



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias

**Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas*
aeruginosa AT10 aplicando la Metodología de Superficie
de Respuesta. Caracterización y aplicación del producto**

Arelis Abalos Rodríguez

Barcelona, 2001



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias
Programa: Microbiología y Parasitología
Bienio: 1998-2000

**Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas*
aeruginosa AT10 aplicando la Metodología de Superficie
de Respuesta. Caracterización y aplicación del producto**

Memoria para optar al grado de Doctor en Química

Arelis Abalos Rodríguez

Barcelona, 2001

Universidad de Barcelona
Facultad de Farmacia
Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias

M^a Angeles Manresa Presas, Profesora Titular del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona y Josefa Bastida Rodríguez, Profesora Titular del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Murcia,

INFORMAN:

como directoras de la memoria doctoral **“Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta. Caracterización y aplicación del producto”** presentada por Arelis Abalos Rodríguez que reúne las condiciones necesarias y autorizan su presentación.

Vto. Bno.

M^a Angeles Manresa Presas

Vto. Bno.

Josefa Bastida Rodríguez

...”La ciencia no conoce fronteras, porque el conocimiento pertenece a la humanidad, y es la antorcha que ilumina al mundo”...

L. Pasteur

A Neubelio

A mis padres

Con la presentación de esta memoria, culmino la etapa más importante en mi vida profesional... No ha sido fácil alcanzar la meta, pero he sabido llegar y ese es el premio. A todos los que me han acompañado en esta larga, difícil y a la vez hermosa travesía sinceramente, GRACIAS.

Quisiera agradecer en primer lugar a la Dra Angeles Manresa y a la Dra Josefa Bastida, directoras de esta Tesis, por los conocimientos transmitidos durante el trabajo, la confianza depositada en mí, sus exigencias y estímulo constantes en todo el desarrollo de la investigación.

A la Agencia Española de Cooperación Iberoamericana (AECI) por la beca concedida para la realización de la Tesis Doctoral. Al Institut Català de Cooperació Iberoamericana (ICCI) por atender mis inquietudes de becaria.

Al Dr. F. Congregado, J. del Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias y a la Dra. C. Fusté, Coordinadora del Programa de Doctorado de Microbiología y Parasitología.

A la Dra. M^a. J. Espuny por su valiosa ayuda en las sesiones de Microscopía Electrónica y las discusiones científicas en el campo microbiológico.

A la Dras. R. Infante, A. Pinazo y L. Pérez del Departamento de Tensoactivos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por la colaboración en la caracterización físico-química de los ramnolípidos. Al Dr. F. Comelles y Dr. J. Esquena por su ayuda.

A la Dra. O. Jáuregui del laboratorio de HPLC-Masas de los Serveis Científic Tecnics de la UB por sus conocimientos durante la caracterización química de los ramnolípidos. Al Dr. I. Casals.

A la Dra. A. M^a Solanas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología por su colaboración durante la etapa de biodegradación de petróleo.

A la Dra. F. Máximo del Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Murcia por su ayuda. Al Dr. A. Bódalo, y profesores del Departamento. Al Dr. L. Alías por su interés.

*A mis compañeros del laboratorio, los **TENSIS**, Dani, Dèlia, Escar, Ester, Jaume, Jordi, M. Benincasa y Miriam por compartir las horas de trabajo cotidiano, por aprender de mi cultura e idiosincrasia y enriquecerme con la de ustedes, por las discusiones científicas, por hacerme reír y olvidar la nostalgia. A Carolina por su apoyo y disciplina en el trabajo. Escar y Dèlia nuevamente gracias, por estar conmigo hasta tan tarde, por hacerme recobrar la paciencia frente al ordenador y apoyarme en los momentos de flaqueza, por su amistad y estima, por criticarme cuando lo merecía. A la Dra. A. López, Isa, Nuria, Susana, Cris, M. Nevot y David porque también compartimos largas horas de trabajo. A M^a Jesús y Gloria por su disposición.*

A Marc Viñas por la desinteresada ayuda que me brindó. Al Dr. J. Sabaté, Quim y Ricard por la agradable acogida dentro del grupo. A Zaira por su amistad.

A Elsa Lidia, Laly, Niurka y Roberto en el IDO por todo el apoyo que me brindaron en los comienzos y no olvidarnos en el camino.

A mis profesores de la carrera de Química, especialmente a la MSc. C. López, Dra. A. Marañón, Lic. M. Guerra, Dra. M. Casals y Dra. A. García.

A la Dra. R.C. Bermúdez por su apoyo, estímulo y exigencias; por creer en los jóvenes. A todos mis compañeros de trabajo en el CEBI por su confianza y sus dudas. A Manuel, Nora, Rosa y Suyén por su amistad.

Ester: las palabras no siempre expresan los sentimientos. Gracias por tu amistad y cariño y todo lo hermoso que compartimos en estos años. A María Rosa, Pedro, Puri y Ale.

A María, Elicet, Enrique y Roberto por la entrañable amistad que nos unió, por compartir la añoranza y los sueños, por escucharnos mutuamente.

A la familia Prats-Guinart, mi familia en España, por considerarme una más, por todo el calor y mimos recibidos. Antonio, Kika, Marta, Elisenda, David, Pau, Judit, Jordi, Pepa, Pepe, Antonia, Ramón, Carmen y Teresina gracias por todos los momentos inolvidables que viví entre ustedes.

A Zoila por la comunicación permanente con mi familia, y estar atenta a mi trabajo. A M^ª Elena, Yolanda y Nancy. A Héctor y José por la agradable convivencia en el 1^{ro}-4^{ta} durante nuestra estancia en Barcelona.

A mis padres por confiar en mí y apoyarme en los momentos difíciles de mi vida, por su estímulo diario, por no permitirme el desaliento. Por el cariño, la educación y los valores transmitidos. A Alejandro y a Alclis. A mis familiares y amigos.

*A ti Neubelio, gracias por cuidar nuestro amor en tan dura lejanía, por confiar en nosotros y estar siempre a mi lado sin imponer condiciones, por apoyarme día a día, por ser quien eres... **tú lo sabes**... sobran entonces, las palabras.*

	Páginas
INDICE.....	i-iv
1.-INTRODUCCION.....	1
1.1.- Actividad superficial. Tensoactivos microbianos.....	1
1.1.1.- Clasificación de los tensoactivos microbianos.....	1
1.2.- Ramnolípidos.....	2
1.2.1.- Estructura y biosíntesis.....	2
1.2.2.- Función biológica.....	5
1.2.3.- Producción de ramnolípidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
1.2.4.- Factores que afectan la producción de ramnolípidos.....	6
1.2.4.1.- Desarrollo de cepas productoras de ramnolípidos.....	7
1.2.4.2.- Valoración del sustrato.....	8
1.2.4.3.- Diseño del medio de cultivo para la producción de ramnolípidos.....	8
1.2.5.- Propiedades químicas, fisico-químicas y biológicas de los ramnolípidos.....	9
1.2.5.1.- Propiedades químicas y fisico-químicas.....	9
1.2.5.2.- Propiedades biológicas.....	9
1.2.6.- Aplicaciones potenciales de los ramnolípidos.....	10
1.2.7.- Biorremediación.....	11
1.2.7.1.- Biodegradación de hidrocarburos por microorganismos.....	11
1.2.7.2.- Utilización de los tensoactivos en la biodegradación de hidrocarburos.....	13
1.3.- Desarrollo industrial de un bioproceso.....	14
1.3.1.- Obtención de cepas superproductoras.....	14
1.3.2.- Diseño del medio de cultivo.....	15
1.4.- Procedimientos de diseño de medios de cultivo.....	16
1.4.1.- Simple omisión o de una variable cada vez.....	16
1.4.2.- Diseño de Experimentos.....	16
1.4.3.- Procedimientos de diseño experimental.....	17
1.4.3.1.- Diseño completamente factorial.....	18
1.4.3.2.- Diseño factorial parcial, incompleto o fraccionado.....	18
1.4.3.3.- Formación ortogonal.....	19
1.4.3.4.- Rectángulo Latino ortogonal.....	19
1.4.3.5.- Diseño compuesto.....	19
1.5.- Técnicas secuenciales de Optimización.....	19
1.5.1.- Optimización Evolucionaria (EVOP).....	19
1.5.2.- Simplex.....	20

1.5.3.- Complex.....	20
1.6.- Técnicas no secuenciales de Optimización.....	20
1.6.1.- Inyección en pulso.....	20
1.6.2.- Metodología de Superficies de Respuesta (MSR).....	20
1.7.- Técnicas computacionales de diseño.....	20
1.7.1.- Algoritmo Genético (AG).....	21
1.7.2.- Optimización del enjambre de partícula (OEP).....	21
1.8.- Métodos de inteligencia artificial.....	21
1.8.1.- Redes Neuronales Artificiales (RNA).....	21
1.8.2.- Seguir las reglas (Fuzzy logic).....	22
1.9.- Metodología de Superficies de Respuesta (MRS).....	22
1.9.1.- Diseño estadístico de experimentos.....	23
1.9.1.1.- Diseño rotacional central compuesto.....	23
1.9.2.- Modelo matemático.....	24
1.9.2.1.- Polinomio de segundo orden.....	24
1.9.3.- Validación del modelo matemático.....	26
Objetivos.....	27
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
2.1.- Microorganismos.....	29
2.2.- Medio de cultivo. Inóculo y condiciones de cultivo.....	29
2.3.- Desarrollo de la matriz experimental.....	30
2.3.1.- Diseño experimental y técnica de optimización.....	30
2.3.2.- Funciones respuestas y cuantificación de las respuestas.....	30
2.3.2.1.- Cuantificación de los ramnolípidos.....	30
2.3.2.2.- Cuantificación de la biomasa.....	31
2.3.3.- Análisis estadístico y Modelo matemático.....	31
2.4.- Caracterización química de la fuente de carbono (RAGL).....	31
2.5.- Recuperación y purificación de los ramnolípidos.....	31
2.5.1.-Purificación por columna de adsorción.....	31
2.5.2.- Purificación por precipitación ácida.....	32
2.6.- Caracterización química, fisico-química y biológica.....	32
2.6.1.- Caracterización química por HPLC/ESI-MS.....	32
2.6.2.- Caracterización fisico-química.....	33
2.6.3.- Ensayos de Solubilidad.....	33
2.6.4.- Ensayos de Emulsificación.....	33
2.6.5.- Diagrama ternario de fases.....	34
2.6.6.- Propiedades biológicas.....	34

2.7.- Detección y análisis de las inclusiones lipídicas.....	35
2.7.1.-Microscopía Electrónica de transmisión.....	35
2.7.2.- Extracción de las inclusiones lipídicas.....	35
2.7.3.- Análisis de las inclusiones lipídicas por Espectroscopía de Infrarrojos.....	35
2.7.4.- Caracterización de las inclusiones lipídicas por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS).....	36
2.8.- Biodegradación del crudo de petróleo Casablanca.....	36
2.8.1.- Biodegradación del crudo Casablanca por <i>P. aeruginosa</i> AT10.....	36
2.8.1.1.- Medio de cultivo.....	37
2.8.1.2.- Condiciones de cultivo e inóculo.....	37
2.8.2.- Influencia de la adición de los ramnolípidos M_{AT10} en la biodegradación del crudo Casablanca por el consorcio microbiano AM.....	37
2.8.2.1.- Medio de cultivo.....	37
2.8.2.2.- Condiciones de cultivo e inóculo.....	37
2.8.3.- Obtención de los hidrocarburos totales del petróleo (TPH).....	38
2.8.3.1.- Extracción líquido/líquido.....	38
2.8.3.2.- Columna de adsorción.....	38
2.8.4.- Verificación del proceso de biodegradación.....	38
2.8.4.1.- Cromatografía de Gases-FID.....	39
2.8.4.2.- Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS)....	39
3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	41
3.1.- Ajuste a un modelo de regresión cuadrático.....	46
3.2.- Ajuste al mejor modelo de regresión.....	48
3.3.- Obtención de los valores óptimos.....	52
3.3.1.- Obtención de los máximos y estudio de los efectos parciales.....	52
3.3.1.1.- Ramnolípidos (Y_1).....	52
3.3.1.2.- Biomasa (Y_2).....	58
3.3.2.- Estudio de las Superficies de Respuesta (SR).....	61
3.3.2.1.- Influencia de las variables en la producción de ramnolípidos...	62
3.3.2.2.- Influencia de las variables en la biomasa.....	69
3.4.- Análisis canónico.....	74
3.4.1.- Análisis canónico para la producción de ramnolípidos.....	75
3.4.2.- Análisis canónico para la biomasa.....	77
3.5.- Comprobación de los modelos.....	78
3.5.1.- Comprobación experimental de los máximos.....	81

3.5.1.1.- Cinética de la producción de ramnolípidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10.....	81
3.5.1.2.- Cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> AT10.....	83
3.6.- Análisis de las inclusiones lipídicas.....	85
3.6.1.- Acumulación de PHAs por <i>P. aeruginosa</i> AT10.....	85
3.6.2.- Composición química de los PHAs de <i>P. aeruginosa</i> AT10.....	87
3.7.- Caracterización química de los ramnolípidos M_{AT10}	89
3.8.- Propiedades biológicas de los ramnolípidos M_{AT10}.....	94
3.9.- Caracterización fisico-química de los ramnolípidos M_{AT10}.....	97
3.9.1.- Ensayos de solubilidad de los ramnolípidos M _{AT10}	97
3.9.2.- Determinación de la concentración micelar crítica (cmc).....	97
3.9.3.- Cálculo de la eficiencia y la efectividad de los ramnolípidos M _{AT10}	99
3.9.4.- Propiedades emulsionantes de los ramnolípidos M _{AT10}	102
3.9.5.- Diagrama ternario de fases.....	105
3.10.- Biodegradación del crudo de petróleo Casablanca.....	109
3.10.1.- Biodegradación del crudo de petróleo Casablanca por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> AT10.....	109
3.10.1.1.- Análisis de las fracciones alifática y aromática.....	110
3.10.2.-Influencia de la adición de los ramnolípidos M _{AT10} en la biodegradación del crudo de petróleo Casablanca por el consorcio microbiano AM.....	113
3.10.2.1.- Análisis de la fracción alifática.....	114
3.10.2.2.- Análisis de la fracción aromática.....	114
4. CONCLUSIONES.....	121
5. BIBLIOGRAFÍA	123
6. ANEXOS.....	I
Análisis de Varianza y Regresión múltiple.....	II
Análisis Canónico R.....	XXV

1.1.- Actividad superficial. Tensoactivos microbianos

La actividad superficial se define como la adsorción de las moléculas de un soluto en forma de monocapa molecular, de modo que el grupo polar (cabeza) quede orientado hacia la fase liófila y el grupo no polar (cola) hacia la fase liófila. Esta situación es siempre energéticamente más favorable que la disolución completa en cualesquiera de las dos fases y representa un estado de equilibrio entre la tendencia de la molécula a adsorberse y su disolución completa debido a la agitación térmica. Las moléculas que presentan actividad superficial son conocidas como **tensoactivos** y tienen la propiedad fundamental de disminuir la tensión superficial e interfacial y formar agregados micelares. (Rosen, 1989)

En un sistema heterogéneo, la interfase determina el comportamiento del sistema como un todo. Por tal razón es comprensible que una gran variedad de microorganismos entre bacterias, levaduras y hongos sintetizan moléculas con actividad superficial, conocidas como **tensoactivos microbianos** o **biotensoactivos**, las cuales se adsorben en la interfase de dos fases con diferente polaridad debido a su naturaleza anfifílica y alteran las condiciones que prevalecen en la misma (Rosenberg y Ron, 1999). Los tensoactivos microbianos, al igual que los tensoactivos sintéticos, reducen la tensión superficial e interfacial, se agrupan en micelas y estabilizan emulsiones de sistemas agua/aceite. Las propiedades físico-químicas de los biotensoactivos le confieren capacidad detergente, humectante, emulsionante y dispersante, entre otras. A diferencia de su contraparte química, los tensoactivos microbianos tienen la ventaja de ser menos tóxicos, biodegradables y compatibles ambientalmente, poseen mayor especificidad de acción y selectividad a temperaturas, pH y salinidad extrema. Otra ventaja es la posibilidad de síntesis a partir de fuentes renovables (Mata-Sandoval *et al.*, 1999), lo cual favorece abaratar el costo del proceso de producción. Los sustratos comúnmente utilizados son los aceites vegetales (Robert *et al.*, 1989; Daniel *et al.*, 1998; Sim *et al.*, 1997) y residuos (Makkar y Cameotra, 1997; Daniel *et al.*, 1999; Sarubbo *et al.*, 1999). El empleo de residuos para la producción de tensoactivos microbianos contribuye a disminuir la contaminación ambiental que generan al ser vertidos al medio (Mulligan y Gibbs, 1993; Desai y Banat, 1997).

1.1.1.- Clasificación de los tensoactivos microbianos

Debido a su naturaleza los biotensoactivos son moléculas estructuralmente muy diversas y atendiendo a su masa molecular se dividen en dos grupos: moléculas de

baja masa molecular, las cuales reducen eficientemente la tensión superficial e interfacial del sistema y polímeros de alta masa molecular, que se hallan fuertemente unidos a la superficie celular. Los polímeros más estudiados son los emulsanos producidos por *Acinetobacter calcoaceticus* (Rosenberg y Ron, 1997) y el liposano a partir de *Candida lipolytica* (Sarubbo *et al.*, 1999). Tanto los emulsanos como el liposano son excelentes bioemulsificantes exocelulares.

La mayoría de los tensoactivos microbianos descritos son moléculas de bajo peso molecular. Se subdividen a su vez según la estructura química en glicolípidos, lipopéptidos, ácidos grasos y fosfolípidos. Los **ácidos grasos** provienen de la oxidación microbiana de los alcanos, destacando los ácidos corinomicólicos de *Nocardia erythropolis* (Hommel y Ratkedge, 1993); mientras que los **fosfolípidos** son los componentes fundamentales de las membranas microbianas. Este tipo de biotensoactivo es muy común en algunas especies de *Acinetobacter* y *Thiobacillus thiooxidans* (Hommel y Ratkedge, 1993; Rosenberg y Ron, 1999). Los tensoactivos microbianos conocidos como **lipopéptidos** tienen una actividad antibiótica muy marcada, tal es el caso de la surfactina o subtilisina de *Bacillus subtilis* (Razafindralambo *et al.*, 1996) y las liquenisinas A y B de *Bacillus licheniformis* (Yakimov *et al.*, 1996). Dentro de los **glicolípidos** son agrupadas moléculas que en su estructura contienen una o dos unidades de un azúcar unidas a través de enlaces acilo (glicosídico) a cadenas de ácidos grasos o β -hidroxiácidos (Rosenberg y Ron, 1999). Los glicolípidos se subdividen a su vez en **trealosalípidos** de *Rhodococcus* sp (Espuny *et al.*, 1995; Vollbrecht *et al.*, 1999); **soforolípidos** producidos por *Torulopsis bombicola* (Cooper y Paddock, 1984; Daniel *et al.*, 1999) y **ramnolípidos** que son producidos por *Pseudomonas aeruginosa*. (Syldatk *et al.*, 1985 b; Lang y Wullbrandt, 1999)

1.2.- Ramnolípidos

1.2.1.- Estructura y biosíntesis

Dentro de los glicolípidos, los ramnolípidos son los tensoactivos microbianos más efectivos y mejor estudiados. Son producidos por el género *Pseudomonas aeruginosa*, bacilo Gram-negativo característico de aguas y suelos. Esta bacteria es además un patógeno humano oportunista, causante de serias infecciones nosocomiales (Campos-García *et al.*, 1998). La patogenicidad de *Pseudomonas* está relacionada con la secreción de moléculas tóxicas (exotoxina A, piocianina, alginato y ramnolípidos) y enzimas hidrolíticos (proteasas y fosfolipasas C). (Olvera *et al.*, 1999)

La estructura general de los ramnolípidos contiene un anillo de α -L-ramnopiranosil unido a una cadena de β -hidroxiácido (Figura 1.1). El anillo de α -L-ramnopiranosil tanto en los monorramnolípidos ($R_1=H$) como en los dirramnolípidos ($R_1= \alpha$ -L-ramnopiranosil) es la parte invariable en la molécula.

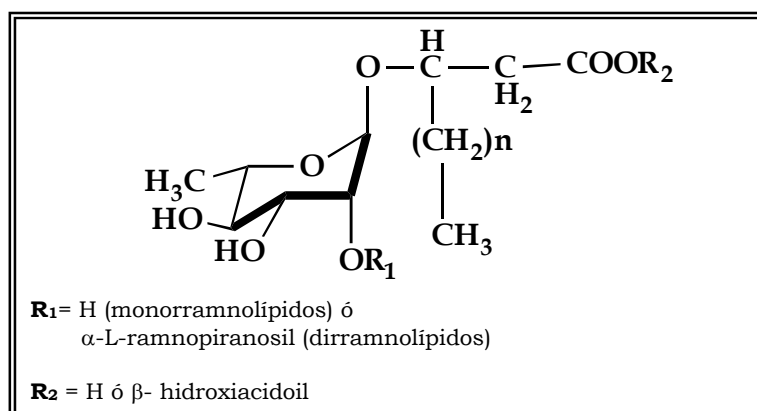


Figura 1.1.- Estructura química general de los ramnolípidos

La producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* fue descrita por primera vez en 1949 por Jarvis, quien demostró la existencia del enlace glicosídico entre la cadena lipídica y la unidad de ramnosa (Jarvis y Johnson, 1949). Las unidades de ramnosa se unen a través de otro enlace glicosídico.

Los ramnolípidos son sintetizados por células libres, vía síntesis de *novo* (Syldatk y Wagner, 1987) y se acumulan extracelularmente al final de la fase exponencial y principio de la estacionaria en condiciones de limitación por nitrógeno (Mulligan y Gibbs, 1989). La ruta de biosíntesis fue propuesta por Burger en 1963, (Figura 1.2) sugiriendo que estas moléculas son sintetizadas a partir de reacciones secuenciales de transferencia de α -L-ramnopiranosil, catalizadas cada una por ramnosiltransferasas específicas (Burger *et al.*, 1963). La d-timidíndifosfato (dTDP) α -L-ramnosa actúa como sustrato donador (Burger *et al.*, 1963) e interviene además en la síntesis del lipopolisacárido (LPS) (Maier y Soberón-Chávez, 2000). El β -hidroxiacidoil- β -hidroxiácido actúa como sustrato aceptor (Burger *et al.*, 1963) y es además el intermediario de la síntesis de polihidroxiacanoatos, (PHAs) (Rehm *et al.*, 1998). La formación del β -hidroxiácido determina la velocidad de reacción (Mulligan y Gibbs, 1989) y procede, independientemente de la fuente de carbono, de la ácido graso sintasa (Hommel y Ratkedge, 1993). Estudios más recientes han sugerido la

participación de los ramnolipidos en la motilidad en “swarming” de *Pseudomonas aeruginosa* como un modo de colonización de hábitats naturales o *in vivo* donde la disponibilidad de nitrógeno puede ser un factor limitante (Köhler *et al.*, 2000). La motilidad en “swarming” de *P. aeruginosa* es similar a la motilidad deslizante observada en *Myxococcus xanthus*. Esta bacteria secreta un tensoactivo en el extremo contrario a la dirección del movimiento; así el bacilo es impulsado hacia delante por la diferencia de tensión superficial entre los extremos de la célula. (Prescott *et al.*, 1999)

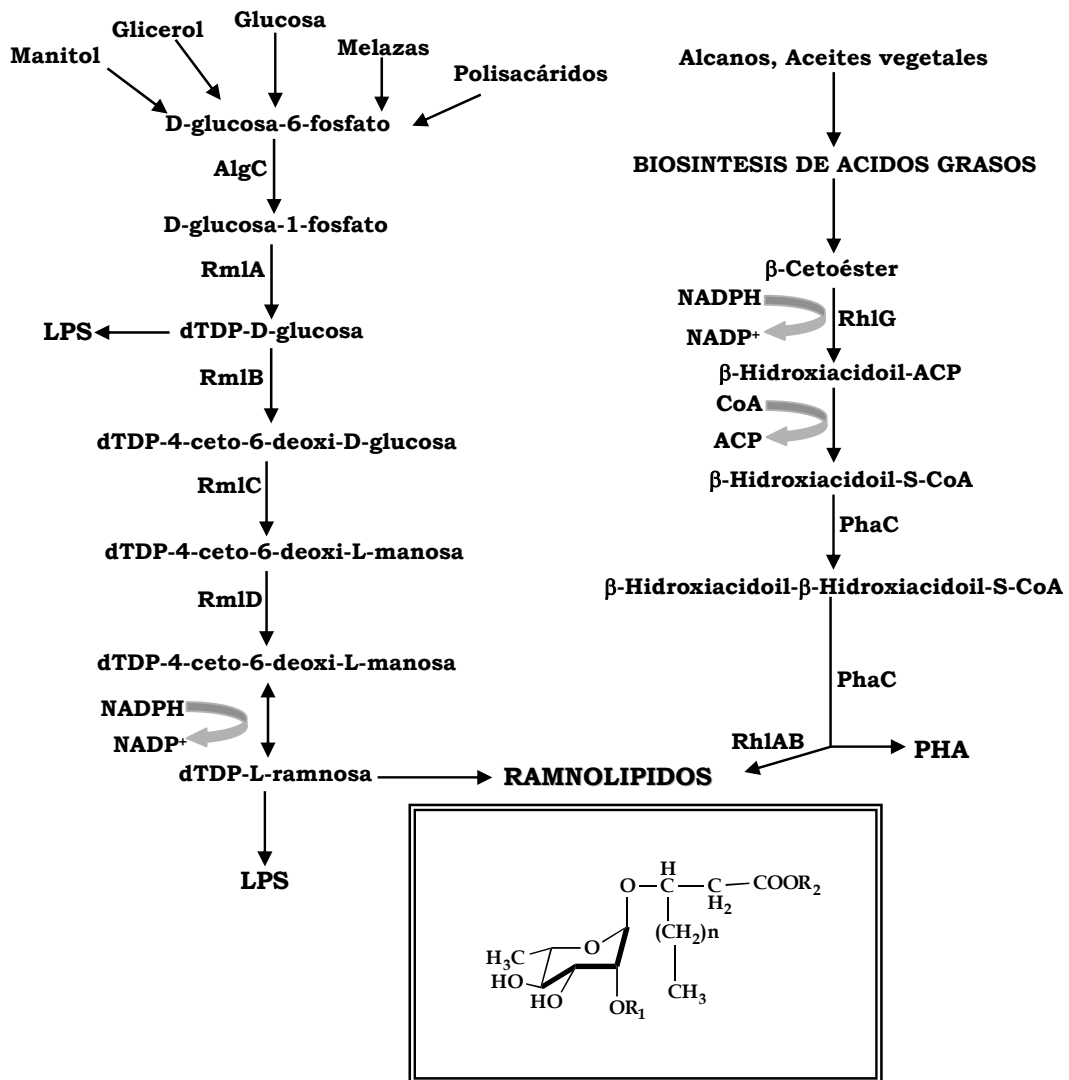


Figura 1.2.- Ruta de biosíntesis de los ramnolipidos

En cultivo líquido *P. aeruginosa* produce mayoritariamente las formas α -L-ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato ($\text{R}_1\text{C}_{10}\text{C}_{10}$) y α -L-ramnopiranosil-

2-O- α -L-ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato ($R_2C_{10}C_{10}$) (Syldatk y Wagner, 1987). Las formas $R_1C_{10}C_{10}$ y $R_2C_{10}C_{10}$ se sintetizan secuencialmente; sin embargo el mutante *Pseudomonas* IBT8 que no produce $R_1C_{10}C_{10}$, es capaz de sintetizar el dirramnolípido $R_2C_{10}C_{10}$ (Wild *et al.*, 1997). Acilaciones adicionales en el anillo de ramnosa de un ácido α -decenoico en las moléculas $R_1C_{10}C_{10}$ y $R_2C_{10}C_{10}$ dan lugar a los ramnolípidos A y B cuando se cultiva *P. aeruginosa* sobre un 5% de n-parafinas (Lang y Wullbrandt, 1999). Recientemente se han encontrado hasta 28 nuevas formas homólogas de ramnolípidos producidas por diferentes especies de *P. aeruginosa*. La longitud de la cadena del β -hidroxiácido variaba entre C_8 y C_{24} y algunas de ellas presentaban insaturaciones (Mata-Sandoval *et al.*, 1999; Déziel *et al.*, 1999 b). Debido a la variabilidad de longitud que presenta la cadena del β -hidroxiácido, frecuentemente el término ramnolípidos hace alusión a una mezcla compleja de moléculas homólogas y no a la síntesis de una única molécula.

1.2.2.- Función biológica

La función fisiológica de los ramnolípidos y tensoactivos microbianos en general no ha sido completamente esclarecida aún. Se ha descrito que la presencia de ramnolípidos estimula el crecimiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en sustratos no miscibles en agua, n-alcanos por ejemplo, al facilitar la emulsificación del sustrato y posterior penetración del mismo al medio celular (Syldatk *et al.*, 1985 a; Zhang y Miller, 1992); sin embargo *P. aeruginosa* también es capaz de sintetizar ramnolípidos en sustratos solubles en agua como glucosa (1.5 g/L) (Guerra-Santos *et al.*, 1984) y etanol (32 g/L) (Matsufuji *et al.*, 1997). Los ramnolípidos además favorecen la colonización de hábitats naturales por *Pseudomonas aeruginosa*. (Köhler *et al.*, 2000)

1.2.3.- Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa*

Con el desarrollo de los conceptos de Ingeniería Bioquímica se comenzaron a estudiar diversas estrategias de cultivo: discontinuo (Syldatk *et al.*, 1985 a), alimentado (Linhardt, 1989) y continuo con o sin reciclaje de células (Reiling *et al.*, 1986). La síntesis de ramnolípidos por *P. aeruginosa* puede ocurrir asociada al crecimiento, bajo condiciones limitantes de crecimiento o en condiciones no proliferantes.

Durante la síntesis asociada al crecimiento existe una relación paralela entre el consumo de la fuente de carbono, el crecimiento y la síntesis de ramnolípidos. La fuente de carbono tiene un papel determinante. *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 por ejemplo, es capaz de crecer y producir ramnolípidos con glucosa (1.8 g/L), n-alcanos

(2.55 g/L) y aceite de oliva (10 g/L); sin embargo tanto el crecimiento celular como la acumulación de ramnolipidos alcanzaron los valores más altos en aceite de oliva como fuente de carbono. (Robert *et al.*, 1989)

La producción de ramnolipidos se incrementa notablemente como resultado de la limitación por uno o más componentes del medio. Se ha observado que la sobreproducción de ramnolipidos por *Pseudomonas* sp. DSM 2874, cuando el cultivo alcanza la fase estacionaria de crecimiento, fue debida a una limitación por iones nitrato (NO_3^-) o amonio (NH_4^+) (Syldatk *et al.*, 1985 a). La limitación por iones Fe^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} también puede conducir a una sobreproducción de ramnolipidos en *Pseudomonas* sp. DMS 2874 (Syldatk *et al.*, 1985 a). En condiciones de desnitrificación la sobreproducción de ramnolipidos por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 se observó con limitación por fosfatos. (Chayabruta *et al.*, 2001)

La producción microbiana de metabolitos secundarios puede ser examinada con células no proliferantes, estado en el cual las células no se multiplican, pero pueden utilizar la fuente de carbono para continuar la síntesis de ramnolipidos. Las células del cultivo son recogidas cuando se inicia la producción de ramnolipidos. Syldatk describió la síntesis de 15 g/L de ramnolipidos por *Pseudomonas* sp. DMS 2874 con células no proliferantes inmovilizadas utilizando n-alcenos como fuente de carbono (Syldatk *et al.*, 1985 a). Los soforolipidos de *Torulopsis bombicola*, celobiosalipidos de *Ustilago maydi* y los trealolipidos de *Rhodococcus erythropolis* también fueron producidos a partir de células no proliferantes. (Syldatk y Wagner, 1987)

1.2.4.- Factores que afectan la producción de ramnolipidos

Los principales factores que afectan la producción de ramnolipidos en cultivo discontinuo son: la formación excesiva de espuma debida a la aeración y las características propias del producto; los bajos rendimientos de producción por el diseño inadecuado del medio de cultivo y las altas productividades volumétricas que encarecen la recuperación del producto. (Ochsner *et al.*, 1995)

La formación de espuma es una característica de la producción de tensoactivos en general. La utilización de antiespumantes durante el proceso previene la formación de espuma, sin embargo no es una solución muy recomendable ya que además del costo del agente químico se encarece la recuperación del producto al ser necesaria la posterior separación del tensoactivo químico. La reincorporación de la espuma al bioproceso puede plantearse como una solución eficiente que favorece la óptima

explotación del volumen del biorreactor (Reiling *et al.*, 1986; Mercadé, 1990). La producción anaerobia de ramnolípidos en condiciones de desnitrificación ha sido sugerida como vía alternativa de evitar el exceso de espuma (Chayabruta *et al.*, 2001); sin embargo las producciones son muy bajas (0.30-0.32 g/L) y es un método más eficiente para eliminación de nitratos y tratamiento de aguas residuales con alto contenido en lípidos.

La transición del cultivo discontinuo hacia el cultivo continuo y sistemas de reciclaje de células favorece el incremento de la productividad volumétrica y con ello la obtención de altos rendimientos de producción. (Ochsner *et al.*, 1995)

El incremento de los rendimientos de producción debe ser dirigido hacia la obtención de cepas superproductoras de ramnolípidos; la valoración del sustrato como fuente de carbono y el diseño del medio de cultivo por la selección adecuada de sus componentes.

1.2.4.1.- Desarrollo de cepas productoras de ramnolípidos

La obtención de cepas superproductoras suele ser un procedimiento muy complejo ya que la síntesis de ramnolípidos depende de dos rutas del metabolismo central: la síntesis de ácidos grasos y la gluconeogénesis (Figura 1.2) (Ochsner *et al.*, 1995; Hommel y Ratkedge, 1993). Por otra parte la síntesis de ramnolípidos es regulada por un sistema genético muy complejo que a su vez regula la secreción de compuestos tóxicos asociados a la patogenicidad de *Pseudomonas aeruginosa* (Campos-García *et al.*, 1998; Olvera *et al.*, 1999; Tavares *et al.*, 2000) y la biosíntesis de polihidroxialcanoatos (PHAs). (Rehm *et al.*, 1998)

El desarrollo de estrategias para la producción de ramnolípidos en *Pseudomonads* recombinantes no patógenas como *P. putida* o en *E. coli* ha de combinarse con el diseño correcto del medio de cultivo, así como la optimización del bioproceso para conducir la síntesis hacia elevadas y seguras producciones de ramnolípidos. (Ochsner *et al.*, 1995).

La acumulación de una mezcla compleja de homólogos ha sugerido además, la participación de diferentes intermediarios cuyas reacciones específicas que conducen a la síntesis de ramnolípidos no son del todo conocidas. (Maier *et al.*, 2000)

1.2.4.2.- Valoración del sustrato

Para desarrollar un bioproceso económico es muy importante que los nutrientes requeridos por el microorganismo sean baratos ya que el costo de la materia prima puede ser entre el 10 y el 50% del producto final.

Los sustratos utilizados en la producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* no se han limitado a un tipo específico. Los cultivos se han llevado a cabo sobre sustratos solubles en agua como glucosa (Babu *et al.*, 1996), etanol (Matsufuji *et al.*, 1997), glicerol (Arino *et al.*, 1996), manitol (Déziel *et al.*, 1999 b) y melazas residuales del proceso de obtención de azúcar de remolacha (Patel y Desai, 1997) y sustratos no miscibles en agua; fundamentalmente los aceites vegetales (Robert *et al.*, 1989; Patel y Desai, 1997; Mata-Sandoval *et al.*, 1999; Chayabruta *et al.*, 2001), residuos oleosos de procesos industriales (Mercadé *et al.*, 1997; Haba *et al.*, 2000; Abalos *et al.*, 2001; Benincasa, 2001) y derivados del petróleo (Syldatk *et al.*, 1985 a; Déziel *et al.*, 1999 b). Los aceites vegetales y residuos oleosos favorecen la acumulación de altas cantidades de ramnolípidos (Mercadé *et al.*, 1993, Sim *et al.*, 1997) debido a la presencia de los ácidos grasos, que son incorporados directamente a la β -oxidación facilitando la síntesis *de novo* del β -hidroxiácido (Mata-Sandoval *et al.*, 2000) y la variedad de moléculas homólogas sintetizadas (Déziel *et al.*, 1999 b; Mata-Sandoval *et al.*, 1999, Abalos *et al.*, 2001). La utilización de residuos oleosos además de disminuir los costos de producción de modo que el proceso sea más rentable y competitivo; minimiza la contaminación ambiental provocada por su vertido continuo al medio, acumulándose grandes volúmenes de residuos que por su baja solubilidad en sistemas acuosos son muy difíciles de degradar.

1.2.4.3.- Diseño del medio de cultivo para la producción de ramnolípidos

El diseño del medio de cultivo para la producción de ramnolípidos no ha sido muy estudiado. El procedimiento de diseño más utilizado ha sido por simple omisión o de una variable cada vez (Linhardt, 1989; Robert *et al.*, 1989; Chayabruta *et al.*, 2001; Mata-Sandoval *et al.*, 2001) y con menor regularidad se ha aplicado la técnica de inyección en pulso (Ochsner *et al.*, 1995). La desventaja de estos procedimientos es que no permiten evaluar la interacción entre los factores considerados. El desarrollo de sistemas de células inmovilizadas (Mattei *et al.*, 1986) y el cultivo continuo (Guerra-Santos *et al.*, 1984) han sido vías utilizadas para incrementar los rendimientos de producción en la síntesis de ramnolípidos.

Los principales componentes nutricionales que afectan la acumulación de ramnolipidos son las fuentes de carbono, nitrógeno, fosfato y hierro (Mulligan y Gibbs 1993). En condiciones de desnitrificación se observó que además de las fuentes de carbono y fosfato, el azufre también influyó en la síntesis de ramnolipidos (Chayabruta *et al.*, 2001).

1.2.5.- Propiedades químicas, fisico-químicas y biológicas de los ramnolipidos

1.2.5.1.- Propiedades químicas y fisico-químicas

La determinación estructural de los ramnolipidos se ha realizado utilizando Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C (Choe *et al.*, 1992; Schenk *et al.*, 1994) y Espectrometría de Masas (Parra *et al.*, 1989; Déziel *et al.*, 1999 b). Las técnicas cromatográficas HPLC y TLC también han sido utilizadas en la caracterización de los ramnolipidos producidos por diferentes especies de *P. aeruginosa* (Arino *et al.*, 1996; Mata-Sandoval *et al.*, 1999). La estructura química de los ramnolipidos se caracteriza por dos enlaces fundamentales: enlace éster (COOR) que une las cadenas del β -hidroxiácido y el enlace glicosídico (COC) que une el β -hidroxiácido con el anillo de α -L-ramnopiranososa (Figura 1.1).

Los ramnolipidos son estables a temperaturas elevadas, muy solubles en álcalis y solventes polares, poco solubles en agua e insolubles en ácidos minerales y hexano. El enlace éster se pierde fácilmente por saponificación, y el enlace O-glicosídico entre los anillos de ramnosa es muy sensible en medio ácido. La estructura anfifílica está determinada por la presencia de (los) anillo (s) de α -L-ramnopiranososa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$) y el grupo carboxilo (COOH), que aportan las propiedades hidrofílicas a la molécula, y por la (s) cadena (s) del β -hidroxiácido que aporta las propiedades hidrofóbicas. El grupo carboxilo determina el carácter aniónico de los ramnolipidos (Rosenberg y Ron, 1999) y es el responsable de las reacciones de esterificación (Lang y Wagner, 1987). Los ramnolipidos reducen la tensión superficial del agua desde 72 mN/m hasta valores de 28 a 30 mN/m y más bajos. La tensión interfacial en sistemas agua/aceite es reducida desde 43 mN/m hasta 1 mN/m. La formación de micelas tiene lugar en un rango de concentraciones de 10-200 mg/L (Lang y Wullbrandt, 1999) y actúan como agentes emulsionantes estabilizando emulsiones o/w. (Patel y Desai, 1997)

1.2.5.2.- Propiedades biológicas

Por su naturaleza anfifílica y consiguiente capacidad de adsorberse en las interfases,

los tensoactivos microbianos interactúan con las membranas biológicas. El mecanismo de acción puede ser por: a.- cambio en la permeabilidad de la membrana, b.- solubilización de la membrana, en este caso se pierde la estructura laminar de la membrana y c.- cambio conformacional en las proteínas de membrana debido a que son removidos los fosfolípidos, esto trae como consecuencia la pérdida de actividad biológica. (Schwuger y Bartnik, 1980)

Lang y Wagner observaron que las formas $R_1C_{10}C_{10}$ y $R_2C_{10}C_{10}$ de los ramnolípidos exhibían actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* (Lang y Wagner, 1993). En 1989 Bunster utilizó ramnolípidos para mejorar la humectabilidad de las hojas en plantas (Bunster *et al.*, 1989); mientras que Haferburg observó el efecto antifitoviral para los virus del mosaico del tabaco y la patata. (Haferburg *et al.*, 1987)

La mezcla de mono y dirramnolípidos mostró actividad zoosporicida en las especies fitopatógenas zoospóricas *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora capsici*, *Plasmopara lactucaeradicis* (Stanghellini y Maier, 1997). La actividad zoosporicida se observó por la pérdida de motilidad y posterior lisis de las zoosporas.

1.2.6.- Aplicaciones potenciales de los ramnolípidos

La mayoría de los tensoactivos comerciales son derivados del petróleo y por su estructura química son compuestos muy difíciles de eliminar. El rápido avance de la Biotecnología y la necesidad cada vez más inminente de preservar el medio donde se desarrolla la vida han convertido a los tensoactivos biológicos en una alternativa muy atractiva de los tensoactivos químicos. (Banat y Makkar, 2000)

Los ramnolípidos han sido fuente de materia prima en la obtención de L-ramnosa, compuesto químico muy utilizado en saborizantes alimenticios y que se obtiene a partir de polisacáridos vegetales con múltiples subproductos no deseados. La hidrólisis de los ramnolípidos es sencilla y la reacción es estereoespecífica (Linhard, 1989). Los marcadores fluorescentes del tipo pirenaciléster, obtenidos a partir de ramnolípidos (R-PE), sustituyen la utilización del pireno en el monitoreo de superficies debido a la dificultad de utilización que tiene este compuesto en sistemas acuosos (Ishigami y Suzuki, 1997). Los ramnolípidos también pueden ser aplicados en la industria de cosméticos como parte de liposomas y emulsiones. (Ishigami y Suzuki, 1988)

Kosaric describió la posible aplicación médica de los ramnolípidos como

emulsificantes en el transporte de drogas al sitio de acción, como suplemento del tensoactivo pulmonar o como adyuvantes en preparados vacunales (Kosaric, 1996). La actividad zoosporicida de los ramnolípidos ha sugerido su aplicación en el control de patógenos zoosporicos. (Maier y Soberón-Chávez, 2000)

1.2.7.- Biorremediación

El campo de aplicación más amplio de los ramnolípidos es la biorremediación y biodegradación de hidrocarburos.

El accidente provocado por el petrolero Exxon Valdéz en 1989 frente a las costas de Alaska marcó el inicio de los tratamientos de biorremediación en la restauración de costas, playas y hábitats marinos afectados por la contaminación de hidrocarburos (Atlas, 1991). La **biorremediación** es una tecnología emergente que utiliza la capacidad metabólica de los microorganismos para producir una mineralización o transformación de contaminantes orgánicos, se ha convertido en el método más utilizado para la combatir la contaminación ambiental por hidrocarburos, compuestos químicos tóxicos y las conocidas “mareas negras” o derrames de petróleo en suelos, aguas y zonas costeras. Es un proceso lento que no genera residuos (Atlas, 1991; Maier *et al.*, 2000). Si la biorremediación es realizada en el sitio de contaminación se llama **biorremediación in situ** , por el contrario si se lleva a cabo fuera del sitio contaminado se llama **biorremediación ex situ** (Alexander, 1994). La biorremediación *in situ* se efectúa por adición de nutrientes (NO_3^- y PO_4^{3-} fundamentalmente) o inoculando microorganismos con actividad biodegradativa. La aplicación de cualesquiera de estos procedimientos se conoce como biorremediación por bioaumento o dirigida (Viñas *et al.*, 2001). La biorremediación *in situ* suele emplearse fundamentalmente en la restauración de sistemas acuíferos, costas y playas después de un derrame de petróleo y aunque es poco costoso tiene la desventaja de que el control del proceso es muy difícil (Alexander, 1994). La biorremediación *ex situ* puede realizarse en reactores de fase líquida (slurry-phase) o reactores de fase sólida (biopiles) (Jørgensen *et al.*, 2000). El tratamiento *ex situ* permite controlar mejor el proceso, sin embargo los costes son más elevados. (Alexander, 1994)

1.2.7.1.- Biodegradación de hidrocarburos por microorganismos

Los hidrocarburos se agrupan en tres grandes grupos: hidrocarburos alifáticos (n-alcános en su mayoría), alicíclicos (alcános cíclicos) y aromáticos (bencenos sustituidos) (Maier *et al.*, 2000). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son

moléculas orgánicas derivadas de la fusión de dos o más anillos bencénicos ordenados en línea, ángulo o arreglos cerrados (Figura 1.3).

Los hidrocarburos constituyen una fuente de contaminación ambiental muy frecuente. Su biodegradación por poblaciones microbianas naturales es uno de los principales mecanismos para eliminarlos (Atlas, 1991). La **biodegradación** se define como la reducción de compuestos orgánicos complejos catalizada biológicamente. Cuando la biodegradación de las moléculas orgánicas ocurre hasta su conversión en compuestos inorgánicos se denomina **mineralización** y es exclusiva de la actividad microbiana (Alexander, 1994). La biodegradación de hidrocarburos depende de factores abióticos (solubilidad en agua, biodisponibilidad, estructura molecular, disponibilidad de oxígeno, pH, nutrientes) y bióticos (población microbiana, cometabolismo) (Alexander, 1994) y es un proceso que puede durar horas, días, meses o años según las condiciones. (Atlas, 1991)

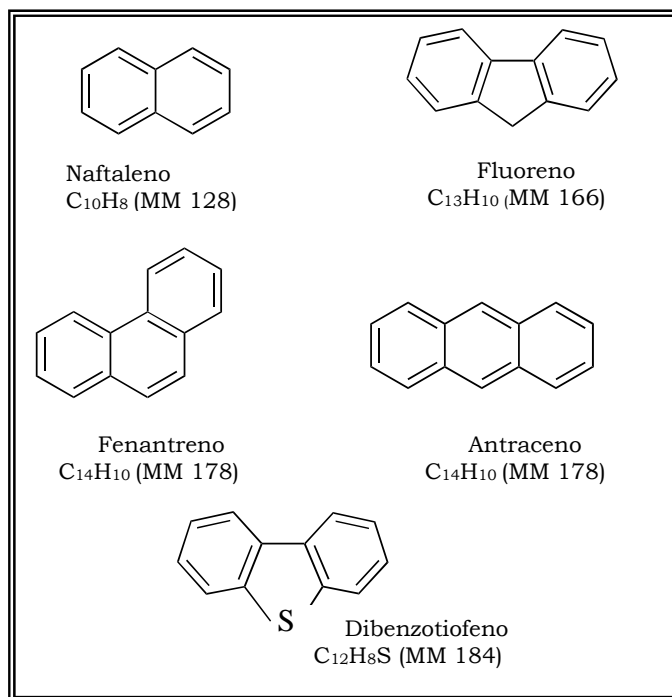


Figura 1.3.- Estructura química los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) más frecuentes en contaminaciones por petróleo y sus derivados.

