



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Industrial

“Biosurfactantes producidos por bacterias ácido-lácticas: selección, caracterización y aplicaciones como aditivos en la formulación de alimentos”

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Química Industrial

Lic. Virginia Melany Lara

Directora de tesis: Dra. Carmen Adriana Campos

Directora Adjunta: Dra. María Fernanda Gliemmo

Consejera de Estudios: Dra. Sandra Guerrero

Fecha de defensa: 12 de julio de 2023

Lugar de trabajo: Instituto de Tecnología de Alimentos y Procesos Químicos (ITAPROQ),
Universidad de Buenos Aires

Biosurfactantes producidos por bacterias ácido-lácticas: selección, caracterización y aplicaciones como aditivos en la formulación de alimentos

El objetivo de esta tesis fue el aislamiento e identificación de bacterias ácido-lácticas (BAL) productoras de biosurfactantes (BS), la selección de aquellos con mejor actividad y la evaluación de su posible empleo como aditivos en la formulación de alimentos. En una primera etapa, a partir de alimentos provenientes de la Patagonia, se aislaron e identificaron nueve BAL que produjeron BS unidos a la célula. La evaluación de sus propiedades tensioactivas permitió seleccionar a cuatro de las cepas productoras. Se evaluó la actividad emulgente, antimicrobiana y antiadhesiva de los compuestos y la capacidad de producción por parte de las BAL. En base a los resultados obtenidos se seleccionó a *Lactiplantibacillus plantarum* Tw226 como la bacteria que presentó además de buenas propiedades funcionales, un mayor rendimiento en la producción del BS. Se realizó un análisis completo del genoma de la cepa productora y se la caracterizó como segura para usos biotecnológicos. En una segunda etapa, se determinaron las condiciones óptimas de producción del BS, se analizó su composición química, propiedades físicas y su actividad emulgente. Se pudo comprobar que el compuesto correspondía a un glicolipopeptido, capaz de disminuir la tensión superficial hasta 46,4 mN/m, con una concentración micelar crítica de 0,11 g/L, soluble y estable en su actividad superficial en el rango de pH entre 5,00 y 7,00. El BS permitió estabilizar emulsiones con 0,15 % m/m de goma xántica a pH 6,00, aun en formulaciones que contenían NaCl o glucosa. También, permitió estabilizar emulsiones de aceite esencial de corteza de canela con una concentración de 5000 ppm, durante al menos nueve semanas. Las emulsiones de aceites esenciales presentaron actividad antioxidante y actividad antimicrobiana frente a *Listeria innocua* y *Zygosaccharomyces bailii*. En una tercera etapa, se estudió la producción del BS utilizando como medio de cultivo alternativo jugo de yacón en combinación con distintas proporciones de caldo MRS. Se encontró que el sistema que generó un rendimiento de BS comparable con el obtenido con caldo MRS, fue el formulado con 75 % v/v de jugo de yacón y 25 % v/v de caldo MRS, presentando, el BS, similares grupos funcionales según un análisis FTIR. El trabajo realizado permitió seleccionar una BAL capaz de producir un BS con propiedades funcionales prometedoras el cual fue capaz de producirse en un medio con menor costo.

Palabras clave: Bacterias ácido-lácticas, biosurfactantes, propiedades tensioactivas, aditivos, emulsiones.

Biosurfactants produced by Lactic acid bacteria: selection, characterization and applications as additives for the formulation of foods

The objective of this thesis was the isolation and identification of lactic acid bacteria (LAB) able to produce biosurfactants (BS), the characterization of those with better activity and the evaluation of a possible use as food additives for the formulation of foods. In a first stage, from Patagonian food products, nine LAB able to produce cell bound BS were isolated and identified. Based on their surfactant properties, four strains were selected. Their emulgent, antimicrobial and antiadhesive activity were evaluated, and the capacity of the selected LAB to produce the BS. Based on results obtained, a *Lactiplantibacillus plantarum* Tw226 was selected since this bacterium exhibited good functional properties and the highest production yield. A complete genomic analysis of the producer strain was performed, and it was characterized as safe for biotechnological uses. In a second stage, the optimal conditions for the BS production, its chemical composition, physical and emulsifying properties were evaluated. It was verified that the compound was a glycolipopeptide able to reduce the surface tension until 46.4 mN/m, with a critical micelle concentration of 0.11 g/L, soluble and stable in its surfactant activity at pH conditions between 5.00 and 7.00. The BS was useful to stabilize emulsions with 0.15 % of xanthan gum at pH 6.00, even in formulations with NaCl and glucose. The BS was also capable of stabilize emulsions with cinnamon bark essential oil in a concentration of 5000 ppm, for at least nine weeks. The emulsions of cinnamon bark essential oil shown antioxidant activity and antimicrobial activity against *Listeria innocua* and *Zygosaccharomyces bailii*. In a third stage, it was studied the production of the BS using as an alternative culture media yacon juice based in combination with different proportion of MRS broth. It was found that the formulation that generated a BS production near to the one produced using MRS, contained 75 % v/v of yacon juice and 25 % v/v of MRS, and in those conditions the BS presents similar functional groups according to FTIR analysis. Therefore, it was achieved the selection of a LAB able to produce a BS with promising functional properties, which can be produced even using an alternative culture medium.

Key words: Lactic acid bacteria, biosurfactants, surfactant properties, additives, emulsions.

Agradecimientos

A la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haberme otorgado las becas para realizar la presente tesis. A la Universidad de Buenos Aires, y en particular al ITAPROQ por permitir mi formación.

A la Universidad de Buenos Aires, por brindarme el espacio y las clases necesarias para la formación doctoral. Por estos 14 años de formación profesional pública.

A la Dra. Carmen Adriana Campos, mi directora de tesis y mentora, por su guía, dedicación, presencia, confianza, enseñanzas y positivismo en este camino. A la Dra. María Fernanda Gliemmo, por ser mi directora asistente, por sus consejos prácticos, brindarme su apoyo y su trabajo meticuloso en búsqueda de la excelencia.

A la Dra. Sandra Guerrero, mi consejera de estudio, gracias por todos los consejos y ayudas a lo largo de toda la tesis.

A la Dra. Lía Noemí Gerschenson, directora del grupo de investigación, por su apoyo e interés constante.

A todos mis compañeros del LOCAP, porque son renuevo en los momentos de cansancio y una mano tendida para ayudarnos a avanzar. Gracias por su ayuda, oídos, enseñanzas y charlas.

A la Dra. Marisol Vallejo y al Dr. Emilio Marguet por generosamente ayudarnos, brindarnos herramientas y conocimiento.

Al grupo de la Dra. Pilosof, del Dr. Jorge Wagner, de la Dra. Cassanello y de la Dra. Guerrero por prestarnos equipamiento que fue clave para el avance de la investigación. A la Universidad de São Paulo, en especial al laboratorio de Biomoléculas, por abrirme sus puertas. La ciencia avanza más lejos cuando es en comunidad.

A toda mi familia por intentar entender lo que estuve haciendo estos años, acompañarme con tanto amor, inculcarme el estudio y la perseverancia como bases de una buena vida.

A mi amado Jorge por bancarme los días de experimental que llegaba tarde a casa, ocuparse de cosas que momentáneamente tenía que dejar de lado y ser mi ayuda idónea. Haces que las cosas difíciles sean más fáciles.

A Dios, dador de todo conocimiento, por abrir puertas que nunca hubiera imaginado. Descubrir los secretos de la naturaleza es un privilegio.

Índice

1. Introducción.....	2
1.1 Aditivos alimentarios.....	2
1.1.2. Aditivos de origen natural	3
1.2 Surfactantes.....	4
1.2.1 Clasificación de los surfactantes	6
1.2.1.1 Surfactantes sintéticos	7
1.2.1.2 Surfactantes naturales	8
1.3. Biosurfactantes microbianos	9
1.3.1 Composición química de los biosurfactantes microbianos.....	10
1.4 Bacterias ácido-lácticas como fuente de biosurfactantes	11
1.4.1 Características de los biosurfactantes producidos por bacterias ácido-lácticas...	12
1.4.2 Fuentes de bacterias ácido-lácticas productoras de biosurfactantes	14
1.4.3 Etapas de la producción de biosurfactantes por bacterias ácido-lácticas	15
1.4.4 Desafíos en la producción de biosurfactantes por bacterias ácido-lácticas	16
1.4.4.1 Producción de biosurfactantes a partir de medios nutritivos alternativos	17
1.5 Funcionalidad de los biosurfactantes.....	18
1.5.1 Actividad tensioactiva y emulsificante.....	19
1.5.1.1 Técnicas utilizadas para el estudio de la tensioactividad	22
1.5.1.2 Técnicas utilizadas para la evaluación de la actividad emulsificante.....	27
1.5.2 Actividad antimicrobiana	34
1.5.2.1 Evaluación de la capacidad antimicrobiana.....	36
1.5.3 Actividad antiadhesiva y antibiofilm.....	37
1.5.3.1 Evaluación de la capacidad antiadhesiva y antibiofilm.....	40
2. Objetivos.....	46
2.1 Objetivos generales.....	46
2.2 Objetivos particulares	46
3. Materiales y métodos	49
3.1 Materiales	49
3.1.1 Reactivos	49
3.1.2 Medios de cultivo	50
3.1.3 Bacterias indicadoras	50
3.1.4 Equipos	50
3.2. Métodos generales	52
3.2.1 Metodologías para el aislamiento, identificación y caracterización de BAL	52
3.2.1.1 Toma de muestra y aislamiento de cepas provenientes de alimentos de la región patagónica.....	52
3.2.1.2 Identificación fenotípica de los aislamientos.....	53

3.2.1.3 Identificación genotípica de las cepas seleccionadas	54
3.2.1.4 Prueba de sensibilidad a antibióticos.....	56
3.2.2 Metodologías para la producción de biosurfactante	57
3.2.2.1 Inóculo	57
3.2.2.2 Producción de biosurfactante	57
3.2.2.3 Extracción del biosurfactante ligado a la célula	59
3.2.2.4 Purificación parcial y liofilización	59
3.2.3 Metodologías para el <i>screening</i> de biosurfactantes.....	59
3.2.3.1 Ensayo del colapso de la gota.....	60
3.2.3.2 Ensayo de la dispersión del aceite	60
3.2.3.3 Evaluación de la hidrofobicidad de las cepas	60
3.2.4 Evaluación del rendimiento en la producción del biosurfactante.....	61
3.2.5 Metodologías directas para la determinación de la tensión superficial	61
3.2.5.1 Tensiómetro de anillo de Du Noüy.....	61
3.2.5.2 Tensiómetro de gota: determinación de tensión superficial dinámica	62
3.2.6 Determinación de capacidad emulgente de biosurfactantes y caracterización de emulsiones	64
3.2.6.1 Determinación del índice de emulsificación.	64
3.2.6.2 Determinación de la distribución, el tamaño de gota, el índice de polidispersidad por dispersión estática de la luz	64
3.2.6.3 Determinación del tamaño de gota por dispersión dinámica de la luz	65
3.2.6.4 Determinación del Potencial Z	65
3.2.6.5 Estudio de la evolución de la turbidez en el tiempo	66
3.2.6.6 Observación microscópica de las emulsiones	67
3.2.6.7 Caracterización reológica de emulsiones	67
3.2.7 Determinación de la actividad antimicrobiana y antibiofilm	68
3.2.7.1 Inóculos	68
3.2.7.2 Determinación de la actividad antiadherente de los sobrenadantes libres de células	69
3.2.7.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de los biosurfactantes	69
3.2.7.4 Determinación de actividad antimicrobiana del biosurfactante seleccionado mediante el ensayo de microdilución en caldo	70
3.2.7.5 Determinación de la actividad antibiofilm por co-incubación	71
3.2.7.6 Determinación de la mínima concentración inhibitoria de emulsiones de aceites esenciales de corteza de canela estabilizadas con el biosurfactante seleccionado.....	71
3.2.8 Caracterización química del biosurfactante seleccionado	73
3.2.8.1 Caracterización química primaria por Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR).....	73
3.2.8.2 Cuantificación de hidratos de carbono	73
3.2.8.3 Cuantificación de proteínas	74
3.2.8.4 Cuantificación de lípidos	74
3.2.8.5 Determinación de humedad	75

3.2.9 Caracterización de las propiedades físicas del biosurfactante seleccionado	76
3.2.9.1 Concentración micelar crítica	76
3.2.9.2 Solubilidad en función del pH	76
3.2.10 Actividad antioxidante	76
3.2.11 Estudio del crecimiento de la cepa productora de biosurfactante empleando distintos medios de cultivo	78
3.2.11.1 Seguimiento del crecimiento a través de la absorbancia	78
3.2.11.2 Seguimiento del crecimiento a través de recuento en placa	79
3.2.11.3 Medición del pH	79
3.2.12 Análisis estadísticos de los datos	80
<i>I. Capítulo 1: Aislamiento y selección de bacterias ácido lácticas productoras de biosurfactante y caracterización de la cepa seleccionada.....</i>	81
I.1 Objetivos particulares.....	81
I.2 Metodologías específicas.....	81
I.3 Resultados y discusión	83
1.3.1 Identificación y capacidad para producir compuestos tensioactivos de las bacterias ácido-lácticas aisladas	83
I.3.2 Estudio de las propiedades funcionales de los sobrenadantes libres de células preseleccionados	86
I.3.2.1 Presión superficial	86
I.3.2.2 Actividad emulsificante: estudio de la capacidad emulsificante.....	88
I.3.2.3 Actividad emulsificante: estudio de la estabilidad física de las emulsiones ..	89
I.3.3 Rendimiento en la producción de biosurfactante	94
I.3.4 Actividad antiadherente	96
I.3.5 Actividad antimicrobiana	98
I.3.6 Análisis genómico de la cepa seleccionada y de resistencia a antibióticos	100
I.4 Conclusiones	103
<i>II. Capítulo 2: Selección de las condiciones de producción del biosurfactante seleccionado y su caracterización fisicoquímica y funcional</i>	106
II.1 Objetivo particulares.....	106
II.2 Metodologías específicas:	106
II.2.2 Caracterización de la actividad superficial del biosurfactante.....	109
II.2.3 Formulación y estudio de emulsiones estabilizadas el biosurfactante seleccionado.....	109
II.2.3.1 Formulación y caracterización de emulsiones de aceite de maíz en presencia de agentes humectantes	109
II.2.3.2 Formulación y caracterización de emulsiones de aceite esencial de corteza de canela en agua.....	110
II.3 Resultados y discusión.....	111
II. 3.1 Optimización de la producción de biosurfactante.....	111

II.3.2 Caracterización química.....	115
II.3.2.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier	115
II.3.2.2 Composición química	116
II.3.3 Caracterización física y funcional.....	117
II.3.3.1 Concentración micelar crítica	117
II.3.3.2 Solubilidad a distintas condiciones de pH	119
II.3.3.3 Análisis dinámico de la tensión superficial en distintas condiciones de pH y en soluciones con agentes humectantes.....	119
II.3.3.4 Formación de emulsiones conteniendo el biosurfactante en presencia de NaCl o glucosa	123
II.3.3.4 Aplicación como agente de control microbiano: actividad antimicrobiana y actividad antibiobilm	133
II.3.3.5 Aplicación como estabilizante de emulsiones de aceites esenciales en agua	134
II.4 Conclusiones.....	144
Capítulo III: Producción del biosurfactante en medios de cultivo alternativos	139
III.1 Objetivo particular del capítulo	139
III.2. Metodologías específicas.....	139
III.2.1 Elaboración del jugo de yacón.....	139
III.2.2 Efecto de la concentración del jugo de yacón y del caldo MRS sobre el crecimiento de la cepa productora del biosurfactante	141
III.2.3 Evaluación del crecimiento en medios con diferentes proporciones de caldo MRS y suplementados con jugo de yacón.....	142
III.2.4 Producción del biosurfactante en diferentes escalas de trabajo y condiciones de aireación.....	142
III.2.5 Producción del biosurfactante en una mayor escala de trabajo	143
III. 3. Resultados y discusión	144
III.3.1 Evaluación del crecimiento de <i>L. plantarum</i> Tw226 empleando caldo MRS o jugo de yacón en distintas concentraciones.....	144
III.3.2 Evaluación del crecimiento de <i>L. plantarum</i> Tw226 en jugo de yacón suplementado con distintas concentraciones de caldo MRS	146
III.3.3 Evaluación de la producción de biosurfactante en distintas condiciones de aireación.....	149
III.3.4 Caracterización química de los biosurfactantes por FTIR.....	152
III.3.5 Producción del biosurfactante a mayor escala de trabajo	154
III. 4 Conclusiones:.....	158
4. Conclusiones generales:.....	168
5. Bibliografía:	171

Abreviaturas utilizadas:

A: valor asintótico

Abs_{max}: absorbancia máxima asintótica

ANOVA: análisis de la varianza

BAL: bacterias ácido láctica

BM: biomasa

BS: biosurfactante/s

D_{3,2}: diámetro de Sauter

D_{4,3}: diámetro de De Brouckere

DLS: dispersión dinámica de luz

CMC: concentración micelar crítica

GRAS: generalmente reconocido como seguro

%IM: disminución porcentual de la adherencia de las células

m: velocidad de crecimiento establecido por el modelo Logístico

PS: presión superficial

%RSA: *Radical Scavenging Activity* (Porcentaje de inhibición de radicales libres)

SLC: sobrenadante libre de células

ti: tiempo inflexión de la fase lag establecido por el modelo Logístico

TSD: tensión superficial dinámica

TSI: índice Turbiscan®

TW: Tween® 80

UFC: unidades formadoras de colonias

Zp: potencial zeta

En letras griegas:

μm: velocidad específica de crecimiento

λ: tiempo de fase de latencia

Introducción

1. Introducción

1.1 Aditivos alimentarios

El modo de obtención de alimentos de la humanidad cambió a través de los siglos, desde la caza y recolección en la era paleolítica, pasando por la domesticación de especies vegetales y animales, así como también la etapa de intercambio de especias y otros bienes en el siglo XV, llegando a nuestros días donde los alimentos se producen mayoritariamente de manera industrial (Atkins y Bowler, 2001; Vos y Bellú, 2019). Este sistema de producción industrial presenta desafíos específicos, relacionados principalmente con el mantenimiento de la calidad durante el transporte y almacenamiento (Campêlo, 2019). Por lo que el estudio de los métodos de preservación de alimentos en el último siglo es vasto, siendo la incorporación de aditivos uno de los factores de conservación utilizados (Carocho et al., 2015).

El Codex Alimentarius (2011) define al término aditivo alimentario como: *“cualquier sustancia que normalmente no se consume como alimento por sí misma y que normalmente no se usa como ingrediente típico del alimento, tenga o no valor nutritivo, cuya adición intencional a los alimentos con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en la fabricación, elaboración, preparación, el tratamiento, el envasado, el embalaje, el transporte o la conservación de dichos alimentos resultan, o puede esperarse razonablemente resultar (directa o indirectamente), en que él o sus subproductos se conviertan en un componente o afecten de otro modo las características de estos alimentos. El término no incluye contaminantes o sustancias añadidas a los alimentos para mantener o mejorar las cualidades nutricionales.”*

Por otro lado, el Código Alimentario Argentino (CAA), define el término de aditivo alimentario como *“cualquier ingrediente agregado a los alimentos intencionalmente, sin el propósito de nutrir, con el objeto de modificar las características físicas, químicas, biológicas o sensoriales, durante la manufactura, procesado, preparación, tratamiento, envasado, acondicionado, almacenado, transporte o manipulación de un alimento; podrá resultar que el propio aditivo o sus derivados se conviertan en un componente de dicho alimento. Esta definición no incluye a los contaminantes o a las sustancias nutritivas que se incorporan a un alimento para mantener o mejorar sus propiedades nutricionales.”*

Las funcionalidades de los aditivos alimentarios son múltiples, el CAA enlista las siguientes: regulador de la acidez, acidulante, anti aglutinante, antiespumante, antioxidante, aromatizante/saborizante, colorante, conservador, edulcorante, emulsificante/emulsionante, espesante, estabilizante, estabilizante del color, resaltador del sabor, agentes de firmeza, mejorador de harinas, espumante, glaseante, gelificantes, humectante, leudante químicos y secuestrante.

El uso de aditivos alimentarios ha aumentado mucho en los últimos años y, como resultado, se estima que el 75% de la dieta contemporánea se compone de alimentos industrializados. En promedio cada persona puede llegar a consumir de 3,6 a 4,5 kg de aditivos alimentarios por año, pero estos valores podrían ser aún mayores (Zengin et al., 2011). Hoy en día, aproximadamente el 100% de la producción de alimentos en todo el mundo se realiza total o parcialmente con la ayuda de sustancias químicas (Chaib y Barone, 2020). En consecuencia, es difícil de concebir la industria de alimentos sin aditivos alimentarios, agentes de limpieza y desinfección de origen químico. Pero, si bien el uso de aditivos está ampliamente insertado en la industria, y proporciona ventajas a nivel tecnológico y económico, también es importante mencionar la preocupación creciente acerca de los mismos sobre la salud de los consumidores y el medioambiente.

En el año 2008, la Autoridad Europea de Sanidad Alimentaria (EFSA), determinó que, si bien los aditivos alimentarios son deseables en cuanto a su funcionalidad, podrían tener efectos negativos en la salud (Bronzwaer, 2008), por lo que era necesario reevaluar la lista de aditivos aprobados. Por otro lado, cada vez son más los estudios que relacionan a distintos aditivos con efectos negativos en la salud, hallando actividad toxicológica y teratogénica en algunos (Sambu et al., 2022), así como también reacciones de hipersensibilidad (Laura et al., 2019). A partir de esto, los consumidores de países industrializados están mucho más interesados en los componentes de los alimentos que hace 50 años atrás, pudiéndose observar una creciente tendencia al rechazo de los aditivos alimentarios artificiales los cuales son mayormente percibidos como insalubres o desconocidos (Asioli et al., 2017).

1.1.2. Aditivos de origen natural

Al aumentar el conocimiento sobre los efectos adversos de los aditivos alimentarios sintéticos, aumenta la demanda de aquellos productos con ingredientes que poseen una

impronta natural, los cuales son percibidos por los consumidores como productos positivos, saludables y amigables con el medio ambiente (McClements y Gummus, 2016; Roman et al., 2017; Zhong et al., 2018). Sin embargo, detrás de esta demanda, la disminución del uso de aditivos alimentarios aumenta la susceptibilidad al deterioro, fisicoquímico y microbiológico, produciendo un incremento de la variedad de microorganismos deteriorativos y patógenos (Brandelli, 2015). También hay estudios que demuestran que el cambio climático que avanza puede favorecer el crecimiento de microorganismos deteriorativos aun en alimentos con baja actividad de agua y aquellos que se considera que no necesitan refrigeración para su preservación (Misiou y Koutsoumanis, 2022). Teniendo en cuenta también, el aumento de la población mundial y las áreas urbanizadas, que confluyen en una creciente demanda de alimentos (Hemathilake, 2022), pensar una industria alimentaria moderna sin el uso de aditivos es meramente una utopía.

Frente a estos factores que convergen en un mismo escenario, surge la necesidad de la búsqueda y el estudio de nuevos componentes de origen natural que puedan ser utilizados como aditivos alimentarios. El hallazgo de estos compuestos permitiría atender la demanda del desarrollo de productos libres o con menor contenido de aditivos sintéticos y al mismo tiempo otorgar estabilidad y extensa vida útil a los alimentos.

Como respuesta a esta problemática, esta tesis se centra en la selección y caracterización de biosurfactantes (BS) - en particular aquellos producidos por bacterias ácido-lácticas - y su aplicación como aditivos potencialmente multifuncionales en la formulación de alimentos.

1.2 Surfactantes

Entre los distintos aditivos empleados en la industria alimentaria, los surfactantes presentan gran importancia desde el punto de vista económico, ya que el mercado para estos ingredientes se estima en alrededor de \$ 2.1 mil millones en 2012 y se preveía que aumente a alrededor de \$ 2.9 mil millones en 2018 (Lerner, 2015). De acuerdo con un relevamiento realizado por Cox et al. (2021), existen más de 100 tipos de emulsificantes que son comúnmente utilizados como aditivos alimentarios de manera global.

Los surfactantes son compuestos que tienen la capacidad de disponerse en la interfase de dos fases inmiscibles, proceso que generalmente se describe como adsorción, generando una disminución de la tensión superficial (Romsted, 2014). Este fenómeno se produce gracias a

que son moléculas anfifílicas, es decir que poseen en su estructura un extremo hidrofílico (polar) y otro hidrofóbico (no polar). La interfaz más simple es la del aire / líquido, que se presenta por ejemplo en las espumas, en este caso, el tensioactivo se adsorberá con el grupo hidrofílico apuntando hacia el líquido polar (agua), dejando la cadena hidrofóbica apuntando hacia el aire, lo que reduce la tensión superficial (γ) (Tadros, 2013).

Otra interfaz es el aceite/agua, la cual se presenta en las emulsiones y donde la porción hidrofílica del surfactante se orientará hacia el agua y la porción hidrofóbica hacia el aceite, generando una disminución de la tensión interfacial (Figura 1.1-A). En el caso de que se le otorgue a la mezcla de aceite y agua suficiente energía, se formarán gotas en el seno del líquido y el agente surfactante se depositará alrededor de las estas formando micelas (Figura 1.1-B). Por lo tanto, se espera que cuando sea adicionado un surfactante a una formulación alimentaria, este aditivo sea capaz de:

- Generar reducciones en la tensión superficial e interfacial.
- Disponerse rápidamente en la interfase aceite/agua para facilitar la formación de gotas.
- Retardar los mecanismos de desestabilización.

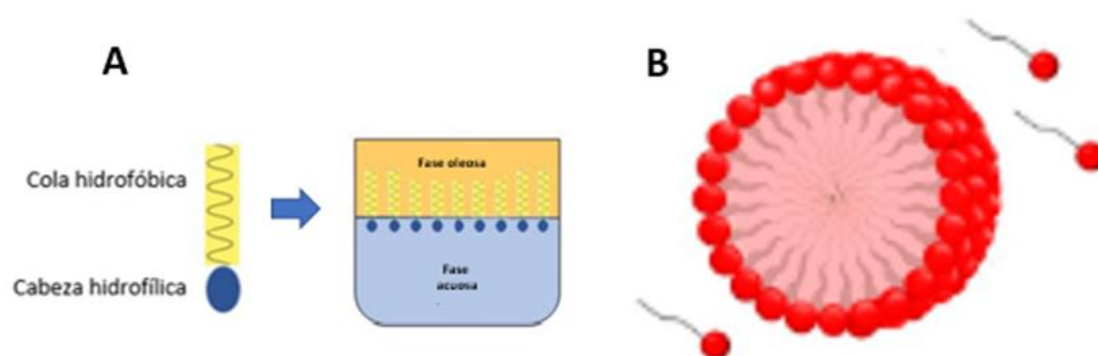


Figura 1.1: Panel A: Disposición de moléculas tensioactivas en la interfase (Cox et al., 2021). Panel B: Esquema de una micela formada a través del uso de surfactantes (Santos et al., 2015).

1.2.1 Clasificación de los surfactantes

Los surfactantes pueden clasificarse a través de distintos criterios como:

- Fuente de origen: de acuerdo con si son sintéticos o derivados de matrices naturales. Dos emulsificantes sintéticos ampliamente utilizados son los polisorbatos (Tween®) o sorbitán (Span), mientras que los emulsificantes naturales más comúnmente utilizados pueden tener diversos orígenes como animal: proteínas de suero láctico, proteína de huevo, gelatina y caseína o vegetal como lecitina de soja (McClements y Gumus, 2016).
- Polaridad: puede ser aniónicos, catiónicos, no iónicos o zwitteriones. Las aplicaciones y características varían de acuerdo con sus propiedades. Los aniónicos se encuentran comercializados ampliamente, existiendo tanto de origen natural como sintético, poseen buenas propiedades emulgentes y tensioactivas. Los catiónicos normalmente se utilizan en superficies con carga negativa, como agentes anticorrosivos, agentes de flotación, suavizantes y bactericidas. Los no iónicos poseen buenas propiedades emulgentes a bajas temperaturas y emulsificantes. Por último, los zwitteriones no se destacan por sus propiedades emulsificantes, pero son buenos para ser aplicados en la industria cosmética por su excelente compatibilidad con la piel (Fenibo et al., 2019).
- Peso molecular: pueden ser de bajo o alto peso molecular. Los de bajo peso molecular suelen ser, carboxilatos, sulfatos, fosfatos, sulfonatos, ésteres de ácidos grasos de sorbitán (Span) y ésteres de ácidos grasos de polietoxisorbitán (Tween®) y los de alto peso molecular suelen ser polímeros como proteínas (Tadros, 2006).

Como se puede observar los tipos de surfactantes que actualmente se comercializan son diversos, y así también son las propiedades que poseen y los efectos adversos que cada uno puede presentar sobre la salud humana. Debido a esto, resulta de interés su reemplazo por productos naturales. El cual es uno de los objetivos de este trabajo, en el cual con fines comparativos se utiliza como surfactante sintético de referencia al Tween® 80 perteneciente a los polisorbatos, cuya importancia y propiedades se detallan a continuación.

1.2.1.1 Surfactantes sintéticos

Entre los surfactantes sintéticos más utilizados se encuentra el grupo de los polisorbatos, conocidos también comercialmente como “Tween®”, son surfactantes no iónicos de ésteres de ácidos grasos de polietoxisorbitán (Figura 1.2).

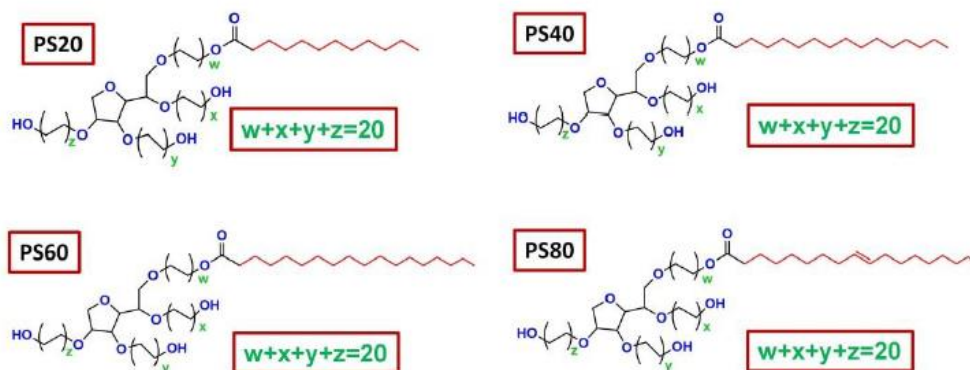


Figura 1.2: Estructura química de varios polisorbatos. PS20: polisorbato 20. PS40: Polisorbato 40, PS60: Polisorbato 60, PS80: Polisorbato 80 (Ravichandran et al., 2021).

Debido a su fácil disponibilidad comercial, la facilidad de sus modificaciones químicas y óptimas propiedades funcionales, los polisorbatos son ampliamente utilizados tanto en la industria de alimentos como en la industria farmacéutica (Ravichandran et al., 2022). Sin embargo, el uso de estos aditivos es cada vez más cuestionado. Estudios sobre la ingesta de aditivos en Francia, Italia, Reino Unido e Irlanda, indicaron un consumo de los emulsionantes polisorbato 20 y polisorbato 65, también conocidos como Tween® 20 y Tween® 65, en proporciones mayores a la ingesta diaria admisible (IDA) en niños (Vin et al., 2013), pudiendo generarse efectos adversos en los consumidores (Cox et al., 2022). También, estudios de la carcinogenicidad del polisorbato 80 evidenciaron actividad cancerígena (National Toxicology Program, 1992), siendo actualmente, un aditivo prohibido por la FDA (Cox et al., 2022). Sin embargo, es un aditivo ampliamente utilizado en numerosos países, entre ellos Argentina.

1.2.1.2 Surfactantes naturales

Debido a la creciente demanda de productos de origen natural por parte de los consumidores, el estudio y desarrollo de emulsificantes de origen natural es de interés (Mukherjee et al., 2006).

Los BS pueden obtenerse a partir fuentes vegetales, animales y microbianas, siendo estos últimos producidos por bacterias, hongos y levaduras (Sharma., 2016; McClements y Gumus, 2016). Los BS más frecuentemente utilizados son las proteínas, los fosfolípidos, así como también los producidos por microorganismos (McClement y Gumus, 2016).

Algunos ejemplos de BS ampliamente estudiados en la industria de alimentos son:

- **Las saponinas:** son biomoléculas de alto peso molecular, que poseen un núcleo de aglicona (parte no soluble en agua) que tiene 27 a 30 átomos de carbono, con uno o dos restos de hidratos de carbono que le otorgan las propiedades anfifílicas (El Aziz et al., 2019). Las matrices de las que se pueden aislar las saponinas son amplias, como la corteza de quillaja (Reichert et al., 2019), la mandioca (Ralla et al., 2018a), el ginseng (Ralla et al., 2017), la avena (Ralla et al., 2018b), entre otras. Sin embargo, en algunos casos, como en el de las saponinas de quinua, estas presentan la desventaja de poseer un factor anti-nutricional y posible toxicidad (El Hazzam et al., 2020). No obstante, se destacan por su actividad emulsificante, con capacidad de generar disminuciones en la tensión superficial similares a los surfactantes sintéticos como los pertenecientes a la familia del Tween®, Span, SDS y esteres de sacarosa. También son reconocidas por su actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antioxidante, antiviral e hipocolesterolémica, lo que extendió su aplicación a la industria de los alimentos y farmacéutica (Schereiner, 2022).
- **Los fosfolípidos:** los ingredientes funcionales provenientes de fosfolípidos son comúnmente llamados lecitinas. Estas se pueden aislar de numerosas fuentes biológicas, siendo las más comunes la soja, el huevo, la leche, la colza, la semilla de canola, la semilla de algodón y el girasol. Los fosfolípidos más comunes que se encuentran en las formulaciones comerciales de lecitina son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico (Ericson, 2008). En algunas lecitinas comerciales, llamadas lisolecitinas, se elimina una de las cadenas de ácidos grasos para alterar sus características funcionales (Casado et al., 2012). Por lo tanto, es cuestionable que las

lisolecitinas se las considere emulsionantes naturales (McClements y Gumus, 2016). De todos modos, las lecitinas, en especial la lecitina de soja es ampliamente utilizada en la industria de los alimentos por su multifuncionalidad (Szuhaj, 2019).

- **Las proteínas:** en este grupo se destacan las proteínas lácteas, las proteínas del huevo, así como también las proteínas de vegetales provenientes de algunas legumbres como la soja, garbanzos y frijoles (Raffa et al., 2015; McClements y Gummus, 2016). A pesar de sus propiedades funcionales y los beneficios que posee su origen natural, presentan ciertas limitaciones en términos de su baja solubilidad a pH ácido, el cual es característico de algunos alimentos. Se encuentran en estudio diversas estrategias para su aplicación como su uso combinado con otras biomoléculas o generar modificaciones directas sobre su estructura (Wang y Lou, 2023; Chen et al., 2023).

Por lo tanto, se puede plantear que la implementación de origen vegetal y animal en industria alimentaria presenta desafíos relacionados con la toxicidad de las moléculas y con la implementación de menores modificaciones químicas en su estructura, por lo que es un área en pleno desarrollo. Una fuente de BS menos estudiada son los microorganismos.

1.3. Biosurfactantes microbianos

Los tipos de microorganismos capaces de producir BS son variados, pudiendo ser producidos por bacterias, mohos o levaduras. Estos BS pueden ser moléculas que se extraen de la superficie de las células, denominándose “biosurfactantes ligados a la célula”, o ser liberadas al medio de manera extracelular. Poseen una masa molecular entre 500 y 1500 Da, por lo que pueden clasificarse en BS de alto o bajo peso molecular (Saruboo et al., 2022).

Las razones por las que los microorganismos producen BS no están aún dilucidadas. Algunas hipótesis indican que la producción de BS se relaciona con mecanismos que facilitarían la absorción de sustratos hidrófobos, como sustancias oleosas. La liberación de BS permitiría la emulsificación de los sustratos hidrófobos, aumentando el área superficial de nutrientes disponibles y permitiendo un mayor aprovechamiento de estos por parte de los microorganismos (Sharma et al., 2016). Otras teorías indican que estarían ligados a la capacidad de las células de adherirse a las superficies e interfases (Rosenberg y Ron, 1997). Los BS son también reconocidos como componentes para el funcionamiento del metabolismo celular, movimiento y defensa. En el caso de los ramnolípidos, BS

extracelulares, se los identificó como moléculas asociadas a los mecanismos de “*quorum sensing*” para la formación de biofilms, fomentando la absorción de sustratos poco solubles, lubricantes, inmunomoduladores, metabolitos secundarios y sustancias antimicrobianas conocidas (Fracchia et al. 2012; Dusane et al. 2010).

Los BS son caracterizados como aditivos multifuncionales. Se han registrado BS con actividad antimicrobiana (Madhu et al., 2014; Sharma et al., 2016), emulsionante (Portilla-Rivera et al., 2008; Gudiña et al., 2016) y antiadherente (Meylheuc et al., 2006; Sharma et al., 2016). También se propusieron utilizar para la biorremediación ambiental y para usos médicos (Ferreira et al., 2017; Walencka et al., 2007). Por lo cual, su aplicación no se limita sólo a su capacidad emulgente.

Las aplicaciones estudiadas para los BS microbianos son amplias, desde aplicaciones en la industria cosmética, gracias a que poseen capacidad humectante y buena compatibilidad con la piel (Ahmadi-Ashtiani et al, 2020), como agentes que facilitan la recuperación de petróleo (Chafale y Kapley, 2022), en aplicaciones biomédicas, con el fin de inhibir el desarrollo de biofilms (Giri et al., 2019), y alimentarias, como estabilizantes (Ribeiro et al., 2020).

Cómo se mencionó anteriormente, algunos de los beneficios de los BS son su baja toxicidad, en comparación con los surfactantes sintéticos (Banat et al., 2010; Naughton et al., 2019), que son biodegradables, que poseen distintas naturalezas y algunos son estables en condiciones extremas de pH y temperatura (Sharma et al., 2016). Sin embargo, uno de los beneficios más destacables de los BS producidos por microorganismos es la posibilidad de ser sintetizados a partir de subproductos agroindustriales, siendo una alternativa para su aprovechamiento, dando lugar a una economía circular (Lakatos et al., 2022).

1.3.1 Composición química de los biosurfactentes microbianos

Los BS son considerados como mezclas complejas de diferentes compuestos anfífilos cuya composición depende del microorganismo productor. Su naturaleza química es diversa pudiéndose destacar a los siguientes grupos:

- **Glicolípidos**: se consideran BS de bajo peso molecular, compuestos por una porción hidrofílica de carbohidratos y una porción hidrofóbica de ácidos grasos (Banat et al., 2010; Naughton et al., 2019). Dentro de esta categoría se encuentran los

ramnolípidos, que están conformados por ácidos grasos de 8 a 16 carbonos (Déziel et al., 1999). Estos son uno de los BS más ampliamente estudiados y comercialmente disponibles, se obtienen mayoritariamente a partir de *Pseudomonas aeruginosa* (de Araujo et al., 2016). En cuanto a sus propiedades físicas, son capaces de reducir la tensión superficial de 72 mN/m a 30 mN/m y poseen una concentración micelar crítica (CMC) que varía de 50 mg/L a 200 mg/L según la cepa de origen (Saruboo et al., 2022). También se han obtenido glicolípidos con capacidad surfactante a partir de cepas de levaduras del género *Candida* (Zenati et al., 2018).

- **Lipopéptidos:** están compuestos por cadenas de aminoácidos y residuos de ácidos grasos (Saruboo et al., 2022). El lipopéptido más estudiado y comercializado es el “Surfactin”, producido por *Bacillus subtilis* (de Araujo et al., 2016). Se han descubierto al menos 30 clases de este tipo de surfactantes, tienen actividades antibacteriana, antiviral, antifúngica y pueden actuar como eficientes emulsionantes, estabilizadores y modificadores de superficie en la industria alimentaria (Cochrane et al., 2016; Salek et al., 2019). Pueden reducir la tensión superficial de 72 a 27 mN/m en concentraciones menores a 5% y poseen una baja CMC (Datta et al., 2020).
- **Surfactantes poliméricos:** los más conocidos son el liposan, proveniente de *Candida lipolítica*, y el emulsan, proveniente de *Acinetobacter radioresistens* (Saruboo et al., 2022). El emulsan posee estructura de lipopolisacárido (Raffa et al., 2015) y el liposan, de glicoproteína (Adetunji y Olaniran, 2021).

Según Sharma et al. (2016), los BS microbianos más estudiados son los provenientes de las cepas pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* y *Candida*, siendo en menor medida el estudio de las bacterias ácido-lácticas (BAL) como fuente de BS. Este último grupo, es de creciente interés especialmente para la industria alimentaria en el cual las BAL se han utilizado por siglos con fines biotecnológicos.

1.4 Bacterias ácido-lácticas como fuente de biosurfactantes

Las BAL comprenden un grupo de bacterias Gram positivas que poseen similitudes a nivel morfológico, metabólico y fisiológico, teniendo también una cercanía a nivel filogenético. Pueden describirse como no esporuladas, cocos o bacilos, anaerobios aerotolerantes, que obtienen energía a través de la fermentación de carbohidratos y producen ácido láctico como principal producto de dicho proceso (Khalid et al., 2011; Mouafo et al., 2022). Debido a sus

propiedades fermentativas, se han empleado para producir alimentos fermentados durante miles de años (Rhee et al. 2011; Widyastuti y Febrisiantosa, 2014). Las BAL también pueden encontrarse en la superficie de las mucosas de humanos, de distintos animales sanos (Ouwehand et al. 2002; El Aidy et al. 2015), incluyendo animales provenientes del medio marino (Sequeiros et al., 2010).

Algunas BAL poseen propiedades probióticas y desempeñan funciones protectoras al producir compuestos como ácido láctico, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y BS, que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorativos (Agboola et al. 2014). En numerosos trabajos se propone el uso de estos metabolitos como aditivos naturales (Campos et al., 2013; Schelegueda et al., 2015; Sharma., 2016).

Una ventaja que poseen los BS producidos por BAL de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus* es que estas bacterias son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) de acuerdo con la Administración de alimentos y drogas de los Estados Unidos, por lo cual, su aplicación en la industria alimentaria y de la salud es ampliamente aceptada (Burdock y Carabin, 2004; Mouafo et al., 2022). Esta cualidad no se presenta en la mayoría de los microorganismos reconocidos como productores de BS, por lo que los metabolitos producidos por ellos requieren de estudios específicos para autorizar su uso en alimentos (Widyastuti y Febrisiantosa, 2014; Sharma et al., 2016). Por esta razón, es de interés el estudio de la producción de BS producidos por BAL de los géneros ya mencionados, ya que han sido ampliamente utilizados en los alimentos desde tiempos remotos y se espera que los BS sean inocuos.

1.4.1 Características de los biosurfactantes producidos por bacterias ácido-lácticas

En los últimos 30 años se ha estudiado la producción de BS de diversas BAL. En la Tabla 1.1, se muestra una recopilación de datos acerca de los BS obtenidos por BAL utilizando como medio de producción caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe), medio nutritivo ampliamente utilizado para el desarrollo de este tipo de bacterias.

Tabla 1.1: Bacterias productoras de BS, clasificación del BS, naturaleza y rendimiento de producción utilizando como medio nutritivo caldo MRS (Mouafo et al., 2022).

Bacteria productora	Tipo de BS	Rendimiento (g/l)	Naturaleza del BS	Referencia
<i>L. crispatus</i> BCI	Ligado a la celula	0,06	lipoproteico	De Gregorio y col. (2020)
<i>L. acidophilus</i> NCIM 2903	Ligado a la celula	0,17	glicolipoproteica	Stpote y col (2019)
<i>L. jensenii</i> P6A	Ligado a la celula	0,27	glicolipoproteica	Moraís y col (2017)
<i>L. gasseri</i> P65	Ligado a la celula	0,42	glicolipoproteica	Moraís y col (2017)
<i>L. plantarum</i> G88	Extracelular	0,3	glicolipoproteica	Moufano, Mbawala y Ndjouenkeu (2018)
<i>L. delbrueckii</i> N2	Extracelular	0,51	glicolipoproteica	Moufano, Mbawala y Ndjouenkeu (2018)
<i>L. agilis</i> CCUG31450	Ligado a la celula	0,84	glicoproteico	Gudiña y col (2015)
<i>L. animalis</i> ATCC35046	Ligado a la celula	0,37	glicoproteico	Gudiña y col. (2015)
<i>L. buchneri</i> ATCC4005	Ligado a la celula	0,18	glicoproteico	Gudiña y col. (2015)
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	Ligado a la celula	2,01	glicoproteico	Benzadnia y col. (2020)
<i>Lactobacillus</i> CV8LAC	Extracelular	1,04	glicoproteico	Franccia y col. (2010)
<i>S. thermophilus</i> A	Ligado a la celula	0,8	glicolípido	Rodrigues, Texeira y Oliveira (2006)
<i>Lc. Lactis</i> 53	Ligado a la celula	0,7	glicolípido	Rodrigues, Texeira y Olivera (2006)
<i>L. fermenti</i> 126	Ligado a la celula	2,23	fosfoglicoproteico	Brezozowski y col. (2011)

Como puede observar, las BAL productoras de BS son diversas, así como también la naturaleza de los BS. Algunas BAL, son capaces de producir BS extracelulares, metabolitos que son excretados al medio de cultivo durante la fermentación, y otras producen BS ligados a las células, metabolitos que deben ser extraídos de la pared celular de la bacteria al finalizar la fermentación. La naturaleza química y los rendimientos varían notoriamente con la cepa productora. En general, los BS producidos por BAL estarían conformados por una mezcla de diferentes compuestos, cuya composición varía de acuerdo con la cepa productora. Estos BS pueden poseer distinta naturaleza química pudiendo ser clasificados como lipopolisacáridos, glicolípidos, glicoproteínas o glicolipoproteínas (Rodrigues, et al., 2006; Sauvageau et al., 2012; Gudiña et al., 2015; Vecino et al., 2013).

Los estudios sobre BS de BAL demuestran que estos compuestos pueden poseer actividad emulsificante (Ferreira et al., 2017; Nataraj et al., 2021), así como también actividad antimicrobiana (Gudiña et al., 2010; Gudiña et al., 2015; Cornea et al., 2016), actividad antibiofilm (Rodrigues et al., 2004; Walencka et al., 2007; Sharma et al., 2016; Nataraj et al., 2021). También se ha informado su uso coadyuvante alimentario de flotación (Vecino et al., 2013). A partir de esto se puede plantear que los BS pueden ser considerados compuestos multifuncionales, lo que proporciona una ventaja a nivel de la formulación de alimentos, debido a que con la incorporación de un único aditivo se lograrían múltiples funciones tecnológicas.

1.4.2 Fuentes de bacterias ácido-lácticas productoras de biosurfactantes

Se han encontrado BS a partir de BAL obtenidas de diferentes fuentes, entre ellas, el tracto urogenital de mujeres sanas (Velraeds et al., 1996), frutas y vegetales (Fracchia et al., 2010), alimentos fermentados a base de arroz (Madhu y Papulla, 2014), derivados de productos lácteos (Cornea et al., 2016), entre otros.

En los últimos años, el área de investigación abocada al hallazgo de nuevas biomoléculas se orientó hacia cepas provenientes de ambientes que presentan condiciones extremas. Esto es debido a que en los ecosistemas con condiciones extremas los microorganismos desarrollan estrategias para sobrevivir y sus metabolitos frecuentemente poseen características distintivas (Barros et al., 2013).

En los ambientes acuáticos, los microorganismos experimentan competencia por nutrientes y sustratos por lo que es común que las especies bacterianas que presenten una o más estrategias competitivas sean más propensas a la colonización y a la absorción de nutrientes (Grossart et al., 2003; Barros et al., 2013). Por otro lado, el microbiota gastrointestinal de vertebrados, como los peces de ambientes fríos y cálidos, son fuente de cepas probióticas (Buntin et al., 2008), las cuales suelen ser cepas de BAL que han sido asociadas con la producción de BS (Konkol et al., 2019; Lopez-Prieto et al., 2019).

Por lo tanto, el ambiente marino, y en especial el ambiente patagónico por sus condiciones extremas, así como los peces que viven en esas zonas, serían prometedores para el descubrimiento de cepas capaces de producir nuevos compuestos bioactivos y relevantes, incluidos antibióticos, enzimas, vitaminas, fármacos y BS (Gudiña et al., 2016). Entonces, las BAL provenientes de peces de la Patagonia resultan un grupo de interés en cuanto a su potencialidad de producción de BS.

1.4.3 Etapas de la producción de biosurfactantes por bacterias ácido-lácticas

La producción de BS por BAL puede separarse en tres etapas, fermentación, extracción y purificación:

1) *Fermentación*

La etapa de fermentación consiste en generar la multiplicación de las bacterias en un medio nutritivo en condiciones controladas de aireación, agitación, temperatura y tiempo. En bibliografía se informa la producción de BS a partir del cultivo de BAL en diferentes medios líquidos, siendo el más comúnmente empleado el caldo MRS (Gudiña et al., 2006; Ferreira et al., 2017). En cuanto a las condiciones de aireación, agitación, temperatura y tiempo son diversas. Tanto el medio nutritivo, como el tiempo de producción, agitación y temperatura son determinantes para el rendimiento de la producción de BS, como también su composición química y funcionalidad (Rodrigues et al., 2006; Montoya et al., 2021).

2) *Extracción*

La extracción varía de acuerdo con el tipo de BS que se busque aislar. En el caso de que se quiera aislar BS ligados a la célula, se realiza el lavado de las bacterias mediante centrifugaciones y lavados sucesivos del pellet con agua destilada. Las bacterias se

resuspenden en un solvente adecuado, usualmente, buffer fosfato salino (PBS) y se agita suavemente para la liberación del BS. Finalmente, por centrifugación, se separan las BAL del sobrenadante libre de células (SLC), en el cual se encontrará el BS (Gudiña et al., 2015; Ferreira et al., 2017; Morais et al., 2017). Los cambios en el buffer de extracción, las condiciones de agitación y temperatura también pueden generar cambios en la composición y el rendimiento de la producción de BS (Vecino et al., 2015). En el caso de BS extracelulares, estos se liberan en el caldo de fermentación, por lo que se obtienen luego por precipitación ácida y técnicas extractivas con solvente (Mouafo et al., 2018).

3) Purificación:

Por último, se realiza la purificación. En el caso de los BS ligados a las células, los BS se encontrarán inmersos en el solvente de extracción por lo que el SLC estará conformado por el BS con una mezcla de los componentes presentes en el solvente, en particular sales cuando se emplean buffers. Para separarlo de la solución salina se realiza un proceso de diálisis, a partir del cual se obtienen al BS en agua. Finalmente, el BS se suele liofilizar para obtener un producto libre de agua y en estado sólido (Gudiña et al., 2006; Ferreira et al., 2017). En ciertas investigaciones, se opta luego por seguir profundizando en la purificación del BS y separar los componentes que lo conforman, realizando técnicas de separación cromatográficas o por precipitación acídica (Sharma et al., 2015).

1.4.4 Desafíos en la producción de biosurfactantes por bacterias ácido-lácticas

La producción de BS presenta desafíos, en especial por su alto costo de producción y bajo rendimiento, que dificulta la producción a gran escala, como también por la falta de estudios de estos en preparaciones de tipo industrial (Sharma, 2016).

Estos desafíos despiertan la necesidad de continuar buscando e investigando nuevas cepas que posean mayores rendimientos, así como también mecanismos de optimización de la producción y de estudios que profundicen su caracterización en sistemas alimentarios o similares. Una de las alternativas estudiadas para la disminución de los costos de producción de BS es el uso de subproductos de la industria alimentaria como medios nutritivos, siendo aprovechados por las BAL para la producción de BS.

1.4.4.1 Producción de biosurfactantes a partir de medios nutritivos alternativos

La producción de BS de BAL se realiza a partir de fermentaciones en las cuales las bacterias consumen un sustrato para producir la biomolécula de interés. En este tipo de procesos biotecnológicos el tipo de sustrato en que se desarrolla la bacteria será fundamental para definir las propiedades del producto obtenido, así como también su costo.

Las primeras investigaciones sobre la producción de BS de BAL utilizaron como medio de cultivo caldo MRS, medio complejo utilizado normalmente para la detección y enriquecimiento de lactobacilos. En los últimos años, la búsqueda de nuevos usos de los subproductos de la industria alimentaria está en auge. Entre ellos, su empleo como medio de cultivo para la producción de biomoléculas como los BS. Por otra parte, se registró la capacidad de ciertas cepas de BAL para producir BS a partir de residuos agroindustriales. Esta práctica permite la reutilización de los subproductos para evitar su eliminación y la producción de compuestos tóxicos (Moldes et al., 2007), así como también la reducción de los costos de producción (Ebadipour et al., 2015). Esto abre el panorama hacia un aprovechamiento de los residuos y la posibilidad de ser consideradas prácticas útiles en el desarrollo de sistemas de producción circular (Moldes et al., 2007; Portilla-Rivera et al., 2008; Thavasi et al., 2011).

Algunos de los subproductos estudiados para la producción de BS a partir de BAL son suero lácteo (Rodrigues et al., 2006; Madhu y Prapulla., 2006), licor de maíz fermentado (Ebadipour et al., 2015), salvado de cebada, recorte de sarmientos, mazorcas de maíz, residuos de *Eucalyptus globulus* (Moldes et al., 2007), orujo de uva destilado, cáscaras de avellana, cáscaras de nuez (Portilla – Rivera et al., 2008) y subproductos de mango (Sittisart y Gacaluck, 2022), entre otros.

Entre los alimentos regionales poco industrializados, se encuentra el yacón, éste es una planta andina cuya raíz tuberosa presenta un alto contenido de compuestos prebióticos, en especial los fructooligosacáridos e inulina, conocidos por su capacidad de mejorar algunas funciones metabólicas y el sistema inmunológico (Choque Delgado et al., 2013). En cuanto a su perfil nutricional (Figura 1.3), en base seca contiene un 94,15 % de hidratos de carbono incluyendo azúcares sencillos como glucosa y fructosa, así como también los fructanos anteriormente mencionados. Contiene también un 2,45 % de proteína y un 0,87 % de lípidos en base seca

(Caetano et al., 2016). Por estas propiedades, esta raíz puede ser un medio adecuado para la producción de BS, ya que su composición de azúcares es prometedora para el crecimiento microbiano.

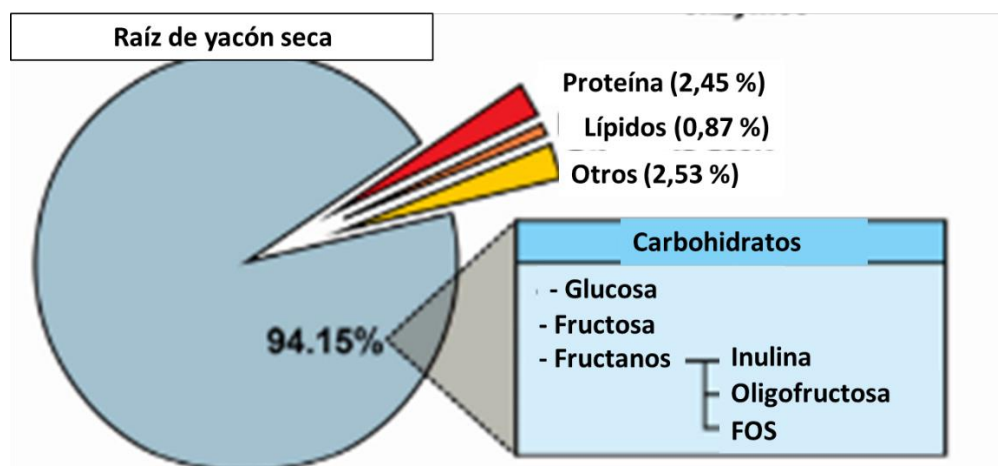


Figura 1.3: Composición en base seca de la raíz tuberosa de yacón. Gráfico adaptado de Caetano et al. (2016)

1.5 Funcionalidad de los biosurfactantes

Como se mencionó anteriormente, es de interés el hallazgo y selección de compuestos naturales que puedan ser utilizados como aditivos alimentarios. A la hora de seleccionar este tipo de compuestos es fundamental la evaluación de su funcionalidad.

Los trabajos relacionados con la selección de BS suelen enfocarse en la presencia de alguna de estas tres funciones:

- Actividad tensioactiva y emulsificante
- Actividad antimicrobiana
- Actividad antibiofilm

A continuación, se profundizará en la causa de la selección de estos tres ejes y los fundamentos de las técnicas aplicadas para su estudio.

1.5.1 Actividad tensioactiva y emulsificante

Dentro de los alimentos producidos industrialmente, los alimentos como aderezos, mantecas, cremas, salsas, bebidas y sopas podrían englobarse dentro de lo que llamaremos emulsiones alimentarias (McClements, 2016). Debido a sus propiedades fisicoquímicas este tipo de alimentos no podría comercializarse sin la adición de uno o más agentes con actividad emulsificante.

Se conoce como emulsión a una suspensión heterogénea de gotas microscópicas de un líquido dispersas en una fase continua de otro líquido inmiscible (McClements, 2015). En el caso de las emulsiones alimentarias las fases, normalmente, están compuestas por aceite y agua, conformando respectivamente una fase oleosa (O) y una fase acuosa (W). Existen distintos tipos de emulsiones, las cuales se clasifican de acuerdo con cuál es la naturaleza de las fases que las componen (Figura 1.4):

Emulsión aceite en agua (O/W): En estos sistemas, la fase oleosa se encuentra dispersa mientras que la fase continua es la acuosa. Este es el caso de aderezos, salsas, bebidas y sopas.

Emulsión agua en aceite (W/O): En este caso la fase dispersa es la fase acuosa, mientras que la fase continua que las contiene es la fase oleosa. Este es el caso de las margarinas, mantecas y cremas.

Emulsiones múltiples: Las emulsiones aceite-agua-aceite (O/W/O) se conforman por gotas de aceite dispersas en gotas de agua mayores y estas se encuentran dispersas en una fase oleosa. Las emulsiones agua-aceite-agua (W/O/W) consisten en gotas de agua dispersas en gotas de aceite mayores, que a su vez están dispersas en un medio acuoso continuo (McClements y Li, 2010).

