



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

**“Biosurfactante de *Bacillus subtilis* DS03: propiedades y
aplicación en sistemas de limpieza “out of place” en una planta de
procesamiento de salchichas”**

TESIS DE POSTGRADO

Previo a la obtención del Título de:

MAGÍSTER EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Presentada por:

Iana Lucia Cruz Mendoza

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2022

AGRADECIMIENTO

A Dios, la Mater, a mi director de tesis, el Dr. Jonathan Coronel. A la Dra. Fabiola Cornejo, coordinadora de la Maestría por su apoyo y guianza. A las personas y profesores que colaboraron de una u otra forma para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

Este trabajo realizado con esfuerzo por varios meses está dedicado a mi familia, en especial mis padres, mi hermano y mi abuelo. A aquellos que no pudieron compartir este logro físicamente conmigo. A Henry y Diego por ser mi compañía en momentos de tribulación y a mi querida Chimi que me acompaña desde el cielo.

TRIBUNAL DE TITULACIÓN

**Ángel Ramírez M., Ph.D.
DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE**

**Jonathan Coronel, Ph.D.
DIRECTOR DE TESIS**

**Diana Coello M., MSc.
CO-DIRECTOR DE TESIS**

**Arturo Palacios., Ph. D.
VOCAL**

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta tesis de grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual del mismo a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

Iana Lucia Cruz Mendoza

RESUMEN

Los surfactantes biológicos (SB) son moléculas anfifílicas que se alinean en la interfase reduciendo la tensión superficial. La producción de surfactantes biológicos se desarrolla como una alternativa a los tensioactivos sintéticos porque son biodegradables, con baja toxicidad y alta especificidad. El presente estudio propone utilizar un extracto crudo de biosurfactante (BCE) como parte de productos de limpieza y sanitización. La investigación se basó en estudiar la producción de BCE a partir de *Bacillus subtilis* DS03 utilizando como mejor sustrato a la melaza, representando una alternativa de fuente de carbono económica. El producto BCE se caracterizó por diferentes pruebas físicas y químicas bajo un amplio rango de pH, altas temperaturas y propiedades emulsionantes mostrando resultados exitosos. La tensión superficial del agua de 72 mN/m se redujo a 34 mN/m con BCE, logró una concentración micelar crítica de 24,66 ppm. BCE también se aplicó a la superficie de poliestireno como pretratamiento para evitar el desarrollo de biopelículas microbianas, mostrando inhibición en más del 90 % de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* por encima de 2000 ppm BCE. La prueba continuó usando BCE como post-tratamiento para remover biopelículas, reportando una reducción significativa de 50,10% *Escherichia coli*, 55,77% *Staphylococcus aureus* y 59,44% *Listeria monocytogenes* en una concentración superior a 250 ppm BCE. Finalmente, se realizó un experimento de comparación entre el lauril éter sulfato de sodio (SLES) y el BCE (incluido en la formulación comercial), reportándose una reducción eficiente con las mezclas. Los resultados sugirieron que BCE es un ingrediente prometedor para formulaciones de limpieza con aplicaciones en aplicaciones industriales de alimentos.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS.....	IV
SIMBOLOGÍA	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Descripción del problema	2
1.2 justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos	4
CAPÍTULO 2	
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Actividades de limpieza	5
2.2 Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS):.....	6
2.3 Agentes de limpieza	7
2.4 Compuestos biológicos.....	7
2.5 Métodos de Análisis	8
CAPÍTULO 3	
3. METODOLOGÍA.....	9
3.1 Compuestos activos de estudio.	9
3.2 Producción del extracto crudo de biosurfactante.....	9
3.3 Evaluación de propiedades fisicoquímicas de BCE	10
3.4 Estabilidad de SB a diferentes pH y temperatura.....	10
3.5 Ensayo antiadherencia sobre superficie de poliestireno	10
3.6 Actividad antimicrobiana de BCE: curva de letalidad	11
3.7 Diseño del sistema de limpieza fuera de lugar (COP) utilizando BCE.....	11
3.8. Análisis Estadístico.....	13

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS	14
4.1. Producción de biosurfactante	14
4.2. Propiedades fisicoquímicas y biológicas del BCE	16
4.3. Ensayo de antiadherencia sobre superficie de poliestireno	21
4.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana	24
4.5. Evaluación de BCE en un proceso de limpieza fuera de lugar (COP).....	26

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	30
5.1 Conclusiones	30
5.2 Recomendaciones	31

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

BCE	Extracto Crudo Biosurfactante
BOE	Extracto Orgánico Biosurfactante
CMC	Concentración Micelar Crítica
COP	Cleaning Out of Place
EPA	Environmental Protection Agency
ETA	Enfermedades Transmitida por Alimentos
GRAS	Generally Recognized as Safe
LP	Lipopéptidos
MMI	Medio Mineral Inicial
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PAA	Peroxiacetic Acid
QAC	Quaternary Ammonium Compounds
SB	Surfactante Biológico
SLES	Lauril Éter Sulfato Sódico
LSD	Least Significant Difference

SIMBOLOGÍA

°C	Grados centígrados
g	Gramos
L	Litros
m	Metro
mN	Milnewton
mg	Miligramos
O	Oil
p	Peso
Rf	Retardation Factor
μ	Micro
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
v	Volumen
W	Water
xg	Fuerza Centrifuga