Una amplia variedad de microorganismos entre bacterias, hongos, levaduras y algas en hábitats marinos poseen capacidad degradadora de hidrocarburos; no obstante los principales responsables de la biodegradación son las bacterias, que normalmente

actúan en los hábitats naturales como comunidades microbianas o poblaciones mixtas, ampliándose así la diversidad de compuestos que pueden ser degradados (Bouchez, *et al.*, 1999). Entre las bacterias destaca el género *Pseudomonas* sp., el cual participa activamente en el proceso de biodegradación. *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus niger*, *Cunninghamella elegans* y *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella autotrophica* son las especies de hongos y algas respectivamente que comúnmente poseen actividad degradativa de HAPs (Cerniglia, 1992). Los n-alcenos son las moléculas más fáciles de degradar y por su similitud con los ácidos grasos muchos microorganismos pueden utilizarlos como fuente de carbono y energía. La degradación puede ocurrir por tres vías metabólicas fundamentales: oxidación terminal, subterminal y ω -oxidación. El paso final de las oxidaciones es la β -oxidación o el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Maier *et al.*, 2000). Los HAPs son los compuestos más difíciles de degradar, ya que por su baja solubilidad en sistemas acuosos permanecen en los diferentes ecosistemas, sin modificación en su estructura química, durante períodos de tiempo muy largos. La hidrofobicidad, recalcitrancia ambiental y genotoxicidad se incrementa con la complejidad de la estructura molecular y variedad isomérica que poseen. El mecanismo de degradación de los HAPs en eucariotas requiere del oxígeno molecular para iniciar el ataque enzimático al anillo bencénico. (Cerniglia, 1992)

1.2.7.2.- Utilización de los tensoactivos en la biodegradación de hidrocarburos

Una estrategia muy frecuente para incrementar la biodisponibilidad de los hidrocarburos por solubilización de los mismos es la utilización de tensoactivos químicos a concentraciones superiores al valor de su concentración micelar crítica (cmc) (Singer *et al.*, 2000; Zheng y Obbard, 2000) y microbianos a concentraciones por encima (Morán *et al.*, 2000; Mata-Sandoval *et al.*, 2000) y al valor de la cmc del tensoactivo (Zhang y Miller, 1992; Olivera *et al.*, 2000). Los biotensoactivos tienen la ventaja que no provocan daños ambientales adicionales y al ser biodegradables pueden ser eliminados sin dificultad. Por otra parte se ha observado que los tensoactivos sintéticos pueden inhibir la actividad degradativa de los microorganismos (Thiem, 1994). Los tensoactivos microbianos más utilizados han sido los emulsanos de *Acinetobacter calcoaceticus* (Rosenberg y Ron, 1997), la surfactina de *Bacillus subtilis* (Morán *et al.*, 2000) y los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa*. (Zhang y Miller, 1992; Noordman *et al.*, 1998; Mata-Sandoval *et al.*, 2000)

Los ramnolípidos facilitan la solubilización de pesticidas nitrogenados en suelos. La solubilización de los pesticidas (485 mmol de pesticida/mol de ramnolípidos) a concentraciones de ramnolípidos superiores al valor de la cmc fue más alta que la

solubilización obtenida cuando se utilizó una concentración de ramnolípidos inferior a la cmc (3.8 mmol de pesticida/mol de ramnolípidos) (Mata-Sandoval *et al.*, 2000). La remoción de n-hexadecano (C₁₆) (Beal, 2000) y n-octadecano (C₁₈) (Zhang y Miller, 1992) en suelos se incrementó de 1.84 a 22.8 µg/L y 9x10⁻³ a 250 mg/L respectivamente con la adición de ramnolípidos. Los porcentajes de biodegradación del naftaleno, fenantreno y antraceno por poblaciones microbianas se incrementaron del 50 al 90% con la presencia de 500 mg/L de ramnolípidos durante el tratamiento de biorremediación de suelos contaminados (Arino *et al.*, 1998; Noordman *et al.*, 1998). La presencia de ramnolípidos redujo diez veces la toxicidad del cadmio (Cd²⁺), durante la biodegradación del naftaleno en suelos por *Burkholderia sp.* (Sandrin *et al.*, 2000). La capacidad emulsionante de los ramnolípidos ha sido utilizada en la recuperación terciaria de petróleo (MEOR), limpieza de tanques de almacenamiento de crudo y lavados de suelos contaminados con petróleo. (Banat, 1995)

1.3.- Desarrollo industrial de un bioproceso

Los problemas fundamentales que se presentan en el escalado industrial de un bioproceso están relacionados con la obtención de cepas superproductoras que permitan alcanzar altos rendimientos con una rápida cinética de producción y la selección adecuada de los componentes del medio de cultivo. (Fiechter, 1986)

1.3.1.- Obtención de cepas superproductoras

La obtención de cepas superproductoras está relacionada con la aplicación de técnicas modernas de Ingeniería Genética (Ochsner *et al.*, 1995) y Bioquímica (Parekh *et al.*, 2000). No obstante, la aplicación de estas técnicas es poco frecuente ya que la regulación de las vías metabólicas y reacciones involucradas en ellas es muy difícil debido por una parte a la velocidad limitante de algunas reacciones catalíticas dentro de todas las vías metabólicas y por otra porque las condiciones que conducen a un mayor rendimiento de metabolitos primarios y secundarios son diferentes. La productividad de una cepa para un metabolito primario se puede incrementar por ingeniería metabólica (Parekh *et al.*, 2000). Para metabolitos secundarios, la situación es más compleja porque frecuentemente intervienen en la síntesis muchas reacciones específicas desconocidas que involucran diferentes enzimas biosintéticos; lo cual requiere un suministro óptimo de precursores. (Parekh *et al.*, 2000). Ha de tenerse en cuenta además que el metabolismo intermediario para la síntesis de metabolitos primarios y secundarios es común y por tanto cualquier cambio operado en la ruta

metabólica para favorecer la superproducción de metabolitos secundarios afectará la ruta metabólica central. (Calam, 1986)

Aún cuando el desarrollo de las cepas que intervienen en un bioproceso puede sentar las bases para que el mismo sea económico, debe combinarse con el desarrollo de las condiciones adecuadas del medio de cultivo de modo que la actividad biosintética de las células hacia el producto final sea óptima.

1.3.2.- Diseño del medio de cultivo

El diseño del medio de cultivo se fundamenta en conocer cuáles son los nutrientes y en qué concentraciones conducen con mejores resultados el metabolismo celular hacia la síntesis del producto deseado (Zhang y Greasham, 1999) y está intrínsecamente relacionado con el desarrollo de la cepa, "no es posible seleccionar la mejor cepa hasta no encontrar el medio óptimo y no es posible diseñar el medio óptimo hasta no tener la mejor cepa". (Kennedy y Krouse, 1999)

La composición del medio puede afectar significativamente la concentración y recuperación del producto, el rendimiento y la productividad volumétrica; parámetros que influyen fuertemente en la economía del bioproceso (Kennedy y Krouse, 1999). El diseño del medio de cultivo muchas veces se complica por la cantidad de factores nutricionales (sustrato, macro y microelementos, factores de crecimiento) y ambientales (aeración, pH, temperatura, agitación) que lo componen (Fiechter, 1986); además del desafío de operar y procesar el volumen de datos generados en el proceso de diseño. Tradicionalmente el diseño de medios de cultivo se ha llevado a cabo en matraces Erlenmeyer agitados, de modo que el cambio en la concentración o naturaleza de un componente provoca un cambio en la respuesta buscada, comparándose los resultados con los del experimento anterior (Zhang y Greasham, 1999). Utilizando técnicas y procedimientos estadísticos es posible, sin embargo, explorar de forma multivariada el dominio experimental y con un mínimo de experimentos alcanzar el óptimo en la respuesta deseada (Boccú *et al.*, 1990). Así, independientemente del bioproceso en estudio puede ser diseñado cualquier medio de cultivo para una respuesta dada.

1.4.- Procedimientos de diseño de medios de cultivo

1.4.1.- Simple omisión o de una variable cada vez

Considerando los numerosos parámetros potencialmente responsables de la biosíntesis de un metabolito, usualmente el medio de cultivo se desarrolla en fase de prueba. (Fiechter, 1986)

La estrategia clásica de diseño del medio de cultivo consiste en variar la concentración de una variable o factor cada vez, mientras el resto se mantiene constante. (Madox y Richert, 1977, Palasota y Deming, 1992). Coccagn-Bousquet determinó por este procedimiento los requerimientos nutricionales reales para el crecimiento de *Lactobacillus lactis* (Coccagn-Bousquet *et al.*, 1995). La producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* DSM 2659 en cultivo continuo se estudió variando una variable cada vez. (Guerra-Santos *et al.*, 1984)

El procedimiento de cambiar un factor cada vez o simple omisión es muy sencillo y el efecto individual de cada factor puede reflejarse gráficamente sin necesidad de un análisis estadístico. Las desventajas son que las interacciones entre los componentes del medio son ignoradas al asumir tácitamente que el valor de una variable o factor que maximiza la respuesta es independiente del resto; lo cual puede conducir a óptimos erróneos y el consumo de tiempo debido a la cantidad de experimentos a realizar si los factores a examinar son varios. (Cochram, 1974, Palasota y Deming, 1992)

1.4.2.- Diseño de Experimentos

Una estrategia de diseño alternativa, que se ha convertido a su vez en una herramienta muy útil en la industria y ramas de la ciencia, es el uso de diseños estadísticos de experimentos que guían al investigador a evaluar más de una variable independiente a un mismo tiempo. La elección del diseño dependerá de la hipótesis en vigor y en cualquier caso, el diseño elegido debe investigar las zonas oscuras que se tienen con el conocimiento actual del problema y cuya iluminación constituye un avance importante. El diseño puede representarse como “una ventana móvil a través de la cual pueden observarse ciertos aspectos de la realidad más o menos distorsionados por el ruido ambiente”. Aún cuando la hipótesis sobre esa realidad pueda ser falsa o inexacta, los datos en sí son generados por esa realidad y solo la actualización continua de la hipótesis y la comparación de las deducciones acerca del

mundo real con los datos obtenidos nos puede conducir hacia la verdad. (Box *et al.*, 1989)

El problema básico del diseño de experimentos es decidir qué configuración de puntos característicos revelará mejor los aspectos de interés del problema. La aproximación comienza con la selección de las variables (de tres a cinco comúnmente), entre todas (más de cinco) las que participan en la respuesta deseada, que influyen sobre esa respuesta. (Zhang y Greasham, 1999)

La teoría del diseño de experimentos fue desarrollada por Ronald Fisher en 1926, quien demostró que era más eficiente evaluar varios factores a la vez, para entender las complejas relaciones que pueden existir entre ellos, que la variación de un factor cada vez. Los primeros trabajos de utilización de las técnicas estadísticas y procedimientos de diseños de experimentos se desarrollaron en Agricultura y Biología en el estudio de la dinámica de poblaciones. Posteriormente su uso se ha ido extendiendo y generalizando hacia otras disciplinas como la Física, Ingeniería Química y diversas ramas de la Industria (Box *et al.*, 1989). El auge del diseño experimental fue hacia la década del 70 y muchos de los estudios realizados hasta entonces aplicando el procedimiento de simple omisión requirieron ser mejorados en sus resultados. Silveira comprobó que la velocidad de producción de biogás por *Methanosarcina barkeri* cuando se diseñó el medio de cultivo en una formación ortogonal se incrementó 1.3 veces respecto al medio diseñado con el procedimiento de simple omisión. (Silveira *et al.*, 1991)

Cuando se habla de “mejorar” un medio de cultivo utilizando un diseño de experimentos es necesario conjugar el procedimiento de diseño con una técnica de optimización. El diseño especifica las distintas variantes del medio que se han de evaluar en el experimento, incluyendo número de réplicas y las combinaciones de prueba dentro de “bloques” homogéneos. La técnica de optimización emplea un modelo matemático que a partir de los datos experimentales, predice y “mejora” la composición del medio de cultivo (Kennedy y Krouse, 1999). Las técnicas de optimización pueden ser secuenciales (son desarrolladas en etapas dependientes una de otra) y no secuenciales (son desarrolladas en etapas independientes entre sí).

1.4.3.- Procedimientos de diseño experimental

El procedimiento de diseño de experimentos más conocido es el diseño factorial.

El diseño factorial consiste en fijar l niveles de k variables o factores (Box *et al.*, 1989). Si consideramos l_1 niveles para el factor k_1 ; l_2 niveles para el factor k_2 ; y l_k niveles para el k -ésimo factor; las $l_1 \times l_2 \times \dots \times l_k$ condiciones experimentales se llama diseño factorial $(l_1 \times l_2 \times \dots \times l_k)^k$. El número de combinaciones elementales requeridas en el diseño factorial es el producto de los l niveles de los k factores. Por ejemplo: un factorial $2 \times 3 \times 5$ significa que para tres variables independientes donde $k_1= 2$ niveles; $k_2= 3$ niveles y $k_3= 5$ niveles; requiere 30 experimentos elementales.

Los diseños factoriales permiten evaluar la significación relativa de los diferentes factores cuando se sospecha de la existencia de interacciones complejas entre ellos. (Hounsa *et al.*, 1996)

1.4.3.1.- Diseño completamente factorial

En este diseño son evaluadas todas las l^k combinaciones posibles de los factores que son estudiados (Box *et al.*, 1989). Los niveles de experimentación de los factores son codificados para analizar cómodamente los resultados y posteriormente traducidos a sus valores reales. La influencia o el efecto de las variables, así como de las interacciones (antagónicas o sinérgicas) entre ellas se determina aplicando el algoritmo de Yates. (Rincón *et al.*, 1993). Este tipo de diseño es aplicable a la construcción de modelos microbianos. (Davies, 1993)

1.4.3.2.- Diseño factorial parcial, incompleto o fraccionado

Este diseño fue introducido por Plackett y Burman en 1946. Si el número de combinaciones a examinar en el diseño completamente factorial es impracticable (generalmente más de tres variables a más de tres niveles) se recurre a un diseño factorial parcial, es decir se evalúa solo una fracción del diseño factorial completo. Se aplica a dos niveles y se asume que los efectos de las variables son aditivos, es decir no hay interacciones entre los factores. (Davies, 1993)

La aplicación del diseño factorial incompleto a la producción de γ -interferón recombinante por células de ovario de hámster chino, aumentó la producción en un 45%. (Castro *et al.*, 1992). Fueron examinados 20 componentes del medio en 24 experimentos.

A partir del diseño factorial se han elaborado otros procedimientos de diseño experimental que permiten también estudiar la influencia de la composición del medio

en una respuesta determinada. Entre ellos se destacan la Formación ortogonal, el Rectángulo Latino ortogonal y el Diseño compuesto.

1.4.3.3.- Formación ortogonal

Es un diseño factorial incompleto que se construye en base a una matriz de columnas ortogonales. Este tipo de diseño no estima la interacción entre los efectos. (Box y Tyssedal, 1996)

1.4.3.4.- Rectángulo Latino ortogonal

Es una formación rectangular de símbolos no repetidos en filas ni columnas. Es muy útil cuando los efectos de los factores son aditivos y puede ser usado para construir diseños factoriales parciales. (Kennedy y Krouse, 1999)

1.4.3.5.- Diseño compuesto

Es un diseño que se construye adicionando nuevas combinaciones a las correspondientes en el factorial 2^k .

Si se adicionan $2k$ combinaciones de factores el diseño se llama diseño central compuesto (DCC) y el número total de combinaciones responde a la forma $2^k + 2k$. Por el contrario si se adicionan k combinaciones en el factorial 2^k (una para cada factor) el diseño se llama diseño no central compuesto (DNCC) y el número total de combinaciones a evaluar serán $2^k + k$. (Cochram, 1974; Box *et al.*, 1989)

1.5.- Técnicas secuenciales de Optimización

1.5.1.- Optimización Evolucionaria (EVOP)

Permite estudiar el efecto de dos o tres factores simultáneamente. Las respuestas son analizadas estadísticamente para llegar a una conclusión. El desarrollo de la técnica es secuencial porque el diseño de una fase depende de los resultados de la fase anterior. (Banerjee y Bhattachyyra, 1992)

1.5.2.- Simplex

Es una técnica secuencial alternativa a la EVOP y se basa en un diseño geométrico conocido como simplex regular de n dimensiones. El simplex en dos dimensiones es un triángulo equilátero, y en tres, un tetraedro regular. (Saguy, 1982)

1.5.3.- Complex

Al igual que el Simplex es una técnica secuencial basada en evaluar y comparar los valores de la función en todos los vértices de un simplex, desplazando el peor punto hacia uno nuevo. (Saguy, 1982)

1.6.- Técnicas no secuenciales de Optimización

1.6.1.- Inyección en pulso

Esta técnica se fundamenta en cultivos discontinuos en los cuales el crecimiento celular se interrumpe al agotarse un nutriente esencial. Si cuando esto ocurre, el nutriente adecuado es añadido en pulso, el crecimiento puede continuar. (Kennedy 1999). En la práctica los pulsos de nutrientes se añaden hasta identificar cuál es el nutriente correcto. La desventaja de la técnica es el consumo de tiempo que supone. Nielsen y Ochsner utilizaron la técnica de inyección en pulso para estudiar el curso de la fermentación láctica y la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* PG202 respectivamente. (Nielsen y Benthin, 1990; Ochsner *et al.*, 1995)

1.6.2.- Metodología de Superficies de Respuesta (MSR)

Es una técnica donde se combinan la estrategia experimental y un modelo matemático y de inferencia estadística que permiten estudiar un sistema en el cual la respuesta, crecimiento celular, por ejemplo, está influenciada por un número de variables (nutrientes, pH, temperatura). (Box *et al.*, 1989)

1.7.- Técnicas computacionales de diseño

Con el desarrollo de la informática, se han desarrollado nuevas técnicas de diseño, conocidas como diseños computacionales. Son algoritmos que no se basan en aproximaciones a modelos matemáticos y permiten examinar un gran número de variables simultáneamente en un proceso fermentativo o bioproceso. La aproximación

se hace de manera iterativa y no requiere de conjeturas iniciales por parte del investigador en lo que se refiere al intervalo de concentraciones de las variables o condiciones de cultivo (Parekh *et al.*, 2000). Los más conocidos son el Algoritmo Genético (AG) y la Optimización del enjambre de partícula (OEP).

1.7.1.- Algoritmo Genético (AG)

Se basa en desarrollar un sistema imitando los procesos de mutación y selección natural del proceso evolutivo (Kennedy y Krouse, 1999; Zhang y Greasham, 1999). La aproximación se efectúa adaptando la “población” de experimentos a determinadas condiciones y evaluar posteriormente aquellos experimentos (“la próxima generación”) que mejores resultados alcanzaron a partir del experimento “parental”. El proceso continúa hasta alcanzar el resultado deseado. En esta técnica cada experimento, la composición del medio, por ejemplo; se “codifica” en un cromosoma donde cada constituyente del medio a una concentración definida representa un gen. Weuster-Boltz utilizó el AG durante el estudio de trece componentes del medio de cultivo para la producción del aminoácido L-lisina con *Corynebacterium glutamicum*. Después de nueve iteraciones con el medio obtenido la producción de L-lisina se incrementó de 95 a 120 mM. (Weuster-Boltz *et al.*, 1997)

1.7.2.- Optimización del enjambre de partícula (OEP)

Similar al AG, esta técnica parte de una “población” respecto a los niveles de las variables. Cada individuo (matraz) en la población está representa por su posición en el espacio de diseño (niveles de las variables) y su velocidad (cambio en los niveles de nutrientes comparado con la iteración previa). Con la aplicación de esta técnica se logró un incremento del 41% en la producción del antifúngico echinocandina B al examinar 15 componentes del medio en nueve iteraciones. (Parekh *et al.*, 2000)

1.8.- Métodos de inteligencia artificial

Estas técnicas son más empleadas en el control del proceso, que para el diseño del medio de cultivo en sí (Parekh *et al.*, 2000). Las más conocidas son las Redes Neuronales Artificiales (RNA) y Seguir las reglas (Fuzzy logic).

1.8.1.- Redes Neuronales Artificiales (RNA)

Es una técnica basada en modelos de regresión no lineales y discriminación de un

análisis estadístico común. La técnica tiene la ventaja de que no requiere de mucho conocimiento del sistema biológico y puede tratar con resultados no lineales. Con esta técnica se diseñó el medio de cultivo de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de etanol. (Hajmeer *et al.*, 1998)

1.8.2.- Seguir las reglas (Fuzzy logic)

Es una técnica de multiestimación lógica que permite definir el grado de pertenencia de una categoría definida a través de un valor verdadero (1) y uno falso (0). Kennedy y Reader utilizaron esta técnica para diseñar un medio de fermentación donde la concentración del sustrato (alta, media, baja) era la categoría definida. (Kennedy y Reader, 1992)

1.9.- Metodología de Superficies de Respuesta (MSR)

La metodología de Box-Wilson, conocida hoy como Metodología de Superficies de Respuesta (MSR), es una combinación de técnicas empíricas para el diseño de experimentos, construcción de modelos, evaluación del (los) efecto (s) de las variables y búsqueda de las condiciones óptimas de los factores estudiados que permiten alcanzar la respuesta deseada de acuerdo a uno o más criterios seleccionados. La MSR fue desarrollada por Box y Wilson en 1951 (Box *et al.*, 1989) para optimizar los procesos químicos de producción. Su utilización en la Industria Química ha sido muy amplia; sin embargo su aplicación al diseño de medios de cultivo no es muy frecuente.

Con la Metodología de Superficies de Respuesta pueden ser respondidas tres interrogantes fundamentales: ¿Cómo en una región de interés un conjunto de 2 a 5 variables afectan una respuesta determinada? ¿Qué niveles, si es que existe alguno, de las variables de control permitirán alcanzar una respuesta que satisfaga simultáneamente las especificaciones deseadas? y ¿Para qué valores de las variables de control se producirá un máximo o un mínimo en una respuesta específica y cómo es la superficie de respuesta en las inmediaciones de ese máximo o mínimo? (Box *et al.*, 1989). La respuesta de estas interrogantes aplicando la MSR requiere la ejecución de tres pasos: 1° un diseño estadístico de experimentos, 2° estimación de los coeficientes a un modelo matemático que describa la superficie de respuesta y 3°.comprobar que el modelo matemático describe adecuadamente esa superficie de respuesta.

En la Tabla I.1 aparecen relacionados los principales trabajos realizados en la última

década sobre diseño de medios de cultivo utilizando la MSR.

Tabla I.1.- Aplicación de la Metodología de Superficies de Respuesta (MSR) en el diseño de medios de cultivo.

Objetivo	Respuesta
Reducción estereoselectiva de acetato de etilo por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Boccú <i>et al.</i> , 1990)	Pureza óptica, Biomasa, Sustrato reducido
Producción de lípidos por <i>Rhodotorula gracilis</i> CFR-1 (Prapulla <i>et al.</i> , 1992)	Producción de grasas
Velocidad de crecimiento de <i>Yersinia enterocolitica</i> (Bhaduri <i>et al.</i> , 1995)	Crecimiento microbiano
Bioconversión de xilosa a xilitol (Roberto <i>et al.</i> , 1995)	Concentración de xilosa Concentración de xilitol
Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> YIT 9018 (Oh <i>et al.</i> , 1995)	Crecimiento microbiano
Obtención del enzima pectatoliasa (Hounsa <i>et al.</i> , 1996)	Biomasa Actividad enzimática
Producción de soforolípidos (Casas <i>et al.</i> , 1997)	Biomasa
Producción de Surfactina (Sen, 1997)	Concentración micelar crítica
Obtención de ácidos grasos poli-insaturados ω -3 (Wanasundara y Shahidi, 1998)	Concentración de ácidos poli-insaturados
Producción de astaxantina por <i>Phaffia rhodozyma</i> (Vázquez y Martín, 1998)	Biomasa
Producción de xilanasa por <i>Thermoascus aurantiacus</i> (Souza <i>et al.</i> , 1999)	Actividad xilanasa
Solubilización de lecitina de soja (Began <i>et al.</i> , 2000)	Solubilidad de lípidos
Extracción de proteínas de paloma (Yurika <i>et al.</i> , 2000)	Concentración de proteínas
Conversión de almidón a H ₂ (Lay, 2000)	Hidrógeno producido
Producción de amilasa por <i>Bacillus circulans</i> GRS 313 (Dey <i>et al.</i> , 2001)	Producción de amilasa
Producción de exopolisacárido por <i>Agrobacterium radiobacter</i> (Triveni <i>et al.</i> , 2001)	Acumulación de EPS

1.9.1.- Diseño estadístico de experimentos

1.9.1.1.- Diseño rotacional central compuesto

El diseño rotacional central compuesto (DRCC) es el diseño de experimentos comúnmente utilizado en la técnica de optimización de MSR.

Un diseño central es un **diseño factorial** a dos niveles superpuesto en un **diseño estrella**. Se construye por la adición de $2k$ combinaciones a un factorial 2^k para k factores o variables independientes. Los puntos centrales de ambos diseños coinciden. (Palasota y Deming, 1992)

Los niveles codificados de cada variable en el diseño factorial son denotados por -1 y $+1$ y en el diseño central compuesto por $-\alpha$ y $+\alpha$. El número total de combinaciones de tratamientos es $2^k + 2k$ y los experimentos son realizados a cinco niveles de las variables independientes: $-\alpha$; -1 ; 0 ; $+1$; $+\alpha$; donde $-\alpha$ corresponde al valor más bajo; -1 corresponde al valor bajo; 0 corresponde al valor central; $+1$ corresponde al valor alto y $+\alpha$ corresponde al valor más alto. El valor de α en un diseño central compuesto rotacional es $2^{k/4}$, representa la distancia a la que se encuentran los puntos en el diseño estrella y se escoge con tres fines: a.- para que los coeficientes sean ortogonales uno respecto al otro, es decir sobre un mismo eje coordenado a ambos lados del origen, b.- minimizar el sesgo si la superficie de respuesta resultante no fuese cuadrática y c.- darle al diseño la propiedad de ser **rotacional** (Cochram, 1974). Así, la matriz que representa el diseño central compuesto contiene todas las combinaciones de las variables que serán examinadas bajo los valores codificados $(-\alpha; -1; 0; +1; +\alpha)$.

A los diseños centrales compuestos se les aplica el criterio de rotabilidad. Ello significa colocar entre 5 y 7 puntos repetidos en el centro de la estrella, que es el punto crítico en la construcción del modelo. De este modo, los puntos del centro dan $(n-1)$ grados de libertad, para n puntos centrales, permitiendo estimar el error experimental y determinar la precisión de la respuesta en el centro y cerca de él y por tanto el error estándar de la respuesta será el mismo en todos los puntos equidistantes del centro de la región. (Cochram, 1974, Box *et al.*, 1989)

Resumiendo lo expuesto, el diseño rotacional central compuesto (DRCC) es un procedimiento estadístico que contiene tres grupos de experimentos. **Primer grupo:** 2^k puntos experimentales del diseño factorial de k variables a los niveles -1 y $+1$. **Segundo grupo:** $2k$ puntos experimentales del diseño estrella a los niveles $-\alpha$ y $+\alpha$. **Tercer grupo:** n_0 puntos centrales repetidos al nivel central (0). (Goupy, 1999)

La representación geométrica del diseño central compuesto es un sólido o estrella de k dimensiones por lo que si son estudiadas más de tres variables no es posible representar el diseño estrella.

1.9.2.- Modelo matemático

1.9.2.1.- Polinomio de segundo orden

El diseño factorial 2^k como base del diseño central compuesto es útil para determinar

cuál o cuáles variables son las más relevantes en la respuesta buscada e identificar la dirección de las experimentaciones futuras; sin embargo este procedimiento de diseño es inapropiado cuando se requiere explorar toda la región en el espacio de la variable examinada y describir completamente la conducta de la función respuesta dentro del mismo. En tal caso, para estudiar completamente el dominio y mejorar el ajuste de la superficie de respuesta se necesitan calcular coeficientes de segundo orden y verificar si alguna curvatura caracteriza la función. (Boccú *et al.*, 1990)

Si el diseño estadístico de experimentos utilizado para obtener los datos es un DRCC, frecuentemente es empleado como modelo matemático una ecuación polinomial de segundo orden para ajustar los datos y predecir los niveles de las variables que se requieren para obtener la máxima respuesta deseada (Cochram, 1974; Box *et al.*, 1989). El modelo de segundo orden cuadrático tiene la forma: $\mathbf{Y} = b_0 + \sum_i b_i X_i + \sum_{i < j} b_{ij} X_i X_j + \sum_i b_{ii} X_i^2 + e$ donde \mathbf{Y} es la respuesta estudiada; b_0 el intercepto; b_i representa el coeficiente de los términos lineales e indican la pendiente de cada factor; b_{ii} representa el coeficiente de los términos cuadráticos, e indican la curvatura y b_{ij} representa el coeficiente de los términos de los productos cruzados e indican las interacciones entre los factores; es decir mide cuánto varía la pendiente del factor X_i cuando el factor X_j aumenta o disminuye. Los términos de interacción entre tres factores frecuentemente son insignificantes y pueden eliminarse de la ecuación polinomial (Palasota *et al.*, 1992). Como el modelo cuadrático tiene en cuenta las interacciones entre los factores y los efectos cuadráticos, ofrece una buena aproximación de la verdadera conducta del sistema estudiado por encima del factor dominante (Box *et al.*, 1989; Parekh *et al.*, 2000). El estudio matemático de la superficie de respuesta cuando participan cuatro o más factores se puede simplificar por medio del análisis canónico; el cual se fundamenta en una rotación de los ejes coordenados hacia un nuevo origen, con el objetivo de eliminar los términos de interacción ($b_{ij}X_iX_j$), o traslación del origen hacia el máximo o mínimo de la superficie de respuesta. (Goupy, 1999)

El modelo de superficie o superficie de respuesta de la función que se estudia (respuesta) es un gráfico de la respuesta del sistema frente a las variables que tienen alguna influencia en dicha respuesta. Se representa en un gráfico tridimensional donde el eje vertical representa la respuesta (\mathbf{Y}) y los dos ejes horizontales representan los niveles codificados ($-\alpha$; -1 ; 0 ; $+1$; $+\alpha$) de los dos factores examinados que más influyen en la respuesta. El resto de los factores, si los hubiera, que no han sido representados en el gráfico tridimensional, son fijados a su nivel óptimo; es decir al nivel para el cual la respuesta deseada es máxima. (Oh *et al.*, 1995)

1.9.3.- Validación del modelo matemático

La validación del modelo matemático tiene como objetivo demostrar que la ecuación polinomial utilizada se ajusta y describe correctamente la función respuesta predicha por la regresión; sin embargo pocas veces se lleva a cabo este paso de comprobación cuando se aplica la MSR como técnica de optimización para el diseño del medio de cultivo. (Bódalo *et al.*, 1997; Oh *et al.*, 1995; Yurika *et al.*, 2000)

Objetivos

La premisa fundamental en cualquier proceso industrial o biológico es obtener el producto deseado con altos rendimientos y bajos costos producción. En los procesos biotecnológicos, donde los microorganismos tienen un papel fundamental, esta premisa cobra mayor importancia debido a la cantidad de factores y/o parámetros que intervienen en el bioproceso. Considerando lo expuesto, en la realización de este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Incrementar la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 aplicando como procedimiento estadístico la Metodología de Superficies de Respuesta (MSR).
- Aplicación de los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 a la biodegradación del crudo de petróleo Casablanca por el consorcio microbiano AM.

Para alcanzar los objetivos propuestos se trazó el siguiente plan de trabajo:

- Diseño de la matriz experimental, obtención de los valores óptimos y las superficies de respuestas.
- Caracterización química, fisico-química y biológica de los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10.
- Aplicación de los ramnolípidos de *P. aeruginosa* AT10 a la biodegradación del crudo de petróleo Casablanca.

2.1.- Microorganismos

Pseudomonas aeruginosa AT10

La cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT10 fue aislada de suelos contaminados con residuos oleosos del proceso de refinado de aceites comestibles en los alrededores de la planta refinadora de aceites ERASOL en la ciudad de Santiago de Cuba, Cuba. La cepa se mantuvo durante toda la etapa experimental a 4°C en placas de TSA con resiembras mensuales y alternativamente en bolas de congelación a -20°C (Cryo-Billes, Francia). (Abalos *et al.*, 2000)

Consorcio microbiano AM

El consorcio microbiano AM fue aislado de arenas contaminadas con crudo de petróleo (Sabaté, 1998) y pertenece a la colección del grupo de biodegradación de hidrocarburos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología. El consorcio se mantuvo por resiembras quincenales en medio mineral (BMTM) y 0.1% v/v de la mezcla de hidrocarburos aromáticos antraceno, fluoreno, fenantreno, fluoranteno y pireno.

2.2.- Medio de cultivo. Inóculo y condiciones de cultivo

El inóculo de 24 h de incubación se preparó a partir de 50 mL de un medio mineral compuesto por (g/L): NaNO₃, 3; K₂HPO₄/KH₂PO₄ (2:1 m/m), 1.5; FeSO₄.7H₂O, 0.010; CaCl₂, 0.01; KCl, 0.10; MgSO₄.7H₂O, 0.50; Extracto de levadura, 0.10 y 0.05 mL/L de una solución de elementos trazas de composición (g/L): H₃BO₃, 0.26; CuSO₄.5H₂O, 0.50; MnSO₄.H₂O, 0.50; MoNa₂O₄.2H₂O, 0.06; ZnSO₄.7H₂O, 0.70. Como fuente de carbono se utilizaron 20 g/L del residuo de ácidos grasos libres (RAGL) procedente de la planta refinadora ERASOL.

Una alícuota de este cultivo se centrifugó (10 min, 5000 rpm) para preparar, con el pellet celular, una suspensión de DO_{540 nm} = 2. Un 2% de la suspensión celular obtenida se inoculó en el medio. El pH se ajustó en todos los casos a 6.8.

Los experimentos se realizaron por triplicado en matraces Erlenmeyer con muescas y 500 mL de capacidad, conteniendo 50 mL de medio. El medio de cultivo fue esterilizado a partir de una solución concentrada de cada uno de los componentes

durante 20 min a 120°C y 1 atm. Los cultivos fueron incubados durante 96 h en un agitador recíproco a 120 rpm y 30°C.

2.3.- Desarrollo de la matriz experimental

El desarrollo de la matriz experimental, la confirmación de los modelos de superficie de respuesta obtenidos, así como la comprobación experimental de los máximos para cada función respuesta se llevó a cabo utilizando el mismo medio mineral basal del inóculo (apartado 2.2), variando únicamente las concentraciones de la fuente de carbono (RAGL); nitrógeno (NaNO_3); fosfato ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) y hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) según la combinación a estudiar. Las condiciones experimentales fueron las descritas en el apartado 2.2.

2.3.1.- Diseño experimental y técnica de optimización

Se utilizó un diseño experimental rotacional central compuesto (DRCC) para 4 variables independientes o factores. Las variables independientes, estudiadas fueron las fuentes de carbono (RAGL; X_1), nitrógeno (NaNO_3 ; X_2), fosfato ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$; X_3) y hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; X_4). La técnica de optimización que se empleó fue la Metodología de Superficies de Respuesta (MSR).

2.3.2.- Funciones respuestas y cuantificación de las respuestas

Y_1 : producción de ramnolípidos = g/L de ramnolípidos y

Y_2 : biomasa = g/L de peso seco

2.3.2.1.- Cuantificación de los ramnolípidos

Los ramnolípidos se cuantificaron por Espectroscopía de Absorción Molecular, mediante el método espectrofotométrico de desarrollo de color con curva de calibrado ($y = 1.98e^{-2} - 3.3e^{-3}$) como procedimiento de cálculo, utilizando una solución de ramnosa como patrón (Chandrasekaran y Bemiller, 1980). El contenido de ramnolípidos se calculó multiplicando el contenido de ramnosa por el factor 3, el cual representa la correlación ramnolípidos/ramnosa (Itoh *et al.*, 1971). Este factor de correlación se comprobó además, experimentalmente usando la recta de calibrado de ramnolípidos $y = 2.1e^{-2} - 6.4e^{-3}$ (Abalos *et al.*, 2001)

2.3.2.2.- Cuantificación de la biomasa

La biomasa celular se cuantificó por el peso seco de las células de una alícuota de 5 mL de cultivo durante 24h a 100°C.

2.3.3.- Análisis estadístico y Modelo matemático

Los datos fueron analizados por regresión múltiple, utilizándose un polinomio de segundo grado o cuadrático como modelo de ajuste.

Para los cálculos de regresión se usó el Software Essential Regression (www.geocities.com/SiliconValley/Network/1032). Los análisis gráficos se realizaron con el Software Microsoft Excel 7.0 (Microsoft Corporation, Redmont, WA).

2.4.- Caracterización química de la fuente de carbono (RAGL)

La composición de la fuente de carbono (RAGL), se determinó por Cromatografía de Gases (GC) previa metanólisis con una solución de NaOH $C_{\text{NaOH}} = 0.5 \text{ mol/L}$ según Folch en 1957. (Folch *et al.*, 1957)

Los ésteres metílicos se analizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 (Hewlett Packard, Palo Alto, EUA) equipado con un inyector de split, columna capilar de 60m x $\phi_i = 0.25 \text{ mm}$ (Supelco SP 2380) y detector de ionización a la llama (FID). Las condiciones de trabajo fueron: temperatura columna: 200°C (isoterma); flujo de Helio: 0.57 mL/ min; relación de split: 1/100; temperatura detector: 300°C; temperatura inyector: 250 °C. La integración de los picos se realizó en un HP-Chem (Hewlett Packard, Palo Alto, EUA).

2.5.- Recuperación y purificación de los ramnolípidos

La recuperación y purificación de los ramnolípidos se realizó por cromatografía de adsorción en columna y precipitación ácida.

2.5.1.-Purificación por columna de adsorción

Para llevar a cabo el estudio fisico-químico, los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 se recuperaron del cultivo por centrifugación en una Centrikon T-124 (Kontron, Milano , Italia) a 8000 rpm (7500 g) durante 20 min. El

sobrenadante libre de células obtenido fue acidificado a pH 6.1 y depositado en una columna de adsorción cromatográfica de Amberlita XAD-2 (Sigma, St. Louis, EUA) para su posterior elución con metanol. La purificación se llevó a cabo por una modificación del método descrito por Reiling. (Reiling *et al.*, 1986)

2.5.2.- Purificación por precipitación ácida

La purificación por precipitación ácida de los ramnolípidos se realizó teniendo en cuenta la presencia del grupo carboxilo en las moléculas de ramnolípidos.

El sobrenadante libre de células obtenido como ya se describió en el apartado anterior se acidificó con Acido Sulfúrico (H₂SO₄) concentrado hasta pH 1-2 aproximadamente. La solución acidificada se conservó a 4°C durante 24 h. El precipitado (ramnolípidos) fue recuperado por centrifugación (7500 g, 20 min, 15°C), lavándose varias veces con agua destilada acidificada.

2.6.- Caracterización química, físico-química y biológica

2.6.1.- Caracterización química por HPLC/ESI-MS

La identificación de los diferentes ramnolípidos se realizó por HPLC/ESI-MS (High-performance Liquid Chromatography/ Electrospray Ionisation-Mass Spectrometry).

A partir de una solución metanólica de 10 mg/mL (metanol grado HPLC), 10 µL de muestra fueron analizados en un HPLC Waters 2690 (Waters, Midford, EUA) acoplado a un detector de masas. La separación cromatográfica en modo fase reversa se llevó a cabo en las siguientes condiciones: Columna C₁₈ (SPHERISORB ODS2) de 150 x 4.6 mm y 0.5 µm de φ_i (Teknochroma, San Cugat, España); fase móvil: Acetonitrilo/agua (AcN/H₂O) con un 0.1% (v/v) de Acido Acético en cada solvente; gradiente de fase móvil: se inició con un 30% de AcN durante 2 min, incrementándose la concentración de AcN hasta 100% en 30 min y manteniéndose esta concentración durante 5 min; velocidad de flujo: 1 mL/min; sistema de split: 1:50

Para la elución total de la muestra se adicionaron post-columna 200 µL/min de acetona a través de una bomba de jeringa Phoenix 20 (Carlos Erba). La fase móvil y la acetona se mezclaron en una T (Valco).

El espectro de masas se obtuvo en un cuadrupolo VG Plataform II (Micromass, Manchester, UK) provisto de una fuente de electrospray. Las condiciones del electrospray fueron: modo Electrospray negativo (N-ES); secado con nitrógeno calentado a 100°C; introducción en el capilar a una velocidad de flujo de 400 L/ h; potencial aplicado al capilar: -3.5 kV; voltajes de extracción de -35 V (detección de las moléculas) y -80 V (visualización de posibles fragmentaciones). Los datos espectrales fueron obtenidos en un barrido de masas desde m/z 100 a 750. La integración de los picos se realizó utilizando el software MassLynx.

2.6.2.- Caracterización físico-química

La caracterización físico-química se realizó determinando los parámetros superficiales tensión superficial (γ_{TS}), tensión interfacial (γ_{TI}), concentración micelar crítica (cmc), exceso superficial (Γ_T) y pC_{20} .

Las determinaciones de las tensiones superficial e interfacial (vs hexadecano) se realizaron en un tensiómetro Krüss K1 utilizando el método de placa de Wilhelmy, mientras que la concentración micelar crítica (cmc), se determinó a partir del gráfico TS vs log C obtenido con el software Microsoft Excel 97 SR-1. Las diferentes concentraciones se prepararon por diluciones sucesivas de una solución acuosa concentrada de muestra 2 g/L. Con el objetivo de alcanzar el equilibrio las muestras se mantuvieron en reposo de 1 a 2 horas a 25°C. La placa de platino y todo el material de vidrio utilizado se limpió cuidadosamente con mezcla crómica.

2.6.3.- Ensayos de Solubilidad

Se ensayaron 9 solventes entre orgánicos e inorgánicos. Para ello se disolvió una punta de espátula (100 mg aproximadamente) en 1 mL de los reactivos relacionados a continuación: H₂O; Acidos Clorhídrico (HCl) y Sulfúrico (H₂SO₄); Hidróxido de Sodio (NaOH); Hidrogenocarbonato de Sodio (NaHCO₃); Metanol (CH₃OH); Acetato de Etilo (CH₃COOCH₂CH₃); Eter Etilico (CH₃CH₂OCH₂CH₃); Cloroformo (CHCl₃) y Hexano (C₆H₁₄). La obtención de una fase homogénea se consideró como ensayo positivo.

2.6.4.- Ensayos de Emulsificación

Los ensayos de emulsificación de los ramnolípidos purificados por columna de adsorción se llevaron a cabo con diferentes fases hidrofóbicas de composición química diversa: aceite de linaza (glicéridos de C_{18:2}), aceite de almendras (C₁₆, C₁₈, C_{18:1}, C_{18:2}),

crudo de petróleo (mezcla de hidrocarburos alifáticos y poliaromáticos), keroseno (mezcla de n-alcanos ligeros), Tolueno (C₆H₅CH₃), Benceno (C₆H₆), n-alcanos (C₁₂₋₁₄) y aceite mineral (>C₂₈). Las emulsiones se prepararon por pesada (1g final), mezclando previamente los ramnolípidos con la fase hidrofóbica y agitando vigorosamente durante 1 min. Posteriormente se añadió la fase acuosa seguida de agitación vigorosa durante 1 min. Se dejaron reposar, sin agitación posterior, 24 h a temperatura ambiente y transcurrido ese tiempo se calculó el porcentaje de emulsificación (E₂₄).

$$\%E = (\text{Peso emulsión 24 h} - / \text{Peso total}) \times 100$$

2.6.5.- Diagrama ternario de fases

El diagrama ternario de fases se construyó a partir de una serie de emulsiones de composiciones diferentes. Las emulsiones se prepararon según se describió en el apartado 2.6.4. Los intervalos de concentración (m/m) ensayados para cada componente del sistema fueron: petróleo 5-80%, agua 10-95% y ramnolípidos 5-20%.

2.6.6.- Propiedades biológicas

La actividad antimicrobiana de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* AT10 se determinó de acuerdo a los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI).

La actividad antibacteriana fue ensayada utilizando el método de diluciones seriadas con incubación en placas de microtitulación (Microtiters) 24 h a 37°C (Woods y Washington, 1995) y la actividad antimicrobiana frente a levaduras y hongos fue determinada en medio sólido con placas de agar Sabouraud incubadas durante 72 h a 25°C (Espinel-Ingroff y Pfaller, 1995).

Un amplio rango de bacterias Gram negativas y Gram positivas fueron ensayadas: *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Citrobacter freundii* ATCC 22636, *Enterobacter aerogenes* CECT 689, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Klebsiella pneumoniae* var. *pneumoniae* CECT 178, *Proteus mirabilis* CECT 170, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella thyphimurium* ATCC 16028, *Serratia marcescens* CECT 274, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* var. *mycoide* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 11228, *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* ATCC 10541, *Micrococcus luteus* ATCC 9631, *Arthrobacter oxydans* ATCC 8010, *Mycobacterium phlei* ATCC 41423 and *Clostridium perfringens* ATCC 486. Levaduras: *Candida albicans* ATCC 10231, *Rhodotorula rubra*

CECT 1158 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Hongos: *Aspergillus niger* ATCC 14604, *Aureobasidium pullulans* ATCC 9348, *Chaetonium globosum* ATCC 6205, *Gliocladium virens* ATCC 4645, *Penicillium chrysogenum* CECT 2802, *Penicillium funiculosum* CECT 2914, *Colletotrichum gloesporioides*, *Botrytis cinerea*, *Rhizotecnia solani*, and *Fusarium solani*.

2.7.- Detección y análisis de las inclusiones lipídicas

2.7.1.-Microscopía Electrónica de transmisión

La detección de las inclusiones lipídicas se realizó mediante la técnica de Microscopía Electrónica de transmisión.

El pellet celular procedente de 1-2 mL de cultivo se lavó con tampón Sørensen de concentración 0.3 mol/L (pH 7.38). Posteriormente se resuspendieron en una solución 2.5% v/v de glutaraldehído en tampón Sørensen (0.1 mol/L) y se fijaron según Mínguez *et al.*, 1986. Las secciones obtenidas se tiñeron posteriormente con una solución al 1% (m/v) de acetato de uranilo y citrato de plomo para su visualización en un microscopio electrónico Phillips EM 301 (Eindhoven) con un voltaje de aceleración de 60 kV.

2.7.2.- Extracción de las inclusiones lipídicas

La extracción de las inclusiones se llevó a cabo mediante extracción continua en Soxhlet con triclorometano (CHCl₃) durante 24 a 85-90 ° C. (Cromwick *et al.*, 1996)

La biomasa celular utilizada se obtuvo por centrifugación (7500 g durante 20 min) de 10 mL de cultivo y fue liofilizada (Telstar Cryodos) antes de proceder a su extracción. La cantidad de PHA extraída se calculó en forma de porcentaje respecto a la biomasa liofilizada analizada. %PHA = (biomasa extraída/biomasa liofilizada) x 100

2.7.3.- Análisis de las inclusiones lipídicas por Espectroscopía de Infrarrojos

Las inclusiones lipídicas fueron analizadas también por el método de Espectroscopía de Absorción Molecular de Infrarrojos (IR).

Se utilizó un espectrógrafo de infrarrojos PERKIN ELMER FITR 1600. La introducción de la muestra se realizó sobre pastillas de NaCl como soporte. El espectro se registró en la región comprendida entre 4000- 667 cm^{-1} .

2.7.4.- Caracterización de las inclusiones lipídicas por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS)

La caracterización de química de las inclusiones lipídicas se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 5890 serie II) acoplado a un detector de masas (Hewlett Packard 5989 A). Las técnicas de ionización empleadas fueron Ionización Química (CI) e Impacto Electrónico (EI). Previo al análisis por GC/MS se procedió a metilar y sililar la muestra con el objetivo de proteger los grupos carboxilo e hidroxilo presentes. La derivatización a ésteres metílicos se realizó con diazometano como agente metilante, mientras que la sililación de los ésteres metílicos se llevó a cabo con trimetilclorosilano como agente sililante. (Kates, 1972)

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: columna HP-5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm recubierta con 5 % de Fenil-metilsiloxano; temperatura inyector: 250°C; temperatura detector: 290°C; temperatura inicial columna: 35°C (2 min); gradiente de temperatura: 8°C/ min; temperatura final 310°C (10 min). Para la integración de los picos se utilizó el software Masslab y la cuantificación se realizó en base a las proporciones relativas de los ésteres metílicos sililados.

2.8.- Biodegradación del crudo de petróleo Casablanca

Los ensayos de biodegradación de petróleo se realizaron en dos bloques. Primer bloque: estudio de la capacidad biodegradativa de petróleo por la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Segundo bloque: influencia de la adición de los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* AT10 en la biodegradación de petróleo por el consorcio microbiano AM (Sabaté, 1998).

Todo el material de vidrio utilizado fue cuidadosamente limpiado en baño de ultrasonido con jabón alcalino (pH 10) durante 10 min. Posteriormente se lavaron con agua corriente y agua desionizada, secándose finalmente con acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) calidad pestipur (SdS; Peypin, Francia).

2.8.1.- Biodegradación del crudo Casablanca por *P. aeruginosa* AT10

2.8.1.1.- Medio de cultivo

Para el cultivo de *P. aeruginosa* AT10 en los ensayos de biodegradación se utilizó el medio mineral ya descrito (apartado 2.2), modificando las concentraciones de las fuentes de carbono, nitrógeno, fosfato y hierro como sigue: NaNO₃, 5 g/L; K₂HPO₄/KH₂PO₄ (2:1 m/m), 4 g/L; FeSO₄.7H₂O, 11 x 10⁻³ g/L y 0.2% (v/v) de crudo de petróleo Casablanca como fuente de carbono.

2.8.1.2.- Condiciones de cultivo e inóculo

Los experimentos de biodegradación se realizaron por duplicado en matraces Erlenmeyer con muescas de 100 mL de capacidad, conteniendo 50 mL de medio y en las mismas condiciones de cultivo descritas en el apartado 2.2.

Se utilizaron dos tratamientos de inóculos con *Pseudomonas aeruginosa* AT10: 24 y 72 horas de incubación. En ambos casos se añadió un 2% de una suspensión celular DO_{540 nm} = 2. El medio con inóculo de 24 h contenía 1.1 mg/mL de ramnolípidos; mientras que el medio con inóculo de 72 h contenía 60 mg/mL de ramnolípidos. Los tratamientos se estudiaron a 10 y 20 días de incubación.

2.8.2.- Influencia de la adición de los ramnolípidos M_{AT10} en la biodegradación del crudo Casablanca por el consorcio microbiano AM

2.8.2.1.- Medio de cultivo

El medio mineral (BMTM) utilizado en este segundo bloque contenía (g/L): KH₂PO₄.3H₂O, 42.5; NaH₂PO₄.H₂O, 10; NH₄Cl, 20; MgSO₄.7H₂O, 2; FeSO₄.7H₂O, 0.12; MnSO₄.H₂O, 0.03; ZnSO₄.7H₂O, 0.03 CoCl₂.6H₂O, 0.01; y Acido Nitriloacético (CNCH₂COOH), 1.23. Un 0.5% (v/v) de crudo Casablanca se utilizó como fuente de carbono en todos los experimentos del bloque.

2.8.2.2.- Condiciones de cultivo e inóculo

Los experimentos de biodegradación se realizaron por duplicado en matraces Erlenmeyer con muescas y 100 mL de capacidad, conteniendo 50 mL de medio. El medio de cultivo fue esterilizado a partir de una solución concentrada de cada uno de los componentes durante 20 min a 120°C y 1 atm.

Los cultivos fueron incubados durante 10 días en un agitador recíproco a 200 rpm y 25°C y en todos los matraces se inoculó 1 mL de cultivo (1.9×10^8 NMP/mL) tomado en la mitad de la fase de crecimiento del consorcio. El consorcio se mantuvo durante toda la etapa experimental mediante resiembras quincenales en el medio mineral (2.8.2.1), pero utilizando como fuente de carbono una mezcla (0.1% v/v) de hidrocarburos poliaromáticos (antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno y pireno)

Las concentraciones de ramnolípidos que se estudiaron fueron 0.5 y 0.015% (m/v). Las soluciones se prepararon en medio acuoso ligeramente alcalino (pH 7-8).

2.8.3.- Obtención de los hidrocarburos totales del petróleo (TPH)

La fracción de los TPH, transcurrido el período de incubación, fue obtenida por extracción líquido/líquido y posterior purificación por Cromatografía de adsorción en columna.

2.8.3.1.- Extracción líquido/líquido

Las muestras se trataron con 50 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) distribuidos en cinco extracciones de 10 mL cada una. El extracto orgánico obtenido se recogió sobre sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) y el diclorometano se eliminó en rotavapor (Büchi, Suiza).