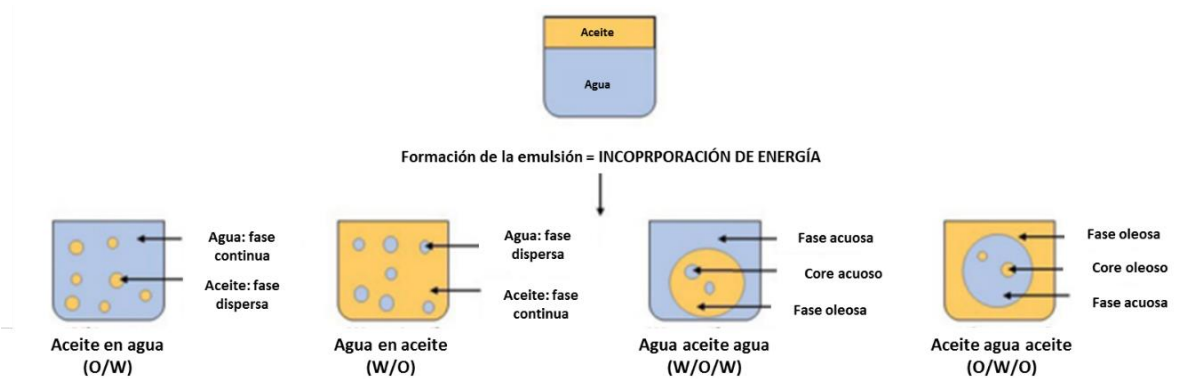


Figura 1.4: Formación de una emulsión y los cuatro tipos de emulsiones que se pueden formar (Cox et al., 2023).

Para crear un sistema en el cual dos fases inmiscibles se encuentren mezcladas es necesario incorporar energía. En la industria alimentaria, este proceso generalmente se lleva a cabo utilizando métodos de alta energía que utilizan dispositivos mecánicos (homogeneizadores), que someten a las fases a fuerzas disruptivas para formar pequeñas gotas. Al formarse gotas en el seno del sistema, se produce un aumento en el área interfacial. La Ecuación 1.1, representa al cambio de energía libre en el proceso de formación de una emulsión ($\Delta G_{\text{formación}}$), la cual es función del área interfacial (ΔA) y la tensión superficial (γ). Puede observarse que un aumento del área interfacial, fenómeno que sucede durante la formación de las gotas, producirá un aumento de la $\Delta G_{\text{formación}}$, reflejando que el fenómeno de la formación de una emulsión es termodinámicamente desfavorable (McClements, 2016).

$$\Delta G_{\text{formación}} = \gamma \cdot \Delta A \text{ (Ecuación 1.1)}$$

Debido a las características termodinámicas de las emulsiones, las mismas tenderán a evolucionar hacia un nivel de menor energía desde el momento de su formación. Por lo que el sistema evoluciona hacia una disminución del área interfacial, la cual puede suceder por distintos mecanismos, pero cuyo fin siempre es la separación de las fases. Este proceso en el cual una emulsión se transforma nuevamente en un sistema cuyas fases se encuentran separadas es llamado desestabilización. Distintos mecanismos pueden contribuir a la desestabilización, como consecuencia de la diferencia de densidad entre las fases continua y dispersa, de las interacciones entre las gotas y de la estructura y elasticidad del film interfacial (Mancuso et al., 1999). Algunos de los mecanismos de desestabilización física de las emulsiones son los siguientes (Figura 1.5):

- **Separación gravitacional:** normalmente, la densidad de las gotas en una emulsión es diferente a la del líquido que las rodea, por lo que una fuerza gravitacional neta actúa sobre ellas. Si las gotas poseen una densidad menor que el líquido circundante, tenderán a moverse hacia arriba, lo que se conoce como cremado. Pero, si poseen una densidad mayor a la del líquido circundante, tenderán a moverse hacia abajo, lo que se conoce como sedimentación. (McClements, 2007).

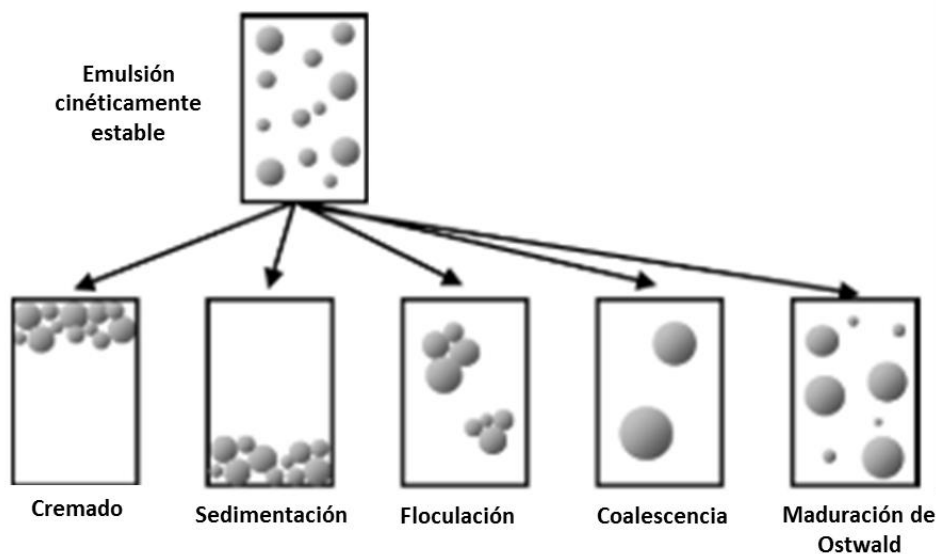


Figura 1.5: Diagrama esquemático de los mecanismos de inestabilidad más comunes que ocurren en las emulsiones alimentarias: cremado, sedimentación, floculación, coalescencia, maduración de Ostwald (McClements, 2007)

- **Floculación y coalescencia:** la floculación es el proceso mediante el cual dos o más gotas se aproximan entre sí, pero mantienen su integridad individual. La tendencia a que se produzca la floculación de las gotas depende principalmente del equilibrio de las fuerzas de atracción y repulsión que actúan sobre ellas: si las fuerzas de atracción dominan, las gotas tenderán a agregarse, pero si lo hacen las de repulsión, entonces serán estables a la agregación. En una emulsión no es deseable que se produzca la floculación, ya que esto podría derivar en un aumento de la velocidad de los procesos de separación gravitacional y consiguiente separación de fases (McClements, 2007). También la formación de flóculos puede derivar en un aumento de la viscosidad de la emulsión lo que conlleva a un cambio en las propiedades sensoriales y reológicas de la emulsión (Demetriades y McClements, 1999; Quemada y Berli, 2002). Por otro lado, la coalescencia se define como el proceso por el cual dos o más gotas se fusionan para formar una sola gota más

grande. La coalescencia, al igual que la floculación, genera un aumento en la velocidad de sedimentación y cremado debido al aumento del tamaño de las gotas generando una mayor influencia de las fuerzas gravitacionales sobre las mismas (McClements, 2007).

- **Maduración de Ostwald:** La maduración de Ostwald es el proceso mediante el cual gotas grandes crecen a expensas de las más pequeñas debido al transporte de masa de la fase dispersa de una gota a otra a través de la fase continua intermedia. La maduración de Ostwald es importante en emulsiones de aceite en agua que contienen lípidos más solubles en agua (por ejemplo, aceites esenciales) o cuando la fase acuosa contiene alcohol (por ejemplo, licores de crema) (McClement, 2007).

Volviendo a la Ecuación 1.1, se puede observar el parámetro γ , que relaciona al $\Delta G_{\text{formación}}$ con el ΔA . La γ se define como el trabajo isotérmico y reversible requerido para aumentar el área superficial por unidad de superficie (Ebnesajjad, 2011). En base a la Ecuación 1.1, se puede observar que al disminuir la γ , se producirá una disminución del $\Delta G_{\text{formación}}$, generándose un sistema termodinámicamente más estable, por lo que en el proceso de formación de una emulsión no basta sólo con el ejercicio de la homogeneización física, sino que también es fundamental la incorporación de emulsionantes o emulsificantes que generen una disminución de la γ .

1.5.1.1 Técnicas utilizadas para el estudio de la tensioactividad

La actividad surfactante de una molécula puede ser evaluada a través del estudio de los cambios de tensión superficial que proporciona a un sistema. Este estudio puede realizarse de manera directa o indirecta. Las metodologías directas consisten en la medición de la tensión superficial *per se* con los equipos adecuados. Mientras que las metodologías indirectas consisten en la observación del comportamiento del sistema al enfrentarlo a diversas condiciones de polaridad, siendo que el efecto que genere sobre el mismo indicará la presencia o no de actividad superficial en las moléculas evaluadas (Walter et al., 2010).

Técnicas indirectas: son rápidas, se emplea poca cantidad de muestra y no requieren de equipos específicos. Algunas de estas son:

1. **Ensayo del colapso de la gota:** se basa en la desestabilización que sufre la gota de un líquido polar que posee en su seno un tensioactivo, al ser depositado en una

superficie no polar. Para observar dicho efecto, se colocan gotas del líquido a estudiar sobre una superficie sólida recubierta de aceite o una superficie hidrófoba como “parafilm”. Si el líquido no contiene surfactantes, las moléculas de agua polar son repelidas desde la superficie hidrofóbica y las gotas permanecen estables (Figura 1.6). Si el líquido contiene tensioactivos, las gotas se propagan o incluso colapsan, generando una disminución en el ángulo de la gota sésil que puede ser observado visualmente, debido a que la tensión interfacial entre la gota de líquido y la superficie hidrofóbica disminuye.



Figura 1.6: Ejemplo de un resultado positivo para el análisis de un SLC de *Lactobacillus acidophilus* en la gota “B”, observándose el aplanamiento de la gota con respecto a “A” que es el control donde se emplea agua en reemplazo de SLC (Shokouhfard et al., 2015).

En el caso de la búsqueda de BAL capaces de producir BS ligados a las células, este tipo de ensayo se realiza sobre los SLC obtenidos luego de la fermentación y extracción. En el caso de la búsqueda de BS extracelulares puede realizarse directamente sobre el caldo de cultivo.

2. Ensayo del desplazamiento del aceite: esta metodología se basa en la capacidad que poseen los surfactantes para dispersar una fase oleosa formando un halo (Figura 1.7). Para este ensayo, algunos autores indican que existe una relación directa entre el diámetro del halo y la intensidad de la actividad tensioactiva, de esta manera, aquellas muestras que presenten una mayor actividad surfactante presentarían un mayor diámetro en el halo (Morikawa et al., 2000).

Al igual que el ensayo del colapso de la gota, éste se realiza sobre los SLC obtenidos luego de la fermentación y/o extracción. Tanto en el ensayo del colapso de la gota, como en el del desplazamiento del aceite, si se desea comparar la capacidad surfactante de diversos sistemas, y seleccionar aquellas con una mayor actividad

superficial, se pueden realizar múltiples diluciones del sistema evaluado. Luego, estas diluciones se evalúan con los ensayos mencionados, informando el valor de la solución más diluida con actividad superficial. Aquellos sistemas que presenten actividad superficial a menores diluciones serán los que poseen una mayor actividad superficial.



Figura 1.7: Esquema del ensayo del halo adaptado da Silva et al. (2021b)

Si bien las técnicas indirectas poseen sus ventajas, lamentablemente no es posible la selección de una sola para discernir si un sistema presenta compuestos tensioactivos o no, sino que se debe realizar los análisis combinando al menos dos técnicas (Youssef et al., 2004).

Técnicas directas: en estas técnicas se evalúa la tensión superficial o interfacial del líquido estudiado.

1. **Anillo DüNouy:** este método se basa en medir la fuerza requerida para separar un objeto con geometría conocida de una interfase o superficie, que en este caso consiste en un anillo (Ebnesajjad, 2011). Para este fin, se dispone un anillo con diámetro conocido sobre la superficie del líquido o la interfase a estudiar y se realiza una fuerza perpendicular al anillo para separar al mismo de la superficie (Figura 1.8)

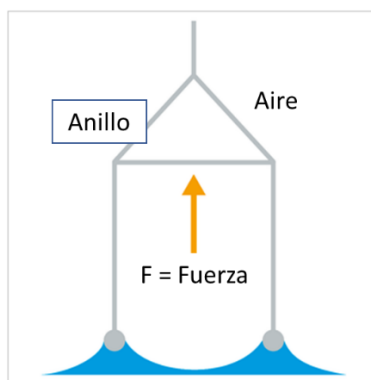


Figura 1.8: Diagrama esquemático del método de Du Noüy.

La fuerza máxima que se realiza en este proceso se relaciona con la tensión superficial o interfacial de acuerdo con la Ecuación 1.3.

$$\gamma = \frac{F}{L \cdot \cos \theta} \quad (\text{Ecuación 1.3})$$

Siendo “L”, la longitud mojada del anillo, correspondiente a la suma de la longitud externa e interna del anillo y el “cos θ ” corresponde al coseno del ángulo de contacto inicial entre el anillo y el líquido valor que en el caso de los anillos de platino es 0. Una de las desventajas de esta metodología es la necesidad de un volumen importante de líquido para obtener el parámetro deseado. A pesar de que es una técnica utilizada desde finales de Siglo IXX, aún tiene vigencia por su precisión y facilidad de uso (Walter et al., 2010, Ebnesajjad et al., 2011), existiendo actualmente modelos de equipos, tanto manuales como automático.

2. Técnica de la gota pendiente: puede utilizarse para calcular la tensión superficial o interfacial y para el estudio de la tensión superficial dinámica, es decir, como varía la tensión superficial en el tiempo. Es de interés que un BS sea capaz de disponerse y acomodarse rápidamente en una interfase ya que de esta manera podrá intervenir en la formación de gotas en una emulsión de manera más efectiva. La forma de una gota de un líquido está íntimamente relacionada con el balance entre la fuerza gravitacional y las fuerzas superficiales. A mayor tensión superficial, las gotas formadas serán más esféricas, ya que de esta manera disminuye la superficie expuesta. Mientras que, en una gota pendiente, las fuerzas gravitacionales tienen a darle a las gotas una forma más alargada. Por lo que la forma que tome una gota pendiente estará relacionada con su volumen, densidad y también por la tensión superficial del líquido que la compone (McClements, 2004). La silueta de gota evaluada por el equipo es capturada por un sistema de análisis de imagen a partir del cual se puede calcular el valor de tensión superficial. En la sección Materiales y Métodos se explicarán con mayor detalle las especificaciones técnicas de esta metodología.

A partir del empleo de técnicas directas, también es posible la de terminación de la CMC. CMC: es un parámetro característico de cada surfactante y corresponde a la cantidad de tensioactivo a partir de la cual comienzan a formarse micelas en el seno del líquido (Sharma et al., 2016) En esta concentración la interfase se ve saturada de moléculas de surfactante y se alcanza la máxima reducción de tensión superficial. (Figura 1.9).

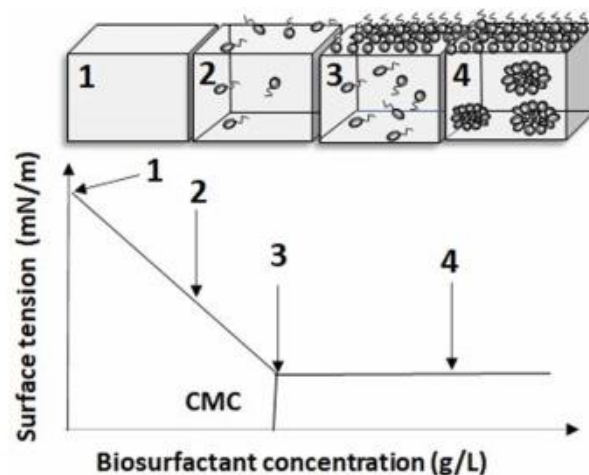


Figura 1.9: Pasos en la reducción de la tensión superficial debido a la adición de surfactante hasta alcanzar la CMC y la posterior formación de micelas (Sarubbo et al., 2022).

Los agentes tensioactivos potentes poseen una CMC baja, es decir, que se busca que utilizando una concentración muy baja de tensioactivo sea suficiente para reducir la tensión superficial (George y Jayachandran, 2009). Por lo que este es un parámetro muy importante de caracterizar en el estudio de nuevos agentes surfactantes. Para tal fin se realizan diluciones del agente tensioactivo y se mide la tensión superficial para cada concentración, utilizando cualquiera de las técnicas de medición directa. El punto de inflexión a partir del cual no se obtiene una reducción de la tensión superficial es definido como la CMC.

1.5.1.2 Técnicas utilizadas para la evaluación de la actividad emulsificante

Índice de emulsificación ($IE\%_{24}$): es importante tener en cuenta que no todos los agentes tensioactivos poseen la capacidad de estabilizar emulsiones (Walter, 2010), por lo que la medición de la tensión superficial no es suficiente para concluir que poseen actividad emulsificante. Un parámetro útil para evaluar la capacidad que posee un compuesto para producir una emulsión estable es el $IE\%_{24}$. Esta técnica, fue desarrollada por Cooper y Goldenberg (1987) y consiste en realizar una emulsión, incorporando una fase oleosa a una fase acuosa que posee el surfactante que se desea estudiar. Luego se homogeniza, se registra la altura de la emulsión y se almacena de un tiempo determinado en condiciones controladas. Finalizada la incubación, se mide la altura de la porción de emulsión que permaneció estable (Figura 1.10). Aquella emulsión que mantuvo una mayor altura, luego del almacenamiento posee un mayor $IE\%_{24}$.

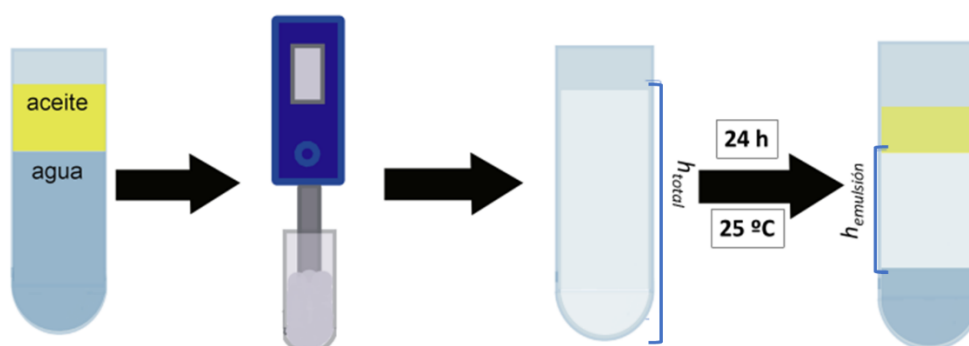


Figura 1.10: Proceso de formación de la emulsión y evaluación del $IE\%_{24}$.

Aquellos surfactantes que sean capaces de formular emulsiones con un $IE\%_{24}$ más alto, se consideran mejores agentes emulsificantes. En otras palabras, es una medida de cuán útil es un surfactante para formar gotas que se mantengan dispersas en el seno de un líquido a lo largo del tiempo. Debido a su rapidez y simpleza, esta técnica es ampliamente utilizada para identificar compuestos con capacidad emulgente.

Potencial Z (Zp): es un parámetro relacionado con las interacciones eléctricas de las partículas en una matriz. Se define como el potencial entre la capa líquida inmediatamente próxima a la superficie (fuertemente unida a la partícula) y la fase continua, y proporciona una medida de la carga neta en la superficie de la partícula y de la distribución del potencial

eléctrico en la interfaz (Cano-Sarmiento et al., 2018). El desarrollo de una carga neta en la superficie de una partícula afecta la distribución de iones de la región interfacial circundante. Esto resulta en un aumento de la concentración de iones de carga opuesta a la partícula que están cercanos a la superficie. Así, una doble capa eléctrica se genera alrededor de cada partícula (Figura 1.11). La capa de líquido más próxima a la partícula se denomina capa de *Stern*, en ella los iones están fuertemente ligados. Luego, hay una región externa, conocida como capa difusa, donde los iones están ligados con menos fuerza a la partícula. Cuando una partícula se mueve (debido a la gravedad, por ejemplo), lo hace con los iones que conforman la capa *Stern* y la difusa, pero los iones que se encuentran por fuera del límite no se mueven con la partícula. Este límite se conoce como plano *Slipping* (deslizamiento). El potencial que existe en este límite se conoce como Z_p (Figura 1.11).

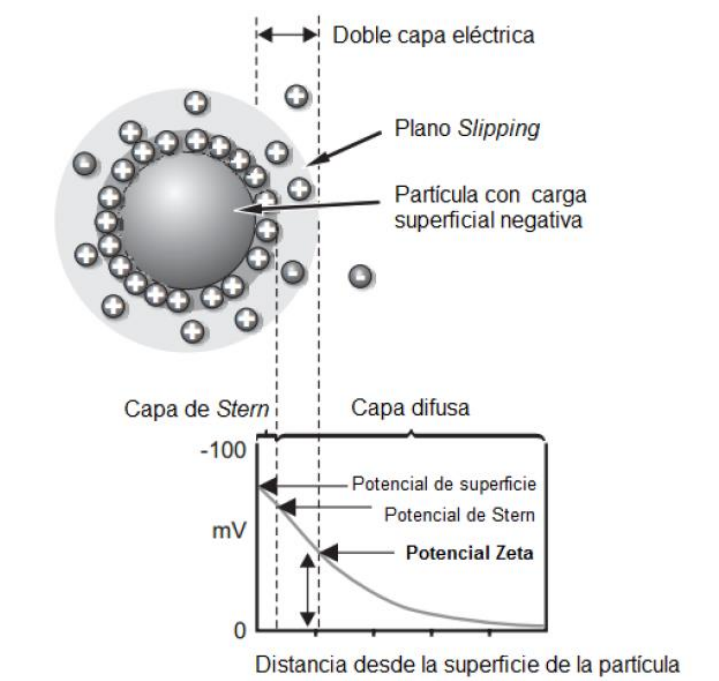


Figura 1.11: Esquema de una partícula cargada y la doble capa que la rodea (Malvern Instruments Ltd, 2016).

La magnitud del Z_p es un indicador de la estabilidad del sistema coloidal en estudio, por lo que esta técnica es empleada ampliamente para determinar la estabilidad de sistemas coloidales líquidos, como las emulsiones. Si todas las partículas en la suspensión tienen un Z_p negativo o positivo alto, tenderán a repelerse evitando así la floculación de la emulsión.

Si las partículas tienen, en cambio, bajos valores de Zp , las fuerzas que previenen que las partículas se acerquen serán más débiles y la tendencia a flocular será mayor. La magnitud de la Zp varía de -200 a 200 mV, dependiendo del comportamiento electroquímico de la interfaz de partículas (Glawdel y Ren, 2008). Se considera que una suspensión es estable cuando tiene valores de Zp mayores a 30 mV en valor absoluto. Por otro lado, cuando las partículas tienen valores bajos Zp , no habrá fuerza suficiente para evitar que las partículas se agreguen (Carneiro-da-Cunha et al., 2011).

Para medir el Zp se utiliza la microelectroforesis de láser Doppler. Se aplica un campo eléctrico a una solución de moléculas o a una dispersión de partículas, que entonces se mueven con una velocidad relacionada con su Zp . Esta velocidad se mide utilizando una técnica interferométrica de láser llamada M3-PALS (Dispersión de luz para análisis de fase). Esto permite el cálculo de la movilidad electroforética, y a partir de esta, se obtiene el Zp y la distribución de Zp (Malvern Instruments Ltd. 2016).

Turbidimetría: la medición de la turbidez de una emulsión es una medida de la estabilidad ya que los dos principales fenómenos de desestabilización que afectan a la homogeneidad de las dispersiones, los cuales son la migración de partículas (cremado, sedimentación) y la agregación o variación de tamaño de partícula (coalescencia, floculación), producen cambios en la turbidez del sistema. Un equipo útil para estudiar la turbidez de las emulsiones en las distintas capas de un sistema es conocido normalmente con su nombre comercial TURBISCAN, el cual, a través un sistema de dispersión múltiple de luz, permite el análisis de la desestabilización física de dispersiones líquidas concentradas (Mengual, 1999).

Caracterización de la fase dispersa: muchas de las propiedades más importantes de las emulsiones están determinadas por el tamaño de las gotas que contienen, por ejemplo, la vida útil, apariencia, textura, características de liberación de un activo, perfil de sabor y propiedades funcionales (McClements, 2004). De acuerdo con los tamaños de las partículas a estudiar se podrán utilizar dos técnicas: dispersión estática de luz, para determinar tamaños de partícula entre $0,1$ y 1000 μm , comúnmente utilizadas para el análisis de micro emulsiones; o dispersión dinámica de luz para partículas que tienen un tamaño entre $0,3$ nm - 10 μm .

1. **Dispersión estática de luz:** en esta técnica, un arreglo de detectores, ubicados en diferentes ángulos, mide la intensidad de la luz dispersada por las partículas estudiadas.

La difracción producida por una partícula suficientemente pequeña (del orden de la longitud de onda de la radiación incidente), ante un haz de luz, origina un patrón de difracción que es característico del tamaño de la partícula. El tamaño de las gotas, la longitud de onda de la luz y la diferencia entre los índices de refracción de las fases dispersa y continua, determinan la intensidad con la que se produce este fenómeno. La suma de los patrones individuales producidos por cada una de las partículas que constituyen la muestra genera un patrón de difracción. Cuando se hace incidir un haz de luz láser sobre una suspensión de partículas o gotas, es posible medir el patrón de difracción que se produce, pudiendo deducir la distribución de tamaños de partícula en la muestra. Esto es gracias a que las partículas grandes dispersan la luz en ángulos pequeños en relación con el rayo láser, y las partículas pequeñas dispersan la luz en ángulos grandes (Figura 1.12).

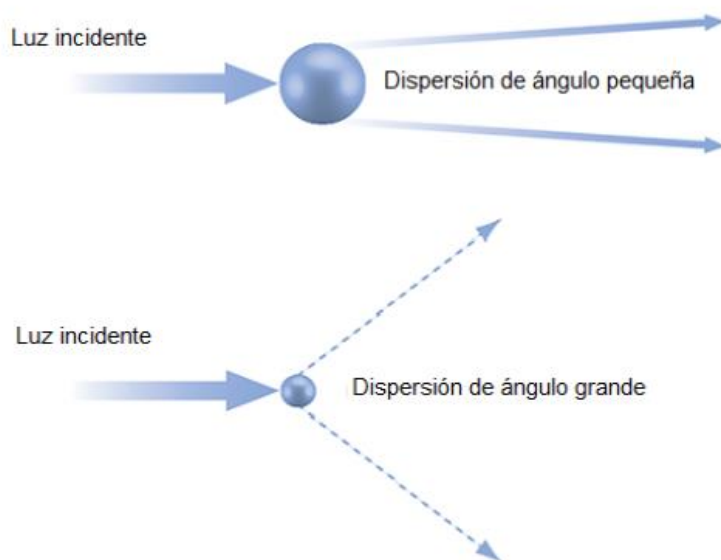


Figura 1.12: Dispersión de luz de partículas pequeñas y grandes. (Malvern instruments Ltd., 2016).

A través de la teoría de Mie de la dispersión de luz, se pueden analizar los datos de la intensidad de dispersión angular para calcular el tamaño de las partículas responsables de crear el patrón de dispersión. Esta teoría fue desarrollada para interpretar patrones de dispersión de emulsiones diluidas que contienen partículas esféricas independientemente de su tamaño y se correlaciona muy bien con los resultados experimentales. El tamaño de partícula se registra como un diámetro de esfera equivalente al volumen (Instrumental Malvern, 2012).

Distribución de tamaño de partícula: en una emulsión monodispersa el tamaño de las gotas esféricas puede caracterizarse de manera completa e inequívoca a través de un solo parámetro, el radio (r) o el diámetro (d). Sin embargo, las emulsiones polidispersas requieren un análisis más complejo. Generalmente, las emulsiones alimentarias son polidispersas, esto quiere decir, que el tamaño de todas las gotas varía dentro de un rango definido entre un valor mínimo y un valor máximo. En este caso, es conveniente analizar la fase dispersa en términos de una distribución de tamaño de gota. El diámetro de las gotas en una emulsión está siempre comprendido entre un valor mínimo y un máximo, lo que permite dividir la escala de diámetros en diferentes clases “ i ” ($i= 1, 2, 3 \dots n$) y contar el número de gotas “ n_i ” correspondientes a la clase “ i ”, cuyo diámetro representativo es “ d_i ” (en general, el centro del intervalo). A partir de esto, se puede definir la frecuencia relativa o fracción de ocurrencia “ f_i ”, como el número de gotas pertenecientes a la clase “ i ” dividido por el número total de gotas, es decir, “ f_i ” corresponde a la probabilidad de ocurrencia de “ d_i ” (Ecuación 1.4).

$$f_i = \frac{n_i}{\sum n_i} = \frac{n_i}{n} \quad (\text{Ecuación 1.4})$$

Los resultados pueden presentarse en forma tabular o mediante un histograma. En la práctica es más conveniente e informativo presentar los datos como una frecuencia de tamaños en número, en superficie o en volumen. La distribución de tamaño de partícula también puede representarse como curvas continuas: las funciones de distribución y de distribución acumulativa. Las funciones de distribución pueden ser monomodales cuando presentan un único pico, bimodales cuando presentan dos picos principales o multimodales si hay más de dos picos.

A partir de las funciones de distribución pueden calcularse distintos diámetros promedio que permiten caracterizar las distribuciones de tamaño de partícula. Dos parámetros muy útiles para caracterizar emulsiones y evaluar la estabilidad de estas en el tiempo son los diámetros promedio de Sauter ($D_{3,2}$) y de DeBroucker ($D_{4,3}$) (Figura 1.13):

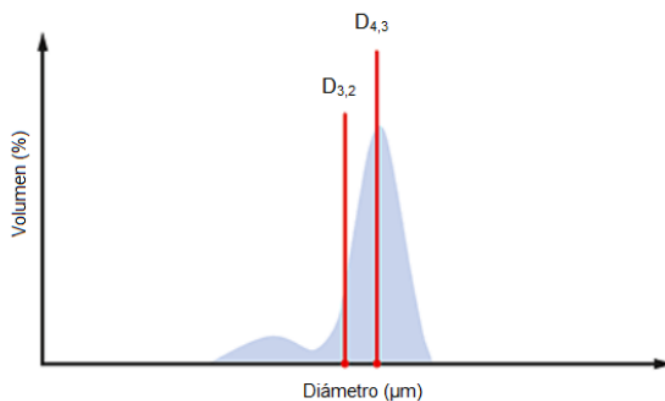


Figura 1.13: Valores de $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ en una distribución de tamaño de partícula en la cual está presente una proporción significativa de partículas finas (Malvern Instruments Limited, 2016).

- **$D_{3,2}$ (diámetro medio de superficie o diámetro de Sauter):** es el diámetro de una esfera que tiene la misma relación volumen/área superficial que la partícula de interés. El $D_{3,2}$ brinda una medida del diámetro promedio en donde se encuentran la mayoría de las gotas (Ecuación 1.5). Es más sensible a la presencia de partículas pequeñas en la distribución del tamaño. Menores valores de $D_{3,2}$ indica la presencia de gotas de menor tamaño en el sistema.

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i \cdot d_i^3}{\sum n_i \cdot d_i^2} \quad (\text{Ecuación 1.5})$$

Donde n_i es el número de partículas de tamaño d_i .

- **$D_{4,3}$ (Diámetro medio de volumen o diámetro De Brouker):** es el diámetro de una esfera que tiene el mismo volumen que la partícula de interés (Ecuación 1.6). Es más sensible a la presencia de grandes partículas, se usa para describir

fenómenos de aglomeración, floculación y cremado en emulsiones. El aumento de dicho parámetro en el tiempo indica un aumento en los tamaños de partículas, lo que puede traducirse en un avance de la desestabilización de la emulsión.

$$D_{4,3} = \frac{\sum n_i \cdot d_i^4}{\sum n_i \cdot d_i^3} \quad (\text{Ecuación 1.6})$$

- **Span:** para la caracterización de una emulsión polidispersa también es útil el cálculo del Span. Este parámetro es un índice que refiere a la polidispersidad de la emulsión. Cuanto mayor es el Span, más polidispersa será la muestra. El mismo se calcula a través de la Ecuación 1.7:

$$\text{Span} = \frac{(d_{0,9} - d_{0,1})}{d_{0,5}} \quad (\text{Ecuación 1.7})$$

Donde “ $d_{0,1}$ ” corresponde al diámetro por debajo del cual se encuentra el 10% del volumen total de las partículas de la muestra, “ $d_{0,5}$ ” al diámetro por debajo del cual se encuentra el 50% del volumen total de las partículas de la muestra y “ $d_{0,9}$ ” al diámetro por debajo del cual se encuentra el 90% del volumen total de las partículas de la muestra.

2. **Dispersión dinámica de luz (DLS):** esta técnica se utiliza para la medición de tamaño de partículas pequeñas entre 0,3 nm y 10 μm . La medición se fundamenta en el movimiento Browniano de las partículas, el cual surge de la colisión al azar de las moléculas del líquido que rodean a la partícula. En el caso de las partículas pequeñas, el movimiento que presentan es rápido, mientras que las partículas grandes se mueven más lentamente. En la técnica de DLS, se ilumina la muestra con un láser; dependiendo del tamaño de cada partícula la luz será dispersada con cierta intensidad, generando diferentes fluctuaciones en la velocidad de la luz. El análisis de la intensidad de estas fluctuaciones permite la obtención del coeficiente de difusión traslacional (D) de la partícula. Esto posibilita estimar el tamaño de partícula a partir de la ecuación de Stokes- Einstein (Ecuación 1.8):

$$d = \frac{kT}{3\eta\pi D} \quad (\text{Ecuación 1.8})$$

donde, “ d ” es el diámetro hidrodinámico (m); “ D ” es el coeficiente de difusión traslacional ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$); “ k ” es la constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ N}\cdot\text{m}\cdot\text{K}^{-1}$); “ T ” es la temperatura absoluta (K) y; η es la viscosidad del solvente ($\text{N}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$). De esta manera se puede obtener la distribución de tamaño de partícula, el cual se puede realizar en base a la intensidad %, volumen % o número %.

1.5.2 Actividad antimicrobiana

Anteriormente se mencionó que en la industria alimentaria es importante asegurar la estabilidad física de los alimentos, lo que lleva a la adición de aditivos como los emulsificantes. Sin embargo, la desestabilización física no es la única razón de la disminución de la vida útil de los alimentos, sino que es igual o más importante asegurar la estabilidad microbiológica de los alimentos.

Asegurar la inocuidad microbiológica en los alimentos es fundamental, ya que su falta, no sólo genera pérdidas económicas estimadas en 1,3 billones de toneladas de alimento al año según la FAO (Di Renzo et al., 2015), sino que también se asocia a enfermedades que pueden ser mortales (Petruzzi et al., 2017). Las enfermedades transmitidas por alimentos son llamadas normalmente a través de la sigla “ETA”. Estas enfermedades son provocadas por el consumo de agua o alimentos contaminados con microorganismos o parásitos, o bien por las sustancias tóxicas que aquellos producen, y constituyen un importante problema a nivel mundial (ANMAT, s.f.). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que 1 de cada 10 personas sufren enfermedades cada año a causa de la ingesta de alimentos contaminados y 420.000 resultan en muerte (2015).

Los microorganismos que afectan la estabilidad de los alimentos pueden ser:

- **Deteriorativos:** son aquellos que causan deterioro en las propiedades sensoriales de los alimentos, pueden ser tanto bacterias como mohos y levaduras. Dentro de las bacterias deteriorativas podemos encontrar a las bacterias ácido-lácticas (BAL) como las cepas de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacteria* y algunas cepas de *Enterococcus*. También, a las *Pseudomonas*, como *P. auruginosa*,

P. fluorescens, *P. putida* y *P. fragi* (Petruzzi et al., 2017). En el caso de las levaduras, algunas cepas son *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, varias cepas de *Candida* y *Rodothula* entre otras (Fleet, 2011). Los mohos, como por ejemplo *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea* suelen deteriorar alimentos como vegetales y frutas, aun a bajas temperaturas (Chong et al., 2022).

- **Patógenos:** son aquellos que causan enfermedades al consumidor, sin necesariamente causar cambios en las características sensoriales del alimento (FAO, s.f.). Algunas bacterias patógenas son *Listeria monocytogenes* (Xedzro et al., 2022), *Salmonella* spp., *Shigella* spp. (Oyedeki et al., 2023), *Escherichia coli* (Esciso-Martinez et al., 2022), entre otras. También, pueden destacarse algunas cepas de hongos y levaduras con actividad patogénica, como *Candida* spp, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus* spp, *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. (Oyedeki et al., 2023).

Las estrategias para controlar el crecimiento microbiano son múltiples y pueden ser implementadas en todas las etapas de elaboración de un alimento. Durante la elaboración, se busca implementar buenas prácticas de manufactura y el adecuado tratamiento de materias primas. Se busca aplicar tratamientos que favorezcan su conservación en el tiempo, como depresión de la actividad de agua, tratamientos térmicos, disminución de la acidez, incorporación de agentes antimicrobianos. También se busca la implementación de las condiciones de empaquetamiento, transporte y almacenamiento adecuadas, utilizando atmósferas modificadas, materiales que permitan mantener las condiciones de humedad óptimas y la refrigeración, de ser necesario. Generalmente, estas tecnologías se utilizan en conjunto con el fin de generar sistemas que actúen como múltiples barreras para el crecimiento microbiológico (Cassani et al., 2020).

En el Código Alimentario Argentino, los antimicrobianos se encuentran denominados como conservadores y se los define como aquellas sustancias que “*impiden o retardan la alteración de los alimentos provocada por microorganismos o enzimas*” (Código Alimentario Argentino, s.f.). La naturaleza de los antimicrobianos es diversa, algunos son sales inorgánicas, ácidos orgánicos o sus sales. Los más comúnmente utilizados son, el dióxido de azufre, benzoato de sodio, ácido ascórbico, ácido propiónico, sorbatos, nitritos y nitratos de

sodio y potasio (Lennerz et al., 2015). En los últimos años, los antimicrobianos tornaron una imagen negativa debido a que algunas investigaciones mostraron que pueden poseer efectos adversos para la salud. Como es el caso de los nitritos y nitratos, que presentan en algunas condiciones actividad mutagénica (Nujić et al., 2017).

A raíz de lo anteriormente mencionado, es creciente el estudio de agentes antimicrobianos de origen natural como los BS, así como la combinación de estos con los sintéticos con el fin de disminuir las dosis utilizadas (Travisan et al., 2022; Pereira Batista et al., 2023).

1.5.2.1 Evaluación de la capacidad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana *in vitro* de un extracto o un compuesto puro puede ser determinada mediante diversas metodologías, desde metodologías sencillas como la de difusión en agar, hasta más complejas, como citofluorometría de flujo, que requieren equipos especializados (Balouri et al., 2015). Sin embargo, a la hora de realizar un “*screening*” de compuestos antimicrobianos, se suele optar por metodologías sencillas como las primeramente mencionadas, ya que permiten determinar rápidamente si un compuesto posee o no actividad antimicrobiana.

Método de Kirby-Bauer

El método de Kirby-Bauer o también llamado método de difusión en agar, es una metodología utilizada para determinar la capacidad antimicrobiana de un compuesto. El mismo se realiza a través de la siembra de un inóculo del microorganismo indicador con concentración estandarizada sobre agar nutritivo en placas de Petri formando un césped. La sustancia para analizar se dispone en discos estériles los cuales se ubican sobre el césped microbiano. Finalmente, se incuba en condiciones óptimas de crecimiento del microorganismo y el resultado se informa como el diámetro del halo de inhibición (Figura 1.14).

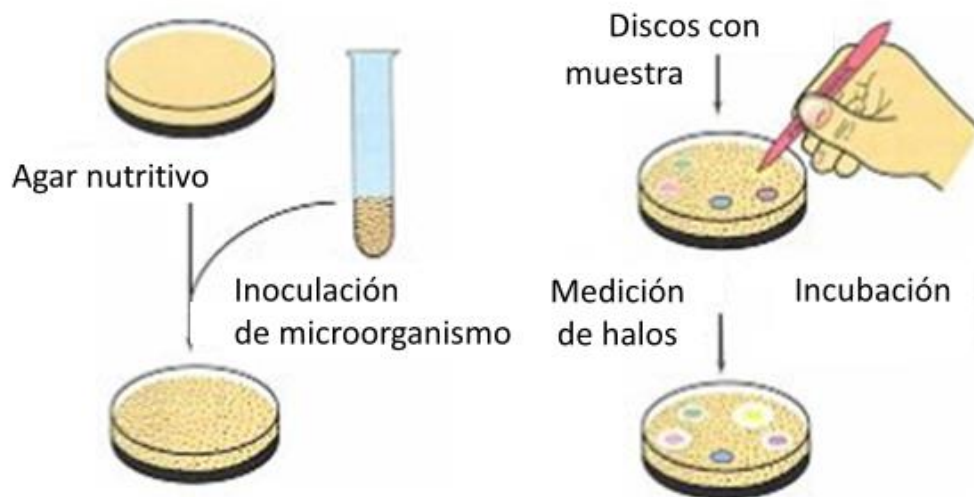


Figura 1.14: Diagrama de los pasos del método de Kirby-Bauder.

1.5.3 Actividad antiadhesiva y antibiofilm

Otra problemática que es de importancia es el desarrollo y eliminación de biofilms microbianos en establecimientos de producción de alimentos. Con el fin de protegerse del estrés ambiental, los microorganismos, en general, dejan su estado planctónico y se acercan a las superficies desarrollando biofilms. Al alcanzar una densidad celular específica, se activa un sistema de señalización a través de mecanismos de *quorum sensing* que propician el desarrollo del biofilm microbiano en conjunto. A partir de eso, las células comienzan a producir polisacáridos extracelulares que permiten la unión de las células a la superficie y entre ellas, generándose consorcios microbianos (Sauer et al., 2003; Palmer et al. 2007). Este tipo de estructura se denomina comúnmente biofilm. La formación del biofilm es progresiva, posee diferentes etapas y condiciones, que se describen a continuación y que se muestran en la Figura 1.15 (Percival et al. 2011):

1. Movimiento de los microorganismos cerca de la superficie

Para que se forme el biofilm los microorganismos deben llegar a la superficie, por lo que las condiciones de movilidad del microorganismo determinarán la facilidad con la cual se adicionará. Por ejemplo, las condiciones de flujo turbulentas en una industria y la motilidad de los microorganismos favorecerán la formación de biofilm.

2. Adhesión

La adhesión a la superficie acondicionada se realiza en dos etapas, adhesión reversible e irreversible. La adhesión reversible se da a distancias de la superficie mayores a 50 nm, teniendo relevancia solamente fuerzas de *Van Der Waal*. Al continuarse aproximando los microorganismos a la superficie y alcanzar distancias a esta entre 10 – 20 nm se suman a las fuerzas mencionadas anteriormente fuerzas electrostáticas. Finalmente, al aproximarse a una distancia menor a 1,5 nm se suman fuerzas específicas entre el microorganismo y la superficie generando una adhesión más fuerte e irreversible.

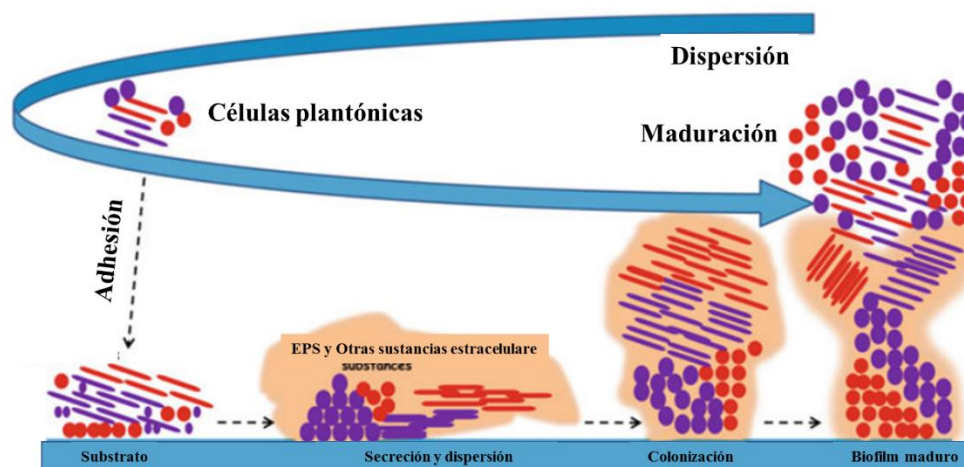


Figura 1.15: Etapas de la formación de biofilm sobre una superficie (Sharma et al., 2016)

3. Secreción, colonización y maduración

Una vez que los microorganismos lograron adherirse comienza la secreción de exopolisacáridos, glicoproteínas y otras biomoléculas que fortalecen aún más la adhesión. Luego, los microorganismos continúan creciendo y multiplicándose, logrando la colonización de la superficie, a través de la generación de colonias y una continua secreción de polímeros extracelulares. Cuando el biofilm alcanza una altura de 10-25 μm , los microorganismos que se encuentran en la base

comienzan a ser anaeróbicos, lo que indica la maduración del biofilm, alcanzando una alta diversidad de especies y estabilidad.

4. Desprendimiento y dispersión

El desprendimiento consiste en la transferencia de células y componentes del biofilm hacia el líquido, lo que produce nuevamente la dispersión de células en forma plantónica. Los factores que favorecen el desprendimiento son cepas dependientes y puede relacionarse con las condiciones de pH, temperatura o fuerzas de deformación que se apliquen sobre la superficie.

Los biofilms microbianos compuestos por una sola especie son razonablemente raros en comparación con los multiespecie (Kotulova y Slobodnikova 2010; Bueno, 2014). Cuando los microorganismos se encuentran formando biofilms, la expresión de genes beneficiosos para su desarrollo y supervivencia aumenta, hay cambios morfológicos en las colonias y puede facilitarse la adquisición de genes resistentes a antibióticos por medio de transferencia de plásmidos, poseen mejor acceso a los nutrientes y las células se encuentran más próximas unas de las otras facilitando asociaciones mutualistas, sinérgicas y de protección (Percival et al. 2011). De esta manera, los biofilms se transforman en focos de crecimiento y desprendimiento microbiano constante que, por sus características adaptativas también son difíciles de erradicar.

Una gran cantidad de bacterias transmitidas por los alimentos son capaces de adherirse y formar biofilms en diferentes superficies, como acero inoxidable, plástico, vidrio (Wang et al., 2014) e incluso superficies de alimentos, como frutas y verduras (Bilek et al., 2013). La adhesión de bacterias en las superficies compromete la inocuidad y el deterioro de los alimentos, generando enormes pérdidas económicas (Van Houd y Michiels, 2010). Los biofilms son una fuente de infección continua y difícil de erradicar, en consecuencia, hay un foco de interés en torno al desarrollo de técnicas innovadoras para superar este problema.

En cuanto a la disminución en la formación de biofilm, las estrategias son varias, desde estrategias microbidas, así como también, estrategias no microbidas. Estas últimas engloban mecanismos que evitan la unión microbiana a una superficie, que interrumpen el desarrollo de biofilms y/o afectan su estructura para mejorar la penetración de antimicrobianos y que afectan la maduración del biofilm (Rasamiravaka et al., 2015). Las

técnicas no microbidas son de mayor interés en los últimos años debido a que el aumento de la resistencia antimicrobiana genera que los microbidas sean cada vez menos efectivos (Parrino et al., 2019).

Existen tres estrategias generales para la inhibición de la formación de biofilms (Yin et al., 2021):

1. Cambiar las propiedades de la superficie: la formación de biofilms depende de las características fisicoquímicas de la superficie. Por lo tanto, cambiar las características del material, como su suavidad, humectabilidad o hidrofilia, podría ayudar a prevenir la formación del biofilms.
2. Regular las vías de señalización: la formación de biofilm depende de diversas vías de señalización como *quorum sensing* y sistemas de segundo mensajero de nucleótidos. Por lo tanto, los inhibidores de biofilm pueden diseñarse dirigiéndose a proteínas relevantes en los respectivos sistemas reguladores para bloquear sus vías de señalización y, por lo tanto, inhibir la formación del biofilm.
3. Aplicar presiones externas para erradicar el biofilm: diferentes estrategias, tanto físicas como bioquímicas, se han estudiado como medios de erradicación. Algunos mecanismos físicos son la aplicación de ultrasonido y campos magnéticos. Desde el aspecto bioquímico, el uso de antimicrobianos no es tan efectivo como en cultivos planctónicos, por lo que también se estudia el uso de enzimas, fagos y otros metabolitos microbianos.

A pesar de las múltiples estrategias que se conocen para la erradicación de biofilms, el hallazgo de nuevas vías de control sigue siendo de interés debido a las interacciones diversas que se generan en estos sistemas que los conforman como sistemas complejos (da Silva et al., 2021b).

1.5.3.1 Evaluación de la capacidad antiadhesiva y antibiofilm

Las metodologías utilizadas para evaluar la capacidad antiadherente o antibiofilm de un compuesto son diversas, llevando incluso a que algunos autores planteen la necesidad de establecer un método de detección sencillo, estandarizado y de alto rendimiento que contemple la variabilidad biológica de los biofilms (Haney et al., 2021). Existen metodologías para estudiar la formación de biofilm en condiciones de flujo (Rodrigues et al.,

2006b) y en condiciones estancas. Dentro de estas últimas, las más populares son los ensayos colorimétricos en placas de 96 pocillos (Fracchia et al., 2010; Gudiña et al., 2010; Madhu y Paoyla, 2013; Vecino et al., 2018), aunque también existen adaptaciones que permiten aplicarlos en mangueras de silicona (Sharma y Sharan, 2016) o en pequeñas porciones de metal inmersos en tubos de fermentación (Meylheuc et al., 2006).

Ensayo colorimétrico en microplaca: tanto para la medición de la actividad antiadhesiva de un compuesto como la actividad antibiofilm, se pueden utilizar técnicas colorimétricas utilizando microplacas. Estas técnicas se usan para hacer un primer *screening* de la capacidad de los compuestos en estudio.

En el caso de las técnicas que miden la actividad antiadhesiva, éstas tienen el objetivo de evaluar, si una sustancia utilizada para acondicionar una superficie posee la capacidad de disminuir la adherencia de los microorganismos. Para esto se pueden utilizar técnicas similares a las planteadas por Madhu y Prapulla (2014). En este tipo de técnicas se acondiciona la superficie de los pocillos mediante la incorporación del activo analizado durante un tiempo prefijado. Luego, se retira el exceso y se incorporan los microorganismos formadores de biófilm, los que se remueven después de un tiempo suficiente para que se produzca la adhesión a la superficie. Finalmente, se realiza una tinción para cuantificar la cantidad de microorganismos adheridos tanto en ausencia como en presencia del agente acondicionador.

En el caso de las técnicas que miden la actividad antibiofilm, éstas tienen el objetivo de evaluar si una sustancia presente en el seno de un medio nutritivo es capaz de disminuir el desarrollo de biofilm. Para esto se utiliza una técnica similar a la antes comentada, pero se permite la formación del biofilm, se descartan las células no adheridas y se incorpora el agente en estudio.

Debido a que la formación de biofilm *in vitro* es altamente susceptible a diversas condiciones, para minimizar los errores y proporcionar un análisis confiable de los datos obtenidos, es esencial realizar varias réplicas (Stepanović et al., 2007). También es importante que los compuestos utilizados en esta metodología no posean actividad antimicrobiana frente a las bacterias indicadoras o, en su defecto, que la concentración de este sea al menos la mitad de

la mínima concentración necesaria para causar inhibición, para poder descartar que la inhibición en el biofilm no sea producida por la inhibición microbiana.

1.6 Estructura general del proceso de selección de bacterias ácido-lácticas productoras de biosurfactantes y del estudio de la caracterización y funcionalidad de éstos

A partir del análisis de los trabajos publicados, el proceso de la selección de BAL productoras de BS y el estudio de la caracterización y funcionalidad de éstos, podría dividirse en cinco etapas, que se explican a continuación:

- 1) Aislamiento y caracterización preliminar de microorganismos: algunos microorganismos de entornos específicos son de interés ya que pueden ser conocidos como productores de distintos metabolitos. En esta etapa se aíslan los microorganismos que pertenecen al grupo o familia que se decidió estudiar a partir de diversas pruebas bioquímicas. Luego, se puede optar por realizar una caracterización inicial de las cepas aisladas, a través de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para confirmar su naturaleza como BAL.
- 2) Selección de microorganismos capaces de producir compuestos tensioactivos: una vez aislados los microorganismos del grupo de interés, se evalúa la capacidad que poseen para producir compuestos con capacidad tensioactiva y/o emulsificante, propiedades básicas de los BS. Esta selección se puede realizar a partir de métodos de *screening*, los cuales rápidamente pueden dar indicios de cuáles cepas son productoras de BS. Algunas de estas metodologías de *screening* son las mencionadas anteriormente como la “Técnicas del colapso de la gota”, “Técnica del desplazamiento del aceite”, medición de la hidrofobicidad de las células, medición de tensión superficial de los SLC o “Índice de Emulsificación (EI₂₄)” (Walter et al., 2010). Aquellas cepas que posean mejores resultados ante estas pruebas podrán, seguir siendo estudiadas aplicando técnicas más complejas como la medición del tamaño de gotas de emulsiones formuladas con SLC o medición del rendimiento en la producción de los BS purificados. En algunos casos, también es de interés la evaluación de la actividad antibiofilm, antioxidante o antimicrobiana de los SLC, ya que, como se mencionó anteriormente, los BS pueden poseer múltiples funciones (Campos et al., 2013b).

- 3) Caracterización de los microorganismos seleccionados: es importante la caracterización completa de las bacterias reconocidas como productoras de un metabolito, ya que parte de esto depende la seguridad de la posible aplicación de este. Esto se puede realizar a partir del estudio del genoma completo del microorganismo, así como también su resistencia a antibióticos. Por otro lado, en algunos trabajos también optan por analizar los requerimientos nutricionales para la producción del BS y cómo estos afectan el rendimiento o sus propiedades, así como también el descubrimiento de las condiciones óptimas de producción y/o extracción (Vecino et al., 2015; Montoya Vallejos et al., 2021).
- 4) Caracterización de los BS seleccionados: Con el fin de evaluar las posibles aplicaciones de los BS seleccionados es necesario poder caracterizarlos tanto fisicoquímica como funcionalmente. Para esto, al BS aislado se le estudia la composición de sus principales macrocomponentes (Vecino et al., 2015), así como también el análisis de grupos funcionales mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Rodrigues et al., 2006; Jameel y Haider, 2021) y en algunos casos la determinación de la composición elemental por espectroscopía fotoelectrónica de Rayos-X (Rodrigues et al., 2006) y caracterización de ácidos grasos por cromatografía gaseosa (Vecino et al., 2015). En cuanto a los análisis físicos, se caracteriza su actividad superficial, esto se puede realizar mediante la medición de la tensión superficial y/o tensión interfacial, (Fracchia et al., 2010; Madhu y Prapulla, 2014). También se determina su CMC (Madhu y Prapulla, 2014; Al-Sheraih et al., 2022). Por otro lado, no solo basta que un BS sea capaz de reducir la tensión superficial, sino que también, debe de realizarlo de manera rápida por lo que es relevante realizar una medición dinámica de la tensión superficial, utilizando un tensiómetro de gota (Bakshi et al., 2017). Estas propiedades mencionadas, también pueden evaluarse en presencia de agentes humectantes comúnmente utilizados en la industria alimentaria, como azúcares o sales, así como también en diferentes condiciones de pH. También, se puede evaluar la capacidad para formar emulsiones con distintos aceites, condiciones de pH o en presencia de agentes humectantes, con el fin de evaluar su funcionalidad en sistemas similares a alimentos. La medición del

tamaño de gota y de la turbidez en el tiempo, del Z_p , la observación microscópica de las emulsiones y el IE_{24} , son algunas de las técnicas que nos permiten poder evaluar la capacidad que poseen los BS a la hora de estabilizar emulsiones. En ocasiones, se profundiza en la capacidad antimicrobiana y antibiofilm que poseen los BS, utilizando el compuesto purificado en distintas concentraciones frente a diferentes microorganismos (Gudiña et al., 2010).

- 5) Producción de BS a partir de medios nutritivos alternativos: si bien, esta etapa no es fundamental, como se mencionó anteriormente, hay un interés creciente por evaluar que los metabolitos sean capaces de ser producidos por medios alternativos provenientes principalmente de subproductos agroindustriales. Esta etapa podría ser también evaluarse al principio, ya que, si el foco está en descubrir microorganismos que sean capaces de producir metabolitos, como BS, a partir de un subproducto industrial específico, es factible poder contrastar a este con el grupo completo de bacterias aisladas (Portilla-Rivera et al., 2008; Vecino et al., 2015).

En esta tesis se siguieron las etapas que se detallan en la Figura 1.16 para la selección BAL productoras de BS y para la caracterización de estos.

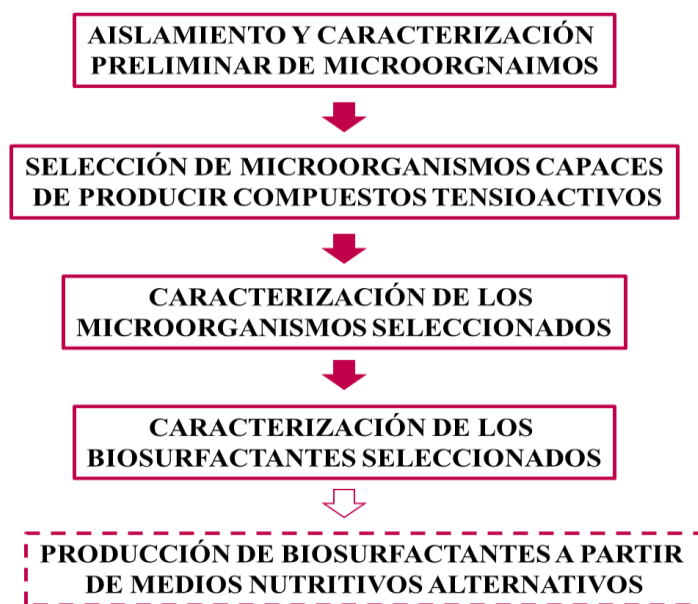


Figura 1.16: Etapas para la selección de BS producidos por microorganismos. La última etapa se encuentra punteada ya que es opcional, pero es incorporada a los estudios de BS con mayor frecuencia.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivos generales

- Contribuir al desarrollo de alimentos más sanos y seguros teniendo en cuenta las actuales demandas de los consumidores.
- Promover el uso de BS para disminuir el uso de surfactantes sintéticos y optimizar la estabilidad física de alimentos y la higiene de superficies en contacto con alimentos.
- Promover el aprovechamiento de subproductos agroindustriales.

2.2 Objetivos particulares

- Aislar e identificar BAL productoras de BS a partir de productos de la pesca y quesos ovinos naturales de la Patagonia.
- Caracterizar la actividad surfactante, la capacidad antiadhesiva y antimicrobiana de BS.
- Seleccionar el/los BS con mejor funcionalidad.
- Determinar las condiciones óptimas de producción del BS seleccionado.
- Caracterizar al BS seleccionado a través de sus propiedades físicas y químicas.
- Emplear un BS seleccionado como emulsionante, estabilizante y antimicrobiano en emulsiones aceite en agua y como agente anti-adhesivo.
- Caracterizar la actividad surfactante y emulsificante del BS en función del pH y la concentración de solutos.
- Caracterizar la actividad emulsificante del BS en combinación con surfactantes sintéticos.
- Evaluar el uso de jugo de yacón, sólo o combinado con diferentes proporciones de caldo MRS, como medio de cultivo alternativo para el crecimiento de *L. pentosus* Tw226 y para la producción del BS.
- Analizar el efecto del uso de jugo de yacón, sólo o combinado con diferentes proporciones de caldo MRS, como medio de cultivo alternativo sobre la composición química del BS obtenido.
- Estudiar el efecto de distintas condiciones de aireación sobre el crecimiento de *L. pentosus* Tw226 y la producción del BS.