2.8.3.2.- Columna de adsorción

El extracto orgánico obtenido se disolvió en 1 mL de CH_2Cl_2 y se depositó en una columna de fraccionamiento que contenía 10 g de alúmina (Al_2O_3 90% activo) de 70-230 mesh ASTM (Merck) y 1g de Na_2SO_4 . La alúmina fue previamente activada a 120°C durante 24 h, desactivándose al momento de empaquetar la columna con un 5% de agua. El material depositado en la columna se eluyó con 100 mL de diclorometano y la fracción orgánica obtenida se concentró en rotavapor hasta evaporación del solvente.

2.8.4.- Verificación del proceso de biodegradación

La verificación del proceso de biodegradación tanto en el estudio de la capacidad biodegradativa de *P. aeruginosa* AT10 (primer bloque) como en el estudio de la influencia de la adición de ramnolípidos en la biodegradación del crudo Casablanca

por el consorcio AM (segundo bloque) se realizó por Cromatografía de Gases-FID para la fracción alifática y por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS) para la fracción aromática.

El extracto orgánico de los TPH (2.8.3.2) se resuspendió en 10 mL de diclorometano. De esta solución se tomó una fracción alícuota de 1 mL y se diluyó diez veces (1/10) con diclorometano antes de proceder a los análisis cromatográficos.

2.8.4.1.- Cromatografía de Gases- FID

La fracción alifática fue analizada en un cromatógrafo de gases Termoquest Trace 2000 con detector de ionización a la llama (FID) y columna capilar OBS de 30 m x ϕ_i = 0.25 mm.

Las condiciones de trabajo fueron: temperatura inicial 50°C (1 min); gradiente de temperatura: 5°C/min hasta 320°C y a esta temperatura durante 10 min; temperatura detector: 320°C; temperatura inyector: 290°C; flujo de Helio: 1.1 mL/min; volumen de inyección: 1 μ L. La integración de los picos se realizó con el software Chomcard y la representación gráfica de los cromatogramas se obtuvo con el software Sigmaplot 2.0. En la cuantificación de los picos se incluyó la UCM (unresolved complex mixture).

2.8.4.2.- Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS)

La fracción aromática fue analizada en un cromatógrafo de gases HP 5890 serie II acoplado a un espectrómetro de masas HP 5989 como detector.

Las condiciones del análisis fueron las siguientes: temperatura inicial: 40°C (2 min); gradiente de temperatura: 4°C /min hasta 310°C y a esta temperatura 11min; temperatura del inyector: 300°C; temperatura del detector: 280°C; columna: HPC-5MS de 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m recubierta con 5 % de Fenil-metilsiloxano; splitless: 0.48; flujo: 11 psi; volumen de inyección: 1 μ L. La integración de los picos se realizó con el programa MassLab y la cuantificación de los mismos se realizó en base al cromatograma del ión base a partir de la selección de iones moleculares (SIM) de hidrocarburos poliaromáticos “diana”: naftaleno, fluoreno fenantreno/antraceno y dibenzotiofeno; así como los derivados metilados de cada uno de ellos (Figura 1.3).

El procedimiento de diseño de una variable cada vez ha sido el más utilizado en el estudio de la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Linhardt, 1989; Robert *et al.*, 1989; Chayabruta *et al.*, 2001; Mata-Sandoval *et al.*, 2001). La desventaja del procedimiento de simple omisión es que no permite evaluar la interacción entre los diferentes factores o variables considerados, además del consumo de tiempo cuando intervienen más de dos variables. La Metodología de Superficies de Respuesta (MSR) por el contrario es una técnica de optimización que permite evaluar varios factores conjuntamente y asimismo examinar las interacciones que se establecen entre ellos para conducir a un máximo o un mínimo en la respuesta estudiada. Como procedimiento de diseño utiliza el diseño rotacional central compuesto (DRCC).

El microorganismo de trabajo utilizado en el presente estudio es la cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Esta cepa fue aislada en los alrededores de la planta refinadora de aceites comestibles ERASOL, en la ciudad de Santiago de Cuba (Cuba); a partir de suelos contaminados con el residuo de ácidos grasos libres (RAGL) procedente de la etapa final del refinado de aceite de soja (Figura A.1, Anexos). *Pseudomonas aeruginosa* AT10 al crecer en un medio mineral (apartado 2.2, Material y Métodos) con RAGL como fuente de carbono, produce 3.6 g/L de ramnolípidos con un rendimiento celular $Y_{P/X}$ de 0.85 y una conversión del sustrato del 18% (Abalos *et al.*, 2000).

Los componentes del medio de cultivo que más influyen en la acumulación de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* son la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, fosfato y hierro (Guerra-Santos *et al.*, 1984; Robert *et al.*, 1989; Ochsner *et al.*, 1995). En base a ello fueron considerados estos cuatro componentes mediales como variables independientes en el diseño del medio de cultivo para la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 aplicando la MSR: fuente de carbono (X_1); fuente de nitrógeno (X_2); fuente de fosfato (X_3); fuente de hierro (X_4).

La fuente de carbono utilizada fue el residuo de ácidos grasos libres (RAGL), el cual contiene un 48.4% de ácido linoleico ($C_{18:2}$), 21.1% de ácido oleico ($C_{18:1}$), 17% corresponde a la fracción más volátil ($< C_{12}$); 6.2% de ácido palmítico ($C_{16:0}$); 2.9% de ácido esteárico ($C_{18:0}$) y un 0.2% de ácido linolénico ($C_{18:3}$). Diferentes residuos de procesos industriales han sido utilizados como sustratos alternativos en la producción de ramnolípidos, lo cual constituye una vía adicional hacia el escalado de la producción de tensoactivos microbianos. Entre los sustratos alternativos destacan el

alpelchín, OOME (Mercadé *et al.*, 1993); melazas de azúcar de remolacha (Babu *et al.*, 1996; Patel y Desai, 1997); y suero de leche (Daniel *et al.*, 1998 y 1999).

La fuente de nitrógeno utilizada fue el nitrato de sodio (NaNO_3). Investigaciones previas con diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Guerra-Santos *et al.*, 1986; Robert *et al.*, 1989; Ochsner *et al.*, 1995) demostraron que de las diversas fuentes nitrogenadas probadas (sulfato y cloruro de amonio, urea y nitrato de sodio), el nitrato de sodio fue la fuente que permitió alcanzar la producción de ramnolípidos más alta. La fuente de fósforo empleada fue una mezcla 2:1 de $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$. La adición independiente de hidrógenofosfato de potasio (K_2HPO_4) o dihidrógenofosfato de potasio (KH_2PO_4) inhibieron el crecimiento y la acumulación de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 (Robert *et al.*, 1989). La combinación 1:1 de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Syldatk *et al.*, 1985a) y el ácido fosfórico (Guerra-Santos *et al.*, 1986) también se han utilizados como fuente de fósforo. Los iones Fe^{2+} se añadieron en forma de sulfato de hierro (II) heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

A partir del estudio del medio de cultivo, utilizando el procedimiento de simple omisión o una variable cada vez, realizado con *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 (Robert *et al.*, 1991), se consideraron los siguientes niveles de concentración para cada componente estudiado: fuente de carbono (X_1): 10 - 50 g/L; nitrato (X_2): 1 - 9 g/L; fósforo (X_3): 1 - 7 g/L y hierro (X_4): 1 - 21 mg/L. Los tres grupos de experimentos del DRCC utilizados en el presente trabajo se relacionan como sigue: 16 puntos experimentales correspondientes al **diseño factorial 2^4** . El diseño factorial se realizó a los niveles -1 y +1 de las variables. 8 puntos experimentales correspondientes al **diseño estrella 2×4** ; el diseño en estrella se realizó a los niveles $-\alpha$ y $+\alpha$ de las variables. Con 4 variables, el valor de α dado por $\alpha=2^{k/4}$ es igual a 2; por tanto las variables en el diseño estrella tuvieron los niveles -2 y +2. Finalmente se seleccionaron 7 puntos centrales repetidos siguiendo el criterio de Cochran (Cochran, 1974). Unificando los tres grupos de experimentos, la matriz se desarrolló a 5 niveles de las variables: -2 (nivel más bajo); -1 (nivel bajo); 0 (nivel central); +1 (nivel alto) y +2 (nivel más alto). La matriz experimental base se muestra en la Tabla III.1. El DRCC con 4 variables requirió la ejecución de 31 experimentos.

En la tabla, cada valor codificado de las variables se corresponde con un valor real de concentración a través de la ecuación 1.

$$X_i = (x_i - x_i^*) / \Delta x_i \quad (1)$$

donde: X_i : valor codificado de la i -ésima variable; x_i : valor en unidades de concentración de la i -ésima variable; x_i^* : valor real de la i -ésima variable en el punto central; Δx_i : incremento que sufre la i -ésima variable. Aplicando la ecuación 1 a cada factor, se determinaron los diferentes niveles de cada variable:

$$X_1 = (\text{RAGL} - 30) / 10 \quad (1a)$$

$$X_2 = (\text{NaNO}_3 - 5) / 2 \quad (1b)$$

$$X_3 = (\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4 - 4) / 1.5 \quad (1c)$$

$$X_4 = (\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O} - 0.011) / 5 \quad (1d)$$

Las funciones respuesta (**Y**), media de tres determinaciones independientes, fueron:

$$\mathbf{Y}_1 = \text{g/L de ramnolipidos y}$$

$$\mathbf{Y}_2 = \text{g/L de biomasa celular}$$

Los resultados son mostrados en la Tabla III.2.

Tabla III.1.- Matriz experimental base del diseño rotacional central compuesto (DRCC) utilizada en el diseño del medio de cultivo para la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

Exp	Valor codificado				Valor real de concentración (g/L)			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄ ·10 ⁻³
1	-1	-1	-1	-1	20	3	2.5	6
2	1	-1	-1	-1	40	3	2.5	6
3	-1	1	-1	-1	20	7	2.5	6
4	1	1	-1	-1	40	7	2.5	6
5	-1	-1	1	-1	20	3	5.5	6
6	1	-1	1	-1	40	3	5.5	6
7	-1	1	1	-1	20	7	5.5	6
8	1	1	1	-1	40	7	5.5	6
9	-1	-1	-1	1	20	3	2.5	16
10	1	-1	-1	1	40	3	2.5	16
11	-1	1	-1	1	20	7	2.5	16
12	1	1	-1	1	40	7	2.5	16
13	-1	-1	1	1	20	3	5.5	16
14	1	-1	1	1	40	3	5.5	16
15	-1	1	1	1	20	7	5.5	16
16	1	1	1	1	40	7	5.5	16
17	-2	0	0	0	10	5	4	11
18	2	0	0	0	50	5	4	11
19	0	-2	0	0	30	1	4	11
20	0	2	0	0	30	9	4	11
21	0	0	-2	0	30	5	1	11
22	0	0	2	0	30	5	7	11
23	0	0	0	-2	30	5	4	1
24	0	0	0	2	30	5	4	21
25	0	0	0	0	30	5	4	11
26	0	0	0	0	30	5	4	11
27	0	0	0	0	30	5	4	11
28	0	0	0	0	30	5	4	11
29	0	0	0	0	30	5	4	11
30	0	0	0	0	30	5	4	11
31	0	0	0	0	30	5	4	11

Tabla III.2.- Valores de respuesta (expresados en g/L) obtenidos al ejecutar la matriz experimental del DRCC para la producción de ramnolípidos, RLs (Y_1) y biomasa (Y_2) por *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

Exp.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	RLs Y ₁	Biomasa Y ₂
1	-1	-1	-1	-1	2.73	3.98
2	1	-1	-1	-1	9.39	4.50
3	-1	1	-1	-1	2.55	3.91
4	1	1	-1	-1	8.67	7.80
5	-1	-1	1	-1	1.59	3.00
6	1	-1	1	-1	6.69	5.11
7	-1	1	1	-1	1.20	3.76
8	1	1	1	-1	5.88	8.33
9	-1	-1	-1	1	3.37	4.50
10	1	-1	-1	1	9.69	5.00
11	-1	1	-1	1	1.41	4.56
12	1	1	-1	1	6.93	8.23
13	-1	-1	1	1	2.91	4.14
14	1	-1	1	1	7.74	5.62
15	-1	1	1	1	0.84	4.83
16	1	1	1	1	4.71	8.63
17	-2	0	0	0	2.40	1.63
18	2	0	0	0	14.58	5.97
19	0	-2	0	0	2.79	3.35
20	0	2	0	0	0.30	6.38
21	0	0	-2	0	7.41	6.69
22	0	0	2	0	3.93	6.99
23	0	0	0	-2	3.90	3.93
24	0	0	0	2	4.14	5.26
25	0	0	0	0	5.04	6.25
26	0	0	0	0	4.98	5.90
27	0	0	0	0	4.98	6.00
28	0	0	0	0	4.92	6.61
29	0	0	0	0	4.62	5.13
30	0	0	0	0	5.28	6.05
31	0	0	0	0	4.95	6.13

3.1.- Ajuste a un modelo de regresión cuadrático

Los resultados experimentales obtenidos en un DRCC pueden ser ajustados a un polinomio de orden (n-1) niveles de las variables. Esto significa que para las 4 variables estudiadas a 5 niveles, los resultados se podrán ajustar a un modelo de regresión polinómico de orden 4 (Oh *et al.*, 1995); no obstante el polinomio de segundo orden es el frecuentemente utilizado para el ajuste de los resultados al aplicar el DRCC. (Box *et al.*, 1989; Palasota y Deming, 1992; Goupy, 1999)

El modelo de regresión polinómico de segundo orden al que se han de ajustar los resultados obtenidos en las dos respuestas evaluadas (Tabla III.2) tiene la forma:

$$\mathbf{Y} = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{44} X_4^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{14} X_1 X_4 + b_{23} X_2 X_3 + b_{24} X_2 X_4 + b_{34} X_3 X_4 \quad (2)$$

dónde **b**₀ representa el intercepto, es decir el valor de la respuesta en el punto central; **b**_i (i=1-4) representa los coeficientes de los términos lineales, es decir la pendiente de cada factor; **b**_{ii} (i=1-4) representa los coeficientes de los términos cuadráticos, es decir la curvatura de la respuesta y **b**_{ij} (i ≠ j) representa el coeficiente de interacción entre los factores, indica cómo varía la respuesta cuando uno de los factores aumenta o disminuye.

Utilizando el programa Essential Regression (ER), un Macro del Microsoft Excel, (www.geocities.com/SiliconValley/Network/1032) los modelos de regresión obtenidos en el diseño del medio de cultivo para la producción de ramnolípidos (**Y**₁) y biomasa (**Y**₂) por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 tienen la forma:

$$\mathbf{Y}_1 = 4.97 + 2.81 X_1 - 0.70 X_2 - 0.84 X_3 - 0.03 X_4 + 0.85 X_1^2 - 0.88 X_2^2 + 0.15 X_3^2 - 0.26 X_4^2 - 0.17 X_1 X_2 - 0.38 X_1 X_3 - 0.13 X_1 X_4 - 0.04 X_2 X_3 - 0.48 X_2 X_4 - 0.17 X_3 X_4 \quad (3)$$

$$\mathbf{Y}_2 = 6.01 + 1.22 X_1 + 0.84 X_2 + 0.06 X_3 + 0.32 X_4 - 0.49 X_1^2 - 0.23 X_2^2 + 0.26 X_3^2 - 0.30 X_4^2 + 0.71 X_1 X_2 - 0.21 X_1 X_3 - 0.10 X_1 X_4 + 0.07 X_2 X_3 - 0.01 X_2 X_4 + 0.06 X_3 X_4. \quad (4)$$

El análisis de la varianza (ANOVA) permite conocer la significación de los modelos de regresión. Las Tablas III.3 y III.4 muestran el ANOVA correspondiente a los modelos de regresión de las funciones respuestas **Y**₁ y **Y**₂ respectivamente y que son descritos por las ecuaciones 3 y 4.

Tabla III.3.- Análisis de Varianza (ANOVA) para la producción de ramnolípidos (Y_1) por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 según el modelo de regresión cuadrático de 14 términos (ecuación 3)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Probabilidad P (>F)
Regresión	276.86	14	19.78	252.75	4.94×10^{-16}
Residual	1.25	16	0.09		
Error LOF	1.02	10	0.10	2.716	0.117
Error Exp.	0.23	6	0.04		
Total	278.11	30			

$$|R| = 0.9977, R^2 = 0.9955, R^2_{ajustado} = 0.9916, CV = 5.76 \%$$

Tabla III.4.- Análisis de Varianza (ANOVA) para la biomasa celular (Y_2) de *Pseudomonas aeruginosa* AT10 según el modelo de regresión cuadrático de 14 términos (ecuación 4)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Probabilidad P (>F)
Regresión	77.44	14	5.53	36.18	1.97×10^{-09}
Residual	2.45	16	0.15		
Error LOF	1.23	10	0.12	0.603	0.772
Error Exp.	1.22	6	0.20		
Total	79.88	30			

$$|R| = 0.9846, R^2 = 0.9694, R^2_{ajustado} = 0.9426, CV = 7.21 \%$$

El test F (Fisher) da valores muy bajos de probabilidad (P), $P = 4.9 \times 10^{-16}$ para los ramnolípidos (Tabla III.3) y $P = 1.97 \times 10^{-9}$ para la biomasa (Tabla III.4); los cuales demuestran una significación muy alta de los modelos de regresión. Los altos valores obtenidos en los coeficientes de la regresión (R^2 , $R^2_{ajustado}$ y $|R|$), así como los coeficientes de variación (CV) tan bajos permitieron comprobar también la significación de ambos modelos de regresión.

Las tablas ANOVA presentadas (Tablas III.3 y III.4) reflejan una fila atípica del Análisis de Varianza. En las mismas el estudio del residual está desdoblado en dos errores: el error debido a la falta de ajuste o "lack of fit" y el error puro debido al error experimental. La prueba de la falta de ajuste debe realizarse siempre que la matriz de experimentos diseñada inicialmente contenga puntos repetidos, que en el estudio presentado corresponden a los 7 puntos centrales. Esta prueba se basa en un test Fisher.

En la Tabla III.3; la prueba para la falta de ajuste en la función respuesta ramnolípidos (Y_1) tiene una probabilidad pequeña ($P = 0.117$); es decir existe solamente un 11,7% de probabilidad de que la falta de ajuste no sea significativa. Esto quiere decir que la prueba de falta de ajuste es significativa en un 88.3% de probabilidad, lo que equivale a decir que el modelo de regresión para los ramnolípidos (Y_1) no describe con suficiente precisión los resultados obtenidos. Una situación muy diferente se presenta en la tabla ANOVA correspondiente a la función biomasa (Y_2) (Tabla III.4). Para esta respuesta la falta de ajuste no es significativa en un 77.2% de probabilidad, es decir solamente el 22.8% de los resultados experimentales no son reproducidos por el modelo. En los textos básicos de consulta (Cochram, 1974; Box *et al.*, 1989) no se refleja un valor de probabilidad a partir del cual se acepte la prueba de falta de ajuste. La bibliografía especializada indica que valores de $P \geq 26\%$ son aceptables para la prueba de falta de ajuste. (Oh *et al.*, 1995)

Si la prueba de falta de ajuste es rechazada, dos posibles soluciones pueden ser aplicadas: a.- realizar una transformación matemática de la variable dependiente (función respuesta), por ejemplo $\ln Y$, $1/Y$, \sqrt{Y} , etc. y realizar nuevamente el ajuste del modelo de regresión con esta nueva función respuesta o b.- ajustar los datos experimentales a un modelo de regresión polinómico de orden superior. Siempre que el diseño experimental permita realizar la segunda opción, como ocurre en el caso estudiado, evidentemente es la variante más sencilla a desarrollar.

3.2.- Ajuste al mejor modelo de regresión

El programa Essential Regression tiene una opción de optimización automática del modelo de regresión o **autoajuste**, donde busca; si existe un modelo cuya tabla ANOVA sea más aceptable que la anteriormente obtenida. El proceso se realiza añadiendo (forward) o suprimiendo (backward) términos a la regresión. La técnica se aplicó a la función respuesta ramnolípidos (Y_1) porque no superó la prueba de falta de ajuste y a la biomasa (Y_2) para ver si se obtenía un mejor modelo. Las nuevas ecuaciones de regresión obtenidas fueron:

$$Y_1 = 4.97 + 3.04 X_1 - 0.88 X_2^2 + 0.85 X_1^2 - 0.84 X_3 - 0.70 X_2 - 0.48 X_2 X_4 - 0.38 X_1 X_3 - 0.26 X_4^2 - 0.35 X_1 X_2^2 + 0.15 X_3^2 + 0.17 X_3 X_4 - 0.17 X_1 X_2 - 0.13 X_1 X_4 \quad (5)$$

$$Y_2 = 6.01 + 1.22 X_1 + 0.84 X_2 + 0.71 X_1 X_2 - 0.50 X_1^2 + 0.26 X_3^2 + 0.32 X_4 + 0.30 X_4^2 - 0.23 X_2^2 + 0.21 X_1 X_3 \quad (6)$$

Cuando es ejecutado el autoajuste, los términos de la ecuación de regresión aparecen ordenados según su nivel de significación; así los primeros términos de la ecuación son aquellos que mayor influencia tienen en la respuesta estudiada.

Como se refleja en la ecuación 5; para la producción de ramnolípidos (Y_1) se obtuvo un modelo de tercer orden dado por $X_1 X_2^2$ con 13 variables exploratorias. La tabla ANOVA correspondiente a este nuevo modelo (Tabla III.5) evidencia su superioridad respecto al modelo de segundo orden descrito en la ecuación 3 ya que la “falta de ajuste” se convierte en **no significativa** ($P = 0.492 > P = 0.117$). Es decir se rechaza H_0 (hipótesis nula), luego entonces el modelo describe adecuadamente los datos experimentales para la función respuesta ramnolípidos. Por otra parte los valores tan altos de los coeficientes de la regresión; es decir el coeficiente de determinación múltiple ($R^2 = 0.9977$), el coeficiente de determinación ajustado ($R^2_{ajustado} = 0.9960$) y el coeficiente de correlación múltiple ($|R| = 0.9989$) y el bajo coeficiente de variación (CV = 3.99%) permitieron comprobar la bondad del nuevo ajuste.

Tabla III.5.- Análisis de Varianza (ANOVA) para la producción de ramnolípidos (Y_1) por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 según el modelo de regresión cúbico de 13 términos (ecuación 5)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Probabilidad P (>F)
Regresión	277.47	13	21.34	569.68	9.092×10^{-20}
Residual	0.64	17	0.04		
Error LOF	0.38	10	0.04	1.046	0.492
Error Exp.	0.25	7	0.04		
Total	278.11	30			

$$|R| = 0.9989, R^2 = 0.9977, R^2_{ajustado} = 0.9960, CV = 3.99 \%$$

En el caso de la respuesta biomasa (Tabla III.6), se comprobó que la “falta de ajuste” en el nuevo modelo es **menos significativa** aún ($P = 0.783 < P = 0.772$) y la cantidad de variables exploratorias requeridas es mucho menor ($9 < 14$), lo cual es más conveniente para facilitar el uso del modelo de regresión en la predicción de la biomasa (Y_2). Los altos valores de los coeficientes de la regresión ($R^2 = 0.9643$, $R^2_{ajustado} = 0.9490$ y $|R| = 0.9820$) y el bajo valor del coeficiente de variación (CV = 6.79%) obtenidos en el nuevo modelo (Tabla III.6) confirmaron la elevada significación del

modelo, aunque no difieren significativamente de los obtenidos en el modelo anterior. (Tabla III.4)

Tabla III.6.- Análisis de Varianza (ANOVA) para la biomasa celular (Y_2) de *Pseudomonas aeruginosa* AT10 según el modelo de regresión cuadrático de 9 términos (ecuación 6)

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Probabilidad P (>F)
Regresión	77.03	9	8.56	63.00	3.576×10^{-13}
Residual	2.85	21	0.14		
Error LOF	1.59	14	0.11	0.627	0.783
Error Exp.	1.26	7	0.18		
Total	79.88	30			

$$|R| = 0.9820, R^2 = 0.9643, R^2_{ajustado} = 0.9490, CV = 6.79\%.$$

En cada caso, la bondad de ajuste también se evaluó por un gráfico de correlación entre valores teóricos predichos por el modelo de regresión descritos en la ecuación 5 para la producción de ramnolípidos y ecuación 6 para la biomasa y sus respectivos valores experimentales.

Como se observa, para las dos funciones respuestas seleccionadas producción de ramnolípidos (Figura 3.1) y biomasa (Figura 3.2) la representación de valores experimentales frente a valores teóricos se aproxima a la diagonal. Además de la tabla ANOVA, el programa ER utilizado proporciona un estudio estadístico completo y detallado de la ecuación de regresión y sus coeficientes, así como de los puntos experimentales empleados en el ajuste. Este estudio se refleja en el apartado **Análisis de Varianza y Regresión múltiple** dentro de la sección de Anexos.

Considerando los modelos de regresión descritos en las ecuaciones 5 (Producción de ramnolípidos) y 6 (producción de biomasa), ha de destacarse que en la producción de ramnolípidos (Y_1) por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 existe una mayor cantidad de interacciones entre los componentes mediales estudiados (carbono, nitrato, fosfato y hierro) que para la biomasa.

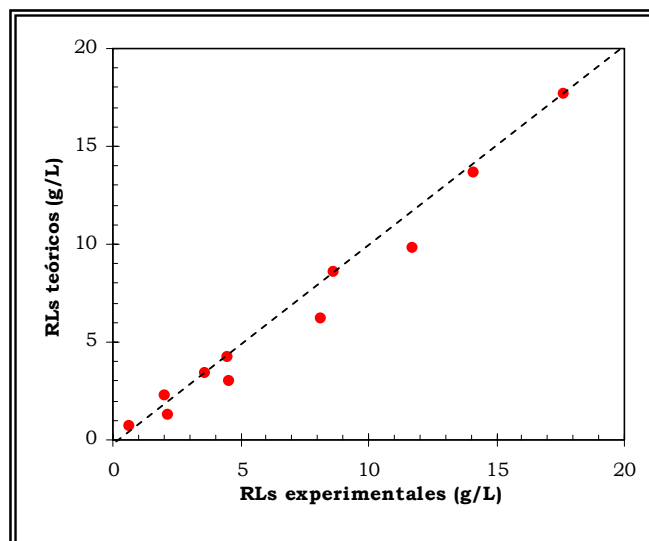


Figura 3.1.- Gráfico de correlación ramnolipidos teóricos /ramnolipidos experimentales que evalúa la bondad del ajuste del modelo de regresión para la producción de ramnolipidos (ecuación 5) por *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

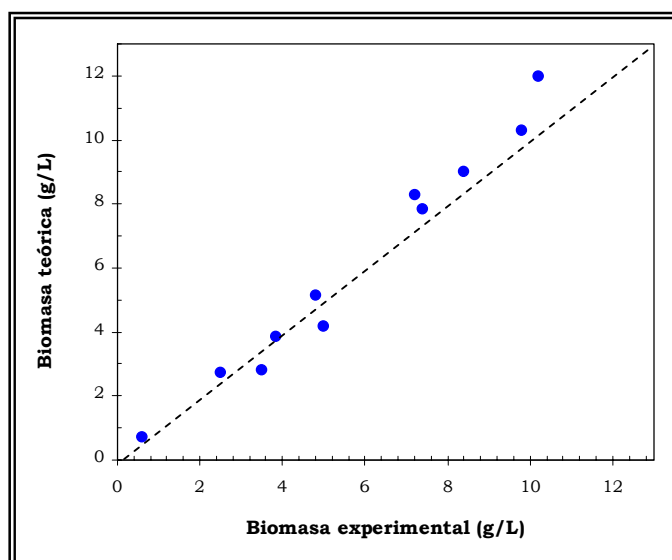


Figura 3.2.- Gráfico de correlación biomasa teórica /biomasa experimental que evalúa la bondad del ajuste del modelo de regresión para la biomasa (ecuación 6) por *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

3.3.- Obtención de los valores óptimos

Las ecuaciones de regresión obtenidas describen adecuadamente la acumulación de ramnolípidos (ecuación 5) y producción de biomasa (ecuación 6) por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 en función de las concentraciones de los cuatro componentes del medio de cultivo estudiados. A partir de los modelos descritos por estas ecuaciones, es posible obtener utilizando tres herramientas diferentes toda la información sobre los fenómenos estudiados. Las herramientas utilizadas fueron: 1.- determinación de los óptimos matemáticos de cada ecuación de regresión. Con este óptimo matemático se determinó la combinación de concentraciones que produce la máxima producción de ramnolípidos y biomasa por *Pseudomonas aeruginosa* AT10. El estudio de los valores óptimos se complementó con los gráficos de los efectos parciales; 2.- estudio de las superficies de respuesta para la producción de ramnolípidos y biomasa por *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Los gráficos de las superficies de respuesta permiten conocer la influencia de la variación de concentraciones de cada componente del medio de cultivo y las interacciones existentes entre ellos sobre la producción de ramnolípidos y biomasa por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 y 3.- análisis canónico de las ecuaciones de regresión. El análisis canónico permite aislar la influencia de cada componente del medio de cultivo estudiado (fuente de carbono, nitrato, fosfato y hierro) eliminando matemáticamente los términos de interacción.

3.3.1.- Obtención de los máximos y estudio de los efectos parciales

El software ER utilizado en este trabajo para la obtención de las ecuaciones de regresión posibilita la determinación de los valores máximo y mínimo de una función haciendo uso de la Macro Solver de Microsoft Excel. Con esta opción se han determinado los valores óptimos de fuente de carbono, nitrato, fosfato y hierro (variables independientes) que hacen máximas la producción de ramnolípidos y biomasa (respuestas) por *Pseudomonas aeruginosa* AT10, dentro del intervalo de concentraciones utilizado en el diseño de experimentos.

3.3.1.1.- Ramnolípidos (Y_1)

$$Y_1 = 4.97 + 3.04 X_1 - 0.88 X_2^2 + 0.85 X_1^2 - 0.84 X_3 - 0.70 X_2 - 0.48 X_2 X_4 - 0.38 X_1 X_3 - 0.26 X_4^2 - 0.35 X_1 X_2^2 + 0.15 X_3^2 + 0.17 X_3 X_4 - 0.17 X_1 X_2 - 0.13 X_1 X_4 \quad (5)$$

Para la función respuesta ramnolípidos (Y_1) se obtuvo que el punto de máxima acumulación es $(X_1; X_2; X_3; X_4) = (2, -0.18, -2, -0.97)$.

Al traducir los valores codificados de las variables a sus correspondientes valores de concentración, a partir de las expresiones descritas para cada componente (ecuaciones 1a - 1d), las concentraciones que permiten alcanzar la máxima producción de ramnolipidos son: RAGL (X_1)= 50 g/L; NaNO_3 (X_2)= 4.64 g/L; $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (X_3)= 1 g/L y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (X_4)= 7.4 mg/L. Si la composición del medio de cultivo responde a estas condiciones; la máxima acumulación de ramnolipidos predicha por el modelo es de 18.66 g/L. Al evaluar este punto en la ecuación 6 (Y_2), la biomasa predicha por el modelo es de 5.67 g/L. El rendimiento celular obtenido fue $Y_{P/X} = 3.3$.

Es muy frecuente que la producción de metabolitos secundarios, como es el caso de los ramnolipidos, no esté favorecida en las condiciones del crecimiento celular (Parekh *et al.*, 2000) y como era de esperar, los puntos de máxima respuesta para las dos funciones estudiadas no fueron coincidentes. Las ecuaciones de superficie para los ramnolipidos y la biomasa (ecuaciones 5 y 6) son diferentes, y reflejan además que los componentes mediales estudiados y las interacciones entre ellos no tienen el mismo peso en la producción de ramnolipidos y biomasa. Tal situación posibilita “orientar” la ruta biosintética hacia la respuesta deseada (producción de ramnolipidos).

La biosíntesis de ramnolipidos involucra las vías metabólicas centrales de los ácidos grasos y los carbohidratos, cada una con su correspondiente consumo energético (Figura 1.2, apartado 1.2.1 en Introducción); se necesita entonces, un exceso de fuente de carbono que permita el llevar a cabo el metabolismo (Hommel y Ratkedge, 1993; Maier *et al.*, 2000). Por otra parte la producción de ramnolipidos por *P. aeruginosa* se caracteriza por la acumulación de diferentes moléculas homólogas.

La sobreproducción de ramnolipidos por *Pseudomonas aeruginosa*, de modo similar a la producción de polihidroxicanoatos (PHAs) y exopolisacáridos (EPS), está estrechamente ligada a una limitación por nitrógeno (Hommel y Ratkedge, 1993). La limitación por la fuente de nitrógeno, frecuentemente se utiliza para regular el crecimiento celular en fermentaciones aerobias (Wu y Ju, 1997). Sin embargo, esta estrategia no procede si la producción de ramnolipidos ocurre bajo condiciones de desnitrificación en fermentaciones anaerobias, donde la limitación por fosfatos es más efectiva para alcanzar altas producciones de ramnolipidos (Chayabutra y Ju, 2000).

Se ha demostrado que en un medio limitado por la fuente de nitrógeno, la producción de ramnolipidos está regulada por los niveles de glutamato, glutamina y amonio. Las *Pseudomonadaceae* utilizan el NO_3^- que es reducido hasta NH_4^+ , el cual es finalmente

asimilado por la glutamina sintetasa para formar glutamina (Mulligan y Gibbs, 1989). Debido a que el crecimiento es lento, causado por la limitación de nitrógeno, la actividad de la glutamina sintetasa aumenta, incrementándose los niveles de glutamina en el medio que inhiben a su vez la actividad del enzima (por modificación del equilibrio). Como consecuencia de la disminución de la actividad enzimática es detectado un aumento de la producción de ramnolípidos al desviarse el metabolismo celular desde el nitrógeno hacia la síntesis de carbohidratos (Mulligan y Gibbs, 1989). Durante el cultivo de *Pseudomonas* sp DSM 2874 con n-alcenos como fuente de carbono, se observó que al añadir 0.2% de diferentes fuentes de nitrógeno al medio cultivo, una vez consumidos los niveles iniciales, se mantuvo la inhibición en la síntesis de ramnolípidos, pero no la supresión total de la misma (Syldatk *et al.*, 1985 a).

La relación C/N en el punto óptimo fue de 10.77 y aunque no se ha descrito un valor único de relación C/N para alcanzar la máxima producción de ramnolípidos, la mayoría de los estudios realizados donde se aborda la síntesis de ramnolípidos en función de esta relación señalan valores de C/N entre 5 y 20. Así por ejemplo, Guerra-Santos encontró una relación C/N óptima de 18 para el cultivo de *P. aeruginosa* con glucosa (Guerra-Santos *et al.*, 1984); mientras que la máxima producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* 44T1 con aceite de oliva se obtenía con C/N de 6.6 (Manresa *et al.*, 1991). Ochsner observó que *P. aeruginosa* DMS 2659 cultivada sobre aceite maíz alcanzaba la máxima acumulación de ramnolípidos con C/N de 4 (Ochsner *et al.*, 1995). La máxima producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* LBI cultivada con “jaboncillo” (soapstock) de soja (Figura A.1, Anexos) como fuente de carbono se obtuvo con una relación C/N de 2.5 (Benincasa, 2001). La relación C/N no debe considerarse referencia absoluta en el diseño del medio de cultivo ya que es un cociente que depende de los niveles de carbono y nitrógeno, que son los que realmente determinan que se alcance un mínimo o un máximo del producto deseado. Los niveles de carbono usualmente utilizados en la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* son 10 g/L (Babu *et al.*, 1996; Benincasa, 2001), 20 g/L (Manresa *et al.*, 1991; Ochsner *et al.*, 1995) y 40 g/L (Haba *et al.*, 2000). En cuanto a la fuente de nitrógeno los niveles limitantes más usuales son 1 g/L (Guerra-Santos *et al.*, 1984), 3 g/L (Manresa *et al.*, 1991), 4 g/L (Benincasa, 2001) y 5 g/L (Ochsner *et al.*, 1995). En el presente estudio la relación C/N de 10.77 se obtuvo con 50 y 4.64 g/L de carbono (RAGL) y nitrógeno (NaNO₃).

Con niveles tan bajos de fosfato, 1 g/L la síntesis de las macromoléculas celulares tampoco está favorecida, desviándose el metabolismo hacia la producción de

ramnolípidos. Concentraciones elevadas de fosfato (7.82 g/L) influyeron negativamente en la síntesis de ramnolípidos por *Pseudomonas* sp DSM 2874 debido al efecto osmótico (Syldatk *et al.*, 1985 a). No obstante, Guerra-Santos observó que el cultivo de *P. aeruginosa* Rsan-ver en glucosa aumentaba la producción de ramnolípidos con una relación C/P de 16, para 1.1 g/L de fosfato (Guerra-Santos *et al.*, 1984).

La limitación por fosfato puede conducir el metabolismo de *Pseudomonas aeruginosa* hacia la producción de piocianina (Syldatk *et al.*, 1985). Se ha sugerido que la participación del fosfato en el metabolismo de esta bacteria guarda relación con su mecanismo de resistencia intrínseca al formar parte del núcleo del lipopolisacárido (LPS) (Walsh *et al.*, 2000). La relación C/P en el punto de máxima acumulación de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 fue de 50 (1 g/L de fosfato).

De los elementos traza, el hierro es el que mayor influencia tiene en la producción de ramnolípidos, sin embargo su participación en la biosíntesis de ramnolípidos aún no está esclarecida totalmente. Por una parte se requiere de este micronutriente para que se lleve a cabo la fosforilación oxidativa (Prescott *et al.*, 1999) y por otra se ha observado que niveles de hierro entre 0.027 y 0.33 mg/L inhiben la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* en un medio mineral con glucosa como fuente de carbono (Guerra-Santos *et al.*, 1984) y n-alcanos (Ochsner *et al.*, 1995). Syldatk observó que concentraciones de 5 mg/L de hierro provocaban una ligera inhibición de la síntesis de ramnolípidos en *Pseudomonas* sp DSM 2874 cultivada en n-alcanos (Syldatk *et al.*, 1985 a). En *P. aeruginosa* 44T1 cultivada sobre aceite de oliva, concentraciones de hierro superiores a 10 mg/L inhibieron la síntesis de ramnolípidos (Robert *et al.*, 1989). En condiciones de desnitrificación tampoco se observó un incremento de la biosíntesis de ramnolípidos si se limitaba el medio por hierro (Chayabutra y Ju, 2000). Se ha planteado además que la limitación del medio por nitrógeno y hierro en el cultivo de *P. aeruginosa* puede conducir a la formación de exopolisacáridos (Guerra-Santos *et al.*, 1984). En el punto óptimo la relación C/Fe para el cultivo de *P. aeruginosa* AT10 con residuo de soja (RAGL) fue de 6747,64.

El bajo contenido de biomasa celular (5.67 g/L) en estas condiciones evidenció que el metabolismo en *Pseudomonas aeruginosa* AT10 estaba dirigido hacia la producción de ramnolípidos.

Los gráficos de efectos parciales facilitan y complementan la información obtenida por el punto óptimo mostrando la influencia de cada componente del medio de cultivo

estudiado (carbono, nitrato, fosfato y hierro) sobre la producción de ramnolípidos y biomasa por *Pseudomonas aeruginosa* AT10. La función del efecto parcial de una variable independiente es una función que describe el cambio en la respuesta según la variación de sus niveles, mientras que el resto de las variables se mantienen fijas en su nivel óptimo. (Oh *et al.*, 1995)

Si $\mathbf{Y} = f(X_1, X_2, X_3, X_4)$ denota el modelo de superficie de la respuesta descrito en la ecuación 5 y $Y = f(X_1^*, X_2^*, X_3^*, X_4^*)$ denota el punto óptimo de estos factores, es decir (2, -0.18, -2, -0.97) para la producción de ramnolípidos (\mathbf{Y}_1), la función Y del efecto parcial de X_1 para la respuesta \mathbf{Y}_1 queda definida como:

$$Y(X_1) = f(X_1, X_2^*, X_3^*, X_4^*)$$

De igual modo se definen las funciones para los efectos parciales de X_2 , X_3 y X_4 :

$$Y(X_2) = f(X_1^*, X_2, X_3^*, X_4^*); Y(X_3) = f(X_1^*, X_2^*, X_3, X_4^*); Y(X_4) = f(X_1^*, X_2^*, X_3^*, X_4).$$

En los gráficos de efectos parciales, se representan en el eje de las ordenadas las $Y(X_i)$ y en el eje de las abscisas los valores codificados de las X_i . En la Figura 3.3 se representan los efectos parciales de las cuatro variables estudiadas para la respuesta \mathbf{Y}_1 (ramnolípidos).

Como se observa en el gráfico, la curva que describe el cambio más evidente según varían los niveles de la variable es la correspondiente a la fuente de carbono (X_1), ello significa que es el factor que más influye. Pequeñas variaciones en los niveles de la fuente de carbono (RAGL) provocarán un cambio apreciable en la producción de ramnolípidos. En la ecuación de regresión (ecuación 5) se refleja esta situación ya que: 1) el término X_1 además de ser el primero que aparece, es el que tiene el coeficiente más alto ($b_1 = 3.045$); 2) el término X_1^2 también posee un coeficiente alto ($b_{11} = 0.854$); 3) la variable X_1 aparece en todos los términos de interacción, lo que significa que la interacción de la fuente de carbono con el nitrato; el fosfato y el hierro influye en la producción de ramnolípidos.

La curva descrita por el efecto parcial de la fuente de carbono (X_1) sugiere la adición de cantidades superiores a 50 g/L para alcanzar mayor producción de ramnolípidos; sin embargo se observó que concentraciones del orden de 100 y 150 g/L la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 era fuertemente reprimida; obteniéndose solamente 0.26 y 0.13 g/L de ramnolípidos para 100 y 150 g/L

respectivamente. Los niveles de sustrato comúnmente utilizados en la producción de ramnolípidos con aceites vegetales o residuos oleosos son de 20 g/L (Robert *et al.*, 1989; Ochsner *et al.*, 1995); 40 g/L (Linhard, 1989) y 60 g/L (Sim *et al.*, 1997) y condicionan un exceso de fuente de carbono sin provocar estrés en las células.

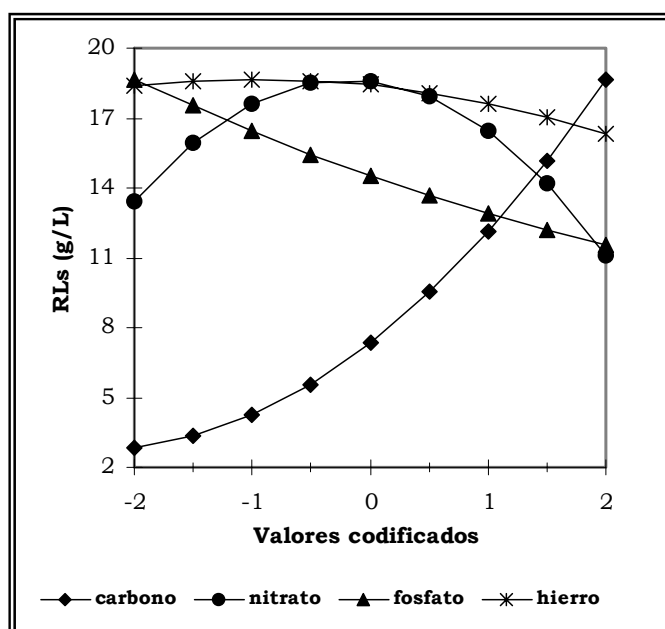


Figura 3.3.- Gráfico de los efectos parciales del carbono (X_1), nitrato (X_2), fosfato (X_3) y hierro (X_4) para la producción de ramnolípidos (Y_1) por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 a

La curva correspondiente al nitrato (X_2) presenta un máximo claro, aunque muy suave, entre los niveles -1 y $+1$; es decir entre 3 y 7 g/L. La meseta observada alrededor de este máximo permite trabajar en un rango amplio de concentraciones, es decir pequeñas variaciones de la concentración de nitrato en esta zona de meseta no modificarán notablemente la producción de ramnolípidos. Sin embargo hacia los niveles extremos -2 a -1 (1 a 3 g/L) y 1 a 2 (7 a 9 g/L) hay una disminución brusca en la producción de ramnolípidos al variar los niveles de nitrato; disminución provocada por una parte por la baja concentración de nitrato en el medio (1 a 3 g/L) que no favorece un mínimo crecimiento celular para efectuar la síntesis de ramnolípidos y por otra parte el exceso de nitrato en el medio (7 a 9 g/L) que favorece completamente el crecimiento celular. El término de curvatura $-0.88 X_2^2$ como segundo término en la ecuación de regresión evidencia la variación no lineal de la producción de ramnolípidos respecto a los niveles de nitrato. La relación C/N hacia los extremos está

entre 3.3 y 10 y si bien coincide con los valores descritos por otros autores (Manresa *et al.*, 1991; Ochsner *et al.*, 1995), está por debajo del valor de C/N obtenido en el punto de máxima respuesta; C/N, 10.77. Hacia los niveles extremos más bajos del intervalo estudiado (-2 a -1) la relación C/N está afectada por las bajas concentraciones de la fuente de carbono (de 10 a 20 g/L); mientras que hacia los niveles extremos más altos (1 a 2) la relación C/N está afectada por las altas concentraciones de nitrato (7 a 9 g/L).

El fosfato (X_3) tiene un efecto casi lineal con pendiente negativa y constante en todo el intervalo estudiado, de modo que al aumentar la concentración de fosfato en el medio, la producción de ramnolípidos disminuye. En el punto de máxima acumulación de ramnolípidos la concentración de fosfato es muy baja (1g/L), limitación esta que no favorece un crecimiento celular excesivo. Una concentración de fosfato similar fue utilizada para favorecer el incremento de producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* Rsan-ver con glucosa como fuente de carbono (Guerra-Santos *et al.*, 1984). La pendiente de la curva descrita por el fosfato aunque no es tan pronunciada como la descrita por la fuente de carbono ni tan suave como la zona de meseta observada en el nitrato, sí es lo suficientemente alta como para que un ligero aumento de fosfato provoque un rápido descenso en la producción de ramnolípidos. En la ecuación de regresión el término $b_3 X_3$ posee un coeficiente negativo ($b_3 = -0.84$)

La influencia del hierro (X_4) es prácticamente nula, ya que la producción de ramnolípidos prácticamente no varía excepto para niveles entre 0 y +2, es decir de 11 a 21 mg/L; donde la producción de ramnolípidos disminuye si aumenta la concentración de hierro en el medio. Situación similar se observó con *P. aeruginosa* 44T1 cultivada sobre aceite de oliva. La producción de ramnolípidos por esta cepa disminuyó sensiblemente al aumentar los niveles de hierro en el medio por encima de 10 mg/L (Robert *et al.*, 1989). En la ecuación del modelo de regresión para la producción de ramnolípidos (ecuación 5) el término $b_4 X_4$ no aparece como término lineal sino cuadrático y con un coeficiente muy bajo y negativo ($b_{44} = -0.264$).

3.3.1.2.- Biomasa (Y_2)

$$Y_2 = 6.01 + 1.22 X_1 + 0.84 X_2 + 0.71 X_1 X_2 - 0.50 X_1^2 + 0.26 X_3^2 + 0.32 X_4 + 0.30 X_4^2 - 0.23 X_2^2 + 0.21 X_1 X_3 \quad (6)$$

El punto de máxima biomasa fue (X_1, X_2, X_3, X_4) = (2, 2, 2, 0.55), es decir: RAGL (X_1)= 50 g/L; NaNO_3 (X_2)= 9 g/L; $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (X_3)= 7 g/L y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (X_4)= 13.75

mg/L. Con estas concentraciones de los componentes estudiados en el medio de cultivo, la biomasa predicha por el modelo fue 12.05 g/L. Cuando se evaluó este punto en la ecuación 5 (\mathbf{Y}_1), la producción de ramnolípidos fue 2.86 g/L. El rendimiento celular obtenido fue solo $Y_{P/X} = 0.23$.

En general la obtención de altas cantidades de biomasa requiere de un medio balanceado (Pirt, 1985) debido a que es necesario cubrir la composición centesimal de la biomasa. Para *Pseudomonas* sp. la composición elemental (%) es de 45 para el C; 11.2 para el N; 2.5 para el P y 6×10^{-3} para el Fe (Rodríguez, E., comunicación personal). Esta situación se reflejó en el máximo de biomasa predicho por el modelo.

El carbono y el nitrógeno son nutrientes esenciales para el metabolismo celular en la síntesis de proteínas y macromoléculas de las membranas celulares (Harder y Dijkhuizen, 1983; Pirt, 1985) y los niveles de fuente de carbono (50 g/L) y nitrato (9 g/L) necesarios en el medio de cultivo para obtener la máxima biomasa responden a la composición centesimal para *Pseudomonas* sp. El fosfato también es necesario en el medio por el doble papel del fósforo como elemento constitutivo de las membranas celulares y de la molécula energética del metabolismo (ATP) (Nesmeyanova y Bogdanov, 1987). Recientemente se ha descrito la participación del fosfato en la estructura de los enzimas fosfomanomutasa (PMM) y fosfoglucomutasa (PGM), los cuales inducen la síntesis de los precursores del alginato, el LPS y los ramnolípidos (Olvera *et al.*, 1999; Tavares *et al.*, 2000). La presencia del hierro está directamente vinculada a su participación en la fosforilación oxidativa (citocromos) (Presscott *et al.*, 1999) y la síntesis de sideróforos, pioverdinas y otros pigmentos que participan en manifestaciones infectivas de esta bacteria. (Takase *et al.*, 2000)

En las condiciones de máxima producción de biomasa (RAGL, nitrato, fosfato y hierro) = 50, 9, 7, 13.74×10^{-3} g/L, la composición del medio no estaba diseñada para inducir la biosíntesis de ramnolípidos, razón por la cual la acumulación de estos fue muy baja; 2.86 g/L. El aspecto más importante del diseño del medio de cultivo para la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 fue encontrar las condiciones que conducen a una máxima producción de ramnolípidos con un alto rendimiento celular.

Las funciones para los efectos parciales en el caso de la biomasa (\mathbf{Y}_2) son similares a las descritas anteriormente (3.3.1.1), pero con $(X_1^*, X_2^*, X_3^*, X_4^*) = (2, 2, 2, 0.55)$.

Para la biomasa, la fuente de carbono (X_1) también tiene el efecto más fuerte (Figura 3.4). La biomasa aumenta rápidamente al aumentar en el medio la concentración de la fuente de carbono de 10 a 50 g/L. La curva que describe el efecto parcial de esta variable posee la pendiente más grande, lo cual significa que es la fuente de carbono es el componente del medio que más influye. En el modelo de regresión (ecuación 6) aparece b_1X_1 como primer término y con el coeficiente ($b_1 = 1.218$) más alto.

La pendiente de la curva correspondiente al efecto parcial del nitrato (X_2) indica, que la biomasa aumenta notablemente al aumentar la concentración de nitrato en el medio de 1 a 9 g/L. El término b_2X_2 es el segundo de la ecuación de regresión de la biomasa (ecuación 6) y con un coeficiente elevado ($b_2 = 0.844$).

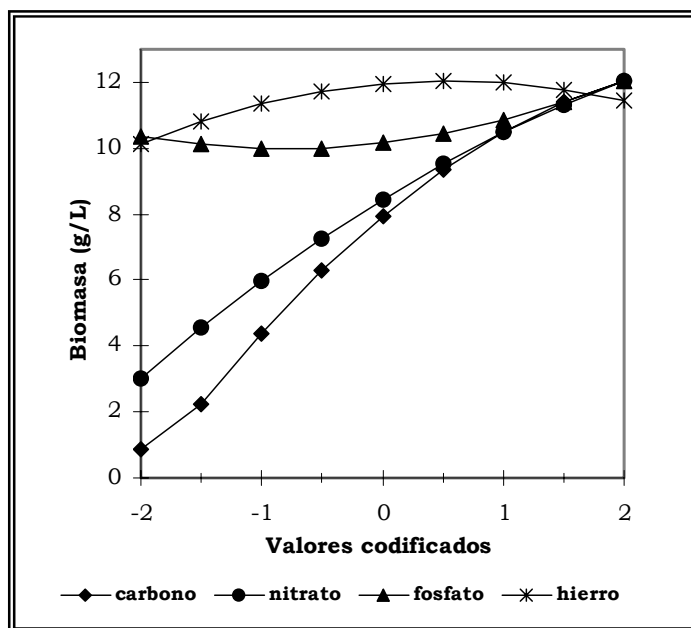


Figura 3.4.- Gráfico de los efectos parciales del carbono (X_1), nitrato (X_2), fosfato (X_3) y hierro (X_4) para la biomasa (Y_2) celular producida por *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

Desde el punto de vista fisiológico el carbono (RAGL) y el nitrógeno (nitrato) son nutrientes esenciales para el crecimiento microbiano y corresponden al porcentaje más elevado de la composición centesimal de *Pseudomonas* sp. lo que se manifiesta en las curvas de efectos parciales de estos dos componentes del medio de cultivo al describir la variación de biomasa más evidente; es decir la fuente de carbono (X_1) y el nitrato son los componentes mediales que más afectan en el crecimiento microbiano

de *Pseudomonas aeruginosa* AT10. En el diseño del medio de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus casei* YIT 9018, Oh observó que además de la temperatura, los efectos parciales de la fuente de carbono (glucosa) y nitrógeno (triptona) son los componentes mediales que más afectan el crecimiento de esta bacteria láctica. (Oh *et al.*, 1995)

Contrariamente a lo observado en los efectos parciales del carbono y nitrato, el efecto del fosfato (X_3) es menos pronunciado, y en todo el intervalo de concentraciones estudiado para el fosfato (1 a 7 g/L) la curva siempre se mantiene en los niveles más altos de biomasa; con un ligero aumento hacia los niveles extremos superiores de fosfato (1 a 2), donde la biomasa aumenta al aumentar de 5.5 a 7 g/L la concentración de fosfato. El término b_3X_3 no aparece en la ecuación de regresión (ecuación 6) y la influencia de este factor en la biomasa solo está reflejada en el término de curvatura $b_{33}X_3^2$ y de interacción con la fuente de carbono ($b_{13}X_1X_3$). Los coeficientes de estos términos son muy pequeños, $b_{33} = 0.265$ y $b_{13} = 0.211$.

Finalmente el efecto del hierro (X_4) en la biomasa describe un ligero máximo poco definido en las proximidades del nivel central del diseño (11 mg/L). Independientemente de que en los niveles extremos -2 a -1 (1 a 6 mg/L) y 1 a 2 (16 a 21 mg/L) la biomasa disminuye; la curva descrita siempre se mantiene en los valores más altos de respuesta, o sea entre 10 y 12 g/L de biomasa. El término X_4 posee un coeficiente lineal pequeño ($b_4 = 0.324$), lo que significa que su influencia es mínima. El término de curvatura $b_{44} X_4^2$ tiene coeficiente negativo (-0.296). Por otra parte la interacción del hierro con el resto de los componentes estudiados no posee una marcada influencia en la biomasa puesto que en el modelo de regresión (ecuación 6) no están reflejados los términos $b_{14}X_1X_4$ (carbono-hierro); $b_{24}X_2X_4$ (nitrato-hierro) y $b_{34}X_3X_4$ (fosfato-hierro). Las necesidades nutricionales de hierro son bajas, 6×10^{-3} (Rodríguez, E., comunicación personal); solo como cofactor de enzimas con funciones redox como los citocromos, las ferredoxinas y las flavoproteínas y una vez cubiertas no son requeridas cantidades mayores de este micronutriente. (Pirt, 1985)

3.3.2.- Estudio de las Superficies de Respuesta (SR)

La superficie de respuesta es un gráfico tridimensional o en forma de curvas de nivel de una respuesta frente a dos de las variables estudiadas (Palasota y Deming, 1992; Goupy, 1999). Así, de este modo, en el eje vertical es representada la función respuesta \mathbf{Y} , mientras que en los ejes horizontales son representados los niveles codificados de las variables seleccionadas en cada caso. Las variables no

representados en el gráfico se mantienen constantes, en el presente trabajo se han fijado al nivel óptimo para el cual se obtiene la máxima la respuesta.

Los gráficos de las SR en 3D y/o su proyección en curvas de nivel evidencian cómo influye cada componente del medio de cultivo (fuente de carbono, nitrato, fosfato y hierro) y las interacciones que se establecen entre ellos sobre la producción de ramnolípidos y biomasa por *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

3.3.2.1.- Influencia de las variables en la producción de ramnolípidos (Y₁)

$$Y_1 = 4.97 + 3.04 X_1 - 0.88 X_2^2 + 0.85 X_1^2 - 0.84 X_3 - 0.70 X_2 - 0.48 X_2 X_4 - 0.38 X_1 X_3 - 0.26 X_4^2 - 0.35 X_1 X_2^2 + 0.15 X_3^2 + 0.17 X_3 X_4 - 0.17 X_1 X_2 - 0.13 X_1 X_4 \quad (5)$$

En las Figuras 3.5 a 3.10 se muestran las superficies de respuesta y curvas de nivel que representan las influencias del carbono (X₁), nitrato (X₂), fosfato (X₃) y hierro (X₄) sobre la producción de ramnolípidos, tanto en forma de superficies de respuesta como en curvas de nivel.

La producción de ramnolípidos aumenta notablemente al aumentar la concentración de RAGL de 10 a 50 g/L (Figuras 3.5 a 3.7), sin que se aprecie un máximo de concentración del sustrato carbonado, es decir la producción de ramnolípidos aumenta continuamente con el aumento de concentración RAGL como se observó en la curva de efectos parciales (Figura 3.3). La variación de la producción de ramnolípidos respecto a la fuente de carbono no es lineal, lo que indica la existencia de una relación cuadrática respuesta (producción de ramnolípidos)/variable (fuente de carbono), expresada en el término $0.85X_1^2$ en el modelo de regresión (ecuación 5). Las mayores producciones de ramnolípidos se observaron hacia los niveles más altos de carbono, o sea 40-50 g/L ya que se requiere de un exceso de fuente de carbono para que se lleve a cabo el metabolismo. En el diseño del medio para la acumulación de soforolípidos, glicolípidos producidos por *Candida bombicola*, (Casas *et al.*, 1997) y el lipopéptido surfactina de *Bacillus subtilis* (Sen, 1997) aplicando la MSR; también se evidenció que la producción de estos tensoactivos microbianos es máxima con concentraciones muy altas de glucosa, 20 – 36 g/L en el medio de cultivo.

La producción de ramnolípidos aumenta con la concentración de nitrato (X_2), pasando por un valor máximo y posteriormente disminuye (Figuras 3.5, 3.8 y 3.9). Este máximo se encuentra a concentraciones de nitrato próximas al nivel central del diseño de experimentos y coincide con el valor óptimo de nitrato (-0.18), es decir 4.64 g/L, para alcanzar la máxima producción de ramnolípidos. La curvatura tan marcada de la superficie de respuesta con respecto a esta variable justifica la presencia del término cuadrático $-0.88 X_2^2$ en la ecuación de regresión (ecuación 5). Concentraciones de nitrato de 3 g/L (Manresa *et al.*, 1991); 4 g/L (Benincasa, 2001) y 5 g/L (Ochsner *et al.*, 1995) frecuentemente conducen a una sobreproducción de ramnolípidos. La máxima producción de surfactina se alcanzó con 4.5 g/L de nitrato. (Sen, 1997)

La influencia de la concentración de fosfatos (X_3) sobre la producción de ramnolípidos es menor que la observada para el carbono (X_1) y el nitrato (X_2). De las SR donde se representa esta variable (Figuras 3.6, 3.8 y 3.10) puede deducirse que la producción de ramnolípidos aumenta al disminuir la concentración de fosfato; aumento que aunque es no lineal posee una curvatura muy suave. La curvatura está determinada por el término X_3^2 , el cual se encuentra en la ecuación de regresión afectado con un coeficiente muy pequeño (0.15). La máxima producción de ramnolípidos se obtiene para concentraciones muy bajas de fosfato, observación que coincide con el máximo matemático de la ecuación de regresión (ecuación 5), 1g/L. Syldatk observó que la adición de 1 g/L de fosfato al medio mineral con n-alcanos como fuente carbono favorecen la máxima producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* Rsan-

ver (Syldatk *et al.*, 1985 a). La participación del fosfato en la síntesis de ramnolípidos ha sido asociada a la actividad del enzima fosfoglucomutasa (PGM) al inducir la síntesis de la d-timidíndifosfato-L-ramnosa (dTDP-L-ramnosa). (Olvera *et al.*, 1999)

La concentración de hierro (X_4) es la menos influyente sobre la producción de ramnolípidos. Se observa un ligero máximo en la producción de ramnolípidos (Figuras 3.7, 3.9 y 3.10) respecto a los niveles de hierro, que se sitúa hacia el nivel central del diseño experimental, (-0.97) el cual corresponde a 11 mg/L. La SR presenta una leve curvatura con respecto a la concentración de hierro, determinada por el término cuadrático $b_4 X_4^2$ de la ecuación de regresión (ecuación 5) afectado con un coeficiente muy pequeño (-0.26). En condiciones de desnitrificación la concentración de hierro no influye en la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Chayabutra *et al.*, 2000); sin embargo la producción de surfactina por *B. subtilis* DSM 3256 está directamente relacionada con la concentración de hierro en el medio de cultivo (Sen, 1997).

Una de las principales ventajas de las representaciones gráficas de las superficies de respuesta es que se ponen de manifiesto las posibles interacciones que puedan existir entre los distintos componentes del medio de cultivo. Estas interacciones determinan que la influencia de un componente sobre la respuesta estudiada no sea la misma para diferentes valores del otro componente con el que interacciona. Estas observaciones, que se pueden predecir analizando en la ecuación de regresión los términos correspondientes a los productos cruzados de las variables, no son evidentes en los gráficos de los efectos parciales (Figuras 3.3 y 3.4).

Las interacciones que se establecen entre los diferentes componentes del medio cultivo dependen del proceso en sí. En la producción de ramnolípidos influyen, en orden de importancia, las interacciones nitrato-hierro (Figura 3.9); carbono-fosfato (Figura 3.6), fosfato-hierro (Figura 3.10), carbono-nitrato (Figura 3.5) y carbono-hierro (Figura 3.7); mientras que en la producción de soforolípidos por *Candida bombicola* NRRL 17069-Y las interacciones más importantes son carbono-fosfato; nitrógeno-fosfato y carbono-nitrógeno (Casas *et al.*, 1997). La producción de surfactina por *Bacillus subtilis* DSM 3256 en cambio, está más afectada por las interacciones carbono-nitrógeno; carbono-hierro y carbono-manganeso (Sen, 1997). En cualesquiera de los casos citados, las interacciones reflejan que las pendientes de las curvas de respuesta con respecto a una de las variables varían según el valor que adopte la otra variable representada; es decir cómo aumenta o disminuye la respuesta estudiada respecto a uno de los componentes según el nivel del otro componente de la interacción.

A partir de la SR de la interacción nitrato-hierro (Figura 3.9), por ejemplo, se evidencia cómo la producción de ramnolípidos en la dirección del hierro no varía mucho para niveles muy bajos de nitrato, de 1 a 5 g/L; sin embargo para niveles muy altos de nitrato, de a 9 g/L el efecto es contrario. La producción de ramnolípidos es más curvada sobre los niveles de nitrato (X_2) que sobre los niveles de hierro (X_4), esto significa que el término cuadrático X_2^2 influye más que X_4^2 ; es decir las variaciones de concentración de nitrato provocan mayores cambios en la producción de ramnolípidos que las variaciones de concentración de hierro. La interacción nitrato-hierro sobre la producción de ramnolípidos es muy importante debido a que la limitación del medio por ambos nutrientes puede conducir a la formación de exopolisacáridos (EPS) (Guerra-Santos *et al.*, 1984). La interacción carbono-fosfato (Figura 3.6) fue la más evidente, ya que en la SR representada por esta interacción se observa cómo la pendiente que determina el aumento de la producción de ramnolípidos al aumentar la concentración de carbono (X_1) es mucho más pronunciada para concentraciones bajas de fosfatos. El máximo se alcanza a niveles muy altos de carbono, 50 g/L y muy bajos de fosfato, 1g/L. Esta interacción es la más importante en la acumulación de sofolípidos por *Candida bombicola* NRRL 17069-Y. (Casas *et al.*, 1997)

Es válido destacar que la interacción más compleja (si bien no la más importante) en la producción de ramnolípidos es la interacción carbono-nitrato (Figura 3.5), complejidad que se refleja en la curvatura de la superficie de respuesta tanto en la dirección del carbono (X_1) como del nitrato (X_4). En el modelo de regresión (ecuación 5) son incluidos los términos lineales X_1 y X_2 , cuadráticos X_1^2 y X_2^2 y de interacción $X_1 X_2$, además del término cúbico $X_1 X_2^2$. Esta interacción es la más fuerte en la producción de surfactina por *B. subtilis* DSM 3256 (Sen, 1997). Por otra parte el gráfico de la interacción fosfato-hierro (Figura 3.10) evidencia la poca influencia de estos dos componentes en la producción de ramnolípidos, ya que para cualquier nivel de concentraciones la superficie “flota” con valores de ramnolípidos muy elevados.

Del análisis de las SR se comprobó que la acumulación de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 es máxima con una concentración de carbono alta, 50 g/L, para que se lleve a cabo la síntesis de ramnolípidos; una concentración limitante de nitrato, 4.64g/L de modo que el metabolismo esté “dirigido” hacia la sobreproducción de ramnolípidos; baja concentración de fosfato, 1 g/L que afecte la síntesis de macromoléculas celulares y se “desvíe” el metabolismo hacia la producción de ramnolípidos y un nivel intermedio de hierro, 7.4 mg/L para cubrir las necesidades de la fosforilación oxidativa.

3.3.2.2- Influencia de las variables en la biomasa (Y₂)

$$Y_2 = 6.01 + 1.22 X_1 + 0.84 X_2 + 0.71 X_1 X_2 - 0.50 X_1^2 + 0.26 X_3^2 + 0.32 X_4 + 0.30 X_4^2 - 0.23 X_2^2 + 0.21 X_1 X_3 \quad (6)$$

Las superficies de respuesta en 3D y sus proyecciones en curvas de nivel que representan las influencias del carbono (X₁), nitrato (X₂), fosfato (X₃) y hierro (X₄) y sus interacciones sobre la biomasa producida por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 se representan en las Figuras 3.11 a 3.16.

De los gráficos de SR para la biomasa se verificó que la fuente de carbono (X_1) es el componente del medio de cultivo que más influencia tiene. La biomasa aumenta rápidamente al aumentar la concentración del sustrato (RAGL) de 10 a 50 g/L (Figuras 3.11, 3.12 y 3.13); situación observada en el gráfico de efectos parciales (Figura 3.4). La curvatura que muestran las SR indican que la relación biomasa (respuesta)/sustrato (variable) no es lineal, sino cuadrática. Esta relación cuadrática se refleja en el modelo de regresión (ecuación 6) por el término $-0.50 X_1^2$. La máxima producción de biomasa se alcanzó en el nivel más alto de la fuente de carbono, 50 g/L. Concentración esta que responde a la composición centesimal de *Pseudomonas* sp., C: 45.1 (Rodríguez, E., comunicación personal)

Según aumenta la concentración de nitrato (X_2), la biomasa aumenta (Figuras 3.11, 3.14 y 3.15) sin que se observe un máximo de concentración de nitrato, y como era de esperar ya que es un nutriente esencial para la síntesis de proteínas y macromoléculas celulares (Pirt, 1985), la máxima biomasa se obtuvo a niveles muy altos (+2) de nitrato, 9 g/L. Esta concentración de nitrato responde a la composición centesimal de *Pseudomonas* sp., N: 11.2 (Rodríguez, E., comunicación personal). El término $-0.23 X_2^2$ del modelo de regresión (ecuación 6) se refleja en la curvatura de la superficie de respuesta en la dirección del nitrato

La biomasa aumenta al aumentar los niveles de fosfato (X_3); no obstante el aumento observado no fue tan pronunciado como en el caso del carbono (X_1) y el nitrato (X_2). El máximo de biomasa se alcanzó al nivel más alto (7 g/L) de fosfato (Figuras 3.12, 3.14 y 3.16). La ligera curvatura de las SR está determinada por el término $0.26 X_3^2$.

La concentración de hierro (X_4) influye muy poco en la biomasa, no observándose cambios apreciables en la misma al aumentar la concentración de hierro de 1 a 21 mg/L (Figuras 3.13, 3.15 y 3.16). Los requerimientos nutricionales de hierro por *Pseudomonas* sp son mínimos, y están muy relacionados con la fosforilación oxidativa. (Prescott *et al.*, 1999)

Las interacciones más importantes entre los componentes del medio estudiados en el presente trabajo para la biomasa son carbono-nitrato, X_1X_2 (Figura 3.11) y carbono-fosfato, X_1X_3 (Figura 3.13). La curvatura que tiene la SR en la interacción carbono-nitrato en la dirección de los dos componentes evidencia que la obtención de biomasa está fuertemente determinada por la combinación de los niveles de concentración de la fuente de carbono y nitrato. La biomasa aumenta notablemente al variar la concentración del sustrato carbonado (X_1) de 10 a 50 g/L; para cualquier nivel de

nitrito (X_2) en el medio, no obstante la mayor cantidad de biomasa se alcanza a niveles muy altos de nitrito (7 a 9 g/L). En la dirección del nitrito, el cambio de pendiente es más evidente. La biomasa aumenta al aumentar los niveles de nitrito en el medio, sin embargo este aumento es más fuerte hacia los niveles más altos de carbono (40 a 50 g/L). El máximo de biomasa se alcanzó a los niveles más altos de carbono y nitrito, 50 y 9 g/L respectivamente, condiciones que coinciden con la composición centesimal para *Pseudomonas sp.* antes señalada. La interacción carbono-nitrito es también la más importante en el crecimiento de *Rhodotorula gracilis* CFR-1 (Prapulla *et al.*, 1992) y *Lactobacillus casei* YIT 9018. (Oh *et al.*, 1995)

La interacción carbono-fosfato X_1X_3 (Figura 3.12), es la más débil. La biomasa en la dirección del sustrato (RAGL) aumenta para cualquier nivel de fosfato en el medio; siendo máxima a los niveles más altos de fosfato, 7 g/L y carbono, 50 g/L. En la dirección del fosfato se observa una situación similar. La curvatura de la SR en ambas direcciones es muy ligera, lo cual se refleja en los términos $-0.50 X_1^2$ y $0.26 X_3^3$ del modelo de regresión (ecuación 6).

A partir del análisis de las SR se confirmó que la máxima biomasa se obtiene con un medio balanceado; es decir altas concentraciones de carbono (50 g/L), nitrito (9 g/L) y fosfato (7 g/L) de modo que esté cubierta la composición centesimal para *Pseudomonas sp.* y se lleve a cabo la síntesis de las macromoléculas celulares y un nivel intermedio de hierro (13.75 mg/L) que supla las necesidades metabólicas en la fosforilación oxidativa.

3.4.- Análisis canónico

El análisis canónico es una herramienta matemática muy utilizada en el diseño de procesos químicos (Gouppy, 1999); no así en el diseño de medios de cultivo. Consiste en girar (análisis canónico R) o girar y trasladar (análisis canónico RT) los ejes de forma que son definidas unas nuevas variables (Z_k) totalmente independientes entre sí. Esto significa que las interacciones entre las variables iniciales (X_i) son eliminadas. La ventaja del análisis canónico es que al eliminar las interacciones entre las variables, las variaciones observadas en la respuesta estudiada son “verdaderas”; a diferencia de lo observado en los gráficos de efectos parciales (Figuras 3.3 y 3.4) dónde las interacciones entre los componentes mediales estudiados (carbono, nitrito, fosfato y hierro) quedan “enmascaradas”.

Las variaciones observadas en la producción de ramnolipidos y biomasa por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 en función de las nuevas variables Z_k se cumplen siempre para cualquier valor que adopte el resto de variables Z_k no representadas en el eje que se esté analizando.

En el presente estudio se realizó el análisis canónico por rotación de los ejes coordenados (apartado **Análisis canónico R** en la sección Anexos) con ayuda del software Mathcad 4.0 (Mathsoff, Inc.)

3.4.1.- Análisis canónico para la producción de ramnolipidos

$$Y_1 = 4.97 + 3.04 X_1 - 0.88 X_2^2 + 0.85 X_1^2 - 0.84 X_3 - 0.70 X_2 - 0.48 X_2 X_4 - 0.38 X_1 X_3 - 0.26 X_4^2 - 0.35 X_1 X_2^2 + 0.15 X_3^2 + 0.17 X_3 X_4 - 0.17 X_1 X_2 - 0.13 X_1 X_4 \quad (5)$$

Como el análisis canónico solamente es aplicable a ecuaciones cuadráticas, se ha realizado el cambio de variable $X_1 X_2^2 = X_5$, el modelo de regresión cúbico se reduce entonces a un modelo de regresión cuadrático. Las expresiones de la producción de ramnolipidos (Y_1) en función de las nuevas variables Z_k según los nuevos ejes (R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5) de coordenadas fueron:

respecto al eje R_1	$y = 4.967 - 3.303 Z_1 + 0.944 Z_1^2$	5.1
respecto al eje R_2	$y = 4.967 - 0.095 Z_2 - 0.422 Z_2^2$	5.2
respecto al eje R_3	$y = 4.967 + 0.371 Z_3 - 0.046 Z_3^2$	5.3
respecto al eje R_4	$y = 4.967 + 0.263 Z_4 + 0.081 Z_4^2$	5.4
respecto al eje R_5	$y = 4.967 - 0.362 Z_5 + 0.182 Z_5^2$	5.5

La representación gráfica de la respuesta en función de las variables Z_k se muestran en la Figura 3.17. Los valores propios (coeficientes del término Z_k^2 en las ecuaciones 5.1 - 5.5) respecto a los ejes R_1 (0.944), R_4 (0.081) y R_5 (0.182) son positivos; lo cual significa que la producción de ramnolipidos a través de esos ejes presenta un mínimo; mientras que a través de los ejes R_2 (-0.422) y R_3 (-0.046) presenta un máximo porque los valores propios en esos ejes son negativos. Como el valor propio más alto es respecto al eje R_1 (ecuación 5.1), la variable Z_1 es la que más influye en la producción de ramnolipidos.

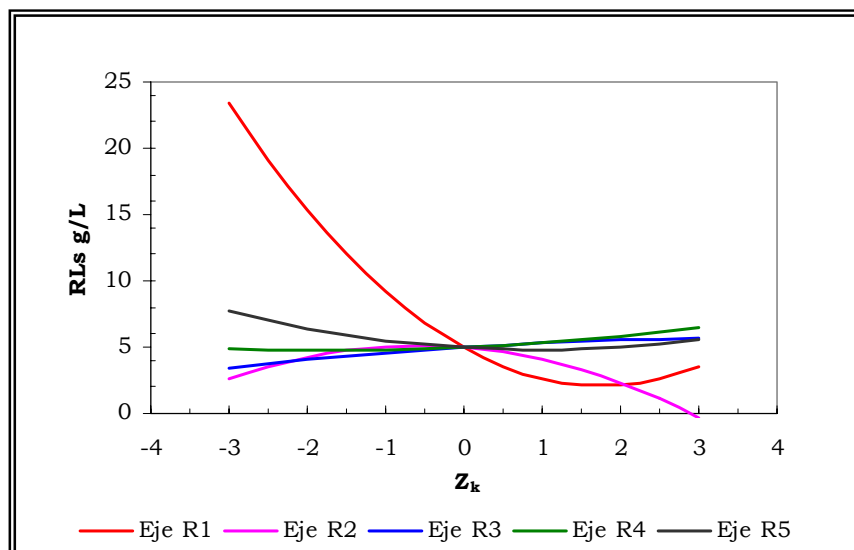


Figura 3.17.- Representación de la producción de ramnolípidos (RLs) por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 en función de las variables Z_k a partir del análisis canónico R.

Las variables Z_k obtenidas se relacionan con las variables X_i estudiadas según las expresiones:

$$Z_1 = - 0.952 X_1 + 0.072 X_2 + 0.235 X_3 + 0.052 X_4 + 0.177 X_2^2 \quad (5.1.1)$$

$$Z_2 = 0.063 X_1 + 0.503 X_2 - 0.108 X_3 + 0.855 X_4 + 0.026 X_2^2 \quad (5.2.2)$$

$$Z_3 = - 0.242 X_1 - 0.093 X_2 - 0.268 X_3 + 0.067 X_4 - 0.926 X_2^2 \quad (5.3.3)$$

$$Z_4 = - 0.146 X_1 - 0.558 X_2 - 0.714 X_3 + 0.238 X_4 + 0.318 X_2^2 \quad (5.4.4)$$

$$Z_5 = - 0.103 X_1 + 0.650 X_2 - 0.593 X_3 - 0.453 X_4 + 0.100 X_2^2 \quad (5.5.5)$$

Las expresiones anteriores ponen en evidencia que las variables Z_k dependen de una combinación lineal de los cuatro componentes mediales estudiados: carbono (X_1); nitrato (X_2); fosfato (X_3); hierro (X_4) y la “nueva variable” X_5 ($X_1 X_2^2$). Ya que la variable Z_1 es la que más influye en la respuesta (ecuación 5.1); la producción de ramnolípidos será máxima para valores muy negativos de esta variable. Es decir a niveles muy altos de carbono (2) y muy bajos de fosfato (-2) ya que sus coeficientes para la variable Z_1 son -0.952 y 0.235 respectivamente (ecuación 5.1.1). Para el nitrato y el hierro, debido a que sus coeficientes son además de positivos muy pequeños (0.072 y 0.052 respectivamente), la producción de ramnolípidos será máxima a niveles bajos o muy próximos a cero. Estas observaciones coinciden con las obtenidas en el estudio de las SR.

Los resultados obtenidos en el análisis canónico para producción de ramnolípidos (Y_1) corroboraron el máximo predicho por el modelo de regresión (ecuación 5) para esta respuesta: (2, -0.18 -2, -0.97) (apartado 3.3.1.1). Es decir *Pseudomonas aeruginosa* AT10 sintetiza 18.66 g/L de ramnolípidos en un medio mineral que contiene 50 g/L de fuente de carbono (RAGL), 4.64 g/L de NaNO_3 , 1 g/L de fosfato ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) y 7.4 mg/L de hierro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

3.4.2.- Análisis canónico para la biomasa

$$Y_2 = 6.01 + 1.22 X_1 + 0.84 X_2 + 0.71 X_1 X_2 - 0.50 X_1^2 + 0.26 X_3^2 + 0.32 X_4 + 0.30 X_4^2 - 0.23 X_2^2 + 0.21 X_1 X_3 \quad (6)$$

La respuesta Y_2 (biomasa) en función de las nuevas variables Z_k respecto a los nuevos ejes (R_1 , R_2 , R_3 y R_4) fueron:

$$\text{respecto al eje } R_1 \quad y = 6.01 - 0.528 Z_1 - 0.748 Z_1^2 \quad (6.1)$$

$$\text{respecto al eje } R_2 \quad y = 6.01 + 1.341 Z_2 + 0.003 Z_2^2 \quad (6.2)$$

$$\text{respecto al eje } R_3 \quad y = 6.01 - 0.342 Z_3 + 0.286 Z_3^2 \quad (6.3)$$

$$\text{respecto al eje } R_4 \quad y = 6.01 + 0.324 Z_4 - 0.296 Z_4^2 \quad (6.4)$$

La representación gráfica de la respuesta en función de las variables Z_k son mostradas en la Figura 3.18. Los valores propios (coeficientes del término Z_k^2 en las ecuaciones 6.1 - 6.4) respecto a los ejes R_1 (-0.748) y R_4 (-0.296) son negativos, entonces la biomasa presenta un máximo a través de esos ejes.

Los valores propios a través de los ejes R_2 (0.003) y R_3 (0.286) al ser positivos dan un mínimo de biomasa. En el caso específico del eje R_2 el valor propio es tan bajo que la respuesta a lo largo de ese eje más que presentar un mínimo describe una recta. El valor propio más alto que se obtuvo fue 0.286 (ecuación 6.3), lo cual representa que la variable Z_3 es la que mayor influencia tiene en la biomasa.

Las expresiones que relacionan las variables Z_k con los factores X_i estudiados (carbono, nitrato, fosfato y hierro) fueron:

$$Z_1 = -0.823 X_1 + 0.562 X_2 + 0.085 X_3 \quad (6.1.1)$$

$$Z_2 = 0.535 X_1 + 0.817 X_2 - 0.215 X_3 \quad (6.1.2)$$

$$Z_3 = -0.190 X_1 - 0.215 X_2 - 0.973 X_3 \quad (6.1.3)$$

$$Z_4 = X_4 \quad (6.1.4)$$

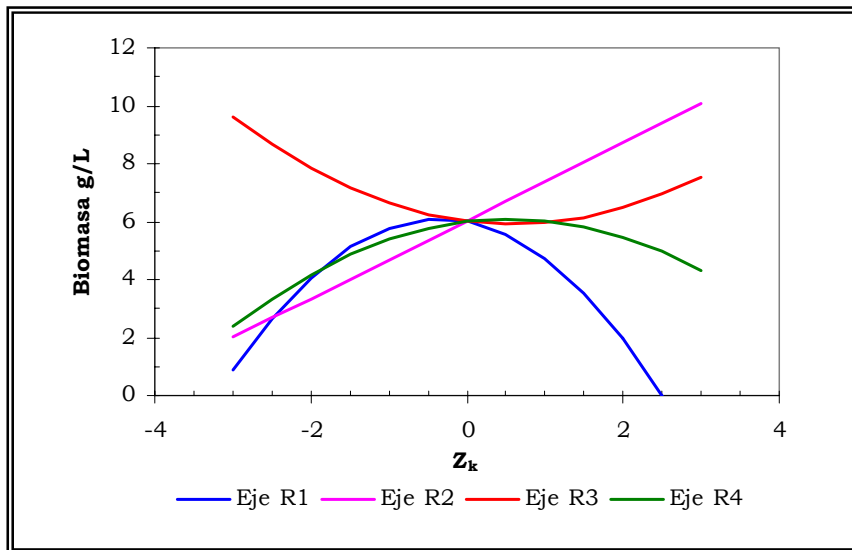


Figura 3.18.- Representación de la biomasa producida por *pseudomonas aeruginosa* AT10 en función de las variables Z_k a partir del análisis canónico R

De las expresiones anteriores se evidenció que las variables Z_1 , Z_2 y Z_3 dependen únicamente de la combinación lineal del carbono (X_1); nitrato (X_2) y fosfato (X_3); mientras que Z_4 solo depende del hierro (X_4). Ya que la variable Z_3 es la que más influye en la respuesta (ecuación 6.3); la biomasa será máxima para valores muy negativos de esta variable. Es decir a niveles muy altos de carbono, nitrato y fosfato (2) ya que sus componentes para la variable Z_3 son negativos (-0.19, -0.215 y -0.973 respectivamente, ecuación 6.3.3). Como la variable Z_4 solamente depende del hierro, la máxima biomasa se obtendrá al nivel de hierro que condicione ese máximo; es decir 0.55.

Estos resultados coinciden con el máximo de biomasa (2, 2, 2, 0.55) predicho por el modelo (apartado 3.3.1.2). Es decir 50 g/L de carbono (X_1), 9 g/L de nitrato (X_2), 7 g/L de fosfato (X_3) y 13.75 mg/L de hierro (X_4) son necesarios para obtener 12.05 g/L de biomasa por *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

3.5.- Comprobación de los modelos

La comprobación de cualquier modelo matemático (cinético, regresión, diseño) no debe realizarse utilizando los mismos puntos experimentales de la construcción del modelo,

sino nuevos experimentos en condiciones escogidas al azar, dentro del intervalo de concentraciones de validez del modelo. Los resultados experimentales obtenidos con estos puntos son comparados entonces con los predichos por el modelo en esas condiciones. (Bódalo *et al.*, 1997)

En la comprobación de los modelos descritos en las ecuaciones 5 (producción de ramnolípidos) y 6 (producción de biomasa) se realizaron 11 experimentos distribuidos en todo el rango experimental y en las mismas condiciones de los puntos incluidos en la matriz (Tabla III.1). Las combinaciones de las variables en la comprobación de los modelos se muestran en las Tablas III.7a y III 7b.

Tabla III.7a.- Matriz experimental de comprobación del modelo de regresión (ecuación 5) para la producción de ramnolípidos (RLs) por *P. aeruginosa* AT10.

Valores codificados				Valores reales (g/L)				RLs exp	RLs t
X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄ x10 ⁻³		
2	-1	-2	0	50	3	1	11	17.60	17.74
2	2	2	0	50	9	7	11	3.58	3.42
2	-2	-2	2	50	1	1	21	14.11	13.70
0	-2	-2	1	30	1	1	16	4.47	4.23
0	2	-2	0	30	9	1	11	2.02	2.30
1	-2	-2	2	40	1	1	21	8.59	8.64
-1	1	-2	2	20	7	1	21	0.61	0.76
1	2	-2	2	40	9	1	21	2.15	1.28
2	2	-2	0	50	9	1	11	11.70	9.84
-2	2	0	2	10	9	4	21	1.40	1.63
1	-2	0	1	40	1	4	16	8.11	6.25
1	2	0	-1	40	9	4	6	4.50	3.01

Tabla III.7b.- Matriz experimental de comprobación del modelo de regresión (ecuación 6) para la biomasa (Biom) de *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

Valores codificados				Valores reales (g/L)				Biom exp.	Biom teórica
X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄ x10 ⁻³		
2	-1	-2	0	50	3	1	11	5.00	4.19
2	2	2	0	50	9	7	11	10.20	11.97
2	-2	-2	2	50	1	1	21	0.60	0.71
0	-2	-2	1	30	1	1	16	3.83	3.85
0	2	-2	0	30	9	1	11	7.40	7.84
1	-2	-2	2	40	1	1	21	3.50	2.82
-1	1	-2	2	20	7	1	21	4.80	5.15
1	2	-2	2	40	9	1	21	8.40	9.02
2	2	-2	0	50	9	1	11	9.80	10.29
-2	2	0	2	10	9	4	21	0.17	0.00
1	-2	0	1	40	1	4	16	2.50	2.74
1	2	0	-1	40	9	4	6	7.20	8.30

Como puede observarse en las gráficas (Figuras 3.19a y 3.19b) tanto para la producción de ramnolípidos (Y_1) como para la biomasa (Y_2) los puntos experimentales se distribuyen uniformemente a lo largo de la recta $f(Y) = X$, con coeficientes de correlación de $R_1 = 0.9554$ y $R_2 = 0.9704$ para los ramnolípidos y biomasa respectivamente.

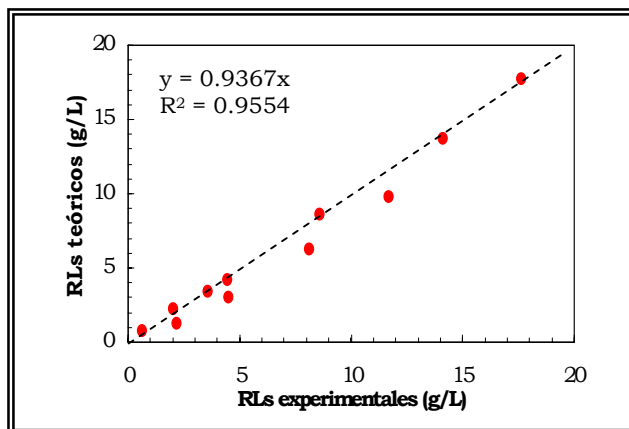


Figura 3.19a.- Gráfico de correlación Ramnolípidos teóricos/Ramnolípidos experimentales. Comprobación del modelo de regresión para la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10.(ecuación 5).

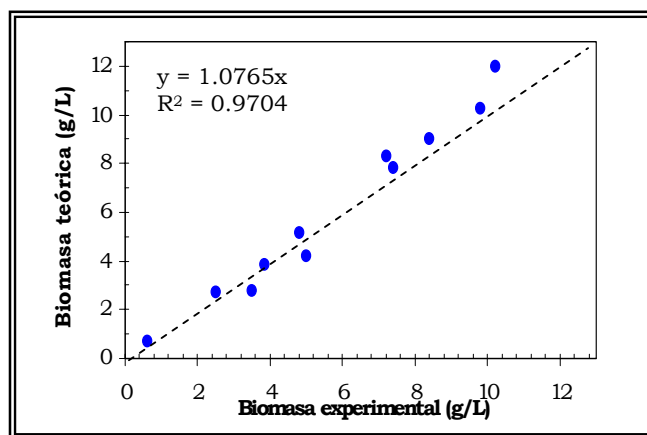


Figura 3.19b.- Gráfico de correlación biomasa teórica/biomasa experimental. Comprobación del modelo de regresión para la producción de biomasa por *Pseudomonas aeruginosa* AT10.(ecuación 6).

3.5.1.- Comprobación experimental de los máximos

La comprobación experimental del máximo de cada respuesta se realizó en las mismas condiciones que los tratamientos de la matriz del diseño, pero fijando las cuatro variables estudiadas a la concentración para la cual la producción de ramnolípidos (Y_1) y biomasa (Y_2) por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 alcanzan su máximo valor según los modelos de regresión descritos en las ecuaciones 5 y 6.

3.5.1.1.- Cinética de la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10

Las concentraciones utilizadas de las fuentes de carbono (RAGL), nitrógeno (NaNO_3), fosfato ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) y hierro ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$) fueron: 50; 4.64; 1 y 7.4×10^{-3} g/L respectivamente.

El inóculo se preparó a partir de 50 mL del medio mineral descrito en el apartado 2.2 de Material y Métodos. Una alícuota del cultivo se centrifugó (10 min, 5000 rpm) para preparar, con el pellet celular, una suspensión de inóculo del 2% v/v.

En las primeras 24h de cultivo la producción de ramnolípidos fue muy baja; acumulándose tan solo 0.21 g/L, sin embargo en el medio de cultivo se observó emulsificación del sustrato. A partir de las 30h aproximadamente, cuando ya se ha consumido todo el nitrato del medio, se detectó un aumento en la síntesis de ramnolípidos y a su vez se alcanzaba la fase estacionaria de crecimiento (Figura 3.20). Mulligan y Gibbs en 1989 observaron que el incremento en la producción de ramnolípidos estaba asociada a la desaparición del nitrato en el medio de cultivo (Mulligan y Gibbs, 1989; Manresa *et al.*, 1991).

La acumulación de ramnolípidos en el medio continuó incrementándose hasta las 84h aproximadamente para estabilizarse en 16.50 g/L con una velocidad de acumulación de 0.29 g/L.h, desde el tiempo en que se detectó el incremento (30h) hasta que se estabilizó la producción (84h). El rendimiento respecto a la fuente de carbono ($Y_{P/C}$) fue de 0.33 g de ramnolípidos por gramo de fuente carbono. La biomasa celular obtenida fue de 4.5 g/L, a una velocidad ($\mu_{\text{máx}}$) de 0.16 g/L.h. El rendimiento de celular, $Y_{P/X}$ fue 3.66 g de ramnolípidos por gramo de biomasa seca. El pH se estabilizó en 8 unidades alrededor de las 42h.

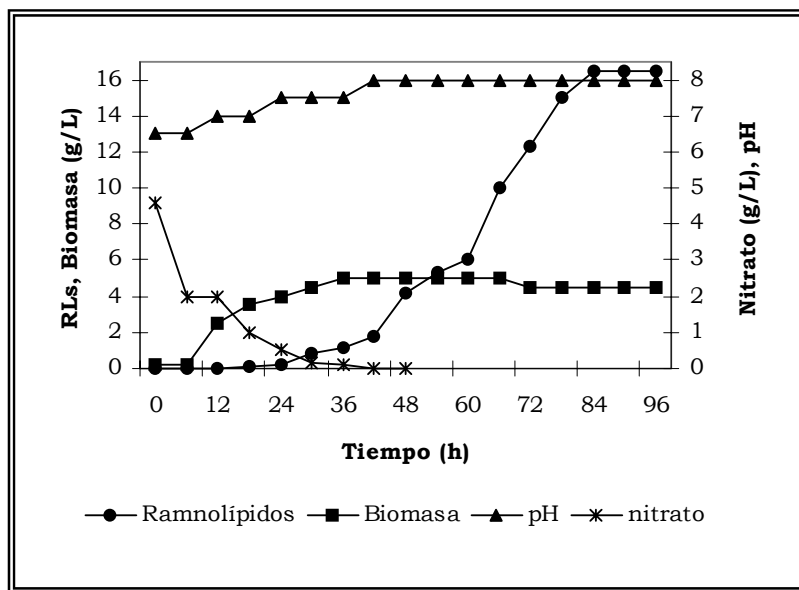


Figura 3.20.- Cinética de producción de los ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10. RAGL, 50 g/L; nitrato, 4.64 g/L; fosfato, 1 g/L; hierro, 7.4 mg/L.

La producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 antes del diseño del medio de cultivo solamente alcanzaba los 3.60 g/L con un rendimiento celular, $Y_{P/X} = 0.85$ (Abalos *et al.*, 2000) (Tabla III.8). Con la aplicación de la técnica de diseño MSR la acumulación de ramnolípidos se incrementó en 4.6 veces, 16.5 g/L. La conversión del sustrato ($Y_{P/C}$) fue del 33% y la productividad de 0.20 g/L.h. Producciones más elevadas de ramnolípidos se obtuvieron con *P. aeruginosa* UW-1 (24.3 g/L) cultivada sobre aceite de canola ($C_{18:1}$) (Sim *et al.*, 1997) y *P. aeruginosa* UI-29791 (46 g/L) cultivada con aceite de maíz ($C_{18:2}$) (Linhardt, 1989) a expensas de periodos de incubación de 240h. La conversión del sustrato $Y_{P/C}$ fue de 34% para *P. aeruginosa* UW-1; sin embargo la productividad alcanzada fue muy baja, 0.10 g/L.h. En el caso de *P. aeruginosa* UI-29791 la conversión del sustrato carbonado (aceite de maíz) en ramnolípidos fue aproximadamente el doble, $Y_{P/C} = 60\%$ de la conversión sustrato carbonado (RAGL) en ramnolípidos alcanzada con *P. aeruginosa* AT10, $Y_{P/C} = 33\%$ no obstante; las productividades volumétricas alcanzadas con ambas cepas no difieren, $P = 0.20$ y 0.19 g/L.h para *P. aeruginosa* AT10 y *P. aeruginosa* UI-29791 respectivamente.

Tabla III.8.- Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 con residuo de soja (RAGL) como fuente de carbono antes y después del diseño del medio de cultivo aplicando MSR.

	Medio no diseñado	Medio diseñado
RLs (g/L)	3.6	16.5
Biomasa (g/L)	4.23	4.5
$Y_{p/x}$ (g/g)	0.85	3.6
$Y_{p/c}$ (%)	18	33
P (g/L.h)	0.037	0.20

Se detectó fuente de carbono emulsionada en el medio de cultivo; lo cual sugiere que una parte de los ramnolípidos no hayan sido cuantificados. Este hecho puede explicar la diferencia entre el valor teórico predicho por el modelo para la producción de ramnolípidos descrito en la ecuación 5 (18.66 g/L) y el valor experimental observado (16.50 g/L).

Finalizado el periodo de incubación; los ácidos esteárico (C_{18:0}) y linolénico (C_{18:3}) fueron consumidos en su totalidad. Los ácidos oleico (C_{18:1}) y linoleico (C_{18:2}) se consumieron en un 39.3%; la fracción volátil (<C₁₂) en un 16.43%; mientras que del ácido palmítico (C₁₆) fue consumido solamente el 3.02%.

3.5.1.2.- Cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* AT10

El inóculo se preparó a partir de 50 mL del medio mineral descrito en el apartado 2.2 de Material y Métodos. Una alícuota del cultivo se centrifugó (10 min, 5000 rpm) para preparar, con el pellet celular, una suspensión de inóculo del 2% v/v.

Las concentraciones utilizadas de la fuente de carbono (RAGL), nitrógeno (NaNO₃), fosfato (K₂HPO₄/KH₂PO₄) y hierro (FeSO₄ x7H₂O) fueron 50; 9; 7 y 13.75 x10⁻³ g/L respectivamente.

El aumento de biomasa se observó a las 18h de cultivo aproximadamente (0.55 g/L) hasta las 78h en que se alcanzó la fase estacionaria, obteniéndose 10.50 g/L de biomasa celular (Figura 3.21). La velocidad de crecimiento, $\mu_{m\acute{a}x}$, fue de 0.16 g/Lh. El pH del medio se mantuvo en 8 unidades a partir de las 42h.

En las condiciones de máximo crecimiento celular, la producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* AT10 fue baja, 2.50 g/L. El rendimiento celular $Y_{p/x}$ (0.24) y la

conversión del sustrato $Y_{P/C}$ (5%) fueron mucho más bajos que los alcanzados en las condiciones de máxima acumulación de ramnolípidos (3.6 y 33% respectivamente) y que los obtenidos en las condiciones del medio sin diseñar (Tabla III.8).

Como era de esperar la síntesis de ramnolípidos en las condiciones de máxima producción (Figura 3.20) y máximo crecimiento celular (Figura 3.21) para *P. aeruginosa* AT10 tuvo un comportamiento diferente. En las condiciones de máxima producción, la síntesis de los ramnolípidos se observó al final de la fase exponencial (Figura 3.20) y comienzos de la estacionaria; cuando el nitrato del medio se agotó.

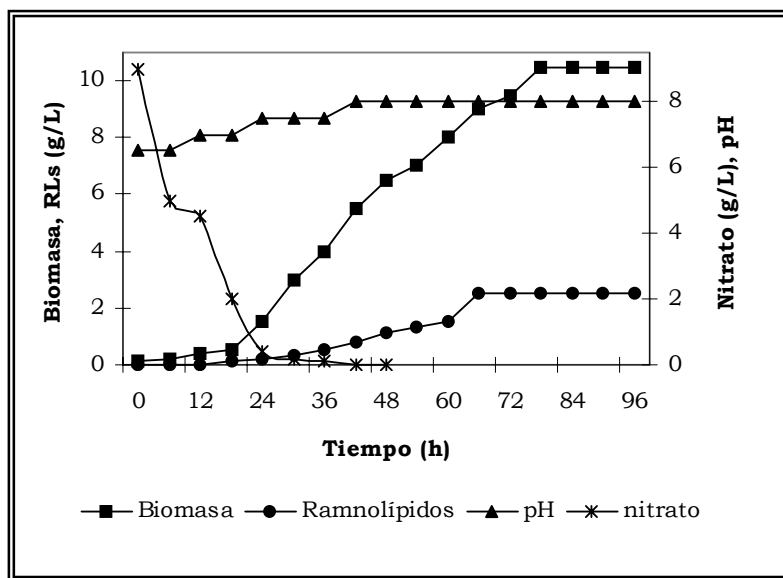


Figura 3.21.- Cinética de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* AT10. RAGL, 50 g/L; nitrato, 9 g/L; fosfato, 7 g/L; hierro, 13.75 mg/L.

Comportamientos similares fueron observados durante el cultivo de *P. aeruginosa* 44T1 (8.8 g/L) en aceite de oliva (Manresa *et al.*, 1991); *P. aeruginosa* UW-1 (24.3 g/L) en aceite de canola (Sim *et al.*, 1997) y *P. aeruginosa* 47T2 (8.1 g/L) en aceites fritos (Haba *et al.*, 2000). La conversión de la fuente de carbono en ramnolípidos fue 50, 34 y 40 % respectivamente. Por el contrario, al incrementarse la concentración de nitrato el crecimiento celular aumenta como se pudo observar en la gráfica de efectos parciales para el nitrato en las condiciones de máxima biomasa (Figura 3.4). En estas condiciones la síntesis de ramnolípidos fue paralela al crecimiento y en la fase estacionaria cesa. (Figura 3.21)

3.6.- Análisis de las inclusiones lipídicas

Las inclusiones lipídicas fueron extraídas como se describió en la sección 2.7.2 de Material y Métodos y analizadas por Espectroscopía de Infrarrojos (IR) y Cromatografía de Gases/Espectroscopía de Masas (CG/EM).