- Analizar el efecto de un aumento en el volumen de trabajo sobre la producción del BS en las condiciones de aireación previamente seleccionadas.

En base a los objetivos mencionados, el trabajo realizado se centró en la selección de BAL productoras de BS, la caracterización de los BS seleccionados y su aplicación como aditivos alimentarios. En función de los mencionados objetivos, el trabajo se dividió en las siguientes etapas:

- I) Asilamiento, selección e identificación de BAL productoras de BS en base a la evaluación funcional de los SLC (Capítulo 1).
- II) Evaluación de las características de la cepa seleccionada con el fin de evaluar su viabilidad en procesos biotecnológicos alimentarios (Capítulo 1).
- III) Caracterización fisicoquímica del BS seleccionado y determinación de las condiciones óptimas de producción (Capítulo 2).
- IV) Evaluación de las propiedades funcionales del BS seleccionado como emulsificante, antimicrobiano y antibiofilm (Capítulo 2).
- V) Producción del BS en un medio alternativo a base de jugo de yacón (Capítulo 3).

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos

- Aceite esencial de corteza de canela – *Cinnamomum zeylanicum* (Euma, Buenos Aires, Argentina)
- Aceite de maíz (Molino Cañuelas, Buenos Aires, Argentina)
- Ácido acético glacial (Anedra, Argentina)
- Ácido clorhídrico (Anedra, Argentina)
- Ácido nalidíxico (Sigma Aldrich, Misuri, EE. UU.)
- Ampicilina (MP Biomedicals, California, EE. UU.)
- Azul Nilo (Sigma Aldrich, Misuri, EE. UU.)
- Buffer de carga (Inbio Highway, Tandil, Argentina).
- Buffer tris acetato EDTA -TAE- (Sigma Aldrich, Misuri, EE. UU.)
- Bromuro de etidio (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- Clindamicina (Sigma Aldrich, Misuri, EE. UU.)
- Cicloheximida (MP Biomedicals, California, EE. UU.)
- Cloranfenicol (Sigma Aldrich, Misuri, EE. UU.)
- Cloroformo (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- Cloruro de sodio (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- Cloruro de potasio (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- Cristal Violeta (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- Dihidrógeno fosfato de potasio – KH_2PO_4 – (Anedra, Argentina)
- Eritromicina (Sigma Aldrich, Misuri, EE. UU.)
- Gentamicina (Sigma Aldrich, Misuri, EE. UU.)
- Goma xántica (Cargill, Buenos Aires, Argentina)
- Hidrógeno fosfato de sodio - Na_2HPO_4 - (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- Hidróxido de sodio (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- Hexano (Biopack, Buenos Aires, Argentina)
- Kanamicina (Sigma Aldrich, Misuri, EE. UU.)
- Metanol (Biopack, Buenos Aires, Argentina)

- Nistatina (Sigma Aldrich, Misuri, EE. UU.)
- Sorbato de potasio (Sigma, Saint Louis, EE. UU.)
- Tetraciclina (Sigma Aldrich, Misuri, EE. UU.)
- Tween® 80 (Anedra, Argentina)

Todos los reactivos usados fueron de calidad analítica. La goma xántica, el aceite de maíz y los aceites esenciales fueron de calidad alimentaria.

3.1.2 Medios de cultivo

- Agar bacteriológico
- Agar M17
- Agar Man Rogosa Sharpe -MRS-
- Agar Mueller-Hinton
- Agar triptona soja – TSA –
- Caldo Man Rogosa Sharpe -MRS-
- Caldo triptona soja -TSB-
- Solución Ringer

Todos los medios de cultivo fueron provistos por Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia, a excepción del agar Muller-Hinton provisto por Merck Diagnostic, Berlín, Alemania.

3.1.3 Bacterias indicadoras

- *Escherichia coli* 35218
- *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014
- *Listeria innocua* ATTC 3309
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838
- *Shewanella putrefaciens* ATCC 8071
- *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256

3.1.4 Equipos

- Agitador Orbital (Vicking, Buenos Aires, Argentina)

- Baño de ultrasonido 24TACA con una frecuencia de 40 Khz (Testlab S.R.L., Buenos Aires, Argentina)
- Centrífuga de alta velocidad (Eppendorf 5804 R, Hamburgo, Alemania)
- Centrifuga DCA-300 RVT R (Presvac S.R.L, Buenos Aires, Argentina)
- Dispersor de luz estática (SLS) Mastersizer 2000 con una unidad de dispersión Hydro 2000MU y un láser He-Ne (633 nm) (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido)
- Difractómetro láser Zetasizer Nano-Zs (DLS). El equipo cuenta con un láser He-Ne (633 nm) y un correlador digital Modelo ZEN3600. (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido)
- Equipo comercial de purificación Wizard Genomics Promega DNA (Madison, Wisconsin, EE. UU.)
- Espectrofotómetro FTIR Nicolet 8700 equipado con un detector DTGS (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)
- Espectrofotómetro (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón)
- Estufa de vacío (Towson y Mercer LTD, Croydon, Inglaterra)
- Fluorómetro Qubit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).
- Higrómetro Aqualab (La Plata, Buenos Aires, Argentina)
- Homogeneizador de alta velocidad Ultra-turrax T-8 equipado con una herramienta de dispersión S8N-5G (IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania)
- Homogeneizador de alta velocidad Ultra-turrax T-25 equipado con una herramienta de dispersión S25N-18G (IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania)
- Juguera centrífuga (Peabody, Buenos Aires, Argentina)
- Lector de microplacas acoplado al programa Gen5: BioTek Instruments, ELx808 (USA Reader Control and Data Analysis Software)
- Liofilizador (Christ, Alemania)
- Microscopio óptico Axisoskop 40 (Ziess, Jena, Alemania)
- Microscopio confocal de barrido LSM980 con un objetivo de aceite 63x (NA 1.4) (Ziess, Jena, Alemania)
- pHmetro (Mettler Toledo, AD1030; Ohio, EE. UU.)

- Tensiómetro de anillo manual de Du Noüy modelo Cenco 70535 (Cenco, Illinois, Estados Unidos)
- Tensiómetro de anillo de Du Noüy automático Lauda TD 3 (Lauda, Lauda-Königshofen, Alemania)
- Tensiómetro de gota PAT-1 (Sinterface Technologies, Berlín, Alemania)
- Termociclador Mastercycler® (Eppendorf, Hamburg, Alemania)
- Transiluminador (Labnet, Nueva Jersey, EE. UU.).
- Turbidímetro (Densichek, Biomerieux, Francia)
- Turbiscan TMA2000 (Formulaction, Toulouse, Francia)
- Reómetro equipado con un sistema de con y plato PP40/S (AntonPaar MCR 302, Austria)

3.2. Métodos generales

3.2.1 Metodologías para el aislamiento, identificación y caracterización de BAL

3.2.1.1 Toma de muestra y aislamiento de cepas provenientes de alimentos de la región patagónica

Se trabajó con muestras de quesos ovinos provenientes de queserías artesanales del Valle Inferior del río Chubut (Patagonia, Argentina) y con distintos tipos de pescados capturados en el litoral marítimo del noreste de la provincia de Chubut.

Las muestras de quesos se extrajeron con sacabocados estériles y se procesaron dentro de las 4 horas de obtención. Para ello, se pesaron en condiciones de esterilidad 1,0 g de cada muestra y se transfirieron a un recipiente plástico estéril y hermético. Luego, se ajustaron a un volumen final de 10,0 mL utilizando como diluyente agua peptonada estéril (1,5 % m/v) conteniendo Tween® 80 (1,0 %) para favorecer la disolución de la materia grasa presente y se homogeneizaron mediante vortex. Luego de una incubación de 12 horas a 35 °C, se tomó una alícuota de 0,1 mL, se extendió sobre placas de agar Man Rogosa Sharp (MRS) suplementado con ácido nalidíxico (20 µg/mL) y nistatina (10 µg/mL) para asegurar la inhibición de la flora Gram negativa y de los mohos y levaduras, respectivamente. Después de 24-48 horas de incubación a 35 °C en aerobiosis, en las colonias compatibles con BAL se investigó la morfología por coloración de Gram, ensayo de la actividad de catalasa y oxidasa.

Los cultivos característicos de BAL se conservaron a -30 °C en una suspensión de caldo tripticasa soya (TSB) adicionada con glicerol al 10,0 % m/m.

En cuanto a las muestras provenientes de pescados, éstas se trasladaron bajo refrigeración hasta el laboratorio y se procesaron dentro de las 8-10 horas. Todos los ejemplares recolectados previamente se lavaron superficialmente con agua marina estéril para remover bacterias epifíticas. Posteriormente, se procedió a la disección utilizando tijeras estériles y se realizó la remoción del intestino, tegumento y branquias mediante pinzas estériles para su posterior procesamiento. Posteriormente, cada muestra se transfirió asépticamente a diferentes medios de enriquecimiento con la finalidad de favorecer el desarrollo de diferentes BAL:

- A) Agar MRS ajustado a pH 4,60 y 5,40 -medio selectivo para *Lactobacillus*.
- B) Agar MRS sin acetato ajustado a pH 8,00 -medio selectivo para *Carnobacterium*.
- C) Agar MRS suplementado con 6,5 % m/v de NaCl -medio selectivo para *Enterococcus*.
- D) Agar M17 -medio selectivo para *Streptococcus* y *Lactococcus*.

Los enriquecimientos se incubaron a 30 °C durante 24-48 horas. Luego del periodo de incubación los cultivos líquidos se repicaron a agar MRS respetando la misma composición de su respectivo medio de enriquecimiento, agar M17, mientras que los enriquecimientos en MRS (6,5 % de NaCl) repicaron a agar bilis esculina. Se realizaron repiques sucesivos con el objetivo de obtener aislamientos puros. Todos los medios sólidos se suplementaron con ácido nalidíxico (20 µg/mL) y nistatina (10 µg/mL), y se incubaron durante 24 - 48 a 30 °C en aerobiosis. Los cultivos se repicaron hasta su purificación, se realizaron las pruebas antes mencionadas para su identificación preliminar. Todos los cultivos puros se conservaron como en el caso anterior.

3.2.1.2 Identificación fenotípica de los aislamientos

Todas las cepas de BAL con morfología de bacilo/cocobacilo que mostraron homogeneidad bajo el microscopio, Gram positivas y que no presentaron actividad de catalasa se repicaron a agar MRS para su posterior identificación preliminar a nivel de género, mediante los siguientes ensayos:

- Producción de CO₂ por fermentación de la glucosa: se determinó en tubos con 5 mL de caldo MRS suplementados con glucosa (40 g/L final) y campana de Durham, siguiendo el procedimiento descrito por Müller (1990). Los tubos se incubaron a 35 °C durante 48 horas. El ensayo se consideró positivo si luego de la incubación se observó la producción de gas.
- Fermentación de ribosa: Las cepas se repicaron a caldo MRS e incubaron a 35 °C durante 18-20 horas. Posteriormente se centrifugaron a 3.500 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en agua destilada estéril. Se sembraron 20 µL de los cultivos en tubos con 2 mL de caldo para fermentación, suplementado con ribosa (1,00 % m/m) como única fuente de carbono y purpura de bromo cresol (0,006 % m/m) como indicador ácido-base. Se dejaron incubar durante 48 horas a 35 °C, se realizaron dos lecturas a las 24 y 48 horas. El resultado se consideró positivo (fermentación de la ribosa) cuando se producía un viraje del color púrpura a amarillo como consecuencia del descenso de pH.

3.2.1.3 Identificación genotípica de las cepas seleccionadas

Extracción y amplificación del ADN

Las cepas seleccionadas se incubaron a 30 °C en caldo MRS durante 18-20 horas. Luego, los cultivos se centrifugaron a 12.000 g durante 5 minutos y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación Wizard Genomics Promega DNA siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa para observar y cuantificar las muestras de ADN extraídas. Para tal fin, se preparó un gel de agarosa al 1,0 % m/v en buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA a pH 8,00), la electroforesis se llevó a cabo en una cubeta horizontal a 70 V. En los pocillos del gel se sembraron 4 µL de cada muestra, previamente mezclados con 1 µL de buffer de carga. Luego de finalizada la corrida, el gel se colocó durante 20 min en una solución de buffer TAE y bromuro de etidio (0,5 µg/L); posteriormente se observó el gel con luz UV en un transiluminador.

El ADN de cada una de las BAL seleccionadas se utilizó como molde para la amplificación por PCR del gen que codifica el ARNr 16S. Para ello, se emplearon los cebadores universales

para procariotas 27F (5`-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3`) y 1492R (5`-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3`).

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler®. Los productos de amplificación se examinaron en un gel de agarosa al 1,5 %, utilizando los reactivos en los volúmenes y concentraciones de la Tabla 3.1.

El protocolo para la amplificación consistió en una desnaturalización inicial durante 5 min a 94 °C, seguida de una desnaturalización de 1 min a 94 °C. Luego, se realizó el alineamiento durante 20 segundos a 55 °C y la extensión a 72 °C durante 5 minutos. Los pasos de desnaturalización, alineamiento y extensión se repitieron 35 veces para finalmente enfriar las muestras a 22 °C. Posteriormente, los productos de la amplificación de ARNr 16S se enviaron para su secuenciamiento a Macrogen Inc, Corea, donde se utilizó un secuenciador automático, para producir los cromatogramas.

Tabla 3.1: Concentración de los reactivos para la amplificación del gen ARNr 16S

Mezcla de reacción para 50 µL	Volumen (µL)
Mezcla madre (5x)	10
Primer R (10 µM)	2
Primer F (10 µM)	2
Taq (5 µ/µl)	0,5
Cl2Mg (25 mM)	2
ADN	1
AD (CSP)	32,5

Análisis de las secuencias del ADNr 16S

Los cromatogramas se analizaron y editaron utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. Se corrigieron los errores en la asignación de bases debido a ruido de fondo de los electroferogramas y se eliminaron los extremos (alrededor de 25 nucleótidos de longitud) de cada secuencia parcial debido a que suelen presentar una baja fiabilidad. Las secuencias del ADNr 16S se ensamblaron manualmente a partir de las secuencias amplificadas con los iniciadores 27F y 1492R.

La identificación de las secuencias se determinó mediante la herramienta SeqMatch de la base de datos Ribosomal Database Project (RDP) (Cole et al., 2005), específica para el ARN

ribosomal, que contrasta la secuencia de interés con las depositadas en la base, el porcentaje de similitud se obtuvo a través del parámetro S_{ab} score (Izquierdo Altarejos, 2015).

Análisis filogenético

El árbol filogenético se construyó con el programa MEGA 6.06 (Tamura et al., 2013) de acuerdo con el método estadístico Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), utilizando el método de sustitución de Tamura-Nei y con un valor de bootstrap de 1000 réplicas. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó mediante la herramienta Clustal W (Thompson et al., 1994). Las secuencias para la construcción del árbol filogenético pertenecen a cepas de colección y fueron obtenidas de la base de datos del RDP. Se escogió arbitrariamente a la secuencia de la cepa *Escherichia coli* como grupo externo.

Secuenciación y ensamble del genoma de la cepa seleccionada

Para verificar, antes de la secuenciación genética, la pureza y viabilidad de la cepa con fines biotecnológicos se realizó una secuenciación y ensamble del genoma de la cepa productora de BS. La cepa criopreservada a -80 °C, se cultivó en agar MRS, se repicó en caldo MRS, se incubó a 30 °C por 24 horas y, posteriormente, se centrifugó a 3000 ×g durante 5 min. El ADN genómico se extrajo utilizando el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) y se cuantificó utilizando el fluorómetro Qubit. Las bibliotecas de extremo pareado se prepararon utilizando los kits de preparación de la biblioteca de ADN Nextera XT (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) y se secuenciaron en la plataforma MiSeq (Illumina), utilizando el kit de reactivo MiSeq versión 3 de 600 ciclos (Illumina). Las lecturas sin procesar se recortaron con Trimmomatic v0.39 utilizando parámetros predeterminados. El genoma se ensambló utilizando pipeline SPAdes, versión 3.14.1 (Parks et al., 2015) utilizando el genoma de *P. pentosaceus* SRCM102736 (CP028259) como guía para la resolución de ensamblaje de regiones repetitivas. La integridad del genoma, la contaminación y la heterogeneidad de la cepa se analizaron a través de CheckM, versión 0.9.6 (Haft et al., 2018). Este proyecto de secuenciación “shotgun” de genoma completo se depositó en DDBJ/ENA/GenBank bajo el número de acceso JALGQC000000000.

3.2.1.4 Prueba de sensibilidad a antibióticos

La susceptibilidad a antibióticos se evaluó mediante dilución en agar utilizando agar Mueller-Hinton de acuerdo con las directrices del *Clinical and Laboratory Standards Institute*

(FEEDAP, 2018). En esta prueba se utilizaron siete antibióticos diferentes: ampicilina (2 mg/L), cloranfenicol (8 mg/L), clindamicina (4 mg/L), eritromicina (1 mg/L), gentamicina (16 mg/L), kanamicina (64 mg/L) y tetraciclina (32 mg/L). Las placas de agar se incubaron a 37 °C durante 24 horas. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 se utilizaron como microorganismos referencia. Después de la incubación, los resultados se interpretaron de acuerdo con los puntos de corte identificados por el Panel FEEDAP y adoptados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria para distinguir entre cepas susceptibles y resistentes (2018).

3.2.2 Metodologías para la producción de biosurfactante

Un resumen de la metodología empleada se puede observar en la Figura 3.1.

3.2.2.1 Inóculo

Para evaluar la capacidad de producir BS de las BAL se tomaron los cultivos previamente aislados de quesos y pecados y se sembraron en placas con agar MRS. Se tomó una colonia aislada, se incorporó a 5,0 mL de caldo MRS y se incubó a $30,0 \pm 0,1$ °C durante 24 horas. Finalizada la incubación, se realizó otro inóculo en el cual se sembró 1,0 mL del cultivo previo en 10,0 mL de caldo MRS, el cual se incubó a $30,0 \pm 0,1$ °C durante 15 horas con una agitación de 100 rpm, y se obtuvo un cultivo de BAL en fase estacionaria temprana.

3.2.2.2 Producción de biosurfactante

Para la etapa de selección de cepas productoras de BS, la producción se llevó a cabo utilizando el protocolo propuesto por Gudiña et al. (2010). Se empleó 600 mL de caldo MRS como fuente de nutrientes, medio óptimo para el crecimiento de BAL, al que se le incorporaron 6,0 mL del pre-inoculo en fase estacionaria temprana. El proceso se llevó a cabo en condiciones de agitación orbital con una frecuencia de 120 rpm durante 72 horas a $37,0 \pm 0,1$ °C. Luego, se separó el caldo de la biomasa por centrifugación (5,0 minutos a 8500 rpm a $10,0 \pm 0,1$ °C) y se realizaron dos lavados con agua desmineralizada estéril. De esta manera, se obtuvo el SLC y el pellet bacteriano.

En una segunda fase de la investigación, a partir de la cual se determinaron las condiciones óptimas de producción, se utilizó la misma metodología para la producción de BS, solo que, durante la fermentación, se utilizaron las condiciones de temperatura, agitación y tiempo determinadas como óptimas.

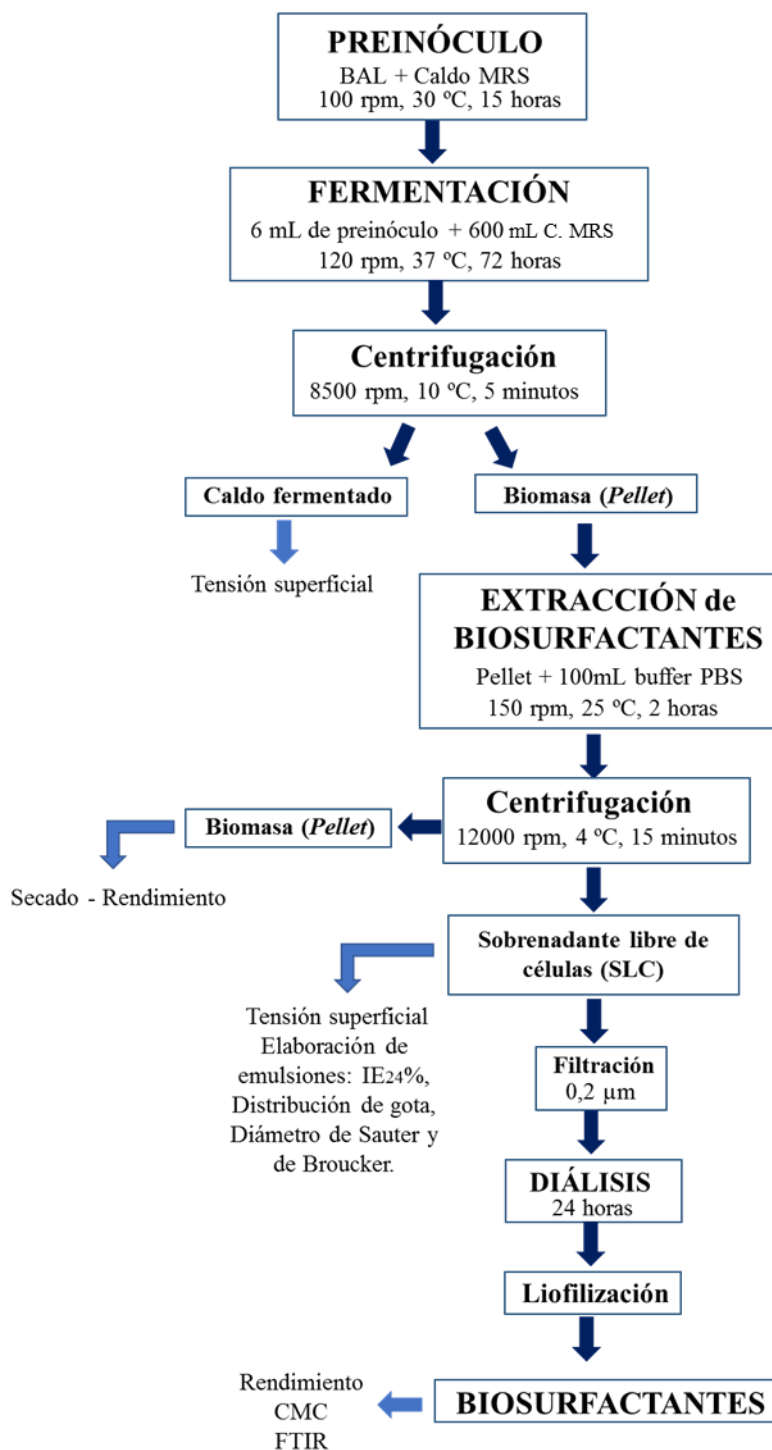


Figura 3.1: Diagrama que indica los pasos del proceso de producción, selección y caracterización inicial de BS.

En una tercera etapa, la producción de BS se llevó a cabo a partir de un medio nutritivo alternativo. Para esto utilizaron las condiciones de temperatura y agitación de 37 °C y 120 rpm, ya que no se poseían las condiciones óptimas para el medio y estas son las condiciones generalmente utilizadas en bibliografía, sin embargo, el tiempo de incubación se acotó a 48 horas.

3.2.2.3 Extracción del biosurfactante ligado a la célula

En todas las instancias de la investigación de la producción de BS ligado a la célula se utilizó el siguiente protocolo para su extracción. Se resuspendió el pellet obtenido en la etapa anterior en buffer fosfato salino (PBS) ajustado a pH 7,00 con NaOH 0,1 M. Para la resuspensión se utilizó un volumen de buffer igual a 1/6 del volumen de caldo utilizado en la etapa de fermentación. Dicha suspensión se incubó durante 2 horas a $25,0 \pm 0,1$ °C y a 150 rpm para favorecer la liberación de BS adherido a la pared celular. Finalmente, se centrifugó (15 minutos a 4 °C y a 12000 rpm) y se filtró usando un filtro estéril con un tamaño de poro de 0,22 μm para obtener SLC estéril el cual puede contener compuestos con actividad surfactante.

3.2.2.4 Purificación parcial y liofilización

Los SLC fueron dializados y liofilizados con el fin de purificar parcialmente el BS. Para la diálisis se utilizó una membrana con poro de 6-8 kDa de diámetro y se dispuso en ella cada uno de los SLC empleándose agua Millie-Q como medio de recepción de los compuestos con capacidad de permear. El proceso de diálisis se realizó por 24 horas a 4 ± 1 °C, generando cuatro recambios de agua cada dos horas y un último periodo de diálisis de catorce horas sin recambio. Los SLC dializados, se congelaron y se liofilizaron por 48 horas, utilizando un liofilizador. Las muestras liofilizadas se almacenaron a -20 ± 1 °C.

3.2.3 Metodologías para el *screening* de biosurfactantes

Para realizar un estudio preliminar de los SLC e identificar aquellos que poseen una mayor actividad superficial se utilizaron tres técnicas de screening propuestas por Walter et al. (2010).

3.2.3.1 Ensayo del colapso de la gota

Para esta metodología se colocaron 500 μL de aceite de maíz comercial en una placa de Petri de 90 mm de diámetro y, sobre la superficie del aceite, se depositaron 50 μL de SLC sin dializar, formando una gota sésil. Una disminución del ángulo de contacto de la gota apoyada sobre la superficie se considera como un indicio de la presencia de compuestos con actividad superficial. Con el objetivo de poder evaluar cuáles SLC poseían una mayor actividad superficial, se realizaron diluciones de estos al 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16. A dichas diluciones se las evaluó mediante la metodología descrita en esta sección. Los sobrenadantes que posean una mayor actividad superficial presentarán una disminución del ángulo de contacto en las diluciones más diluidas, por lo que, como resultado se informó la última dilución en la cual se observó un aplanamiento de la gota visualmente apreciable. Como control negativo se utilizó PBS. Este ensayo se realizó, al menos, por cuadruplicado.

3.2.3.2 Ensayo de la dispersión del aceite

La metodología utilizada se basa en la propuesta de Morikawa (2000). Para la realización del ensayo, se incorporaron 40,0 mL de agua destilada y 1,0 mL de aceite de maíz comercial en una placa de Petri de 150 mm de diámetro. Luego, se depositaron 10 μL de cada SLC sobre la capa de aceite. Las muestras con actividad superficial forman un halo sobre dicha capa. Al igual que en el ensayo anterior, para determinar cuáles SLC poseían una mayor actividad superficial se realizaron diluciones 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de los mismos y se informó como positivo la última dilución en la cual se observó la formación de un halo en la fase oleosa. Este ensayo se realizó, al menos, por triplicado.

3.2.3.3 Evaluación de la hidrofobicidad de las cepas

De acuerdo con Pruti y Cameo (1997), la capacidad de las bacterias de adherirse a hidrocarburos es característico de microorganismos productores de BS, esperando que aquellas cepas productoras posean una membrana más hidrófoba. Para evaluar la hidrofobicidad de las cepas se utilizó el ensayo de adhesión bacteriana a hidrocarburos (BATH), propuesto por Rosenberg et al. (1980). Este método se basa en el grado de adherencia de las células a diversos hidrocarburos líquidos. Para medir esta propiedad de las diversas cepas aisladas, las mismas se incubaron en tubos con caldo MRS durante 24 horas a $30,0 \pm 0,1$ °C. Finalizada la incubación, se centrifugaron (15 minutos a 7500 rpm a 10 °C)

y los pellets se lavaron dos veces con PBS a pH 7,00. Luego, se ajustó la concentración de la bacteria a 1,0 McFarland (aproximadamente 3.10^8 UFC/mL) en buffer PBS. Se separaron fracciones de 4,0 mL de la suspensión bacteriana en tubos de ensayo, a una parte de los tubos se les adicionó 1,0 mL de un solvente no polar, mientras que el otro grupo de los tubos quedó tal cual. Los solventes no polares utilizados fueron xileno y hexadecano, por separado. Los tubos se incubaron 10 minutos a $25,0 \pm 0,1$ °C y al finalizar, cada tubo se agitó durante 1 minuto en un agitador vortex. Se dejó estabilizar 30 minutos a $25,0 \pm 0,1$ °C y se tomaron 1,5 mL de la fase acuosa, a las cuales se les midió la absorbancia a 600 nm. El porcentaje de células unidas a la fase hidrófoba se calculó mediante la Ecuación 3.1.

$$\%Hidrofobicidad = \frac{(A_{sin\ fase\ organica} - A_{con\ fase\ organica})}{A_{sin\ fase\ orgánica}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

3.2.4 Evaluación del rendimiento en la producción del biosurfactante

Para evaluar el rendimiento en la producción de BS se determinó la masa del BS y de biomasa bacteriana seca por producción. La determinación de masa de BS liofilizado se obtuvo mediante su pesaje en una balanza analítica. La materia seca de las bacterias se determinó secando la biomasa en un horno de convección a 105 ± 1 °C, hasta peso constante y pesándolo en una balanza analítica (Schelegueda et al., 2015).

El rendimiento del BS se calculó como:

- Gramos de BS por gramo de biomasa seca.
- Gramos de BS por litro de caldo nutritivo.
- Gramos de BS por litro de buffer de extracción.
- Productividad (mg de BS/L de caldo.h), de acuerdo con la Ecuación 3.2:

$$Productividad = \frac{masa\ de\ biosurfactante}{volumen\ de\ caldo \times tiempo\ de\ producción} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

3.2.5 Metodologías directas para la determinación de la tensión superficial

3.2.5.1 Tensiómetro de anillo de Du Noüy

La tensión superficial de los SLC se midió utilizando un tensiómetro de anillo manual de *Du Noüy*, equipado con un anillo de platino de 12,8 mm de diámetro interno y 13,8 mm de diámetro externo. Para ello, se dispusieron 20,0 mL de SLC en una placa de Petri de vidrio

de 52 mm de diámetro interno y se realizó la medición con la muestra termostatizada a $25,0 \pm 0,1$ °C. Paralelamente, se midió la tensión superficial del buffer PBS (debido a que es el medio de extracción de los BS), con el fin de poder calcular la presión superficial. El resultado se expresó como presión superficial, siendo la diferencia de las tensiones superficiales entre el solvente (PBS) y la solución que contiene las moléculas tensioactivas (SLC). La presión superficial hace referencia a la capacidad que posee un agente tensioactivo para disminuir la tensión superficial, entonces, un mayor valor de presión superficial indicará que el componente tensioactivo posee una mayor capacidad de reducir la tensión superficial. Esta técnica también se utilizó para detectar BS extracelulares en los medios de fermentación. Para ello, se midió la tensión superficial de los medios de cultivo luego de la fermentación y se las comparó con la tensión superficial del medio de cultivo MRS estéril termostatizado a $25,0 \pm 0,1$ °C.

3.2.5.2 Tensiómetro de gota: determinación de tensión superficial dinámica

Para determinar la tensión superficial y la tensión superficial dinámica (TSD) del BS en diferentes condiciones de acidez y en presencia de agentes humectantes, se utilizó un tensiómetro interfacial de gota PAT-1.

El equipo permite realizar un análisis dinámico de la tensión superficial ya que registra los valores de tensión superficial en función del tiempo (θ). Cuenta con un sistema de inyección que permite la formación de una gota (12 μ L) de la solución estudiada en la punta de un capilar inmerso en una cubeta de vidrio. En el caso de la medición de la tensión superficial, la cubeta se encuentra vacía y termostatizado a $25,0 \pm 0,1$ °C. El tensiómetro cuenta con un sistema óptico formado por una fuente de luz, lentes y una cámara que permite obtener imágenes de la gota en una computadora. El equipo está apoyado sobre una mesa antivibratoria y cuenta con una unidad de protección para disminuir el efecto de perturbaciones provenientes del exterior.

El perfil de la gota se ajustó a la ecuación de Young-Laplace (Ecuación 3.3), lo que permitió determinar, de manera automática y en cortos periodos de tiempo, la variación de la tensión interfacial:

$$\frac{1}{x} \cdot \frac{x}{dx} \cdot (x \cdot \text{sen}\Phi) = \frac{2}{b} - C \cdot z \quad (\text{Ecuación 3.3})$$

donde x y z son las coordenadas cartesianas de cualquier punto del perfil de la gota, b es el radio de la curvatura en el punto más bajo de la gota, Φ es el ángulo de la tangente al perfil de gota y C es la constante de capilaridad (Ecuación 3.4):

$$C = g \cdot \Delta\rho/\gamma \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

Donde γ es la tensión superficial, $\Delta\rho$ es la diferencia de densidad de los dos fluidos y g es la aceleración de la gravedad (Figura 3.2).

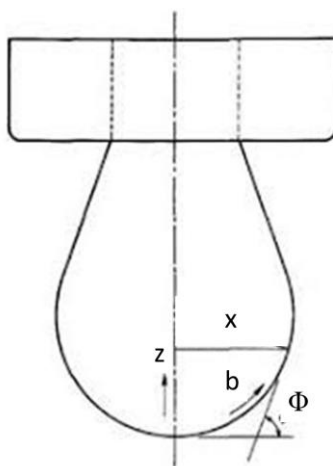


Figura 3.2: Gráfico de la ubicación de las variables medidas por el tensiómetro de gota.

Se estudió la tensión superficial dinámica (TSD) según Bakhshi et al. (2017) utilizando la Ecuación 3.5:

$$TSD = \frac{\Delta TS}{T_e} \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

donde ΔTS corresponde a la diferencia entre la tensión superficial del solvente que contiene el surfactante y la tensión superficial de equilibrio (mencionado anteriormente como presión superficial) y T_e , el tiempo en que se demora en alcanzar la tensión superficial de equilibrio.

Los resultados informados corresponden a un promedio de la medición de la tensión superficial del BS obtenido de, al menos, tres producciones independientes.

Los materiales de vidrio utilizados en esta determinación se limpiaron cuidadosamente con agua y detergente, se enjuagaron con abundante agua y con una mezcla de persulfato de amonio (8,00 % m/v) disuelto en ácido sulfúrico para eliminar restos de materia orgánica,

finalmente se lavaron con agua destilada y se secaron a $80,0 \pm 0,1$ °C. También, luego de cada medición, el capilar fue higienizado con etanol y abundante agua destilada. Las mediciones se realizaron por triplicado.

3.2.6 Determinación de capacidad emulgente de biosurfactantes y caracterización de emulsiones

A partir de las técnicas detalladas a continuación se caracterizó la capacidad de los BS para otorgar estabilidades físicas a distintas emulsiones. El protocolo de elaboración de las emulsiones se encuentra en la sección I.2.1 y II.2.3.

3.2.6.1 Determinación del índice de emulsificación.

La estabilidad visual de una emulsión se puede determinar a partir del índice de emulsificación ($IE\%_{24}$). Para ello, 5 mL de las emulsiones se colocaron en tubos graduados, se midió la altura inicial de las emulsiones al cabo de una hora de la homogenización y luego de 24 horas de almacenamiento a $25,0 \pm 0,1$ °C. Para calcular el índice se utiliza la Ecuación 3.6:

$$EI\%_{24} = \frac{h_{emulsión}}{h_{total}} \cdot 100 \text{ (Ecuación 3.6)}$$

donde “ $h_{emulsión}$ ” representa la altura de la emulsión luego de 24 horas de almacenamiento y “ h_{total} ” representa la altura de la emulsión recién formada. Las mediciones se realizaron por duplicado en todas las emulsiones.

3.2.6.2 Determinación de la distribución, el tamaño de gota, el índice de polidispersidad por dispersión estática de la luz

Para caracterizar las emulsiones y evaluar la capacidad emulgente de los BS, se determinaron el tamaño de gota, su distribución y polidispersidad por dispersión estática de la luz (SLS) a $25,0 \pm 0,1$ °C. El tamaño de gota se informó como el Diámetro de Sauter ($D_{3,2}$) y el Diámetro de Bouker ($D_{4,3}$). Una reducción significativa de estos parámetros indicaría que los BS son capaces de intervenir en la formación de gotas pequeñas, efecto deseable en la formación de una emulsión (Zalazar et al., 2016).

Las mediciones se realizaron con el equipo Mastersizer 2000, estableciendo la velocidad de la bomba a 1800 rpm y utilizando un índice de refracción de 1473 para la fase de aceite de

maíz y un parámetro de absorbancia de 0,001. Se hicieron dos lecturas por muestra y cada medición se repitió al menos en dos muestras independientes.

3.2.6.3 Determinación del tamaño de gota por dispersión dinámica de la luz

El diámetro de gota de las emulsiones se determinó por dispersión de luz dinámica (DLS), utilizando un difractómetro laser Nano Zetasizer. Las mediciones se realizaron a un ángulo fijo de 173°, siendo el rango de medida del equipo entre 0,6 nm y 6,0 μm . Cada una de las muestras utilizadas se colocó en cubetas de poliestireno. El índice de refracción (IR) de la fase oleosa se determinó con un refractómetro portátil. Las emulsiones se almacenaron a $25,0 \pm 0,1$ °C y las determinaciones se realizaron cada 15 días durante un lapso de 56 días. Los tamaños de gota se reportaron como el volumen promedio (Z-average). Este equipo se utiliza para medir tamaños de partículas entre 3,8 nm a 100 μm . Se hicieron cinco lecturas por muestra y cada medición se repitió al menos en dos muestras preparadas en forma independiente.

3.2.6.4 Determinación del Potencial Z

Para determinar la carga neta superficial de las partículas en solución, se realizó la medición del potencial zeta (Z_p) en un equipo Nano Zetasizer a un ángulo fijo de 17°. Las soluciones se diluyeron entre 0,01 y 0,001 % m/v con agua bidestilada y se colocaron en celdas capilares provistas de electrodos a cada lado (Figura 3.3). El Z_p se determinó midiendo la dirección y velocidad de las partículas al aplicar un campo eléctrico. Se hicieron diez lecturas por muestra y cada medición se repitió al menos en dos muestras preparadas por separado.



Figura 3.3: Celda utilizada para la medición del potencial Z en el equipo Zetasizer Nano-Zs.

3.2.6.5 Estudio de la evolución de la turbidez en el tiempo

La estabilidad de las emulsiones se determinó mediante un Turbiscan®. Para ello, la emulsión se deposita en un vial y un cabezal móvil en el interior del equipo se desplaza verticalmente y de forma automática cada 40 µm desde la base del vial hasta la altura final de la muestra, irradiando una fuente de luz pulsada de una longitud de onda en el infrarrojo cercano de 880 nm. La luz retrodispersada llega a un detector ubicado a 45° con respecto a la fuente de luz y, por otro lado, un detector ubicado a 180° con respecto a la fuente de luz detecta la radiación transmitida que puede atravesar la muestra cuando no existe un gran número de gotas dispersas (Figura 3.4).

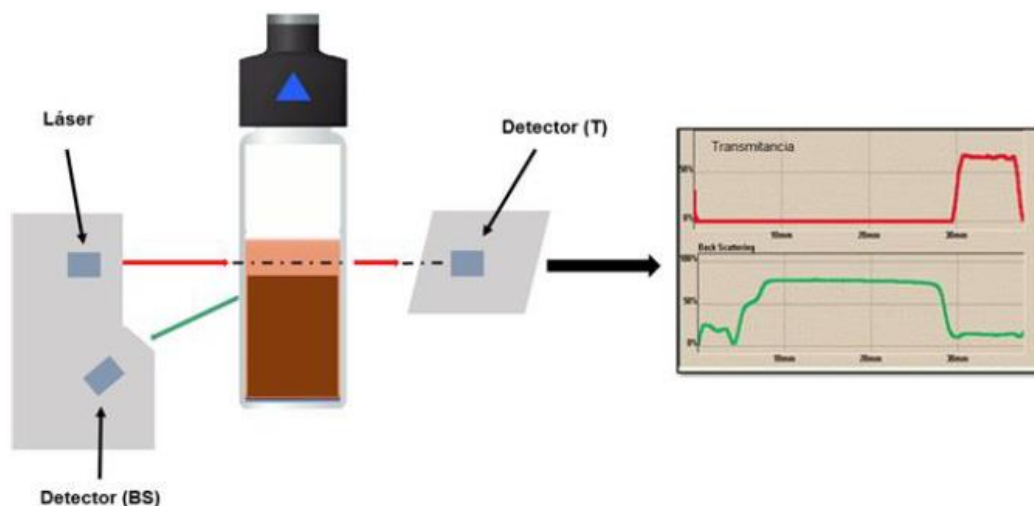


Figura 3.4: Esquema del equipo Turbiscan®.

El “Índice de Estabilidad Turbiscan®” (TSI) es un índice numérico adimensional que es el resultado de sumar todos los fenómenos de desestabilización que ocurren en la muestra que puede ser medido por un cambio notable de la retrodispersión o intensidad de la señal de transmisión a lo largo de la altura de la muestra. Estas variaciones de señal son directamente vinculadas a cualquier desestabilización en la muestra, por lo que, cuanto mayor sea el valor de TSI, menor será la estabilidad. El TSI se calcula mediante la Ecuación 3.7:

$$TSI(t) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{BS})^2}{n-1}} \quad (\text{Ecuación 3.7})$$

donde x_i es el promedio de retrodispersión para cada minuto de medición, x_{BS} es el promedio de x_i y n es el número de escaneos. El valor de TSI para cada emulsión es calculado con el software del equipo Turbiscan® de forma automática.

3.2.6.6 Observación microscópica de las emulsiones

La observación microscópica de las emulsiones es una técnica comúnmente usada para el estudio de su desestabilización, debido a que permite observar la morfología que poseen las gotas y sus cambios en el tiempo, así como también respaldar los resultados a través de las técnicas anteriormente mencionadas.

Microscopía óptica: para la observación microscópica de las emulsiones, se dispusieron cuidadosamente 200 μL de cada emulsión sobre un portaobjetos. Luego, se tapó con un cubreobjeto para evitar la coalescencia y disminuir el movimiento de las gotas. Las muestras se observaron con un microscopio Axioskop 40, con magnificación $\times 100$.

Microscopía láser confocal de barrido: la microestructura de las emulsiones de aceites esenciales se observó utilizando un microscopio láser confocal de barrido. Para observar las muestras, se colocaron alícuotas de 10 μL (sin dilución previa) sobre un portaobjetos y se las tiñó con soluciones acuosas del fluorocromo Azul Nilo (0,1 %m/v en etanol) para teñir los polisacáridos y las proteínas. Luego, se colocó cuidadosamente 1 μL en una microplaca de 96 pocillos para microscopía, evitando la formación de burbujas. Las muestras se excitaron con un láser de 639 nm y se registró la emisión con un detector espectral en el rango de 641-695 nm. Todas las imágenes se adquirieron con el equipo Zeiss LSM980 y se procesaron con el software Fiji - Image J (ImageJ Ops, 2021).

3.2.6.7 Caracterización reológica de emulsiones

Para evaluar el comportamiento viscoelástico de emulsiones se realizaron mediciones en un reómetro dinámico de tensión tangencial controlada con una geometría de cono (24,94 mm de diámetro, ángulo de 2°) y plato con un espacio o gap entre ellos de 1 mm. Se colocaron aproximadamente 1,00 mL de muestra entre el cono y plato, lo que permitió llenar completamente el espacio entre ellos. Cada muestra se colocó sobre la platina, apoyándose, a continuación, el cono sobre la misma según se determinaba desde el software del equipo. Durante el proceso de medición, cada muestra debió alcanzar un estado de verdadero o pseudo equilibrio. Por lo tanto, para evitar su deshidratación durante la medición, se la aisló

y se la mantuvo en una atmósfera húmeda mediante el uso de un cobertor. La plataforma (fija) donde se apoya la muestra a medir posee un controlador de temperatura por sistema Peltier (TEK 150P-CF), conectado a un baño termostático. Todas las mediciones se realizaron a $25,0 \pm 0,1$ °C.

Se realizaron barridos de flujo aplicando velocidades de deformación entre 0 y 1800 s^{-1} , para determinar el tipo de comportamiento que poseen las emulsiones. A partir de este estudio, también se obtuvieron los resultados de viscosidad en función de la velocidad de deformación, que se utilizó para la determinación de la viscosidad aparente de las emulsiones. Se calculó una viscosidad promedio, con fines comparativos, para esto se determinó el promedio de las viscosidades correspondientes a la zona en que la viscosidad permanece constante.

3.2.7 Determinación de la actividad antimicrobiana y antibiofilm

3.2.7.1 Inóculos

Todas las cepas utilizadas como indicadoras se conservaron hasta su uso a $-80,0 \pm 0,1$ °C en caldo nutritivo adicionado con 20,0 % m/m de glicerol. Antes de su uso, las cepas se repicaron dos veces con el objetivo de reactivarlas luego del estrés producido por la crioconservación. De acuerdo con el tipo de microorganismo, las condiciones de incubación de los pre-inóculos fueron diferentes:

- Para bacterias (*S. putrefaciens*, *P. aeruginosa*, *L. plantarum*, *E. coli* y *L. innocua*): En el primer repique se incubó la cepa durante 24 horas, mientras que en el segundo la incubación fue de 15 horas. En todos los casos se utilizó caldo triptona – caseína (TSB). La temperatura de incubación fue de $30,0 \pm 0,1$ °C para todas las cepas, excepto para *E. coli* que tuvo una temperatura de incubación de $37,0 \pm 0,1$ °C.
- Para levaduras (*Z. bailii*): La incubación de los dos repiques tuvo una duración de 30 horas. El caldo utilizado fue caldo Sabouraud y la temperatura de incubación fue de $25,0 \pm 0,1$ °C.

3.2.7.2 Determinación de la actividad antiadherente de los sobrenadantes libres de células

Se analizó si los SLC tenían compuestos capaces de disminuir la adherencia sobre poliestireno de *S. putrefaciens*, *L. innocua*, *P. aeruginosa* y *P. fluorescens*, cepas seleccionadas por su reconocida capacidad para formar biofilms (Bagge et al.; 2001, Borucki et al., 2003; Rossi et al., 2017; Yi y Xie, 2022; Chen et al., 2023; Esposito et al., 2023)

Para la realización del ensayo, se empleó la metodología propuesta por Madhu y Prapulla (2014). Se utilizaron microplacas de poliestireno estériles de 96 pocillos con base plana. En aquellos pocillos que se utilizaron para analizar la capacidad antiadherente de los SLC se agregaron 200 μ L de muestra, y en los que se usaron como control de la adherencia de la se colocaron 200 μ L de PBS. Las microplacas se dejaron reposar durante 18 horas a $4,0 \pm 0,1$ °C para permitir la interacción del SLC con el poliestireno. Pasado el tiempo, se retiró el líquido no adherido y se lavó dos veces con PBS. Luego, se incorporaron 200 μ L de las bacterias indicadoras ajustadas a una densidad óptica de $1,00 \pm 0,01$ McF (3.10^8 UFC/mL). Se dejó incubar durante 4 horas a $4,0 \pm 0,1$ °C, y al finalizar la incubación se lavó tres veces con PBS. Luego, se agregaron 200 μ L de metanol para fijar las células adheridas, el cual se eliminó por vertido luego de 15 minutos. Se dejó secar y se tiñeron los pocillos con 200 μ L de cristal violeta al 0,1 % durante 5 minutos. Finalmente, se quitó el exceso de la solución de violeta cristal y se resuspendió el colorante con 200 μ L ácido acético glacial 33,0 %m/v. Se midió la absorbancia a 590 nm. La disminución porcentual de la adhesión de las células (%IM) al poliestireno se determinó a través de la Ecuación 3.8.

$$\%IM = \left[1 - \left(\frac{A_c}{A_o} \right) \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

siendo “ A_c ” la absorbancia del biofilm remanente luego del tratamiento y “ A_o ” la absorbancia del biofilm sin ningún tratamiento. Un mayor %IM, representa una mayor disminución en la formación de biofilm.

3.2.7.3 Determinación de la actividad antimicrobiana de los biosurfactantes

Se determinó la actividad antimicrobiana de los BS que presentaron mejor actividad superficial utilizando el ensayo de gota en superficie frente a las bacterias indicadoras: *P.*

aeruginosa, *L. plantarum*, *E. coli* y *L. innocua*. Se siguió la metodología propuesta por Reenen et al. (1998).

El inóculo, en fase estacionaria temprana, se centrifugó (5000 rpm, 10 °C, 5 minutos) y se separó el pellet del caldo. Los microorganismos se resuspendieron con agua peptona 0,1 %m/v, y se ajustaron a una densidad óptica de $0,50 \pm 0,01$ McF. Luego, se realizó una dilución 1/100 con agua peptona 0,1 % m/v para alcanzar una concentración de 1.10^6 UFC/mL. Esta suspensión bacteriana se utilizó para realizar un césped sobre placas de Petri estériles con TSA. Para ello, se depositó 1,0 mL de la suspensión bacteriana, se dispersó con una espátula de Drigalsky, se retiró el exceso con una pipeta y se dejó secar.

Sobre el césped bacteriano se dispusieron gotas de 10 µL de solución de BS liofilizado en una concentración de 20 mg/mL. Luego, las placas se guardaron en la heladera durante 30 minutos para favorecer la difusión de la muestra de BS sobre el agar inoculado. Finalmente, las placas se incubaron a $30,0 \pm 0,1$ °C durante 24 horas. La ausencia de crecimiento sobre la zona en que se dispuso la muestra del BS se consideró como indicativo de actividad antimicrobiana frente a la cepa sembrada sobre el agar nutritivo. A mayor diámetro de inhibición de crecimiento, mayor actividad antimicrobiana ejercida por la muestra. El ensayo se realizó por triplicado.

3.2.7.4 Determinación de actividad antimicrobiana del biosurfactante seleccionado mediante el ensayo de microdilución en caldo

Se realizó una solución de BS con una concentración 40 mg/mL en caldo TSA y se esterilizó por filtración, utilizando un filtro con diámetro de poro de 0,22 µm. A partir de esta solución se realizaron diluciones con concentraciones de 20, 10 y 5 mg/mL. En una microplaca de 96 pocillos de poliestireno estéril con fondo curvo se incorporaron 180 µL de cada una de las soluciones de BS en caldo, por triplicado. Estos pocillos se inocularon con biomasa de *Listeria innocua* en fase estacionaria temprana, la suspensión bacteriana se ajustó a una densidad óptica de 0,5 McF (1.10^8 UFC/mL) y se diluyó 1/10 alcanzando una concentración estimada de 1.10^7 UFC/mL, utilizando, en ambos pasos, agua peptonada 0,1 % como diluyente. En los pocillos con la solución de BS se dispusieron 20 µL de la dilución con una concentración 1.10^7 UFC/mL con 180 µL de caldo TSB, alcanzándose una concentración

final 1.10^6 UFC/mL. La concentración del inóculo se corroboró realizando un recuento en superficie sobre TSA.

En la misma microplaca se realizaron los blancos, para los cuales se dispusieron 180 μ L de las soluciones de BS y 20 μ L de agua peptona. También se realizó un control del crecimiento en caldo TSA disponiendo 180 μ L de caldo TSB y 20 μ L del inóculo 1.10^7 UFC/mL. El crecimiento se evaluó a través de la medición de la absorbancia a 600 nm, utilizando un lector de microplacas que realizó mediciones en forma automática cada 60 minutos, durante 24 horas y mantuvo la temperatura de incubación a $30,0 \pm 0,1$ °C.

3.2.7.5 Determinación de la actividad antibiofilm por co-incubación

La capacidad del BS para inhibir el mecanismo de “*quórum sensing*” asociado a la formación de biofilm se estudió mediante un ensayo colorimétrico, de acuerdo con Viola et al. (2021). Con este fin, una vez finalizado el ensayo descrito en 3.2.7.4. se descartó el sobrenadante y se agregaron 200 μ L de solución de cristal violeta 0,1 % a cada uno de los pocillos. Luego, se incubó de manera estática durante 30 min a $30,0 \pm 0,1$ °C. Como el biofilm tiene afinidad por el poliestireno, queda retenido en las paredes de los pocillos, por lo que se prosiguió al lavado de la microplaca sumergiéndola en agua destilada tres veces, descartando así el cultivo no adherido y el exceso de colorante.

Teniendo en cuenta la mayor solubilidad del cristal violeta en etanol, una vez seca la placa, se agregaron 200 μ L de etanol 96° y se incubó con agitación suave a $37,0 \pm 0,1$ °C, durante 30 min. La absorbancia se midió a 600 nm. La inhibición del biofilm se calculó mediante la Ecuación 3.8.

3.2.7.6 Determinación de la mínima concentración inhibitoria de emulsiones de aceites esenciales de corteza de canela estabilizadas con el biosurfactante seleccionado

Se determinó la mínima concentración inhibitoria (MIC) frente a:

- *Z. bailii* en medio nutritivo caldo Sabouraud ajustado a pH 3,50 con ácido cítrico 20,0 % m/v a una temperatura de incubación de $30,0 \pm 0,1$ °C.
- *L. innocua* en medio nutritivo caldo TSB ajustado a pH 5,00 con ácido cítrico 20,0 %m/v a $30,0 \pm 0,1$ °C.

Para ello, la suspensión microbiana frente a la cual se probaron las emulsiones se realizó de la siguiente manera:

- Para *Z. bailii*, se partió de un inóculo incubado durante 30 horas a $25,0 \pm 0,1$ °C, el cual se centrifugó y el pellet se resuspendió con 2 mL de agua peptona 0,1 %. Luego, se realizó una dilución 0,5 McF, es decir con una concentración 1.10^6 UFC/mL, registrando los volúmenes utilizados para alcanzar esta dilución. A partir de los datos registrados, se obtuvo una dilución 1.10^7 UFC/mL.
- Para *L. innocua* se siguió la metodología previamente detallada en la sección 3.2.7.4.

Las diluciones 1.10^7 UFC/mL se utilizaron para sembrar la microplaca. Todas las diluciones se realizaron con agua peptona 0,1%*m/v* como solvente. La concentración de las UFC se corroboró realizando un recuento de colonias en profundidad en TSA para *L. innocua* y un recuento en superficie en agar Sabouraud para *Z. bailii*.

Para determinar la MIC de la emulsión frente a los distintos microorganismos se realizaron diluciones de la emulsión. Se partió de la dilución de la emulsión madre con una concentración de 5000 ppm a 2500 ppm utilizando un caldo doble concentrado. Posteriormente, se realizaron diluciones sucesivas al medio de la emulsión 2500 ppm alcanzando concentraciones 1250, 625, 312,5, 156, 78 y 39 ppm. Todas las diluciones (incluyendo la de la emulsión madre) se hicieron utilizando los caldos mencionados anteriormente para cada tipo de microorganismo. Se incorporaron en los pocillos 180 μ L de cada dilución y 20 μ L de cada microorganismo con la concentración ajustada a 1.10^7 UFC/mL, alcanzando una concentración final de 1.10^6 UFC/mL. Las microplacas se incubaron en un lector de microplacas a $25,0 \pm 0,1$ °C para *Z. bailii* y a $30,0 \pm 0,1$ °C para *L. innocua*. Se registro la MIC como la mínima concentración de emulsión que inhibe el crecimiento del microorganismo debajo de un valor de absorbancia de 0,1 luego de 48 horas de incubación.

También, se determinó si la actividad de las emulsiones era bacteriostática o bactericida. Para ello, se tomó una alícuota de 50 μ L de los pocillos que no presentaron crecimiento y se hizo una siembra en gotas sobre TSA para *L. innocua* y agar Sabouraud para *Z. bailii*. Las placas se incubaron por 72 horas a $30,0 \pm 0,1$ °C para *L. innocua* y a $25,0 \pm 0,1$ °C para *Z. bailii*

3.2.8 Caracterización química del biosurfactante seleccionado

3.2.8.1 Caracterización química primaria por Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR)

Se analizaron alícuotas del BS semipurificado por diálisis y liofilizado en un Espectrofotómetro FTIR Nicolet 8700 equipado con un detector DTGS, provisto de un accesorio de transmisión, en el rango espectral de 4000 hasta 400 cm^{-1} , 32 barridos acumulados, resolución 4 cm^{-1} , apertura 100 y ganancia 8.

La verificación de desempeño del equipo fue realizada tanto en la escala de Números de onda como en la Resolución del equipo registrando el espectro de un film de poliestireno certificado de 35 μm de espesor.

Para el análisis, se preparó una pastilla de KBr empleando 0,5-1 mg de la muestra pulverizada finamente en un mortero de ágata, mezclándola y triturándola con 150-200 mg de KBr (grado de pureza para espectroscopía de infrarrojo). La mezcla se comprimió en un pastillero, mediante una prensa mecánica, aplicando una presión de 100 kN/cm^2 durante al menos 1 minuto, con ayuda de vacío, a fin de obtener un disco transparente de aproximadamente 13 mm de diámetro a través del cual puede atravesar el haz del espectrómetro.

3.2.8.2 Cuantificación de hidratos de carbono

Para la determinación de hidratos de carbono se utilizó el método colorimétrico del Fenol-Sulfúrico, según DuBois (1956), el cual permite cuantificar azúcares totales.

El BS liofilizado y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, se disolvió completamente en agua bidestilada en una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, luego, se diluyó en proporción 1:4 con agua bidestilada alcanzando un volumen de 2000 μL , siendo la concentración final de muestra igual a 12,5 $\mu\text{g/mL}$. A este último sistema, se le incorporaron 50 μL de fenol 80 %m/v, y se agitó el contenido con vortex. Luego, se incorporaron 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, se dejó reposar 10 minutos bajo campana, y se agitó en vortex. Para propiciar la reacción colorimétrica en condiciones controladas, se incubó 15 minutos a $25,0 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm contra el blanco de reactivos. Además, se realizó una curva de calibración utilizando soluciones estándar de D - glucosa en concentraciones entre 0 y 5 μg de D - glucosa/mL. Los resultados se expresaron como porcentaje de hidratos de carbono en base seca. Dicha determinación se realizó por triplicado.

3.2.8.3 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación del porcentaje de proteínas del BS se utilizó la técnica de Lowry modificada según Peterson (1977). El “Reactivo A” y el “Reactivo B” se prepararon de la siguiente manera:

Reactivo A (mezcla de las siguientes soluciones en una relación 100:1:1):

- Solución 1: carbonato sódico (Na_2CO_3) al 2,0 % m/v en solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N.
- Solución 2: sulfato cúprico pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 1,0 % m/v en agua.
- Solución 3: tartrato sódico potásico tetra hidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) al 1,0 % m/v en agua.

Reactivo B:

- Solución de Folin-Ciocalteu 1:1 en agua.