3.6.1.- Acumulación de PHAs por *P. aeruginosa* AT10

La conversión del residuo de ácidos grasos libres (RAGL) en ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 fue más bajo (33%) que los rendimientos $Y_{P/C}$ obtenidos con *P. aeruginosa* 47T2 (40%) (Haba *et al.*, 2000) y *P. aeruginosa* 44T1 (50%) (Manresa *et al.*, 1991), cultivadas en sustratos carbonados similares. Teniendo en cuenta este porcentaje de conversión, la capacidad de *P. aeruginosa* de acumular polihidroxicanoatos (PHAs) (Anderson y Dawes, 1990) y la participación del 3-hidroxiacil-CoA como intermediario común en la síntesis de ramnolípidos y PHAs (Rehm *et al.*, 1998) se observaron por Microscopía Electrónica (EM) las células de *P. aeruginosa* AT10 para comprobar si la cepa acumulaba intracelularmente PHAs.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una familia poliésteres de ácidos (R)-3-hidroxicanoicos esterificados a través del grupo hidroxilo (OH) de la cadena del hidroxiácido. Esterificaciones en las posiciones 2, 4, 5 y 6 (Williams *et al.*, 1999) y sustituciones con halógenos (Witholt y Kessler, 1999) también han sido descritas. La cadena del hidroxiácido puede ser lineal (saturada o insaturada) o ramificada. Los PHAs se localizan en el citoplasma celular en forma de gránulos o inclusiones lipídicas de 0.2-0.5 μm de diámetro, muy refringentes al haz de electrones en microscopía electrónica de transmisión. La superficie *in vivo* de los gránulos es una región dinámica de interfase donde son localizadas las proteínas que intervienen en la síntesis (PHA-sintasa), degradación (PHA-depolimeraza intracelular) y estabilización y formación de las inclusiones (fasinas) (Sudesh y Abe, 2000).

El análisis por EM reveló la presencia de inclusiones lipídicas intracelulares transparentes al haz de electrones (Figura 3.22) asociadas con membranas intracitoplasmáticas y gránulos opacos al haz de electrones.

Tabla III.10.- Composición química de los ramnolípidos M_{AT10} sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Entre paréntesis factor de conversión RLs/Ramnosa.

Asignación probable	t_r (min)	(%)	m/z [M-H] ⁻	Picos
R ₁ C _{8:2}	12.2 (1.8)	6.8	301*	-
R ₂ C ₁₀ C ₁₀	13.0 (3.9)	31.9	649	479 , 169, 311
R ₂ C ₁₀ C _{12:1}	14.2 (4.1)	6.7	675	479 , 311, 169
R ₁ C ₁₀ C ₁₀	14.8 (3.0)	25.2	503	333 , 169, 163
R ₂ C ₁₀ C ₁₂	15.4 (4.1)	12.9	677	479 , 169, 311
R ₁ C _{12:2}	16.0 (2.1)	6.4	357*	-
R ₁ C ₁₀ C _{12:1}	16.0 (3.2)	7.1	529	333 , 163, 169
R ₁ C ₁₀ C ₁₂	17.2 (3.2)	2.8	531	333 , 163, 169

(*) fragmentación total

Las moléculas de RL₁ (R₂C₁₀C₁₀) y RL₂ (R₁C₁₀C₁₀) son considerados los ramnolípidos fundamentales sintetizados *P. aeruginosa* (Syldalk *et al.*, 1985 b; Lang y Wullbrandt, 1999). El monorramnolípido R₁C₁₀C₁₂ fue el homólogo minoritario (2.8%) detectado en la mezcla M_{AT10} .

Las insaturaciones en las cadenas de los β-hidroxiácidos R₂C₁₀C_{12:1} y R₁C₁₀C_{12:1} fueron descritas recientemente en el cultivo de *P. aeruginosa* en manitol y aceite maíz (Déziel *et al.*, 1999 a y b; Mata-Sandoval *et al.*, 1999; Noordman *et al.*, 2000). Las longitudes de las cadenas carbonadas varían entre C₈ y C₁₂ aumentando la diversidad de los homólogos de ramnolípidos y sus posibles combinaciones isoméricas. Sin embargo, cadenas de β-hidroxiácidos poliinsaturadas (R₁C_{12:2} y R₁C_{8:2}) son descritos por primera vez (Abalos *et al.*, 2001). El porcentaje de los monorramnolípidos R₁C_{12:2} y R₁C_{8:2} en la mezcla fue de 6.40 y 6.80 respectivamente (Tabla III.10). Los ramnolípidos son sintetizados vía síntesis de *novo* (Syldatk y Wagner, 1987) y el β-hidroxiácido formado es independiente de la fuente de carbono (Hommel y Ratkedge, 1993); sin embargo las insaturaciones detectadas en las cadenas de algunas moléculas sugiere la dependencia del β-hidroxiácido presente en los ramnolípidos con la fuente de carbono. Los ramnolípidos con cadenas insaturadas se han descrito principalmente durante el cultivo de cepas de *P. aeruginosa* sobre aceites vegetales en cuya composición predominan los ácidos grasos oleico (C_{18:1}) (47T2; Haba, sometido a publicación);

linoleico ($C_{18:2}$) (UG2; Mata-Sandoval *et al.*, 1999) o linolénico ($C_{18:3}$) (LBI; Benincasa, 2001).

Como el potencial de extracción utilizado (-35 V) fue muy bajo no se visualizaron fragmentaciones en los enlaces, no pudiéndose descartar la existencia del par isomérico o del isómero específico en las moléculas con dos cadenas de β -hidroxiácido longitud diferente, es decir los 4 pares de isómeros $R_2C_{10}C_{12:1}$ y $R_2C_{12:1}C_{10}$; $R_2C_{10}C_{12}$ y $R_2C_{12}C_{10}$; $R_1C_{10}C_{12:1}$ y $R_1C_{12:1}C_{10}$ y $R_1C_{10}C_{12}$ y $R_1C_{12}C_{10}$. La determinación del isómero específico en la mezcla se llevó a cabo con un nuevo análisis, en las mismas condiciones, pero incrementando el potencial de extracción a -80 V. Las fragmentaciones fundamentales observadas (Tabla III.10) correspondieron a la ruptura del enlace éster (-COO-) entre las cadenas carbonadas y la ruptura del enlace glicosídico (-O-) entre la unidad de ramnosa y la cadena del β -hidroxiácido; señaladas con los números 1 y 2 respectivamente en la Figura 3.24.

La fragmentación del enlace éster fue la más importante ya que permitió diferenciar entre sí a los mono y dirramnolípidos e identificar a su vez, en el caso de los 4 pares isoméricos señalados, el isómero específico contenido en la mezcla. Para los tres dirramnolípidos (Tabla III.10) fueron visualizadas las fragmentaciones con m/z 479 (ruptura del enlace éster) y m/z 311 (ruptura del enlace glicosídico) (Figura 3.24). El pico m/z 479 corroboró la presencia de los isómeros $R_2C_{10}C_{12:1}$ y $R_2C_{10}C_{12}$.

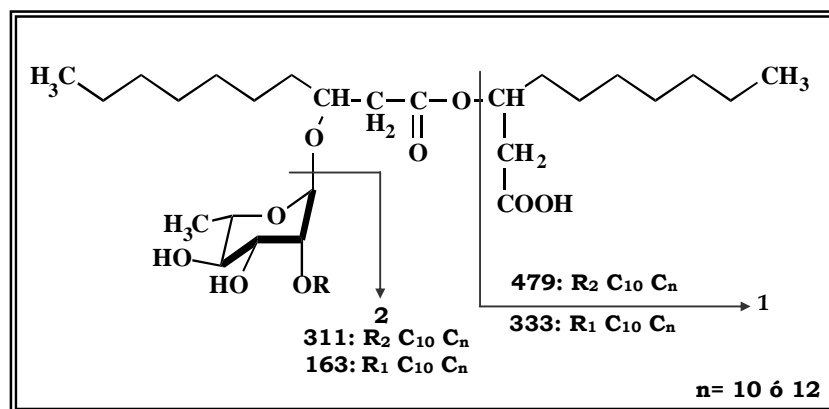


Figura 3.24.- Fragmentaciones características de los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10 (M_{AT10}). 1.-enlace éster; 2.- enlace glicosídico. R= H (monorramnolípidos) R= α -L-ramnopiranosil (dirramnolípidos)

En el caso de los monoramnolípidos, el ión característico fue detectado a m/z 333 (Tabla III.10), el cual correspondió a la ruptura del enlace éster (1). La detección de este pico confirmó que los isómeros contenidos en la mezcla de ramnolípidos M_{AT10} fueron los monoramnolípidos $R_1C_{10}C_{12}$ y $R_1C_{10}C_{12:1}$. En la mezcla de ramnolípidos producida por *Pseudomonas aeruginosa* LBI cultivada sobre “jaboncillo” (soapstock), fracción residual de la primera etapa del proceso de refinado de aceite de soja, (Figura A.1, Anexos) también fueron detectados los homólogos $R_nC_{10}C_{12}$ y $R_nC_{10}C_{12:1}$ ($n= 1$ ó 2), pero no sus respectivos isómeros (Benincasa, 2001). *P. aeruginosa* UG2 cultivada sobre aceite de maíz solamente sintetizó los homólogos del tipo $R_2C_{10}C_{12}$ y $R_2C_{10}C_{12:1}$ (Mata-Sandoval *et al.*, 1999). La presencia de pares de isómeros en mezclas de ramnolípidos ha sido descrita únicamente por Déziel *et al.*, 1999 a y b y Haba, sometido a publicación. Las fragmentaciones de los iones pseudomoleculares de los homólogos $R_1C_{12:2}$ y $R_1C_{8:2}$ no fueron visualizadas a -80 V, por la ruptura total de las moléculas o por la formación de fragmentos moleculares sin grupos ionizables.

La composición de los ramnolípidos M_{AT10} fue similar a los ramnolípidos sintetizada por *P. aeruginosa* LBI (Benincasa, 2001). Tal observación sugirió la influencia directa de los sustratos (Figura A.1, Anexos) empleados para el cultivo de las cepas.

La técnica de HPLC/MS permitió además realizar un estudio más detallado de la acumulación de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 durante el periodo de incubación.

En las primeras 24h de cultivo solamente fueron detectados los ramnolípidos $R_2C_{10}C_{10}$ y $R_1C_{10}C_{10}$ (Figura 3.25). Del total de ramnolípidos acumulados en el medio a las 24h (0.21 g/L); 0.14 g/L correspondieron al dirramnolípido $R_2C_{10}C_{10}$ y tan solo 0.07 g/L al morramnolípido $R_1C_{10}C_{10}$.

Aproximadamente alrededor de las 30h, coincidiendo con el aumento de la acumulación de ramnolípidos, tres nuevos homólogos fueron detectados: $R_2C_{10}C_{12}$; $R_2C_{10}C_{12:1}$ y $R_1C_{10}C_{12:1}$. Sus concentraciones; sin embargo fueron muy bajas (0.02; 0.02 y 0.005 g/L respectivamente).

A partir de las 48h fueron los monoramnolípidos $R_1C_{10}C_{12}$ (0.14 g/L), $R_1C_{12:2}$ (0.17 g/L). Finalmente entre las 72 y 96h se detectó el monoramnolípido $R_1C_{8:2}$ (1.67 g/L). En este periodo de tiempo se observó además que la concentración del dirramnolípido $R_2C_{10}C_{12}$ disminuyó; mientras aumentaba la concentración del dirramnolípido

$R_2C_{10}C_{10}$. (Figura 3.25). En el resto de los homólogos no se observaron cambios en sus concentraciones.

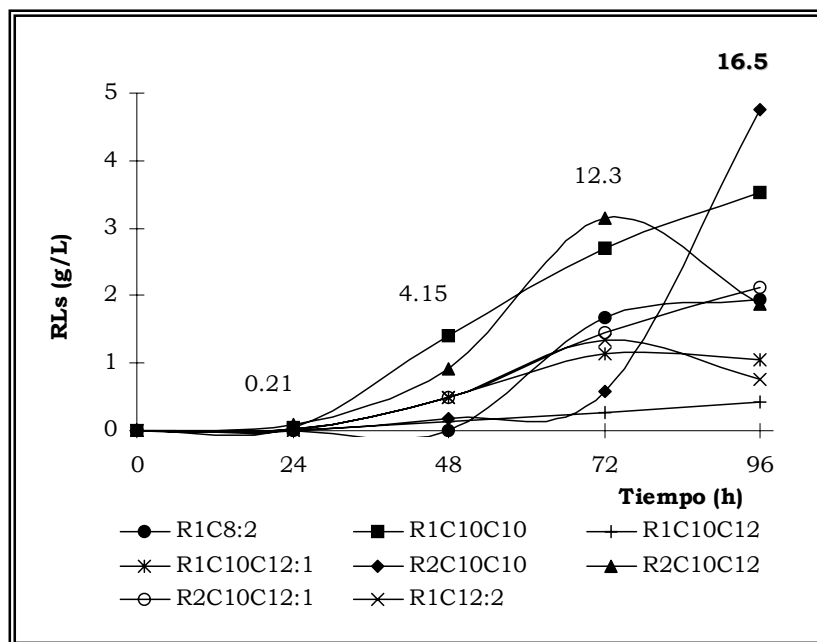


Figura 3.25.- Detección de los ramnolípidos sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 en las condiciones de máxima acumulación: RAGL, 50 g/L; nitrato, 4.64 g/L; fosfato, 1 g/L; hierro 7.4 mg/L.

Del análisis realizado por HPLC/MS se pudo determinar que *Pseudomonas aeruginosa* AT10 cultivada sobre residuo de ácidos grasos libres (RAGL) acumula 8 ramnolípidos: $R_2C_{10}C_{10}$ (4.76 g/L); $R_1C_{10}C_{10}$ (3.52 g/L); $R_2C_{10}C_{12:2}$ (2.11 g/L); $R_1C_{8:2}$ (1.95 g/L); $R_2C_{10}C_{12}$ (1.87 g/L); $R_1C_{10}C_{12:1}$ (1.06 g/L); $R_1C_{12:2}$ (0.77 g/L) y $R_1C_{10}C_{12}$ (0.43 g/L).

3.8.- Propiedades biológicas de los ramnolípidos M_{AT10}

Los ramnolípidos facilitan el carácter invasor y la competencia de *Pseudomonas aeruginosa* sobre otras poblaciones de microorganismos, para la colonización de nuevos hábitats. La participación de esta bacteria en procesos de patogénesis en infecciones crónicas respiratorias (fibrosis cística, bronquitis) se ve favorecida por la producción de ramnolípidos, si bien el papel de los mismos en los procesos respiratorios es más oscuro. (Khöler *et al.*, 2000)

La actividad antimicrobiana fue estimada en base a los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI es la menor concentración de agente antimicrobiano

que reduce visiblemente el crecimiento microbiano. En la Tabla III.11 se muestra la actividad antimicrobiana de los ramnolípidos M_{AT10} producidos por *P. aeruginosa* AT10 frente a bacterias (Gram-positivas y Gram-negativas), levaduras y hongos. El comportamiento de los ramnolípidos M_{AT10} fue diferente para los tres grupos de microorganismos estudiados.

Tabla III.11.- Actividad antimicrobiana de los ramnolípidos M_{AT10} sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AT10

Microorganismos	CMI $\mu\text{g/mL}$
<i>Alcaligenes faecalis</i>	32
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	128
<i>Citrobacter freundii</i>	>256
<i>Enterobacter aerogenes</i>	>256
<i>Escherichia coli</i>	32
<i>Salmonella thyphimurium</i>	128
<i>Serratia marcescens</i>	16
<i>Proteus mirabilis</i>	>256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>256
<i>Arthrobacter oxydans</i>	16
<i>Bacillus cereus v. mycoide</i>	64
<i>Bacillus subtilis</i>	64
<i>Micrococcus luteus</i>	32
<i>Mycobacterium phlei</i>	16
<i>Staphylococcus aureus</i>	128
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	64
<i>Clostridium perfringes</i>	256
<i>Candida albicans</i>	>256
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	>256
<i>Rhodotorula rubra</i>	>256
<i>Aureobasidium pullulans</i>	32
<i>Aspergillus niger</i>	16
<i>Chaetonium globosum</i>	32
<i>Gliocladium virens</i>	16
<i>Penicilium crysogenum</i>	32
<i>Penicilium funiculosum</i>	128
<i>Botrytis cinerea</i>	18
<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	65
<i>Rhizotecnia solani</i>	18
<i>Fusarium solani</i>	65

Se encontró buena actividad inhibitoria frente a *E. coli* y *A. faecalis* (32 $\mu\text{g/mL}$) y *S. marcescens* (16 $\mu\text{g/mL}$). Un comportamiento similar fue observado en los manosileritrosalípidos de *Candida antarctica*, MEL-A y MEL-B (Kitamoto *et al.*, 1993). Con relación a las bacterias Gram-positivas, la actividad antimicrobiana fue más marcada respecto a las Gram-negativas y en un rango de concentraciones más amplio. Se observó fuerte inhibición frente a *S. epidermidis*, siendo la CMI de 8 $\mu\text{g/mL}$. Esta actividad es similar a la observada en los soforolípidos de *Torulopsis bombicola* para

esta misma bacteria y *M. phlei* (16 µg/mL) (Lang y Wullbrandt, 1999). Valores de CMI muy bajos también se obtuvieron para *B. subtilis*, *B. cereus* v. *mycoide* y *S. faecalis* (64 µg/mL). Lang y Wagner observaron mayor actividad (35 µg/mL) frente a *Bacillus* con la mezcla de ramnolípidos formada por R₂C₁₀C₁₀ y R₁C₁₀ (Lang y Wagner, 1993). La cepa *Pseudomonas aeruginosa* GL1 inhibió el crecimiento de *B. cereus*, *Rhodococcus erythropolis* y *P. fluorescens* durante la biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos (HAPs). Los halos de lisis obtenidos oscilaban entre 22 y 35 mm de diámetro (Arino *et al.*, 1998). Los lipopéptidos surfactina (*B. subtilis*) y liquenisina (*B. licheniformis*) por su parte causaron fuerte inhibición en el crecimiento de *A. eutrophus*, *A. calcoaceticus*, *E. coli* y *S. aureus*. Los halos de lisis observados con liquenisina fueron de 8 a 11 mm, mientras que con surfactina superaban los 11 mm (Yakimov *et al.*, 1995). Los tensoactivos sintéticos como el SPAN 20 (ésteres parciales de ácidos grasos entre C₁₂-C₁₆) muestran actividad antimicrobiana por encima de 400 µg/mL para bacterias Gram-positivas y 800 µg/mL para Gram-negativas, levaduras y hongos. (Kitamoto *et al.*, 1993)

Aunque el mecanismo de acción de los tensoactivos aniónicos sobre las membranas celulares y proteínas ha sido ampliamente estudiado, el efecto diferente observado entre bacterias Gram-positivas y negativas no ha sido esclarecido aún. Se ha observado que los tensoactivos aniónicos son más activos frente a bacterias Gram-positivas que frente a las Gram-negativas. La adsorción iónica a la membrana celular puede conducir a citólisis, lisis celular y eventual inactivación de los procesos metabólicos. La composición de los ácidos grasos de la membrana también es un factor importante que determina la sensibilidad de la célula hacia el tensoactivo. (Schwuger y Bartnik, 1980)

Respecto a eucariotas, como se muestra en la Tabla III.11 no se encontró actividad antimicrobiana frente a levaduras. La actividad antifúngica de los ramnolípidos M_{AT10} para los diferentes hongos probados (Tabla III.11) osciló entre 16 y 128 µg/mL. Los valores más bajos de concentración mínima inhibitoria (16 µg/mL) se observaron para *Aspergillus niger*, *Gliocladium virens*, y *Aureobasidium pullulans*, *Chaetonium globusum*, y *Penicillium funicullosum* (32 µg/mL). La actividad inhibitoria también fue estudiada frente a varios hongos fitopatógenos. El crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Rhizotecnia solani* fue inhibido con 18 µg/mL; mientras que 68 µg/mL fueron suficientes para inhibir el crecimiento de *Fusarium solani* y *Colletotrichum gloesporioides*.

La actividad antimicrobiana de los ramnolípidos y biotensoactivos en general frente a hongos no ha sido muy estudiada. Los manosileritrosalípidos MEL-A y MEL-B mostraron actividad muy débil contra *Aspergillus niger* (Kitamoto *et al.*, 1993). Los di, tri y tetra trealosalípidos de *Tsukamurella spec.* DSM 44370 mostraron actividad antimicrobiana frente a *Ustilago violacea* a concentraciones inferiores a 100 µg/mL. (Vollbrecht *et al.*, 1999)

El lugar de acción de los tensoactivos químicos es la membrana celular. Por consiguiente, el efecto de los biotensoactivos sobre la superficie celular es debido tanto a sus propiedades físico-químicas como a la estructura de las células microbianas. Ishigami sugirió que la sustitución del carboxilo (COOH) por su metiléster (COOCH₃) disminuye diez veces la actividad hemolítica de los ramnolípidos (Ishigami *et al.*, 1993). Itoh sugirió que la presencia de una unidad de ramnosa en la molécula es responsable de la actividad antibacteriana, debido al cambio de hidrofobicidad de la molécula al observar que el monorramnolípidos R₁C₁₀C₁₀ fue más activo frente a bacterias Gram-positivas que el dirramnolípidos R₂C₁₀C₁₀. (Itoh *et al.*, 1971)

3.9.- Caracterización físico-química de los ramnolípidos M_{AT10}

La caracterización físico-química se realizó considerando la mezcla de ramnolípidos de *P. aeruginosa* AT10 un único compuesto ya que la separación de todos los componentes individuales de la misma es difícil por su similitud estructural y baja concentración de algunas moléculas. Por otro lado con fines de aplicabilidad resulta más económico utilizar la mezcla y no cada componente individual.

3.9.1.- Ensayos de solubilidad de los ramnolípidos M_{AT10}

La mezcla M_{AT10} es un producto semisólido de color amarillo brillante y olor característico. Soluble en hidróxido de sodio (NaOH), hidrogenocarbonato de sodio (NaHCO₃), metanol (CH₃OH), acetato de etilo (CH₃COOCH₂CH₃), eter etílico (CH₃CH₂OCH₂CH₃) y cloroformo (CHCl₃); parcialmente soluble en agua e insoluble en hexano (C₆H₁₄). En disolución acuosa el pH es de 6.1.

3.9.2.- Determinación de la concentración micelar crítica (cmc)

En la determinación de la tensión superficial (TS) en función de la concentración (Figura 3.26) se observó que la tensión superficial disminuía gradualmente al aumentar la concentración hasta un valor mínimo a partir del cual la tensión

superficial permancia constante. Este valor mínimo de tensión superficial (γ_{cmc}) coincide con la saturación de la superficie del líquido por las moléculas de tensoactivo, las cuales forman una monocapa (exceso superficial) y con la aparición de agregados supramoleculares o micelas en la solución. La concentración a la cual ocurren estos dos fenómenos se denomina concentración micelar crítica (cmc). (Rosen, 1989)

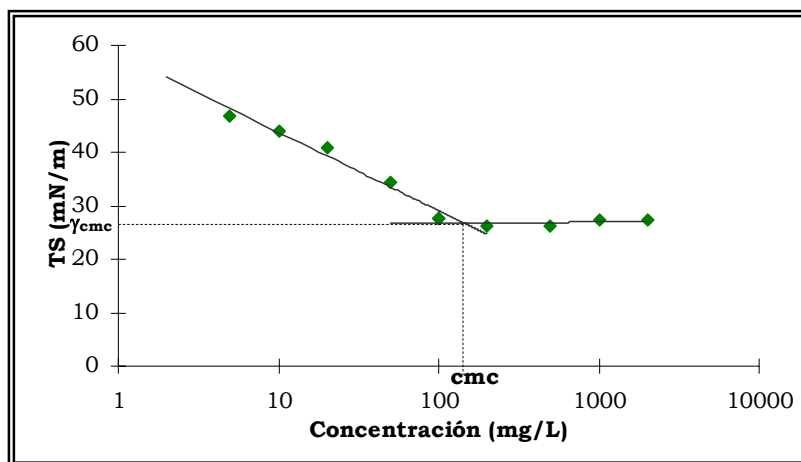


Figura 3.26.- Variación de la tensión superficial (TS) con la concentración de ramnolípidos M_{AT10} .

La cmc obtenida para los ramnolípidos M_{AT10} fue 150 mg/L, valor más bajo que la cmc de los tensoactivos químicos aniónicos como el laurilsulfato de sodio ($C_{12}H_{25}SO_4Na$; 296 mg/L) y el palmitosulfonato de sodio ($C_{16}H_{33}SO_3Na$; 199 mg/L); y algunos ramnolípidos como el metiléster del ramnolípidos B, derivado acilado del $R_2C_{10}C_{10}$, (Me-RB; 400 mg/L) (Ishigami *et al.*, 1993); la mezcla de homólogos $R_1C_{10}C_{10} + R_2C_{10}C_{12} + R_1C_{10}C_{12} + R_1C_{12:2} + R_1C_{8:2}$; 230 mg/L (Abalos *et al.*, 2001) y los ramnolípidos individuales R_1C_{10} y R_2C_{10} ; 200 mg/L (Lang y Wullbrandt, 1999) y más alto los valores de cmc descritos para algunos ramnolípidos individuales: $R_1C_{10}C_{10}$; 20 mg/L (Syldalk *et al.*, 1985 b) y $R_2C_{10}C_{10}$, 40 mg/mL (Sim *et al.*, 1997) o mezclas hasta de dos homólogos $R_2C_{10}C_{12} + R_2C_{10}C_{10}$; 37 mg/L (Mata-Sandoval *et al.*, 1999); $R_2C_{10}C_{10} + R_1C_{10}C_{10}$; 20 mg/L (Noordman *et al.*, 1998).

El aumento en el valor de la cmc se debe por una parte al carácter fuertemente hidrofílico de todas las moléculas, determinado por el (los) anillo(s) de ramnosa y el grupo carboxilo y por la otra a las insaturaciones de las cadenas hidrofóbicas de las moléculas $R_2C_{10}C_{12:1}$; $R_1C_{10}C_{12:1}$; $R_1C_{12:2}$ y $R_1C_{8:2}$. Las insaturaciones afectan la conformación que adoptan las moléculas en las micelas, influyendo en el número de

agregación molecular y por tanto en el valor de la cmc (Rosen, 1989). En el proceso de micelización intervienen todas las moléculas presentes, por tanto, el valor de la cmc depende de la composición de la mezcla. La cmc aumenta con el carácter hidrofílico del grupo polar y los dobles enlaces en el grupo hidrofóbico; que afectan tanto la conformación de las moléculas en las micelas, como el empaquetamiento cerrado del grupo hidrofóbico al alterar su número de agregación (Rosen, 1989; Noordman *et al.*, 2000). Se ha descrito que la simple esterificación del grupo carboxilo en la molécula de ramnolípidos incrementa dos veces el valor de cmc respecto a la molécula no esterificada. (Ishigami *et al.*, 1993)

3.9.3.- Cálculo de la eficiencia y la efectividad de los ramnolípidos M_{AT10}

La acción de los tensoactivos es valorada comúnmente por su **efectividad** y **eficiencia**. La efectividad está determinada por el valor mínimo de tensión superficial alcanzado, que es la tensión superficial en la cmc (γ_{cmc}), y el total de moléculas en el exceso superficial (Γ_T); mientras que la eficiencia está determinada por la concentración de tensoactivo (pC_{20}) capaz de reducir significativamente la tensión superficial del agua. Ambos parámetros no son paralelos, es decir el tensoactivo más eficiente no necesariamente es el más eficaz; y por esta razón suelen utilizarse mezclas de tensoactivos y no tensoactivos puros.

El valor mínimo de tensión superficial (γ_{cmc}) alcanzado por la mezcla M_{AT10} fue 26.8 mN/m (Tabla III.12), valor que es inferior a las tensiones superficiales mínimas descritas para tensoactivos químicos aniónicos típicos como el laurilsulfato de sodio (C₁₂H₂₅SO₄Na); γ_{cmc} 33 mN/m y laurilsulfonato de sodio (C₁₂H₂₅SO₃Na); γ_{cmc} 32 mN/m (Rosen, 1989). Los alquilbencenosulfonatos (R_nArHSO₃) son los únicos tensoactivos químicos que exhiben tensiones superficiales tan bajas (24-26 mN/m) como la de los ramnolípidos, sin embargo tienen la desventaja de ser ambientalmente más tóxicos (Banat, 1995). De los tensoactivos microbianos, los lipopéptidos son los biotensoactivos más efectivos conocidos actualmente ya que son capaces de disminuir la tensión superficial desde 72 mN/m hasta valores de 27 mN/m, destacándose la subtilisina o surfactina de *Bacillus subtilis* y las liquenisininas A y B de *Bacillus licheniformis*. (Yakimov *et al.*, 1995; Desai y Banat, 1997)

Los glicolípidos de *Tsukamurella* sp cultivada en aceite de girasol disminuyeron la tensión superficial del agua hasta 25 mN/m y menos (Vollbretcht *et al.*, 1998). Otros glicolípidos como los celobiosalípidos de *Ustilago maydis* y los soforolípidos de *Torulopsis bombicola* exhibieron valores de tensión superficial entre 30 y 33 mN/m

(Desai y Banat, 1997); mientras que los manoseritrosalípidos producidos por *Candida antarctica* alcanzaron valores de 28 mN/m. (Kitamoto *et al.*, 1993)

El exceso superficial representa el número máximo de moléculas adsorbidas por unidad de área y se calculó aplicando la ecuación de adsorción de Gibbs a los valores premicelares. (Rosen, 1989)

$$\Gamma_T = - \frac{-1}{2.303nRT} \left(\frac{\partial \gamma_{cmc}}{\partial \log C} \right)_T$$

donde R= 8.31 J/mol K; Γ_T = mol/cm² y n es el número de especies en que se disocia el tensoactivo al encontrarse en disolución. Para tensoactivos iónicos, como es el caso de los ramnolípidos, n=2 (Song y Rosen, 1996).

El valor de exceso superficial de los ramnolípidos M_{AT10} fue de 1.23 x10⁷ mol/cm² (Tabla III.12). Este valor es menor que el exceso superficial de los tensoactivos químicos aniónicos del tipo carboxilatos (COO⁻), sulfatos (SO₄²⁻) y sulfonatos (HSO₃⁻), cuyos valores son del orden de 10¹⁰ mol/cm² (Rosen, 1989). Esto indica que los tensoactivos aniónicos de origen químico son menos efectivos que los ramnolípidos M_{AT10}. La efectividad de los tensoactivos se incrementa con la presencia de dobles enlaces en las moléculas.

La efectividad de un tensoactivo determina sus propiedades espumantes, humectantes y emulsionantes debido al empaquetamiento más o menos fuerte de la película interfacial formada en función de la estructura molecular del tensoactivo. Cuanto menor es la efectividad de adsorción, tanto mayor es el área por molécula en la interfase y por tanto más débil será el empaquetamiento de la película interfacial. Se ha observado también que la presencia de dos grupos hidrofílicos, que en los ramnolípidos están representados por el grupo carboxilo y los anillos de ramnosa, provoca un aumento en el área ocupada por la molécula causada por la orientación plana en la interfase de la “porción” de la molécula entre los grupos hidrofílicos (Rosen, 1989). En las moléculas de ramnolípidos la orientación plana puede ser atribuida al impedimento estérico del anillo de ramnosa.

La eficiencia de los ramnolípidos M_{AT10} se determinó por el valor pC₂₀, calculado como el logaritmo negativo de la concentración necesaria para disminuir la tensión superficial del agua en 20 mN/m.

A partir del pC_{20} calculado para los ramnolípidos M_{AT10} se observó que la adición de 0.42 mg/L de ramnolípidos son suficientes para producir una reducción significativa en la tensión superficial del agua (Tabla III.12). El valor pC_{20} del dirramnolípido $R_2C_{10}C_{10}$, componente mayoritario de la mezcla fue de 0.99 mg/L (Abalos *et al.*, 2001), valor que indica que su eficiencia es 2 veces menor que la eficiencia de los ramnolípidos M_{AT10} , es decir para alcanzar la misma reducción significativa en la tensión superficial del agua con el dirramnolípido $R_2C_{10}C_{10}$, se necesita el doble de concentración de los ramnolípidos M_{AT10} . La menor eficiencia del dirramnolípido $R_2C_{10}C_{10}$ se debe a que el grupo hidrofóbico de la molécula $R_2C_{10}C_{10}$, representado por las cadenas carbonadas ($C_{10}C_{10}$), es menor que el grupo hidrofóbico de los ramnolípidos M_{AT10} , representados por las cadenas carbonadas de 8 a 12 átomos.

Los valores pC_{20} descritos para tensoactivos químicos aniónicos suelen estar entre 1-3 mg/L (Rosen, 1989). La eficiencia de los ramnolípidos M_{AT10} es de 2 a 7 veces más alta que la eficiencia de los sulfatos (SO_4^{2-}), sulfonatos (HSO_3^-), carboxilatos (COO^-) y halogenados. Para los ramnolípidos y tensoactivos microbianos en general son desconocidos datos de eficiencia (pC_{20}) y efectividad, referida al exceso superficial (Γ_T).

Las mezclas de dos o más tipos de tensoactivos frecuentemente exhiben interacción sinérgica; esto es que las propiedades interfaciales de la mezcla son más pronunciadas que las de los componentes individuales por sí solas. Al adicionar un 20% de los ramnolípidos M_{AT10} a una solución de laurilsulfato de sodio cuyo valor de cmc es de 200 mg/L, la cmc disminuyó hasta 85 mg/L; poniéndose de manifiesto la interacción sinérgica entre los dos tensoactivos aniónicos ensayados. Dentro de los tensoactivos microbianos las liquenisininas A producidas por *Bacillus licheniformis* actúan sinérgicamente y disminuyen la cmc hasta 12 mg/L. (Desai y Banat, 1997)

Tabla III.12.- Parámetros físico-químicos de los ramnolípidos M_{AT10} producidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

Parámetros físico-químicos	
cmc (mg/L)	150
γ_{cmc} (mN/m)	26.8
pC_{20} (mg/L)	0.42
$\Gamma_m \times 10^7$ (mol/cm ²)	1.23
TI (mN/m)	1
cmc Laurilsulfato/RLs (mg/L)	85

3.9.4.- Propiedades emulsionantes de los ramnolípidos M_{AT10}

La formación de emulsiones a partir de dos fases líquidas no miscibles entre sí es la propiedad más versátil de los tensoactivos para sus aplicaciones en la industria. Las pinturas, pesticidas, helados, cosméticos y muchas formulaciones farmacéuticas son utilizadas en forma de emulsiones.

Para dos fases líquidas no miscibles entre sí, una emulsión se define como la dispersión de una de las fases (fase dispersa) dentro de la otra (fase continua) por la acción de un agente emulsionante que estabiliza termodinámicamente el sistema. La fase dispersa está constituida por gotas microscópicas de 0.1- 100 μm de diámetro. (Zajic y Panchal, 1976; Attwood y Florence, 1983). Se clasifican atendiendo al tamaño de partículas y a la fase dispersa. Según el tamaño de partículas pueden ser **microemulsiones** (0.01- 0.2 μm) o **macroemulsiones** (0.2- 50 μm). Las microemulsiones son semi o transparentes a la luz visible; mientras que las macroemulsiones son opacas a la luz. Dependiendo de la fase dispersa pueden ser emulsiones aceite en agua (o/w) o agua en aceite (w/o). En las emulsiones o/w el aceite es la fase dispersa y el agua la fase continua, invirtiendo las fases puede obtenerse una emulsión w/o.

Los agentes emulsionantes más comunes son los tensoactivos; no obstante sólidos finamente divididos (carbón activado) (Attwood y Florence, 1983) y las vesículas extracelulares de membrana, conocidas como tensoactivos particulados, en *Acinetobacter* sp. (Desai y Banat, 1997) también pueden actuar como emulsionantes. El poder de emulsificación de los tensoactivos, así como el tipo de emulsión formada depende de su estructura química, su concentración y la composición de las fases (Rosen, 1989). Un agente emulsionante induce la formación de gotas de fase dispersa, y una vez formadas, las estabiliza. Estos son dos procesos independientes (Zajic y Panchal, 1976). Por otra parte el agente emulsionante debe tener una actividad superficial tal que permita distorsionar la estructura de las fases continua y dispersa.

La afinidad relativa de un tensoactivo por las fases continua y dispersa se conoce como valor HLB (Hydrophilic- Lipophilic Balance) y fue propuesto por Griffin en 1949 (Rosen, 1989). El método HLB es una escala arbitraria de 0 a 40 donde se agrupan los tensoactivos como solubilizantes (HLB >18), detergentes (13-18), emulsionantes o/w (7-17), emulsionantes w/o (3-7) y antiespumantes (0-2). El valor HLB se puede determinar a partir de la estructura molecular o por datos experimentales de

emulsificación. Considerando la estructura molecular, el valor HLB se puede calcular como:

$$\text{HLB} = 7 + \sum (\text{HLB}_{\text{grupos hidrofílicos}}) - \sum (\text{HLB}_{\text{grupos hidrofóbicos}})$$

En la molécula de los ramnolípidos el carácter hidrófilo está determinado por el grupo carboxilo y el anillo de ramnosa. El carácter hidrófobo es aportado por el β -hidroxiácido. Según propuso Adamson, el grupo carboxilo aporta un valor HLB de 2.1; los anillos glicosídicos 0.5 y los radicales alquílicos -0.47 (Adamson y Gast, 1997). Teniendo en cuenta la fórmula el valor de HLB para los ramnolípidos M_{AT10} es de **10.07**. Este valor indica que los ramnolípidos estabilizan emulsiones o/w. Esta clasificación coincide con la establecida por Lang en 1993 al observar que los glicolípidos tenían un valor HLB cercano a 10 (Lang y Wagner, 1993). Valores HLB entre 10-11 fueron obtenidos también para los glicolípidos producidos por *Tsukamurella spec.* DSM 44370 (Vollbrecht *et al.*, 1999). Como el valor HLB depende del aporte de cada grupo a la molécula puede suceder que tensoactivos distintos tengan el mismo HLB. Los tensoactivos con valor HLB entre 11-13 estimulan la biodegradación de petróleo por poblaciones microbianas. (Bruheim *et al.*, 1997)

El poder de emulsificación E_{24} de los ramnolípidos M_{AT10} fue probado con distintas fases hidrofóbicas (Tabla III.13). La estabilidad de las emulsiones se verificó a las 168 horas y a partir de las 168 horas, cada mes durante un año.

En todas las fases ensayadas, exceptuando el benceno (C_6H_6), se observó formación de emulsiones. En el caso del benceno, la emulsión se desestabilizó a los pocos minutos de formada por la coalescencia inmediata de las gotas en la fase dispersa hasta formar una fase continua única. Con tolueno y n-alcanos se obtuvieron porcentajes de emulsificación de 77 y 75% respectivamente para una misma preparación RLs/sustrato/ H_2O de 15:31:54. La estabilidad de las emulsiones en ambos casos fue baja, siendo más evidente para los n-alcanos, al romperse la emulsión a las 168 h (Tabla III.13). Con aceite de linaza se obtuvo también un 70% de emulsificación, valor que se mantuvo hasta las 168 h.

Tabla III.13.- Porcentajes de emulsificación de los ramnolípidos M_{AT10} con diferentes sustratos hidrofóbicos

Sustrato	RLs	Sust.	H ₂ O	%E ₂₄	168 h
Aceite de linaza	10	56	34	70	70
Aceite de almendra	10	56	34	100	70
Petróleo	10	15	75	100	100
	5	15	80	60	60
Keroseno	15	31	54	100	100
	5	45	50	60	60
Aceite mineral	15	31	54	100	100
Aceite de ricino	5	75	20	50	50
Benceno	15	31	54	-	-
n-alcanos	15	31	54	75	-
Tolueno	15	31	54	77	30

Para los sustratos aceite de almendras, aceite mineral, keroseno y petróleo se alcanzaron porcentajes de emulsificación del 100% al añadir entre 10-15% de ramnolípidos, sin embargo las estabilidades fueron distintas (Tabla III.13). Las emulsiones con aceite mineral y petróleo se mantuvieron estables por más de un año después de su preparación inicial; mientras que con aceite de almendra y keroseno la estabilidad fue disminuyendo en el tiempo hasta su desestabilización total. Esto demostró que para estos dos sustratos los ramnolípidos como agente emulsionante incrementan la formación de gotas de fase dispersa sin lograr una estabilización termodinámica elevada de las mismas una vez formadas.

En las composiciones ensayadas para aceite ricino, petróleo y keroseno con 5% de ramnolípidos, se obtuvieron porcentajes de emulsificación bajos (50 y 60 respectivamente); debido a la baja concentración de ramnolípidos utilizada, 5%. Destacó el hecho de que tanto con aceite de ricino como con petróleo las estabilidades de las emulsiones formadas con un 5% de ramnolípidos, son altas a pesar de que los porcentajes de emulsificación no superan el 60%, en este caso el agente emulsionante no incrementa la formación de gotas de la fase dispersa sino que las estabiliza una vez formadas, evitando la coalescencia y posterior ruptura de las emulsiones (Tabla III.13). La estabilidad de las emulsiones en este caso se debe a las características de los sustratos hidrofóbicos. Patel y Desai observaron que las emulsiones de n-alcanos (C₁₀-C₁₈), petróleo y aceite de coco en sistemas acuosos se estabilizaban en presencia de ramnolípidos. La pérdida de estabilidad al cabo de 24h fue entre un 5-25% según el sustrato hidrofóbico. (Patel y Desai, 1997)

Independientemente de las diferencias de estabilidades y porcentajes de emulsificación encontradas en las emulsiones estudiadas, se observó como

característica común la formación de emulsiones o/w (Figura 3.27), donde la fase dispersa fue el sustrato hidrofóbico y la fase continua agua. El tamaño de las gotas de la fase dispersa fue de 3.5 a 20.2 μm de diámetro, clasificándose las emulsiones como macroemulsiones. Los trealosalípidos de *Rhodococcus* sp. 094 también producen emulsiones o/w altamente estables. (Bruheim et al., 1997)

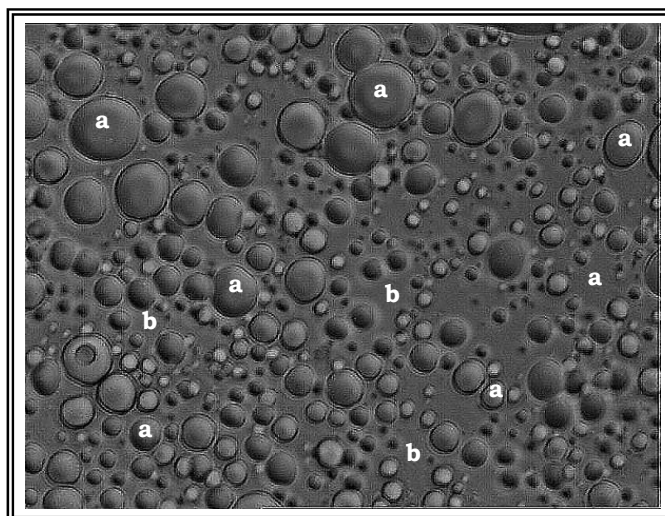


Figura 3.27.- Emulsión aceite en agua (o/w) formada por los ramnolípidos MAT10. Fase continua: agua (b); fase dispersa: sustrato hidrofóbico (a)

3.9.5.- Diagrama ternario de fases

Los sistemas ternarios emulsionante- aceite- agua son muy frecuentes en formulaciones farmacéuticas (Attwood y Florence, 1983), agricultura y alimentos (Kachholz y Schlingmann, 1987) entre otros. La utilización de agentes emulsionantes químicos o microbianos en la recuperación de petróleo (EOR; Enhance Oil Recovery) favorece la explotación máxima y eficiente de los reservorios petrolíferos (Shennan y Levi, 1987; Banat *et al.*, 2000). En los vertidos de petróleo y derivados, la capacidad de emulsificación de los tensoactivos estimula la degradación de los contaminantes por las poblaciones microbianas (Beal y Betts, 2000, Olivera *et al.*, 2000). El dilema fundamental es la selección adecuada de los componentes del sistema ternario y las proporciones en las que han de combinarse para que el producto final reúna las condiciones necesarias para la aplicación deseada: homogeneidad y estabilidad en formulaciones farmacéuticas y cosméticas; viscosidad en recuperación de petróleo, baja estabilidad en tratamientos de biorremediación, entre otras.



Figura 3.22.- Gránulos de polihidroxicanoatos, PHAs (inclusiones claras) acumulados por *Pseudomonas aeruginosa* AT10. RAGL, 20 g/L; nitrato, 3 g/L; fosfato, 1.5 g/L; hierro, 10 mg/L

La detección por IR de dos bandas intensas con número de onda $\nu = 1739 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de tensión de enlace C = O de la función química éster (-COO-) y $\nu = 2854.2 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de tensión del grupo metileno (CH_2) sugirió la presencia de gránulos de poli- β -hidroxicanoatos (PHAs) en el citoplasma. La banda correspondiente a la vibración del enlace C-O de la función química éster fue detectada a $\nu = 1166 \text{ cm}^{-1}$.

La acumulación de PHAs es una respuesta fisiológica a la limitación del medio por algún nutriente necesario en la división celular en presencia de un exceso de fuente de carbono. (Choi y Lee, 1999; Steinbüchel y Valentin, 1995). En las condiciones de máxima producción de ramnolípidos (50, 4.64, 1, 7.4×10^{-3} g/L para RAGL, nitrato, fosfato y hierro respectivamente), el medio del cultivo está limitado por nitrato y fosfato favoreciendo la acumulación intracelular de PHAs. En estas condiciones, *P. aeruginosa* AT10 acumuló el 40 % de la biomasa celular producida (4.5 g/L) en forma de PHAs. Por el contrario, en las condiciones de máxima producción de biomasa (50, 9, 7, 13.75×10^{-3} g/L para RAGL, nitrato, fosfato y hierro respectivamente), solamente se acumuló el 20 % de la biomasa (10.5 g/L). La explicación de estos resultados está

dada porque el medio no está limitado por ningún nutriente, aproximándose el diseño del mismo a la composición centesimal determinada para *Pseudomonas sp.* (Rodríguez, E., comunicación personal)

3.6.2.- Composición química de los PHAs de *P. aeruginosa* AT10

La composición química de los gránulos de PHAs se determinó por Cromatografía de Gases/Espectroscopía de Masas (GC/MS) con ionización por Impacto Electrónico (EI) e Ionización Química (CI) con metano. En cromatografía gaseosa, los componentes de una mezcla son separados según su coeficiente de reparto entre la fase móvil gaseosa (gas portador) y la fase estacionaria (sólida o líquido). El gas portador comúnmente utilizado es el Helio; mientras que como fase estacionaria sólida suelen emplearse soportes de sílica (SiO_2) o alúmina (Al_2O_3) y siloxano (R_nSiOH) como fase estacionaria líquida. El detector típico es un detector de ionización a la llama (FID) (Skook y Leary, 1994).

La técnica de Espectrometría de Masas se fundamenta en la fragmentación de los enlaces de una molécula expuesta a un bombardeo electrónico. Si la ionización se realiza con un haz de electrones se denomina Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico (MS-EI); por el contrario si el agente ionizante es un gas reactivo (CH_4 o NH_3) la técnica se denomina Espectrometría de Masas por Ionización Química (MS-CI). La ionización por impacto tiene la ventaja de que las fragmentaciones obtenidas permiten describir una estructura molecular, sin embargo frecuentemente el pico molecular no es visualizado. La Ionización Química produce escasas fragmentaciones, lo cual permite visualizar el ión pseudomolecular $[\text{M}+1]^+$. Para los análisis de estructuras moleculares estos métodos son utilizados de forma combinada. (Hesse y Meier, 1995)

Los espectros obtenidos por EI permitieron la identificación de los ácidos grasos hidroxilados y fijar a su vez la posición del hidroxilo en la cadena a partir de los picos correspondientes a los iones de m/z 73 (ruptura del enlace O-trimetilsililo; $[\text{Si}(\text{CH}_3)_3]^+$); m/z 89 debido a la ruptura del enlace C-O; $([(\text{CH}_3)_3\text{Si-O}]^+)$ y m/z 175 que corresponde a la escisión en el C_α al grupo hidroxilo en posición β dentro de la cadena del ácido graso. En los espectros también se visualizó el pico $[\text{M}-15]^+$, cuya asignación correspondió al ión molecular de los metilésteres sililados una vez escindido el grupo CH_3 . En la Figura 3.23 se muestran los picos característicos detectados en el espectro de gases/masas por Impacto Electrónico (IE).

En los espectros por CI se visualizó un pico muy intenso que correspondió al ión pseudomolecular $[M-15]^+$, seguido del ión $[M-1]^+$. En ocasiones también fueron observados los iones $[M+29]^+$ y $[M+41]^+$ originados por la unión de los aductos del metano $C_2 H_5^+$ y $C_3 H_5^+$ respectivamente a la molécula. Del estudio combinado de los espectros obtenidos por EI y CI fueron identificados 6 monómeros de ácidos β -hidroxilados, de fórmula general **3-hidroxi- $C_nH_{2n-1}O_2$** para los tres monómeros saturados detectados y **3-hidroxi- $C_nH_{2n-3}O_2$** ó **3-hidroxi- $C_nH_{2n-5}O_2$** para los monómeros mono y di-insaturados respectivamente.

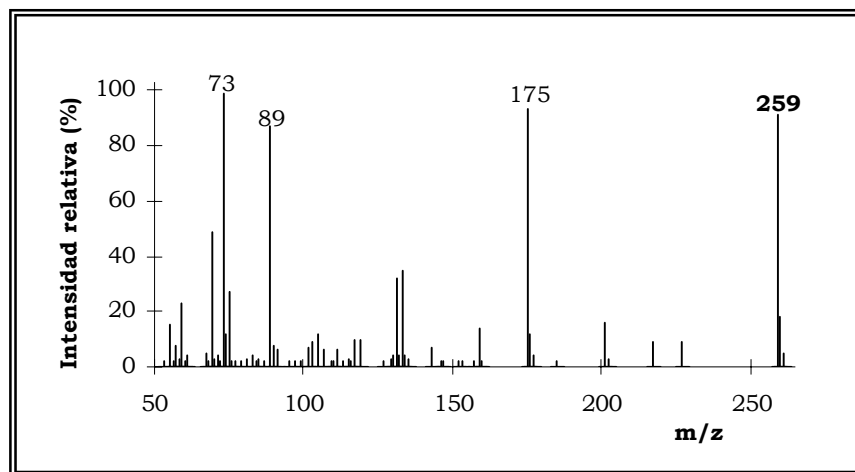


Figura 3.23.- Espectro de masas obtenido por Impacto Electrónico del ácido R-3-hidroxidecanoico de los PHAs de *P. aeruginosa* AT10

En la Tabla III.9 se muestra la composición química de los diferentes monómeros encontrados en los gránulos de PHAs de *Pseudomonas aeruginosa* AT10. La cuantificación se realizó en base a las intensidades relativas de los ácidos hidroxilados.