La muestra de BS liofilizada y almacenada a -20°C , se disolvió completamente en agua bidestilada en una concentración de 1,0 mg/mL. Luego, se adicionaron 100 μL de dicha solución y 100 μL de agua destilada a 1,0 mL del reactivo A. Se agitó en vortex y se incubó por 20 minutos a $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Luego, se agregó 100 μL del reactivo B, se agitó en vortex y se incubó 20 minutos a $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 660 nm contra el blanco conformado por agua destilada. Además, se realizó una curva de calibración utilizando como estándar albúmina de suero bovino disuelta en agua bidestilada. Se utilizaron concentraciones abarcando un rango comprendido entre 0 y 900 μg de proteína/mL. Los resultados se expresaron como porcentaje de proteínas en base seca (%). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado

3.2.8.4 Cuantificación de lípidos

La determinación de lípidos se realizó a través del método de Folch (1957), con modificaciones. Se pesaron $50,0 \pm 0,1$ mg de una muestra de BS liofilizado en tubos falcón de 50 mL. Se incorporan 300 μL de agua bidestilada para formar un sistema, con una consistencia similar a una pasta, en el cual se encuentre disperso el BS favoreciendo su interacción con los solventes de extracción. Para realizar la extracción se utilizaron los

siguientes reactivos y metodologías sobre la muestra de BS diluida, en el orden correspondiente:

- 1) Se agregó 4,0 mL de la solución cloroformo: metanol (2:1), agitando manualmente para favorecer la interacción entre fases y se sometió a ultrasonido por 15 min con una potencia de 240 w para facilitar la extracción de los lípidos presentes.
- 2) Se separó la fase orgánica obtenida con una pipeta Pasteur y se repitió el paso 1) con el pellet de BS remanente, para dar lugar a una segunda extracción.
- 3) Finalizada la segunda extracción, se separó la fase orgánica del pellet y se juntó con la primera fase orgánica, extraída en el paso 2.
- 4) La fase orgánica se lavó dos veces con 4,0 mL de una solución de KCl 0,88% y, posteriormente, dos veces más con 4,0 mL de cloroformo: metanol:KCl 0,88% en relación 3:48:47. Se separó la fase orgánica de la acuosa, con una pipeta Pasteur, entre cada lavado.
- 5) La fase orgánica obtenida se dispuso en placas de Petri, previamente secadas y pesadas, para la evaporación del solvente y posterior pesaje de estas.

El porcentaje de lípidos en la muestra se determinó como (Ecuación 3.9):

$$\% \text{Lípidos} = \frac{(m_{pe} - m_p)}{m_{bs}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3.9})$$

donde m_{pe} corresponde a la masa de la placa de Petri con el extracto lipídico, m_p corresponde a la masa de la placa de Petri y m_{bs} corresponde a la masa de muestra del BS.

3.2.8.5 Determinación de humedad

Se determinó la humedad de la muestra liofilizada del BS y almacenada a $-20,0 \pm 0,1$ °C, mediante gravimetría. Con este fin, se secaron pesafiltros a $60,0 \pm 0,1$ °C y vacío en una estufa de convección, hasta peso constante. Posteriormente, se depositó una masa de aproximadamente $0,0250 \pm 0,0001$ g de BS en los pesafiltros. Las muestras se secaron en las condiciones anteriormente mencionadas hasta peso contante. Los resultados se informaron como porcentaje de humedad (%), haciéndose uso de la Ecuación 3.10:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(m_{ph} - m_p) - (m_{ps} - m_p)}{(m_{ph} - m_p)} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 3.10})$$

siendo m_{ph} la masa del pesafiltro conteniendo la masa de biosurfactante húmedo, m_p la masa del pesafiltro y m_{ps} la masa del pesafiltro conteniendo la masa de BS seco.

El resultado obtenido de esta determinación se utilizó para el cálculo del porcentaje de hidratos de carbono, proteínas y lípidos en base seca. Las mediciones se realizaron por duplicado y el resultado fue el promedio de ambas mediciones.

3.2.9 Caracterización de las propiedades físicas del biosurfactante seleccionado

3.2.9.1 Concentración micelar crítica

La CMC se determinó utilizando la metodología mencionada por Gudiña (2010). Se prepararon diluciones del BS parcialmente purificado y liofilizado en concentraciones entre 0,004 y 12,0 mg/ml en agua bidestilada y se determinó la tensión superficial de cada dilución a 20 ± 1 °C utilizando un tensiómetro de anillo automático, equipado con un anillo de platino de 12,8 mm de diámetro interno y 13,8 mm de diámetro externo. El punto que corresponde a la CMC se identifica como el punto de inflexión a partir del cual no se observan cambios significativos en la tensión superficial a pesar del aumento de la concentración de BS. Es posible determinarlo graficando la tensión superficial en función de la concentración de BS en escala logarítmica. Aquel punto a partir del cual se observa un cambio en la pendiente de la curva es reconocido como la CMC. Para facilitar la determinación de su valor, ambos lados de la curva se ajustaron a una recta, antes y después de la inflexión. El punto donde ambas rectas se intersecan corresponde al valor de CMC.

3.2.9.2 Solubilidad en función del pH

Se evaluó la solubilidad del BS en soluciones de pH entre 4,00 y 7,00. Para esto, se dispusieron en tubos de ensayo 5,0 mL de una solución del BS en una concentración de 5,00 g/L y se ajustó el pH con ácido clorhídrico 1,0 M a valores de 4,00, 5,00, 6,00 y 7,00. La presencia de turbidez o precipitado indican la pérdida de solubilidad de la muestra.

3.2.10 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante del BS y de las emulsiones de aceites esenciales estabilizadas con BS se determinó por medio de las técnicas de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), de acuerdo con Brand-Williams et al. (1995), evaluando la capacidad que tienen las muestras

para captar radicales libres. En la Figura 3.5 puede observarse la ecuación de la reacción química.

La molécula DPPH es conocida como un radical libre capaz de permanecer estable, debido a que, cuando un electrón no apareado se deslocaliza, lo hace sobre la molécula completa, evitando la dimerización. La deslocalización del electrón genera un color violeta intenso, que absorbe en medio etanólico o metanólico a 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con un sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta va desapareciendo por la formación de la forma reducida, y adquiere un color amarillo.

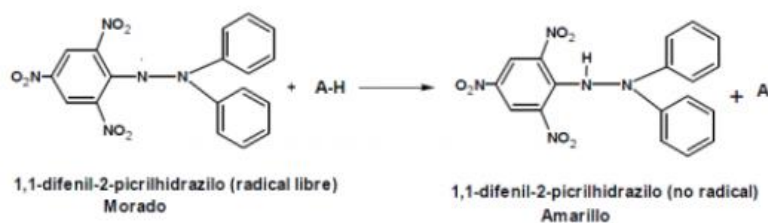


Figura 3.5: Reacción del DPPH con un sustrato antioxidante.

Se realizó una solución de BS, en agua desionizada con una concentración de 5,00 g/L y se dispusieron 200 μ L en tubos de ensayo. En paralelo se realizó la curva de calibración con ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trólox) con concentraciones entre 0,1 y 0,4 mM en una mezcla de proporción 1:1 de etanol: agua desionizada. Se incorporó a cada sistema analizado y a los correspondientes a la curva de calibración, 1,8 mL de una solución etanólica de DPPH 0,1 mM y se incubó en forma inmediata a 37 °C durante 30 minutos. Cumplido el tiempo de incubación de cada sistema, se midió la absorbancia a 517 nm contra el blanco de reactivos.

También, a partir de los datos de absorbancia se realizó el cálculo de % RSA (Radical Scaving Activity) (Ecuación 3.11), parámetro que refiere a la disminución de la oxidación en la muestra, a mayores valores de % RSA indican mayor actividad antioxidante.

$$\%RSA = \frac{A_o - A_1}{A_o} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3.11})$$

donde A_o corresponde a la absorbancia del banco de reactivo y A_1 la absorbancia de la muestra.

3.2.11 Estudio del crecimiento de la cepa productora de biosurfactante empleando distintos medios de cultivo

Una de las metodologías utilizadas para el seguimiento del crecimiento de bacterias corresponde a la medición de los cambios de absorbancia en el tiempo. Para esto se utilizaron dos técnicas:

- 1) La siembra en microplacas de 96 pocillos, que permite la medición automática de la absorbancia en el tiempo a través del uso de un lector de microplacas.
- 2) La toma aséptica de 1,0 mL de muestra previamente homogeneizada del contenedor donde se produce la fermentación y la medición de la absorbancia en un espectrofotómetro UV.

La primera técnica se utilizó para evaluar el crecimiento de BAL en sustratos a base de jugo de yacón. La segunda, para evaluar el crecimiento de BAL en sustratos a base de yacón, en aquellos casos en los que era necesario luego extraer el BS, ya que el volumen reducido de la microplaca no permite la extracción de este metabolito.

3.2.11.1 Seguimiento del crecimiento a través de la absorbancia

Con los datos obtenidos de absorbancia se construyeron curvas de crecimiento las que se modelaron aplicando el Modelo Logístico, éste presenta la Ecuación 3.12 (Dalgaard y Koutsoumanis, 2001):

$$Abs = Abs_{min} + \frac{Abs_{max} - Abs_{min}}{1 + e^{-m \cdot (t - t_i)}} \quad (\text{Ecuación 3.12})$$

Donde Abs_{min} corresponde a la absorbancia mínima asintótica, y Abs_{max} corresponde a la absorbancia máxima asintótica. El parámetro t_i , corresponde a el tiempo de inflexión y m corresponde al parámetro relacionado con la velocidad de crecimiento. Abs y t corresponde a la variable absorbancia y tiempo respectivamente. Es importante destacar que la velocidad específica de crecimiento no corresponde a la máxima velocidad de crecimiento, como tampoco el t_i coincide con el tiempo de fase lag, ya que el método de densidad óptica es menos sensible que el método de recuento de viables en placa (Dalgaard y Koutsoumanis, 2001; Biesta-Peters et al., 2010).

3.2.11.2 Seguimiento del crecimiento a través de recuento en placa

Para realizar los recuentos del crecimiento de la bacteria productora de BS en el tiempo, se tomaron alícuotas de 1,0 mL del recipiente de fermentación de manera aséptica, el cual previamente debió ser agitando con suavidad para homogenizar la disposición de las bacterias en el medio. De dicha alícuota, se tomaron 100 μ L y se diluyó en agua peptona 0,1 %m/v estéril para lograr una dilución de 1/10. Para homogenizar la dilución se agitó con vortex. Luego, se realizaron diluciones seriadas mezclando una parte de la dilución anterior con 9 partes de agua peptona.

El recuento de BAL se realizó en superficie utilizando placas de Petri con agar MRS. Para esto, se sembraron 100 μ L de la dilución deseada sobre el agar y se rastrilló con una espátula de Drigalsky, esterilizada por flameo, hasta la absorción completa de la muestra en el agar y se incubaron a $37,0 \pm 0,1$ °C. Luego de la incubación, se contaron las colonias características. En todos los recuentos microbiológicos, se utilizaron 3 réplicas independientes, y a cada una se le realizaron los recuentos por duplicado.

El modelado del crecimiento de las BAL en base al recuento en placa se realizó utilizando el modelo de Gompertz modificado según Zwietering et al. (1990), presente en la Ecuación 3.13:

$$\log \frac{N}{N_0} = A \exp \left\{ - \exp \left[\mu_m \frac{e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Ecuación 3.13})$$

la cual expresa el logaritmo del cociente entre la población microbiana a un dado tiempo (N) y la población inicial (N_0) en función del tiempo. De esta manera, se obtuvieron los parámetros biológicos del crecimiento de BAL: la velocidad específica de crecimiento (μ_m), el tiempo de fase de latencia (λ) y el valor asintótico (A).

3.2.11.3 Medición del pH

Paralelamente, se midió el pH de una alícuota del medio de cultivo en función del tiempo de incubación a través del uso de un pHmetro de mesada. Se realizó por triplicado midiendo una vez cada muestra independiente.

3.2.12 Análisis estadísticos de los datos

Los datos obtenidos de los distintos ensayos realizados se analizaron mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor, seguido por el test de Tukey para detectar diferencias significativas con un nivel de significancia de 0,05. En ciertos ensayos también se evaluó el coeficiente de correlación lineal de Pearson, para determinar correlación lineal entre un factor y un efecto, valores cercanos a ± 1 de este coeficiente indican posible correlación lineal. Este análisis y la comparación de las medias, así como también la evaluación de correlación lineal entre factores, se hizo utilizando el programa estadístico *Infostat* (Infostat, 2020).

Para el análisis del comportamiento reológico, las curvas obtenidas a partir del barrido de flujo se modelaron utilizando la Ley de la potencia (Ecuación 3.14):

$$\tau = K \cdot \gamma^n \quad (\text{Ecuación 3.14})$$

siendo τ el esfuerzo de corte, γ la velocidad de deformación, K el índice de consistencia y n el índice de comportamiento. Este último permite clasificar los fluidos en newtonianos ($n=1$), pseudoplasticos ($n < 1$) y dilatantes ($n > 1$) (Ramirez-Navas, 2006). El ajuste de los parámetros se evaluó a través de un ANOVA, el ajuste se evaluó a partir del error estándar y el p-valor ($p < 0,05$)

En el caso del estudio del crecimiento de la BAL productora del BS, el ajuste de las ecuaciones utilizadas para modelar las curvas de crecimiento se evaluó realizando un análisis factorial de varianza obteniéndose los coeficientes de correlación ajustados (R^2).

Tanto los parámetros obtenidos a partir del modelado de las curvas de flujo y de las curvas de crecimiento, se compararon mediante un ANOVA determinándose las diferencias significativas a través de la prueba de Tukey. En todos los casos, la significatividad estadística se evaluó a un nivel del 5% ($p \leq 0,05$). Los modelados y la obtención del coeficiente de correlación ajustado se obtuvieron mediante el programa estadístico Statgraphiscs (Centurion XV, Versión 15.2.05).

Capítulo

I. Capítulo 1: Aislamiento y selección de bacterias ácido lácticas productoras de biosurfactante y caracterización de la cepa seleccionada

I.1 Objetivos particulares

- Aislar e identificar BAL productoras de BS a partir de productos de la pesca y quesos ovinos naturales de la Patagonia.
- Caracterizar la actividad surfactante, la capacidad antiadhesiva y antimicrobiana de BS.
- Seleccionar el/los BS con mejor funcionalidad.

I.2 Metodologías específicas

En la Figura I se muestra un diagrama de las etapas de trabajo y metodologías aplicadas en este capítulo.

I.2.1 Formación de emulsiones para la determinación de la actividad emulgente de los sobrenadantes libres de células conteniendo biosurfactantes

Para evaluar la actividad emulgente de los compuestos surfactantes presentes en los SLC, se formularon emulsiones que fueron luego evaluadas a través de la determinación del: i) Índice de emulsificación ($IE_{24\%}$) y ii) Diámetro y distribución de gota por SLS.

Como fase acuosa de las emulsiones se utilizaron los SLC a los cuales se les adicionó 0,15 % m/m de goma xántica y se les permitió una hidratación por 24 horas en agitación, finalizado dicho proceso se ajustó el pH a 7,00 utilizando una solución de HCl 1 M o de NaOH 1 M según fuere necesario. Como fase oleosa se utilizó aceite de maíz comercial (Arcor, Argentina). La proporción entre la fase acuosa y oleosa fue de 90/10. Ambas fases se mezclaron durante un minuto en un agitador vortex para formar una emulsión gruesa. Posteriormente, para reducir el tamaño de gota de la emulsión, se procesó con un homogeneizador Ultra-turrax T-8 equipado con una herramienta de dispersión S8N-5G operando a 24000 rpm por 3,5 minutos. Con fines comparativos, se formuló una emulsión usando PBS con 0,15 % m/m de goma xántica como fase acuosa. Luego, las emulsiones se almacenaron a $25,0 \pm 0,1$ °C.



Figura I: Diagrama de flujo de las etapas de trabajo desarrolladas en el Capítulo 1.

I.3 Resultados y discusión

1.3.1 Identificación y capacidad para producir compuestos tensioactivos de las bacterias ácido-lácticas aisladas

A partir de las muestras de quesos de leche ovina artesanal y del tracto gastrointestinal de pescados, fue posible identificar taxonómicamente nueve cepas de BAL. Las mismas se identificaron a nivel feno y genotípico. Este último se realizó mediante la amplificación del ARN ribosomal 16s por medio de PCR. El genoma de las bacterias se incorporó a la base de datos GenBank de NCBI (Tabla I.1). Las cepas presentaron una alta homología con los géneros *Lactiplantibacillus*, *Lactococcus* y *Leuconostoc*. Algunas especies pertenecientes al género *Lactiplantibacillus* y *Lactococcus*, son conocidas como productoras de BS ligados a la célula o extracelulares (Mouafo et al., 2020). También, Salman y Khudair (2015) aislaron a la cepa *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, que fue capaz de producir un BS con actividad antibiofilm y antimicrobiana.

Tabla I.1: Género, especie y origen de las especies aisladas.

Género y especie	Numero de acceso	Fuente
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (LbTw3)	MK308540	Queso ovino
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (LbTw5)	MK308541	Queso ovino
<i>Lactiplantibacillus paraplantarum</i> (LbTw7)	MK308542	Queso ovino
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (Tw11)	JQ724544	Tracto intestinal de pejerrey panzón (<i>Odontesthes platensis</i>)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (Tw12)	KF930996	Tracto intestinal de pejerrey panzón (<i>Odontesthes platensis</i>)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (Tw34)	GQ845022	Tracto intestinal de pejerrey panzón (<i>Odontesthes platensis</i>)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (Tw35)	KF930997	Tracto intestinal de pejerrey panzón (<i>Odontesthes platensis</i>)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>jonggajibkimchii</i> (Tw234)	MN831890	Tracto intestinal de palometa (<i>Parona signata</i>)
<i>Lactobacillus pentosus</i> (Tw226)	MN831889	Tegumento de pejerrey panzón (<i>Odontesthes platensis</i>)

Luego de someter a las bacterias a un proceso de fermentación, utilizando caldo MRS como medio nutritivo y posterior extracción en buffer PBS, se obtuvieron SLC de cada una de ellas. Estos SLC fueron analizados por la metodología del colapso de la gota y dispersión del aceite, y en todos se observó presencia de compuestos tensioactivos en mayor o menor medida (Tabla I.2).

En cuanto a los análisis con las metodologías del colapso de la gota y dispersión de aceites, se obtuvo que, a través de ambas técnicas, el nivel de dilución hasta el cual se observó actividad superficial fue similar. Thavasi et al. (2013) y Youssef et al. (2004) detectaron correlación entre ambas técnicas, y no sólo eso, sino que reportaron que los resultados obtenidos por ambas técnicas tienen una buena correlación con los análisis de tensión superficial. Según ambos autores, la técnica que poseería una mayor precisión para predecir la actividad superficial sería la técnica de la dispersión del aceite. Youssef et al. (2004) recomiendan la utilización de ambas técnicas como metodologías de *screening* de BS, indicando que resultados positivos de ambas técnicas confirmarían la presencia de compuestos tensioactivos en los SLC analizados.

Tabla I.2: Resultados del ensayo de colapso de la gota, dispersión del aceite e hidrofobicidad.

Género y especie	Colapso de gota	Dispersión del aceite	Hidrofobicidad Xileno (%)	Hidrofobicidad Hexadecano (%)
<i>L. plantarum</i> (LbTw3)	1	1	44,3 ± 0,3	85,0 ±0,7
<i>L. plantarum</i> (LbTw5)	1	1	66,0 ± 1,3	86,4 ±2,1
<i>L. paraplantarum</i> (LbTw7)	1/16	1/8	66,0 ± 3,6	89,3 ±1,2
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (Tw11)	1/2	1/2	4,8 ± 1,1	11,8 ±0,8
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (Tw12)	1/16	1/8	9,9 ± 1,8	5,4 ±0,6
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (Tw34)	1	1	1,9± 0,1	3,1 ±0,3
<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> (Tw35)	1/2	1/8	6,5 ± 1,8	3,3 ±0,4
<i>L. pentosus</i> (Tw226)	1/8	1/8	26,4 ± 1,0	29,8±1,8
<i>Ln. mesenteroides</i> ssp. <i>jonggajibkimchii</i> (Tw234)	1/16	1/16	23,2 ± 0,8	25,4±1,3

Por otro lado, se evaluó la hidrofobicidad de las cepas, como se aprecia en la Tabla I.2. Los resultados de hidrofobicidad obtenidos no presentan correlación con el método del colapso de la gota y el de la dispersión del aceite. Múltiples trabajos reportan que la hidrofobicidad de las cepas podría considerarse como un indicio para identificar cepas productoras de BS,

en base a que estas cepas serían más hidrofóbicas ya que los BS le permitirían interactuar fácilmente con la fase no polar (Pruthi y Cameotra, 1997; Thavasi et al., 2011; Nadella et al. 2018). En un principio se evaluó dicha técnica como un método rápido de identificación debido a que la extracción de los BS es un proceso laborioso. Realizando una revisión bibliográfica se observó que normalmente la técnica de hidrofobicidad se utiliza para la detección de cepas capaces de producir BS extracelulares y bacterias aisladas de entornos relacionados a hidrocarburos, donde los BS cumplen la función de facilitar la nutrición de las bacterias (Cornea et al., 2016). Mientras que en los casos de los estudios de cepas que producen BS adheridos a las células, normalmente se realiza un estudio directo sobre los extractos. Por otro lado, Thavasi et al. (2013) plantearon que la hidrofobicidad de las cepas puede deberse a metabolitos que no necesariamente son BS, siendo entonces una metodología poco confiable para determinar la capacidad de una cepa de producir BS ligados a la célula. Por lo tanto, para la selección de las cepas, se consideraron los resultados obtenidos del análisis de colapso de la gota y de la dispersión del aceite.

Como se mencionó anteriormente, en la Tabla I.2 se muestra el nivel de dilución hasta el cual se observó actividad superficial a partir del análisis de colapso de la gota y de la dispersión del aceite. Se considera que los SLC que presentan actividad superficial en condiciones de mayor dilución, poseen mayor actividad superficial y, por ende, es prometedora la presencia de BS en ellos. Por lo tanto, a partir del ensayo del colapso de la gota y de la dispersión del aceite, se seleccionaron cuatro cepas que presentaron actividad superficial hasta, al menos, la dilución 1/8 por ambas metodologías.

Para profundizar el análisis genotípico de las cuatro cepas con mayor actividad superficial, se construyó su árbol filogenético utilizando las especies válidas para cada género y como grupo externo se eligió *E. coli*. En el árbol se observan cuatro grupos definidos, el primero perteneciente al género *Lactobacillus*, el segundo a *Lactococcus*, el tercero a *Leuconostoc* y el último el grupo externo. La cepa Tw226 y LbTw7 integraron el primer grupo y se identificaron como *L. pentosus* y *L. paraplantarum*, respectivamente. Mientras que las cepas Tw12 y Tw234 se identificaron como *Lc. lactis* ssp. *lactis* y *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii*, respectivamente (Figura I.1).

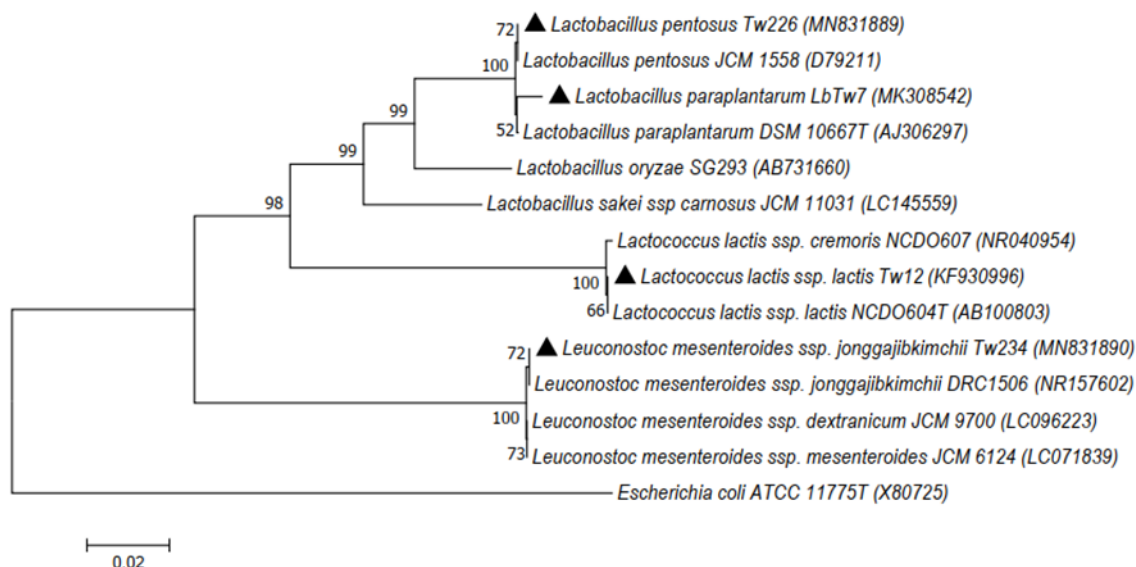


Figura I.1: Árbol filogenético construido por el método Neighbor-Joining basado en la relación entre las secuencias del gen 16S rRNA de la selección de cepas (▲): *L. pentosus* Tw226, *L. paraplantarum* LbTw7, *Lc. lactis* ssp. *lactis* Tw12, *Ln. mesenteroides* ssp. *joggajibkimchii* Tw234. Los números en los nodos internos son valores de soporte de boot-strap. Entre paréntesis están los números de acceso de GenBank. La secuencia de ARNr 16S de *Escherichia coli* fue elegida arbitrariamente como el grupo externo.

I.3.2 Estudio de las propiedades funcionales de los sobrenadantes libres de células preseleccionados

I.3.2.1 Presión superficial

Con el objetivo de confirmar que la reducción en la tensión superficial que generan los compuestos presentes en los SLC seleccionados es significativa respecto a la tensión superficial del buffer PBS (solución base del SLC), se evaluó la tensión superficial de los SLC con un tensiómetro de anillo de Du Noüy antes y después de realizar la diálisis. Con los valores de tensión superficial obtenidos se calculó la presión superficial. Los resultados se muestran en la Figura I.2.

Las presiones superficiales de los SLC se encontraron dentro del rango de 19,0 mN/m - 28,1 mN/m. El SLC que presentó la mayor reducción en la tensión superficial fue el producido por *Lactobacillus pentosus* Tw226. Según van der Vegt et al. (1991) un compuesto puede considerarse como tensioactivo cuando genera una disminución de la tensión superficial de, al menos, 8 mN/m, por lo que los valores de presión superficial observarían afirmarían la presencia de BS en los SLC. Por otro lado, el rango de reducciones de tensión superficial se

encuentra dentro de lo esperado para BAL. Gudiña et al. (2011) estudiaron la producción de BS por parte de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20 en distintos medios de cultivo, y obtuvieron disminuciones en la tensión superficial de los SLC entre 15,03 mN/m y 24,50 mN/m, dependiendo del medio nutritivo utilizado. Madhu y Prapulla (2014) reportaron una disminución de 22,0 mN/m en la tensión superficial en el SLC obtenido por una cepa de *Lactobacillus plantarum*. También se registró una disminución en la tensión superficial igual a 21,5 mN/m en el SLC de una cepa de *Lactobacillus pentosus* (Rodrigues et al., 2006). Sharma et al. (2016), analizando diversas investigaciones realizadas sobre BS producidos por BAL, informaron disminuciones en la tensión superficial en un rango entre 13,5 - 30,0 mN/m cuando los BS eran empleados en una concentración igual a su CMC.

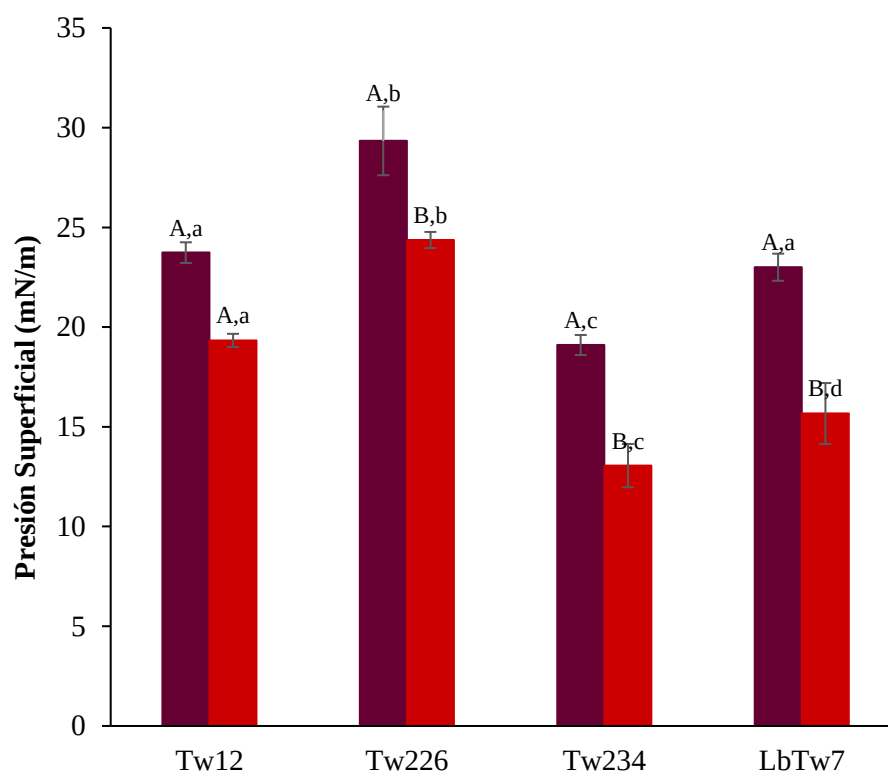


Figura I.2: Presión superficial del SLC producido por las cepas preseleccionadas (■SLC; ■SLC dializado). Las medias para una cepa con un tratamiento diferente seguido de las mismas letras mayúsculas no difieren significativamente ($p < 0,05$); las medias para diferentes cepas y el mismo tratamiento seguido de la misma letra minúscula no difieren significativamente ($p < 0,05$). SLC de: *L. lactis* ssp. *lactis* Tw12 (Tw12), *L. pentosus* Tw226 (Tw226), *L. paraplantarum* LbTw7 (LbTw7), *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* Tw234 (Tw234).

También se midió la tensión superficial de los caldos fermentados siendo la reducción de la tensión superficial insignificante. De este modo, se confirma que las cepas identificadas

serían incapaces de producir BS extracelulares, al menos en las condiciones en las que se produjo la fermentación.

Luego de dializar, los SLC presentaron una ligera pero significativa disminución de la presión superficial, con excepción del BS obtenido de *Lactococcus lactis ssp lactis* Tw12 en el que la diálisis no modificó la presión superficial (Figura I.2). Este procedimiento se llevó a cabo para eliminar principalmente las sales del PBS, sin embargo, dado que los BS están compuestos por mezclas de biomoléculas con diferente masa molecular, la liberación de compuestos de masa molecular baja a través de los poros de membrana podría explicar la pérdida de presión superficial (Rodrigues, et al., 2006; Sharma, 2014). Aun así, los valores de presión superficial obtenidos después del proceso de purificación están dentro de los valores máximos de presión superficial reportados para los BS producidos por BAL (Sharma et al., 2016).

I.2.3.2. Actividad emulsificante: estudio de la capacidad emulsificante

Con el fin de evaluar posibles aplicaciones en la industria alimentaria, es fundamental estudiar la capacidad emulgente de un BS. Entonces, para poder detectar si los BS presentes en los SLC poseían esta capacidad, se formularon emulsiones con los mismos y se evaluó el $IE_{24\%}$. Los resultados pueden se muestran en la Tabla I.3.

Tabla I.3: Índice de emulsificación de las emulsiones formuladas con los SLC obtenidos de las distintas especies de BAL y del control negativo, formulado con PBS.

	Tw12	Tw226	LbTw7	Tw234	CN
$IE_{24\%}$	98,5±2, 5a	91,7±1,2 ^{ab}	82,7±2,3 ^c	84,9±3,6 ^{bc}	14,1±3,6 ^d

Los promedios cuyo superíndice poseen la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$). Emulsión formulada con goma xántica 0,15 %m/m (CN), emulsión formulada con goma xántica 0,15 %m/m y el SLC de: *L. lactis ssp. lactis* Tw12 (Tw12), *L. pentosus* Tw226 (Tw226), *L. paraplantarum* LbTw7 (LbTw7), *Ln. mesenteroides ssp. joggajibkimchii* Tw234 (Tw234).

El $IE_{24\%}$ de las emulsiones formuladas con los SLC resultó significativamente mayor que el control negativo, en el cual se utilizó PBS como fase acuosa adicionado con 0,15 % de goma xántica (Tabla I.3). Las emulsiones realizadas con los SLC presentaron $IE_{24\%}$ entre 98,5 y 82,7 %. Los SLC que otorgaron a las emulsiones una mayor estabilidad fueron los provenientes de *Lc. lactis ssp. lactis* Tw12 y *L. pentosus* Tw226. El control negativo exhibió

un $IE_{24}\%$ de aproximadamente 14,1 % probablemente concedido por la presencia de la goma xántica en la fase acuosa. Según Willumsen y Karlson (1996), un agente emulsificante debe tener la capacidad de mantener, al menos, el 50 % del volumen inicial de la emulsión luego de 24 horas. En base a lo comentado, se concluye que los compuestos extraídos poseen la capacidad de aumentar la estabilidad de emulsiones en las condiciones de emulsificación propuestas.

En este trabajo se midió el $IE_{24}\%$ frente a un aceite vegetal, debido a que era de interés que la capacidad emulsificante se manifieste en sistemas formulados con aceites comestibles. Madhu y Prapulla (2014) encontraron que emulsiones formuladas con un BS producido por *Lactobacillus pentosus* CECT 4023 exhibieron un $IE_{24}\%$ de 38 y 19 % para el aceite de coco y girasol, respectivamente. Ferreira et al. (2017) evaluaron el $IE_{24}\%$ utilizando aceite de trigo, romero, almendra y jojoba, y obtuvieron valores de 60% para los primeros dos sistemas, 70 % para el tercero y 15 % para el último. La información sobre la actividad emulsionante de BS obtenidos de BAL frente a aceites vegetales es escasa debido a que el $IE_{24}\%$ normalmente se prueba frente a hidrocarburos y en este trabajo se adaptó la metodología. La medición del $IE_{24}\%$ fue desarrollada por Cooper y Goldeberg (1987), quienes evaluaron la capacidad emulsificante del SLC obtenido a partir dos especies de *Bacillus*, frente a querosén. Dicha técnica, aun se continúa utilizando en trabajos relacionados con la búsqueda de BS relacionados a la biorremediación. Por ejemplo, Nadella et al. (2018) evaluaron sobrenadantes de diversas cepas de *Pseudomonas* aisladas de zonas petrolíferas frente a querosén, Diesel y petróleo. Moldes et al. (2013) también evaluaron el SLC obtenido de una bacteria *Lactobacillus pentosus* CECT 4023 frente a querosén, xileno, heptano y hexano, obteniendo resultados entre 40 y 15 %. Gudiña et al., (2015) formularon emulsiones que tuvieron un $IE_{24}\%$ del 60 % utilizando los BS producidos por *Lactobacillus agilis* CCUG31450 en una concentración superior a la CMC para n-hexadecano.

1.2.3.3 Actividad emulsificante: estudio de la estabilidad física de las emulsiones

En el estudio de las emulsiones, también es de interés analizar el tamaño de las gotas presentes en las mismas ya que de éste depende la estabilidad física, apariencia, perfil de textura, entre otras propiedades (McClements et al., 2010). Para ello, se realizó el análisis del tamaño de gota de las emulsiones utilizando un difractor láser, obteniéndose las

distribuciones de volumen y número de partículas que se muestran en la Figura I.3, Panel A. A partir de dichos perfiles se puede observar que las emulsiones formuladas con los SLC obtenidos de las cepas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12, *Lactobacillus pentosus* Tw226 y *Lactiplantibacillus plantarum* LbTw7 presentaron una distribución bimodal, lo que indicaría que hay dos poblaciones con gotas de distinto tamaño en la emulsión. Al analizar las distribuciones de tamaño en volumen, pareciera que las gotas de mayor tamaño poseen un volumen porcentual mayor que las de menor tamaño en todas las emulsiones formuladas.

Al realizar la conversión de la distribución en función del número de partículas (Figura I.3, Panel B), se observa que la población principal para la emulsión formulada con el SLC obtenido de *Lactobacillus pentosus* Tw226 corresponde a la población de menor tamaño. Esta tendencia se puede explicar considerando la contribución diferencial de las gotas pequeñas y grandes a las estimaciones de diámetros ponderados por número y diámetros ponderados por volumen, respectivamente (Fioramonti et al., 2017). Las distribuciones basadas en el volumen de las gotas siempre estarán desplazadas hacia mayores tamaños en comparación con las distribuciones basadas en su número, por lo que los diámetros informados para cada población en volumen presentaron valores mayores a los señalados para la distribución en número en el caso de la emulsión producida por el SLC de la cepa *Lactobacillus pentosus* Tw226.

El análisis de polidispersidad (span) (Figura I.3, Panel C) muestra que las emulsiones realizadas con los SLC presentaron una mayor polidispersidad que el control negativo. Esto puede deberse a que las emulsiones formuladas con los SLC presentan una población bimodal. Al analizar la distribución en volumen, la bimodalidad no es tan evidente, siendo que las poblaciones características se encuentran entre 1 y 10 μm y entre 10 y 100 μm . Pero sin dudas, se confirma la bimodalidad en la distribución en número de partículas, observándose también dos poblaciones en la emulsión estabilizada por el SLC de *Leuconoctons mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* Tw234. Por otro lado, la emulsión libre de BS presentó una población única y con una menor polidispersidad estadísticamente significativa.

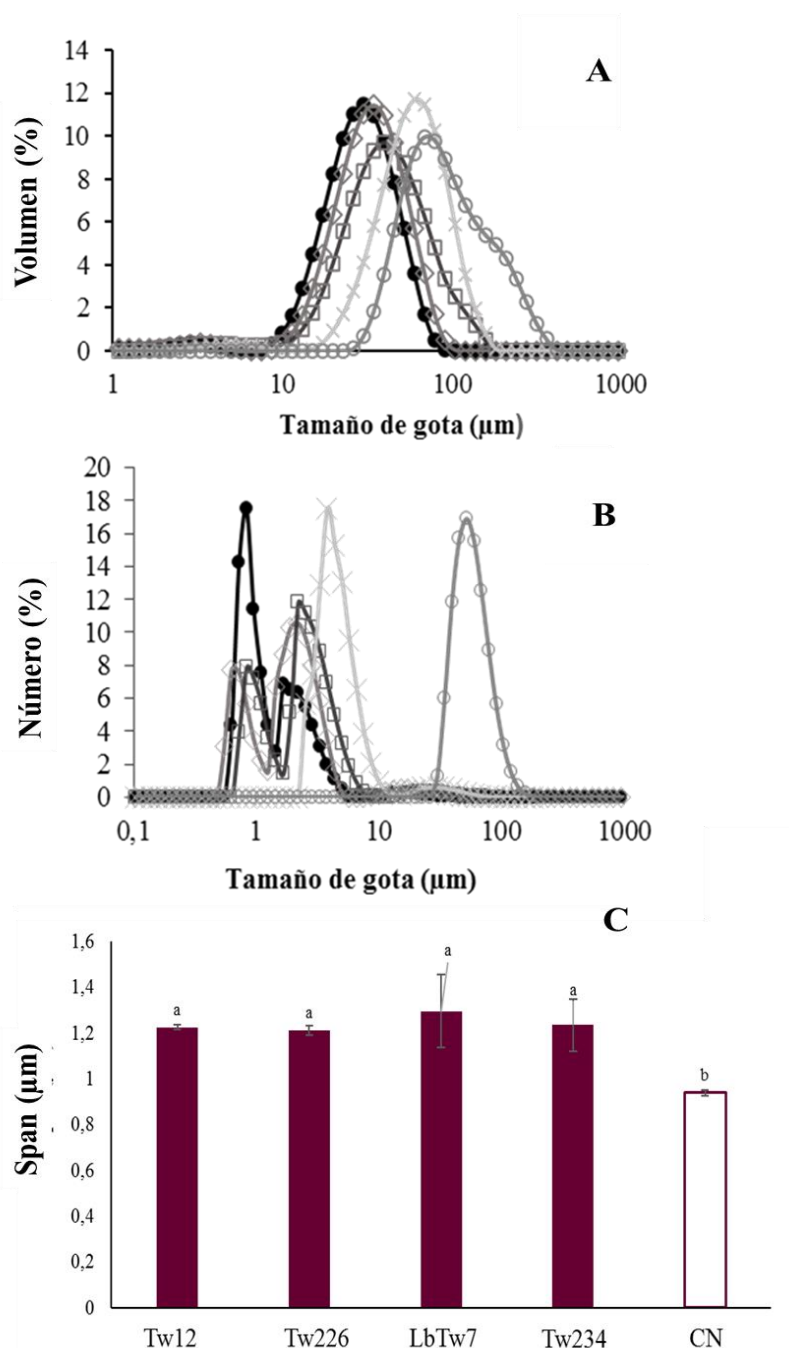


Figura I.3: Distribuciones de tamaño de partícula en volumen (**Panel A**) y en número (**Panel B**) de las emulsiones formuladas con el SCL de cada cepa. (—●— SCL Tw226; —◇— SCL Tw12; —□— SCL LbTw7; —×— SCL Tw234; —○— Control). Valor de Span para las emulsiones formuladas con los SCL y con PBS para el control negativo (**Panel C**). Emulsión formulada con goma xántica 0,15 %m/m (CN), emulsión formulada con goma xántica 0,15 %m/m y el SCL de: *L. lactis* ssp. *lactis* Tw12 (Tw12), *L. pentosus* Tw226 (Tw226), *L. paraplantarum* LbTw7 (LbTw7), *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* Tw234 (Tw234). Las medias para diferentes emulsiones seguidas de la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$).

Cuando se trata de la formación de una emulsión hay múltiples factores que entran en juego. Uno de ellos es la concentración del surfactante. Se necesita una concentración de surfactante suficiente para poder cubrir toda la interfase aceite/agua, cuanto mayor sea esta concentración más pequeña serán las gotas que se puedan formar. Por otro lado, en el caso de los BS naturales, muchas veces, un sobre-procesamiento de la muestra puede generar la formación de gotas más grandes en las emulsiones, ya que condiciones de estrés pueden generar daños en las moléculas (McClements y Gumus, 2016). La existencia de poblaciones bimodales al formularse una emulsión puede deberse a que el uso de grandes velocidades de cillazamiento puede generar pequeñas gotas que producen un aumento de la viscosidad en la zona de recirculación, generando, al pasar el tiempo de agitación, que aquellas zonas que se encuentran más alejadas del homogeneizador se vean impedidas a recircular y que su tamaño de gota se reduzca (Ramírez et al., 2002).

Otros parámetros que también se tuvieron en cuenta para la caracterización de las emulsiones formadas fueron el $D_{3,2}$ y el $D_{4,3}$. El $D_{3,2}$ proporciona una estimación del diámetro medio de la mayoría de las gotas, mientras que el $D_{4,3}$ está vinculado a cambios en el tamaño de las partículas relacionados con los procesos de desestabilización (McClements, 2007). Reducciones significativas del $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ indicarían que los BS poseen capacidad emulgente, ya que refleja la capacidad que poseen para intervenir en la formación de gotas de menor tamaño (Zalazar et al., 2016). Los resultados pueden verse en la Figura I.4, paneles A y B.

El uso de SLC obtenidos de *Lactobacillus pentosus* Tw226 y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12 promovió las mejores reducciones del $D_{3,2}$ y del $D_{4,3}$ (Figura 9, paneles A y B). Esto indicaría que los BS presentes en los SLC de estas cepas serían útiles para la creación de una emulsión, facilitando la formación inicial de finas gotas lipídicas durante la homogeneización y mejorando la estabilidad de las gotas de aceite en la fase acuosa una vez que se han formado. Por lo tanto, se demuestra que los SLC producidos por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12 y *Lactobacillus pentosus* Tw226, contienen BS útiles para formar y estabilizar emulsiones de aceite en agua. En base a esto, se infiere que los BS de ambas especies serían capaces de acomodarse alrededor de la fase oleosa de manera exitosa, permitiendo así la formación de gotas más pequeñas durante el proceso de homogenización.

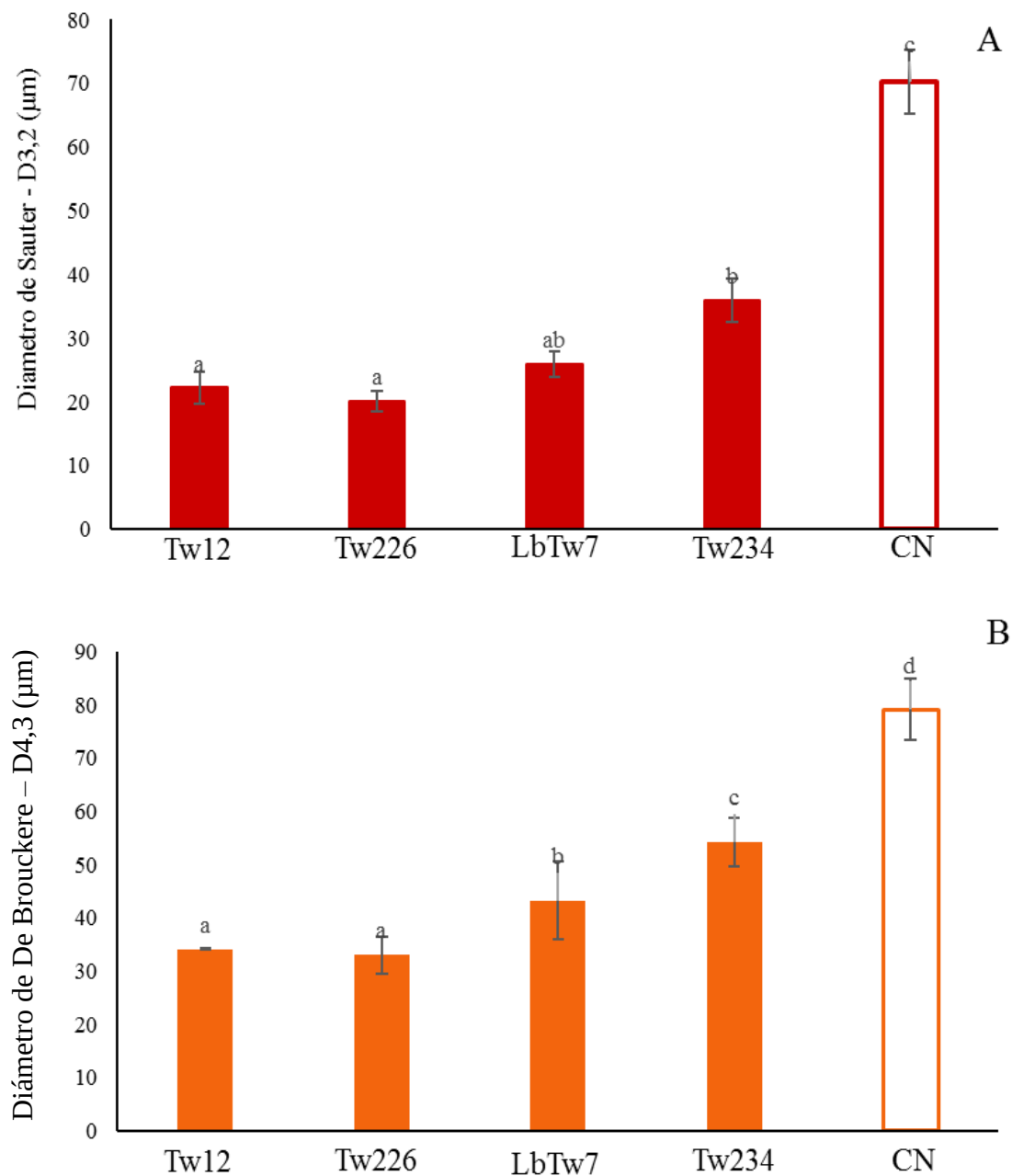


Figura I.4: Diámetro de Sauter (D_{3,2}) (**Panel A**) y diámetro de De Brouckere (D_{4,3}) (**Panel B**) para las emulsiones formuladas con los SLC de las distintas cepas de BAL preseleccionadas y PBS (Control Negativo). Emulsión formulada con goma xántica 0,1 %m/m (CN), emulsión producida con goma xántica 0,1 %m/m y el SLC de: *L. lactis* ssp. *lactis* Tw12 (Tw12), *L. pentosus* Tw226 (Tw226), *L. paraplantarum* LbTw7 (LbTw7), *Ln. mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* Tw234 (Tw234). Las medias para diferentes emulsiones seguidas de la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$).

I.3.3 Rendimiento en la producción de biosurfactante

El rendimiento de producción, expresado en gramos de BS por gramo de biomasa seca, fue de 0,03; 0,04; 0,09 y 0,26 para las cepas *Leuconoctons mesenteroides* ssp. *Jonggajibkimchii* Tw234, *Lactiplantibacillus paraplantarum* LbTw7, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12 y *Lactobacillus pentosus* Tw226, respectivamente (Figura I.5). El rendimiento significativamente mayor obtenido por *Lactobacillus pentosus* Tw226 es destacable, ya que, aunque una biomolécula tenga características excepcionales, un bajo rendimiento impide su aplicación industrial y comercial. Por lo tanto, el hallazgo de bacterias y técnicas que permitan obtener un alto rendimiento es uno de los ejes de más interés en el campo de la producción de BS. De esta manera, la productividad generada por *Lactobacillus pentosus* Tw226 es un aspecto importante, siendo que la misma posee un rendimiento hasta 8 veces mayor que la cepa con el menor rendimiento estudiada en este trabajo.

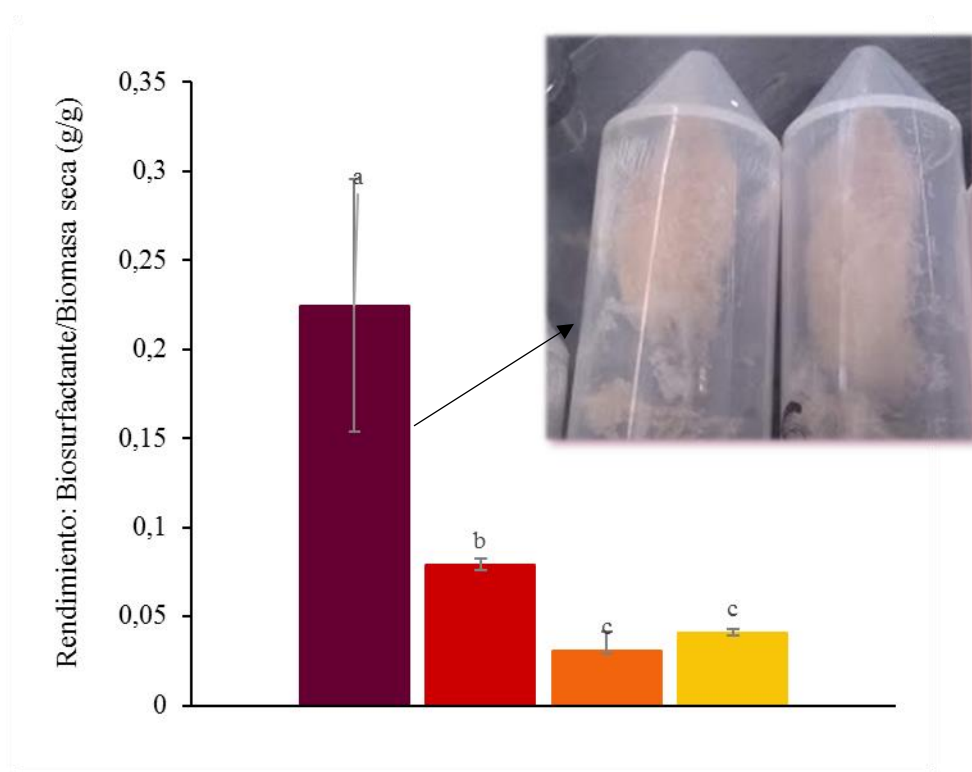


Figura I.5: Gráfico: Rendimiento de biosurfactante / biomasa seca (g/g) para cada cepa productora. (■ *Lactobacillus pentosus* Tw226; ■ *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* Tw12; ■ *Lc. mesenteroides* ssp. *Jonggajibkimchii* Tw234; ■ *Lb. paraplantarum* LbTw7). Las medias para diferentes rendimientos seguidas de la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$). Fotografía: Aspecto del biosurfactante producido por *Lactobacillus pentosus* Tw226, luego de la liofilización.

Los datos de rendimiento, de productividad en base a litro de caldo, y las concentraciones en base a PBS pueden encontrarse en la Tabla I.4, reafirmando que aquella cepa que posee una mejor performance en la producción de BS es *Lactobacillus pentosus* Tw226.

Tabla I.4: Rendimiento de BS en base a litro de caldo nutritivo, productividad y concentración en buffer PBS de extracción.

	Rendimiento (g/L caldo)	Productividad (mg BS/L.h)	Concentración en buffer de extracción (g BS/L de PBS)
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> Tw12	0,041 ± 0,009 ^a	0,57 ± 0,04 ^a	0,32 ± 0,04 ^a
<i>Lactobacillus</i> <i>pentosus</i> Tw226	0,120 ± 0,024 ^b	1,66 ± 0,98 ^b	1,80 ± 0,13 ^b
<i>Leuconoctons</i> <i>mesenteroides</i> ssp. <i>jonggajibkimchii</i> Tw234	0,036 ± 0,009 ^a	0,50 ± 0,04 ^a	0,24 ± 0,01 ^a
<i>Lactiplantibacillus</i> <i>paraplantarum</i> LbTw7	0,059 ± 0,013 ^a	0,82 ± 0,07 ^a	0,47 ± 0,06 ^c

Lo promedios cuyo superíndice poseen la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$).

En este capítulo, la producción del BS de *Lactobacillus pentosus* se dio en las condiciones estándar normalmente utilizadas en bibliografía. Pero cada cepa posee su condición óptima para la producción de BS. Probablemente, con una selección adecuada del medio de cultivo, fuente de carbono y condiciones de crecimiento (pH, temperatura, nutrientes y micronutrientes) podría haber un aumento en el rendimiento de la producción. Moldes et al., (2007) reportaron que una cepa de *Lactobacillus pentosus* fue capaz de producir 0,28 gramos de BS/gramo de biomasa seca utilizando un hidrolizado de granos de cebada, mientras que el rendimiento se elevó a 0,76 g de BS/gramo de masa seca utilizando como medio de cultivo hidrolizados hemicelulósicos derivados del recorte de brotes de vid. También, Bustos et al. (2018) lograron aumentar el rendimiento del BS producido por una cepa de *Lactobacillus pentosus* realizando tres procesos de fermentación/extracción cada 15 horas. Esto demuestra la importancia en la selección de las condiciones utilizadas para la producción de BS.

Al mismo tiempo, las condiciones de extracción del BS también juegan un papel en su rendimiento. Una de las técnicas reportadas para aumentar el rendimiento consiste en realizar procesos de extracción sucesivos, logrado aumentar la masa de BS extraído. Utilizando esta

técnica para extraer un BS ligado a la célula de una cepa de *Lactobacillus pentosus*, se logró extraer un 89,6% de BS en una primera extracción y el 10,4% restante en una segunda (Bustos et al. 2018). Por otro lado, Vecino et al. (2015) también informaron que el tiempo de agitación, la salinidad del medio y la temperatura durante el proceso de extracción generan cambios en el producto obtenido.

Por lo tanto, el rendimiento del BS producido por *Lactobacillus pentosus* Tw226 puede considerarse prometedor, teniendo en cuenta que éste puede ser aún mayor si se optimizan las condiciones de producción y de extracción.

I.3.4 Actividad antiadherente

Debido a que la adherencia a la superficie es la primera etapa de la formación de un biofilm, disminuir la afinidad de los microorganismos a la superficie es una buena estrategia para inhibir su formación y disminuir, así, el uso de agentes de limpieza sintéticos (Campos et al., 2019). Con este propósito, se evaluó la capacidad de los SLC para disminuir la adherencia al poliestireno de bacterias asociadas a contaminaciones alimentarias, obteniéndose los resultados de la Figura 1.6. Puede observarse que todos los SLC disminuyeron la adherencia de las bacterias al poliestireno, las cuales se encontraron entre $26,9 \pm 0,5$ y $59,6 \pm 3,6$ %, variando su valor de acuerdo con el SLC utilizado como acondicionador y con la cepa indicadora.

Para las cepas de *Pseudomonas*, se presentaron las mayores disminuciones de la adherencia con el SLC proveniente de *Lactobacillus pentosus* Tw226, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12 y *Lactiplantibacillus paraplantarum* LbTw7, mientras que la menor inhibición se observó con el SLC producido por *Leuconoctons mesenteroides* ssp. *Jonggajibkimchii* Tw234. En el caso de *S. putrefaciens*, los SLC que generaron una mayor inhibición de la adherencia fueron los producidos por *Lactobacillus pentosus* Tw226 y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12, presentando un menor efecto antiadherente los SLC producidos por *Lactobacillus paraplantarum* LbTw7 y *Leuconoctons mesenteroides* ssp. *Jonggajibkimchii* Tw234. Por último, se observó que la disminución de la adherencia de la bacteria *L. innocua* se dio en mayor medida en las superficies acondicionadas con los SLC provenientes de *Lactobacillus pentosus* Tw226, mientras que el menor efecto antiadherente fue dado por el SLC de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12.

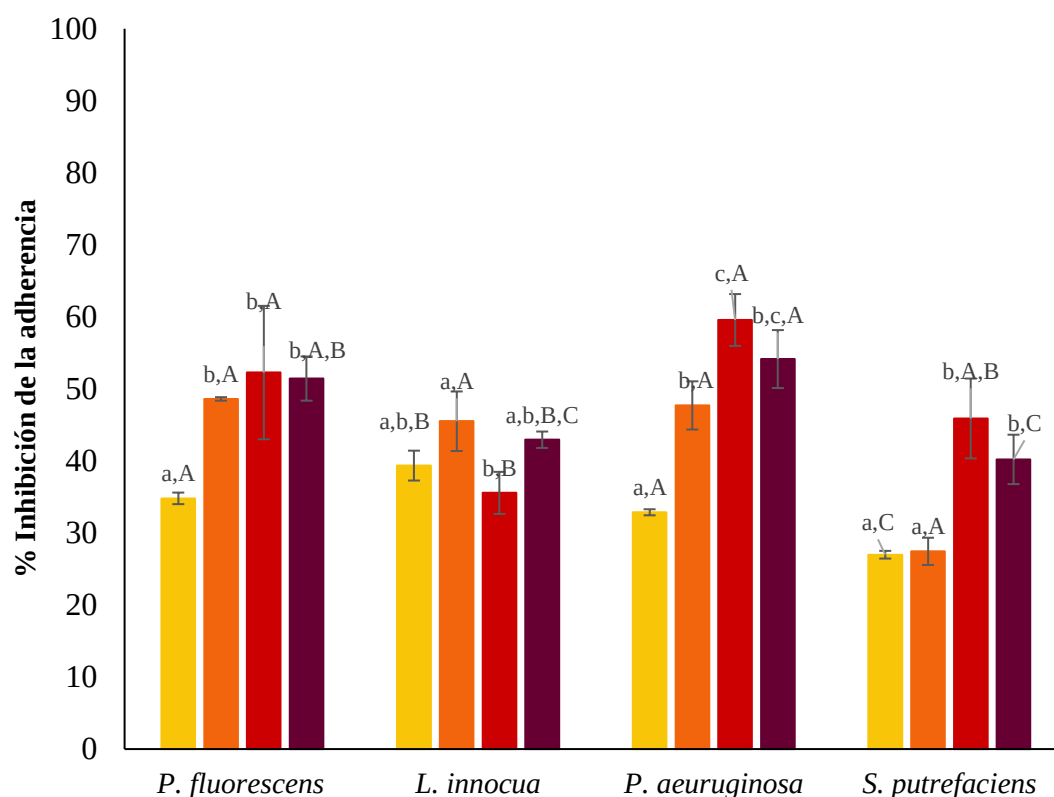


Figura I.6: Porcentaje de inhibición de la adherencia de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *S. putrefaciens* y *L. innocua* a poliestireno en superficies tratadas con los SLC obtenidos de las cepas *Leuconoctons mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* Tw234 (■), *Lactiplantibacillus paraplantarum* LbTw7 (■), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12 (■), *Lactobacillus pentosus* Tw226 (■). Letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para inhibir la adherencia de una misma cepa. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias en la inhibición entre cepas para un mismo tratamiento ($p < 0,05$).

En bibliografía no se encuentran registros previos del estudio de la actividad antiadherente de BS adheridos a las células provenientes de BAL frente a *P. fluorescens*, microorganismo normalmente asociado a la contaminación de alimentos, especialmente productos lácteos (Meliani y Basoltane, 2015), ni frente a *S. putrefaciens*, microorganismo asociado a la contaminación de alimentos y a la corrosión de superficies de acero inoxidable (Bagge et al., 2001). Sin embargo, hay estudios sobre la actividad antiadherente de BS de BAL frente a *P. aeruginosa* y *L. innocua*.

P. aeruginosa es una bacteria deteriorativa, capaz de formar biofilm y que posee varios factores de virulencia coordinados por “quorum sensing” (Viola et al., 2018). Gudiña et al. (2010) estudiaron el efecto de acondicionar la superficie de poliestireno con una solución de

BS proveniente de *L. paracasei* ssp. *paracasei* A20 frente a diversas bacterias patógenas, entre ellas *P. aeruginosa*. Este estudio reveló que la actividad antiadherente es dependiente de la concentración, obteniéndose una mayor inhibición a la máxima concentración (50 mg/mL), en este caso la disminución obtenida fue del 21,2 %. El mayor efecto antiadherente de un BS adherido a la célula producido por *L. paracasei* frente a *P. aeruginosa* fue del 72 % cuando se utilizó el BS en una concentración 25 mg/mL (Vecino et al., 2018). En cuando a la actividad antiadherente de BS adheridos a las células, producidos por BAL frente a *L. innocua*, Sharma et al. (2016) reportaron que un BS producido por *Lactobacillus helveticus* generó una inhibición del 82,1 % para una concentración de 25 mg/mL y del 21,0 %, para 1,56 mg/mL. Si bien los resultados de actividad antiadherente obtenidos a partir de los SLC de las BAL (Figura I.6) estudiadas ejercieron disminuciones menores que las reportadas por bibliografía, es importante tener en cuenta que en los SLC las concentraciones de BS (Tabla I.4. – Concentración en buffer de extracción) son menores a la utilizada por Gudiña et al. (2010), Sharma et al. (2016) y (Vecino et al., 2018).

I.3.5. Actividad antimicrobiana

En la Figura I.7 pueden observarse los resultados del análisis de actividad antimicrobiana de las soluciones producidas con los BS provenientes de *Leuconoctons mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* Tw234, *Lactiplantibacillus paraplantarum* LbTw7, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12 y *Lactobacillus pentosus* Tw226, en una concentración de 20 mg/mL.

En ninguna de las placas se lograron visualizar halos de inhibición definidos. Sin embargo, en la placa correspondiente al césped de *E. coli* se observó una disminución de la densidad de las colonias en la zona en la cual se dispuso el BS proveniente de la cepa *Lactobacillus pentosus* Tw226. Un fenómeno similar, ocurrió en la placa inoculada con el césped de *L. innocua*, en la cual se observó una disminución de la densidad de crecimiento en la zona en la que se sembró el BS proveniente de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12. A partir de estos resultados se podría inferir que es posible que los BS provenientes de *Lactobacillus pentosus* Tw226 y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12 inhiban levemente el crecimiento de *E. coli* y *L. innocua* respectivamente, sin embargo, es necesario realizar más ensayos para confirmar este primer indicio.

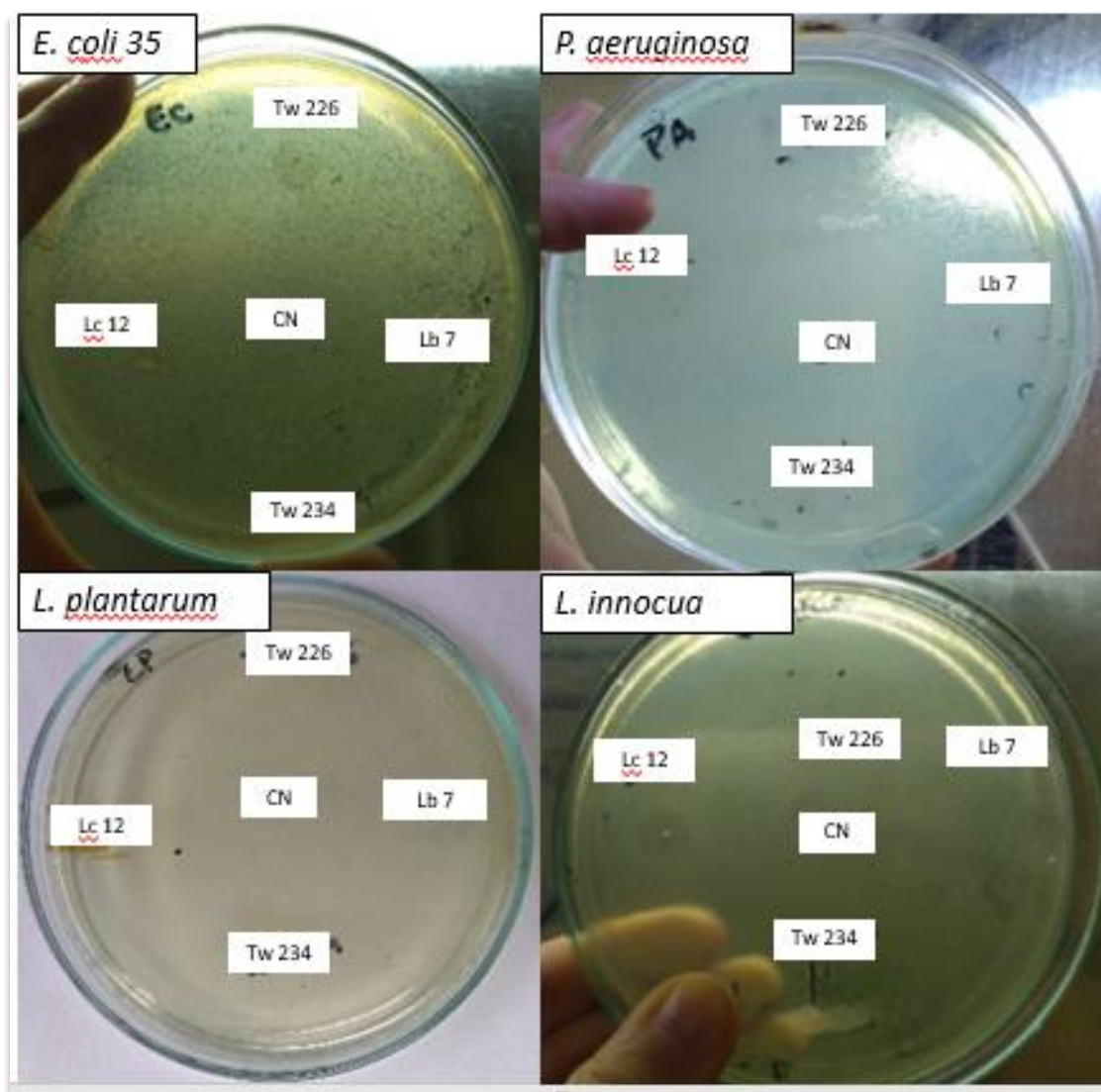


Figura I.7: Fotografías de las placas sembradas con un césped de la bacteria indicadora luego de 48 horas de incubación. El nombre presente en la esquina superior izquierda de cada foto representa la bacteria inoculada en el agar. Los nombres en el interior de la placa indican el origen de las soluciones de BS analizadas con una concentración de 20 mg/mL, siendo: Lc 12: el BS proveniente de la cepa *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12; Lb 7: el BS proveniente de la cepa *Lactiplantibacillus paraplantarum* LbTw7; Tw 226: el BS proveniente de la cepa *Lactobacillus pentosus* Tw226; Tw 234: el BS proveniente de la cepa *Leuconoctons mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* Tw234 y CN, el control negativo que es buffer PBS.

Madhu y Padulla (2014) reportaron actividad antimicrobiana del BS proveniente de *Lactobacillus plantarum* CFR 2194 en concentraciones de 25 mg/mL para las cepas de *E. coli* ATCC 31075 y *E. coli* MTCC 108 utilizando la técnica de la difusión en agar luego de 16 horas de incubación. En el trabajo mencionado, observaron que la actividad de la solución fue diferente para ambas cepas de *E. coli* ya que los halos de inhibición fueron 5 mm y 15

mm, respectivamente. Cornea et al. (2016) también estudiaron, mediante la técnica de difusión en agar, la actividad antimicrobiana del BS adherido a la célula producido por distintas cepas de BAL frente a *E. coli* y observaron que de tres BS analizados sólo uno presentó actividad antimicrobiana.

No se han encontrado antecedentes del estudio de la actividad antimicrobiana de BS provenientes de BAL frente a *L. innocua*, aunque sí algunos sobre la actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*. Sittisart y Gasaluck (2022) indicaron que un BS presente en un SLC producido a partir de *Lactobacillus plantarum* MGL-8, generó halos de inhibición entre 9,30 y 14,70 mm dependiendo del medio de fermentación. También, un BS producido por *Lactobacillus casei* MRTL3 presentó actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* y generó halos de inhibición mayores a 8 mm (Sharma y Sharan, 2014).

En base a los antecedentes de BS con actividad antimicrobiana, puede observarse que esta funcionalidad posee una dependencia con la cepa y con el medio de producción. También, se puede observar que, en general, poseen una actividad antimicrobiana menor que la que se registra para otros agentes antimicrobianos de BAL como las bacteriocinas, las cuales pueden generar halos de inhibición frente a *L. innocua* en el rango de 18 a 23 mm (Delcarlo et al., 2019).

I.3.6 Análisis genómico de la cepa seleccionada y de resistencia a antibióticos

Sobre la base de los resultados obtenidos, especialmente los relacionados al rendimiento, se eligió a la cepa *Lactobacillus pentosus* Tw226 como la mejor productora de BS. Por lo tanto, antes de proseguir con la caracterización del BS producido por esta cepa, se estudió si es segura para utilizarla con fines biotecnológicos, a través de la determinación del genoma completo y del estudio de su resistencia a antibióticos.

Para identificar completamente la cepa Tw226, previamente aislada del tracto intestinal de pejerrey panzón (*Odontesthes platensis*) y clasificada como *Lactobacillus pentosus* mediante la técnica de amplificación por PCR del gen ARNr 16S, se secuenció y analizó el genoma microbiano total. De un conjunto de 4.348.464 lecturas logradas con la secuenciación de 80 cóntigos, se obtuvo un genoma borrador con un tamaño de aproximadamente 3,33 Mb y 44,4% G + C y en base al ensamblaje se consiguió un 99,38% del genoma completo, con un

total de 3460 secuencias de codificación (CDS), 81 ARNt, 4 ARNnc, cinco copias del operón ribosomal (5S, 16S y 23S) y 55 pseudogenes.

La identificación taxonómica se realizó en base al análisis ANI, provisto por “PGAP pipeline” permitiendo clasificar la cepa Tw226 como una *Lactiplantibacillus plantarum*. La discrepancia observada sobre la identificación se debe a que las especies *L. plantarum*, *L. pentosus* y *L. paraplantarum* (anterior clasificación) están estrechamente relacionadas desde el punto de vista genético y exhiben fenotipos muy similares. La heterogeneidad genética del grupo *L. plantarum* ha sido demostrada por Dellaglio et al. (1975) sobre la base de la hibridación ADN-ADN, permitiendo identificar tres grupos que luego se clasificaron como *L. plantarum* sensu stricto, *L. pentosus* y *L. plantarum*. En consecuencia, el análisis molecular de las secuencias de ADN ribosomal 16S no es adecuado debido al alto valor de identidad (> 99%) compartida por *L. plantarum* y *L. pentosus* (Torriani et al., 2001).

Las especies de *Lactobacillus* ssp. son consideradas como cepas GRAS (“*Generally Recognized as Safe*”) según la clasificación brindada por la Administración de Alimentos y Drogas de los EE. UU. (FDA), es decir, que no están asociadas con riesgos toxicológicos, sin embargo, algunas cepas fueron clasificadas como patógenos oportunistas para humanos y animales (Burdock y Carabin, 2004). Por lo tanto, se hicieron esfuerzos para evaluar cuidadosamente los riesgos potenciales y los factores de virulencia de la cepa Tw226, se realizaron análisis bioinformáticos sobre la información genética secuenciada que permitió la identificación de las características funcionales ilustradas en la Figura I.8. A través de los resultados obtenidos por las herramientas RAST y PGAP, fue posible verificar que el genoma de la cepa Tw226 contiene algunos genes asociados a la movilidad de elementos, siendo escasas las relacionadas a los transposones y profagos, por lo que se puede determinar que no posee factores de virulencia asociados a dichos elementos. También se observó que el genoma no posee genes relacionados a sistemas de secreción de Tipo III y VI, que suelen estar relacionados con la patogenicidad de las cepas de *Aeromonas* y otros géneros patogénicos.

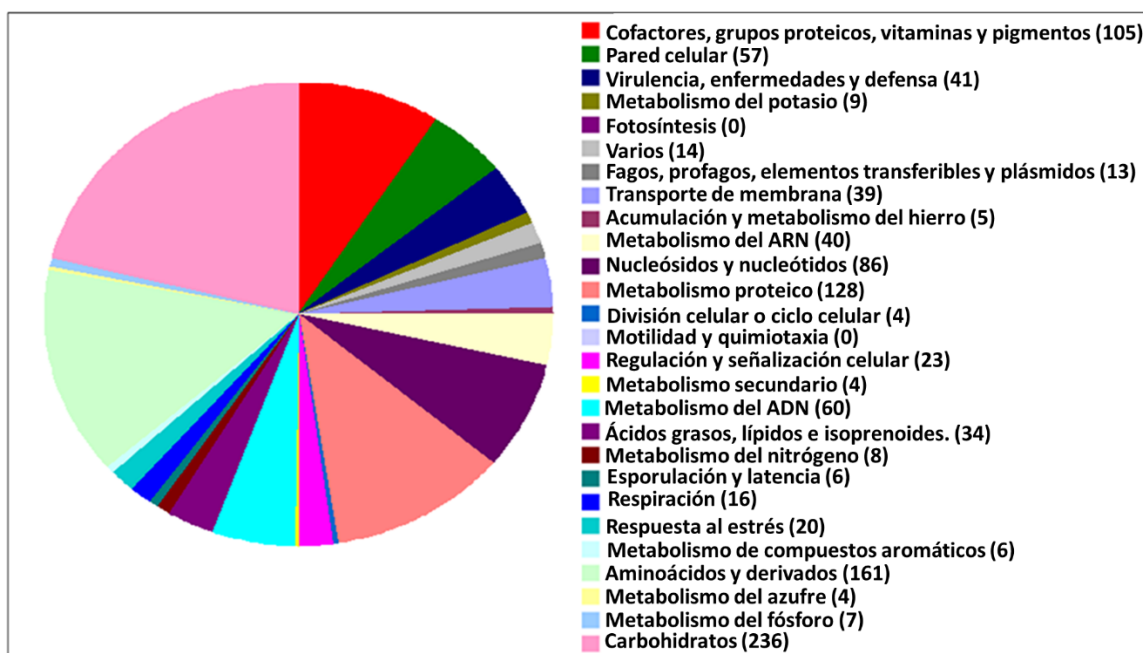


Figura I.8: Características genéticas identificadas por la secuenciación del genoma del *Lactiplantibacillus plantarum* Tw226. El número entre paréntesis representa el número de genes identificados en cada categoría funcional.

En cuanto a la resistencia a antibióticos, la cepa *L. plantarum* Tw226 fue sensible a cloranfenicol, clindamicina, eritromicina, gentamicina y kanamicina, mientras que fue resistente a ampicilina y tetraciclina, según los puntos de corte establecidos por la EFSA (2018).

La familia Lactobacillaceae es el grupo más grande de BAL, cuyos miembros son los más utilizados como probióticos en una amplia variedad de alimentos. Hasta la fecha, 23 géneros y 561 especies fueron descritas en la “Lista de Nombres Procarióticos con dicha Preposición en la Nomenclatura” (LPSN) (Zheng et al., 2020) lo que da una idea de la complejidad y diversidad de esta familia. En términos de susceptibilidad a los antibióticos, por lo general, se considera que los lactobacilos son sensibles a la ampicilina y la penicilina. Sin embargo, algunos autores han reportado la presencia de resistencia a la ampicilina y a las cefalosporinas en varias especies (Colautti et al., 2020). La resistencia a la ampicilina y la penicilina se debe a cambios en la secuencia de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP), por lo que no debe considerarse peligrosa, ya que su transmisión no está asociada a elementos móviles, sino que se da de manera vertical. Por otro lado, la tetraciclina es un antibiótico de amplio espectro que exhibe actividad frente a una amplia gama de bacterias Grampositivas y Gramnegativas.

La resistencia a ella está relacionada con la presencia de dos grupos de genes y es la resistencia más comúnmente encontrada en lactobacilos (Gueimonde et al., 2013). Aparte de los determinantes de la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina, y según los análisis genómicos, la cepa Tw226 parece ser segura para fines biotecnológicos.

I.4 Conclusiones

- Se pudieron aislar nueve cepas de BAL productoras de biosurfactantes a partir de queso ovino y pescados de la Patagonia.
- Las cepas *Lactobacillus pentosus* Tw226, *Lactiplantibacillus paraplantarum* LbTw7, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12 y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* Tw234 fueron capaces de producir BS.
- La mayor reducción en la tensión superficial se halló en el SLC de *Lactobacillus pentosus* Tw226.
- El SLC obtenido de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12 proporcionó una mayor estabilidad a la emulsión formulada.
- Las emulsiones formuladas con los SLC de las cepas *Lactobacillus pentosus* Tw226, *Lactiplantibacillus paraplantarum* LbTw7, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12 y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *jonggajibkimchii* Tw234 presentaron distribuciones de gota polidispersas, con dos poblaciones características.
- Los BS presentes en los SLC obtenidos de *Lactobacillus pentosus* Tw226 y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* Tw12 ejercieron las mayores reducciones en los tamaños de gota.
- Los SLC presentaron la capacidad de acondicionar una superficie de poliestireno para disminuir la adherencia de *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *L. innocua* y *S. putrefaciens*.
- Los SLC no presentaron actividad antimicrobiana certera frente a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. innocua* y *L. plantarum*.
- En cuanto al rendimiento en la producción de BS, se destacó *Lactobacillus pentosus* Tw226.
- A partir de un análisis genómico completo se determinó que la cepa Tw226, anteriormente identificada como *Lactobacillus pentosus* mediante análisis PCR, pudo ser identificada como una cepa *Lactiplantibacillus plantarum* Tw226.

Por lo tanto:

Se seleccionó la cepa *Lactiplantibacillus plantarum* Tw226 como la mejor productora de BS en base a su rendimiento del BS y a las propiedades del SLC. Se decidió caracterizar al BS producido fisicoquímica y funcionalmente, así como también estudiar las condiciones óptimas de producción.

Capítulo 2

II. Capítulo 2: Selección de las condiciones de producción del biosurfactante seleccionado y su caracterización fisicoquímica y funcional

II.1 Objetivo particulares

- Determinar las condiciones óptimas de producción del BS seleccionado.
- Caracterizar al BS seleccionado a través de sus propiedades físicas y químicas.
- Emplear al BS seleccionado como emulsionante, estabilizante y antimicrobiano en emulsiones de aceite en agua y como agente anti-adhesivo.
- Caracterizar la actividad surfactante y emulsificante BS en función del pH y la concentración de solutos.
- Caracterizar la actividad emulsificante del BS en combinación con surfactantes sintéticos.

II.2 Metodologías específicas:

En la Figura II. se muestra un diagrama de las etapas de trabajo y metodologías aplicadas en este capítulo.

II.2.1 Optimización de la producción de biosurfactante

Para evaluar el efecto de la producción de BS en el tiempo se realizaron producciones de BS a 37 °C, 120 rpm en caldo MRS durante 24, 48 y 72 horas de agitación, según la sección 3.2.2.1 y 3.2.2.2 de Materiales y Métodos. Luego, se extrajeron los SLC de la manera indicada en la sección 3.2.2.3 de Materiales y Métodos y se midió la actividad superficial a través del ensayo del colapso de la gota y del desplazamiento del aceite, evaluando la actividad superficial de diluciones sucesivas.

Con el fin de optimizar la producción de BS en función de la temperatura de incubación y la velocidad de agitación, en aquellos tiempos en los cuales se detectó actividad superficial, se utilizó un Diseño Compuesto Central Rotacional (CCD) de 2 factores, con 8 puntos radiales y con una réplica por quintuplicado del punto central (totalizando 13 experimentos) cuyas variables independientes fueron la temperatura de cultivo y la velocidad de agitación. Las temperaturas seleccionadas variaron entre 20-35 °C y las velocidades de agitación entre 0-100 rpm (Tabla II.1).

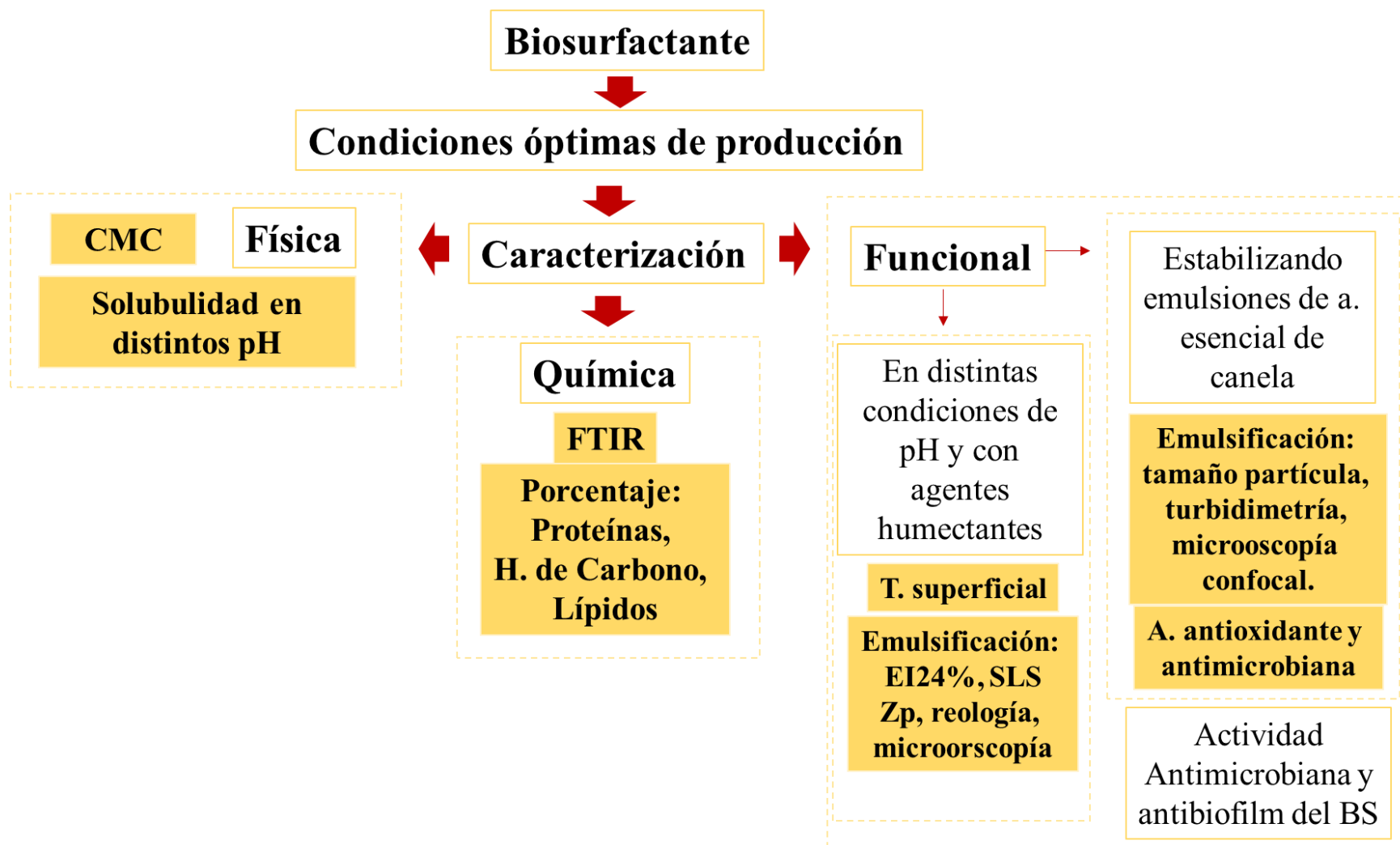


Figura II: Esquema de las etapas de trabajo desarrolladas en el Capítulo 2.

Se realizaron ensayos independientes a las 48 y 72 horas para cada experimento. Para cada ensayo, el inóculo se preparó por dilución de un preinóculo previamente cultivado utilizando como medio de cultivo MRS fresco a una densidad óptica de 0,7-0,8 u.a. a 600 nm. El cultivo se preparó mediante la adición de 10 mL de inóculo de la cepa *L. plantarum* Tw226 en 90 mL de medio de cultivo MRS en un Erlenmeyer de 250 mL. Los experimentos se realizaron mediante la incubación de diferentes cultivos a las velocidades de agitación y temperatura que se muestran en la Tabla II.1.

Tabla II.1: Condiciones de las corridas realizadas según el Diseño Compuesto Central Rotacional (CCD) con 8 puntos radiales y una réplica de 5 veces del punto central. La temperatura y la velocidad de agitación fueron seleccionadas como variables independientes, mientras que las concentraciones de biomasa y BS como respuestas.

Temperatura (°C)	Velocidad de agitación (rpm)
27,5	50
27,5	50
27,5	50
27,5	50
27,5	50
22,2	85
22,2	15
32,8	85
32,8	15
35,0	50
27,0	0
20,0	50
27,0	100

Las variables dependientes se ajustaron a una función polinómica de segundo grado (Ecuación II.1):

$$\Psi = B_0 + B_1x_1 + B_2x_2 + B_{11}x_1^2 + B_{22}x_2^2 + B_{12}x_1x_2 \quad (\text{Ecuación II.1})$$

Donde, Ψ es la variable dependiente (concentración de BS o de biomasa), x_1 y x_2 son las variables independientes (temperatura y velocidad de agitación, respectivamente); B_0 es el valor de la respuesta ajustada en el punto central del diseño; B_1 y B_2 son los coeficientes de regresión lineal; B_{11} y B_{22} son los coeficientes de regresión cuadrático; y B_{12} es el coeficiente de interacción entre las variables independientes.

Se realizó un ANOVA para determinar la significatividad de los coeficientes de regresión de las ecuaciones ($p \leq 0,05$). La adecuación de los modelos se evaluó mediante la determinación

del coeficiente de determinación (R^2), R^2 ajustado, la prueba de falta de ajuste ($p \leq 0,05$) y el estadístico Durbin-Watson ($p \leq 0,05$). Se aplicó la metodología de superficie de respuesta para optimizar las respuestas y determinar los valores óptimos de los factores. El análisis estadístico se realizó utilizando Statgraphics (Centurion XV, Versión 15.2.05).

II.2.2 Caracterización de la actividad superficial del biosurfactante

Para caracterizar la actividad superficial del BS se disolvió en agua destilada alcanzando una concentración de 5,0 g/L. A dicha solución se le determinó: i) la CMC, utilizando un tensiómetro de anillo automático; ii) la solubilidad a distintas condiciones de pH; iii) la tensión superficial dinámica (TSD) durante 7200 segundos, a distintas condiciones de pH y en presencia de agentes humectantes. Para esto se realizó lo siguiente:

- Se ajustó el pH de la solución de 5,0 g/L de BS a 5,00; 6,00 y 7,00 utilizando HCl 1,0 M.
- Se realizaron soluciones de los agentes humectantes NaCl y glucosa, en concentraciones de 5,00 y 13,9 % m/v y se ajustó el pH al valor más ácido posible en el cual se observó estabilidad en su actividad superficial, manteniendo la concentración de BS en 5,0 g/L. Dichas concentraciones de solutos se seleccionaron con el objetivo de que las muestras posean igual actividad de agua ($a_w = 0,984$), siendo la misma determinada con el higrómetro Aqualab. Las determinaciones se realizaron para cada producción del BS, al menos, por duplicado para cada condición de pH y de humectante, utilizando un tensiómetro de gota.

II.2.3 Formulación y estudio de emulsiones estabilizadas el biosurfactante seleccionado

II.2.3.1 Formulación y caracterización de emulsiones de aceite de maíz en presencia de agentes humectantes

En alimentos, los agentes tensioactivos son normalmente utilizados para estabilizar sistemas que contienen múltiples solutos en su formulación. Algunos de los más comúnmente utilizados son NaCl y glucosa. Para evaluar el efecto del BS sobre el tamaño de gota de emulsiones que contienen estos agentes humectantes se formularon las fases acuosas detalladas en la Tabla II.2.

Tabla II.2: Composición de las fases acuosas utilizadas para estudiar la capacidad estabilizante del BS en presencia de humectantes.

Sistema	NaCl (%m/m)	Glucosa (%m/m)	BS (g/L)
Control	-	-	-
E-BS	-	-	5,0
E-NaCl	5,0	-	-
E-GLU	-	15,0	-
E-NaCl:BS	5,0	-	5,0
E-GLU:BS	-	15,0	5,0

Todas las emulsiones contenían 0,15 % m/m de goma xántica. El sistema “Control”, está conformado solamente por la solución de goma xántica.

Para realizar las fases acuosas, primero se preparó una solución acuosa del BS, a la que se le adicionó el agente humectante y finalmente la goma xántica. Las suspensiones formadas se sometieron a agitación durante 24 horas a 5 °C para lograr la hidratación de la goma xántica. Luego, se ajustó el pH a 6,00 con ácido cítrico 25 % m/v. En los sistemas que contenían glucosa como humectante se adicionó 1,0 mg/mL de sorbato de potasio con el fin de evitar el posible crecimiento microbiano. Como fase oleosa se incorporó aceite de maíz al 10 % m/m. Ambas fases se homogeneizaron durante un minuto en un agitador vortex para formar una emulsión gruesa y posteriormente, para reducir el tamaño de gota, la emulsión se procesó con un homogeneizador de alta velocidad Ultra-turrax T-8 equipado con una herramienta de dispersión S8N-5G operando a 24.000 rpm por 3,5 minutos.

Para caracterizar las emulsiones y estudiar el efecto del BS se evaluó: a) el índice de emulsificación; b) el tamaño de gota, su distribución y polidispersidad; c) el potencial Z; d) el comportamiento reológico mediante la determinación de las curvas de flujo y de la viscosidad. Los ensayos se efectuaron a 25 °C de acuerdo con las condiciones especificadas en “Materiales y Métodos 3.2.6”.

II.2.3.2 Formulación y caracterización de emulsiones de aceite esencial de corteza de canela en agua

Se formularon emulsiones de aceite esencial de corteza de canela. Para su estabilización se utilizaron como emulsificantes Tween® 80 y el BS. La composición de las emulsiones se detalla en la Tabla II.3:

Tabla II.3: Composición de las emulsiones de aceite esencia de corteza de canela en agua.

	Tween® 80 (ppm)	Biosurfactante (ppm)
C:BS:T	2500	2500
C:BS	-	5000
C:T1	5000	
C:T2	2500	-
C:T3	1250	-

Todas las emulsiones contenían 5000 ppm de aceite esencial de canela corteza.

Para la homogeneización de los sistemas se utilizó un homogeneizador de alta velocidad Ultraturrax T-25. Las condiciones de homogeneización fueron 20 segundos a 13.500 rpm, para favorecer la mezcla entre las distintas fases, seguido de 50 segundos a 20.500 rpm, para generar la formación de gotas más pequeñas.

Para caracterizar las emulsiones se determinó: a) el tamaño de gota por dispersión de luz dinámica (DLS); b) la evolución de la turbidez, mediante el uso del Turbiscan®; c) la actividad antioxidante, mediante la metodología de DPPH; d) la actividad antimicrobiana, mediante la determinación de la MIC frente a *Z. bailii* y *L. innocua* por el método de microdilución en caldo. Los ensayos del “a” al “c” se efectuaron a 25 °C. El ensayo “d” se realizó a 25 °C para *Z. bailli* y a 30 °C para *L. innocua*.

II.3 Resultados y discusión

II. 3.1 Optimización de la producción de biosurfactante

El estudio de los SLC obtenidos de la incubación de *L. plantarum* Tw226 en MRS y posterior extracción de BS a 24, 48 y 72 horas, presentaron los resultados de la Tabla II.4.

Tabla II.4: Actividad superficial de los SLC obtenidos a las 24, 48 y 72 horas de producción.

	Tiempo (h)		
Metodología	24	48	72
Colapso de la gota	1/2	1/8	1/16
Desplazamiento del aceite	1/2	1/4	1/8

El resultado informado corresponde a la menor dilución en la cual se observó actividad superficial.

En base a los resultados presentes en la Tabla II.4, puede observarse que hay mayor actividad superficial en los SLC obtenidos en las producciones a 48 y 72 horas. Madhu y Prapulla (2014) evaluaron la tensión superficial de SLC obtenidos luego de 24, 48 y 72 horas de incubación. Estos autores observaron que empleando tiempos de incubación de 48 y 72 horas obtuvieron mayores disminuciones de tensión superficial, siendo mayores las disminuciones a las 72 que a las 48 horas. En base a los resultados obtenidos para *L. plantarum* Tw226, se seleccionaron los tiempos de 48 y 72 horas como los más prometedores para la obtención de BS y se estudiaron las condiciones óptimas de producción para estos dos tiempos de incubación.

Los datos obtenidos de rendimiento de biomasa (g/L) y de BS (g/L), en las distintas condiciones de temperatura y de velocidad de agitación, se evaluaron a través de un modelo de segundo orden con un término de interacción bidireccional (Ecuación II.1). Los coeficientes de regresión y los análisis de varianza se muestran en la Tabla II.5 y las superficies de respuesta, en la Figura II.1.

A ambos tiempos evaluados, la temperatura fue el factor que más efecto tuvo sobre la producción de BS y de biomasa, mientras que la agitación sólo fue significativa sobre la producción de BS luego de 72 horas (Tabla II.4, $p > 0,05$). Este resultado también se observó en las superficies de respuesta, en las cuales, el incremento de la temperatura, en ausencia de agitación, produjo un incremento de la concentración de BS y un descenso de la cantidad de biomasa (Figura II.1). Este comportamiento no se modificó al incrementarse la velocidad de agitación.

Mediante la optimización de las curvas de regresión se calculó que las concentraciones máximas de BS se obtuvieron a 35,0 °C y 0,5 rpm para ambos tiempos. Por otro lado, la máxima concentración de biomasa se obtuvo bajo condiciones óptimas de 22,7 °C y 0,5 rpm, a las 48 horas, y de 24,08 °C y 49,5 rpm, a las 72 horas. Esto indicaría que la producción de BS no sería un proceso que requiere altas velocidades de agitación durante la incubación y que, además, no habría una correlación entre las condiciones óptimas de producción del BS, producido por *L. plantarum* Tw226, y las condiciones de crecimiento óptimas. Las concentraciones máximas de BS que se obtuvieron en mediante la optimización de los modelos de regresión fueron 0,125 y 0,185 g de BS/L a las 48 y 72 h, respectivamente. A

partir de estos valores, se calculó la productividad (g de BS/L.h), resultando la misma $2,6 \cdot 10^{-3}$ para ambos tiempos, lo que indicaría que la producción de BS no aumentaría significativamente por aumentar el tiempo de incubación.

Tabla II.5: Coeficientes de regresión del ajuste de los rendimientos del biosurfactante (A) y de la biomasa (B) a la función polinómica de segundo grado y el análisis de varianza, luego de 48 y 72 horas de incubación.

A: Concentración de biosurfactante (g/L)

Tiempo (h)	48		72	
Coeficientes	Estimado	p	Estimado	p
B₀	0,347		0,365	
B₁	$-2,50 \cdot 10^{-2}$	0,0003	$-2,70 \cdot 10^{-2}$	0,00001
B₂	$5,20 \cdot 10^{-4}$	0,3807	$-2,59 \cdot 10^{-4}$	0,0406
B₁₁	$5,34 \cdot 10^{-4}$	0,0011	$6,26 \cdot 10^{-4}$	0,0033
B₂₂	$3,98 \cdot 10^{-7}$	0,2886	$6,20 \cdot 10^{-6}$	0,1021
B₁₂	$-2,29 \cdot 10^{-5}$	0,8670	$-2,29 \cdot 10^{-5}$	0,4507
R²	91,7	--	93,7	--
R²aj	85,0	--	89,2	--
FA	--	0,052	--	0,051
DW	3,22	0,9778	2,99	0,9338

B: Concentración de biomasa (g/L)

Tiempo (h)	48		72	
Coeficientes	Estimado	p	Estimado	p
B₀	-2,02		-4,01	
B₁	0,418	0,00001	0,527	0,00001
B₂	$-7,61 \cdot 10^{-3}$	0,1583	$-1,07 \cdot 10^{-2}$	0,5508
B₁₁	$-9,20 \cdot 10^{-3}$	0,0001	$-1,08 \cdot 10^{-2}$	0,0001
B₂₂	$-1,72 \cdot 10^{-5}$	0,514	$-6,74 \cdot 10^{-5}$	0,0785
B₁₂	$2,92 \cdot 10^{-4}$	0,2204	$-1,67 \cdot 10^{-4}$	0,5765
R²	97,4	--	96,0	--
R²aj	9,55	--	93,1	--
FA	--	0,0943	--	0,0994
DW	1,06	0,051	1,67	0,1870

1: temperatura de incubación, 2: velocidad de agitación. B₀: constante. B₁ y B₂: términos lineales. B₁₁ y B₂₂: términos cuadráticos. B₁₂: término de interacción. R²: coeficiente de determinación (%). R² aj: coeficiente de determinación ajustado (%). Falta de ajuste (p ≥ 0,05). DW: estadístico de Durbin-Watson (p ≥ 0,05).

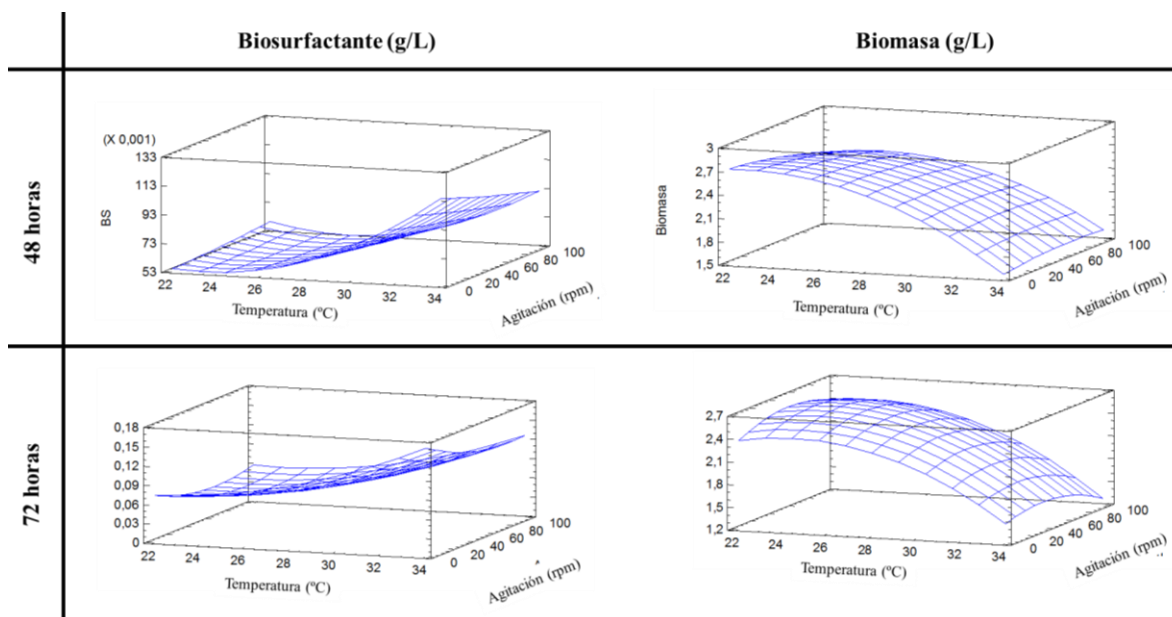


Figura II.1: Superficies de respuesta de concentración de BS y de biomasa como función de la temperatura de incubación y de la velocidad de agitación.

La temperatura comúnmente considerada óptima para el crecimiento de BAL se encuentra alrededor de los 37,0 °C (Gallus et al., 2022), sin embargo, la mayor tasa de crecimiento de *L. plantarum* Tw226 se obtuvo a temperaturas cercanas a los 25,0 °C. Frente a este comportamiento, es útil recordar el origen de la cepa *L. plantarum* Tw226. La misma fue aislada de un espécime de pejerrey plateado (*Odontesthes platensis*) propio del litoral marítimo del noreste de la provincia de Chubut. De acuerdo con registros sobre la temperatura marítima de la zona, esta se encuentra entre los 8 – 18 °C, dependiendo de la época del año (Rubilar et al., 2005; Carrasco et al., 2010). Además, los peces son animales ectotérmicos, lo cual significa que la temperatura de sus cuerpos se rige por factores externos, en especial por las aguas que habitan. Si viven en regiones frías, entonces su temperatura corporal se encontrará cercana a esas temperaturas (Boltaña et al., 2017; Balcombe, 2018). En base a estos factores, y a el hecho de que las bacterias normalmente se encuentran adaptadas a su entorno, es razonable que cepas como *L. plantarum* Tw226 puedan llegar a tener una temperatura de crecimiento menor que otras BAL.

En cuanto a la temperatura de producción óptima de BS, suele ser un factor que depende de la BAL productora, y se encuentran registrados valores entre 30 y 37 °C, dependiendo de la cepa utilizada (Moufao et al., 2022). A partir de los resultados obtenidos, pudo observarse que

para la cepa *L. plantarum* Tw226, las condiciones óptimas de producción del BS no coinciden con las de producción de biomasa. Cornea et al. (2016) también informaron que varias especies de *Lactobacillus* mostraron una mayor producción de BS a las 48 horas, tiempo en el que se alcanzó una reducción del pH máxima. Sittirart y Gasaluck (2022) reportaron que el mayor rendimiento de BS producido por *L. plantarum* MGL-8 lo obtuvieron a las 120 horas de incubación, momento en que la BAL se encontraba en fase de muerte, con condiciones de pH desfavorables y los nutrientes escasos. Por lo tanto, parecería que la producción de BS en estas cepas se encontraría asociada a factores de estrés. Algunos autores plantean que las BAL son capaces de crecer y sobrevivir en un medio gracias a la presencia de mecanismos de “quorum sensing”. Las BAL secretan péptidos autoinducidos que promueven la activación de mecanismos de “quorum sensing”, como la producción de BS y la producción de biofilms para poder protegerse (Sharma y Saharan, 2016; Gu et al., 2018). Bajo este planteo, es posible que las condiciones más favorables para la producción de BS difieran de las óptimas condiciones de crecimiento de la bacteria productora.

II.3.2 Caracterización química

II.3.2.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

La espectroscopía FTIR es muy útil para identificar diferentes grupos funcionales y dilucidar algunos componentes de una sustancia cuya composición se desconoce. El espectro FTIR del BS se muestra en la Figura II.2. El pico de 3200–3500 cm^{-1} indica la presencia de grupos O-H y N-H característicos de las glicoproteínas (Vecino et al., 2013). La absorbancia registrada a longitudes de onda de 3304,9 cm^{-1} , podría ser debida al estiramiento N-H de un grupo amida. Además, la absorción de vibraciones a 1655,1 cm^{-1} podría corresponder a la vibración del estiramiento C = O (banda Amida I) y la absorción a 1542,0 cm^{-1} podría representar la vibración N-H (banda Amida II) (Barth, 2007). La presencia del estiramiento C-H, correspondiente a los grupos CH_2 y CH_3 de las cadenas alifáticas, se denota en la banda de absorbancia entre 2931,5 cm^{-1} y 2961,6 cm^{-1} , así como en bandas alrededor de 1453,3 y 1379 cm^{-1} . Una fracción de polisacárido se puede detectar debido al rango de longitud de onda de absorción de 1200–1000 cm^{-1} , la absorción a 1084,3 cm^{-1} podría identificarse como el estiramiento de C-O-C de los enlaces glicosídicos y la de 1237,0 cm^{-1} podría representar la presencia de grupos sulfato éster, normalmente presentes en polisacáridos de sulfato (Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011).

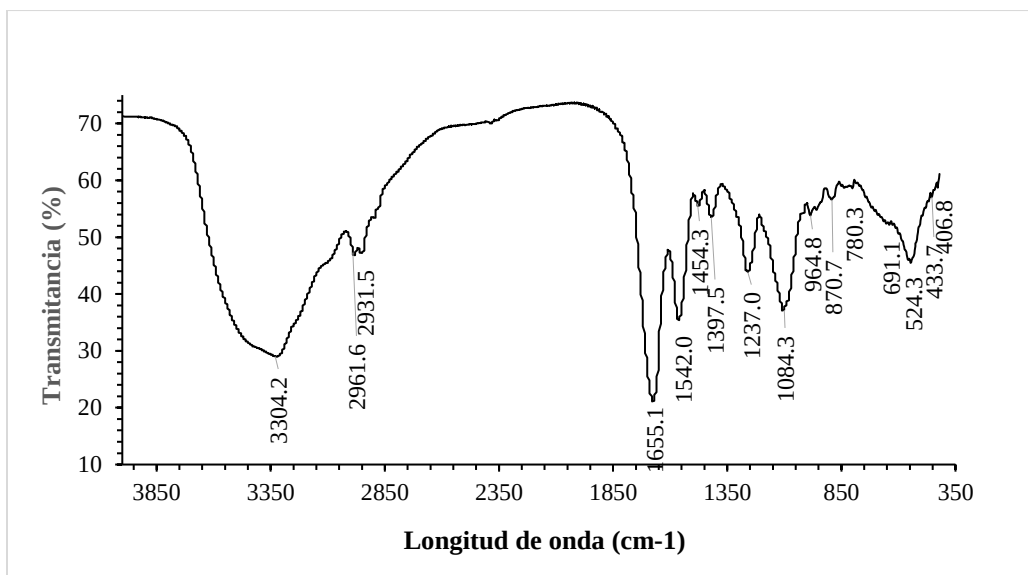


Figura II.2: Espectros FTIR de biosurfactantes producidos por *L. plantarum* Tw226

Madhu et al. (2014) y Bakhshi et al. (2017), estudiando el BS producido por una cepa de *L. plantarum* CFR 2194 y *L. plantarum* subsp. *plantarum* PTCC 1896 pudieron identificar a través del espectro FTIR que el BS no estaba conformado por una única sustancia y que poseía enlaces característicos a proteínas y polisacáridos. Además, Behzadnia et al. (2020) y Sittisart y Gasaluck (2022), comprobaron que los BS extraídos de *L. plantarum* ATCC 8014 y *L. plantarum* MGL-8, respectivamente, poseen una estructura de glicolipopéptido. Behzadnia et al. (2020), sumó a la espectroscopía FTIR un análisis de cromatografía gaseosa acoplado a masas, confirmando así la presencia de ácido esteárico. Por lo que, según Behzadnia et al. (2020), los picos característicos de lípidos podrían estar solapados por los pertenecientes a polisacáridos y proteínas. Teniendo en cuenta que los picos característicos de los lípidos de la membrana celular de las BAL suelen encontrarse en entre 3050 y 2800 cm^{-1} , así como en 1350 cm^{-1} y 1740 cm^{-1} , es posible que en el espectro analizado estos picos estén enmascarados (Berterame et al., 2016). Por lo tanto, es necesario realizar análisis adicionales para confirmar la presencia de compuestos lipídicos en el BS.

II.3.2.2 Composición química

El estudio de la composición química del BS crudo demostró la presencia de proteínas, hidratos de carbono y lípidos en una proporción $64,0 \pm 0,1 \%$; $15,0 \pm 1,0 \%$ y $21,0 \pm 2,0 \%$,

respectivamente (Figura II.3). Por lo tanto, a partir de este análisis se puede plantear que el BS producido por *L. plantarum* Tw226 presenta una composición glicolipopeptídica.

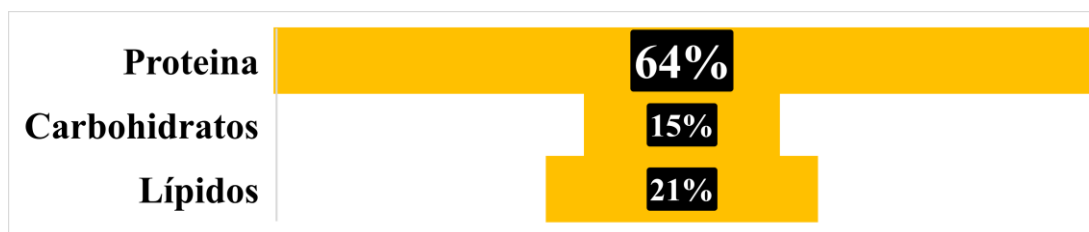


Figura II.3: Composición química del BS producido por *L. plantarum* Tw226.

Los resultados del estudio de composición química ratifican el análisis realizado previamente por FTIR que mostró la presencia de grupos característicos de proteínas y glucídicos. Estudios desarrollados previamente sobre la composición química de BS de BAL, mostraron que la composición de los BS puede variar según la cepa utilizada para la producción, además de que suele referirse a ellos como una combinación de diferentes compuestos (Rodrigues et al., 2006; Saravanakumari y Mani, 2010; Vecino et al., 2015).

Si bien hay presencia de lípidos y carbohidratos, es destacable el carácter proteico del BS. Muchos compuestos proteicos son conocidos por sus propiedades tensioactivas porque presentan grupos polares y apolares capaces de disponerse en las interfaces generando una disminución de la tensión superficial (McClements, 2016).

II.3.3 Caracterización física y funcional

II.3.3.1 Concentración micelar crítica

Para el BS producido por *L. plantarum* Tw226, la CMC fue de $0,11 \pm 0,02$ g/L, alcanzando un valor de tensión superficial de equilibrio igual a $46,4 \pm 0,09$ mN/m (Figura II.4).

Los datos de actividad tensioactiva y CMC de BS adheridos a las células de cepas de *L. plantarum* son escasos. Se encuentra informado que el BS producido por *L. plantarum* CFR 2194 fue capaz de reducir la tensión superficial hasta 44,3 mN/m y su CMC fue 6,00 g/L (Madhu y Prapulla, 2014). Además, el BS extraído con un tratamiento de ultrasonido producido por *L. plantarum* ATCC 8014, tuvo una CMC de 1,00 g/L, disminuyendo la tensión superficial hasta 37,3 mN/m (Behzadnia et al., 2020). En otros estudios que emplearon SLC conteniendo BS producidos por diversas cepas de *L. plantarum* se obtuvieron

valores de tensión superficial de SLC entre 44,74 – 47,44 mN/m dependiendo del medio y de las condiciones de producción, no informaron valores de CMC (Bakhsi et al., 2022).

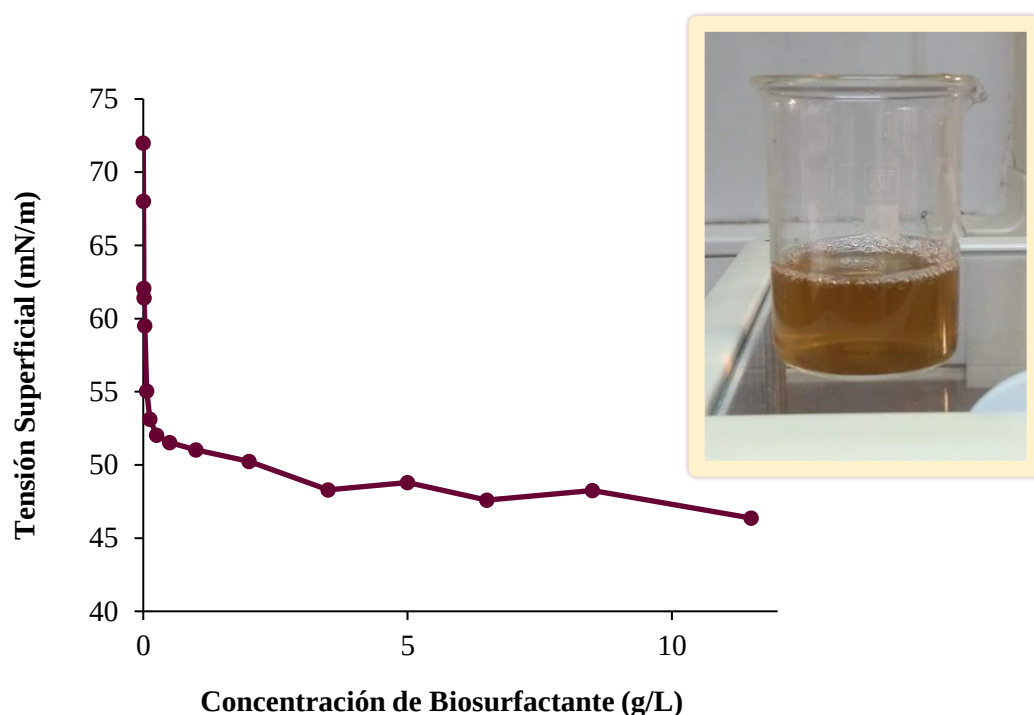


Figura II.4: Efecto de la concentración de BS sobre la tensión superficial del agua destilada. Gráfico: Tensión superficial (mN/m) del BS bruto obtenido de *L. plantarum* Tw226 disuelto en agua destilada a diferentes concentraciones a temperatura ambiente (20 °C). Fotografía: Aspecto de la solución del BS producido por *L. plantarum* Tw226 en una concentración de 12 g/L.

Ampliando el análisis a otras cepas de BAL, Bustos et al. (2018) reportaron que *Lactobacillus pentosus* CECT-4023T alcanzó una tensión superficial en agua destilada de 50,0 mN/m cuando se utilizó MRS como medio de fermentación. También, un valor de tensión superficial igual a 55,0 mN/m fue obtenido por Vecino et al. (2013) quienes produjeron un BS a partir *L. plantarum* ATCC 8014 utilizando como medio de cultivo azúcares hemicelulósicos producto de residuos de la vinicultura. En cuanto a la CMC de los BS producidos por *Lactobacillus pentosus*, Bustos et al (2018) informaron un valor de CMC de 1,95 g/L para el BS producido por *Lactobacillus pentosus* CECT-4023T. También, un BS producido por *Lactococcus lactis* 53, redujo la tensión superficial a 40,0 mN/m, sin embargo, la CMC resultó en 14,0 g/L, valor que es considerablemente elevado. En base a la información presente se puede determinar que la CMC del BS producido por *L. plantarum*

Tw226 es destacable debido a que puede alcanzar su máxima capacidad surfactante en concentraciones bajas.

II.3.3.2 Solubilidad a distintas condiciones de pH

La solubilidad del BS dependió del pH del medio. Cuando se solubilizó en agua bidestilada ajustada a pH 4,00 se observó que comenzó a aparecer turbidez con posterior precipitación. Este fenómeno también fue informado por Behzadnia (2022) quien reportó la aparición de precipitados para soluciones del BS producido por *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 con un pH menor a 5,00. Esta tendencia se vincula al carácter altamente proteico del BS (Figura II.3). Numerosas proteínas presentan un punto isoeléctrico (pI) entre 4,00 – 5,50, generando que su solubilidad disminuya drásticamente por la pérdida de carga neta. Esta limitación también está presente en BS proteicos actualmente utilizados en la industria como las proteínas de suero lácteo, caseínas y proteínas de huevo (McClements y Gumus, 2016).

II.3.3.3 Análisis dinámico de la tensión superficial en distintas condiciones de pH y en soluciones con agentes humectantes

En la Figura II.5 se muestran los cambios de la tensión superficial de soluciones del BS en una concentración de 5,00 g/L y ajustadas a distintos valores de pH. Se puede observar que la tensión superficial varía en el tiempo y que las curvas presentan tres secciones. Una inicial, donde se registra una fuerte caída de la tensión superficial que corresponde a un periodo en el cual las moléculas del BS se desplazan y ubican en la interfase. Luego, una región en la que hay una disminución gradual de la tensión superficial, en la cual las moléculas de BS se acomodan en la interfase y, finalmente, una región en la cual la tensión superficial se vuelve constante. La tensión superficial de esta última región es conocida como tensión superficial de equilibrio.

Las tensiones superficiales de equilibrio de las soluciones a pH 5,00, 6,00 y 7,00 no presentaron diferencias significativas, por lo que se podría plantear que se mantiene estable la actividad superficial en ese rango de pH. Los resultados pueden observarse en la Tabla II.6.

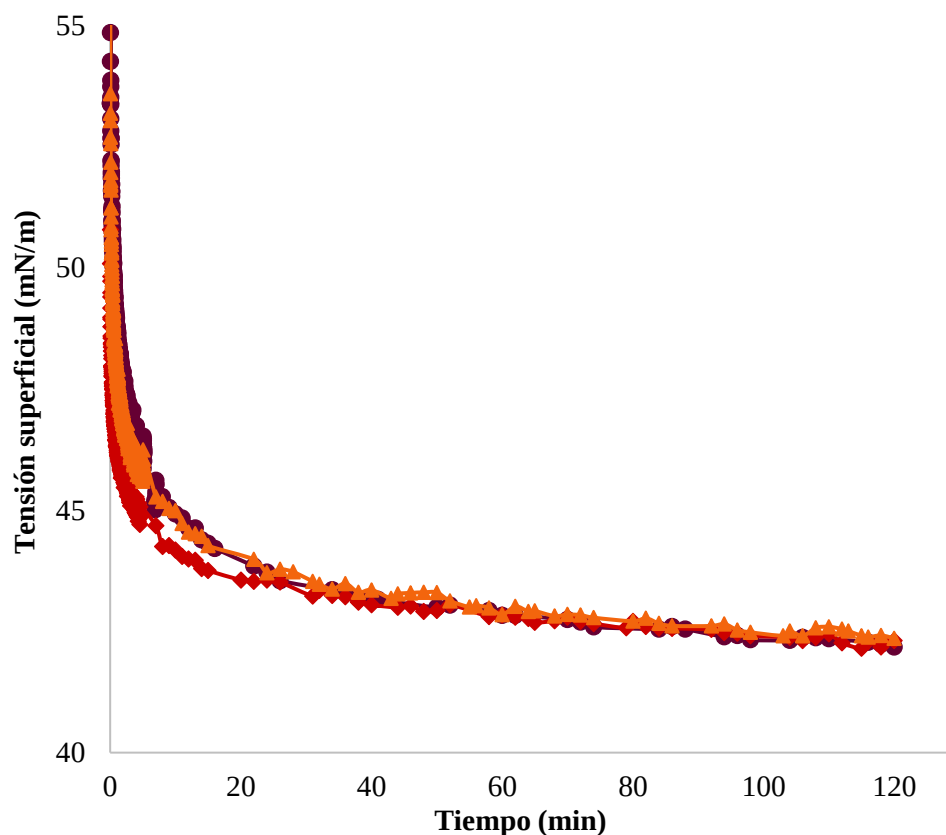


Figura II.5: Tensión superficial en función del tiempo para las soluciones de BS 5 g/L ajustadas a pH 5,00 (♦), 6,00 (▲) y 7,00 (●).