El monómero mayoritario en el polímero fue el ácido 3-hidroxidecanoico ($C_{10:0}$), con un 41.1% de abundancia. Este hidroxiaácido es el grupo hidrofóbico más frecuente en las moléculas de los ramnolípidos. El segundo monómero más abundante fue el ácido 3-hidroxiocetanoico ($C_{8:0}$) con un 17.7%; mientras que 9.9% correspondió al ácido 3-hidroxidodecanoico ($C_{12:0}$) y un 10.2% al ácido 3-hidroxidodecenoico ($C_{12:1}$). Estos hidroxiaácidos también han sido encontrados en el grupo hidrofóbico de los ramnolípidos (Déziel *et al.*, 1999 a y b; Mata-Sandoval *et al.*, 1999). La presencia de estos monómeros (C_8 - C_{12}) como componentes mayoritarios ha sido descrita en los gránulos de PHAs acumulados por *P. oleovorans* cultivada sobre n-alcenos, ácidos

carboxílicos y alcoholes (C₆-C₁₂) como fuente de carbono (Anderson y Dawes, 1990). Los 3-hidroxiácidos de 14 átomos de carbono mono y diinsaturados fueron los monómeros minoritarios (9.1 y 8.9% respectivamente).

Tabla III.9.- Composición química de los PHAs de *P. aeruginosa* AT10. Señalados los picos [M+H]⁺, [M+29]⁺ y [M+41]⁺ detectados por Impacto Electrónico (EI) e Ionización Química (CI).

tr (min)	C _n (%)	3-OH ácido	Picos característicos	
			EI	CI
15.6	C _{8:0} (17.7)	160	73, 175, 89, 231	247, 277 , 289
18.7	C _{10:0} (41.1)	188	73, 175, 89, 259	275, 305 , 317
21.3	C _{12:1} (10.2)	214	73, 175, 89, 285	301, 331 , 343
21.6	C _{12:0} (9.9)	216	73, 175, 89, 287	303, 333 , 345
23.8	C _{14:1} (9.1)	242	73, 175, 89, 313	329, 359 , 371
23.9	C _{14:2} (8.9)	240	73, 175, 89, 311	327, 357 , 369

El tipo de PHAs sintetizado por cada microorganismo depende fundamentalmente de la fuente de carbono, la PHA-sintasa y la ruta metabólica involucrada (Sudesh y Abe, 2000). Los sustratos más comunes en la síntesis de PHAs por *Pseudomonas* sp. son ácidos grasos (Fernández, 2000), aceites vegetales (Sudesh y Abe, 2000) y residuos oleosos (Vidal *et al.*, sometido a publicación). *Pseudomonas* sp. 42A2, por ejemplo acumula mayoritariamente PHAs que contienen monómeros de 10, 12 y 8 átomos de carbono con oleina (C_{18:1}) como fuente de carbono; sin embargo esta misma cepa con el residuo de ácidos grasos libres (RAGL) acumula además de los monómeros antes señalados, monómeros de 14 átomos de carbono mono y diinsaturados (Fernández, 2000). *Pseudomonas aeruginosa* AT10 al crecer con oleina como fuente de carbono, acumula mayoritariamente monómeros de 10 y 8 átomos de carbono; mientras que con RAGL aparecen además monómeros de 12 y 14 átomos de carbono, con diferente grado de insaturación. (Tabla III.9)

3.7.- Caracterización química de los ramnolípidos M_{AT10}

La caracterización de los ramnolípidos por Cromatografía en capa fina (TLC) (Itoh *et al.*, 1971) es un procedimiento poco sensible. La aplicación de las técnicas de HPLC y Espectrometría de masas (MS) en la caracterización química de los ramnolípidos ya sea como técnicas individuales (Parra *et al.*, 1989; Schenk *et al.*, 1994; Arino *et al.*,

1996) o combinadas (Déziel *et al.*, 1999 a y b; Mata-Sandoval *et al.*, 1999) es un método más sensible y eficiente para conocer la composición de los ramnolípidos sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa* AT10. La combinación de HPLC/MS supone la utilización del espectrómetro de masas como detector del cromatógrafo líquido. Así, las muestras eluidas y separadas por HPLC son recogidas y analizadas individualmente por MS. La fragmentación de los enlaces de la molécula expuesta a un bombardeo electrónico permite la obtención de su espectro de masas correspondiente. Si la muestra es introducida en el analizador de masas (cuadrupolo) previamente pulverizada e ionizada se denomina Espectrometría de masas con Ionización por Electrospray (ESI). (Hesse y Meier, 1995)

Previo al análisis por HPLC/ESI-MS la muestra se purificó por cromatografía de adsorción en columna y posterior elución con metanol (Reiling *et al.*, 1986). Después de la evaporación del metanol, el 65% de los ramnolípidos fueron recuperados del sobrenadante depositado en la columna. El 65–70% de los ramnolípidos acumulados extracelularmente pueden ser recuperados del medio de cultivo por este método.

En ESI negativo solamente son visualizadas las moléculas cargadas negativamente. En estas condiciones, el espectro de masas generado al potencial de extracción de trabajo (-35 V) mostró un ión [M-H]⁻ muy intenso, debido a la desprotonación del grupo carboxilo de los ramnolípidos, que portaba la mayor proporción del ión total.

En el análisis realizado por HPLC/ESI-M fueron detectados 8 picos, los cuales se clasificaron de acuerdo a su ión pseudomolecular registrado en el espectro de masas. La detección de los 8 homólogos se verificó entre los 12 y 17 minutos (Tabla III.10) del gradiente de fase móvil (AcN/H₂O) del HPLC. La proximidad encontrada en los tiempos de retención de los diferentes homólogos fue debido a la similitud estructural que poseen. La mezcla está formada por **tres** dirramnolípidos (51.5%): R₂C₁₀C₁₀; R₂C₁₀C_{12:1}; R₂C₁₀C₁₂ y **cinco** monorramnolípidos (48.5%): R₁C₁₀C₁₀; R₁C₁₀C_{12:1}; R₁C₁₀C₁₂; R₁C_{12:2}; R₁C_{8:2}. Individualmente, los componentes mayoritarios de la mezcla M_{AT10} fueron el dirramnolípidos R₂C₁₀C₁₀ (31.9%) detectado a m/z 649 y el monorramnolípidos R₁C₁₀C₁₀ (25.2%) con m/z 503. Estas moléculas se corresponden con los ramnolípidos clásicos RL₁ y RL₂ respectivamente descritos previamente por Itoh en 1971 al cultivar diferentes cepas de *P. aeruginosa* en n-alcenos. La mezcla de estas dos moléculas contenía un 51.3% del ramnolípidos RL₁ (Itoh *et al.*, 1971).

El diagrama de fases permite un conocimiento completo de las posibilidades que un sistema puede ofrecer en cuanto a sus estados fásicos, en función de las proporciones relativas de sus componentes. El equilibrio de fases dentro de un sistema ternario se representa en un diagrama de fases triangular en el cual se delimitan las regiones, según las combinaciones seleccionadas de los tres componentes, que producen emulsiones estables, microemulsiones, cristales líquidos u otro estado fásico de interés (Attwood y Florence, 1983). La representación gráfica del sistema se realiza sobre un triángulo equilátero, ya que la suma de las perpendiculares de los lados en cualquier punto de este es igual al peso del triángulo. El triángulo está dividido en 100 partes, las cuales se hacen corresponder con la composición en porcentaje de cada componente. De este modo el 100% de cada componente se sitúa en los vértices y el lado opuesto al vértice indica el sentido hacia dónde disminuye la composición de ese componente en un punto dado (Attwood y Florence, 1983). En el presente trabajo se consideró oportuno estudiar el sistema ramnolípidos-petróleo-agua con el objetivo de utilizar los ramnolípidos en la biodegradación de crudo de petróleo.

Para proceder al estudio se prepararon diferentes composiciones (Tabla III.14) utilizando ramnolípidos en forma semisólida y en solución acuosa a pH ligeramente alcalino. Los ramnolípidos en forma semisólida se obtuvieron a partir de la purificación por columna de adsorción y la solución acuosa se preparó a partir de los ramnolípidos precipitados en medio ácido (H_2SO_4 , pH 1-2).

En todas las composiciones preparadas (Figura 3.28) se observó emulsificación del petróleo y la característica común en las composiciones ensayadas fue la formación de emulsiones múltiples o/w/o (Figura 3.29). Los porcentajes de emulsificación (15-50%) obtenidos en las preparaciones con ramnolípidos en solución acuosa (zona clara del diagrama) fueron más bajos (Tabla III.14) que los observados en las preparaciones con ramnolípidos en forma semisólida (zona oscura del diagrama), excepto en las composiciones con un contenido de ramnolípidos y agua entre un 10 y 20%; en las cuales se alcanzaron porcentajes de emulsificación relativamente altos (70-80%).

En las preparaciones con ramnolípidos en forma semisólida (5-15%), se obtuvieron porcentajes de emulsificación entre el 60 y 100% (Tabla III.14) y se observó bajo luz polarizada, una tercera fase de cristal líquido (Figura 3.30). La fase cristal líquido es una estructuración más compacta y compleja de las micelas del tensoactivo (ramnolípidos) y su presencia sugiere la agrupación laminar o en multicapas de las micelas de los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

Tabla III.14.- Composición en porcentaje de las preparaciones del diagrama ternario de fases.

RLs	Petróleo	H ₂ O	%E
10	15	75	100
10	50	40	60
10	70	30	100
10	40	50	100
15	31	54	100
5	40	55	34.5
5	45	50	70
5	35	65	70
5	15	80	60
20	60	20	70.6
10	45	45	50
20	20	60	24.2
20	70	10	73.5
10	80	10	80.6
10	5	85	16
10	10	80	20
10	15	75	26.1
10	20	70	15.7

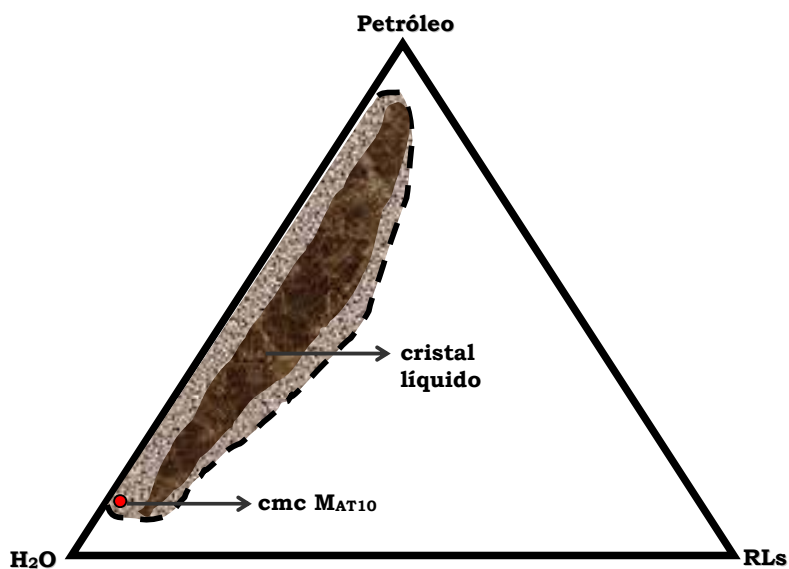


Figura 3.28.- Diagrama ternario de fases del sistema RLs-Petróleo-agua. Emulsiones múltiples o/w/o: zona de líneas de puntos; RLs semisólidos: zona más oscura; RLs en solución acuosa: zona más clara.

La fase cristal líquido es una estructuración más compacta y compleja de las micelas del tensoactivo (ramnolípidos) y su presencia fue indicativo de una agrupación en multicapas o laminar de las micelas de los ramnolípidos. Cuando aparecen fases de cristal líquido, la concentración de las micelas en ese estado fásico es varias veces superior al valor de la concentración micelar crítica (Attwood y Florence, 1983)

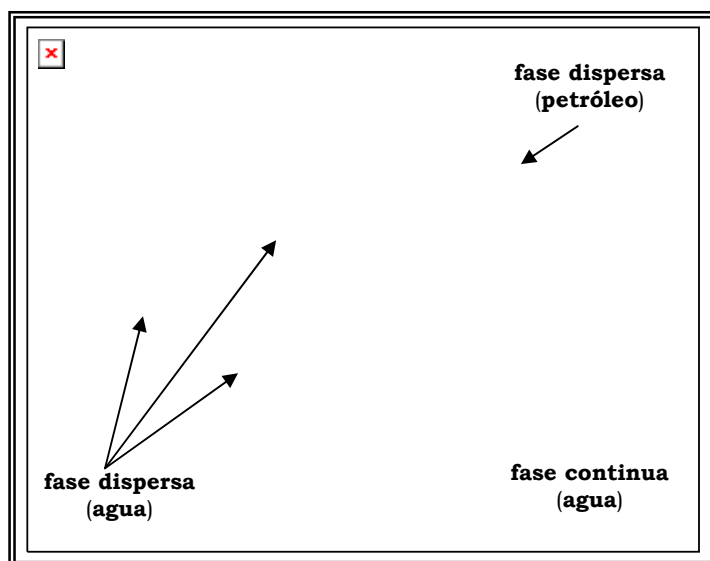


Figura 3.29.- Emulsión múltiple o/w/o formada por los RLs (M_{AT10})/petróleo/agua.

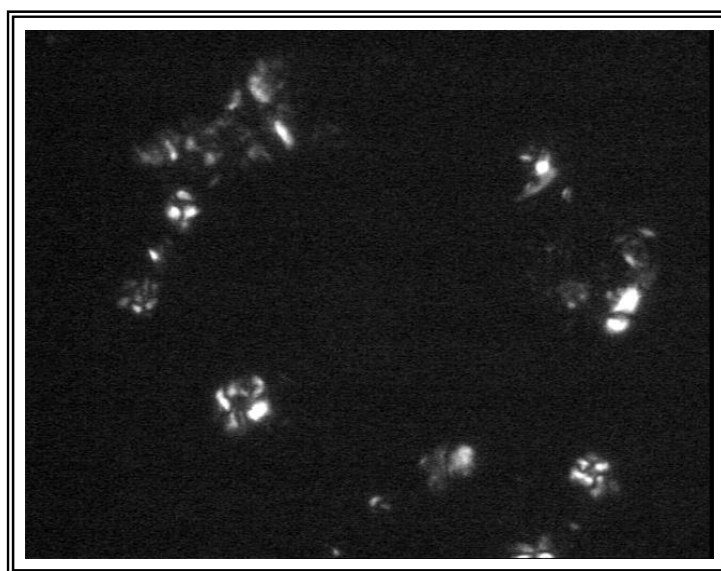


Figura 3.30.- Fase cristal líquido observada con luz polarizada en las composiciones con ramnolípidos M_{AT10} en forma semisólida.

3.10.- Biodegradación del crudo de petróleo Casablanca

Considerando los resultados obtenidos en el diagrama ternario de fases se utilizó la capacidad emulsionante de los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* AT10 en la biodegradación de un crudo de petróleo.

El petróleo no refinado o crudo de petróleo es un líquido viscoso de color oscuro, menos denso que el agua e insoluble en ella. Está compuesto por una mezcla muy heterogénea de hidrocarburos saturados alifáticos, ramificados o cíclicos; hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos, y resinas y compuestos polares. La composición de un crudo de petróleo varía según la localización y origen; aunque básicamente se suele clasificar como crudo ligero o parafínico si la fracción mayoritaria es n-alcanos y alcanos ramificados o isoprenoides o crudo pesado o asfáltico si la fracción mayoritaria está compuesta por cicloalcanos o naftenos y aromáticos (Harayama *et al.*, 1999).

En el presente trabajo se escogió como modelo el crudo de petróleo Casablanca, crudo ligero, compuesto por un 56.6% de hidrocarburos saturados alifáticos (C₈-C₄₀) y ramificados (isoprenoides de C₁₂-C₁₈); 10.6% de hidrocarburos aromáticos, 14.6% de hidrocarburos poliaromáticos y 18.2 % de resinas, alquitranes y compuestos polares (Viñas, 1999). El estudio de la biodegradación del crudo Casablanca se realizó en dos bloques. Primer bloque: Biodegradación del crudo de petróleo Casablanca por la cepa productora de ramnolípidos *Pseudomonas aeruginosa* AT10 y Segundo bloque: Influencia de los ramnolípidos de *P. aeruginosa* AT10 en la biodegradación del crudo de petróleo Casablanca por el consorcio microbiano AM (Sabaté, 1998).

Los estudios de biorremediación en aguas y suelos están basados en la reducción de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH) y los porcentajes de biodegradación, en los dos bloques, se estimaron en base a la disminución de los TPH de las fracciones alifática y aromática del crudo Casablanca.

3.10.1.- Biodegradación del crudo de petróleo Casablanca por *Pseudomonas aeruginosa* AT10

El estudio de la biodegradación del crudo Casablanca por *P. aeruginosa* AT10 se realizó utilizando dos tratamientos de inóculo durante 10 y 20 días de incubación para cada tratamiento de inóculo. En todos los casos las muestras fueron corregidas respecto a controles tratados en las mismas condiciones.

Se utilizaron inóculos 24 y 72 horas de incubación debido a que la cepa *P. aeruginosa* AT10 es productora ramnolípidos. En ambos casos se añadió un 2% de una suspensión celular $DO_{540\text{ nm}} = 2$; obtenida de un cultivo en el medio mineral descrito en el apartado 2.2 (Material y Métodos). Las cantidades de ramnolípidos añadidas al medio de cultivo dependieron del inóculo empleado. El medio con inóculo de 24 h contenía 1.1 mg/mL; mientras que el medio con inóculo de 72 h contenía 60 mg/mL de ramnolípidos. En los dos tratamientos la concentración de ramnolípidos añadida al medio fue menor que su concentración micelar crítica (150 mg/L).

3.10.1.1.- Análisis de las fracciones alifática y aromática

La fracción alifática del crudo se analizó por Cromatografía de gases-FID y los porcentajes de biodegradación fueron calculados teniendo en cuenta la UCM (unresolved complex mixture) + picos resueltos.

Los perfiles cromatográficos de las muestras con inóculos de 24 y 72 horas y concentraciones de ramnolípidos de 1.1 y 60 mg/L respectivamente mostraron marcadas diferencias con el cromatograma control (Figura 3.31 a), sin embargo los cromatogramas de las muestras (Figura 3.31 b) para cada tratamiento fueron muy similares entre sí, independientemente del tiempo de incubación del cultivo (10 y 20 días).

Pseudomonas aeruginosa AT10 solo degradó la fracción alifática de los alcanos comprendida entre C_8 y C_{40} ; mientras que los isoprenoides no sufrieron modificación alguna, (Figura 3.31 b). Los n-alcanos son los hidrocarburos más abundantes en el crudo Casablanca. La degradación ocurre aeróbicamente por oxidaciones sucesivas de las moléculas hasta la formación del ácido carboxílico correspondiente, el cual es incorporado directamente en la β -oxidación. La vía oxidativa más común es la oxidación terminal: alcano (C-C) \rightarrow alcohol (C-OH) \rightarrow aldehído (C=O) \rightarrow ácido carboxílico (COOH) \rightarrow **β -oxidación**. La oxidación es catalizada por una monooxigenasa (Harayama *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2000). La utilización de sorbentes naturales como el quitosano de los crustáceos aumentó la capacidad biodegradativa de *Pseudomonas aeruginosa* facilitando la interacción petróleo/microorganismo en la interfase agua/célula/petróleo/sorbente. El tiempo de incubación necesario se redujo de 31 a 7 días. (Setti *et al.*, 1999)

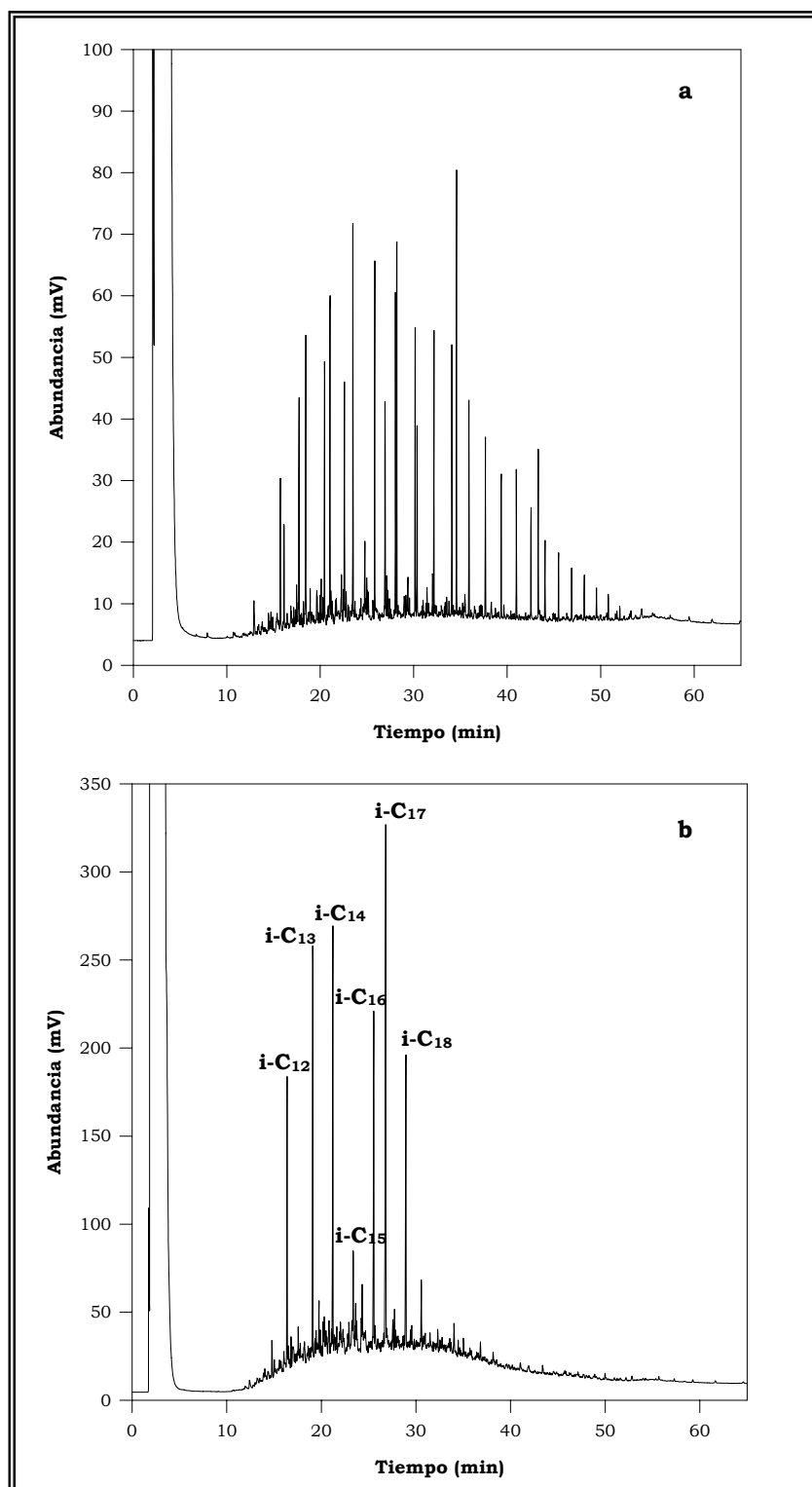


Figura 3.31.- Perfil cromatográfico del crudo Casablanca antes (a) y después (b) del tratamiento con *Pseudomonas aeruginosa* AT10 a los 10 días de incubación.

La serie de n-alcenos presente en el crudo Arabian light fue completamente oxidada por *Pseudomonas spp.* a los 20 días de incubación; sin embargo los isoprenoides fueron resistentes a la biodegradación (Solanas *et al.*, 1984). La biodegradación de isoprenoides en presencia de mezclas de n-alcenos frecuentemente está reprimida y solo se ha descrito en cepas muy especializadas (Nakajima *et al.*, 1985) y en consorcios microbianos utilizando el lipopéptido subtilisina de *Bacillus subtilis* 09 (Olivera *et al.*, 2000).

Los porcentajes de biodegradación obtenidos en las muestras tratadas con inóculo de 24 h fueron de 48% a los 10 días y 50% a los 20 días y en las muestras tratadas con inóculo de 72 h, se alcanzaron porcentajes de biodegradación de 44% y 42% a los 10 y 20 días respectivamente. La ligera disminución obtenida en los porcentajes de biodegradación en las muestras tratadas con inóculo de 72 h respecto a las muestras con inóculo de 24 h se explicó por el envejecimiento del inóculo de 72 h. No obstante, no se observaron diferencias entre los porcentajes de biodegradación a los 10 y 20 días en ninguno de los dos tratamientos; resultado que evidenció la biodegradación de la fracción de alifática en los primeros 10 días de incubación tanto para las muestras con inóculo de 24 h como las tratadas con inóculo de 72 h.

Finalizado el período de incubación, se determinaron las tensiones superficiales de los medios de cultivo en los tratamientos de 24 y 72 h. La tensión superficial medida fue 52 mN/m en ambos casos, valor que se correspondió con la tensión superficial del medio mineral utilizado (Material y Métodos 2.8.1.1). Tal observación indicó por una parte que la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT10 no produce ramnolípidos cuando se cultivó con petróleo como fuente de carbono y por otra que los ramnolípidos inicialmente añadidos en el medio de cultivo no favorecieron el proceso de biodegradación. Una situación similar se observó con *P. aeruginosa* UG-2, productora de ramnolípidos. Cuando se inoculó la cepa en suelos contaminados con hidrocarburos no hubo incremento de la actividad biodegradativa (Jain *et al.*, 1992). Las cantidades de ramnolípidos que se añadieron al medio de cultivo en los dos tratamientos de inóculo fueron de 1.1 mg/L y 60 mg/L para los inóculos de 24 y 72 horas respectivamente; las cuales están muy por debajo de la cmc de los ramnolípidos M_{AT10} de *P. aeruginosa* AT10 (150 mg/L). A concentraciones inferiores a la concentración micelar crítica (cmc) el proceso de micelización no tiene lugar, razón por la cual no se detectó una reducción de la tensión superficial.

El análisis de la fracción aromática se realizó por Cromatografía de Gases/Espectroscopía de Masas (GC/MS) ya que el contenido de hidrocarburos

saturados en el crudo Casablanca (alifáticos + isoprenoides) es el doble de los hidrocarburos aromáticos, quedando esta última fracción enmascarada en la UCM. Para proceder al análisis por GC/MS, el perfil cromatográfico de los aromáticos se subdividió en dos familias. La primera (F₁) y más ligera se registró entre 15-20 min y la segunda y más pesada (F₂) se registró entre 25-40 min.

El porcentaje de biodegradación calculado por la integración total de los picos en cada familia fue nulo tanto en la F₁ como en la F₂. Estos resultados muestran que *Pseudomonas aeruginosa* AT10 no fue capaz de degradar los hidrocarburos aromáticos del crudo Casablanca; razón por la cual no se estudiaron individualmente los hidrocarburos aromáticos de la F₁ y la F₂.

3.10.2.-Influencia de la adición de los ramnolípidos M_{AT10} en la biodegradación del crudo de petróleo Casablanca por el consorcio microbiano AM

La biodegradación de moléculas orgánicas (hidrocarburos, pesticidas, aromáticos policíclicos, etcétera) es un proceso que transcurre en dos etapas: transporte de la molécula desde la fase acuosa hacia el interior de la célula y su posterior catabolismo a través de oxidaciones sucesivas. (Zheng y Obbard, 2000). El paso limitante en el proceso es la baja biodisponibilidad de las moléculas debido a su pobre solubilidad en los sistemas acuosos, compatibles con la vida microbiana (Morán *et al.*, 2000). La adición de tensoactivos es una estrategia que permite acelerar el proceso de biodegradación al aumentar la solubilidad de las moléculas orgánicas en la fase acuosa, facilitando así la penetración al medio intracelular. (Zhang y Miller, 1992; Bruheim *et al.*, 1997; Olivera *et al.*, 2000; Singer *et al.*, 2000)

A partir de los resultados obtenidos en el diagrama ternario de fases (3.9.5) se procedió a estudiar la influencia de los ramnolípidos M_{AT10} en la biodegradación del crudo Casablanca por el consorcio microbiano AM. La concentración de ramnolípidos utilizada se escogió de modo que la composición final del medio estuviera dentro de la zona del diagrama ternario de fases (Figura 3.28) con los porcentajes de emulsificación más bajos (zona clara) y a su vez con un contenido de ramnolípidos no mayor del 1% (m/v). Con este criterio la concentración de ramnolípidos añadida fue 0.5% (m/v).

El consorcio microbiano AM utilizado en presente trabajo pertenece a la colección del grupo de biodegradación de hidrocarburos del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología. Este consorcio está adaptado a la mezcla de hidrocarburos aromáticos antraceno, fluoreno, fenantreno, fluoranteno y pireno como única fuente

de carbono y energía (Sabaté, 1998). Los experimentos se realizaron por duplicado durante 10 de incubación, cultivando en paralelo el consorcio microbiano AM sin adición de ramnolípidos (AM) y el consorcio AM con 0.5% (m/v) de ramnolípidos (AMRLs). En todos los matraces fue inoculado 1 mL de un precultivo del consorcio AM en el medio mineral BMTM (Material y Métodos 2.8.2.1) tomado en la mitad de la fase de crecimiento. La concentración del inóculo fue de 1.9×10^8 NMP/mL.

3.10.2.1.- Análisis de la fracción alifática

Transcurridos los 10 días de incubación, en las muestras AM se obtuvo un 20% de biodegradación (Figura 3.32 a); mientras que en las muestras AMRLs el porcentaje de biodegradación alcanzado fue del 34%. (Figura 3.32 b). Los porcentajes de biodegradación corresponden a la fracción de los n-alcános ya que los isoprenoides no fueron degradados por AM ni por AMRLs (Figura 3.32 a y b). Los trealosalípidos producidos por *Rhodococcus* sp 094 también emulsionan y estimulan la oxidación de n-alcános en crudo de petróleo. (Bruheim et al., 1997)

3.10.2.2.- Análisis de la fracción aromática

A los 10 días de incubación, el porcentaje de biodegradación de la fracción aromática en AM fue de 12.52% y en AMRLs de 62.28%. La actividad biodegradativa de AMRLs a los 10 de incubación (62.28%) fue similar a la actividad biodegradativa observada en AM a los 20 días de incubación (63.75%) (Viñas, 1999). De los resultados alcanzados se evidenció que los ramnolípidos aumentaron la capacidad degradativa del consorcio AM, disminuyendo a la vez el periodo de tratamiento a la mitad, es decir de 20 a 10 días.

Teniendo en cuenta la actividad degradativa de la fracción aromática en AM y AMRLs se realizó el análisis individual de los diferentes hidrocarburos aromáticos presentes en el crudo Casablanca. Para ello el perfil cromatográfico de los aromáticos se subdividió en las familias F₁ y F₂. La F₁, que es la fracción más ligera, contenía las moléculas naftaleno, fluoreno y los derivados metilados de cada una (Tabla III.15) y la F₂ contenía las moléculas fenantreno/antraceno y sus derivados metilados, así como los derivados metilados del dibenzotiofeno y el pireno.

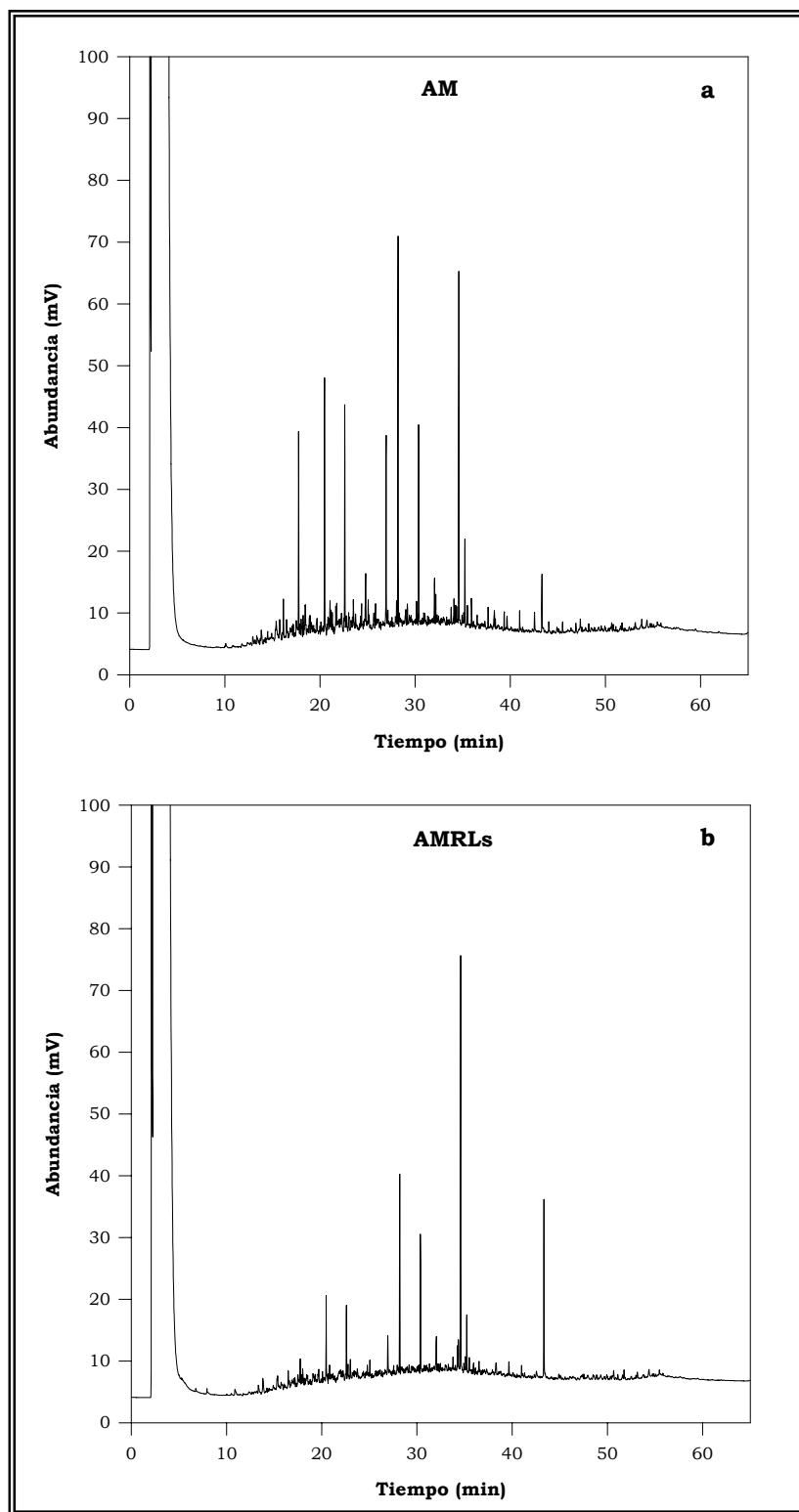


Figura 3.32.- Influencia de la adición de los ramnolípidos M_{AT10} en la biodegradación de la fracción alifática del crudo Casablanca por el consorcio microbiano AM a los 10 días de incubación. a.- sin adición de RLs M_{AT10} ; b.- con RLs M_{AT10} (0.5% m/v)

Tabla III.15.- Biodegradación de los hidrocarburos poliaromáticos del crudo Casablanca por el consorcio microbiano AM a los 10 días de incubación en un medio mineral con ramnolípidos M_{AT10} (0.5% m/v)

Poliaromáticos	Ión (m/z)	% Biodegradación		
		AM	AMRLs	AM*
Naftaleno (N)	128	11.48	94.75	100
Metilnaftaleno (Me-N)	142	13.77	99.24	100
Dimetilnaftaleno (Di-N)	156	11.06	99.05	100
Trimetilnaftaleno (Tri-N)	170	0	95.49	87
Tetrametilnaftaleno (Tet-N)	184	0	17.01	11
Fluoreno (Flu)	166	30.18	100	100
Metilfluoreno (Me-Flu)	180	0	89.89	87
Dimetilfluoreno (Di-Flu)	194	0	14.63	18
Trimetilfluoreno (Tri-Flu)	208	0	44.33	9
Fenantreno/Antraceno (Fn/An)	178	36.09	72.78	100
Metil-Fn/An	192	0	88.53	96
Dimetil-Fn/An	206	0	56.38	48
Trimetil-Fn/An	220	0.30	38.95	20
Metil-DBT	198	0.49	81.04	75
Dimetil-DBT	212	0.88	47.78	40
Trimetil-DBT	226	8.46	34.59	29
Metilpireno (Me-Pi)	216	0	35.35	-
Total	-	12.52	62.28	63.75

DBT: dibenzotiofeno; (*) 20 días de incubación (Viñas 1999)

Los porcentajes más altos de biodegradación encontrados en AM correspondieron al fluoreno (38.18%) y fenantreno (36.09%) (Tabla III.15). entre 11 y 13% de biodegradación se observó para el naftaleno y sus mono y dimetilderivados y tan solo un 8.46% para el trimetildibenzotiofeno. La biodegradación del metil y dimetildibenzotiofeno y el trimetilfenantreno/antraceno no superaba el 1% (Tabla III.15)

Para AMRLs, resultó muy significativo que todos los aromáticos analizados fueron degradados (Tabla III.15) en porcentajes superiores a los obtenidos en AM a los 10 días de incubación. El fluoreno (Figura 1.3) fue degradado en su totalidad (100%) y aunque en sus metilderivados se obtuvieron porcentajes variables (15-90%) de biodegradación (Tabla III.15), fueron superiores a los alcanzados en AM. Se han descrito cultivos puros de *Arthrobacter* sp. que pueden metabolizar el fluoreno. La degradación ocurre presumiblemente por la vía de una dioxigenasa. (Grifoll *et al.*, 1992)

Para el naftaleno (Figura 1.3) y sus metil, dimetil y trimetil derivados se alcanzaron porcentajes de biodegradación superiores al 90% (Tabla III.15). El tetrametilnaftaleno fue el menos degradado de los metil derivados (17.01%). Este metil derivado no fue degradado por AM a los 10 días de incubación; sin embargo a los 20 días se alcanzó un 11% de biodegradación (Viñas, 1999). Algunas bacterias, fundamentalmente *Pseudomonas* sp, pueden metabolizar los anillos de los metilnaftalenos a través de un cis-dihidrodiol en diferentes sitios del anillo. (Solanas *et al.*, 1984)

En el caso de los isómeros fenantreno y antraceno (Figura 1.3) y sus metilderivados se obtuvieron porcentajes de biodegradación entre 38.95 y 88.53%; mientras que los metilderivados del dibenzotiofeno (Figura 1.3) fueron degradados entre 34.59 y 81.04%. El metilpireno fue degradado en un 35.35% (Tabla III.15). El consorcio AM no degradó el metilpireno a los 10 ni 20 días de incubación (Tabla III.15). La biodegradación de los derivados metilados de hidrocarburos poliarómicos con tres o más anillos fusionados no ha sido muy estudiada y su eliminación depende tanto del número de sustituyentes como de la posición de estos ya que suele ser esteroespecífica. (Sabaté, 1998)

En sentido general, la biodegradación de los diferentes aromáticos policíclicos en el crudo Casablanca fue menor tanto mayor complejidad estructural presentaba la molécula. Al aumentar la complejidad molecular, menos solubilidad en la fase acuosa y menor biodisponibilidad como nutriente a los microorganismos; quienes frecuentemente no disponen del sistema enzimático de degradación de estos compuestos (Guiysse *et al.*, 2000). Los porcentajes de biodegradación observados en las moléculas no sustituidas, en orden decreciente, fueron: fluoreno> naftaleno> fenantreno/antraceno. Dentro de una misma familia se observó que al aumentar el número de sustituyentes en el anillo, el porcentaje de biodegradación disminuyó. La disminución encontrada probablemente se debió al efecto estérico de los sustituyentes que “bloquean” el sitio de reacción dónde ha de atacar el enzima en la molécula. (Maier *et al.*, 2000)

Los aromáticos y poliaromáticos son los hidrocarburos más difíciles de degradar por las poblaciones microbianas debido a la dificultad de transporte hacia el interior de las células determinada por la pobre solubilidad en los sistemas acuosos (Cerniglia, 1992). El incremento de la capacidad biodegradativa del consorcio AM, especializado en la degradación de hidrocarburos aromáticos, en presencia de los ramnolípidos MAT10 demostró que estos glicolípidos aceleran el proceso de biodegradación facilitando la penetración de los hidrocarburos aromáticos hacia el interior de las células

microbianas ya sea dentro de la fase micelar o pseudosolubilizados. (Sekelsky y Sherve, 1999)

La adición de *Pseudomonas aeruginosa* GL1, cepa productora de ramnolípidos, a una comunidad bacteriana de suelos contaminados con poliaromáticos aumentó la biodegradación del fenantreno y el naftaleno por la degradación de los ácidos o-ftálico y salicílico, metabolitos respectivos de degradación de estos compuestos (Arino *et al.*, 1998). Además, la adición de ramnolípidos a un cultivo de *Burkholderia* sp incrementó la degradación del naftaleno por reducción de la toxicidad del cadmio (Cd^{2+}) durante el proceso. La reducción del cadmio fue explicada por el cambio de hidrofobicidad en la superficie celular que provocan los ramnolípidos, impidiendo así el paso del ión a la célula (Sandrin *et al.*, 2000). Estudios más recientes han demostrado que el sistema Nah, responsable de la biodegradación del naftaleno, interviene en la degradación del fluoreno, fenantreno/antraceno, dibenzotiofeno y sus metilderivados. (Ahn *et al.*, 1999)

Cuando se disminuyó la concentración de ramnolípidos inicial (0.5%) hasta el nivel de la cmc (150 mg/L) no se encontraron diferencias cuantitativas en los porcentajes de biodegradación en los TPH de las fracciones alifática y aromática del crudo Casablanca, sin embargo el aspecto físico de los cultivos fue distinto en cada caso. (Figura 3.33). Al nivel de la cmc (150 mg/L) el crudo se encontraba disgregado y adherido a las paredes de los matraces (Figura 3.33 a). En este caso es el cuerpo celular el que actúa como emulsionante. En el medio con 0.5% de ramnolípidos el crudo estaba completamente emulsificado (Figura 3.33 b).

Los mecanismos mediante los cuales los ramnolípidos pueden incrementar la biodegradación de hidrocarburos y compuestos orgánicos recalcitrantes se basan en: primero, solubilización aparente por medio de emulsiones estables y por consiguiente mayor biodisponibilidad del sustrato a la célula (Zhang y Miller, 1992; Mata-Sandoval *et al.*, 2000) y segundo, interacción de los ramnolípidos con la célula, haciendo la superficie celular más hidrofóbica, la cual se asocia fácilmente con el sustrato hidrofóbico (Zhang y Miller, 1992; Sekelsky y Shreve, 1999). En el primer caso las moléculas de la fase no acuosa quedan atrapadas en el centro de la micela (Figura 3.34) y este mecanismo ocurre a niveles muy altos de ramnolípidos (niveles más altos que la cmc). El segundo caso ocurre a muy bajas concentraciones de ramnolípidos (cercasas a la cmc). Morán observó que los porcentajes de biodegradación de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos presentes en un crudo de petróleo argentino fueron de 35 y 41% respectivamente al utilizar una concentración de surfactina

superior a la cmc de este tensoactivo microbiano (25 ug/mL); sin embargo al utilizar una concentración de surfactina inferior a la cmc los porcentajes de biodegradación fueron 6.4% para los n-alcanos y nulo en el caso de los hidrocarburos aromáticos (Morán *et al.*, 2000). Estudios recientes sugieren que para procesos de biorremediación *in situ* de hidrocarburos, petróleo y compuestos afines; la utilización de niveles muy bajos de ramnolípidos (muy próximos a la cmc) debido a que por su biodegradabilidad pueden servir como fuente de carbono preferencial en una población mixta y en este caso niveles altos (muy por encima de la cmc) de ramnolípidos pueden suprimir la degradación del hidrocarburo hasta el consumo total de los ramnolípidos. Por otra parte, respecto al costo del proceso, en términos económicos es mejor aplicar cantidades bajas de tensoactivos (Maier *et al.*, 2000).

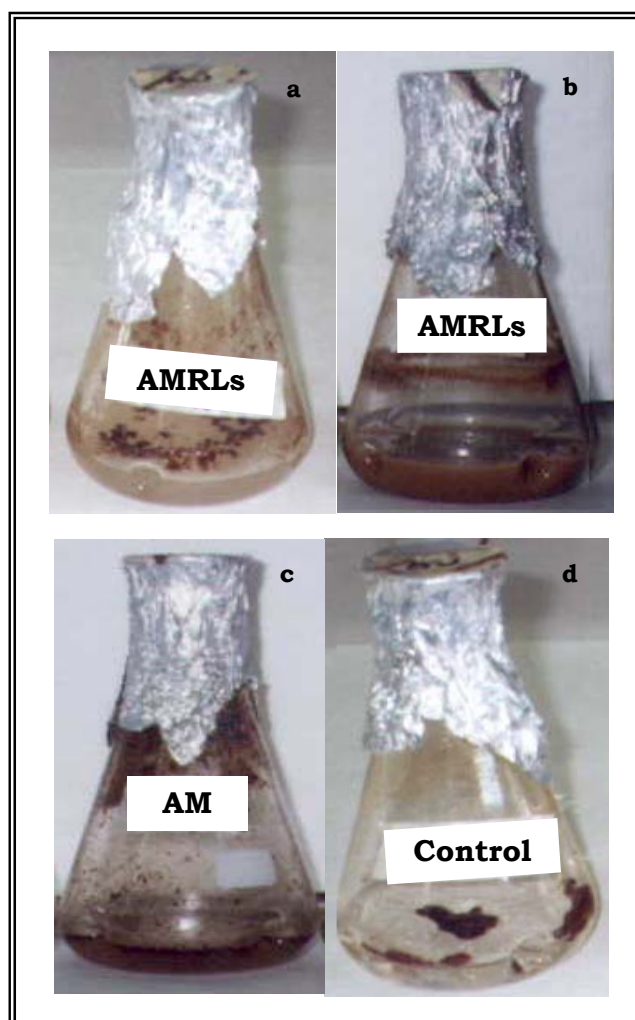


Figura 3.33.- Cultivos del consorcio AM en medio mineral con crudo de petróleo Casablanca como fuente de carbono

a.- AMRLs; C (RLs)= 150 mg/L

b.- AMRLs; C (RLs)= 0.5% m/v

c.- AM sin RLs

d.- Control

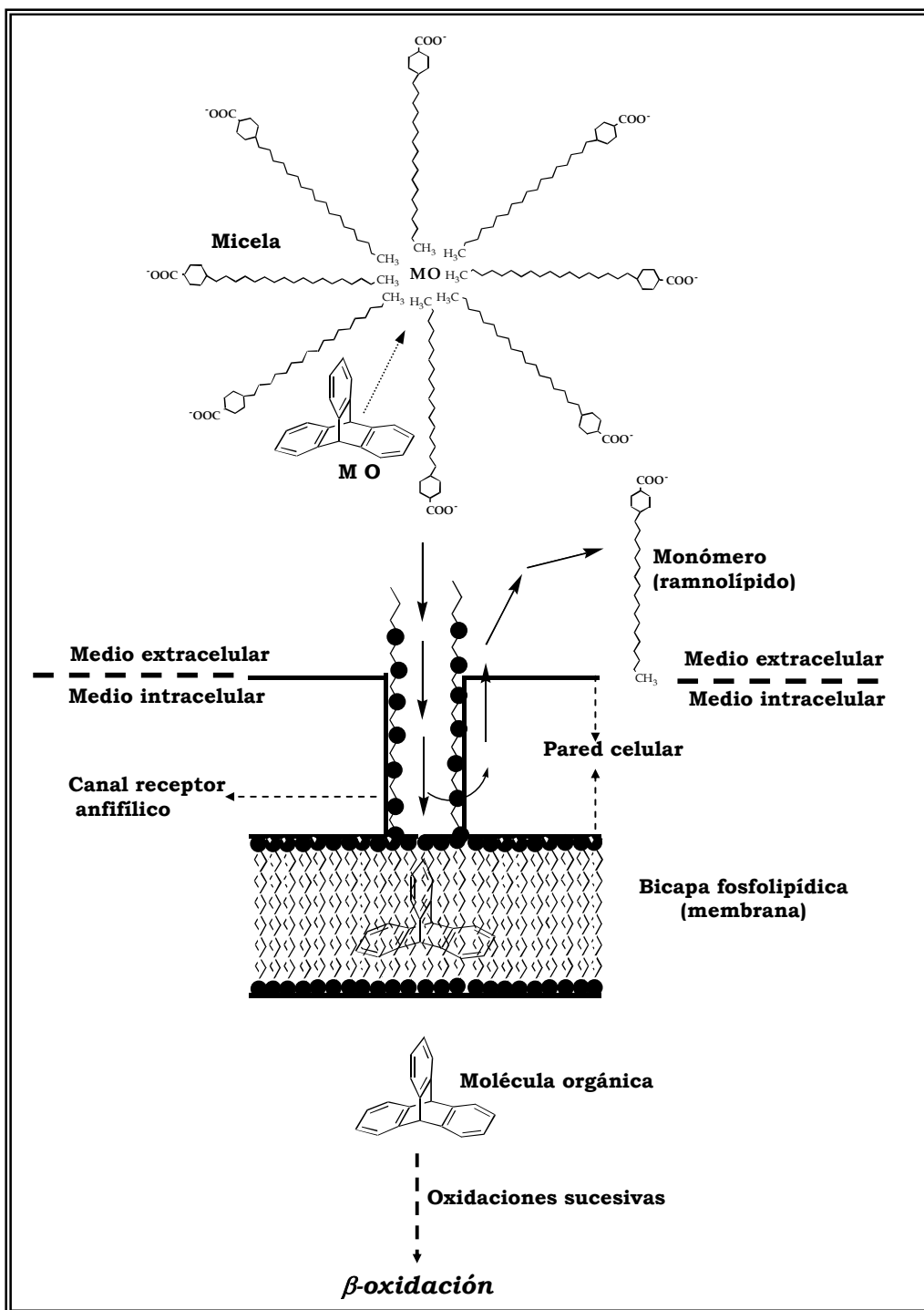


Figura 3.34.- Mecanismo de penetración de las moléculas orgánicas (MO) al medio intracelular a través de las micelas.

1. Se optimizó la producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* AT10 aplicando la Metodología de Superficies de Respuesta (MSR) en el diseño del medio de cultivo. La producción y el rendimiento celular se incrementaron 4 veces respecto al medio no diseñado
2. Los ramnolípidos acumulados por *P. aeruginosa* AT10 constituye una mezcla de 8 homólogos (M_{AT10}): tres dirramnolípidos y 5 monorramnolípidos. Los ramnolípidos M_{AT10} estabilizan emulsiones w/o y poseen además marcada actividad antimicrobiana.
3. La adición de los ramnolípidos M_{AT10} incrementó la capacidad degradativa del consorcio microbiano AM en un 34 % para la fracción alifática y un 62,28% para la fracción aromática del crudo de petróleo Casablanca a los 10 días de incubación.

- Abalos, A., Deroncelé, V., Espuny, J., Bermúdez, R., y Manresa, A.**, 2000. Surface active rhamnolipids accumulation by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from a vegetal oil refinery wastes. *Revista Cubana de Química*. **XII**, 24-29.
- Abalos, A., Pinazo, A., Infante, R., Casals, M., García, F. y Manresa, A.**, 2001. Physico chemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*. **17**, 1367-1371.
- Adamson, A. y Gast, A.** 1997. Emulsions. Foams and aerosols. En *Physical Chemistry of surfaces*. Wiley and Sons ed, (EUA). pp. 500-528.
- Ahn, Y., Sanseverino, J., y Sayler, G.**, 1999. Analyses of polycyclic hydrocarbon-degradating bacteria isolated from contaminated soils. *Biodegradation*. **10**, 149-157.
- Alexander, M.** 1994. Bioremediation technologies. En *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, (California, EUA)
- Anderson, A. y Dawes, E.** 1990. Ocurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* **54**, 450-472.
- Arino, S., Marchal, R., y Vandecasteele, J.P.**, 1996. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 162-168.
- Arino, S., Marchal, R., y Vandecasteele, J.P.**, 1998. Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *J. Appl. Microbiol.* **84**, 769-776.
- Atlas, R.** 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **52**, 149-156.
- Attwood, D, y Florence, A.** 1983. Emulsions. En *Surfactants systems chemistry, pharmacy and biology*. Chapman y Hall ed. (New York) pp. 469-566.
- Babu, P. S., Vaidya, A. N., Bal, A. S., Kapur, R., Juwarkar, A., y Khanna, P.**, 1996. Kinetics of Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from Industrial Wastes. *Biotechnol. Lett.* **18**, 263-268.

Banat, I., Makkar, R., y Cameotra, S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 495-508.

Banat, I. M., 1995. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal-state of the art (review). *Acta Biotechnol.* **15**, 251-267.

Banerjee, R., y Bhattachyyra, B. C., 1992. Evolutionary operation (EVOP) to optimize three-dimensional biological experiments. *Biotechnol. & Bioeng.* **41**, 67-71.

Beal, R. y Betts, W. 2000. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 158-168.

Began, G., Mahonar, B., Udaya, K. y Appu, A. 2000. Response Surfaces for solubility of crude soylécithin lipid in super critical carbon dioxide. *Eur. Food Res. Technol.* **210**, 209-212.

Benincasa, M. 2001. Obtenção de biotensoactivos a partir de resíduos da indústria de oleos vegetais Tesis Doctoral. Universidad Estadual Paulista. Instituto de Química. Brasil.

Bhaduri, S., Buchanan, R. L., y Phillips, J. G. 1995. Expanded response surface model for predicting the effects of temperatures, pH, sodium chloride contents on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 163-170.

Boccú, E., Ebert, C., Gardossi, L., Gianferrara, T., y Linda, P., 1990. Chemometric optimization of an asymmetric reduction catalyzed by Baker's Yeast. *Biotechnol. & Bioeng.* **35**, 928-934.

Bódalo, A., Bastida, J., Gómez, J., Gómez, E., Asanza, M., y Rojo, I., 1997. Growth kinetics of L-aminocyclase-producing *Pseudomonas* sp. BA2. *Chem. Eng. Sci.* **52**, 171-176.

Bouchez, M., Blanchet, D., Bardin, V., Haeseler, F. y Vandecasteele, J.P. 1999. Efficiency of defined strains and soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. *Biodegradation.* **10**, 429-435.

- Box, G.E.** 1954. "The exploration and exploitation of response surfaces: some general considerations and examples". *Biometrics*, **10**, 16-60.
- Box, G., Hunter, W., y Hunter, J.** 1989. Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. (España: Reverté, S.A.).
- Box, G., y Tyssedal, J.,** 1996. Projective properties of certain orthogonal arrays. *Biometrika*. **83**, 950-955.
- Bruheim, P., Bredholt, H., Eimhjellen, K.** 1997. Bacterial degradation of emulsified crude oil and the effect of various surfactants. *Can. J. Microbiol.* **43**, 17-22.
- Bunster, L. Fokkema, N. y Schippers, B.** 1989. Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1340-1345.
- Burger, M., Glaser, L., y Burton, R.M.** 1963. The Enzymatic Synthesis of a Rhamnose-Containing Glycolipid by Extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **238**, 2595-2602.
- Calam, C.** 1986. Physiology of the overproduction of secondary metabolites. In *Overproduction of microbial metabolites*. Vaněk y Hošťálek, ed. (EUA: Butterworths), pp. 27-50.
- Campos-García, J., Caro, A.D., Nájera, R., Maier, R., Al-Tahhannan y Soberón-Chávez, G.** 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG gene encodes a NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J. of Bacteriol.* **180**, 4442-4451.
- Casas, J. A., García de Lara, S., y García-Ochoa, F.** 1997. Optimization of a synthetic medium for *Candida bombicola* growth using factorial design of experiments. *Enz. Microbiol. Technol.* **21**, 221-229.
- Castro, P., Hayter, P., Ison, A., y Bull, A.** 1992. Application of statistical design to the optimization of culture medium for recombinant interferon-gamma production by Chinese hamster ovary cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 84-90.

- Cerniglia, C.** 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*. **3**, 351-368.
- Chandrasekaran, E.V., y Bemiller, J.N.** 1980. Constituent analysis of glucosamonooglucans. En *Methods in Carbohydrate Chemistry*. L.Wrhiste y M.L. Wolfson ed, (Academic Press: N.Y.), pp. 89-97.
- Chayabruta, C., y Ju, L.** 2000. Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 493-498.
- Chayabruta, C., Wu, J., y Ju, L.** 2001. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: Effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnol. & Bioeng.* **72**, 25-33.
- Choe, Y., B., Krishna, N., y Pritchard, D.,** 1992. Proton NMR study on rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Magnetic Resonance in Chem.* **30**, 1025-1029.
- Choi, J., y Lee, S.Y.** 1999. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51** 13-21
- Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, C., Novak, L., Lindley, N., y Loubiere, P.** 1995. Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 108-116.
- Cochram, W. y Cox, G.** 1974. Diseños experimentales. Editorial Trillas (México)
- Cooper, D.G., y Paddock, D.A.** 1984. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 173-176.
- Cromwick, A., Foglia, T. y Lenz, R.** 1996. The microbial production of poly(hydroxyalcanoates) from tallow. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 464-469.
- Daniel, H.J., Otto, R.T., Reuss, M., y Syldatk, C.,** 1998. Sophorolipid production with high yields on whey concentrate and rapeseed oil without consumption of lactose. *Biotechnol. Lett.* **20**, 805-807.

Daniel, H.J., Otto, R.T., Binder, M., Reuss, M., y Syltatk, C., 1999. Production of sphorolipids from whey: development of a two stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized concentrates as substrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 40-45.

Davies, K. 1993. Desing of experiments for predictive microbial modeling. *J. Ind. Microbiol.* **12**, 295-300.

Desai, J., y Banat, I. 1997. Microbial Production of Surfactants and their commercial Potencial. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 47-64.

Déziel, E., Lepine, F., Milot, S., y Villemur, R. 1999 a. Mass spectrometry monitoring of rhamnolipids from a growing culture of *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP. *Biochim. et Biophys. Acta.* **1485**, 145-152.

Déziel, E., Lépine, F., Dennie, D., Boismenu, D., Mamer, O., y Villemur, R. 1999 b. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixture of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol or naphthalene. *Biochim. et Biophys. Acta.* **1440**, 244-252.

Dey, G., Mitra, A., Banerjee, R., y Maiti, B., 2001. Enhanced production of amylase by optimization of nutritional constituents using response surface methodology. *J. Biochem. Eng.* **7**, 227-231.

Espinel-Ingroff, A., y Pfaller, M. A. 1995. Antifungal agents and susceptibility testing. En *Manual of Clinical Microbiology*, P. R. Murray, ed. (Washington, D.C: Murray,P.R), pp. 1405-1415.

Espuny, M. J., Ejido, S., Mercadé, M. E., y Manresa, A., 1995. Characterization of trehalose tetraester produced by a waste lube oil degrader *Rhodococcus sp.* 51T7. *Toxicol. Environ. Chem.* **48**, 83-89.

Fernández, D. 2000. Producción y caracterización de los polihidroxicanoatos producidos por *Pseudomonas sp.* 42A2. Máster en Biología Experimental. Departamento de Microbiología y Parasitología Sanitarias. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.

- Fiechter, A.** 1986. Bioprocess Development. En *Overproduction of microbial metabolites*. Vaněk y Hošťálek, ed. (EUA: Butterworths), pp. 231-259.
- Folch, J., Lees, M., y Sloane, S. G. H.**, 1957. A Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.
- Goupy, J.** 1999. Plans composites. En *Plans d'experiences pour surfaces de reponsé*, DUNOD, ed. (Paris), pp. 253-263.
- Grifoll, M., Casellas, M., Bayona, J.M. y Solanas, A.M.** 1992. Isolation and characterization of a Fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2910-2917.
- Guerra-Santos, L., Käppeli, O., y Fiechter, A.**, 1984. *Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture with Glucose as Carbon Source. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 301-305.
- Guiesysse, B., Bernhoft, I., Andersson, E., Henrysson, T., Olsson, S. y Mattiasson, B.** 2000. Degradation of acenaphthene, phenanthrene and pyrene in a packed-bed film reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 826-831.
- Haba, E., Espuny, M. J., Busquets, M., y Manresa, A.**, 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 379-387.
- Haferburg, D., Hommel, R., Kleber, H., Kluge, S., Schuster y G. Zschieger, H.** 1987. Antiphytovirale aktivität von rhamnolipids aus *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Biotechnol.* **7**, 353-356.
- Hajmeer, M., Basheer, I., y Fung D.** 1998. Citado en: Parekh, S., Vinci, V., Strobel, R. 2000. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 287-301.
- Harder, W., y Dijkhuizen, L.**, 1983. Physiological responses to nutrient limitation. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**, 1-23.
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y. y Kazuaki, S.** 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 63-70.

Hesse, M., Meier, H. 1995. Espectroscopía Infrarroja y Raman (capítulo 2) y Espectrometría de masas (capítulo 4). En *Métodos espectroscópicos en Química Orgánica*, ed. Síntesis. (España). pp 29-70 y 219-.

Hommel, K., y Ratkedge, C. 1993. Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules. En *Biosurfactants production and applications*, N. Kosaric, ed. (New York: Marcel Dekker), pp. 3-65.

Hounsa, C., Aubry, J.M., Dubourgier, H.C., Hornz, J.P. 1996. Application of factorial and Doehlert designs for optimization of pectate lyase production by a recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 764-770.

Ishigami, Y., Gama, Y., Ishii, F., y Choi, Y., 1993. Colloid chemical effect of polar head moieties of a rhamnolipid-type biosurfactant. *Langmuir.* **9**, 1634-1636.

Ishigami, Y. y Suzuki, S. 1997. Citado en Maier, R., y Soberón-Chávez, G., 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 625-633.

Ishigami, Y. y Suzuki, S. 1988. Citado en Maier, R., y Soberón-Chávez, G., 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 625-633.

Itoh, S., Honda, H., Tomita, F., y Suzuki, T., 1971. Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Grown on n-Paraffin. *The J. Antibiotics.* **24**, 855-859.

Jain, D.K., Lee, H y Trevors J.T. 1992. Citado en Morán, A., Olivera, N., Commendatore, M., Esteves, J., y Siñeriz, F., 2000. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation.* **11**, 65-71.

Jarvis, F. G., y Johnson, M. J., 1949. A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *JAACS.* **71**, 4124-4126.

Jørgensen, K., Puustinen, J. y Sourtti, A. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environ. Pol.* **107**, 245-254.

- Kachholtz, T., Schlingmann, M.** 1987. Possible food and agricultural application microbial surfactants: An assessment. En *Biosurfactants and Biotechnology*. N. Kosaric, W. L. Cairns y N. C. C. Gray, eds. (N.Y.: Marcel Dekker), pp. 183-210
- Kates, M.** 1972. Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. En *Laboratory techniques in Biochemistry and Biochemical Biology*, T. S. W. E. Work, ed. (Amsterdam: North-Holland Publishing Co.), pp. 342-349.
- Kennedy, M. y Reader, S.** 1992. Neural networks as a tool in the designing industrial fermentation media. *Proceedings of the 10th Australian Biotechnology Conference*. Melbourne. Australia. pp. 215-218.
- Kennedy, M., y Krouse, D.** 1999. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 456-475.
- Kitamoto, D., Yanagishita, H., Shinbo, T., Nakane, T., Kamisawa, C., y Nakahara, T.**, 1993. Surface active properties antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *J. Biotechnol.* **29**, 91-96.
- Köhler, T., Kocjancic, L., Barja, F., van Delden, C. y Pechére, J.C.** 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. of Bacteriol.* **182**, 5990-5996.
- Kosaric, N.** 1996. Biosurfactants. En *Biotechnology*, Rehm HJ, Reed G., Püler, A. eds. (New York: Basel), pp. 659-717.
- Lang, S., y Wagner, F.** 1987. Structural and properties of biosurfactants. En *Biosurfactants and Biotechnology*, Kosaric, N., Cairns, W.L., y Gray, N.C.C. eds. (N.Y.: Marcel Dekker), pp. 21-45.
- Lang, S., y Wagner, F.** 1993. Biological activities of biosurfactants. En *Biosurfactant properties and applications*, Kosaric, N. ed. (New York: Marcel Dekker), pp. 251-269.
- Lang, S., y Wullbrandt, D.**, 1999. Rhamnose lipids- biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 22-32.
- Lay, J.**, 2000. Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen. *Biotechnol. & Bioeng.* **68**, 269-278.

- Linhardt, R.J.**, 1989. Microbially produced rhamnolipid as a source of Rhamnose. *Biotechnol. & Bioeng.* **33**, 365-368.
- Maddox, I., y Richert, S.**, 1977. Use of response surface methodology for the rapid optimization of microbiological media. *J. Appl. Bacteriol.* **43**, 197-204.
- Maier, R., Pepper, I., y Gerba, C.** 2000. Microorganisms and organic pollutants. En *Environmental Microbiology*. Academic Press, ed. (Canada), pp.363-400.
- Maier, R., y Soberón-Chávez, G.**, 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 625-633.
- Makkar, R., Cameotra, S.**, 1997. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. *JAOCs.* **74**, 887-889.
- Manresa, A., Bastida, J., Mercadé, M. E., Robert, M., de Andrés, C., Espuny, M. J., y Guinea, J.**, 1991. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *J. Ind. Microbiol.* **8**, 133-136.
- Mata-Sandoval, J., Karns, J., y Torrents, A.**, 1999. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipids mixture produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *J. of Chromat.* **864**, 211-220.
- Mata-Sandoval, J., Karns, J., y Torrents, A.**, 2000. Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 4923-4930.
- Mata-Sandoval, J., Karns, J., y Torrents, A.**, 2001. Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. *Microbiol. Research.* **155**, 249-256.
- Matsufuji, M., Nakata, K., y Yoshimoto, A.**, 1997. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnol. Lett.* **19**, 1213-1215.
- Mattei, G., Rambeloarisoa, E., Giusti, G., Rontani, J.F. y Bertrand, J.** 1986. Fermentation procedure of a crude oil in continuous culture on seawater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 302-304.

Mercadé, M.E. 1990. Producción de biotensoactivos a partir de las aguas residuales de las almazaras. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona.

Mercadé, M., Espuny, M., y Manresa, A. 1997. The use of oil substrate for biosurfactant production. *Recent Res. Devel. in Oil Chem.* **1**, 177-185.

Mercadé, M. E., Manresa, A., Robert, M., Espuny, M. J., de Andrés, C., y Guinea, J., 1993. Olive Oil Mill Effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. *Biores. Technol.* **43**, 1-6.

Minguez, C.B., Beveridge, T.J., y Ingram, J.M. 1986. Lipopolysaccharide changes and cytoplasmatic polyphosphate granule accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* durin growth on hexadecane. *Can. J. Microbiol.* **32**, 248-253.

Morán, A., Olivera, N., Commendatore, M., Esteves, J., y Siñeriz, F., 2000. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation.* **11**, 65-71.

Mulligan, C. N., y Gibbs, B., 1989. Correlation of Nitrogen Metabolism with Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3016-3019.

Mulligan, C.N., y Gibbs, B.F. 1993. The economics of Biosurfactants. En *Biosurfactants. Production. Properties. Applications*, N. Kosaric, ed. (N.Y: Marcel Dekker), pp. 329-373.

Nakajima, K., Sato, Y. Takayara, Y. y Ida, T. 1985. Microbial oxidation of isoprenoid alkanes phytane, norpristane and farnesane. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 1993-2000.

Nesmeyanova, M., y Bogdanov, M. 1987. Role of phospholipids in the energetics of secretion of proteins. En *Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganisms*, A. Torriani-Gorini, ed. (Washington: American Society for Microbiology), pp. 83-89.

Nielsen, J., y Benthin, S., 1990. Application of flow-injection analysis in the on-line monitoring of sugars, lactic acid, protein and biomass during lactic fermentations. *Anal. Chim. Acta.* **237**, 165-175.

- Noordman, W, Ji, W., Brusseau, M. y Janssen, D.** 1998. Effects of rhamnolipids biosurfactants on removal of phenantrene from soil. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1806-1812.
- Noordman, W., Bruining, J., Wietzes, P., y Janssen, D.**, 2000. Facilitated transport of a PAH mixture by a rhamnolipid biosurfactat in porous silica matrices. *J. Contaminant Hydrology.* **44**, 119-140.
- Ochsner, U., Hembach, T., y Fiechter, A.**, 1995. Production of rhamnolipid biosurfactant. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **53**, 89-118.
- Oh, S., Rheem, S., Sim, J., Kim, S., y Baek, Y.**, 1995. Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in Tryptone-Yeast Extract-Glucose medium by using response surface methodology. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3809-3814.
- Olivera, N., Commendatore, M., Morán, A., y Esteves, J.**, 2000. Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 70-73.
- Olvera, C., Goldberg, J., Sánchez, R., y Soberón-Chávez, G.**, 1999. The *Pseudomonas aeruginosa algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**, 85-90.
- Palasota, J., y Deming, S.**, 1992. Central composite desing applied to chemical systems. *J. Chem. Educ.* **69**, 560-563.
- Parekh, S., Vinci, V., Strobel, R.** 2000. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 287-301.
- Parra, J. L., Guinea, J., Manresa, A., Mercadé, M. E., Robert, M., Comelles, F., y Bosch, P.**, 1989. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *JAOCS.* **66**, 141-145.
- Patel, R. M., y Desai, A. J.**, 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**, 91-94.

- Pirt, S. J.** 1985. General nutrition. En *Principles of microbe and cell cultivation* (London: Backwell Scientific Publications), pp. 117-137.
- Prapulla, S., Jacob, Z., Chand, N., Rajalakshimi, D., y Karanth, N.**, 1992. Maximization of lipid production by *Rhodotorula gacilis* CFR-1 using Response Surface Methodology. *Biotech. & Bioeng.* **40**, 965-970.
- Prescott, L., Harley, J., y Klein, D.** 1999. Metabolismo: producción de energía. En *Microbiología*. Mc. Graw-Hill. Interamericana. ed, (Mc. Graw-Hill. Interamericana de España:Madrid, España), pp. 169-196.
- Razafindralambo, H., Paquot, M., Baniel, A., Popineau, Y., Hbid, C., Jacques, P., y Thonart, P.**, 1996. Foaming Properties of Surfactin, a Lipopeptide Biosurfactants from *Bacillus subtilis*. *JAACS.* **73**, 149-151.
- Reiling, H.E., Thanei-wyss, U., Guerra-Santos, L.H., Hirt, R., Käppeli, O., y Fiechter, A.**, 1986. Pilot Plant Production of Rhamnolipid Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 985-989.
- Rehm, B., Krüger, N. y Steinbüchel, A.** 1998. A new metabolic link between fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 24044-24051.
- Rincón, J., Fuertes, J., Moya, A., Monteagudo, J. y Rodríguez, L.** 1993. Optimization of the fermentation of whey by *Lactobacillus casei*. *Acta Biotechnol.* **13**, 323-331.
- Robert, M., Mercadé, M. E., Bosch, P., Parra, J. L., Espuny, M. J., Manresa, A., y Guinea, J.**, 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol Letters.* **11**, 871-874.
- Robert, M., Mercadé, M., de Andres, C., Espuny, M. J., Manresa, M. A., y Guinea, J.**, 1991. Optimizacion de la produccion de biotensoactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Grasas y Aceites.* **42**, 1-7.
- Roberto, I. C., Sato, S., Mancilha, I. M., y Taqueda, M. E. S.**, 1995. Influence of media composition on xilitol fermentatiopn by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. *Biotechnol. Lett.* **17**, 1223-1228.

- Rosen, M.** 1989. Surfactants and Interfacial Phenomena. Wiley y Sons, ed. (Wiley Interscience: New York)
- Rosenberg, E., y Ron, E.,** 1999. High- and low- molecular- mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 154-162.
- Rosenberg, E., y Ron, E. Z.,** 1997. Bioemulsans: microbial polymeric emulsifiers. *Curr. Opinion in Biotechnol.* **8**, 313-316.
- Sabaté, J.** 1998. Biodegradación y fotooxidación de hidrocarburos aromáticos policíclicos. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- Saguy, I.,** 1982. Utilization of the "Complex method" to optimize a fermentation process. *Biotechnol. & Bioeng.* **XXIV**, 1519-1525.
- Sandrin, T., Chech, A., y Maier, R.,** 2000. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4585-4588.
- Sarubbo, L. A., Porto, A., y Campos-Takaki, G.,** 1999. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lipolytica*. *Can. J. Microbiol.* **45**, 423-426.
- Schenk, T., Schuphan, I., y Schmidt, B.,** 1994. High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. of Chromat. A.* **693**, 7-13.
- Schwuger, M., y Bartnik, F.** 1980. Interaction of anionic surfactants with proteins, enzymes and membranes. En Anionic Surfactants--biochemistry, toxicology, dermatology, M. Dekker, ed. (N.Y.: Marcel Dekker), pp. 1-47
- Sekelsky, A., y Shreve, G.,** 1999. Kinetic model of biosurfactant-enhanced hexadecane biodegradation *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechnol. & Bioeng.* **63**, 403-409.
- Sen, R.,** 1997. Response Surface Optimization of the Critical Media Components for the Production of Surfactin. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **68**, 263-270.

- Setti, L., Mazzieri, S. y Pifferi, P.** 1999. Enhanced degradation of heavy oil in an aqueous system by a *Pseudomonas* sp. in the presence of natural and synthetic sorbents. *Biores. Technol.* **67**, 191-199.
- Shennan, J., Levi, J.** 1987. In situ microbial enhanced oil recovery. En *Biosurfactants and Biotechnology*, Kosaric, N., Cairns, W.L., y Gray, N.C.C. eds. (N.Y.: Marcel Dekker), pp. 163-181.
- Silveira, R., Kakizono, T., Takemoto, S., Nishio, N. y Nagai, S.** 1991. Medium optimization by an orthogonal array design for the growth of *Metanosarcina barkeri*. *J. Ferm. Bioeng.* **72**, 20-25.
- Sim, L., Ward, O., y Li, Z.-Y.**, 1997. Production and characterisation of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 232-238.
- Singer, A., Gilbert, E., Luepromchai, E. y Crowley, D.** 2000. Bioremediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil using carvone and surfactant-grown bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**, 838-843.
- Skoog, D. y Leary, J.** 1994. Cromatografía de gases. En *Análisis Instrumental*. Ed. Mc Graw Hill. (Madrid, España), pp. 704-729
- Solanas, A.M., Parés, R., Bayona, J.M. y Albaigés, J.** 1984. Degradation of aromatic petroleum hydrocarbons by pure microbial cultures. *Chemosphere.* **13**, 593-601.
- Song, L. D., y Rosen, M. J.**, 1996. Surface properties, micellization and pre-micellar aggregation of gemini surfactants with rigid and flexible spacers. *Lagmuir.* **12**, 1149.
- Souza, M. C., Roberto, I. C., y Milagres, A. M.**, 1999. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using Response Surface Methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 768-772.
- Stanghellini, M.E., y Maier, R.M.**, 1997. Biosurfactants- their identity and potential efficacy in the biological control of zoospore plant pathogens. *Plant Disease.* **81**, 4-12.
- Steinbüchel, A., y Valentin, H.E.** 1995. Diversity of bacterial polyalkanoic acids *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 219-228.

Sudesh, K., y Abe, Y. 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Prog. Polym. Sci.* **25**, 1503-1555.

Syldatk, C., Lang, S., Matulovic, V., y Wagner, F., 1985 a. Production of four interfacial active rhamnolipids from *n*-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2847. *Z. Naturforsch.* **40c**, 61-67.

Syldatk, C., Lang, S., y Wagner, F., 1985 b. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* sp DSM 2874. *Z. Naturforsch.* **40c**, 51-60.

Syldatk, C. y Wagner, F., 1987. Production of biosurfactants. En *Biosurfactants and Biotechnology*, Kosaric, N., Cairns, W.L. y Gray, N.C., eds. (New York: Marcel Dekker), pp. 89-120.

Tavares, I., Jolly, L., Pompeo, F., Leitao, J., Fialho, A., Sá-Correia, I., y Mengin-Lecreulx, D., 2000. Identification of the *Pseudomonas aeruginosa glmM* gene, encoding phosphoglucosamine mutase. *J. Bacteriol.* **182**, 4453-4457.

Takase, H., Nitantai, H., Hoshino, K., Otani, T. 2000. Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed. *Infection and Immunity* **68**, 1834-1839.

Tiehm, A., 1994. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 258-263.

Triveni, R., Shamala, T., Rastogi, N., 2001. Optimised production and utilisation of exopolysaccharide from *Agrobacterium radiobacter*. *Process Biochem.* **36**, 787-795.

Vázquez, M., y Martin, A., 1998. Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. *Biotechnol. & Bioeng.* **57**, 314-320.

Viñas, M. 1999 Biorremediación de aguas contaminadas por hidrocarburos. Máster en Biología Experimental. Departamento de Biología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.

Viñas, M., Sabaté, J., Grifoll, M., Solanas, A.M., Vázquez, V., Gandarillas, C. y Vázquez, A. 2001. Ensayos de tratabilidad de suelos contaminados por la tecnología de biorremediación. *Residuos. Revista Técnica*. **Año XI (59)**, 78-82.

Vollbrecht, E., Heckmann, R., Wray, V., Nimtz, M., y Lang, S., 1998. Production and structure elucidation of di- and oligosaccharide lipids (biosurfactants) from *Tsukamurella* sp nov. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 530-537.

Vollbrecht, E., Rau, U., y Lang, S., 1999. Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella* spec. *Fett Lipid.* **101**, 389-394.

Walsh, A., Matewish, M., Burrows, L., Monteiro, M., Perry, M. y Lam, J. 2000. Lipopolysaccharide core phosphates are required for viability and intrinsic drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **35**, 718-727.

Wanasundara, U., y Shahidi, F., 1998. Concentration of w-3 polyunsaturated fatty acids of marine oils using *Candida cylindracea* lipase: Optimization of reaction conditions. *JAOCS.* **75**, 1767-1774.

Weuster-Botz, D., Kelle, R., Frantzen, y M., Wandrey, C. 1997. Substrate controlled fed-batch production of L-lysine with *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Prog.* **13**, 387-393.

Wild, M., Caro, A., Hernández, A., Maier, R. y Soberón-Chávez, G. 1997. Selection and partial characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. *FEMS. Microbiol. Lett.* **153**, 279-285.

Williams, S.F., Martin, D.P., Horowitz, D.M. y Peoples, O.P. 1999. PHA applications: addressing the price performance issue. I. Tissue engineering. *International J. Biol. Macromol.* **25**, 111-121.

Witholt, B. y Kessler, B. 1999. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics. *Curr. Opinion in Biotechnol.* **10**, 279-285.

- Woods, G. L., y Washington, J. A.** 1995. Antimicrobial susceptibility test: Dilution and disk diffusion method. En *Manual of clinical microbiology*. P.R. Murray, ed, (Washington, D.C), pp. 1327-1341.
- Wu, J., y Ju, L.** 1997. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotechnol.* **59**, 193-202.
- Yakimov, M., Timmis, K., Wray, V., Fredrickson, H.** 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1706-1713.
- Yakimov, M., Fredickson, H., y Timmis, K.** 1996. Effect of heterogeneity of hydrophobic moieties on surface activity of lichenysin A, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus licheniformis* BAS50. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **23**, 13-18.
- Yurika, I., Biondo, O., Waldemar de Oliveira, L., R., d. S., y Iouko, E.** 2000. Response surface methodology for extraction optimization of pigeon pea protein. *Food Chem.* **70**, 259-265.
- Zajic, J. E., y Panchal, C. J.,** 1976. Bio-Emulsifiers. *CRC Crit. Reviev. in Microbiol.* **1**, 39-66.
- Zhang, Y., y Miller, R.,** 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol.* **60**, 2101-2106.
- Zhang, J., y Greasham, R.** 1999. Chemically defined media for commercial fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 407-421.
- Zheng, Z. y Obbard, P.** 2000. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using surfactant and the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **75**, 1183-1189.

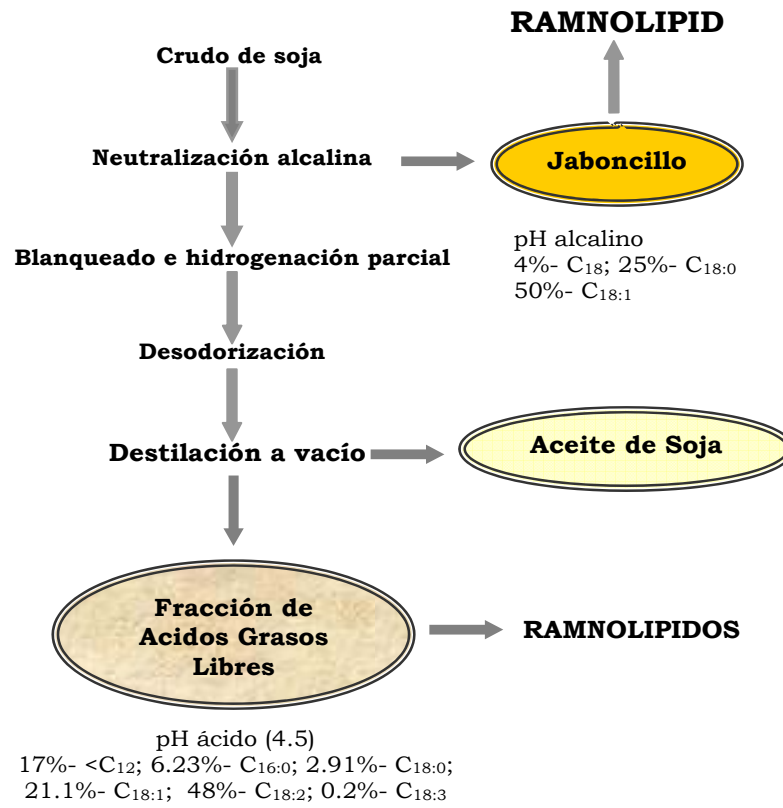


Figura A.1.- Proceso de refinado de aceite de

ANALISIS DE VARIANZA Y REGRESION MULTIPLE

Pruebas de significado del modelo de regresión y de los parámetros

1.- Test para el significado del modelo de regresión

Hipótesis nula (H_0): *El modelo de regresión no es significativo*

La hipótesis nula (H_0) es cierta si no hay relación entre las variables independientes o factores y la respuesta o efecto. Ho se rechaza si $F_0 > F_{crítica}$. Los programas de ajuste no suelen dar la F_0 sino que indican directamente la $F_{significativa}$, que es exactamente el valor de α (0.10; 0.05; etc), es decir el nivel del modelo de regresión. Este α significa la **probabilidad** de que el modelo de regresión obtenido **no** sea el adecuado para predecir el fenómeno estudiado. Estos parámetros aparecen en la tabla ANOVA que resume el test de significación del modelo.

En la fila correspondiente al modelo de regresión se busca una F muy grande y valores de P muy pequeños para que se pueda rechazar la hipótesis nula (H_0)

Ramnolípidos: $F= 569.68$ y $F_{significativa}= 9.09 \times 10^{-20}$. Este modelo es significativo a un nivel de 10^{-20} , es decir la probabilidad (P) de que el modelo no sea adecuado para predecir la producción de ramnolípidos es de 10^{-20} . (Tabla A.1)

Tabla A.1.- Análisis de Varianza (ANOVA) para los ramnolípidos

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Probabilidad P (>F)
Regresión	277.47	13	21.34	569.68	9.092 x10 ⁻²⁰
Residual	0.64	17	0.04		
Error LOF	0.38	10	0.04	1.046	0.492
Error Exp.	0.25	7	0.04		
Total	278.11	30			

Biomasa: $F= 63.00$ y $F_{significativa}= 3.576 \times 10^{-13}$. El modelo que describe esta respuesta es significativo a un nivel de 10^{-13} , o lo que es lo mismo hay una probabilidad de 10^{-13} de que le modelo no sea el adecuado para predecir la producción de biomasa. (Tabla A.2)

Tabla A.2.- Análisis de Varianza (ANOVA) para la biomasa

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Probabilidad P (>F)
Regresión	77.03	9	8.56	63.00	3.576 x10 ⁻¹³
Residual	2.85	21	0.14		
Error LOF	1.59	14	0.11	0.63	0.783
Error Exp.	1.26	7	0.18		
Total	79.88	30			

2.- Test para el “lack of fit” o falta de ajuste

Cuando el diseño experimental contiene puntos repetidos, es decir puntos donde la respuesta es obtenida con los mismos valores de los factores (en el caso estudiado, los experimentos del 25-31), se puede realizar una prueba que da la significación del error debido a las repeticiones y el error debido al modelo.

El residual en un ANOVA típico se divide en dos filas: a.- la suma de cuadrados debida a la falta de ajuste (“lack of fit” e indica si el modelo se reproduce bien o mal los datos experimentales) y b.- la suma de cuadrados debido a la incertidumbre puramente experimental, llamada también error puro

El test de la falta de ajuste o “lack of fit” es parecido la test F del modelo de regresión, es decir se calculan una F y una P. Sin embargo en este caso se busca un valor de F muy pequeño y una P muy grande para que la falta de ajuste no sea significativa. Si el valor de F del “lack of fit” es **mayor** que el $F_{\text{crítico}}$, el “lack of fit” es **significativo**, es decir el modelo no reproduce los resultados experimentales.

Ramrólpidos (Y_1): $F = 1.0461$ y $F_{\text{significativa}} = 0.492$. Esto quiere decir que la probabilidad de que la falta de ajuste **no sea significativa** es del 49.2%. En la literatura consultada se señalan probabilidades de hasta 26% (Oh *et al.*, 1995) (Tabla A.1). **Biomasa** (Y_2): $F = 0.6274$ y $F_{\text{significativa}} = 0.783$. Para esta respuesta, la probabilidad de que la falta de ajuste **no sea significativa** es del 78.30% (Tabla A.2).

Un valor de $F_{\text{significativa}}$ pequeño, es decir un valor de F_0 muy grande indica que hay términos en el modelo que no se están considerando. Por ejemplo; si el ajuste se realiza a un modelo lineal significa que hay necesario la introducción de términos cuadráticos que expliquen la curvatura de la respuesta. Si el modelo ya era cuadrático será necesaria la introducción de términos cúbicos. Box, sugiere utilizar

transformaciones de la respuesta en lugar de introducir términos de orden superior en el modelo de regresión (Box *et al.*, 1989). Otros autores señalan en ocasiones muchos modelos con un valor de F_0 grande son, muchas veces, muy útiles para los propósitos prácticos aunque no cumplan con las leyes de la estadística. (Walters, 1999: www/multisimplex.com)

3.- Test para el significado de los coeficientes de regresión

De manera similar al test F, se aplica el test t , $t_0 > t_{\text{critico}}$ para un α determinado. En las Tablas A.3 y A.4 vienen tabulados los valores de t_0 como t_{stut} . En estas tablas también aparece la probabilidad (P), que es equivalente al valor de α . Luego entonces, P es la probabilidad de que ese término no influya. El software utilizado ordena los términos de regresión por orden creciente de P, es decir los primeros que aparecen son los que tienen **menor probabilidad de no influir**. Si se desea despreciar algún término, han de escogerse los últimos.

Ramrólpidos (Y_1) (Tabla A.3)

Tabla A.3.- Estimación de los coeficientes de regresión (ramrólpidos)

	P	Error	-95%	95%	t stut	VIF
b ₀	3.847x10 ⁻²²	0.07316	4.813	5.121	67.89	
b ₁	4.876x10⁻¹⁹	0.06844	2.901	3.189	44.49	3.000
b ₂₂	1.149x10 ⁻¹⁴	0.03620	-0.959	-0.806	-24.38	1.029
b ₁₁	1.992x10 ⁻¹⁴	0.03620	0.777	0.930	23.58	1.029
b ₃	1.114x10 ⁻¹³	0.03951	-0.923	-0.756	-21.24	1.000
b ₂	1.943x10 ⁻¹²	0.03951	-0.788	-0.621	-17.83	1.000
b ₂₄	1.601x10 ⁻⁰⁸	0.04839	-0.585	-0.381	-9.97	1.000
b ₁₃	4.158x10 ⁻⁰⁷	0.04839	-0.486	-0.281	-7.92	1.000
b ₄₄	1.267x10 ⁻⁰⁶	0.03620	-0.340	-0.187	-7.28	1.029
b ₁₂₂	6.090x10 ⁻⁰⁴	0.08382	-0.528	-0.175	-4.19	3.000
b ₃₃	7.350x10 ⁻⁰⁴	0.03620	0.072	0.225	4.10	1.029
b ₃₄	2.290x10 ⁻⁰³	0.04839	0.071	0.276	3.58	1.000
b ₁₂	2.710x10 ⁻⁰³	0.04839	-0.272	-0.067	-3.50	1.000
b ₁₄	1.809x10 ⁻⁰²	0.04839	-0.229	-0.024	-2.61	1.000

El valor de P más pequeño es del orden de 10^{-19} y corresponde al coeficiente del término X_1 (b_1) y el mayor es del orden 0.018, y se corresponde con el término $X_1 X_4$ (b_{14}). Para esta respuesta, X_1 es la variable que influye más (**menor probabilidad de**

no influir), mientras que la interacción $X_1 X_4$ es la que menos influye (**mayor probabilidad de no influir**).

Biomasa (Y_2): El menor valor de P es del orden de 10^{-13} y corresponde al coeficiente del término X_1 (b_1), mientras que el mayor es del orden de 0.032, y corresponde al coeficiente b_{13} del término $X_1 X_3$. En esta respuesta, la variable X_1 tiene la **menor probabilidad de no influir** y la interacción $X_1 X_3$ posee la **mayor probabilidad de no influir**. (Tabla A.4)

Tabla A.4.- Estimación de los coeficientes de regresión (biomasa)

	P	Error	-95%	95%	t _{stut}	VIF
b_0	5.459×10^{-22}	0.139	5.720	6.300	43.14	
b_1	2.468×10^{-13}	0.075	1.061	1.374	16.18	1.000
b_2	2.487×10^{-10}	0.075	0.688	1.001	11.22	1.000
b_{12}	1.580×10^{-07}	0.092	0.516	0.899	7.68	1.000
b_{11}	4.411×10^{-07}	0.068	-0.639	-0.352	-7.18	1.029
b_{33}	9.480×10^{-04}	0.068	0.121	0.408	3.84	1.029
b_4	3.110×10^{-04}	0.075	0.168	0.481	4.31	1.000
b_{44}	3.160×10^{-04}	0.068	-0.440	-0.153	-4.30	1.029
b_{22}	3.240×10^{-03}	0.068	-0.372	-0.085	-3.32	1.029
b_{13}	3.230×10^{-03}	0.092	0.019	0.403	2.29	1.000

El error estándar de cada coeficiente se refleja en la tabla como Std. Error. Las columnas correspondientes a +95 y -95% indican los límites superior e inferior del rango de confianza de los parámetros. Es decir, hay un 95% de probabilidad de que el valor real de ese coeficiente esté comprendido en ese rango. Este rango está relacionado con el valor de α .

La columna correspondiente a los VIF (variance inflation factors) permite asegurar que los regresores (**ramnolípidos:** $X_1, X_2^2, X_1^2, X_3, X_2, X_2 X_4, X_1 X_3, X_4^2, X_1 X_2^2, X_3^2, X_3 X_4, X_1 X_2, X_1 X_4$; **biomasa:** $X_1, X_2, X_1 X_2, X_1^2, X_3^2, X_4, X_4^2, X_2^2, X_1 X_3$) son independientes entre sí, es decir no guardan una relación lineal entre ellos. Si el VIF es muy grande (>10), el coeficiente estimado está severamente afectado por dependencias lineales entre las variables independientes.

Ramnolípidos (Y_1): El mayor valor de VIF obtenido fue 3, por tanto no hay dependencia entre los regresores (Tabla A.3). **Biomasa (Y_2):** El mayor VIF fue de 1.029, por tanto no hay dependencia entre los factores. (Tabla A.4)

Diagnóstico de la regresión y comprobación de la adecuación del modelo

1.- Coeficientes de determinación múltiple

1.1.- R^2 es el coeficiente de determinación múltiple. Varía entre 0 y 1. En ocasiones puede aparecer como porcentaje de variabilidad total explicado por el modelo ($R^2 \times 100$).

Ramrólpidos (Y_1): $R^2 = 0.9977$, es decir el 99.77% de las variaciones son explicadas por el modelo. (Tabla A.5)

Resumen	
R	0.9989
R^2	0.9977
R^2 ajustado	0.9960
Error	0.19
PRESS	5.36
R^2 de predicción	0.9807
Durbin-Watson d	1.96
Autocorrelación de primer orden	0.02
Coefficiente de Variación	3.99
Indice de precisión	112.53

Tabla A.5.- Resumen del modelo de regresión de la respuesta ramrólpidos

$$Y_1 = 4.97 + 3.04 X_1 - 0.88 X_2^2 + 0.85 X_1^2 - 0.84 X_3 - 0.70 X_2 - 0.48 X_2 X_4 - 0.38 X_1 X_3 - 0.26 X_4^2 - 0.35 X_1 X_2^2 + 0.15 X_3^2 + 0.17 X_3 X_4 - 0.17 X_1 X_2 - 0.13 X_1 X_4$$

Biomasa (Y_2): $R^2 = 0.9643$, es decir que el modelo solo explica el 96.43% de las variaciones. (Tabla A.6)

Resumen	
R	0.9820
R^2	0.9643
R^2 ajustado	0.9490
Error	0.37
PRESS	7.00
R^2 de predicción	0.9120
Durbin-Watson d	2.23
Autocorrelación de primer orden	-0.12
Coefficiente de variación	6.79
Indice de precisión	28.84

Tabla A.6.- Resumen del modelo de regresión de la respuesta biomasa.

$$Y_2 = 6.01 + 1.22 X_1 + 0.84 X_2 + 0.71 X_1 X_2 - 0.49 X_1^2 + 0.26 X_3^2 + 0.32 X_4 - 0.30 X_4^2 - 0.23 X_2^2 + 0.21 X_1 X_3$$

Un R^2 muy próximo a la unidad no indica necesariamente que un modelo sea bueno. R^2 puede aumentar incrementando el número de parámetros del modelo.

Cuantos más parámetros contenga un modelo de regresión, más próximo a 1 será el R^2 . Esos son los llamados modelos “sobreajustados”.

1.2.- $\sqrt{R^2} = |R|$ es el coeficiente de correlación múltiple. En una regresión múltiple, $|R|$ varía entre 0 y +1 y se corresponde con el coeficiente de correlación de la recta obtenida al representar los valores predichos por el modelo frente a los valores experimentales.

Ramrólpidos (Y_1): $|R|=0.9989$ (Tabla A.5); **Biomasa (Y_2):** $|R|= 0.9820$ (Tabla A.6)

1.3.- $R^2_{ajustado}$ es el coeficiente de determinación ajustado. Mientras que R^2 siempre aumenta al introducir nuevos parámetros en el modelo de regresión, $R^2_{ajustado}$ puede disminuir; indicando así si la adición de nuevos términos a la regresión conlleva a “sobreajustar” el modelo.

Ramrólpidos (Y_1): $R^2_{ajustado} = 0.9960$ (Tabla A.5); **Biomasa (Y_2):** $R^2_{ajustado} = 0.9490$ (Tabla A.6)

Al evaluar un modelo de regresión han de compararse los valores de R^2 y $R^2_{ajustado}$. Si son muy diferentes el modelo está “sobreajustado”.

Ramrólpidos: $R^2 = 0.9977$ y $R^2_{ajustado} = 0.9960$ (Tabla A.5); **Biomasa:** $R^2 = 0.9640$ y $R^2_{ajustado} = 0.9490$ (Tabla A.6)

Estos coeficientes aparecen relacionados en la tabla Resumen (Tablas A.5 y A.6) de cada respuesta

2.- Residuales, residuales estandarizados y “outliers”

La Tabla A.7 refleja los valores de residual para cada punto experimental en las dos respuestas estudiadas (ramrólpidos y biomasa). El residual es la diferencia entre el valor experimental de un punto y el valor predicho por el modelo. $(Y_{est} - Y) = residual$.

Tabla A.7.- Correlación respuesta teórica/respuesta experimental

Exp.	R exp.	Rt.	Res.	Rks	R exp.	Rt.	Res.	Rks
	Ramnolipidos				Biomasa			
1	2.730	2.684	0.046	0.416	3.980	3.787	0.193	0.808
2	9.390	9.431	-0.041	-0.329	4.500	4.385	0.115	0.329
3	2.550	2.581	-0.031	-0.245	3.910	4.060	-0.150	-0.700
4	8.670	8.648	0.022	0.162	7.800	7.488	0.312	1.211
5	1.590	1.426	0.164	1.057	3.000	3.365	-0.365	-1.057
6	6.690	6.638	0.052	0.600	5.110	4.807	0.303	1.057
7	1.200	1.322	-0.122	-1.057	3.760	3.638	0.122	0.506
8	5.880	5.856	0.024	0.245	8.330	7.910	0.420	1.401
9	3.375	3.556	-0.181	-1.401	4.500	4.435	0.064	0.081
10	9.690	9.796	-0.106	-0.700	5.000	5.033	-0.033	-0.245
11	1.410	1.521	-0.111	-0.808	4.560	4.709	-0.149	-0.600
12	6.930	7.083	-0.152	-1.211	8.230	8.136	0.094	0.245
13	2.910	2.991	-0.081	-0.600	4.140	4.013	0.127	0.600
14	7.740	7.698	0.042	0.329	5.620	5.455	0.165	0.700
15	0.840	0.956	-0.116	-0.925	4.830	4.286	0.544	1.661
16	4.710	4.984	-0.274	-1.661	8.630	8.559	0.071	0.162
17	2.400	2.292	0.108	0.925	1.630	1.594	0.036	-0.081
18	14.580	14.47	0.108	0.808	5.970	6.464	-0.494	-1.661
19	2.790	2.846	-0.056	-0.506	3.350	3.406	-0.056	-0.329
20	0.300	0.028	0.272	1.661	6.380	6.783	-0.402	-1.401
21	7.410	7.241	0.169	1.211	6.690	7.069	-0.379	-1.211
22	3.930	3.883	0.047	0.506	6.990	7.069	-0.079	-0.416
23	3.900	3.912	-0.012	-0.081	3.930	4.176	-0.246	-0.925
24	4.140	3.912	0.228	1.401	5.260	5.473	-0.212	-0.808
25	5.040	4.967	0.073	0.700	6.250	6.010	0.240	0.925
26	4.980	4.967	0.013	0.080	5.900	6.010	-0.110	-0.506
27	4.980	4.967	0.013	0.000	6.000	6.010	-0.010	-0.162
28	4.920	4.967	-0.047	-0.416	6.610	6.010	0.600	2.141
29	4.620	4.967	-0.347	-2.141	5.130	6.010	-0.880	-2.141
30	5.280	4.967	0.313	2.141	6.050	6.010	0.040	0.000
31	4.95	4.967	-0.017	-0.162	6.130	6.010	0.120	0.416

Rexp: respuesta experimental, Rt: respuesta teórica, Rks: rankits, Res: residuales

Después de obtener el modelo los residuales son analizados para evaluar la adecuación del mismo. Los métodos más utilizados son:

2.1.- Gráficos de probabilidad normal de los residuales

El gráfico de probabilidad normal de los residuales representa el valor normal esperado (rankits) frente a los residuales. Estos gráficos se obtienen con el software utilizado. Los puntos en el gráfico deben de estar en línea recta. (Figuras A.2 y A.3) Si tienen forma de **S**, la distribución de los residuales no es normal, tiene colas largas. Los residuales se examinan buscando los puntos “outliers” (puntos que dan valores excesivamente grande de X, es decir se “salen” por este eje).