Tabla II.6: Valores de tensión superficial de equilibrio (TS) para el BS (5 g/L) a distintos valores de pH.

pH	TS (mN/m)
5,00	43,14 ± 1, 47a
6,00	42,80 ± 1, 69a
7,00	42,50 ± 1, 40a

Lo promedios cuyo superíndice poseen la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$).

En otros trabajos en los que se estudió la estabilidad de BS obtenidos de *L. paracasei* (Gudiña et al., 2010), *L. agilis* CCUG31450 (Gudiña et al., 2015), *Enterococcus faecium* MRTL9 (Sharma, 2015) y *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 8014 (Behzadnia et al., 2022) a diferentes valores de pH, se observó que el punto en el cual había una disminución mayor en la tensión superficial correspondía al pH 7,00 y que en condiciones de menor pH se comenzaba a observar aumentos significativos en la tensión superficial.

Desde el punto de vista tecnológico, un BS no sólo debe tener la capacidad de reducir la tensión superficial de equilibrio, sino que esta disminución también debe producirse rápidamente. Para evaluar la rapidez con la que se dispone el BS en la interfase es útil la determinación de la tensión superficial dinámica (TSD), parámetro que relaciona la presión superficial con el tiempo en que tarda el BS en llegar al equilibrio. Cuanto más rápida sea la reducción de la tensión superficial, mayor será el valor de TSD, por lo tanto, mayores serán las actividades de emulsificación y formación de espuma (Romsted, 2014). En la Tabla II.7, pueden observarse los valores de TSD para las soluciones del BS producido por *L. plantarum* Tw226. Se puede observar que la TSD aumentó en el valor de menor pH, probablemente, al estar más cerca de la pI, haya cambios estructurales que produzcan que se desplace más rápidamente a la interfase. Bakhshi et al. (2017) informaron mayores valores de TSD para BS producidos por *L. plantarum* ssp. *plantarum* que los que se obtuvieron en este trabajo, resultado obtenido básicamente porque registraron menores tiempos para alcanzar el equilibrio (Te). Sin embargo, estos autores utilizaron, a diferencia de este trabajo, la metodología del plato de Wilhelmy. Por otro lado, Verdearlars et al. (1996) realizaron estudios de la tensión superficial de BS, producidos por BAL, en el tiempo a través de un tensiómetro de gota, equipo utilizado en este trabajo. Si bien no informaron TSD, sí mencionaron los Te. Estos autores observaron que, dependiendo de la cepa de origen del BS, los Te se encontraron entre 15 y 40 minutos, y los valores de presión superficial también fueron similares a los obtenidos con el BS obtenido por *L. plantarum* Tw226.

Tabla II.7: Presión superficial de equilibrio (PS), tiempo que demora el sistema para alcanzar el equilibrio (Te) y tensión superficial dinámica (TSD).

pH	PS (mN/m)	Te (min)	TSD (mN/m.min)
5,00	28,9 ± 1,5 ^a	17,3 ± 0,1 ^a	1,67 ± 0,09 ^a
6,00	29,2 ± 1,7 ^a	29,7 ± 0,7 ^b	0,98 ± 0,03 ^b
7,00	29,5 ± 1,4 ^a	29,6 ± 0,6 ^b	0,99 ± 0,03 ^b

Lo promedios cuyo superíndice poseen la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$).

La adición de glucosa y NaCl en concentraciones de 14,00 y 5,00 %, respectivamente, a soluciones de BS obtenido de *L. plantarum* Tw226 en una concentración de 5,00 g/L y a pH 6,00 no generó cambios estadísticamente significativos en la reducción de la tensión superficial de equilibrio (Tabla II.8, Figura II.6). Las investigaciones previas acerca del efecto de NaCl o glucosa sobre la tensión superficial de los BS producidos por BAL, son

escasas. Gudiña et al. (2015) evaluaron la tensión superficial de un BS producido por *Lactobacillus agilis* CCUG31450 en soluciones con una concentración de NaCl entre 5,00 y 20,0 %, y observaron cambios significativos en la tensión superficial a partir de la concentración 10,0 %. Por otro lado, no se encontraron investigaciones previas que registren el efecto que puede producir la incorporación de glucosa sobre la tensión superficial de un BS producido por BAL.

Tabla II.8: Tensión superficial (TS) de las soluciones con una concentración de 5 g/L de BS producido por la cepa Tw226 a pH 6,00 conteniendo 14,0 % m/m de glucosa y 5,0 % m/m de NaCl.

Humectante	TS (mN/m)
Sin humectante	$42,80 \pm 1,69^a$
NaCl	$42,25 \pm 1,35^a$
Glucosa	$42,35 \pm 0,07^a$

Lo promedios cuyo superíndice poseen la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$).

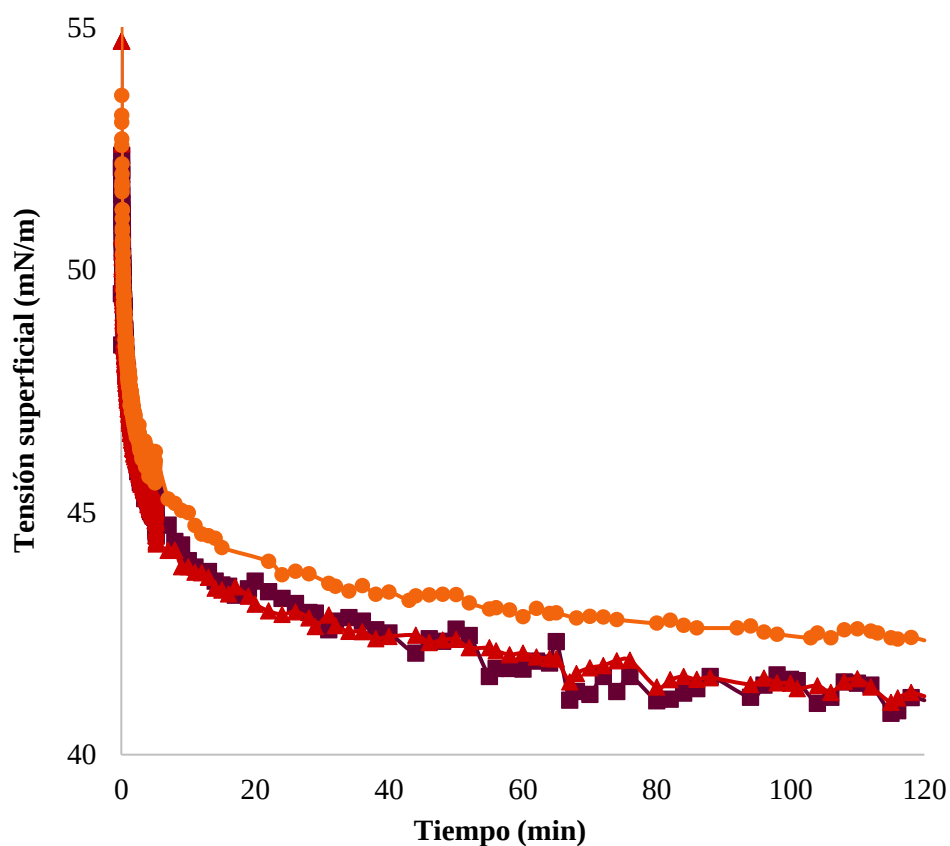


Figura II.6: Tensión superficial en función del tiempo para la solución de BS (5 g/L) con glucosa (14,0 % m/m) (■), con NaCl (5,0 % m/m) (▲) y sin agentes humectantes (●) a pH 6,00.

En cuando a los cambios de TS en el tiempo, la incorporación de los humectantes no generó cambios significativos en la TSD (Tabla II.9). Esto es destacable, ya que la incorporación de estos ingredientes a una formulación con el BS producido por la cepa Tw226, no afectaría su funcionalidad y su cinética de acomodamiento en la interfase. No se encontraron otros trabajos que hayan registrado TSD de BS producidos por BAL bajo estas condiciones o similares.

Tabla II.9: Presión superficial de equilibrio (PS), tiempo que demora el sistema para alcanzar el equilibrio (Te) y tensión superficial dinámica (TSD) de soluciones de BS producido por *L. plantarum* Tw226 con una concentración 5,0 g/L conteniendo 14,0 % m/m de glucosa y 5,0 % m/m de NaCl, ajustadas a pH 6,00.

Humectante	PS (mN/m)	Te (min)	TSD (mN/m.min)
Sin humectante	29,2 ± 1,7 ^a	29,7 ± 0,7 ^a	0,98 ± 0,03 ^a
NaCl – 5 %m/m	29,6 ± 1,2 ^a	29,2 ± 0,1 ^a	1,05 ± 0,04 ^a
Glucosa - 14 %m/m	29,8 ± 0,2 ^a	29,0 ± 0,1 ^a	1,01 ± 0,01 ^a

Lo promedios cuyo superíndice poseen la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$).

II.3.3.4 Formación de emulsiones conteniendo el biosurfactante en presencia de NaCl o glucosa

II.3.3.4.1 Estabilidad visual: Índice de Emulsificación

A través del análisis visual se calculó el índice de emulsificación para evaluar la estabilidad al cabo de 24 horas (Figura II.7, A y B).

El agregado de BS generó un aumento de la estabilidad de las emulsiones sin humectante y con NaCl. Es destacable que la adición del BS a la emulsión con NaCl produjo un aumento en la estabilidad del 87,5 % respecto a su análoga sin BS, siendo el sistema en el que la adición del BS generó un mayor aumento en la estabilidad. También, el agregado de glucosa generó un aumento en la estabilidad de la emulsión independientemente de la presencia del BS. A partir de este resultado se puede afirmar que el BS producido por *L. plantarum* Tw226, posee una funcionalidad como agente emulsificante de prometedora. A continuación, se caracterizarán estas emulsiones estructuralmente para determinar los modos de acción del BS.

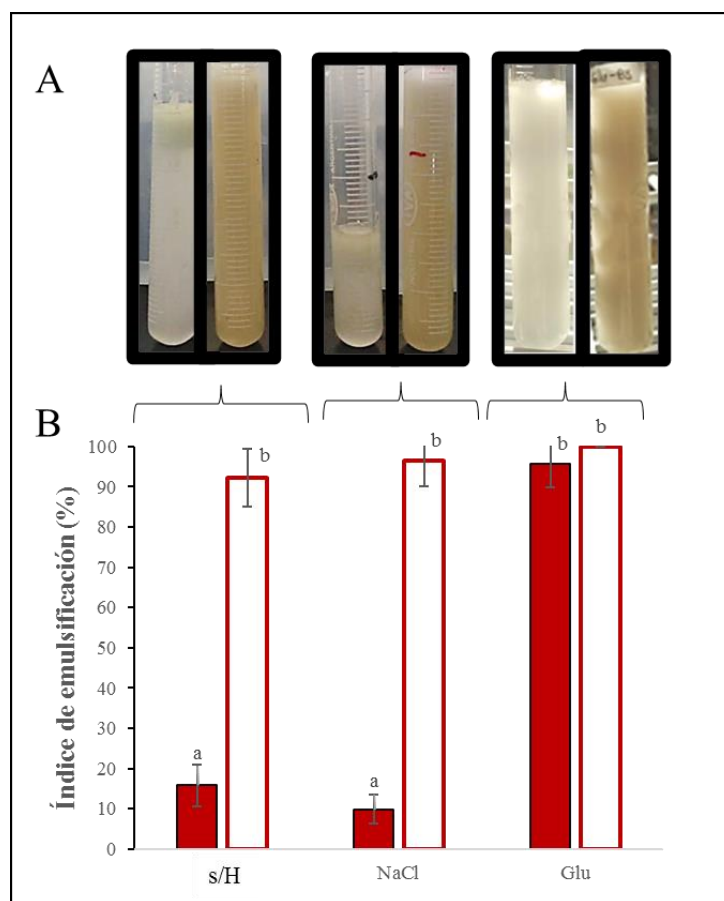


Figura II.7: Actividad emulsificante del BS de *L. plantarum* Tw226 en emulsiones almacenadas durante 24 h a 5 °C. Panel A: Fotos digitales. Panel B: Índice de emulsificación (EI₂₄%). Emulsiones sin BS (□); Emulsiones con BS de 5,0 g/L (■). El grupo "S/ H" son sistemas sin humectante. El grupo "NaCl" son sistemas con 5,0 % m/m de NaCl. El grupo "Glu" son sistemas con 14,0 % m/m de glucosa. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre sistemas ($p < 0,05$).

II.3.3.4.2 Distribución del tamaño de gota y observación microscópica

Se analizó la distribución de tamaño de gota de las emulsiones estabilizadas con el BS, en ausencia y presencia de agentes humectantes, ya que el conocimiento de la distribución del tamaño de las gotas proporciona información sobre su estabilidad (McClements, 2004). La Figura II.8 representa las distribuciones de tamaño de gota y las morfologías de las emulsiones formuladas. Puede observarse que todas las emulsiones, tanto con o sin BS, se clasifican como macroemulsiones debido a que contienen gotas con un tamaño entre 0,5 – 100 μm (Guerra-Rosa, 2016). También, puede observarse que la adición del BS a las emulsiones provocó un corrimiento en la distribución hacia tamaños de gota más pequeños.

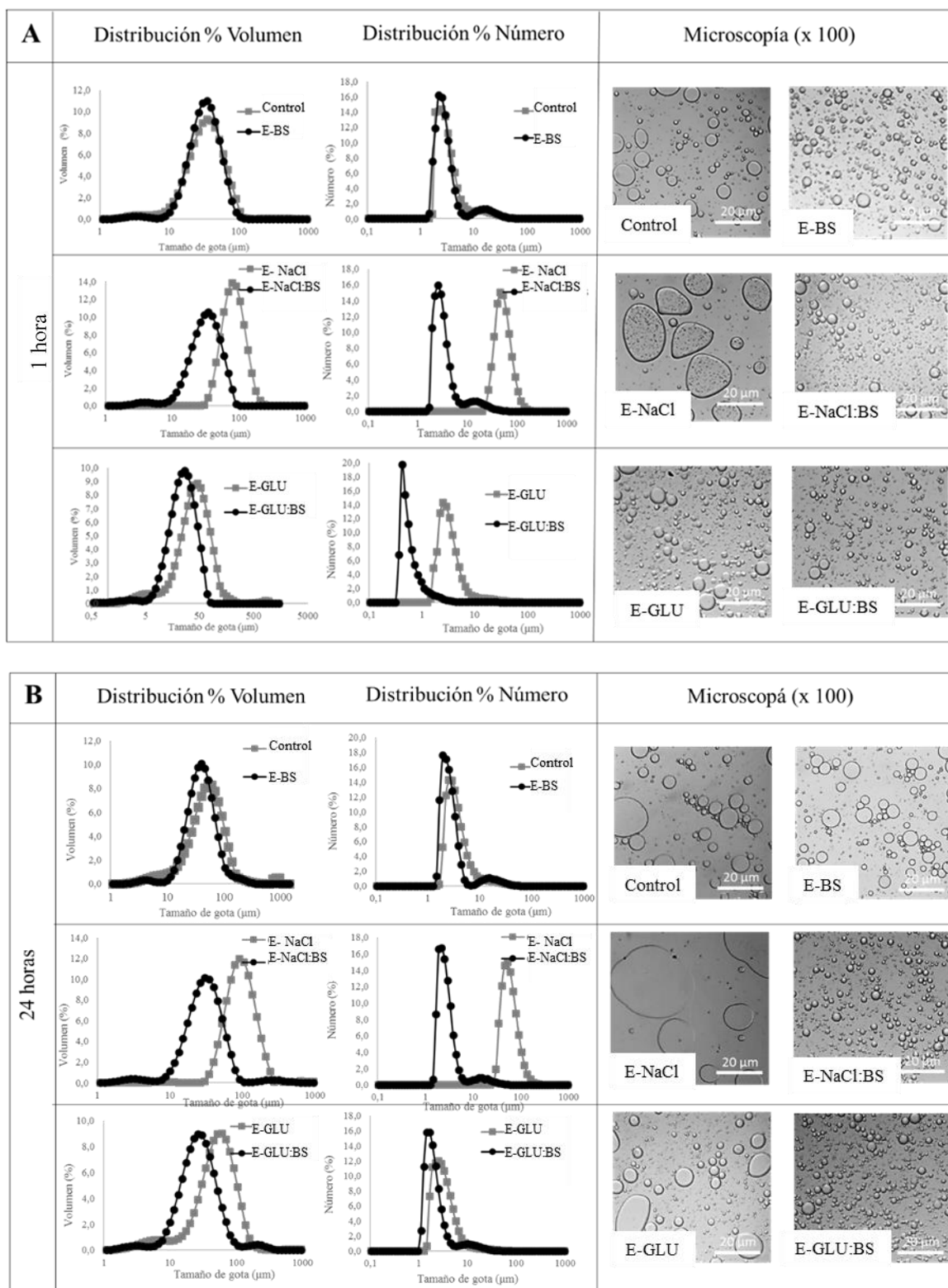


Figura II.8: Distribuciones de tamaño de gota e imágenes microscópicas de emulsiones que contienen 10,0 % m/m de aceite de maíz y 0,15 %m/m de goma xántica en la fase acuosa. Emulsiones después de 1 h de almacenamiento a 5 °C (**Panel A**). Emulsiones después de 24 h de almacenamiento a 5 °C (**Panel B**). De arriba para debajo de cada panel: Primera subdivisión: Emulsiones sin

humectantes. Segunda subdivisión: Emulsiones con 5,0 % m/m de NaCl. Tercera subdivisión: Emulsiones con 14,0 % m/m de glucosa. (●) Emulsiones con BS en una concentración de 5,0 g/L, (■) emulsiones sin BS. Control: emulsiones sin humectante y biosurfactante. E-BS: emulsiones sin humectante y que contienen 5,0 g/L de BS. E-NaCl: emulsiones con 5,0 % m/m de NaCl sin BS. E-NaCl:BS: emulsiones con 5,0 % m/m de NaCl y 5,0 g/L de BS. E-GLU: emulsiones con 14,0 % m/m de glucosa y sin biosurfactante. E-GLU:BS: emulsiones con 14,0 % m/m de glucosa y con 5,0 g/L de BS.

Independientemente de la presencia de BS, se encontró que las emulsiones presentan una distribución bimodal, a excepción de la que contiene NaCl, sin BS, cuya distribución fue monomodal. Este tipo de distribución en emulsiones estabilizadas con goma xántica, en rangos de tamaño de gota similares fueron reportados por Zalazar et al. (2022). Puede observarse que en la distribución en % en volumen la población más grande fue la que tenía un tamaño en el rango de 10 - 100 μm , siendo apenas evidente la población con tamaño en el rango de 1 - 10 μm (Fig. II.8 - panel A). Sin embargo, la distribución de tamaño de gota expresada en función del % en número revela que la mayor población está conformada por aquellas gotas que se encuentran en el rango de 1 - 10 μm . Cabe aclarar que las distribuciones basadas en el volumen de las gotas siempre estarán desplazadas hacia mayores tamaños en comparación con las distribuciones basadas en su número. Es por esto por lo que los diámetros informados para cada población en volumen presentaron valores mayores a los señalados para la distribución en número.

Después de 24 horas de almacenamiento se observó que en los sistemas con NaCl y sin humectante ni BS aparece una nueva población en la distribución de % en volumen de alrededor de 1000 μm , lo que sugiere la presencia de gotas más grandes, producto de la desestabilización. Sin embargo, no influyó en la distribución de % en número (Fig. II.8, Panel B). Por lo tanto, una comparación con los perfiles al inicio y después de 24 horas de almacenamiento sugirió que la presencia de BS no jugó un papel significativo en la formación de gotas más pequeñas, pero sí en su estabilización, evitando la coalición entre gotas que permitan la aparición de gotas de mayor tamaño, lo que generaría la aparición de nuevas poblaciones y desplazamientos hacia mayores valores de tamaño de gota.

El sistema con NaCl mostró una población monomodal conformada por gotas de mayor tamaño en comparación con el resto de las emulsiones, lo que indicaría que la adición de NaCl es un factor que afecta a la formación de gotas pequeñas. Por otro lado, la distribución en % en volumen y en % en número del sistema con NaCl y BS fue similar a la obtenida en

ausencia de NaCl (Fig. II.8, Panel A). Este comportamiento también se refleja en las imágenes microscópicas, es decir, las gotas de la emulsión que contiene sólo NaCl exhibieron tamaños mucho más grandes y de forma más irregular que el sistema análogo que contiene BS. Las imágenes de estas emulsiones después de 24 horas muestran que en la emulsión que contiene sólo NaCl hubo una marcada desestabilización evidenciada por grandes zonas de aceite en agua, mientras que las gotas de la que contiene BS y NaCl muestran un tamaño y morfología similar a los de la emulsión de partida (Fig. II.8). El NaCl fue reportado como un agente desestabilizante de emulsiones con goma xántica por Zalazar et al. (2022), así como también que presenta poblaciones monomodales. En base a esto, el empleo del BS sería una alternativa promisorio para la estabilización de emulsiones conteniendo NaCl.

Finalmente, las emulsiones que contienen glucosa mostraron gotas con tamaño más pequeño que las que no tienen este azúcar. La adición de BS favoreció el desplazamiento del pico más alto de la distribución en número hacia un tamaño más bajo. Sin embargo, estas diferencias disminuyeron después de 24 horas de almacenamiento. En otras palabras, la glucosa inicialmente favoreció la formación de pequeñas gotas, y el BS potenció esta tendencia, pero, luego de 24 horas, las gotas sufrieron un aumento de tamaño que fue menos pronunciado en presencia de BS (imágenes microscópicas en la Fig. II.8, Paneles A y B).

II.3.3.4.3 Parámetros de tamaño de gota

El diámetro de De Brouckere ($D_{4,3}$) y el diámetro de Sauter ($D_{3,2}$) de las gotas se muestran en la Figura II.9. Cabe recordar que el primer parámetro está relacionado con los cambios en el tamaño de las partículas que involucran procesos de desestabilización y es afectado por el tamaño de las gotas más grandes, mientras que el último es un indicador del diámetro medio de la mayoría de las gotas (Eastoe y Dalton, 2000).

En la Figura II.9 se puede observar que la adición de BS hizo que el $D_{4,3}$ disminuya significativamente en todas las emulsiones, tanto al inicio como después de 24 horas de almacenamiento. Esta tendencia sugiere que la adición de BS promovió una reducción en el tamaño de las gotas más grandes. Después de 24 horas de almacenamiento, el $D_{4,3}$ aumentó significativamente en las emulsiones que no contienen BS y se mantuvo sin cambios significativos en la emulsión estabilizada con el BS y que contiene NaCl y la que no posee agentes humectantes. Por lo tanto, se puede sugerir que la reducción en el tamaño de las gotas

puede haber ralentizado la desestabilización y que la presencia de glucosa y BS promovió la ruptura del aceite en gotas más pequeñas.

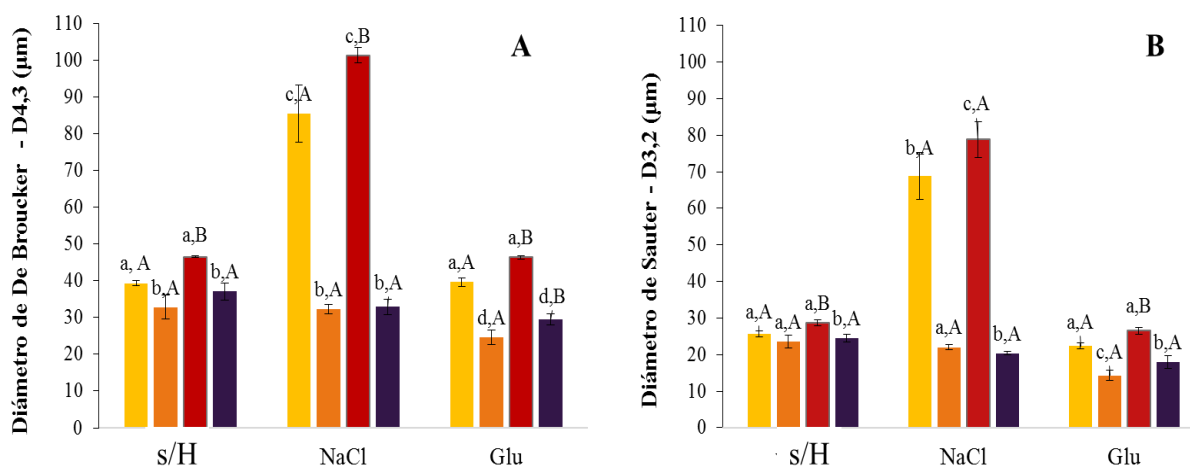


Figura II.9: Diámetros de gotas de emulsiones que contienen 10,0 % m/m de aceite de maíz y 0,15 % m/m de goma xántica en la fase acuosa. Diámetro de De Brouckere ($D_{4,3}$) (**Panel A**). Diámetro de Sauter ($D_{3,2}$) (**Panel B**). (■) Emulsiones sin BS luego de 1 hora de almacenamiento. (■) Emulsiones con 5,0 g/L de BS luego de 1 hora de almacenamiento. (■) Emulsiones sin BS luego de 24 horas de almacenamiento. (■) Emulsiones con 5,0 g/L de BS luego de 24 horas de almacenamiento. El grupo “s/H” sin sistemas sin agentes humectantes. El grupo “NaCl” son sistemas con 50 % m/m de NaCl. El grupo “Glu” son sistemas con 14,0 % m/m de glucosa. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre sistemas evaluados en el mismo tiempo. Las letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas para un mismo sistema, pero evaluados en el tiempo 1 y 24 horas ($p < 0,05$).

En cuanto al parámetro $D_{3,2}$, en el que las gotas más pequeñas tienen una mayor influencia, no se produjo una disminución significativa en el sistema sin humectantes ante la adición del BS. Sin embargo, al comparar los sistemas sin humectantes luego de 24 horas, puede observarse que la presencia del BS generó que el $D_{3,2}$ se mantenga estable, mientras que el que no tiene BS sufrió un aumento significativo. En base a esto puede plantearse que la adición de BS favoreció la estabilidad, ya que promovió que el tamaño de las gotas más pequeñas se mantenga estable luego de 24 horas de envejecimiento. Estos resultados son consistentes con el perfil de distribución discutido previamente (Fig. II.8) y pueden explicar el aumento en la estabilidad visual sugerido por $IE\%_{24}$ (Fig. II.7, Panel B). El valor $D_{3,2}$ de la emulsión que contiene NaCl fue el más alto, lo que significa que este humectante desfavorece la formación de pequeñas gotas en este tipo de emulsión. Para los sistemas con NaCl, la adición de BS redujo el valor $D_{3,2}$ a aproximadamente un tercio del obtenido en la emulsión sin BS (Fig. II.9, Panel B). En la emulsión con glucosa, la presencia de BS resultó en la

formación de gotas más pequeñas, lo que condujo a una disminución estadísticamente significativa tanto del $D_{3,2}$ como del $D_{4,3}$.

No hay otros estudios de distribución tamaño de gota para emulsiones estabilizadas por BS producidos por BAL.

II.3.3.4.4 Potencial Z

La repulsión entre las partículas que conforman una emulsión es un factor que influye en la estabilidad, el cual puede ser estimado mediante la determinación del potencial Z (Z_p). Cuanto mayor sea el Z_p , mayor será la probabilidad de que una suspensión permanezca estable, ya que las partículas cargadas se repelen entre ellas y, en consecuencia, pueden vencer la tendencia natural a agregarse (Benitez y Lozano, 2006). En la Tabla II.10 pueden observarse los valores de Z_p de las emulsiones formuladas. Las emulsiones presentaron valores de Z_p negativos, lo que caracteriza a las emulsiones con una estructura aniónica, otorgada principalmente por la presencia de goma xántica. Se observó que en todas las emulsiones la adición del BS generó valores de Z_p más negativos indicando que las mismas poseerían estructuras más estables. Aquellas emulsiones que poseen un Z_p cercano y menor a -30 mV, pueden reconocerse como estables, siendo las cercanas o menores a 60 mV aún más estables en términos electrostáticos (Serrano-Lotina et al., 2022). A partir de este fenómeno se puede plantear que el BS es un agente que aporta estabilidad a las emulsiones a nivel electrostático, ya que su incorporación en las emulsiones genera el desplazamiento del potencial Z_p hacia valores más negativos.

Tabla II.10: Potencial Z de las emulsiones a 1 h de la homogeneización.

Emulsiones	Potencial Z (mV)
Control	-18,74 $\pm$ 0,81 ^a
E-BS	-64,68 $\pm$ 1,44 ^b
E-NaCl	-34,20 $\pm$ 4,49 ^c
E-NaCl:BS	-41,84 $\pm$ 2,05 ^d
E-GLU	-22,53 $\pm$ 0,23 ^e
E-GLU:BS	-55,44 $\pm$ 2,29 ^f

Lo promedios cuyo superíndice poseen la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$). Control: emulsiones sin humectante y BS. E-BS: emulsiones sin humectante y que contienen 5,0 g/L de BS. E-NaCl: emulsiones con 5,0 % m/m de NaCl sin BS. E-NaCl:BS: emulsiones con 5,0% m/m de NaCl y 5,0 g/L de BS. E-GLU: emulsiones con 14,0 % m/m de glucosa y sin BS. E-GLU:BS: emulsiones con 14,0 % m/m de glucosa y con 5,0 g/L de BS.

II.3.3.4.5 Comportamiento reológico

Se realizó el barrido de flujo de las emulsiones y se evaluaron los cambios de la viscosidad en función de la velocidad de deformación presentándose los resultados en la Figura II.10 – Paneles A y B. Todas las curvas de flujo (Figura II.10 - Panel A) ajustaron al modelo de la Ley de la potencia (Ecuación 3.14), presentando todos los parámetros del modelo un buen ajuste Tabla II.11.

El índice de comportamiento (n) en todas las emulsiones fue menor a 1, por lo que puede determinarse que las emulsiones tuvieron un comportamiento pseudoplástico (Tabla II.11). Que un fluido sea pseudoplástico implica que sufre una disminución a la resistencia a fluir al aumentar el esfuerzo de corte debido a cambios estructurales, lo que se traduce en una disminución de la viscosidad al aumentar el esfuerzo de corte. Este comportamiento se puede observar claramente en la Figura II.10 – Panel B.

El índice de consistencia (“ K ”), presente en la Tabla II.11, se puede interpretar como un parámetro relacionado con la deformación, que depende de la temperatura y de la composición del sistema (Suárez-Domínguez et al., 2015). Con respecto a las fases acuosas, puede observarse que la adición del BS produce una leve pero significativa disminución en K , tanto para el sistema control, como para el sistema E-NaCl. Se observa por otro lado también, la disminución marcada de K al adicionar NaCl a la suspensión de goma xántica (Control). Zalazar et al. (2022) observaron la misma tendencia. Probablemente, el NaCl interfiera en la formación de zonas de unión entre cadenas de goma xántica. En cuanto a las emulsiones, se observa que la incorporación del BS a la fase acuosa con goma xántica, genera un aumento en la consistencia de la emulsión. Sin embargo, en aquellas emulsiones que contienen los agentes humectantes, la incorporación del BS generó una disminución en el K , por lo que la incorporación del BS no sería un factor que genera un aumento en la consistencia en estos casos.

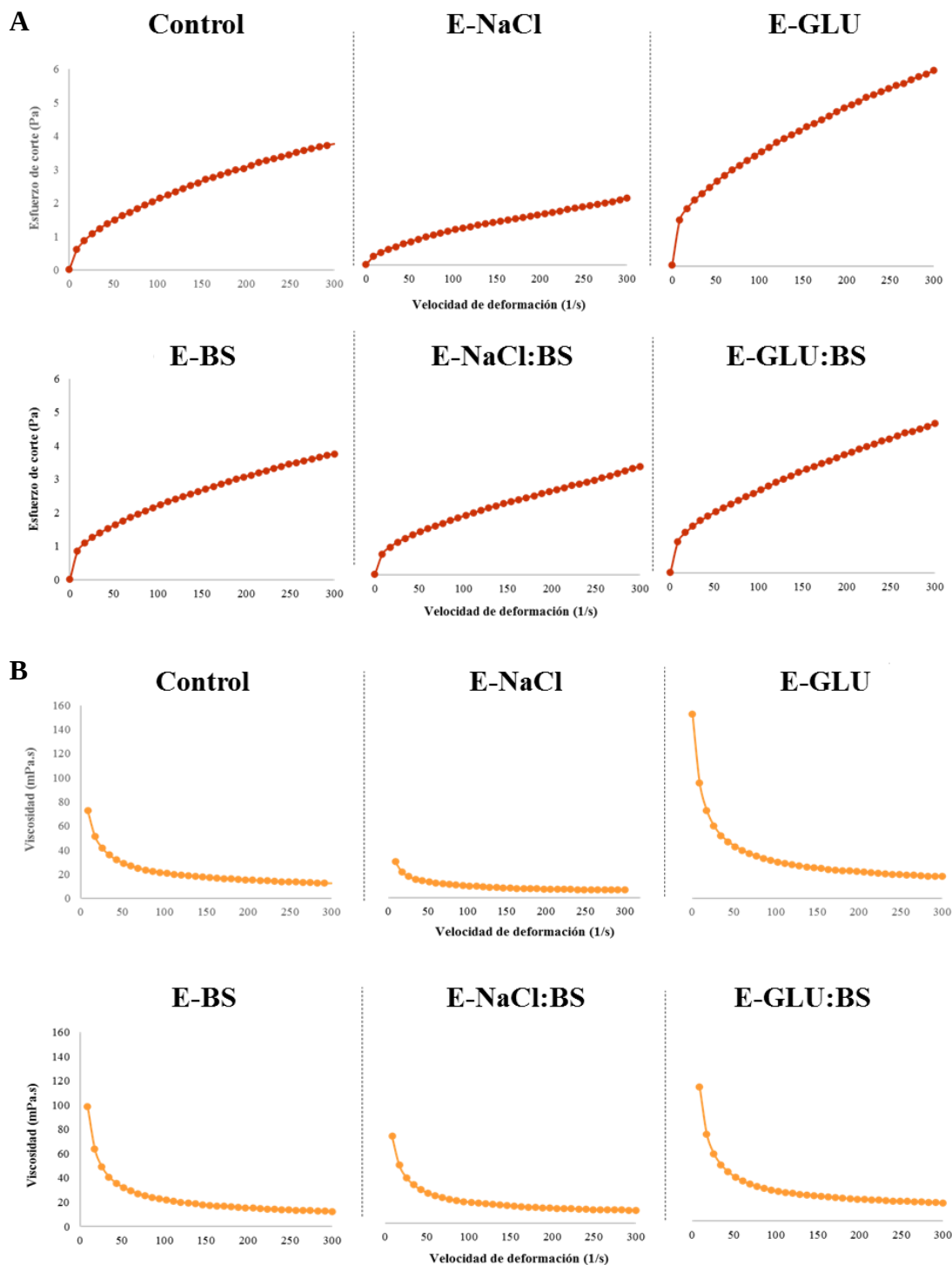


Figura II.10: Comportamiento reológico de emulsiones conteniendo humectantes a 25 °C. Barridos de flujo (**Panel A**). Cambio de viscosidad en el tiempo (**Panel B**). Control: emulsiones sin humectante y BS. E-BS: emulsiones sin humectante y que contienen 5,0 g/L de BS. E-NaCl: emulsiones con 5,0 % m/m de NaCl sin BS. E-NaCl:BS: emulsiones con 5,0% m/m de NaCl y 5,0 g/L de BS. E-GLU: emulsiones con 14,0 % m/m de glucosa y sin BS. E-GLU:BS: emulsiones con 14,0 % m/m de glucosa y con 5,0 g/L de BS.

Tabla II.11: Índice de consistencia (K), índice de comportamiento (n) y viscosidad promedio de las fases acuosas y de las emulsiones formuladas a 25 °C.

	K (Pa.s ⁿ⁻¹)	n	Viscosidad promedio (mPa.s)
Fases acuosas			
BS	$2.10^{-5} \pm 7.10^{-6}^a$	$0,99 \pm 0,01^a$	$1,1 \pm 0,1^a$
Control	$0,03 \pm 4,15.10^{-4}^b$	$0,48 \pm 0,01^b$	$11,6 \pm 0,5^b$
E-BS	$0,02 \pm 8,70.10^{-4}^c$	$0,51 \pm 0,01^b$	$10,8 \pm 0,2^b$
E-NaCl	$6,50.10^{-4} \pm 2,40.10^{-4}^d$	$0,87 \pm 0,02^c$	$5,8 \pm 0,8^c$
E-NaCl:BS	$1,95.10^{-4} \pm 6,40.10^{-5}^a$	$0,81 \pm 0,02^d$	$3,1 \pm 0,2^d$
E-GLU	$0,01 \pm 8,60.10^{-4}^e$	$0,59 \pm 0,01^e$	$13,2 \pm 0,2^e$
E-GLU:BS	$0,01 \pm 2,80.10^{-5}^e$	$0,63 \pm 0,01^e$	$11,2 \pm 0,3^b$
Emulsiones			
Control	$0,17 \pm 0,01^a$	$0,54 \pm 0,02^a$	$13,2 \pm 0,5^a$
E-BS	$0,31 \pm 0,01^b$	$0,43 \pm 0,03^b$	$13,3 \pm 0,5^a$
E-NaCl	$0,17 \pm 0,01^a$	$0,53 \pm 0,04^a$	$6,7 \pm 0,2^b$
E-NaCl:BS	$0,08 \pm 0,01^c$	$0,57 \pm 0,05^a$	$11,2 \pm 0,3^c$
E-GLU	$0,41 \pm 0,01^d$	$0,43 \pm 0,03^b$	$19,3 \pm 0,6^d$
E-GLU:BS	$0,22 \pm 0,02^e$	$0,49 \pm 0,01^{ab}$	$15,3 \pm 0,4^e$

Los promedios cuyo superíndice posee la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$). BS: solución de BS 5g/L. Control: emulsiones sin humectante y BS. E-BS: emulsiones sin humectante y que contienen 5,0 g/L de BS. E-NaCl: emulsiones con 5,0 % m/m de NaCl sin BS. E-NaCl:BS: emulsiones con 5,0% m/m de NaCl y 5,0 g/L de BS. E-GLU: emulsiones con 14,0 % m/m de glucosa y sin BS. E-GLU:BS: emulsiones con 14,0 % m/m de glucosa y con 5,0 g/L de BS.

Los valores de viscosidad promedio pueden observarse en la Tabla II.11. En las fases acuosas y en las emulsiones se observó que la incorporación del BS a la emulsión que posee sólo goma xántica, no generó cambios en la viscosidad. El agregado de NaCl a la emulsión control generó una disminución de la viscosidad a la mitad, aproximadamente, siendo la emulsión E-NaCl la que mostró la menor viscosidad por lo que puede plantearse que la adición del NaCl fue un factor influyente en la disminución de la viscosidad. La disminución de la viscosidad al incorporar el NaCl también pudo observarse en las fases acuosas, ya que su incorporación disminuyó la viscosidad de la solución de goma xántica de 11,6 a 5,8 mPa.s. De alguna manera, esto indicaría que la incorporación del NaCl dificulta el acomodamiento de las moléculas de goma xántica en el agua impidiendo que genere su efecto espesante. Esta disminución de la viscosidad, puede ser parte de lo que causa la disminución de la estabilidad en la emulsión E-NaCl, ya que los espesantes, como la goma xántica, aumentan la estabilidad de las emulsiones al disminuir el movimiento de las gotas en la fase continua por aumento

de su viscosidad. También, se observa que cuando a la fase acuosa de la emulsión E-NaCl, se le incorporó el BS la viscosidad de esta solución disminuyó a 3,1 mPa.s. Sin embargo, cuando la fase acuosa de la emulsión E-NaCl:BS se utilizó para formular una emulsión, la viscosidad de esta aumentó hasta 11,2 mPa.s, aumentando casi al doble respecto de la viscosidad de la emulsión E-NaCl. Como se observó en la Figura II.8, la emulsión E-NaCl:BS tuvo gotas más pequeñas que la emulsión E-NaCl, esto puede explicar el aumento de la viscosidad ya que la formación de gotas pequeñas en una emulsión aumenta su estructura, lo que genera el aumento de la viscosidad (Ramirez et al., 2002).

La incorporación de glucosa a la fase acuosa generó un aumento de la viscosidad de 11,6 a 13,2 mPa.s, sin embargo, la adición del BS generó que esta disminuya hasta 11,2 mPa.s, valor similar a la fase acuosa sin agentes humectantes. Este comportamiento también se observó en las emulsiones con glucosa, al disminuir la viscosidad de la emulsión E-GLU de 19,3 a 15,3 mPa.s. A pesar de esta disminución el valor de la viscosidad de E-GLU:BS fue mayor que el de la emulsión E-BS, por lo que la glucosa es un ingrediente que aumentó la viscosidad de la emulsión.

A partir de lo observado puede plantearse que, en las emulsiones, el BS no fue un factor que aportó a la estabilización de las emulsiones a través de un mecanismo de aumento de viscosidad en la fase acuosa. Sino que, como se observó en la Figura II.10 y en la Tabla II.11, las propiedades del BS que aportarían a la estabilización de las gotas es su capacidad tensioactiva, que favorece a la formación de gotas de aceite de menor tamaño, y que produce la disminución del Z_p al incrementar la repulsión electroestática.

II.3.3.4 Aplicación como agente de control microbiano: actividad antimicrobiana y actividad antibiofilm

Se estudió el efecto del del BS producido por *L. plantarum* Tw226 en concentraciones 5,0, 10,0, 20,0 y 40 mg/mL sobre el crecimiento de *E. coli*, mediante la técnica de microdilución en caldo y seguimiento a través de la absorbancia a 600 nm durante 24 horas. No se evidenció un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli* en ninguna de las concentraciones evaluadas, a pesar de los resultados obtenidos anteriormente en la Fig. I.7, donde se había

determinado una cierta actividad inhibitoria mediante la técnica de difusión en agar. Tampoco se observó que el BS ejerciera actividad inhibitoria sobre la formación de biofilm.

Por lo tanto, podemos confirmar que el BS producido por la cepa Tw226, no se destaca por su funcionalidad como agente de control del crecimiento de *E. coli*. Sin embargo, en base a los resultados observados previamente si es de interés continuar evaluando su aplicación como agente emulsificante.

II.3.3.5 Aplicación como estabilizante de emulsiones de aceites esenciales en agua

II.3.3.5.1 Actividad antimicrobiana de aceite esencial de corteza de canela

En búsqueda de formular una emulsión con actividad antimicrobiana, se evaluó el efecto del aceite de corteza de canela (*Cinnamomum verum*) frente a *L. innocua*. El ensayo de difusión en agar mostró que este aceite presentó actividad para inhibir el crecimiento de *L. innocua* generando un halo de $26,5 \pm 2,0$ mm. Por otro lado, González et al. (2021) informaron que el mismo aceite presenta actividad frente a *Z. bailii*, generando un el halo de inhibición de $41,5 \pm 0,7$ mm. En base a lo comentado, se puede considerar al aceite de corteza de canela como un agente antimicrobiano prometedor para ser aplicado frente a *L. innocua* y *Z. bailii*.

Los aceites esenciales son compuestos naturales conocidos por su actividad antimicrobiana y antioxidante. Sin embargo, al ser hidrófobos, presentan problemas de solubilidad y, además, se requieren altas concentraciones para que su actividad biológica se detecte en un alimento, observándose, como consecuencia, un impacto negativo sobre las características sensoriales. Una estrategia para evitar este problema es utilizarlos encapsulados en emulsiones. Para la formación de estas es necesaria la incorporación de un agente emulsionante, empleándose, mayoritariamente, agentes sintéticos como el Tween®. Esto conlleva a que en las formulaciones se reduzca el porcentaje de compuestos de origen natural, siendo algo indeseable por los consumidores actuales. En base a esto, un BS producido por BAL surge como una alternativa natural para la estabilización de emulsiones de agentes esenciales. Por lo tanto, se evaluó la capacidad del BS producido por *L. plantarum* Tw226 para estabilizar emulsiones con actividad antimicrobiana a base de aceite esencial de corteza de canela.

II.3.3.5.2 Análisis del tamaño de gota de las emulsiones de aceites esenciales de corteza de canela

Como se mencionó anteriormente una de las posibilidades para utilizar los aceites esenciales es a través de su incorporación en sistemas emulsionados. Por este motivo, se realizaron emulsiones con aceite esencial de corteza de canela, estabilizadas con el BS, y con combinación de Tween® 80 con BS según lo indicado en la sección Materiales y Métodos particulares “II.2.3.2”.

A las emulsiones se les midió el tamaño de gota utilizando DLS. En base a los promedios de la distribución de tamaño de gota (*Z-average*), las emulsiones C:T1, C:T2, C:T3 y C:BS:T, siendo las tres primeras estabilizadas solamente con Tween® 80 en concentración decreciente y la última, con una mezcla de Tween® 80 y BS en proporciones iguales, pueden clasificarse como nanoemulsiones de aceite en agua debido a que su diámetro de partícula es menor a 200 nm (McClements y Rao, 2011). Sin embargo, la emulsión C:BS, en la cual se utilizó solamente BS como emulsificante, se clasificó como una emulsión aceite en agua debido a que posee un diámetro de partícula promedio mayor a 200 nm. En la Figura II.11 pueden observarse los cambios en el *Z – average* y la polidispersidad de las emulsiones durante 8 semanas de almacenamiento a 25 °C.

En la Figura II.11 – Panel A puede observarse una tendencia a que el *Z-average* disminuya al aumentar la concentración de Tween® 80, habiendo una correlación significativa inversa entre estas dos variables según el coeficiente de correlación de Pearson ($r = -0,978$). Este comportamiento se debe a que, al aumentar la concentración de surfactante, la tensión superficial entre el aceite esencial de canela y el agua disminuye, permitiendo la formación de gotas pequeñas (Bouchemal et al., 2004). De estas emulsiones, la que se mantuvo con menores cambios en el tiempo fue C:T2, sin presentar diferencias significativas entre los valores de *Z-average* entre semanas ($p < 0,05$), a excepción de la semana 2, en la que fue ligeramente mayor al resto de las semanas.

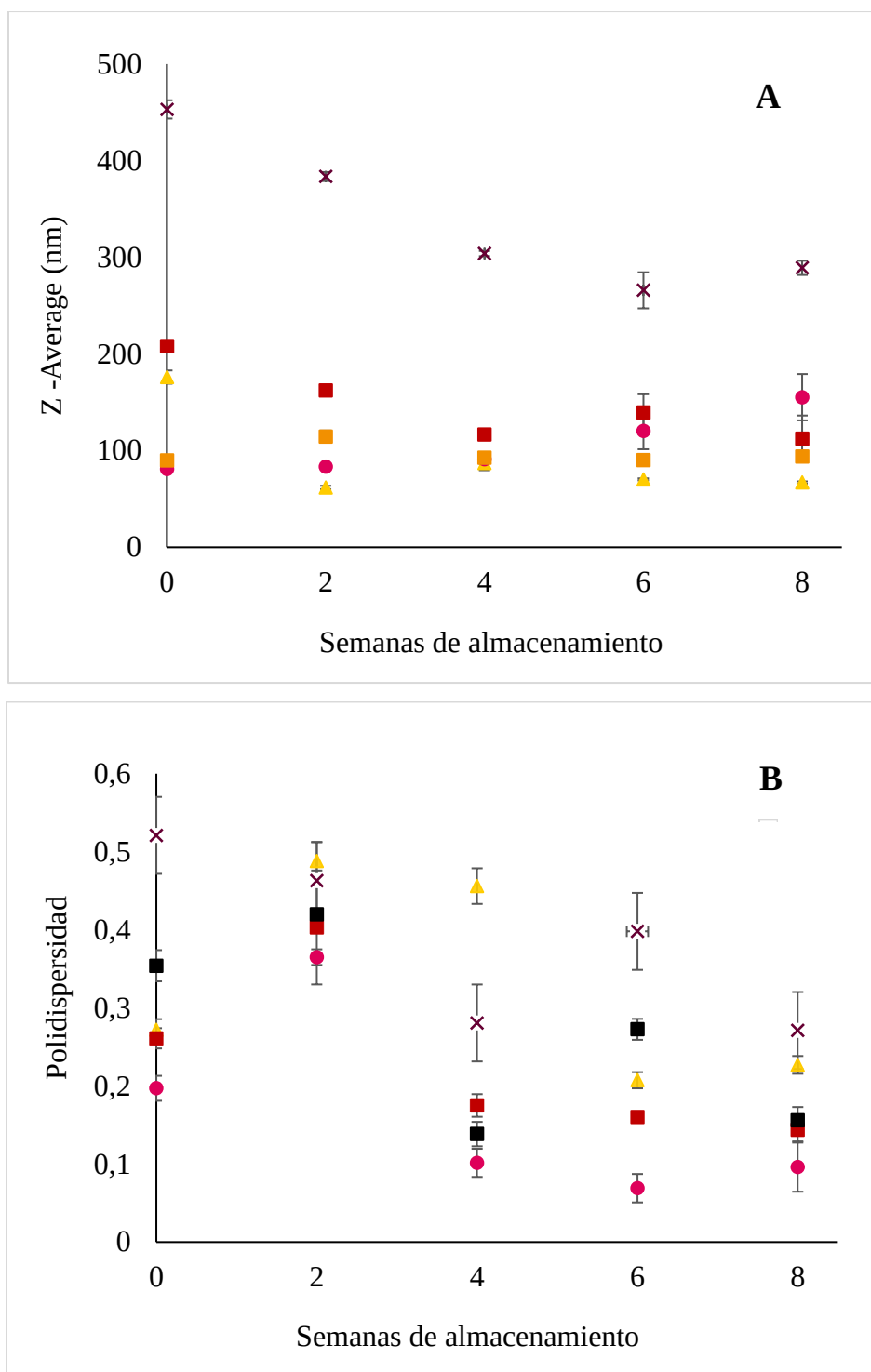


Figura II.11: Evolución del Z-average (**Panel A**) y de la polidispersidad (**Panel B**) de las emulsiones formuladas durante ocho semanas de almacenamiento a 25 °C. Emulsión C:BS:T (▲). Emulsión C:T1 (●). Emulsión C:T2 (■). Emulsión C:T3 (■). Emulsión C:BS (×).

En las emulsiones C:BS, C:BS:T y C:T3 se observó una tendencia a la disminución del *Z-average* hasta la semana 4, luego de esa semana comienza a permanecer estable. Hashtjin y Abbasi (2015), reportaron que una nanoemulsión elaborada a base de aceite esencial de naranja y almacenada a 25 °C, presentó una disminución del *Z-average* hasta la semana 4, para luego permanecer estable o aumentar. Los autores indicaron que este fenómeno podía ocurrir por una disminución gradual de la barrera que ejerce la energía cinética hasta alcanzar un estado de equilibrio cinético. En los sistemas que incluyen aceite, agua y surfactante a temperatura ambiente, existe una barrera de energía cinética que impide que estos sistemas alcancen el estado de equilibrio cinético más alto (Rao y McClements, 2011). La reducción de esta barrera con el tiempo probablemente mejora el equilibrio cinético del sistema. Una tendencia similar fue observada en nanoemulsiones de aceite esencial de lemongrass y de canela estabilizadas con Tween® 80 por González et al. (2021).

Por otro lado, en la emulsión C:T1 se observó un aumento estadísticamente significativo ($p > 0,05$) en el tamaño de partícula en el tiempo ($r = 0,927$). Esto podría deberse a que el mecanismo de desestabilización es diferente al mencionado para las emulsiones anteriores. Un problema básico de las nanoemulsiones es la maduración de Ostwald, debido a que los componentes de los aceites esenciales poseen una alta solubilidad en agua comparado con los triglicéridos de cadena media o larga (Rao y McClements., 2011). La solubilidad de estos componentes genera la disminución del tamaño de gota y la migración de estos hacia gotas de mayor tamaño (Kaur et al, 2021), generando la desaparición de las gotas más pequeñas y la aparición de gotas más grandes, lo que resulta en un aumento del *Z-average*.

La combinación de BS y Tween® 80 en la emulsión C:BS:T permitió que el *Z-average* de las gotas sea significativamente menor ($p < 0,05$) o que presente tamaños de gotas similares ($p > 0,05$) a lo largo del tiempo (a excepción del tiempo inicial de formación) que la emulsión C:T1 que posee la máxima concentración de Tween® 80. Esto es destacable debido a que la mezcla de BS con Tween® 80 permitió obtener una emulsión con tamaño de gota similar a la emulsión con mayor concentración de Tween 80, de esta manera se estaría reduciendo la concentración de este surfactante sintético a la mitad.

La información sobre emulsiones de aceites esenciales estabilizadas por BS producidos por BAL es escasa, y la que se encuentra está enfocada principalmente a la industria cosmética.

En un trabajo realizado por Vecino et al. (2015) evaluaron la capacidad de un BS producido por *L. pentosus* para estabilizar una emulsión de aceite esencial de romero en agua y obtuvieron una emulsión con tamaño de partícula $< 100 \mu\text{m}$ y estable durante 24 horas. También probaron el uso de un BS producido por *L. paracesei* para estabilizar emulsiones de aceite esencial de jojoba, almendra, romero y germen de cereal en agua e informaron que la estabilidad de la emulsión posee una dependencia con el aceite utilizado (Vecino et al., 2016). El mismo BS, luego fue utilizado por Ferreira et al. (2017) para la elaboración de un producto cosmético, siendo capaz de estabilizar emulsiones de aceite en agua en una proporción de aceite a surfactante de 1:3 con una concentración de BS de 1,0 y 10,0 g/L, alcanzando tamaños de gota de la emulsión de 10,1 y 19,2 nm, respectivamente. Por lo tanto, se puede plantear que los datos obtenidos para el BS producido por *L. plantarum* Tw226 son innovadores para esta área de investigación, abriendo una puerta para el estudio de emulsiones de aceites esenciales estabilizadas con BS con posible aplicación a alimentos. También, en base a la información registrada por Ferreira et al. (2017) y Vecino et al. (2016) podría indicar que la optimización de la formulación y el uso de diferentes aceites esenciales podría llevar a la formación de emulsiones con gotas más pequeñas.

II.3.3.5.3 Evaluación de la estabilidad de emulsiones de aceites esenciales por turbidimetría

La estabilidad de estas emulsiones se evaluó a partir del análisis de la evolución de la turbidez, relacionado directamente con el backscattering, en el tiempo, utilizando el equipo Turbiscan®. Los resultados pueden observarse en la Figura II.12 – Paneles A y B.

Los resultados de la emulsión C:BS:T, estabilizada con una mezcla de BS y Tween® 80, están presentes en la Figura II.12 - Panel A. En este caso, se observó un aumento del backscattering al pasar el tiempo entre los 0 y 500 μm , lo que puede indicar la desestabilización de la emulsión por cremado, producido por la migración de las gotas a la superficie. Al mismo tiempo se observó una leve disminución del backscattering entre los 500 y 5000 μm , lo cual se explica por una disminución de la concentración de las gotas en esa fracción del sistema debido a la migración de las gotas a la fracción superior por cremado (Mengual et al., 1999).

En la Figura II.12 - Panel B, se encuentra el gráfico de la evolución del backscattering de la emulsión C:BS en el tiempo, la cual está estabilizada utilizando solamente BS. En esta

emulsión se observó que en el tope y en la base hay mayor turbidez, lo que podría indicar que hay una mayor concentración de gotas en esas regiones. Al envejecer, se produjo un aumento uniforme del backscattering en todo el sistema.

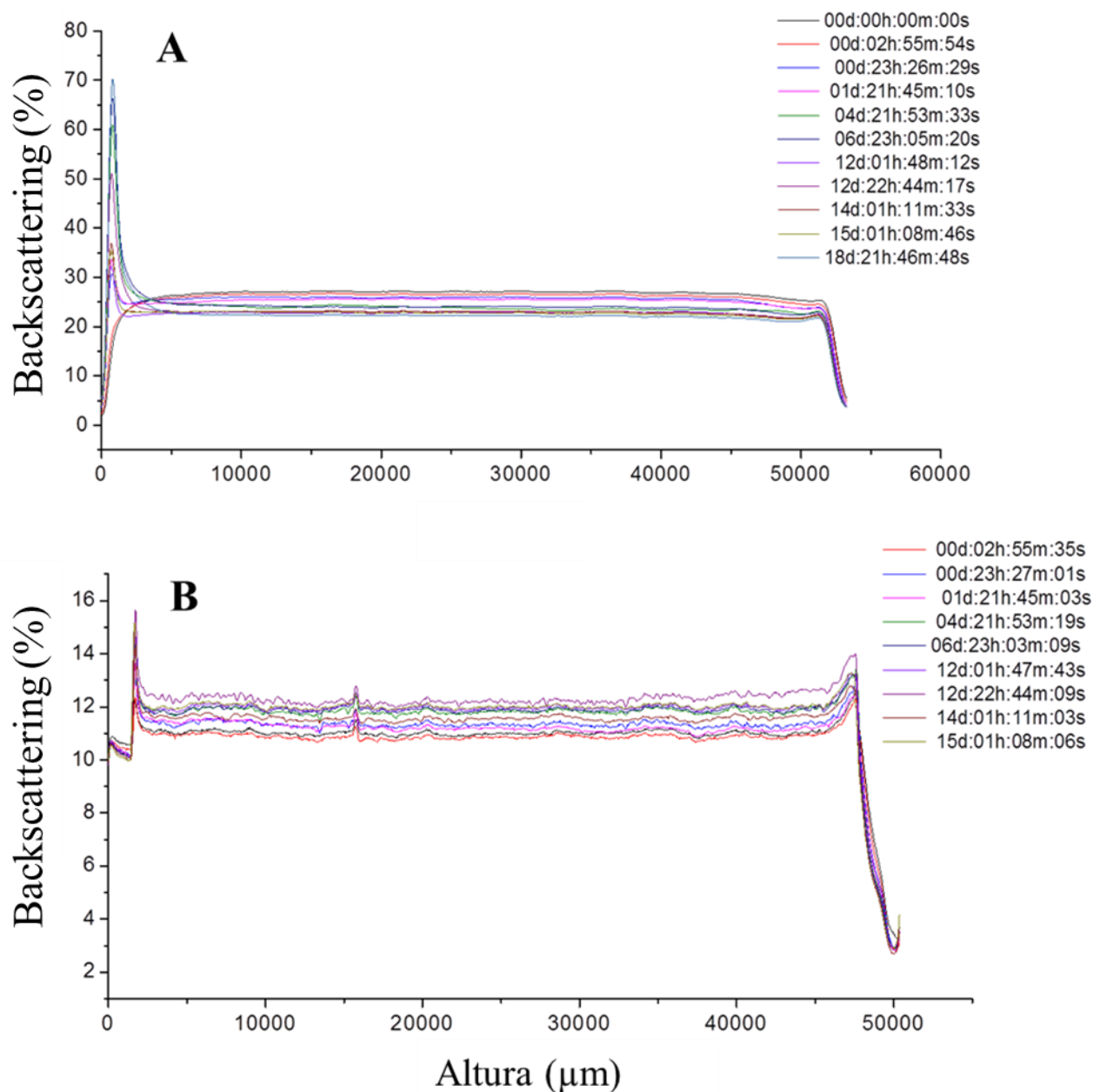


Figura II.12: Back Scattering (%) de la emulsión C:BS:T en las distintas porciones que la conforma al envejecer a 25 °C (**Panel A**). Back Scattering (%) de la emulsión C:BS en las distintas porciones que la conforma al envejecer (**Panel B**).

También se evaluó el TSI, parámetro basado en la intensidad del backscattering y la transmitancia, que se relaciona con la estabilidad de las emulsiones (Xu et al., 2016). El valor de TSI va de 0 a 100, cuanto mayor es el valor de TSI, menor será la estabilidad del sistema (Galvão et al., 2022). En la Figura II.13 se observa que el TSI de las emulsiones C:BS permaneció constante en el tiempo con un valor menor que el TSI de la emulsión C:T2 (estabilizada solo con Tween® 80) y que la emulsión C:BS:T. Por lo que se determina que la emulsión C:BS posee una mayor estabilidad a lo largo del tiempo, seguida por las emulsiones C:T2 y C:BS:T. Esto concuerda con lo observado en la Figura II.11 – Panel A, en donde se observa que al transcurrir el tiempo de almacenamiento la emulsión no presentó los cambios en el backscattering normalmente asociados a los fenómenos de desestabilización de emulsiones.

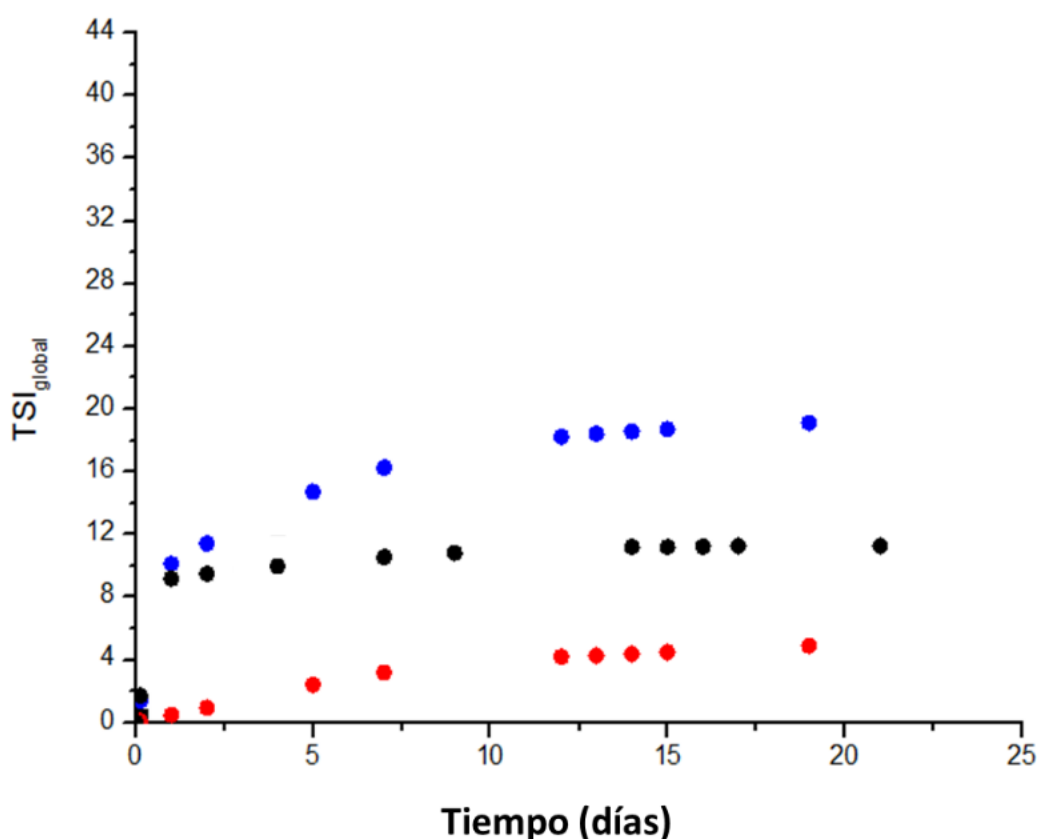


Figura II.13: TSI en función del tiempo. Emulsión C:BS (●), emulsión C:T2 (●) y emulsión C:BS:T (●).

II.3.3.5.4 Caracterización de la emulsión de aceite esencial de corteza de canela por microscopía confocal de barrido

Para observar la morfología de la emulsión de aceite esencial de corteza de canela estabilizada con el BS producido por la cepa *L. plantarum* Tw226, se utilizó microscopía confocal de barrido. A partir de esta técnica se obtuvo la imagen presente en la Figura II.14.

Como puede observarse en la Figura II.14 el colorante Azul Nilo se dispuso alrededor de partículas de forma circular dispersas en el seno de la emulsión. El colorante Azul Nilo es capaz de teñir polisacáridos y proteínas, siendo importante recordar que dentro de la naturaleza química del BS se encuentran este tipo de macromoléculas (Figuras II.2 y II.3). Por lo tanto, se puede afirmar que el Azul Nilo pudo haber teñido las moléculas de BS y que, efectivamente, el BS se dispuso en la interfase de agua (fondo negro) y aceite. También, la Figura II.14 muestra que la emulsión C:BS contiene gotas de diferentes tamaños, por lo que es una emulsión polidispersa, como se observó anteriormente en el análisis de la distribución de tamaño de partícula a través del span (Figura II.11).

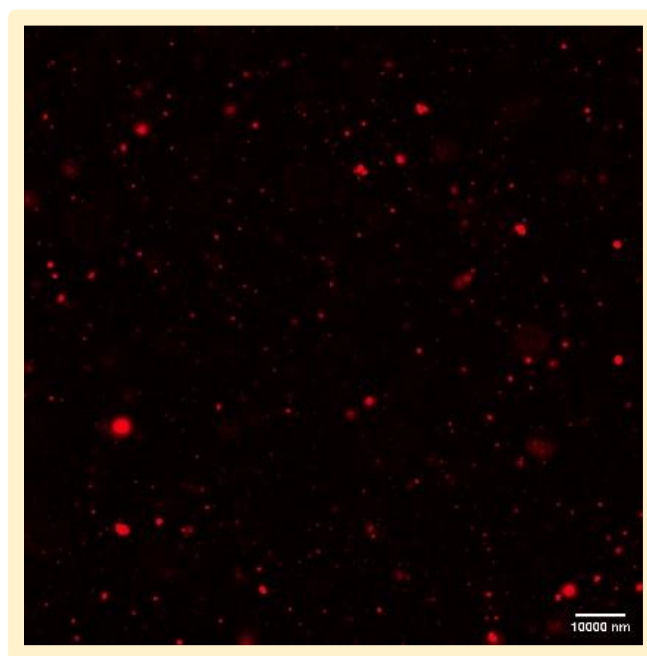


Figura II.14: Imagen de la emulsión C:BS por microscopía confocal de barrido.

También se tomaron imágenes de las emulsiones C:BS:T y C:T2, sin embargo, no se muestran en este trabajo. En la emulsión C:BS:T la mayoría de las gotas tuvieron un tamaño

que está en el límite de detección del equipo siendo difícil de observar la fluorescencia alrededor de las gotas. Por otro lado, en las imágenes de C:T2, al no haber compuestos que se logren teñir con el Azul Nilo, sólo se observó un fondo negro.

Estas imágenes confirman la capacidad que posee el BS, producido por *L. plantarum* Tw226, para disponerse en la interfase o/w y, de esta manera, acomodarse alrededor de las gotas de aceite de una emulsión.

II.3.3.5.5 Actividad antioxidante de las emulsiones de aceite de corteza de canela

Los resultados de la actividad antioxidante de las emulsiones y soluciones de agentes tensioactivos pueden observarse en la Tabla II.12. Las emulsiones formuladas con aceite de corteza de canela tuvieron actividad antioxidante, mientras que los agentes tensioactivos no. A partir de estos resultados es posible plantear que la actividad antioxidante de las emulsiones está dada por la acción del aceite esencial.

Tabla II.12: % RSA y Z-average de soluciones de 5000 ppm de BS, de 2500 ppm de Tween® 80 (TW) y de las emulsiones C:BS, C:BS:T y C:T2.

	% RSA	Z- Average (nm)
BS	0	-
TW	0	-
C:BS	46,3 ± 4,8 ^a	303,9 ± 4,68 ^a
C:BS:T	58,9 ± 3,9 ^b	87,2 ± 7,33 ^b
C:T2	61,6 ± 2,5 ^b	92,6 ± 0,87 ^b

Lo promedios cuyo superíndice poseen la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$).

Se observó una disminución en la actividad antioxidante de la emulsión C:BS con respecto a la actividad antioxidante de las emulsiones C:BS:T y C:T2. En base a que el BS y el Tween® 80 no poseen actividad antioxidante, podría suponerse que en este caso la diferencia en la actividad antioxidante se debe a la diferencia en el tamaño de las gotas que conforman las emulsiones. La actividad antioxidante de un agente en una emulsión o/w depende de su polaridad y de la actividad superficial, debido a que cuanto más sea capaz de disponerse en la interfase aceite agua, mayor será su actividad antioxidante (Decker et al., 2000). En el caso de una emulsión aceite agua, en la que la fase oleosa es un aceite esencial, los agentes antioxidantes se encontrarán dentro de las gotas de la emulsión. En este caso, se podría

plantear que al aumentar la superficie de la interfase aceite en agua, lo que se logra al disminuir el tamaño de las gotas, los agentes antioxidantes estarían más disponibles para ejercer su actividad.

En la emulsión C:BS:T no hay diferencias significativas en el % RSA con respecto a la emulsión C:T2. Esto es destacable, debido a que el uso de la combinación BS y Tween® 80 como emulsificante, permitiría la disminución de la concentración de Tween® 80 a la mitad, sin perjudicar la actividad antioxidante de la emulsión.

II.3.3.5.6 Actividad antimicrobiana de las emulsiones de aceite de corteza de canela

Se determinó las MIC de las emulsiones C:BS, C:BS:T y C:T2 frente a *Z. bailii* y *L. innocua*. La MIC frente a *Z. bailii* fue 140 ppm, independientemente del agente emulsionante utilizado. González et al. (2021) informaron que la MIC para una emulsión de aceite esencial de corteza de canela, estabilizada por Tween® 80, frente a *Z. bailii*, fue de 156,3 ppm. Es interesante que, a pesar de los distintos agentes emulsificantes y la diferencia en los tamaños de gota que presentan las distintas emulsiones, no hay cambios en el valor de la MIC. Esto también concuerda con el trabajo de González et al. (2021), en el cual se informó el tamaño de gota no generaba cambios en el valor de la MIC y que el Tween® 80 no inhibía el crecimiento de *Z. bailii*.

Por otro lado, la MIC frente a *L. innocua* fue 562,5 ppm para las emulsiones C:BS y C:BS:T y de 281,3 ppm para la emulsión C:T2. Este último valor de MIC concuerda con precedentes en bibliografía que informan que para una emulsión de aceite de corteza de canela estabilizada con Tween® 80 frente a *L. innocua* la MIC es de 315 ppm (Thrin et al., 2015). En este caso, sí se observaron cambios en la MIC de acuerdo con el agente emulsificante utilizado, aparentando que se requieren mayores concentraciones para inhibir el crecimiento de *L. innocua* al incorporarse el BS como estabilizante de la emulsión. Podría plantearse que esto se debe a la diferencia de tamaño de gota entre las emulsiones, siendo que la emulsión C:T2 tuvo el menor tamaño de gota, esto generaría un aumento del área de contacto entre el microorganismo y el aceite esencial. Sin embargo, los *Z-average* de las gotas de C:T2 y C:BS:T no difieren significativamente de acuerdo con los resultados observados en la Figura II.11, por lo que se descartaría la explicación anteriormente planteada como la más certera.

En base a estos resultados, se puede establecer que la emulsión formulada con aceite de corteza de canela y el BS producido por *L. plantarum* Tw226 podría ser utilizada como agente de control microbiológico.

II.4 Conclusiones

A partir de los análisis realizados al BS producido por *Lactiplantibacillus plantarum* Tw226 pudo determinarse que:

- Presentó características químicas propias de glicolipopolipéptido, siendo predominante la fracción proteica.
- No fue soluble en condiciones de pH menores a 5,00.
- Presentó estabilidad en su actividad como tensioactivo entre pH 5,00 y 7,00.
- Fue útil para estabilizar emulsiones de aceite de maíz en agua, que pueden contener con agentes humectantes glucosa o NaCl a pH 6,00.
- Su actividad emulsificante proviene primeramente de la capacidad de incorporarse en la interfase aceite agua, disminuir la tensión superficial y el Z_p .
- No presentó actividad antimicrobiana frente a *E. coli* en medio líquido ni tampoco capacidad para inhibir la formación de biofilm en concentraciones entre 5,0 y 40 mg/mL.
- Fue capaz de estabilizar emulsiones con aceites esenciales de corteza de canela como único agente emulsificante.

La emulsión de aceite de corteza de canela estabilizada con una combinación del BS producido por *Lactiplantibacillus plantarum* Tw226 y Tween® 80 en igual proporción:

- Tuvo tamaños de gota menores o iguales a la emulsión que contenía la mayor concentración de Tween® 80.
- Mantuvieron iguales propiedades antioxidantes que la emulsión que contenía solamente Tween® 80 como agente emulsificante.
- Presentaron actividad antimicrobiana frente a *L. inocula* y *Z. baili* siendo las MIC de las emulsiones 562,5 y 156 ppm, respectivamente.
- Presentó condiciones para ser utilizada como único emulsificante, en reemplazo de Tween® 80, permitiendo la reducción de la concentración de este a la mitad.

La emulsión de aceite de corteza de canela estabilizada solamente con BS producido por *Lactiplantibacillus plantarum* Tw226 :

- Presentó los mayores niveles de estabilidad, según el “Índice Turbiscan”.
- Presentó actividad antioxidante.
- Presentó actividad antimicrobiana frente a *L. inocula* y *Z. bailii* siendo las MIC de las emulsiones 562,5 y 156 ppm, respectivamente.

Por lo tanto:

El BS producido por *Lactiplantibacillus plantarum* Tw226 presentó una naturaleza glicolipopeptídica; pudo ser utilizado para la estabilización de emulsiones a pH entre 5,00 y 7,00 que contenían glucosa o NaCl como agentes humectantes; también fue útil para estabilizar emulsiones de aceite esencial de canela como único agente emulsificante o en combinación con Tween® 80.

Capítulo 3

Capítulo III: Producción del biosurfactante en medios de cultivo alternativos

III.1 Objetivo particular del capítulo

- Evaluar el uso de jugo de yacón solo o combinado con diferentes proporciones de caldo MRS como medios de cultivo alternativos para el crecimiento de *L. plantarum* Tw226 y para la producción del BS
- Analizar el efecto del uso de jugo de yacón solo o combinado con diferentes proporciones de caldo MRS como medios de cultivo alternativos sobre la composición química del BS obtenido.
- Estudiar el efecto de distintas condiciones de aireación sobre el crecimiento de *L. plantarum* Tw226 y la producción del BS
- Analizar el efecto de un aumento en la escala de trabajo sobre la producción del BS en las condiciones de aireación previamente seleccionadas.

III.2. Metodologías específicas

En la Figura III. se muestra un diagrama de flujo de las etapas de trabajo y metodologías aplicadas en este capítulo

III.2.1. Elaboración del jugo de yacón

Se trabajó con tubérculos, libres de pesticidas, provenientes de la Comunidad Los Chorrillos, Jujuy, Argentina. Al ingreso al laboratorio, se higienizaron mediante lavado con agua corriente, cepillado para retirar excesos de tierra e inmersión en agua clorinada (200 ppm) durante 5 minutos. Luego, se pelaron y cortaron en cubos de 1 cm³ y se sumergieron en una solución de ácido cítrico 2,5 % m/v durante 5 minutos para reducir el pardeamiento enzimático. Finalmente, los cubos se escaldaron con vapor por 5 minutos, se enfriaron y se les extrajo el jugo con una juguera centrífuga comercial. Para clarificar el jugo se realizaron dos centrifugaciones consecutivas a 10000 rpm durante 15 minutos.

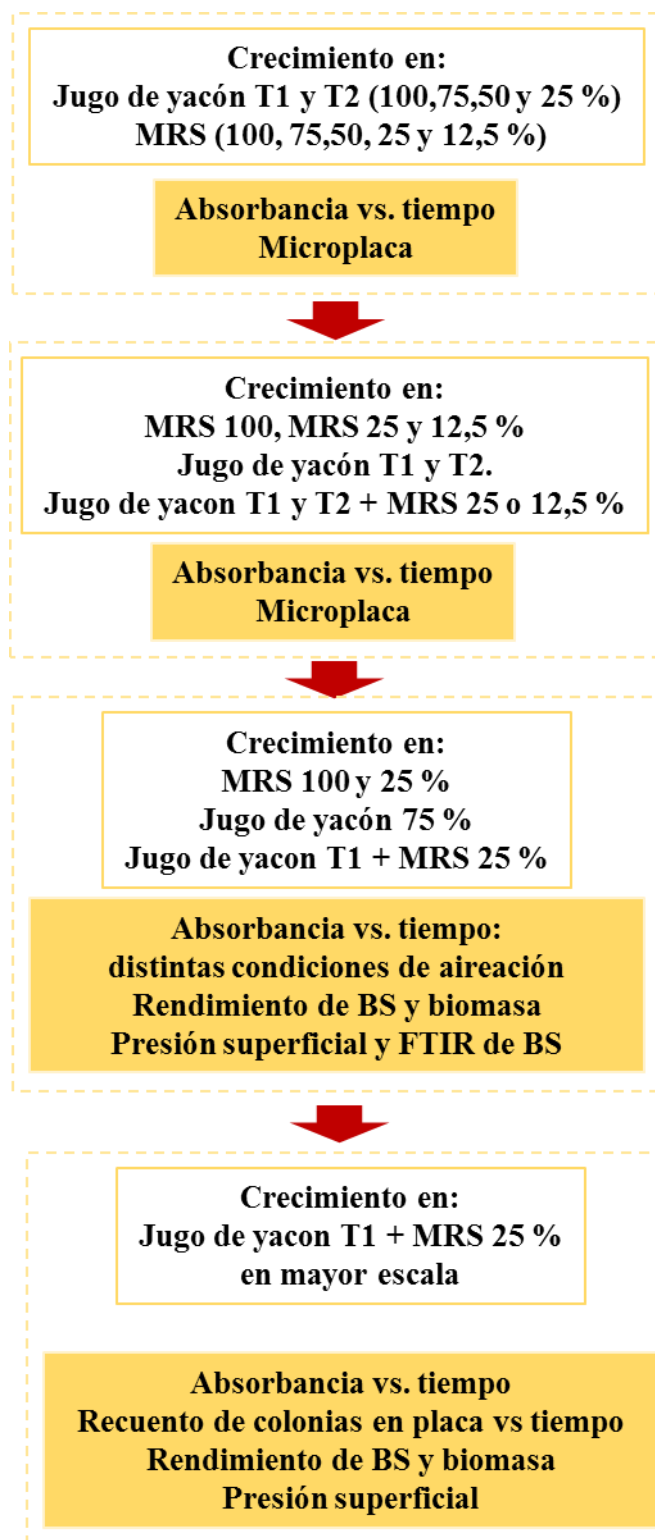


Figura III: Diagrama de las etapas de trabajo desarrolladas en el Capítulo 3.

III.2.2 Efecto de la concentración del jugo de yacón y del caldo MRS sobre el crecimiento de la cepa productora del biosurfactante

Para el estudio del crecimiento de *L. plantarum* Tw226 en medios con concentraciones reducidas de MRS o con jugo de yacón se realizaron las formulaciones presentes en la Tabla III.1.

Tabla III.1: Composición de los sistemas utilizados para el estudio del crecimiento de *L. plantarum* Tw226 en jugo de yacón y caldo MRS en distintas concentraciones.

Sistema	MRS (g/L)	Jugo de yacón (% v/v)
MRS100	55,3	0
MRS50	27,5	0
MRS25	13,8	0
MRS12,5	6,91	0
J100	0	100,0
J75	0	75,0
J50	0	50,0
J25	0	25,0
J12,5	0	12,5

Para todos los sistemas se ajustó el pH a 6,40, pH del caldo MRS comercial. En los casos de los sistemas que contienen solamente jugo de yacón se plantearon dos vías para el ajuste del pH, antes de esterilizar (T1) y después de esterilizar (T2):

- **T1** consistió en ajustar con NaOH 1,5 M y luego esterilizar 15 min a 108 ± 1 °C en un autoclave eléctrico.
- **T2** consistió en esterilizar 15 min a 108 ± 1 °C en un autoclave eléctrico y luego ajustar el pH con NaOH 1,5 M mediante el uso de una muestra sacrificio.

Para evaluar el crecimiento se utilizó el método de microdilución en caldo empleando microplacas de 96 pocillos de fondo cóncavo, en cada pocillo se colocaron 180 µL de sistema y 20 µL de un inóculo de 1.10^6 UFC/mL aproximadamente. Este inóculo se obtuvo de un cultivo *overnight* ajustado a 0,5 McF que se diluyó 1/10 antes de sembrar en la microplaca. Se midió la absorbancia de los pocillos a 590 nm cada 30 minutos durante 48 horas en un lector de microplacas a $35,0 \pm 0,1$ °C. Cada sistema se sembró por sextuplicado, también se

incluyó caldo sin inocular como control negativo, y caldo MRS inoculado como control positivo.

II.2.3 Evaluación del crecimiento en medios con diferentes proporciones de caldo MRS y suplementados con jugo de yacón

Para evaluar el crecimiento de *L. plantarum* Tw226 en medios que contienen una concentración de MRS reducida y suplementados con jugo de yacón, se plantearon los sistemas de la Tabla III.2.

Tabla III.2: Composición de los sistemas utilizados para el estudio del crecimiento de *L. plantarum* Tw226 en jugo de yacón y caldo MRS en distintas concentraciones.

Sistema	MRS (g/L)	Jugo de yacón (% v/v)
MRS100	55,3	0
MRS25	13,8	0
MRS12,5	6,91	75
J75	0	75
MRS25J	13,8	75
MRS12,5J	6,91	75

En aquellos sistemas con jugo de yacón se ajustó el pH a 6,40 siguiendo las dos vías (T1 y T2) indicadas previamente en la sección III.2.2. El jugo y el caldo MRS se autoclavarón por separado y se realizaron las diluciones correspondientes en esterilidad. El crecimiento de *L. plantarum* Tw226 se evaluó en microplacas de 96 pocillos a través del método descrito en la sección III.2.2

III.2.4 Producción del biosurfactante en diferentes escalas de trabajo y condiciones de aireación

Para la producción del BS en distintas condiciones de aireación se realizó un inóculo *overnight* de *Lb. plantarum* Tw226. El inóculo se centrifugó, el pellet bacteriano se resuspendió en agua peptona 0,1 %m/v y se ajustó a 0,5 McF.

Por otro parte, se dispusieron 75 mL de los medios nutritivos MRS 100, MRS25, MRS25J y J75, presentes en la Tabla III.2.2, en dos tipos de recipientes para establecer dos condiciones de aireación (Figura III.1). Las condiciones fueron:

- **Condición “A”:** Erlenmeyer de 250 mL, dejando un espacio cabeza de 125 mL. Se considera que la geometría del recipiente facilita la agitación y dilución del oxígeno en el medio.
- **Condición “B”:** botella de 100 mL, con un diámetro de 4,00 cm y altura 8,00 cm, dejando un espacio cabeza de 25 mL. Se considera que la geometría del recipiente dificulta la agitación y la disolución del oxígeno en el medio.

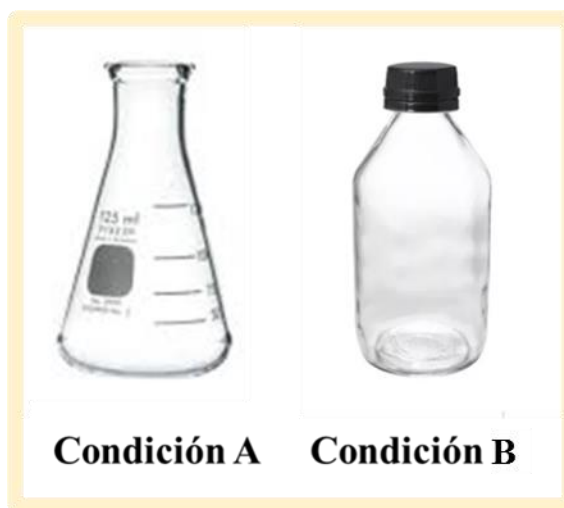


Figura III.1: Imagen de los recipientes utilizados para las condiciones de aireación A y B.

En cada sistema se sembró 750 μ L del inóculo ajustado a 0,5 McF, alcanzando una concentración de bacterias igual a 1.10^6 UFC/mL. La incubación se realizó a $35,0 \pm 0,1$ °C, durante 48 horas en agitación a 120 rpm. El crecimiento se evaluó midiendo la absorbancia de alícuotas de 200 μ L de los sistemas en esterilidad a 590 nm en un lector de microplacas. Finalizadas las 48 horas de incubación, se extrajo el BS siguiendo la metodología descrita en la sección 3.2.2.3 de Materiales y Métodos. Luego, se le midió la presión superficial del SLC mediante el Tensiómetro de Du Noüy manual, se dializó, liofilizó y se estimó el rendimiento (g/L). El producto obtenido en las condiciones de aireación óptimas para la producción de BS se caracterizó químicamente por FTIR.

III.2.5 Producción del biosurfactante en una mayor escala de trabajo

Una vez seleccionadas las condiciones de aireación óptimas para la producción de BS se realizó una producción aumentando el volumen del medio nutritivo a 600 mL, logrando un aumento de la escala de producción de aproximadamente 10 veces (x9,8). Para esto, los 600

mL de medio nutritivo se dispusieron en Erlenmeyers de 2 L y se sembraron 6,0 mL de un cultivo *overnight* de *L. plantarum* Tw226, ajustado a 0,5 McF con agua peptona 0,1 %. Las etapas de limpieza del pellet y de separación del SLC se realizó con una centrífuga de 2 L de capacidad (3000 rpm, 10 °C, 15 min). Para seguir el crecimiento de los microorganismos se tomaron alícuotas de 2 mL en condiciones asépticas y: i) se midió la absorbancia a 590 nm usando un lector de microplacas; ii) se siguió el crecimiento mediante recuento en placa utilizando agar MRS e incubando las placas a 37 °C por 48 horas; iii) se midió el pH de la alícuota remanente utilizando un peachímetro de mesada.

III. 3. Resultados y discusión

III.3.1. Evaluación del crecimiento de *L. plantarum* Tw226 empleando caldo MRS o jugo de yacón en distintas concentraciones.

Se realizó una prueba preliminar para evaluar el crecimiento de *L. plantarum* Tw226 en caldo MRS o jugo de yacón en distintas concentraciones. Con respecto al jugo de yacón, se debió ajustar el pH ya que el jugo tenía un pH inicial de 4,00, para ello, se ensayaron dos condiciones de ajuste de pH, T1 antes de la esterilización y T2 luego de la esterilización. Estos tratamientos se plantearon debido a que en las condiciones de T1 se propicia la reacción de Maillard al producirse un tratamiento térmico a pH = 6,40, mientras que en el T2 se espera que la reacción de Maillard avance en menor grado ante la acidificación del medio (Ellis, 1959). Las curvas de crecimiento pueden observarse en la Figura III.2.

El valor de la absorbancia en la fase estacionaria está directamente relacionado con el crecimiento, por lo que se considera que mayores valores, implican que el microorganismo alcanzó un mayor crecimiento (Dalgaard y Koutsoumanis, 2000). Por lo tanto, se consideró el valor de la absorbancia máxima al finalizar la incubación como criterio para analizar el crecimiento de la bacteria en las distintas condiciones. Los valores obtenidos, al cabo de 48 horas, fueron $1,83 \pm 0,03$ y $1,79 \pm 0,02$ para el crecimiento en las condiciones de MRS100 y de MRS75, respectivamente, sin presentar diferencias significativas. Por otro parte, se pudo observar que la disminución de la concentración de MRS generó una disminución progresiva de la absorbancia alcanzada a las 48 horas de crecimiento (Figura III.2, panel A). Este fenómeno se debería a la limitación en la cantidad de nutrientes disponibles para el crecimiento ocasionada por la dilución (Saeed y Salam, 2013).

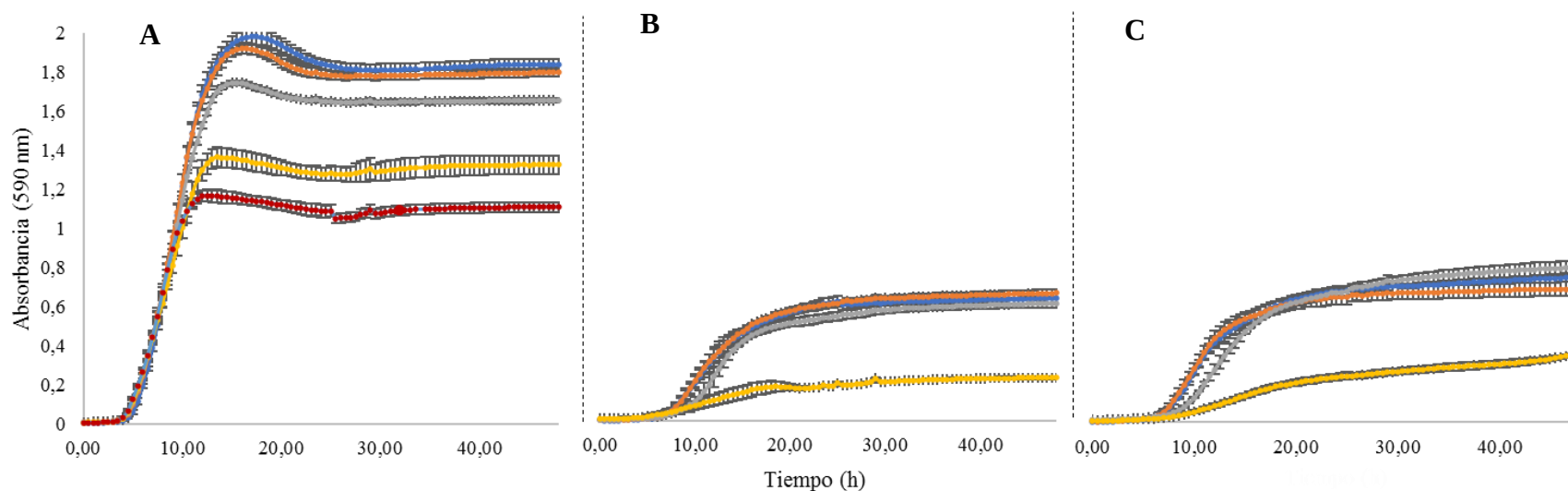


Figura III.2: Crecimiento de *L. plantarum* Tw226 a 37 °C en, caldo MRS (**Panel A**), en jugo de yacón ajustado a pH 6,40 antes de la esterilización (T1) (**Panel B**), jugo de yacón ajustado a pH 6,40 luego de la esterilización (T2) (**Panel C**). En **Panel A**: caldo MRS 100 % v/v (●), caldo MRS 75 %v/v (●), caldo MRS 50 %v/v (●), caldo MRS 25 %v/v (●) y caldo MRS 12,5 %v/v (●). En **Panel B y C**: jugo de yacón 100 % v/v (●), jugo de yacón 75 %v/v (●), jugo de yacón 50 %v/v (●), jugo de yacón 25%v/v (●).

Los sistemas formulados sólo con jugo de yacón y tratados mediante los tratamientos T1 y T2 presentaron absorbancias a las 48 horas iguales a $0,63 \pm 0,03$ y $0,75 \pm 0,03$, respectivamente, siendo significativamente diferentes (Figura III.2, panel B y C). Este resultado sugeriría que la reacción de Maillard, que se favoreció en el tratamiento T1, promovería una leve disminución en el crecimiento bacteriano.

Al comparar el crecimiento en las distintas concentraciones de jugo de yacón para un mismo tratamiento, se observó que, tanto para el tratamiento T1 como para el T2, no hubo diferencias significativas en la absorbancia a las 48 horas entre las concentraciones 100, 75 y 50 % v/v, lo que indicaría que en las tres condiciones se alcanzaron niveles de crecimiento similares (Figura III.2, Paneles B y C). También, en ambos tratamientos, hubo una disminución marcada en la absorbancia a las 48 horas a partir de la dilución con una concentración de 25 %v/v de jugo de yacón.

Por último, si se compara el crecimiento obtenido utilizando el jugo de yacón con respecto al crecimiento obtenido con el caldo MRS, se observa que la absorbancia a las 48 horas fue significativamente menor en todos los casos (Figura III.2, paneles B y C vs. A). Por lo que, se concluye que los nutrientes que aporta el jugo de yacón no son suficientes para alcanzar un crecimiento similar al obtenido mediante el medio nutritivo tradicional.

III.3.2 Evaluación del crecimiento de *L. plantarum* Tw226 en jugo de yacón suplementado con distintas concentraciones de caldo MRS

Como se observó anteriormente, el jugo de yacón sólo no aportó suficientes nutrientes para permitir un crecimiento óptimo de *L. plantarum* Tw226. Por lo que se probó formular sistemas con base de jugo de yacón y suplementado con caldo MRS en distintas concentraciones, utilizando los dos métodos para el ajuste del pH a 6,40 (T1 y T2). En la Figura III.3, se muestran los valores experimentales de la evolución del crecimiento de *L. plantarum* Tw226 en el tiempo y las curvas ajustadas al modelo Logístico. Puede observarse que la curva que presentó mayor crecimiento fue aquella en la cual el sustrato fue MRS100, seguida por la curva con sustrato MRS25J T1 y MRS12,5J T1.

Las curvas de crecimiento pudieron modelarse satisfactoriamente mediante el modelo Logístico según se probó a través de un ANOVA y por medio del coeficiente de correlación

(R^2), el cual mostró valores comprendidos entre 99,90 y 89,28 % para todos los sistemas (Tabla III.3). Si bien el modelo incluye al parámetro Abs_{min} , el mismo no se incorporó en este análisis debido a que no brindaba información significativa. Es notable que la presencia de los nutrientes que aporta el MRS, aun en concentraciones bajas, son necesarios para propiciar el crecimiento del *L. plantarum* Tw226 ya que el crecimiento en sistemas que poseen sólo jugo de yacón (J T1 y J T2) fue escaso. En todos los casos la adición de MRS, aun en concentraciones de 12,5 %v/v generó aumentos de la Abs_{max} estadísticamente significativos respecto al sistema análogo sin MRS (J75). En todos los casos, la adición de MRS a jugo tratado mediante T1, generó aumentos de la Abs_{max} mayores que los obtenidos al adicionar el jugo tratado con T2.

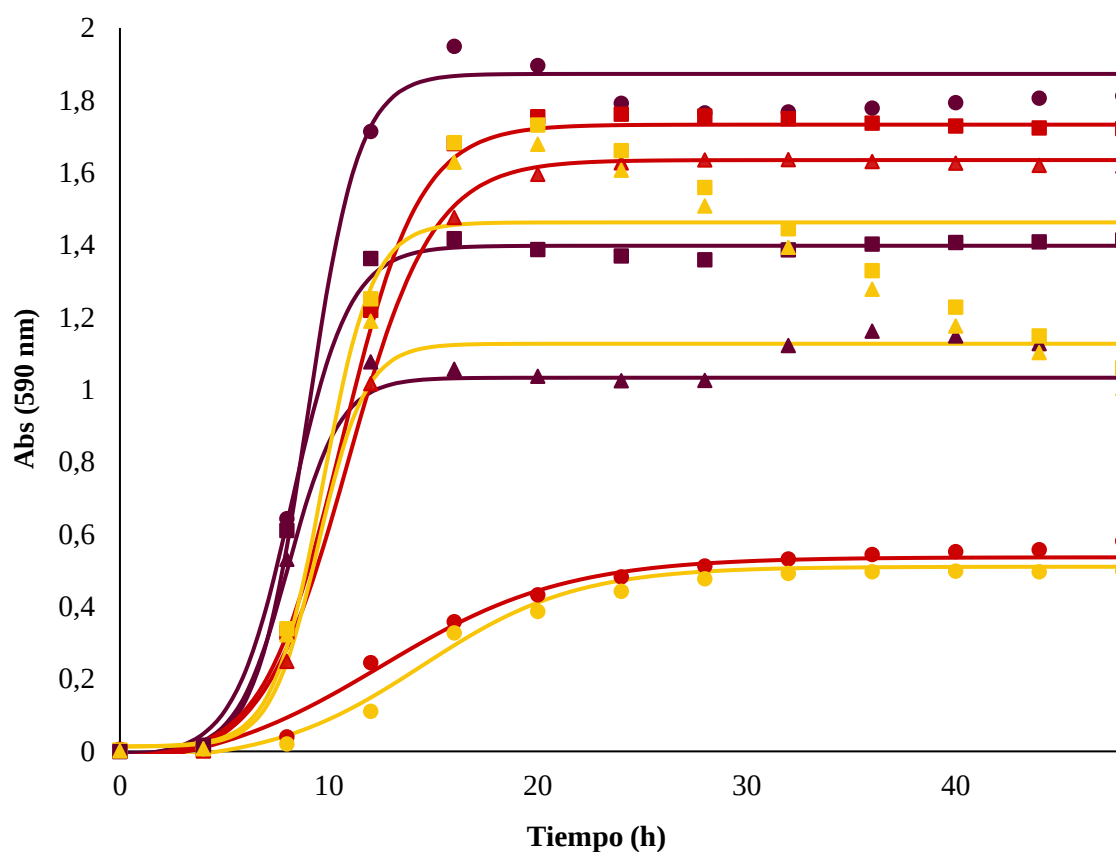


Figura III.3: Curvas de crecimiento de *L. plantarum* Tw226, a 37 °C y agitación de 120 rpm. Sistemas: MRS100 (●), MRS25 (■), MRS12,5 (▲), J75 T1 (●), MRS25J T1 (■), MRS12,5J T1 (▲), J75 T2 (●), MRS25J T2 (■), MRS12,5J T2 (▲). Caldo MRS al 100 % (MRS100); caldo MRS diluido al 25 % (MRS25); caldo MRS diluido al 12,5 % (MRS 12,5); jugo de yacón diluido al 75 % (J75); medio nutritivo con 25 % de caldo MRS y 75% jugo de yacón (MRS25J); medio nutritivo con 12,5 % de caldo MRS y 87,5 % de jugo de yacón (MRSJ12,5). T1: pH ajustado antes del autoclavado. T2: pH ajustado luego del autoclavado.

Al comparar la Abs_{max} de los sistemas MRS25 y MRS12,5, con los adicionados con el jugo de yacón tratados tanto con el T1 y T2, se observó que, en general, la presencia del jugo de yacón tratado con el T1, cuando se empleó en combinación con caldo MRS, produjo un aumento significativo en la Abs_{max} . Se exceptúa de dicho comportamiento el sistema MRS25J T2 que no presentó cambios significativos de la Abs_{max} respecto a MRS25.

Tabla III.3: Parámetros asociados al modelado de las curvas de crecimiento de *L. plantarum* Tw226 en distintos medios nutritivos y condiciones de aireación utilizando el modelo Logístico.

	Abs_{max}	m (h^{-1})	t_i (h)	R^2 (%)
MRS100	$1,87 \pm 0,03^a$	$0,82 \pm 0,03^a$	$8,99 \pm 0,15^{a,b}$	99,20
MRS25	$1,40 \pm 0,04^b$	$0,72 \pm 0,06^b$	$8,23 \pm 0,36^{a,c}$	99,28
MRS12,5	$1,09 \pm 0,10^c$	$0,83 \pm 0,04^a$	$8,07 \pm 0,43^c$	98,57
J75 T1	$0,54 \pm 0,06^d$	$0,23 \pm 0,01^c$	$12,58 \pm 0,40^d$	99,08
MRS25J T1	$1,73 \pm 0,02^e$	$0,54 \pm 0,02^d$	$10,62 \pm 0,13^e$	99,90
MRS12,5J T1	$1,63 \pm 0,05^f$	$0,5 \pm 0,02^d$	$10,91 \pm 0,05^e$	99,90
J75 T2	$0,51 \pm 0,03^d$	$0,27 \pm 0,02^c$	$14,48 \pm 0,80^f$	98,75
MRS25J T2	$1,46 \pm 0,04^b$	$0,85 \pm 0,02^a$	$9,71 \pm 0,12^b$	89,28
MRS12,5J T2	$1,13 \pm 0,04^g$	$0,89 \pm 0,04^a$	$9,49 \pm 0,30^b$	92,98

Los promedios de cada columna cuyo superíndice posee la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$). Abs_{max} : absorbancia máxima asíntótica; m: valor asociado a la velocidad de crecimiento; t_i : tiempo inflexión de la fase lag. MRS100: caldo MRS al 100 %. MRS25: caldo MRS diluido al 25 %. MRS 12,5: caldo MRS diluido al 12,5 %. J75: jugo de yacón diluido al 75 %. MRS25J: medio nutritivo con 25 % de caldo MRS y 75% jugo de yacón. MRS12,5J: medio nutritivo con 12,5 % de caldo MRS y 87,5 % de jugo de yacón. T1: pH ajustado antes del autoclavado. T2: pH ajustado luego del autoclavado.

En todos los sistemas con jugo de yacón tratado con T1 se observó un aumento en el “ t_i ” y una disminución de la “m”, indicando un aumento del tiempo de latencia y una disminución de la velocidad de crecimiento exponencial. Esto puede deberse al tiempo de adaptación que posee la bacteria al pasar del inóculo, realizado en caldo MRS, al caldo compuesto por jugo de yacón adicionado con MRS. Sin embargo, en los sistemas MRS25J y MRS12,5J T2, los parámetros de “m” y “ t_i ”, no presentaron diferencias estadísticamente significativas con MRS100.

Previamente se observó que el BS proveniente de *L. plantarum* Tw226 no se obtuvo en las condiciones óptimas de crecimiento de biomasa, sin embargo, es necesario que haya una cantidad suficiente de biomasa bacteriana para obtener una producción de BS significativa.

Por lo que, en base a los resultados mostrados, se optó por seguir los estudios con el sistema “MRS25J T1”, ante todo, porque tuvo los valores más cercanos a la Abs_{max} obtenida por el caldo MRS, sin poseer necesariamente los parámetros cinéticos (t_i y m) óptimos. Además, el tratamiento T1 presenta ventajas tecnológicas en cuanto al ajuste de pH, debido a que es más fácil hacer el ajuste en condiciones no asépticas y luego esterilizarlo, que realizar un ajuste de pH en esterilidad.

III.3.3 Evaluación de la producción de biosurfactante en distintas condiciones de aireación

En base a los resultados obtenidos en la sección anterior se seleccionaron los sistemas formulados aplicando el tratamiento T1, ya que en éstos se favoreció el crecimiento de la BAL.

Para seguir con el estudio de la producción del BS en los distintos medios, se realizaron los cultivos en 75 mL de medio, empleando frascos con diferentes geometrías con el fin de condicionar el acceso del aire, generando espacios cabeza con diferente disponibilidad de oxígeno (Figura III.4).

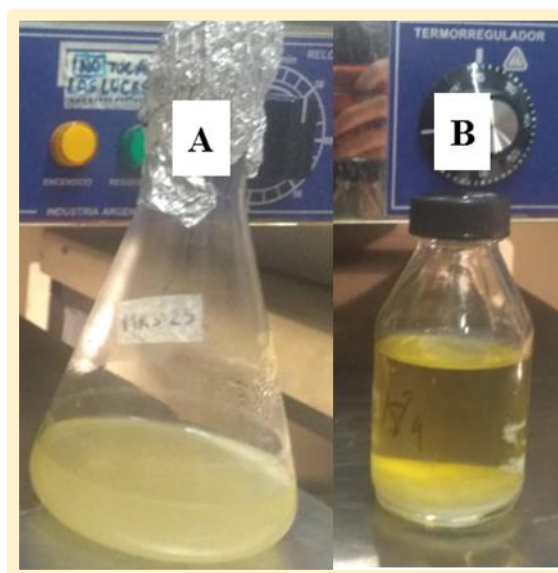


Figura III.4: Condiciones de aireación para el crecimiento de *L. plantarum* Tw226. Mayor aireación (Sistema “A”) y menor aireación (Sistema “B”) en caldo MRS25. Sistemas luego de 48 horas de incubación.

En la Figura III.5, se muestran los valores experimentales de la evolución del crecimiento a través de la medición de la absorbancia de *L. plantarum* Tw226 en distintos medios nutritivos y condiciones de aireación. Las curvas de crecimiento pudieron modelarse satisfactoriamente mediante el modelo Logístico según se probó a través de un ANOVA y por medio del coeficiente de correlación (R^2), el cual mostró valores de 99,72 y 99,21 %.

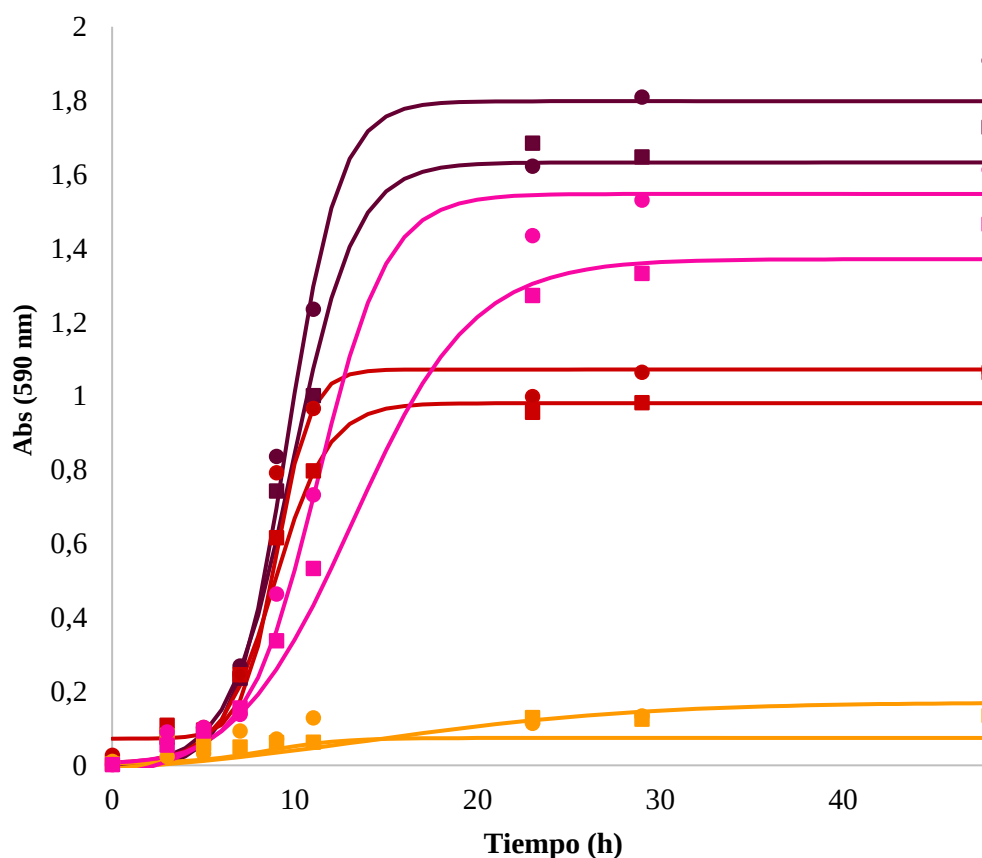


Figura III.5: Curvas de crecimiento en función del tiempo para *L. plantarum* Tw226 utilizando distintos medios de cultivo y distintas condiciones de aireación, durante 48 horas, a 37 °C y agitación de 120 rpm. Sistema: MRS100-A (■), MRS100-B (●), MRS25J-A (■), MRS25J-B (●), MRS25-A (■), MRS25-B (●), J75-A (■) y J75-B (●). Caldo MRS al 100 % (MRS100), caldo MRS diluido al 25 % (MRS25), jugo de yacón diluido al 75 % (J75); medio nutritivo con 25 % de caldo MRS y 75% jugo de yacón (MRS25J). Sistema con mayor aireación (A), sistema con menor aireación (B).

En todos los casos, los sistemas con menor aireación (Sistemas “B”) presentaron mayor crecimiento. Sin embargo, de acuerdo con el análisis de los parámetros, presentes en la

Tabla III.4, las diferentes condiciones de aireación no generaron diferencias estadísticamente significativas sobre el parámetro Abs_{max} (entre sistemas que poseen el mismo medio de cultivo). Por lo tanto, no pareciera que este factor sea condicionante para el crecimiento máximo de *L. plantarum* Tw226. Para el parámetro “m”, asociado a la velocidad de crecimiento, la condición de aireación no presentó diferencias estadísticamente significativas para los sistemas MRS100 y MRS25J, pero sí para los sistemas MRS25 y J75, en los cuales se observó un aumento significativo en el sistema MRS25-B y una disminución en el sistema J-B. Los sistemas J75-B y J75-A fueron los únicos que presentaron diferencias significativas en “ti”. Esto muestra que la presencia de oxígeno no es una limitante para el crecimiento de *L. plantarum* Tw226 tanto en los caldos MRS100, como en el MRS25J. Esto concuerda con los resultados obtenidos en la optimización de la producción mostrados en el Capítulo II, que indicaron que las condiciones de agitación, las cuales afectan la disponibilidad de aire y nutrientes, no afectaban a el crecimiento de *L. plantarum* Tw226 en el tiempo 48 horas.

Tabla III.4: Parámetros asociados al modelado de las curvas de crecimiento de *L. plantarum* Tw226 en distintos medios nutritivos y condiciones de aireación.

	Abs_{max}	$m \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_i \text{ (h)}$	$R^2 \text{ (\%)}$
MRS100-A	$1,63 \pm 0,02^a$	$0,58 \pm 0,09^{a,b}$	$9,87 \pm 0,46^{a,b}$	99,46
MRS100-B	$1,80 \pm 0,02^{a,b}$	$0,70 \pm 0,018^a$	$9,64 \pm 0,32^{a,b}$	99,21
MRS25-A	$0,98 \pm 0,05^c$	$0,68 \pm 0,05^a$	$8,89 \pm 0,28^a$	99,54
MRS25-B	$1,07 \pm 0,01^c$	$1,07 \pm 0,129^c$	$9,00 \pm 0,73^a$	99,66
J75-A	$0,16 \pm 0,01^d$	$0,39 \pm 0,04^{b,d}$	$10,13 \pm 0,58^{a,b}$	99,29
J75-B	$0,28 \pm 0,02^d$	$0,13 \pm 0,02^e$	$14,00 \pm 3,40^c$	99,41
MRS25J-A	$1,37 \pm 0,10^b$	$0,30 \pm 0,06^{e,d}$	$13,20 \pm 0,50^{b,c}$	99,72
MRS25J-B	$1,55 \pm 0,04^b$	$0,53 \pm 0,08^{a,b,d}$	$11,30 \pm 0,60^{a,b,c}$	99,65

Dentro de cada columna, los valores seguidos con la misma letra no son significativamente diferentes. Abs_{max} : absorbancia máxima asintótica; m: valor asociado a la velocidad de crecimiento; t_i : tiempo inflexión de la fase lag. MRS100: caldo MRS al 100 %, MRS25: caldo MRS diluido al 25 %, J75: jugo de yacón diluido al 75 %, MRS25J: medio nutritivo con 25 % de caldo MRS y 75% jugo de yacón. A:Sistema con mayor aireación, B: sistema con menor aireación.

Los resultados de presión superficial, masa seca y BS por litro de medio de cultivo (MS/L y BS/L) pueden observarse en la Tabla III.5. Todos los sobrenadantes aumentaron la presión superficial con respecto al buffer PBS, indicando la presencia de compuestos tensoactivos. En cuanto a la producción de BS, las concentraciones de BS/L de los caldos de cultivo de los sistemas MRS100 y MRS25J presentaron diferencias estadísticamente significativas,

siendo también ambos significativamente mayores a los sistemas MRS25 y J75. El rendimiento de BS por litro de caldo y de masa seca por litro de caldo en MRS25J - A es mayor que la suma de los dos sistemas MRS25-A y J-A por separado, lo que puede sugerir un efecto sinérgico. Se puede observar que no hay diferencias significativas entre sistemas “A” y “B” análogos en cuanto a producción de BS.

Tabla III.5: Presión superficial, rendimiento de biomasa seca por litro de medio de cultivo (MS/L) y rendimiento de biosurfactante por litro de medio (BS/L).

	Presión superficial (mN/m)	MS/L de medio (g/L)	BS/L de medio (g/L)
MRS100-A	22,5 ± 0,7 ^a	1,11 ± 0,11 ^a	0,18 ± 0,02 ^a
MRS100-B	22,7 ± 0,4 ^a	1,73 ± 0,21 ^b	0,14 ± 0,03 ^{ab}
MRS25-A	19,1 ± 0,8 ^{a,b}	0,62 ± 0,05 ^c	0,03 ± 0,01 ^c
MRS25-B	22,5 ± 0,1 ^a	0,66 ± 0,05 ^c	0,05 ± 0,01 ^{cd}
J-A	17,2 ± 1,0 ^{b,c}	0,18 ± 0,13 ^d	0,03 ± 0,01 ^c
J- B	15,7 ± 0,4 ^c	0,18 ± 0,06 ^d	0,03 ± 0,01 ^c
MRS25J-A	22,3 ± 1,8 ^a	1,10 ± 0,06 ^a	0,11 ± 0,03 ^{bc}
MRS25J-B	23,3 ± 0,4 ^a	1,42 ± 0,05 ^e	0,08 ± 0,01 ^{bcd}

Dentro de cada columna, los promedios cuyo superíndice posee la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$). MRS100: caldo MRS al 100 %, MRS25: caldo MRS diluido al 25 %, J75: jugo de yacón diluido al 75 %, MRS25J: medio nutritivo con 25 % de caldo MRS y 75% jugo de yacón. A:Sistema con mayor aireación, B: sistema con menor aireación.

III.3.4 Caracterización química de los biosurfactantes por FTIR

En la Figura III.6 (Paneles A y B) se muestran los espectros de FTIR correspondientes a los BS obtenidos con MRSJ-A y MRS100-A. Se observan los picos característicos de los estiramientos y las vibraciones del enlace amida, propios de los enlaces peptídicos: amida I en 1653,3 – 153,6 nm, amida II en 1540 – 1542 cm^{-1} y amida III en 1456, 4 - 1455,7 cm^{-1} ; 1399,2 – 1398, 2 nm y 1239,2 – 1239,9 cm^{-1} (Goormaghtigh, 2013). El grupo amida I, se asocia con vibraciones del enlace C=O y levemente con las vibraciones del enlace N-H, el grupo amida II es la combinación de los estiramientos del enlace N-H y la vibración de estiramiento C-N con menores contribuciones del C-O, C-C y N-C y el grupo amida III es la combinación en fase de la flexión N-H y la vibración de estiramiento C-N con pequeñas contribuciones del enlace C-O en flexión plana y del enlace C-C vibración de tensión (Barth, 2007). En base a esto, puede determinarse que ambos BS poseen compuestos proteicos. Los análisis correspondientes a los BS producidos por J-A y MRS25-A, presentes en la Figura III.6 (Paneles C y D), no poseen los estiramientos correspondientes a proteínas.

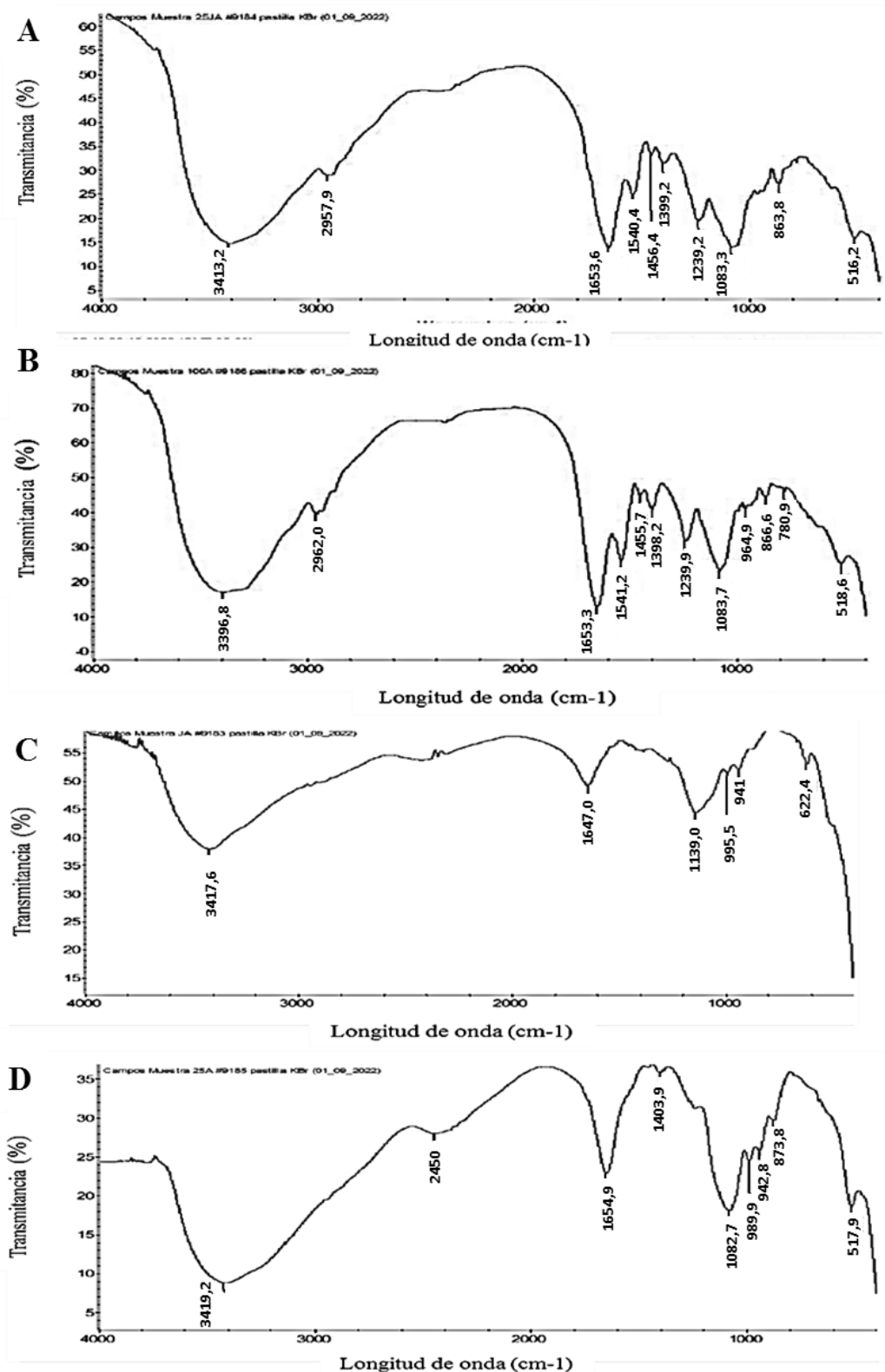


Figura III.6: Espectro FTIR de los BS. **Panel A:** Producido en el sistema MRS100-A. **Panel B:** Producido en el sistema MRS25J-A. **Panel C:** Producido en el sistema J-A. **Panel D:** Producido en el sistema MRS25-A.