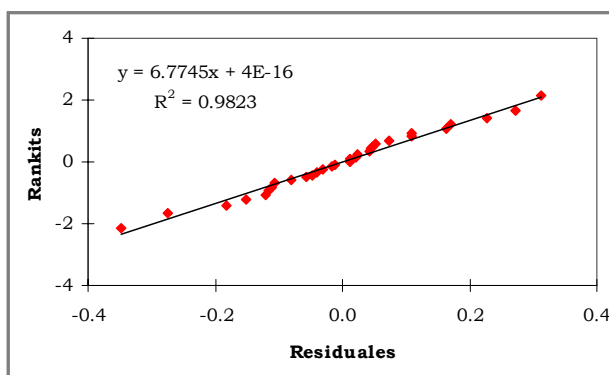


Figura A.2.- Gráfico de probabilidad normal de los residuales (ramnolípidos)

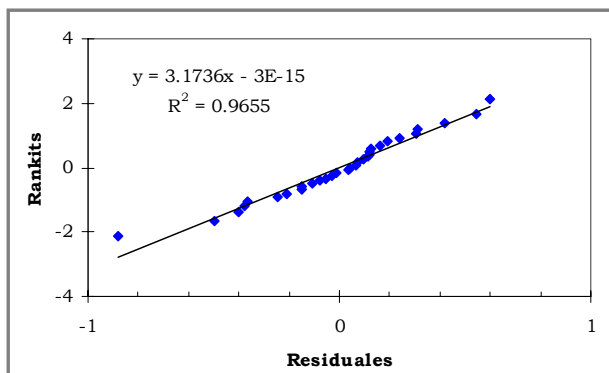


Figura A.3.- Gráfico de probabilidad normal de los residuales (biomasa)

2.2.- Gráficos de los residuales frente a las respuestas predichas por el modelo

La representación de los residuales frente a las respuestas predichas debe mostrar los puntos uniformemente distribuidos alrededor de la línea del cero, en una ancho de banda constante. Si la distribución de los puntos presenta desviaciones tipo “túnel”,

“rombo” o con alguna tendencia especial, es indicativo de que se requiere de alguna transformación en la respuesta o en los regresores (Figuras A.4 y A.5).

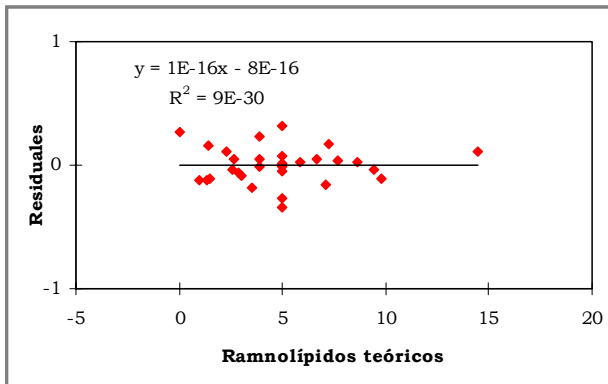


Figura A.4.- Gráfico de los residuales frente a la respuesta teórica (ramnolípidos)

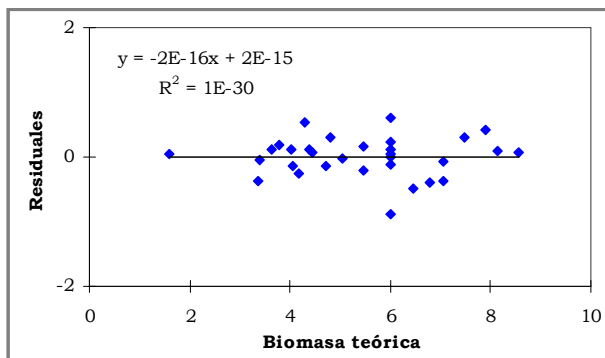


Figura A.5.- Gráfico de los residuales frente a la respuesta teórica (biomasa)

2.3.- Análisis de “outliers” usando valores umbral o de corte

El análisis de los puntos “outliers” se realiza inspeccionando los parámetros:

2.3.1.- Residuales estandarizados

Este residual no puede tener un valor absoluto muy elevado. Frecuentemente se utiliza como valor de corte 3 para detectar puntos “outliers”. Como los ejes X han sido fijados en el diseño del experimento, no se han de encontrar para el estudio realizado ningún punto “outlier”.

Ramrólpidos: El punto experimental 29, tiene un residual estandarizado de -1.793 (Tabla A.8), es decir es el “peor” punto experimental, aunque no se puede considerar “outlier” puesto que su valor absoluto es inferior al valor de corte.

Tabla A.8.- Residuales estandarizados, PRESS; Hat Diagonal y Distancia de Cook’s (ramrólpidos)

Exp.	Stand. Res.	Stud. Res.	PRESS Res.	R Student	Hat Diagonal	Cook's Distance
1	0.236	0.333	0.091	0.324	0.500	0.008
2	-0.210	-0.297	-0.081	-0.289	0.500	0.006
3	-0.158	-0.224	-0.061	-0.217	0.500	0.003
4	0.113	0.160	0.044	0.155	0.500	0.001
5	0.849	1.201	0.329	1.218	0.500	0.103
6	0.268	0.379	0.104	0.369	0.500	0.010
7	-0.630	-0.890	-0.244	-0.885	0.500	0.057
8	0.126	0.178	0.049	0.173	0.500	0.002
9	-0.936	-1.324	-0.363	-1.357	0.500	0.125
10	-0.549	-0.776	-0.212	-0.767	0.500	0.043
11	-0.575	-0.813	-0.223	-0.804	0.500	0.047
12	-0.788	-1.114	-0.305	-1.123	0.500	0.089
13	-0.420	-0.594	-0.163	-0.582	0.500	0.025
14	0.220	0.311	0.085	0.302	0.500	0.007
15	-0.601	-0.849	-0.233	-0.842	0.500	0.051
16	-1.414	-2.000	-0.548	-2.219	0.500	0.286
17	0.559	1.935	1.298	2.126	0.917	2.942
18	0.559	1.935	1.297	2.126	0.917	2.942
19	-0.287	-0.445	-0.134	-0.434	0.583	0.010
20	1.405	2.176	0.653	2.485	0.583	0.473
21	0.875	1.356	0.407	1.393	0.583	0.184
22	0.242	0.375	0.113	0.365	0.583	0.014
23	-0.061	-0.080	-0.020	-0.078	0.417	0.000
24	1.179	1.543	0.391	1.614	0.417	0.121
25	0.376	0.407	0.085	0.396	0.143	0.002
26	0.066	0.072	0.015	0.060	0.143	0.000
27	0.066	0.072	0.015	0.060	0.143	0.000
28	-0.244	-0.263	-0.055	-0.256	0.143	0.000
29	-1.793	-1.937	-0.405	-2.129	0.143	0.045
30	1.616	1.746	0.365	1.870	0.143	0.036
31	-0.088	-0.096	-0.020	-0.092	0.143	0.000

Stant. Res.: Standardized Residuals; Stud. Res.: Studentized Residuals;
PRESS Res.: PRESS Residuals

Biomasa: En esta respuesta el punto 29 es el que mayor residual estandarizado posee -2.388 (Tabla A.9), sin embargo no es un punto “outlier” puesto que es inferior al valor de corte.

Tabla A.9.- Residuales estandarizados, PRESS; Hat Diagonal y Distancia de Cook's (biomasa)

Exp.	Stand. Res.	Stud. Res.	PRESS Res.	R Student	Hat Diagonal	Cook's Distance
1	0.523	0.622	0.272	0.613	0.292	0.016
2	0.313	0.372	0.163	0.364	0.292	0.006
3	-0.408	-0.485	-0.212	-0.476	0.292	0.100
4	0.847	1.006	0.441	1.006	0.292	0.042
5	-0.989	-1.175	-0.515	-1.187	0.292	0.057
6	0.822	0.977	0.428	0.975	0.292	0.039
7	0.331	0.394	0.172	0.386	0.292	0.006
8	1.138	1.353	0.592	1.382	0.292	0.075
9	0.175	0.208	0.091	0.203	0.292	0.002
10	-0.089	-0.106	-0.046	-0.104	0.292	0.000
11	-0.404	-0.480	-0.210	-0.471	0.292	0.009
12	0.254	0.302	0.132	0.296	0.292	0.004
13	0.345	0.410	0.179	0.401	0.292	0.007
14	0.447	0.531	0.232	0.521	0.292	0.011
15	1.475	1.753	0.768	1.851	0.292	0.127
16	0.193	0.230	0.101	0.224	0.292	0.002
17	0.097	0.151	0.086	0.147	0.583	0.003
18	-1.341	-2.077	-1.186	-2.274	0.583	0.604
19	-0.151	-0.235	-0.134	-0.229	0.583	0.008
20	-1.092	-1.692	-0.966	-1.777	0.583	0.401
21	-1.029	-1.347	-0.650	-1.375	0.417	0.130
22	-0.215	-0.281	-0.136	-0.275	0.417	0.006
23	-0.667	-1.033	-0.590	-1.035	0.583	0.149
24	-0.577	-0.893	-0.510	-0.889	0.583	0.112
25	0.651	0.703	0.280	0.695	0.143	0.008
26	-0.298	-0.322	-0.128	-0.315	0.143	0.001
27	-0.027	-0.029	-0.012	-0.029	0.143	1.431
28	1.628	1.758	0.700	1.858	0.143	0.051
29	-2.388	-2.579	-1.027	-3.045	0.143	0.111
30	0.109	0.117	0.047	0.114	0.143	0.000
31	0.326	0.352	0.140	0.344	0.143	0.002

Stand. Res.: Standardized Residuals; Stud. Res.: Studentized Residuals;
PRESS Res.: PRESS Residuals

2.3.2.- “Residuales studentized”

Estos se utilizan más en colecciones pequeñas de puntos experimentales. Como la matriz de diseño (Tabla III.1) contiene 31 puntos experimentales, el análisis se realiza con los residuales estandarizados.

2.3.3.- PRESS (prediction error sum of squares).

Este parámetro sirve para detectar los llamados puntos de “muchacha influencia”, puntos influyentes (influential points) o puntos que se alejan (leverage points). Estos puntos son los que se alejan de la distribución en la dirección de la respuesta \mathbf{Y} , y al variar ligeramente su valor afectan drásticamente a los coeficientes del modelo de regresión. Cuanto mayor es el valor del PRESS, mayor es la influencia de ese punto.

Ramrólpidos: Los experimentos 17 y 18 son los más influyentes (Tabla A.8).

Biomasa: Los experimentos 18 y 29 son los que más influyen en esta respuesta (Tabla A.9)

2.3.4.- R_{student} o “externally studentized residual”

Este parámetro no es muy utilizado

2.3.5.- “Hat matrix” (h_{kk})

Los puntos influyentes se pueden detectar inspeccionando los valores de la diagonal de la “hat matrix”. Cuanto más alto es el valor de h_{kk} más se aleja ese punto de la distribución espacial de los puntos. Normalmente se toma como valor de corte $2p/n$ (para p coeficientes del modelo de regresión y n puntos experimentales)

Ramrólpidos: $\frac{2(14)}{31} = 0.9032$. Solamente los puntos 17 y 18 (Tabla A.8) presentan

valores de h_{kk} mayor que el valor de corte, o sea que son los puntos influyentes o

“leverage” ya vistos anteriormente (subepígrafe 2.3.3). **Biomasa:** $\frac{2(10)}{31} = 0.6452$ El

máximo valor de h_{kk} es 0.583 (Tabla A.9) y se obtuvo en seis puntos experimentales diferentes; no obstante como ninguno sobrepasa el valor de corte no pueden ser considerados puntos influyentes.

2.3.6.- Distancia de Cook (D_k)

Es el cuadrado de la distancia de la respuesta predicha por el modelo para un punto experimental y la respuesta que se obtendría para ese punto si la regresión hubiera eliminado ese punto de la matriz. Se determina para cada punto de la matriz. Los puntos con $D_k > 1$ se consideran puntos muy influyentes.

Ramrólpidos: Los puntos 17 y 18 tienen valores de D_k superiores a 1 (Tabla A.8), ello significa que son puntos muy importantes dentro de la matriz ya que se corresponden con combinaciones donde al variar solamente la fuente de carbono ($X_1 = -2$ y $X_1 = +2$ para los experimentos 17 y 18 respectivamente) la respuesta obtenida es muy baja (experimento 17) o muy alta (experimento 18). **Biomasa:** El mayor valor de D_k obtenido es 0.604 (experimento 18) que es a su vez menor que el valor de corte. (Tabla A.9)

2.4.- Otros parámetros utilizados en el estudio del modelo de regresión

2.4.1.- DFBETAS (Tablas A.10 y A.11)

Permite determinar la influencia de un punto experimental en los coeficientes de regresión del modelo. Hay tantas columnas DFBETAS como coeficientes tiene el modelo de regresión y tantas filas como puntos experimentales. Suele adoptarse como

valor de corte $\frac{2}{\sqrt{n}}$ (para n puntos experimentales). En ambas respuestas el valor de

corte es $\frac{2}{\sqrt{31}} = 0.359$. Los puntos que superen ese valor de corte se consideran puntos

muy influyentes en la determinación de ese coeficiente en concreto.

Tanto para los **Ramrólpidos** (Tabla A.10) como para la **Biomasa** (Tabla A.11) hay varios puntos con DFBETAS mayores que el valor de corte.

Tabla A.10.-Valores de DFBETAS para ramnolípidos

Exp.	b_0	$b_1 X_1$	$b_{22} X_2^2$	$b_{11} X_1^2$	$b_3 X_3$	$b_2 X_2$	$b_{24} X_2 X_4$	$b_{13} X_1 X_3$
1	0.000	0.000	0.025	0.025	-0.094	-0.094	0.115	0.115
2	0.000	0.000	-0.023	-0.023	0.083	0.083	-0.102	0.102
3	0.000	0.000	-0.017	-0.017	0.063	-0.063	0.077	-0.077
4	0.000	0.000	0.012	0.012	-0.045	0.045	-0.055	-0.055
5	0.000	0.000	0.096	0.096	0.352	-0.352	0.431	-0.431
6	0.000	0.000	0.029	0.029	0.107	-0.107	0.131	0.131
7	0.000	0.000	-0.060	-0.060	-0.255	-0.255	0.313	0.313
8	0.000	0.000	0.014	0.014	0.050	0.050	-0.061	0.061
9	0.000	0.000	-0.107	-0.107	0.392	0.392	0.480	-0.480
10	0.000	0.000	-0.060	-0.060	0.221	0.221	0.271	0.271
11	0.000	0.000	-0.063	-0.063	0.232	-0.232	-0.284	-0.284
12	0.000	0.000	-0.088	-0.088	0.324	-0.324	-0.397	0.397
13	0.000	0.000	-0.046	-0.046	-0.168	0.168	0.206	0.206
14	0.000	0.000	0.024	0.023	0.087	-0.087	-0.107	0.107
15	0.000	0.000	-0.066	-0.066	-0.243	-0.243	-0.298	0.298
16	0.000	0.000	-0.175	-0.175	-0.641	-0.641	-0.784	-0.784
17	0.000	-5.207	-0.820	4.102	0.000	0.000	0.000	0.000
18	0.000	5.207	-0.820	4.102	0.000	0.000	0.000	0.000
19	0.000	0.000	-0.375	0.075	0.000	0.275	0.000	0.000
20	0.000	0.000	2.145	-0.429	0.000	1.572	0.000	0.000
21	0.000	0.000	-0.240	-0.240	-0.881	0.000	0.000	0.000
22	0.000	0.000	-0.063	-0.063	0.231	0.000	0.000	0.000
23	0.000	0.000	0.011	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000
24	0.000	0.000	-0.235	-0.235	0.000	0.000	0.000	0.000
25	0.162	0.000	-0.082	-0.082	0.000	0.000	0.000	0.000
26	0.028	0.000	-0.014	-0.014	0.000	0.000	0.000	0.000
27	0.028	0.000	-0.014	-0.014	0.000	0.000	0.000	0.000
28	-0.104	0.000	0.053	0.053	0.000	0.000	0.000	0.000
29	-0.869	0.000	0.439	0.439	0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.763	0.000	-0.386	-0.386	0.000	0.000	0.000	0.000
31	-0.038	0.000	0.019	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabla A.10.-(cont) Valores de DF BETAS para ramnolípidos

Exp.	$b_{44} X_4 X_4$	$b_{122} X_1 X_2^2$	$b_{33} X_3^2$	$b_{34} X_3 X_4$	$b_{12} X_1 X_2$	$b_{14} X_1 X_4$
1	0.025	-0.066	0.025	0.115	0.115	0.115
2	-0.023	-0.059	-0.023	-0.102	0.102	0.102
3	-0.017	0.044	-0.017	-0.077	0.077	-0.077
4	0.012	0.032	0.012	0.055	0.055	-0.055
5	0.096	-0.249	0.096	-0.431	0.431	0.431
6	0.029	0.075	0.029	-0.131	-0.131	-0.131
7	-0.070	0.181	-0.070	0.313	0.313	-0.313
8	0.013	0.035	0.014	-0.061	0.061	-0.061
9	-0.107	0.277	-0.107	0.480	-0.480	0.480
10	-0.060	-0.157	-0.060	0.271	0.271	-0.271
11	-0.063	0.164	-0.063	0.284	0.284	0.284
12	-0.088	-0.229	-0.088	0.397	-0.397	-0.397
13	-0.046	0.119	-0.046	-0.206	-0.206	0.206
14	0.024	0.062	0.024	0.107	-0.107	0.107
15	-0.066	0.172	-0.066	-0.298	0.298	0.298
16	-0.175	-0.453	-0.175	-0.784	-0.784	-0.784
17	-0.820	4.252	-0.820	0.000	0.000	0.000
18	-0.820	-4.252	-0.820	0.000	0.000	0.000
19	0.075	0.000	0.075	0.000	0.000	0.000
20	-0.429	0.000	-0.429	0.000	0.000	0.000
21	-0.240	0.000	1.202	0.000	0.000	0.000
22	-0.063	0.000	0.315	0.000	0.000	0.000
23	-0.057	0.000	0.011	0.000	0.000	0.000
24	1.177	0.000	-0.235	0.000	0.000	0.000
25	-0.082	0.000	-0.082	0.000	0.000	0.000
26	-0.014	0.000	-0.014	0.000	0.000	0.000
27	-0.014	0.000	-0.014	0.000	0.000	0.000
28	0.053	0.000	0.053	0.000	0.000	0.000
29	0.439	0.000	0.439	0.000	0.000	0.000
30	-0.386	0.000	-0.386	0.000	0.000	0.000
31	0.019	0.000	0.019	0.000	0.000	0.000

Tabla A.11.- Valores de DFBETAS (biomasa)

Exp.	b_0	$b_1 X_1$	$b_2 X_2$	$b_{12} X_1 X_2$	$b_1 X_1^2$
1	0.000	-0.149	-0.149	0.182	0.040
2	0.000	0.088	-0.088	-0.108	0.024
3	0.000	0.115	-0.115	0.141	-0.031
4	0.000	0.244	0.244	0.299	0.067
5	0.000	0.288	0.288	-0.352	-0.078
6	0.000	0.237	-0.237	-0.290	0.064
7	0.000	-0.093	0.093	-0.115	0.025
8	0.000	0.335	0.335	0.410	0.091
9	0.000	-0.049	-0.049	0.060	0.013
10	0.000	-0.025	0.025	0.031	-0.007
11	0.000	0.114	-0.114	0.140	-0.031
12	0.000	0.072	0.072	0.088	0.019
13	0.000	-0.097	-0.097	0.119	0.026
14	0.000	0.126	-0.126	-0.155	0.034
15	0.000	-0.449	0.449	-0.550	0.123
16	0.000	0.054	0.054	0.067	0.015
17	0.000	-0.093	0.000	0.000	0.127
18	0.000	-1.438	0.000	0.000	-1.962
19	0.000	0.000	0.145	0.000	0.039
20	0.000	0.000	-1.124	0.000	0.307
21	0.000	0.000	0.000	0.000	0.201
22	0.000	0.000	0.000	0.000	0.040
23	0.000	0.000	0.000	0.000	0.179
24	0.000	0.000	0.000	0.000	0.153
25	0.284	0.000	0.000	0.000	-0.143
26	-0.129	0.000	0.000	0.000	0.065
27	-0.012	0.000	0.000	0.000	0.006
28	0.759	0.000	0.000	0.000	-0.383
29	-1.243	0.000	0.000	0.000	0.628
30	0.047	0.000	0.000	0.000	-0.024
31	0.141	0.000	0.000	0.000	-0.071

Tabla A.12.- (cont) Valores de DF BETAS (biomasa)

Exp.	$b_3 X_3^2$	$b_4 X_4$	$b_{44} X_4^2$	$b_{22} X_2^2$	$b_{13} X_{13}$
1	0.040	-0.149	0.040	0.040	0.182
2	0.024	-0.088	0.024	0.024	-0.108
3	-0.031	0.115	-0.031	-0.031	-0.141
4	0.067	-0.244	0.067	0.067	-0.299
5	-0.078	0.288	-0.078	-0.078	0.352
6	0.064	-0.237	0.064	0.064	0.290
7	0.025	-0.093	0.025	0.025	-0.115
8	0.091	-0.335	0.091	0.091	0.410
9	0.013	0.049	0.013	0.013	0.060
10	-0.007	-0.025	-0.007	-0.007	0.031
11	-0.031	-0.114	-0.031	-0.031	-0.140
12	0.019	0.072	0.019	0.019	-0.088
13	0.026	0.097	0.026	0.026	-0.119
14	0.034	0.126	0.034	0.034	0.155
15	0.123	0.449	0.123	0.123	-0.550
16	0.015	0.054	0.014	0.015	0.067
17	-0.025	0.000	-0.025	-0.025	0.000
18	0.392	0.000	0.392	0.392	0.000
19	0.039	0.000	0.039	-0.198	0.000
20	0.307	0.000	0.307	-1.533	0.000
21	-1.003	0.000	0.201	0.201	0.000
22	-0.201	0.000	0.040	0.040	0.000
23	0.179	0.655	-0.893	0.179	0.000
24	0.153	-0.562	-0.767	0.153	0.000
25	-0.143	0.000	-0.143	-0.143	0.000
26	0.065	0.000	0.065	0.065	0.000
27	0.006	0.000	0.006	0.006	0.000
28	-0.383	0.000	-0.383	-0.383	0.000
29	0.628	0.000	0.628	0.628	0.000
30	-0.024	0.000	-0.024	-0.024	0.000
31	-0.071	0.000	-0.071	-0.071	0.000

2.4.2.- DFFITS

Este parámetro también permite detectar la influencia de un punto experimental sobre la respuesta predicha. El valor de corte que se suele utilizar viene dado por $2\sqrt{\frac{p}{n}}$, para p coeficientes del modelo y n puntos experimentales. Los puntos con DFFITS mayores que este valor de corte tienen gran influencia en los valores teóricos de respuesta del modelo de regresión.

Ramnolípidos: $2\sqrt{\frac{14}{31}}=1.344$. Nuevamente los puntos experimentales 17 (7.051) y 18 (7.051) son los que mayor valor de DFFITS tienen, aunque los puntos 20 (2.941), 21 (1.648) y 24 (1.364) han de considerarse también ya que poseen DFFITS mayor que el valor de corte (Tabla A.12). **Biomasa:** $2\sqrt{\frac{10}{31}}=1.136$. Para esta respuesta solamente el punto experimental 15 (1.188) tiene un DFFITS mayor que el valor de corte. (Tabla A.12)

Tabla A.12.- Valores DFFITS y COVRATIO para ramnolipidos y biomasa

Exp.	Ramnolipidos		Biomasa	
	DFFITS	CR	DFFITS	CR
1	0.324	4.263	0.393	1.910
2	-0.289	4.346	0.234	2.152
3	-0.217	4.484	-0.305	2.055
4	0.155	4.576	0.646	1.403
5	1.218	1.351	-0.761	1.165
6	0.369	4.150	0.626	1.445
7	-0.885	2.395	0.247	2.136
8	0.173	4.553	0.887	0.924
9	-1.357	1.018	0.131	2.253
10	-0.767	2.820	-0.066	2.287
11	-0.804	2.683	-0.302	2.060
12	-1.123	1.617	0.190	2.202
13	-0.582	3.486	0.258	2.122
14	0.302	4.316	0.335	2.009
15	-0.842	2.547	1.188	0.473
16	-2.219	0.109	0.144	2.242
17	7.051	0.861	0.174	3.867
18	7.051	0.861	-2.691	0.392
19	-0.514	4.759	-0.271	3.808
20	2.941	0.058	-2.102	0.903
21	1.648	1.130	-1.162	1.131
22	0.432	4.992	-0.232	2.689
23	-0.066	3.985	-1.225	2.320
24	1.364	0.484	-1.052	2.654
25	0.162	2.378	0.284	1.497
26	0.028	2.715	-0.129	1.808
27	0.028	2.715	-0.012	1.900
28	-0.104	2.575	0.759	0.387
29	-0.869	0.083	-1.243	0.042
30	0.763	0.171	0.047	1.888
31	-0.038	2.706	0.141	1.791

2.4.3.- COVRATIO (CR)

Describe la influencia de un punto experimental sobre la precisión del modelo. Los puntos que se alejan de la distribución en la dirección de \mathbf{Y} (“leverage”), tendrán un valor de COVRATIO elevado a no ser que sean puntos “outlier” (se alejan en la dirección de \mathbf{X}). Si el valor de COVRATIO > 1 , la inclusión de ese punto en la matriz experimental incrementará la precisión del modelo. Por el contrario, si el valor de COVRATIO es menor que la unidad el modelo disminuirá su precisión.

Ramnolípidos: En esta respuesta aparecen siete puntos con COVRATIO menores que la unidad, de los cuales los más importantes son los puntos 29 (0.083), 16 (0.109) y 30 (0.171). Los resultados experimentales correspondientes a estos puntos son los que más afectan la precisión del modelo (Tabla A.12). **Biomasa:** En esta respuesta el punto 29 (0.042) es el que más afecta la precisión del modelo de regresión. (Tabla A.12)

Parámetros descritos en la tabla Resumen (Tablas A.5 y A.6)

1.- R^2 para la predicción

El valor de R^2 de la predicción se determina a partir del PRESS (suma de cuadrados del error de la predicción).

Ramnolípidos: PRESS = 5.36 (Tabla A.5); **Biomasa:** PRESS = 7.00 (Tabla A.6)

R^2 indica el poder predictivo del modelo de regresión y su valor es menor cuanto menos puntos experimentales tenga la matriz de datos. El ajuste del modelo y el poder de predicción que posee se ha de valorar analizando conjuntamente R^2 , R^2_{ajustado} y $R^2_{\text{predicción}}$, así cuanto más próximos sean mayor fortaleza tiene el modelo.

Ramnolípidos: $R^2 = 0.9970$; $R^2_{\text{ajustado}} = 0.9960$; $R^2_{\text{predicción}} = 0.9807$ (Tabla A.5). La diferencia entre los coeficientes es mínima y por tanto el modelo posee fortaleza de predicción. **Biomasa:** $R^2 = 0.9643$; $R^2_{\text{ajustado}} = 0.9490$; $R^2_{\text{predicción}} = 0.9120$ (Tabla A.6). La diferencia entre los coeficientes es ligeramente superior a la encontrada en la respuesta ramnolípidos; sin embargo no es lo suficientemente grande como para afirmar que el modelo es débil en la predicción de esta respuesta. El valor de $R^2_{\text{predicción}}$ es ligeramente bajo e indica que tal vez sería conveniente aumentar el número de puntos experimentales para aumentar el poder predictivo del modelo.

2.- Índice de Precisión (Precision Index)

Cuanto mayor sea el valor del Índice de Precisión mayor poder de predicción tiene el modelo. Los valores bajos se consideran próximos a la unidad.

Ramnolípidos: Precision Index = 112.534 (Tabla A.5); **Biomasa:** Precision Index = 28.843 (Tabla A.6)

3.- Coeficiente de variación (CV)

Este coeficiente indica las variabilidades encontradas en los datos y que no se pueden explicar por el modelo. Se expresa en %.

Ramnolípidos: CV = 3.99% (Tabla A.5). Solo el 3.99% de las variaciones encontradas en los resultados experimentales no pueden ser explicados por el modelo de regresión.

Biomasa: CV = 6.79% (Tabla A.6). Solo el 6.79% de las variaciones encontradas en los resultados experimentales no pueden ser explicados por el modelo de regresión.

Otros parámetros de la regresión

1.- Multicolinealidad

Los ajustes de los datos experimentales a un modelo de regresión, se basan en la “independencia” de los regresores. Esto significa que entre ellos no debe haber relación lineal. La existencia de ortogonalidad entre los regresores puede causar lo que se conoce como “Multicolinealidad”. La Multicolinealidad puede afectar severamente a los coeficientes de la regresión.

La prueba de colinealidad se hace mirando a la matriz de los regresores en forma de correlación. La diagonal de la matriz debe ser 1 y el resto de los elementos deben muy próximos a 0.

Ramnolípidos: La matriz de los regresores (Tabla A.13) muestra una diagonal con valor 1. El resto de los elementos tiene valor 0 o muy próximo a él (-0.088); excepto la combinación (cualquiera que sea la entrada de la matriz) X_1 con $X_1 X_2^2$ que posee un valor elevado (0.816). Esto significa que entre estos regresores debe existir alguna relación lineal, aunque cabe destacar que no es muy grande ya que el valor no supera la unidad. La introducción de este término en el modelo ($X_1 X_2^2$) se debió a que

inicialmente se obtuvo un modelo de regresión cuadrático (ecuación 2) con un test de “lack of fit” inadecuado. Llegado este punto hay que establecer un compromiso entre tener una falta de ajuste inadecuada o cierta colinearidad. **Biomasa**: En esta respuesta la matriz de los regresores tiene diagonal con valor 1. El resto de los elementos posee valor 0 ó -0.088, no existe entonces dependencia lineal entre los regresores. (Tabla A.14)

2.- Collinearity

El valor del determinante de la matriz (diferencia entre los productos de las diagonales principal y secundaria) se llama parámetro de correlación o “Collinearity”. Si tiene valor único, los regresores son ortogonales (no hay relación lineal entre ellos); si por el contrario vale 0 existe relación lineal entre ellos.

Ramrólpidos: “Collinearity” = 0.316 (Tabla A.13). Esto corrobora lo observado anteriormente (punto 1) al examinar la matriz de los regresores. **Biomasa**: “Collinearity” = 0.948 (Tabla A.14). Este valor está muy próximo a la unidad, lo cual indica que los regresores son independientes entre sí.

3.- VIF (variance inflation factor)

Estos valores se calculan para coeficiente del modelo a partir de la matriz de regresores. Los valores de VIF se muestran en la tabla correspondiente a los coeficientes (Tablas A.3 y A.4). Valores de VIF >10 indican que ese coeficiente está afectado severamente por dependencias lineales de su regresor. **Ramrólpidos**: El valor de VIF más elevado es 3 y se corresponde exactamente a los coeficientes de los regresores antes mencionado (Tabla A.3). **Biomasa**: El valor de VIF más elevado es de 1.029, lo cual corrobora que todos los regresores del modelo de regresión son linealmente independientes. (Tabla A.4)

Tabla A.13.- Matriz de correlación (ramnolípidos)

	X ₁	X ₂ ²	X ₁ ²	X ₃	X ₂	X ₂ X ₄	X ₁ X ₃	X ₄ ²	X ₁ X ₂ ²	X ₃ ²	X ₃ X ₄	X ₁ X ₂	X ₁ X ₄
X ₁	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.816	0.000	0.000	0.000	0.000
X ₂ ²	0.000	1.000	-0.088	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.088	0.000	-0.088	0.000	0.000	0.000
X ₁ ²	0.000	-0.088	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.088	0.000	-0.088	0.000	0.000	0.000
X ₃	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X ₂	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X ₂ X ₄	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X ₁ X ₃	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X ₄ ²	0.000	-0.088	-0.088	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	-0.088	0.000	0.000	0.000
X ₁ X ₂ ²	0.816	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X ₃ ²	0.000	-0.088	-0.088	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.088	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
X ₃ X ₄	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.088	0.000	1.000	0.000	0.000
X ₁ X ₂	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000
X ₁ X ₄	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000

Tabla A. 14.- Matriz de correlación (biomasa)

	X_1	X_2	X_1X_2	X_1^2	X_3^2	X_4	X_4^2	X_2^2	X_1X_3
X_1	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X_2	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X_1X_2	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
X_1^2	0.000	0.000	0.000	1.000	-0.088	0.000	-0.088	-0.088	0.000
X_3^2	0.000	0.000	0.000	-0.088	1.000	0.000	-0.088	-0.088	0.000
X_4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
X_4^2	0.000	0.000	0.000	-0.088	-0.088	0.000	1.000	-0.088	0.000
X_2^2	0.000	0.000	0.000	-0.088	-0.088	0.000	-0.088	1.000	0.000
X_1X_3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000

ANALISIS CANONICO R

El análisis canónico es una herramienta matemática muy útil para estudiar una superficie de respuesta cuando están implicados cuatro o más variables. Se fundamenta en la simplificación del modelo de regresión de segundo orden ($\mathbf{Y} = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{44} X_4^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{14} X_1 X_4 + b_{23} X_2 X_3 + b_{24} X_2 X_4 + b_{34} X_3 X_4$) a una ecuación matricial ($y = a_0 + X_k^T a_k + X_k^T A X_k$) donde: \mathbf{Y} es la respuesta en estudio; a_0 es el valor de la respuesta en el origen 0 del sistema de referencia inicial (es decir el valor del término independiente); X_k es el vector de coordenadas de un punto k ; a_k es el vector de los coeficientes de primer grado y A es la matriz diagonal de los términos cruzados y cuadráticos.

Las simplificaciones que se pueden llevar a cabo son: 1.- girar los ejes del sistema de referencia a un nuevo origen R para eliminar los términos de interacción. La rotación lleva los ejes del sistema de referencia inicial a ser paralelos a los ejes de la superficie de respuesta. Existe un eje R por cada factor. 2.- trasladar el centro 0 de los ejes de referencia a la cima o al valle del máximo o mínimo (punto estacionario) de la superficie de respuesta. Si el máximo o el mínimo de la superficie de respuesta se encuentra dentro del dominio de estudio, es decir en el intervalo de niveles de los factores ambas simplificaciones son válidas (análisis canónico RT); si por el contrario el máximo o mínimo está fuera del dominio de estudio, solamente es válida la primera simplificación (análisis canónico R). (Box, 1954; Goupy, 1999)

Pasos del análisis canónico R

1.- Escribir el modelo de regresión cuadrático en forma matricial

Ramrólpidos

$$\mathbf{Y}_1 = 4.97 + 3.04 X_1 - 0.88 \mathbf{X}_2^2 + 0.85 X_1^2 - 0.84 X_3 - 0.70 X_2 - 0.48 X_2 X_4 - 0.38 X_1 X_3 - 0.26 X_4^2 - 0.35 X_1 \mathbf{X}_2^2 + 0.15 X_3^2 + 0.17 X_3 X_4 - 0.17 X_1 X_2 - 0.13 X_1 X_4 \quad (5)$$

En este caso el modelo es de tercer orden por lo que es necesario un cambio de variable para que el modelo tenga forma cuadrática y pueda aplicarse el análisis canónico. El cambio realizado fue: $X_2^2 = X_5$

$$y = a_0 + X_k^T a_k + X_k^T A X_k \quad k = 1, 2, 3, 4, 5$$

$$y = a_0 + [X_1 X_2 X_3 X_4 X_5] \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \\ a_3 \\ a_4 \\ a_5 \end{bmatrix} + [X_1 X_2 X_3 X_4 X_5] \begin{bmatrix} a_{11} a_{12} a_{13} a_{14} a_{15} \\ a_{21} a_{22} a_{23} a_{24} a_{25} \\ a_{31} a_{32} a_{33} a_{34} a_{35} \\ a_{41} a_{42} a_{43} a_{44} a_{45} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \\ X_5 \end{bmatrix} \quad (5a)$$

$a_0 = 3.97$; $a_1 =$ coeficiente del término X_1 ; $a_2 =$ coeficiente del término X_2 ; $a_3 =$ coeficiente del término X_3 , $a_4 =$ coeficiente del término X_4 (que como no aparece en la ecuación de regresión es igual a 0) y $a_5 =$ coeficiente del término X_2^2 ; $a_{11} =$ coeficiente del término X_1^2 ; $a_{22} = 0$ (ya que X_2^2 es igual a X_5 y por tanto es como si no apareciera en la ecuación); $a_{33} =$ coeficiente del término X_3^2 ; $a_{44} =$ coeficiente del término X_4^2 y $a_{55} =$ coeficiente del término X_5^2 (que no aparece en la ecuación y por tanto es 0); $a_{12} = a_{21} = \frac{1}{2}$ coeficiente del término $X_1 X_2$; $a_{13} = a_{31} = \frac{1}{2}$ coeficiente del término $X_1 X_3$; $a_{14} = a_{41} = \frac{1}{2}$ coeficiente del término $X_1 X_4$; $a_{15} = a_{51} = \frac{1}{2}$ coeficiente del término $X_1 X_2^2$; $a_{23} = a_{32} = 0$ (el término $X_2 X_3$ no aparece en la ecuación); $a_{24} = a_{42} = 1/2$ coeficiente del término $X_2 X_4$; $a_{25} = a_{52} = 0$ (el término $X_2 X_5$ no aparece en la ecuación); $a_{34} = a_{43} = 1/2$ coeficiente del término $X_3 X_4$; $a_{35} = a_{53} = 0$ (el término $X_3 X_5$ no aparece en la ecuación) y $a_{45} = a_{54} = 0$ (el término $X_4 X_5$ no aparece en la ecuación). Luego la ecuación 5a quedaría:

$$y = 4.97 +$$

$$[X_1 X_2 X_3 X_4 X_5] \begin{bmatrix} 3.04 \\ -0.70 \\ -0.84 \\ 0 \\ -0.88 \end{bmatrix} + [X_1 X_2 X_3 X_4 X_5] \begin{bmatrix} 0.85 & -0.08 & -0.19 & -0.06 & -0.18 \\ -0.08 & 0 & 0 & -0.24 & 0 \\ -0.19 & 0 & 0.15 & 0.09 & 0 \\ -0.06 & -0.24 & 0.09 & -0.26 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \\ X_5 \end{bmatrix}$$

Biomasa

$$Y_2 = 6.01 + 1.22 X_1 + 0.84 X_2 + 0.71 X_1 X_2 - 0.50 X_1^2 + 0.26 X_3^2 + 0.32 X_4 + 0.30 X_4^2 - 0.23 X_2^2 + 0.21 X_1 X_3 \quad (6)$$

$$y = a_0 + [X_1 X_2 X_3 X_4] \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \\ a_3 \\ a_4 \end{bmatrix} + [X_1 X_2 X_3 X_4] \begin{bmatrix} a_{11} a_{12} a_{13} a_{14} \\ a_{21} a_{22} a_{23} a_{24} \\ a_{31} a_{32} a_{33} a_{34} \\ a_{41} a_{42} a_{43} a_{44} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \end{bmatrix} \quad (6a)$$

$a_0 = 6.01$; $a_1 =$ coeficiente del término X_1 ; $a_2 =$ coeficiente del término X_2 ; $a_3 = 0$, $a_4 =$ coeficiente del término X_4 ; $a_{11} =$ coeficiente del término X_1^2 ; $a_{22} =$ coeficiente del término X_2^2 ; $a_{33} =$ coeficiente del término X_3^2 ; $a_{44} =$ coeficiente del término X_4^2 ; $a_{12} =$

$a_{21} = \frac{1}{2}$ coeficiente del término X_1X_2 ; $a_{13} = a_{31} = \frac{1}{2}$ coeficiente del término X_1X_3 ; $a_{14} = a_{41} = 0$; $a_{23} = a_{32} = 0$; $a_{24} = a_{42} = 0$; $a_{34} = a_{43} = 0$. Luego la ecuación 6a quedaría:

$y = 6.01 +$

$$[X_1 X_2 X_3 X_4] \begin{bmatrix} 1.22 \\ 0.84 \\ 0 \\ 0.32 \end{bmatrix} + [X_1 X_2 X_3 X_4] \begin{bmatrix} -0.49 & -0.35 & -0.10 & 0 \\ 0.35 & -0.23 & 0 & 0 \\ 0.10 & 0 & 0.26 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -0.3 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ X_4 \end{bmatrix}$$

2.- Cálculo de las coordenadas del punto estacionario

$X_s = -\frac{1}{2} A^{-1} a_k$

$$\begin{array}{l} \mathbf{Ramnol\u00edpidos:} \\ \begin{bmatrix} X_{1s} \\ X_{2s} \\ X_{3s} \\ X_{4s} \\ X_{5s} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -2.51 \\ 1.26 \\ -0.07 \\ -0.57 \\ -3.84 \end{bmatrix} \end{array} \quad \begin{array}{l} \mathbf{Biomasa:} \\ \begin{bmatrix} X_{1s} \\ X_{2s} \\ X_{3s} \\ X_{4s} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -118.6 \\ -181.6 \\ 47.0 \\ 0.55 \end{bmatrix} \end{array} \text{ para ambas}$$

respuestas las coordenadas del punto estacionario est\u00e1 fuera del dominio de estudio (-2 a +2); por tanto solo puede ser aplicarse la simplificaci\u00f3n por rotaci\u00f3n de los ejes.

3.- Determinar la distancia del punto estacionario al

$$D_s^2 = \sum_{i=1}^k X_{i,s}^2 \text{ en forma matricial ser\u00eda: } D_s^2 = X_s^T X_s$$

Ramnol\u00edpidos: 4.79; **Biomasa:** 222 (distancia fuera del dominio de estudio en ambas respuestas)

4.- Valor de la respuesta en el punto estacionario

$$y = a_0 + X_s^T a_k + X_s^T A X_s$$

Ramnol\u00edpidos: $a_0 = 4.97$; $X_s^T a_k = -5.07$; $X_s^T A X_s = 2.54$; **y_s (RLs) = 2.43** (este valor no es real debido al cambio de variable).

Biomasa: $a_0 = 6.01$; $X_s^T a_k = -297.67$; $X_s^T A X_s = 148.83$; **y_s (Biomasa) = -142.87**

5.- Cambio a las nuevas variables Z_i

$X_k = M Z_k$ donde M es una matriz ortogonal ya que $M^T M = M M^T = 1$; $M^T = M^{-1}$. Los valores de M dependen de A . Para 4 factores existen 4 vectores propios con 4 componentes o valores propios cada uno.

$$\text{La matriz } M = \begin{bmatrix} m_{11} & m_{21} & m_{31} & m_{41} \\ m_{12} & m_{22} & m_{32} & m_{42} \\ m_{13} & m_{23} & m_{33} & m_{43} \\ m_{14} & m_{24} & m_{34} & m_{44} \end{bmatrix}$$

La nueva superficie de respuesta es: $y = a_0 + Z_s^T M^T a_k + Z_s^T M^T A M Z_s$, donde $M^T a_k$ son los coeficientes de los términos de primer grado; $M^T A M$ es la matriz diagonal (valores propios, es decir los coeficientes de los términos cuadráticos)

$$\text{Ramnol\u00edpidos: } M = \begin{bmatrix} -0.95 & 0.06 & -0.24 & -0.15 & -0.10 \\ 0.07 & 0.50 & -0.09 & -0.56 & 0.65 \\ 0.23 & -0.11 & -0.27 & -0.71 & -0.59 \\ 0.05 & 0.85 & 0.06 & 0.24 & -0.45 \\ 0.18 & 0.03 & -0.93 & 0.32 & 0.10 \end{bmatrix}$$

$$\text{Biomasa: } M = \begin{bmatrix} -0.82 & 0.53 & -0.19 & 0 \\ 0.56 & 0.82 & -0.13 & 0 \\ 0.08 & -0.21 & -0.97 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

6.- Coordenadas del punto estacionario respecto al nuevo sistema de referencia R

$Z_k = M^T X_k$ luego $Z_s = M^T X_s$; entonces: $Z_s = -\frac{1}{2} M^T A^{-1} a_k$

$$\text{Ramnol\u00edpidos: } Z_s = \begin{bmatrix} 1.75 \\ -0.11 \\ 4.03 \\ -1.64 \\ 0.99 \end{bmatrix} \qquad \text{Biomasa: } Z_k = \begin{bmatrix} -0.40 \\ -221.9 \\ 0.59 \\ 0.55 \end{bmatrix}$$

7.- Distancia del nuevo punto estacionario Z_s

$$D_s^2 = Z_s^T Z_s$$

$$\text{Ramnol\u00edpidos: } D_s^2 = 23.00 \qquad D_s = 4.79$$

$$\text{Biomasa: } D_s^2 = 4.93 \times 10^4 \qquad D_s = 221.99$$

En las dos respuestas la distancia al origen R es la misma que al origen 0 debido a que solamente se han girado los ejes, orientándolos paralelos a la superficie de respuesta.

8.- Valor de la respuesta en el nuevo punto estacionario Z_s

$$y_s = a_0 + Z_s^T M^T a_k + Z_s^T M^T A M Z_s$$

Ramrólpidos: $a_0 = 4.97$; $Z_s^T M^T a_k = -5.08$ (término de primer orden); $Z_s^T M^T A M Z_s = 2.54$ (términos de segundo orden. Luego: $y_s = 4.97 - 5.08 + 2.54 = \mathbf{2.43}$

Biomasa: $a_0 = 6.01$; $Z_s^T M^T a_k = -304.69$ (término de primer orden); $Z_s^T M^T A M Z_s = 148.70$ (términos de segundo orden. Luego: $y_s = 6.01 - 304.69 + 148.70 = \mathbf{-149.97}$

9.- Análisis de las superficies de respuesta

En sentido general para cuatro factores:

$$\text{Según } R_1 \quad y = a_0 + (m_{11} a_1 + m_{12} a_2 + m_{13} a_3 + m_{14} a_4) Z_1 + m_1 Z_1^2$$

$$\text{Según } R_2 \quad y = a_0 + (m_{21} a_1 + m_{22} a_2 + m_{23} a_3 + m_{24} a_4) Z_2 + m_2 Z_2^2$$

$$\text{Según } R_3 \quad y = a_0 + (m_{31} a_1 + m_{32} a_2 + m_{33} a_3 + m_{34} a_4) Z_3 + m_3 Z_3^2$$

$$\text{Según } R_4 \quad y = a_0 + (m_{41} a_1 + m_{42} a_2 + m_{43} a_3 + m_{44} a_4) Z_4 + m_4 Z_4^2$$

La respuesta puede entonces ser representada en función de las nuevas variables Z_k :

Ramrólpidos:

$$\text{Según eje } R_1 \quad y = 4.967 - 3.303 Z_1 + 0.944 Z_1^2 \quad (5.1)$$

$$\text{Según eje } R_2 \quad y = 4.967 - 0.095 Z_2 - 0.422 Z_2^2 \quad (5.2)$$

$$\text{Según eje } R_3 \quad y = 4.967 + 0.371 Z_3 - 0.046 Z_3^2 \quad (5.3)$$

$$\text{Según eje } R_4 \quad y = 4.967 + 0.263 Z_4 + 0.081 Z_4^2 \quad (5.4)$$

$$\text{Según eje } R_5 \quad y = 4.967 - 0.362 Z_5 + 0.182 Z_5^2 \quad (5.5)$$

Biomasa:

$$\text{Según eje } R_1 \quad y = 6.01 - 0.528 Z_1 - 0.748 Z_1^2 \quad (6.1)$$

$$\text{Según eje } R_2 \quad y = 6.01 + 1.341 Z_2 + 0.003 Z_2^2 \quad (6.2)$$

$$\text{Según eje } R_3 \quad y = 6.01 - 0.342 Z_3 + 0.286 Z_3^2 \quad (6.3)$$

$$\text{Según eje } R_4 \quad y = 6.01 + 0.324 Z_4 - 0.296 Z_4^2 \quad (6.4)$$

10.- Identificación de las nuevas variables Z_k con las antiguas variables X_k

$$X_k = M Z_k \quad Z_k = M^{-1} X_k = M^T X_k$$

Para cuatro factores:

$$Z_1 = m_{11} X_1 + m_{12} X_2 + m_{13} X_3 + m_{14} X_4 \quad Z_2 = m_{21} X_1 + m_{22} X_2 + m_{23} X_3 + m_{24} X_4$$

$$Z_3 = m_{31} X_1 + m_{32} X_2 + m_{33} X_3 + m_{34} X_4 \quad Z_4 = m_{41} X_1 + m_{42} X_2 + m_{43} X_3 + m_{44} X_4$$

Ramnolípidos:

$$Z_1 = - 0.952 X_1 + 0.072 X_2 + 0.235 X_3 + 0.052 X_4 + 0.177 X_2^2 \quad (5.1.1)$$

$$Z_2 = 0.063 X_1 + 0.503 X_2 - 0.108 X_3 + 0.855 X_4 + 0.026 X_2^2 \quad (5.2.2)$$

$$Z_3 = - 0.242 X_1 - 0.093 X_2 - 0.268 X_3 + 0.067 X_4 - 0.926 X_2^2 \quad (5.3.3)$$

$$Z_4 = - 0.146 X_1 - 0.558 X_2 - 0.714 X_3 + 0.238 X_4 + 0.318 X_2^2 \quad (5.4.4)$$

$$Z_5 = - 0.103 X_1 + 0.650 X_2 - 0.593 X_3 - 0.453 X_4 + 0.100 X_2^2 \quad (5.5.5)$$

Biomasa:

$$Z_1 = - 0.823 X_1 + 0.562 X_2 + 0.085 X_3 \quad (6.1.1)$$

$$Z_2 = 0.535 X_1 + 0.817 X_2 - 0.215 X_3 \quad (6.1.2)$$

$$Z_3 = - 0.190 X_1 - 0.215 X_2 - 0.973 X_3 \quad (6.1.3)$$

$$Z_4 = X_4 \quad (6.1.4)$$