Además, en la Figura III.6 – Panel A y B, también se aprecian picos a 3413,2 y 3396,8 cm^{-1} , los que corresponden al estiramiento del enlace O-H y un pico débil en 2962 y 2957,9 cm^{-1} que corresponde a enlaces CH. Por otra parte, el pico característico alrededor de 863,8 y 866,6 cm^{-1} implica la presencia de enlaces β -D-glucosídicos (Chen et al., 2015) y el pico en 1083,3 y 1083,7 cm^{-1} se corresponde con las vibraciones típicas del grupo C-O-C, pico comúnmente llamado como banda PII (Brzozowski et al., 2011). Todos estos picos son característicos de los polisacáridos, por lo que se puede plantear que estos dos BS presentan una fracción proteica y una conformada por polisacáridos. Picos con longitudes similares pueden observarse en la Figura 3 – Paneles C y D, por lo que se los compuestos obtenidos de la a través de MRS25 y J, presentó grupos funcionales similares propios de polisacáridos.

En conclusión, los resultados obtenidos para el BS producido a partir de MRS100-A y MRSJ-A, son similares a los observados en el Capítulo 1, por lo que se puede plantear que a partir de MRSJ-A se obtuvo un producto químicamente similar al obtenido con MRS100-A y con un perfil similar a otros BS obtenidos a partir de BAL. Pero, los sistemas presentes en MRS25-A y J-A, poseen una menor presencia de compuestos proteicos.

En base a los resultados comentados, se decidió continuar estudiando la producción del BS generado a partir del consumo del medio MRSJ en una mayor escala, así como también sus propiedades funcionales.

III.3.5 Producción del biosurfactante a mayor escala de trabajo

Al aumentar la escala en una fermentación, el objetivo es la fabricación de mayor cantidad de producto, si es posible, o mantener, al menos constante el rendimiento y la calidad de este. Sin embargo, la modificación de las condiciones geométricas y físicas pueden derivar en un comportamiento menos favorable lo que produce una disminución en el rendimiento y en la reproducibilidad (Schmidt, 2005). Por lo que al realizar un aumento de escala en la producción es de interés evaluar el efecto que posee en el rendimiento.

Se llevó a cabo la producción del BS producido por *L. plantarum* Tw226 escalando los volúmenes de la producción presente en el “punto III.3” x 9,8. El escalado se llevó a cabo tanto en los volúmenes de caldo durante la fermentación, así como también en el proceso de centrifugación y en la extracción, utilizando equipos y materiales que poseen mayor capacidad. Los resultados de presión superficial y rendimiento se muestran en la Tabla III.6.

El aumento del volumen en la producción generó un aumento significativo en el rendimiento de biomasa por litro de medio de cultivo, pero afectó al rendimiento de BS/L de caldo. A partir de los resultados obtenidos pareciera que el cambio a esta escala no afectaría significativamente el rendimiento de BS.

Tabla III.6: Presión superficial del SLC sin dializar, rendimientos de masa seca de bacteria al finalizar la fermentación de 48 horas y rendimiento de BS. MRSJ: 75 mL de medio nutritivo en un Erlenmeyer de 250 cc. MRSJ x 9,8: 600 mL de medio nutritivo en un Erlenmeyer de 2000 cc.

	Presión superficial (mN/m)	Rendimiento masa seca (g/L)	Rendimiento biosurfactante (g/L)	Rendimiento biosurfactante (g/gMS)
MRSJ	22,3 ± 1,8 ^a	1,10 ± 0,06 ^a	0,11 ± 0,03 ^a	0,10 ± 0,04 ^a
MRSJ x 9,8	23,8 ± 1,2 ^a	1,43 ± 0,05 ^b	0,086 ± 0,005 ^a	0,061 ± 0,004 ^b

Lo promedios cuyo superíndice poseen la misma letra no difieren significativamente ($p < 0,05$).

En la Figura III.7- Panel A se muestran los valores experimentales de la evolución del crecimiento a través de la medición de la absorbancia de *L. plantarum* Tw226 en el tiempo y las curvas ajustadas al modelo logístico para los sistemas con 600 mL y para el de 75 mL, utilizando el medio MRSJ. La curva de crecimiento correspondiente al sistema de 75 mL se presentó previamente en la Figura III.5 y se incorporó a esta nueva figura con fines comparativos. La curva de crecimiento del sistema de 600 mL pudo modelarse satisfactoriamente mediante el modelo Logístico según se probó a través de un ANOVA y por medio del coeficiente de correlación (R^2), el cual mostró un valor de 99,90 %. Cabe aclarar que, para obtener un mejor ajuste, se decidió eliminar el punto correspondiente a las 48 horas en la evaluación del crecimiento en un volumen de 600 mL. Al observar las curvas, puede apreciarse que, la absorbancia en la fase estacionaria del sistema de mayor volumen presentó un valor más alto comparado con el del sistema de 75 mL. Esto podría indicar que, en el sistema de 600 mL de caldo estaría habiendo una mayor concentración de biomasa bacteriana, por lo que el aumento de escala parecería afectar el crecimiento bacteriano de manera positiva. También, al observarse la pendiente de la curva en la fase exponencial, podría interpretarse que una vez que comienzan a reproducirse las bacterias, lo harían a mayor velocidad en el sistema de 600 mL que en el de 75 mL. Para analizar si los cambios mencionados son significativos, se analizaron y compararon los parámetros cinéticos asociados al modelado de las curvas, a través de un ANOVA y un test de Tukey. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III.7. Se puede observar que habría una

disminución en el “ti” y un aumento de la “m” así como de los valores de “Abs_{max}” en la fermentación producida en un mayor volumen de caldo, siendo todas estas variaciones significativas. Por lo cual, estos cambios en los parámetros cinéticos indican que el aumento en el volumen de producción generó un efecto positivo en el crecimiento de *L. plantarum* Tw226, debido a que:

- a) Se obtuvo mayor crecimiento, lo que se refleja tanto en el aumento del parámetro Abs_{max} como también en el aumento del rendimiento de biomasa seca por litro de medio de cultivo (Tabla III.6).
- b) Se produjo una disminución en el tiempo de latencia posterior a la fase exponencial y un aumento de la “m”, parámetro relacionado con la velocidad de crecimiento.

Por otro lado, en la Figura III.7 – Panel B se muestran los valores experimentales de la evolución del crecimiento, a través de la técnica de recuento de viables en placa, en función del tiempo para el sistema con 600 mL. La curva de crecimiento se pudo modelar satisfactoriamente mediante el modelo de Gompertz modificado según se probó a través de un ANOVA y por medio del coeficiente de correlación ($R^2 = 99,89\%$). En la Tabla III.7 se muestran los parámetros cinéticos de crecimiento de *L. plantarum* Tw226 obtenidos a partir del modelo de Gompertz modificado. Estos parámetros fueron de: $13,27 \pm 0,05$ para el valor asintótico (A), $1,63 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ para la velocidad de crecimiento (μ_m) y $3,72 \pm 3,71 \text{ h}$ para el tiempo de latencia (λ).

En cuanto a los valores experimentales, se alcanzó un valor máximo de $\ln (\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1} / \text{UFC}_0 \cdot \text{mL}^{-1})$ de $13,5 \pm 0,3$ a las 24 horas, el cual se redujo a las 48 horas hasta $9,2 \pm 0,3$. Al finalizar la producción, el pH fue de $3,45 \pm 0,01$ (Figura III.7-Panel B). Sitisart y Gasaluck (2022), al estudiar el crecimiento de *L. plantarum* MGL-8 en jugo de mango, medio de aislamiento de la bacteria, y en caldo MRS, observaron que, en el jugo, el crecimiento bacteriano fue de 10,1 log UFC/mL a las 48 horas en co-incubación con los hongos y levaduras nativas del jugo, mientras que en caldo MRS alcanzó 9,0 log UFC/ml a las 24 horas de crecimiento presentando una disminución de 1,0 ciclo logarítmico a las 48 horas. También, reportaron valores de pH similares entre las 24 y 120 horas de fermentación en caldo MRS. Esto indicaría que la bacteria, luego de 48 horas de crecimiento, se encontraría en la fase de muerte, ya que se observa una disminución en el número de ciclos logarítmicos.

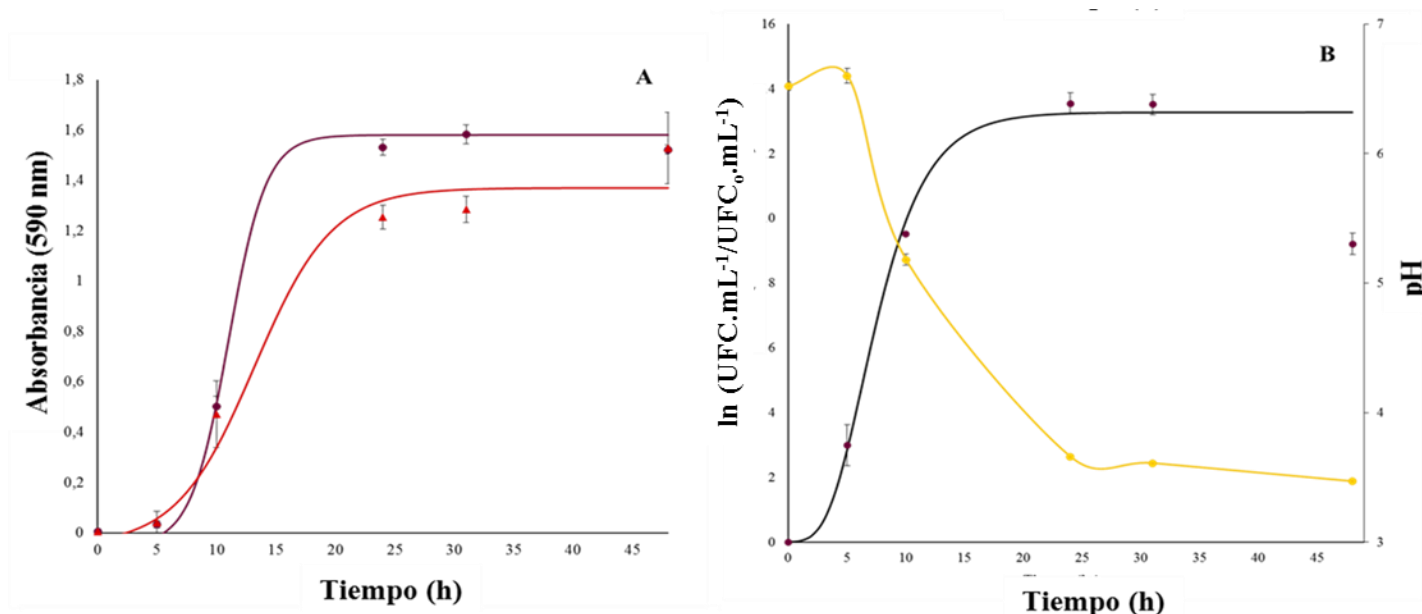


Figura III.7: Curvas de crecimiento de *L. plantarum* Tw226 en términos de absorbancia (590 nm) para el sistema de 600 mL de caldo (●) y el sistema de 75 mL de caldo (▲). Las líneas corresponden a los modelados obtenidos a partir de los parámetros presentes en la Tabla III.7 (**Panel A**). Crecimiento de *L. plantarum* Tw226 durante 48 horas por recuento de viables en placa (●) y evolución del pH (●) utilizando 600 mL de caldo MRS (**Panel B**).

Tabla III.7: Parámetros cinéticos para el crecimiento de *L. plantarum* Tw226 obtenidos mediante el modelo Logístico, para los datos tomados a través de la absorbancia, y el modelo de Gompertz modificado, para los datos obtenidos mediante recuento de viables en placa.

Sistema	Absorbancia			Recuento de viables en placa		
	Abs _{max}	m (h ⁻¹)	ti (h)	A	μ _m (h ⁻¹)	λ (h)
MRSJ X9,8	1,58 ± 0,03 ^a	0,63 ± 0,38 ^a	11,0 ± 0,6 ^a	13,27 ± 0,05	1,63 ± 0,03	3,72 ± 0,71
MRSJ	1,37 ± 0,10 ^b	0,31 ± 0,06 ^b	13,2 ± 0,5 ^b	-	-	-

MRSJX9,8: sistema de 600 mL de medio nutritivo compuesto por 75 % jugo de yacón y 25 % MRS. MRSJ: sistema de 75 mL de medio nutritivo compuesto por 75 % jugo de yacón y 25 % MRS. Abs_{max}: absorbancia máxima asintótica; m: valor asociado a la velocidad de crecimiento; ti: tiempo inflexión de la fase lag; A: valor asintótico; μ_m: velocidad de crecimiento; λ: tiempo de fase de latencia. Los promedios cuyo superíndice posee la misma letra no difieren significativamente (p < 0,05).

A partir de los resultados se puede determinar que el medio MRSJ es útil tanto para la producción de biomasa de *L. plantarum* Tw226, así como también para la producción de BS.

III. 4 Conclusiones:

- *L. plantarum* Tw226 fue capaz de crecer empleando distintas diluciones de caldo MRS.
- El jugo de yacón como único componente del medio de cultivo no fue adecuado para el crecimiento.
- *L. plantarum* Tw226 presentó un crecimiento en la formulación conteniendo 75 %v/v de jugo de yacón y 25 %v/v de caldo MRS comparable con el obtenido empleando sólo caldo MRS sin diluir.
- Los grupos funcionales del BS obtenido mediante el crecimiento de la BAL en un caldo formulado con 75 %v/v de jugo de yacón y 25 %v/v de caldo MRS fueron similares que los obtenidos utilizando sólo caldo MRS.
- Las condiciones de aeración no afectaron el rendimiento de BS ni la producción de biomasa bacteriana.
- La producción a una escala aproximadamente 10 veces mayor no generó cambios en el rendimiento, pero sí se observaron mejoras en los parámetros cinéticos.

Por lo tanto:

El BS producido por *Lactiplantibacillus plantarum* Tw226 podría obtenerse a partir de medios nutritivos alternativos provenientes de productos agroindustriales.

Conclusiones generales

4. Conclusiones generales:

Los resultados presentes en esta tesis profundizan el estudio de BAL provenientes del medio ambiente marítimo patagónico argentino. Se pudieron identificar distintas especies capaces de producir BS ligados a las células, de las cuales *Lactiplantibacillus plantarum* Tw226 se destacó por su mayor rendimiento. Esta cepa, además de producir compuestos tensioactivos con buenas propiedades funcionales, también mostró ser segura para usos biotecnológicos, a partir del estudio de su genoma completo y resistencia a antibióticos.

El BS ligado a la célula producido por *L. plantarum* Tw226 presentó una naturaleza glicolipopeptídica, siendo capaz de disminuir la tensión superficial hasta 46,4 mN/m, con una concentración micelar crítica de 0,11 g/L, soluble y estable en su actividad superficial en el rango de pH entre 5,00 y 7,00. El BS permitió estabilizar emulsiones conteniendo 0,15 % m/m de goma xántica a pH 6,00, aun en presencia de NaCl o glucosa. También permitió estabilizar emulsiones de aceite esencial de corteza de canela con una concentración de 5000 ppm durante, al menos, nueve semanas. Estas emulsiones presentaron actividad antioxidante y actividad antimicrobiana frente a *Listeria innocua* y *Zygosaccharomyces bailii*. Estos resultados nos muestran que las posibilidades para la implementación del BS como aditivo son variadas. Es de particular interés el posible uso como estabilizante de emulsiones con ingredientes antimicrobianos naturales, como los aceites esenciales, surgiendo nuevas alternativas en elementos para la sanitización e higiene.

Finalmente, se comprobó que fue posible producir el BS con grupos funcionales similares a los obtenidos con caldo MRS utilizando una formulación con 75 % v/v de jugo de yacón y 25 % v/v de caldo MRS, presentando un rendimiento comparable con el obtenido utilizando el medio de cultivo tradicional. Este resultado abre una puerta a un vasto abanico de posibilidades de subproductos agroindustriales que podrían ser utilizados como sustrato para la producción de BS por parte de BAL, lo que permitiría la producción de moléculas funcionales a un menor costo y aportando a la generación de economías circulares.

Proyectos a futuro

- Profundizar el estudio del uso de BS como agente estabilizante de emulsiones de aceite en agua y de emulsiones de aceites esenciales. Estas últimas pueden ser empleadas como agentes de higiene y sanitización contra la formación de biofilm.
- Evaluar la producción de BS a partir de distintas cepas BAL utilizando diversos subproductos agroindustriales, así como también la producción de bacteriocinas.
- Crear formulaciones multifuncionales a partir de BS, aceites esenciales y bacteriocinas.

Bibliografía

5. Bibliografía:

- Adetunji, A. I., & Olaniran, A. O. (2021). Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1), 669-679. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.012>
- Agboola O, Maree J, and Mbaya R (2014) Characterization and performance of nanofiltration membranes. *Environ chem Lett* 12(2):241–255. <https://doi.org/10.1007/s10311-014-0463-3>
- Ahmadi-Ashtiani, H. R., Baldisserotto, A., Cesa, E., Manfredini, S., Sedghi Zadeh, H., Ghafari Gorab, M., ... & Vertuani, S. (2020). Microbial biosurfactants as key multifunctional ingredients for sustainable cosmetics. *Cosmetics*, 7(2), 46. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7020046>
- Alimentarius, C. (1989). Class names and the international numbering system for food additives. CAC/GL, 36-1989.
- ANMAT. (s.f.). Enfermedades transmitidas por alimentos. Ministerio de Salud. Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/anmat/comunidad/enfermedades-transmitidas-por-alimentos>
- Asioli, D., Aschemann-Witzel, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A., Næs, T., & Varela, P. (2017). Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International*, 99, 58-71. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.002>
- Atkins, P., & Bowler, I. (2016). *Food in society: economy, culture, geography*. Londres, Routledge.
- Bagge, D., Hjelm, M., Johansen, C., Huber, I., & Gram, L. (2001). *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 67(5), 2319-2325. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2319-2325.2001>
- Bakhshi, N., Soleimani-Zad, S., & Sheikh-Zeinoddin, M. (2017). Dynamic surface tension measurement for the screening of biosurfactants produced by *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* PTCC 1896. *Enzyme and microbial technology*, 101, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.03.001>
- Balcombe, J. (2018). *El ingenio de los peces*. Barcelona: Grupo Planeta.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., ... & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications, and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 427-444. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2589-0>

- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767, 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2007.06.004>
- Barros, J., Becerra, J., González, C., & Martínez, M. (2013). Antibacterial metabolites synthesized by psychrotrophic bacteria isolated from cold-freshwater environments. *Folia microbiologica*, 58, 127-133.
- Behzadnia, A., Moosavi-nasab, M., Tiwari, B. K., & Setoodeh, P. (2020). Ultrasonics - Sonochemistry *Lactobacillus plantarum*- derived biosurfactant: Ultrasound-induced production and characterization. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 65 (August 2019), 105037. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105037>
- Behzadnia, A., Moosavi-Nasab, M., Mohammadi, A., Babajafari, S., & Tiwari, B. K. (2022). Production of an ultrasound-assisted biosurfactant postbiotic from agro-industrial wastes and its activity against Newcastle virus. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.866198>
- Berterame, N. M., Porro, D., Ami, D., & Branduardi, P. (2016). Protein aggregation and membrane lipid modifications under lactic acid stress in wild type and OPI1 deleted *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Microbial Cell Factories*, 15, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0438-2>
- Biesta-Peters, E. G., Reij, M. W., Joosten, H., Gorris, L. G., & Zwietering, M. H. (2010). Comparison of two optical-density-based methods and a plate count method for estimation of growth parameters of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1399-1405.
- Bilek, S. E., & Turantaş, F. (2013). Decontamination efficiency of high-power ultrasound in the fruit and vegetable industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 155-162.
- Boltaña, S., Sanhueza, N., Aguilar, A., Gallardo-Escarate, C., Arriagada, G., Valdes, J. A., ... & Quiñones, R. A. (2017). Influences of thermal environment on fish growth. *Ecology and evolution*, 7(17), 6814-6825.
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., & Call, D. R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*, 69(12), 7336–7342. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.12.7336>
- Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., & Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil, and surfactant optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, 280(1-2), 241-251.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brandelli, A. (2015). Nanobiotechnology strategies for delivery of antimicrobials in agriculture and food. In M. Rai, C. Ribeiro, L. Mattoso, & N. Duran (Eds.), *Nanotechnologies in Food and Agriculture* (pp. 119-139). Springer.
- Bronzwaer, S. (2008). EFSA scientific forum "from safe food to healthy diets": EU risk assessment-- Past, present, and future. *Trends in Food Science & Technology*. Bueno, J. (2014). Anti-biofilm drug

susceptibility testing methods: looking for new strategies against resistance mechanism. *J Microbial Biochem Technol S*, 3(2).

Buntin, N., Chanthachum, S., & Hongpattarakere, T. (2008). Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 30.

Burdock, G. A., & Carabin, I. G. (2004). Generally recognized as safe (GRAS): history and description. *Toxicology letters*, 150(1), 3-18.

Bustos, G., Arcos, U., Vecino, X., Cruz, J. M., & Moldes, A. B. (2018). Recycled *Lactobacillus pentosus* biomass can regenerate biosurfactants after various fermentative and extractive cycles. *Biochemical Engineering Journal*, 132, 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.01.021>

Brzozowski, B., Bednarski, W., & Gołek, P. (2011). The adhesive capability of two *Lactobacillus* strains and physicochemical properties of their synthesized biosurfactants. *Food Technology and Biotechnology*, 49(2), 177-186.

Campêlo, M. C. S., Medeiros, J. M. S., & Silva, J. B. A. (2019). Natural products in food preservation. *International Food Research Journal*, 26(1).

Campos, C. A., Castro, M. P., Rivas, F. P., & Schelegueda, L. I. (2013a). Bacteriocins in food: evaluation of the factors affecting their effectiveness. En Antonio Méndez-Vilas (Eds.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology, and education* (pp. 994-1004) Bedajoz, Formatex Research Center.

Campos, C. A., Lara, V. M., & Gliemmo, M. F. (2019). Lactic acid bacteria as a source of biosurfactants, *The many benefits of lactic acid bacteria* (pp. 91–110). New York.

Campos, J. M., Montenegro Stamford, T. L., Sarubbo, L. A., de Luna, J. M., Rufino, R. D., & Banat, I. M. (2013b). Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology progress*, 29(5), 1097-1108. <https://doi.org/10.1002/btpr.1798>

Carneiro-da-Cunha, M.G., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Teixeira, J.A. y Vicente, A.A. (2011). Influence of concentration, ionic strength and pH on zeta potential and mean hydrodynamic diameter of edible polysaccharide solutions envisaged for multilayered films production. *Carbohydrate Polymers*, 85, 522–528.

Carrasco, M. F., & Barón, P. J. (2010). Analysis of the potential geographic range of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) based on surface seawater temperature satellite data and climate charts: the coast of South America as a study case. *Biological Invasions*, 12, 2597-2607.

Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. (2015). Natural food additives: *Quo vadis?* Trends in food science & technology, 45(2), 284-295. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.006>

Casado, V., Martín, D., Torres, C., & Reglero, G. (2012). Phospholipases in food industry: a review. In *Lipases and phospholipases: Methods and protocols* (pp. 495-523). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-582-4_25

Cassani, L., Gomez-Zavaglia, A., & Simal-Gandara, J. (2020). Technological strategies ensuring the safe arrival of beneficial microorganisms to the gut: From food processing and storage to their passage through the gastrointestinal tract. *Food Research International*, 129, 108852. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108852>

Chafale, A., & Kapley, A. (2022). Biosurfactants as microbial bioactive compounds in microbial enhanced oil recovery. *Journal of biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.05.007>

Chaib, R., & Barone, M. (2020). *Chemicals in the food industry toxicological concerns and safe use*. Cham: Springer.

Chen, N. D., Chen, N. F., Li, J., Cao, C. Y., Wang, J. M., & Huang, H. P. (2015). Similarity evaluation of different origins and species of *Dendrobiums* by GC-MS and FTIR analysis of polysaccharides. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/623640>

Chen, J., Sun, Z., Jin, J., Wang, F., Yang, Q., Yu, H., ... & Wang, Y. (2023). Role of siderophore in *Pseudomonas fluorescens* biofilm formation and spoilage potential function. *Food Microbiology*, 109, 104151. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104151>

Chen, P., Wang, R. M., Xu, B. C., Xu, F. R., Ye, Y. W., & Zhang, B. (2023). Food emulsifier based on the interaction of casein and butyrylated dextrin for improving stability and emulsifying properties. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23889>

Chong, L., Ghatge, V., Zhou, W., & Yuk, H. G. (2022). Developing an LED preservation technology to minimize strawberry quality deterioration during distribution. *Food Chemistry*, 366, 130566. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.130566>

Choque Delgado, G. T., da Silva Cunha Tamashiro, W. M., Maróstica Junior, M. R., & Pastore, G. M. (2013). Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): a functional food. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68, 222-228.

Código Alimentario Argentino.

Cochrane, S. A., & Vederas, J. C. (2016). Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal research reviews*, 36(1), 4-31. <https://doi.org/10.1002/med.21326>

Colautti, A., Arnoldi, M., Comi, G., & Iacumin, L. (2022). Antibiotic resistance and virulence factors in *Lactobacilli*: something to carefully consider. *Food Microbiology*, 103, 103934. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.103934>

Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 53(2), 224-229. <https://doi.org/10.1128/AEM.53.2.224-229.1987>

Cornea, C. P., Roming, F. I., Sicuia, O. A., Voaideş, C., Zamfir, M., & Grosu-Tudor, S. S. (2016). Biosurfactant production by *Lactobacillus* spp. strains isolated from Romanian traditional fermented food products. *Romanian Biotechnological Letters*, 21(2), 11312-11320. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-RBL2015-0022>

- Cox, S., Sandall, A., Smith, L., Rossi, M., & Whelan, K. (2021). Food additive emulsifiers: a review of their role in foods, legislation and classifications, presence in food supply, dietary exposure, and safety assessment. *Nutrition reviews*, 79(6), 726-741. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa064>
- da Silva, A. F., Banat, I. M., Giachini, A. J., & Robl, D. (2021a). Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44(10), 2003-2034. <https://doi.org/10.1007/s00449-021-02597-w>
- da Silva, R. A., Afonina, I., & Kline, K. A. (2021b). Eradicating biofilm infections: an update on current and prospective approaches. *Current Opinion in Microbiology*, 63, 117-125. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.06.008>.
- Dalgaard, P., & Koutsoumanis, K. (2001). Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of microbiological methods*, 43(3), 183-196. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00222-3](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00222-3)
- Datta, P., Tiwari, P., & Pandey, L. M. (2020). Oil washing proficiency of biosurfactant produced by isolated *Bacillus tequilensis* MK 729017 from Assam reservoir soil. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 195, 107612. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2020.107612>
- de Araujo, L. V., Guimarães, C. R., Marquita, R. L. da S., Santiago, V. M. J., de Souza, M. P., Nitschke, M., & Freire, D. M. G. (2016). Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. *Food Control*, 63, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.036>
- Decker, E. A., & McClements, D. J. (2000). Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical. *Journal of Food Science*, 65(8), 1270–1282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x>
- De Gregorio, P. R., Parolin, C., Abruzzo, A., Luppi, B., Protti, M., Mercolini, L., ... & Vitali, B. (2020). Biosurfactant from vaginal *Lactobacillus crispatus* BC1 as a promising agent to interfere with *Candida* adhesion. *Microbial cell factories*, 19(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1265-y>
- Delcarlo, S. B., Parada, R., Schelegueda, L. I., Vallejo, M., Marguet, E. R., & Campos, C. A. (2019). From the isolation of bacteriocinogenic LAB strains to the application for fish paste biopreservation. *LWT*, 110, 239-246.
- Dellaglio, F., Bottazzi, V., & Vescovo, M. (1975). Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 25(1), 160-172.
- Demetriades, K., & McClements, D. J. (1999). Flocculation of whey protein stabilized emulsions as influenced by dextran sulfate and electrolyte. *Journal of Food Science*, 64(2), 206-210.
- Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O. A., & Villemur, R. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas*

aeruginosa strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1440(2-3), 244-252.

Di Renzo, L., Colica, C., Carraro, A., Cenci Goga, B., Marsella, L. T., Botta, R., ... & De Lorenzo, A. (2015). Food safety and nutritional quality for the prevention of noncommunicable diseases: the Nutrient, Hazard Analysis and Critical Control Point process (NACCP). *Journal of Translational Medicine*, 13, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12967-014-0372-9>

DuBois, A. B., Botelho, S. Y., Bedell, G. N., Marshall, R., & Comroe, J. H. (1956). A rapid plethysmographic method for measuring thoracic gas volume: a comparison with a nitrogen washout method for measuring functional residual capacity in normal subjects. *The Journal of Clinical Investigation*, 35(3), 322-326.

Dusane, D. H., Zinjarde, S. S., Venugopalan, V. P., Mclean, R. J., Weber, M. M., & Rahman, P. K. (2010). Quorum sensing: implications on rhamnolipid biosurfactant production. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 27(1), 159-184.

Eastoe, J., & Dalton, J. S. (2000). Dynamic surface tension and adsorption mechanisms of surfactants at the air–water interface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 85(2-3), 103-144.

Ebadipour, N., Lotfabad, T. B., Yaghmaei, S., & RoostaAzad, R. (2016). Optimization of low-cost biosurfactant production from agricultural residues through response surface methodology. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(1), 30-38.

Ebnesajjad, S. (2011). 3 Surface Tension and Its Measurement. *Handbook of Adhesives and Surface Preparation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-4461-3.10003-3>

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., Bastos, M. D. L., ... & Galobart, J. (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal*, 16(3), e05206.

El Aidy, S., van den Bogert, B., & Kleerebezem, M. (2015). The small intestine microbiota, nutritional modulation, and relevance for health. *Current Opinion in Biotechnology*, 32, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.048>

El Aziz, M. M. A., Ashour, A. S., & Melad, A. G. (2019). A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and determination. *Journal of Nanomedicine Research*, 8(1), 282-288.

El Hazzam, K., Hafsa, J., Sobeh, M., Mhada, M., Taourirte, M., El Kacimi, K., & Yasri, A. (2020). An insight into saponins from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd): A review. *Molecules*, 25(5), 1059. <https://doi.org/10.3390/molecules25051059>

Ellis, G. P. (1959). The Maillard reaction. In *Advances in Carbohydrate Chemistry* (Vol. 14, pp. 63-134). Academic Press.

Enciso-Martínez, Y., González-Aguilar, G. A., Martínez-Téllez, M. A., González-Pérez, C. J., Valencia-Rivera, D. E., Barrios-Villa, E., & Ayala-Zavala, J. F. (2022). Relevance of tracking the

- diversity of *Escherichia coli* pathotypes to reinforce food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 353, 109736. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109736>
- Erickson, M. C. (2002). Chemistry and function of phospholipids. En *Food Science and Technology*-New York-Marcel Dekker- (pp. 41-62).
- Esposito, M. M., & Turku, S. (2023). The use of natural methods to control foodborne biofilms. *Pathogens*, 12(1), 45. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010045>
- Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., Selvarajan, R., & Chikere, C. B. (2019). Microbial surfactants: The next generation multifunctional biomolecules for applications in the petroleum industry and its associated environmental remediation. *Microorganisms*, 7(11), 581. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110581>
- Ferreira, A., Vecino, X., Ferreira, D., Cruz, J. M., Moldes, A. B., & Rodrigues, L. R. (2017). Biointerfaces Novel cosmetic formulations containing a biosurfactant from *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155, 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.026>
- Fleet, G. H. (2011). Yeast spoilage of foods and beverages. En C.P. Kurtzman, J.W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts* (pp. 53-63). Amsterdam: Elsevier.
- Fioramonti, S. A., Arzeni, C., Pilosof, A. M. R., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2015). Influence of freezing temperature and maltodextrin concentration on stability of linseed oil-in-water multilayer emulsions. *Journal of food engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.013>
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 226(1), 497-509.
- Food and Agriculture Organization of United Nations - FAO (s.f.). *Manual de Alimentos Sanos y Seguros*. Organization of United Nations. <https://www.fao.org/3/am401s/am401s05.pdf>
- Fracchia, L., Cavallo, M., Allegrone, G., & Martinotti, M. G. (2010). A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2, 827-837.
- Fracchia, L., Cavallo, M., Martinotti, M. G., & Banat, I. M. (2012). Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications—present status and future potentials. *Biomedical science, engineering, and technology*, 14(1), 1-49.
- Galvão, A. M. M. T., Vélez-Erazo, E. M., Karatay, G. G. B., de Figueiredo Furtado, G., Vidotto, D. C., Tavares, G. M., & Hubinger, M. D. (2022). High internal phase emulsions stabilized by the lentil protein isolate (*Lens culinaris*). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 653, 129993.
- Gallus, M. K., Vogel, R. F., & Ehrmann, M. A. (2022). Optimization of a cultivation procedure to selectively isolate lactic acid bacteria from insects. *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 3001-3016.

- George, S., & Jayachandran, K. (2009). Analysis of rhamnolipid biosurfactants produced through submerged fermentation using orange fruit peelings as sole carbon source. *Applied biochemistry and biotechnology*, 158(3), 694-705.
- Giri, S. S., Ryu, E. C., Sukumaran, V., & Park, S. C. (2019). Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains. *Microbial pathogenesis*, 132, 66-72.
- Glawdel T, Ren C (2008) In: Li D (ed) *Encyclopaedia of microfluidics and nanofluidics*. Springer-Verlag Heidelberg, Germany
- Gómez- Ordóñez, E., & Rupérez, P. (2011). Food Hydrocolloids FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1514–1520. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.009>
- González, M. M., Zalazar, A. L., Pedreira, J. D., Campos, C. A., & Gliemmo, M. F. (2021). Lemongrass and cinnamon oil nanoemulsions: Formulation and study of their physical stability and activity against *Zygosaccharomyces bailii*. *Food Science and Technology International*, 27(6), 485-498.
- Goormaghtigh, E. (2013). Infrared spectroscopy: data analysis. En S. Ghosh (Ed.), *Encyclopedia of biophysics* (pp. 1074-1081). Berlín, Alemania: Springer.
- Grossart, H. P., Kjørboe, T., Tang, K., & Ploug, H. (2003). Bacterial colonization of particles: growth and interactions. *Applied and environmental microbiology*, 69(6), 3500-3509.
- Gu, Y., Li, B., Tian, J., Wu, R., & He, Y. (2018). The response of LuxS/AI-2 quorum sensing in *Lactobacillus fermentum* 2-1 to changes in environmental growth conditions. *Annals of Microbiology*, 68(5), 287-294.
- Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2006). Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.11.008>
- Gudiña, E. J., Rocha, V., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 419–424. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02818.x>
- Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2011). Biosurfactant-producing *Lactobacilli*: screening, production profiles, and effect of medium composition. *Applied and Environmental Soil Science*, 2011
- Gudiña, E.J., Fernandes E.J., J. A. T. and L. R. R. (2015). Antimicrobial and anti-adhesive activities of cell- bound biosurfactant from *Lactobacillus agilis* CCUG31450. *RSC Advances*, 5, 90960–90968. <https://doi.org/10.1039/C5RA11659G>

- Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2016). Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications. *Marine Drugs*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/md14020038>
- Gueimonde, M., Sánchez, B., G. de los Reyes-Gavilán, C., & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 4, 202.
- Haney, E. F., Trimble, M. J., & Hancock, R. E. (2021). Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria. *Nature protocols*, 16(5), 2615-2632. <https://doi.org/10.1038/s41596-021-00521-2>
- Hemathilake, D. M. K. S., & Gunathilake, D. M. C. C. (2022). Agricultural productivity and food supply to meet increased demands. En *Future Foods* (pp. 539-553). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821378-7.00028-3>
- Kaur, G., Singh, P., & Sharma, S. (2021). Physical, morphological, and storage studies of cinnamon based nanoemulsions developed with Tween 80 and soy lecithin: A comparative study. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(3), 2386-2398.
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1(3), 1-13. <https://doi.org/10.12692/ijb/1.3.1-13>
- Konkol, D., Szmigiel, I., Domżał-Kędzia, M., Kułczyński, M., Krasowska, A., Opaliński, S., ... & Łukaszewicz, M. (2019). Biotransformation of rapeseed meal leading to production of polymers, biosurfactants, and fodder. *Bioorganic chemistry*, 93, 102865. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102865>
- Lakatos, E. S., Cioca, L. I., Szilagyi, A., Vladu, M. G., Stoica, R. M., & Moscovici, M. (2022). A Systematic Review on Biosurfactants Contribution to the Transition to a Circular Economy. *Processes*, 10(12), 2647. <https://doi.org/10.3390/pr10122647>
- Laura, A., Arianna, G., Francesca, C., Carlo, C., Carla, M., & Giampaolo, R. (2019). Hypersensitivity reactions to food and drug additives: problem or myth? *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, 90(Suppl 3), 80. <https://doi.org/10.23750/abm.v90i3-S.8166>
- Lerner, A., & Matthias, T. (2015). Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*, 14(6), 479-489. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.01.009>
- López-Prieto, A., Rodríguez-López, L., Rincón-Fontán, M., Moldes, A. B., & Cruz, J. M. (2019). Effect of biosurfactant extract obtained from the corn-milling industry on probiotic bacteria in drinkable yogurt. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 824-830. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9256>
- Madhu, A. N., & Prapulla, S. G. (2014). Evaluation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(4), 1777–1789. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0649-5>

- Malvern Instruments. (2012). A basic guide to particle characterization. MRK1806-01
- Malvern Instruments. (2015). Zetasizer Nano user manual (English)
- Malvern Instruments. (2016). Zetasizer Nano accessories user manual (English)
- Mancuso, J. R., McClements, D. J., & Decker, E. A. (1999). The effects of surfactant type, pH, and chelators on the oxidation of salmon oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4112-4116. <https://doi.org/10.1021/jf9900572>
- McClements, D. J. (2004). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
- McClements, D. J. (2007). Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability. *Food Science and Nutrition*, 47(7), 611-649. <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>
- McClements, D. J., & Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & function*, 1(1), 32-59. <https://doi.org/10.1039/B9FO00611B>
- McClements, D. J., & Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(4), 285-330.
- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
- McClements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 234, 3-26. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.03.002>
- Meliani, A., & Bensoltane, A. (2015). Review of Pseudomonas attachment and biofilm formation in food industry. *Poult. Fish. Wildl. Sci*, 3, 2-7. <https://doi.org/10.4172/2375-446X.1000139>
- Mengual, O., Meunier, G., Cayré, I., Puech, K., & Snabre, P. (1999). TURBISCAN MA 2000: multiple light scattering measurement for concentrated emulsion and suspension instability analysis. *Talanta*, 50(2), 445-456. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(99\)00273-1](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(99)00273-1)
- Meylheuc, T., Renault, M., & Bellon-Fontaine, M. N. (2006). Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1-2), 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.013>
- Misiou, O., & Koutsoumanis, K. (2022). Climate change and its implications for food safety and spoilage. *Trends in Food Science & Technology*, 126, 142-152. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.08.009>
- Moldes, A. B., Torrado, A. M., Barral, M. T., & Domínguez, J. M. (2007). Evaluation of Biosurfactant Production from Various Agricultural Residues by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4481-4486. <https://doi.org/10.1021/jf063075g>

- Moldes, A. B., Paradelo, R., Vecino, X., Cruz, J. M., Gudiña, E., Rodrigues, L., ... & Barral, M. T. (2013). Partial characterization of biosurfactant from *Lactobacillus pentosus* and comparison with sodium dodecyl sulphate for the bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. *BioMed research international*, 2013.
- Montoya Vallejo, C., Flórez Restrepo, M. A., Guzmán Duque, F. L., & Quintero Díaz, J. C. (2021). Production, characterization, and kinetic model of biosurfactant produced by lactic acid bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*, 53, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.06.001>
- Morais, I. M. C., Cordeiro, A. L., Teixeira, G. S., Domingues, V. S., Nardi, R. M. D., Monteiro, A. S., ... & Santos, V. L. (2017). Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus jensenii* P 6A and *Lactobacillus gasserii* P 65. *Microbial cell factories*, 16, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0692-3>
- Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211-218. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00121-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00121-0)
- Mouafo, H. T., Mbawala, A., Tchougang, M. H., Ndjouenkeu, R., & Somashekar, D. (2018). Application of response surface methodology to improve the production of antimicrobial biosurfactants by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* N2 using sugar cane molasses as substrate. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(48), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0234-4>
- Mouafo, H. T., Sokamte, A. T., Mbawala, A., Ndjouenkeu, R., & Devappa, S. (2022). Biosurfactants from lactic acid bacteria: A critical review on production, extraction, structural characterization, and food application. *Food Bioscience*, 46 (October 2021), 101598. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101598>
- Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *TRENDS in Biotechnology*, 24(11), 509-515. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.09.005>
- Nadella, R. K., Vaiyapuri, M., Kusunur, A. B., Joseph, T. C., Velayudhan, L. K., & Mothadaka, M. P. (2018). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from aquaculture farm soil and its optimization. *Indian Journal of Fisheries*, 65(4), 127–134. <https://doi.org/10.21077/ijf.2018.65.4.75214-15>
- Nataraj, B. H., Ramesh, C., & Mallappa, R. H. (2021). Characterization of biosurfactants derived from probiotic lactic acid bacteria against methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* isolates. *Lwt*, 151. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112195>
- National Toxicology Program. (1992). NTP toxicology and carcinogenesis studies of polysorbate 80 (CAS no. 9005-65-6) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). National Toxicology Program technical report series, 415, 1-225.
- Naughton, P. J., Marchant, R., Naughton, V., & Banat, I. M. (2019). Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *Journal of applied microbiology*, 127(1), 12-28. <https://doi.org/10.1111/jam.14222>

- Nujić, M., & Habuda-Stanić, M. (2017). Nitrates and nitrites, metabolism, and toxicity. *Food Health Dis*, 6, 63-73.
- OMS, 2015. World Health Organization, foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. December 2015. Geneva.
- Oyedeki, A. B., Green, E., Jeff-Agboola, Y. A., Olanbiwoninu, A. A., Areo, E., Martins, I. E., ... & Adebo, O. A. (2023). Presence of pathogenic microorganisms in fermented foods. In *Indigenous Fermented Foods for the Tropics* (pp. 519-537). Academic Press.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E (2002) Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82(1-4):279-289.
- Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 577-588. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0234-4>
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome research*, 25(7), 1043-1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Parrino, B., Schillaci, D., Carnevale, I., Giovannetti, E., Diana, P., Cirrincione, G., & Cascioferro, S. (2019). Synthetic small molecules as anti-biofilm agents in the struggle against antibiotic resistance. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 161, 154-178. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.10.062
- Percival, S. L., Malic, S., Cruz, H., & Williams, D. W. (2011). Introduction to Biofilms, 41-68. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-21289-5>
- Pereira Batista, A. F., Coelho Trevisan, D. A., Rodrigues dos Santos, A., Silva, A. F., Zanetti Campanerut-Sá, P. A., Alves de Abreu Filho, B., ... & Graton Mikcha, J. M. (2023). Synergistic inhibition of *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in apple jam by cinnamaldehyde and potassium sorbate. *Food Science and Technology International*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1177/10820132231165541>
- Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical biochemistry*, 83(2), 346-356.
- Petruzzi, L., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2017). Microbial spoilage of foods: Fundamentals. The microbiological quality of food (pp. 1-21). Woodhead Publishing.
- 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. <https://doi.org/10.1021/jf801428x>
- Pruthi, V., & Cameotra, S. S. (1997). Rapid identification of biosurfactant-producing bacterial strains using a cell surface hydrophobicity technique. *Biotechnology Techniques*, 11(9), 671-674.

- Quemada, D., & Berli, C. (2002). Energy of interaction in colloids and its implications in rheological modeling. *Advances in colloid and interface science*, 98(1), 51-85.
- Raffa, P., Wever, D. A. Z., Picchioni, F., & Broekhuis, A. A. (2015). Polymeric surfactants: synthesis, properties, and links to applications. *Chemical reviews*, 115(16), 8504-8563.
- Ralla, T., Herz, E., Salminen, H., Edelmann, M., Dawid, C., Hofmann, T., & Weiss, J. (2017). Emulsifying properties of natural extracts from *Panax ginseng* L. *Food Biophysics*, 12, 479-490.
- Ralla, T., Salminen, H., Tuosto, J., & Weiss, J. (2018a). Formation and stability of emulsions stabilised by Yucca saponin extract. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(6), 1381-1388.
- Ralla, T., Salminen, H., Edelmann, M., Dawid, C., Hofmann, T., & Weiss, J. (2018b). Oat bran extract (*Avena sativa* L.) from food by-product streams as new natural emulsifier. *Food Hydrocolloids*, 81, 253-262.
- Rámirez, M., Bullón, J., Andérez, J., Mira, I., & Salager, J. L. (2002). Drop size distribution bimodality and its effect on O/W emulsion viscosity. *Journal of dispersion science and technology*, 23(1-3), 309-321.
- Rao, J., & McClements, D. J. (2011). Formation of flavor oil microemulsions, nano- emulsions and emulsions: influence of composition and preparation method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5026e5035.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed research international*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/759348>
- Ravichandran, V., Lee, M., Nguyen Cao, T. G., & Shim, M. S. (2021). Polysorbate-based drug formulations for brain-targeted drug delivery and anticancer therapy. *Applied Sciences*, 11(19), 9336.
- Reenen, V. (1998). Isolation, purification, and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 1131-1137.
- Reichert, C. L., Salminen, H., & Weiss, J. (2019). Quillaja saponin characteristics and functional properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 43-73.
- Rhee, S. J., Lee, J. E., & Lee, C. H. (2011). Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 10, No. 1, pp. 1-13). BioMed Central.
- Ribeiro, B. G., Guerra, J. M., & Sarubbo, L. A. (2020). Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnology progress*, 36(5), e3030.
- Rodrigues, L., Van Der Mei, H., Teixeira, J. A., & Oliveira, R. (2004). Biosurfactant from *Lactococcus lactis* 53 inhibits microbial adhesion on silicone rubber. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(3), 306–311. DOI: 10.1007/s00253-004-1674-7

- Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., van der Mei, H. C., & Oliveira, R. (2006). Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 49(1), 79-86.
- Roman, S., Sánchez-Siles, L. M., & Siegrist, M. (2017). The importance of food naturalness for consumers: Results of a systematic review. *Trends in food science & technology*, 67, 44-57.
- Romsted, L. S. (Ed.). (2014). *Surfactant science and technology: retrospects and prospects*. CRC Press.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., & Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons—a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9(1), 29-33.
- Rosenberg, E., & Ron, E. Z. (1997). Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. *Current opinion in biotechnology*, 8(3), 313-316.
- Rossi, C., Serio, A., Chaves-López, C., Anniballi, F., Auricchio, B., Goffredo, E., ... Paparella, A. (2017). Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. *Food Control*, 86, 241–248.
- Rubilar, T., Pastor de Ward, C. T., & Díaz de Vivar, M. E. (2005). Sexual and asexual reproduction of *Allostichaster capensis* (Echinodermata: Asteroidea) in Golfo Nuevo. *Marine Biology*, 146, 1083-1090. <https://doi.org/10.1007/s00227-004-1503-0>
- Saeed A. H., & Salam A. I. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 73-87. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.46A009>
- Salek, K., & Euston, S. R. (2019). Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. *Process Biochemistry*, 85, 143-155. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.003>
- Salman, J., & Khudair, A. (2015). Antibacterial and anti-biofilm effect of biosurfactant produced from *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* against bacteria from catheters. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(10), 320-333. <https://doi.org/10.20959/wjpr2015107020>
- Sambu, S., Hemaram, U., Murugan, R., & Alsofi, A. A. (2022). Toxicological and teratogenic effect of various food additives: an updated review. *BioMed Research International*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3658712>
- Satpute, S. K., Mone, N. S., Das, P., Banpurkar, A. G., & Banat, I. M. (2018). *Lactobacillus acidophilus* derived biosurfactant as a biofilm inhibitor: a promising investigation using microfluidic approach. *Applied Sciences*, 8(9), 1555. <https://doi.org/10.3390/app8091555>
- Saravanakumari, P., & Mani, K. (2010). Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. *Bioresource Technology*, 101(22), 8851-8854. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.019>

- Sarubbo, L. A., Maria da Gloria, C. S., Durval, I. J. B., Bezerra, K. G. O., Ribeiro, B. G., Silva, I. A., ... & Banat, I. M. (2022). Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical Engineering Journal*, 108377. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm.
- Sauvageau, J., Ryan, J., Lagutin, K., Sims, I. M., Stocker, B. L., & Timmer, M. S. (2012). Isolation and structural characterisation of the major glycolipids from *Lactobacillus plantarum*. *Carbohydrate Research*, 357, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.05.010>
- Schelegueda, L. I., Vallejo, M., Gliemmo, M. F., Marguet, E. R., & Campos, C. A. (2015). Synergistic antimicrobial action and potential application for fish preservation of a bacteriocin produced by *Enterococcus mundtii* isolated from *Odontesthes platensis*. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 794-801. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.065>
- Schreiner, T. B., Dias, M. M., Barreiro, M. F., & Pinho, S. P. (2022). Saponins as Natural Emulsifiers for Nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(22), 6573-6590. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00016>
- Sequeiros, C., Vallejo, M., Marguet, E. R., & Olivera, N. L. (2010). Inhibitory activity against the fish pathogen *Lactococcus garvieae* produced by *Lactococcus lactis* TW34, a lactic acid bacterium isolated from the intestinal tract of a Patagonian fish. *Archives of microbiology*, 192, 237-245.
- Sharma, D., Saharan, B. S., & Kapil, S. (2016). *Biosurfactants of lactic acid bacteria*. Cham: Springer.
- Shokouhfard, M., Kermanshahi, R. K., Shahandashti, R. V., Feizabadi, M. M., & Teimourian, S. (2015). The inhibitory effect of a *Lactobacillus acidophilus* derived biosurfactant on biofilm producer *Serratia marcescens*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(10), 1001. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2015.5402>
- Sittisart, P., & Gasaluck, P. (2022). Biosurfactant production by *Lactobacillus plantarum* MGL-8 from mango waste. *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 2883-2893. <https://doi.org/10.1111/jam.15250>
- Suárez-Domínguez, E. J., Manuel-Rivera, R., Coronel-Santillán, A. U., Palacio-Pérez, A., & Izquierdo-Kulich, E. (2015). Estudio de coeficientes reológicos de un crudo extrapesado mezclado con un biorreductor de viscosidad. *Ingeniería Mecánica*, 18(2), 87-92.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ružička, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8), 891-899. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007>
- Szuhaj, B. F. (2019). Food and industrial uses of soybean lecithin. En *World Soybean Research Conference II: Proceedings* (pp. 681-691). CRC Press.
- Tadros, T. F. (2006). *Applied surfactants: principles and applications*. John Wiley & Sons.

- Tadros, T. F. (2013). Emulsion formation, stability, and rheology. *Emulsion formation and stability*, 1-75.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., & Banat, I. M. (2011). Application of biosurfactant produced from peanut oil cake by *Lactobacillus delbrueckii* in biodegradation of crude oil. *Bioresource technology*, 102(3), 3366-3372. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.077>
- Thavasi, R., Sharma, S., & Jayalakshmi, S. (2013). Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 04(02). <https://doi.org/10.4172/2157-7463.s1-001>
- Torriani, S., Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Applied and environmental microbiology*, 67(8), 3450-3454. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3450-3454.2001>
- Thrin, N. T. T., Dumas, E., Thanh, M. L., Degraeve, P., Amara, C. B., Gharsallaoui, A., & Oulahal, N. (2015). Effect of a Vietnamese *Cinnamomum cassia* essential oil and its major component trans-cinnamaldehyde on the cell viability, membrane integrity, membrane fluidity, and proton motive force of *Listeria innocua*. *Canadian journal of microbiology*, 61(4), 263-271. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0680>
- van der Vegt, W., van der Mei, H. C., Noordmans, J., & Busscher, H. J. (1991). Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35(6), 766-770. <https://doi.org/10.1007/BF00169908>
- Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2010). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1117-1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x>
- Vecino, X., Devesa-Rey, R., Cruz, J. M., & Moldes, A. B. (2013). Evaluation of biosurfactant obtained from *Lactobacillus pentosus* as foaming agent in froth flotation. *Journal of Environmental Management*, 128, 655-660. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.06.011>
- Vecino, X., Barbosa-Pereira, L., Devesa-Rey, R., Cruz, J. M., & Moldes, A. B. (2015). Optimization of extraction conditions and fatty acid characterization of *Lactobacillus pentosus* cell-bound biosurfactant/bioemulsifier. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(2), 313-320. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6720>
- Vecino, X., Ferreira, A., Cruz, J. M., Moldes, A. B., & Rodrigues, L. R. (2016). Essential oil-water emulsions containing a biosurfactant from *Lactobacillus paracasei*. Poster. https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/42953/1/document_46230_1.pdf
- Vecino, X., Rodríguez-López, L., Ferreira, D., Cruz, J. M., Moldes, A. B., & Rodrigues, L. R. (2018). Bioactivity of glycolipopeptide cell-bound biosurfactants against skin pathogens. *International journal of biological macromolecules*, 109, 971-979.

- Vin, K., Connolly, A., McCaffrey, T., McKevitt, A., O'Mahony, C., Prieto, M., ... & Volatier, J. L. (2013). Estimation of the dietary intake of 13 priority additives in France, Italy, the UK, and Ireland as part of the FACET project. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(12), 2050-2080. <https://doi.org/10.1080/19440049.2013.840527>
- Viola, C. M., Torres-Carro, R., Cartagena, E., Isla, M. I., Alberto, M. R., & Arena, M. E. (2018). Effect of Wine Wastes Extracts on the Viability and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6567957>
- Viola, C. M., Cartagena, E., & Arena, M. E. (2021). Desechos de vinificación como inhibidores de biopelículas de *Staphylococcus aureus*. *Nereis. Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation*, (13), 135-146.
- Vos, R., & Bellú, L. G. (2019). Global trends and challenges to food and agriculture into the 21st century. *Sustainable Food and Agriculture*, 11-30. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_2
- Walenska, E., Rózalska, S., Sadowska, B., & Rózalska, B. (2007). The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiologica*, 53(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/s12223-008-0009-y>
- Walter, V., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant-producing microorganisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 672, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5979-9_1
- Wang, H., Masters, S., Edwards, M. A., Falkinham III, J. O., & Pruden, A. (2014). Effect of disinfectant, water age, and pipe materials on bacterial and eukaryotic community structure in drinking water biofilm. *Environmental Science & Technology*, 48(3), 1426-1435. <https://doi.org/10.1021/es404075w>
- Wang, Y., & Luo, Y. (2023). Colloidal nanoparticles prepared from zein and casein: interactions, characterizations, and emerging food applications. *Food Science and Human Wellness*, 12(2), 337-350. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2023.04.006>
- Widyastuti, Y., & Febrisiantosa, A. (2014). The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food and Nutrition Sciences*, 5(4), 435-442. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.54051>
- Willumsen, P. A., & Karlson, U. (1996). Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, 7(5), 415-423. <https://doi.org/10.1007/BF00058895>
- World Health Organization. (2011). Codex Alimentarius: general standard for food additives. Codex Alimentarius: general standard for food additives.
- Xedzro, C., Tano-Debrah, K., & Nakano, H. (2022). Antibacterial efficacies and time-kill kinetics of indigenous Ghanaian spice extracts against *Listeria monocytogenes* and some other food-borne pathogenic bacteria. *Microbiological Research*, 258, 126980. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126980>

- Xu, D., Zhang, J., Cao, Y., Wang, J., & Xiao, J. (2016). Influence of microcrystalline cellulose on the microrheological property and freeze-thaw stability of soybean protein hydrolysate stabilized curcumin emulsion. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 590–597. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.002>
- Yi, Z., & Xie, J. (2022). Genomic analysis of two representative strains of *Shewanella putrefaciens* isolated from bigeye tuna: Biofilm and spoilage-associated behavior. *Foods*, 11(9), 1261. <https://doi.org/10.3390/foods11091261>
- Yin, W., Xu, S., Wang, Y., Zhang, Y., Chou, S. H., Galperin, M. Y., & He, J. (2021). Ways to control harmful biofilms: Prevention, inhibition, and eradication. *Critical Reviews in Microbiology*, 47(1), 57-78. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1830115>
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339-347. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.10.014>
- Zalazar, A. L., Gliemmo, M. F., & Campos, C. A. (2016). Effect of stabilizers, oil level and structure on the growth of *Zygosaccharomyces bailii* and on physical stability of model systems simulating acid sauces. *Food Research International*, 85, 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.006>
- Zalazar, A. L., Lara, V. M., Gliemmo, M. F., & Campos, C. A. (2022). Effect of humectants and *Zygosaccharomyces bailii* inoculation on the physical stability of oil-in-water emulsions modeling salad dressings. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12045>
- Zenati, B., Chebbi, A., Badis, A., Eddouaouda, K., Boutoumi, H., El Hattab, M., ... & Franzetti, A. (2018). A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 154, 100-107. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.041>
- Zengin, N., Yüzbasioğlu, D., Ünal, F., Yilmaz, S., & Aksoy, H. (2011). The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*, 49(4), 763-769. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.11.056>
- Zhong, Y., Wu, L., Chen, X., Huang, Z., & Hu, W. (2018). Effects of food-additive-information on consumers' willingness to accept food with additives. *International journal of environmental research and public health*, 15(11), 2394.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van't Riet, K. J. A. E. M. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and environmental microbiology*, 56(6), 1875-1881.