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 4.1	Producción de tensión superficial, biomasa y extracto crudo de biosurfactante en glucosa, melaza, suero y almidón por crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> DS03..... 15
Figura 4.2	Evolución temporal de la producción de extracto crudo de biosurfactante, tensión superficial, producción de biomasa en medio de melaza por <i>B. subtilis</i> DS03..... 16
Figura 4.3	Tensión superficial vs. Temperatura..... 17
Figura 4.4	Tensión superficial vs. pH..... 18
Figura 4.5	Concentración micela crítica de extracto crudo de biosurfactante (BCE)..... 20
Figura 4.6	Concentración micela crítica de extracto orgánico de biosurfactante (BOE)..... 20
Figura 4.7	Respuesta de inhibición de la adherencia utilizando BCE en el pretratamiento..... 21
Figura 4.8	Respuesta de inhibición de la adherencia utilizando BCE en el pretratamiento para concentraciones bajas..... 22
Figura 4.9	Respuesta de inhibición de la adhesión utilizando BOE en el postratamiento..... 23
Figura 4.10	Respuesta de inhibición de la adhesión utilizando BOE en el postratamiento para concentraciones bajas..... 23
Figura 4.11	Reducción de la viabilidad celular (UFC/mL) vs. Tiempo..... 25
Figura 4.12	Perfil aerobio mesofílico de cuchillos, molino, cortador, embutidor y rebanador utilizados durante la producción de salchichas..... 28
Figura 4.13	Perfil de coliformes totales de cuchillos, molino, cortador, embutidor y rebanador utilizados durante la producción de salchichas..... 29

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 3.1 Formulación de salchichas producida en el laboratorio de procesamiento de carne.....	12

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos procesados deben pasar por muchas etapas antes de llegar al consumidor final. Durante todo este proceso, algunos factores pueden afectar su seguridad alimentaria. Estos peligros representan un factor que potencialmente puede causar daño al consumidor, y se pueden clasificar según su naturaleza en tres categorías principales: físicos, biológicos y químicos. Los peligros físicos se refieren a cualquier objeto que pueda o no formar parte del propio producto pero que no se considere presente en su presentación final. El peligro químico se refiere a la presencia de bajas concentraciones de herbicidas, insecticidas, detergentes, lubricantes y otros productos químicos comúnmente utilizados en actividades industriales y de postcosecha que potencialmente pueden dañar la salud del consumidor.

La industria alimentaria se preocupa principalmente por los peligros biológicos porque representa la amenaza inmediata más importante para la seguridad alimentaria del consumidor. Este peligro puede provenir de la presencia de bacterias, virus y parásitos patógenos. En las bacterias, la ingestión de alimentos contaminados puede provocar una infección o intoxicación (Chatterjee & Abraham, 2018). En cualquier caso, los consumidores pueden presentar síntomas como fiebre, dolor de estómago, dolor de cabeza y dependiendo de la bacteria; incluso puede resultar en hospitalización y muerte. Los patógenos más comunes de la industria alimentaria son *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella spp.*, *Escherichia coli* O157: H7, *Vibrio spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus* (Tao et al., 2020; Wang et al., 2019b).

Todo lo mencionado anteriormente representa una amenaza significativa para la salud humana y la seguridad alimentaria. El mecanismo principal de contaminación microbiana son las prácticas antihigiénicas entre los manipuladores de alimentos. Además, la utilización de agua no potable con varios patógenos puede contaminar los alimentos cuando se usa agua cruda como agente de limpieza. Finalmente, el contacto directo con equipos sucios puede provocar la propagación de microorganismos a lo largo de toda la línea de procesamiento y representar una amenaza significativa para la seguridad alimentaria (Bintsis, 2017).

Las principales actividades para preservar la seguridad alimentaria en la industria son la limpieza y desinfección de los equipos en contacto directo con los alimentos. Los procesos de limpieza y sanitización tienen como objetivo final controlar los riesgos por patógenos. Luego de un proceso de limpieza normal en donde se eliminan los primeros factores de riesgo como amenazas físicas se aplican productos con capacidad antimicrobiana o sanitizantes para asegurar la eliminación de cualquier riesgo microbiológico debido a residuos sobre las superficies de contacto utilizadas en la industria (Obe et al., 2020; Potter et al., 2012). Generalmente, para este proceso se utilizan ciertos compuestos químicos que deben estar aprobados por una organización internacional para su uso en la industria alimentaria (Donaghy et al., 2019).

Los desinfectantes más comunes son el cloro, los compuestos de amonio cuaternario (QAC) y el ácido peroxiacético (PAA) (Korany et al., 2018a). A pesar de que logran el objetivo final y eliminan los patógenos, se han realizado estudios que demostraron que podrían representar una amenaza para el medio ambiente (Ferk et al., 2007; Jardak et al., 2016; Ying, 2006). Debido a la situación actual de la pandemia global de COVID 19, estos productos no solo están siendo utilizados por la industria sino por el público para desinfectar superficies que suelen estar en contacto con las personas y prevenir infecciones (Hora et al., 2020a). Son un ingrediente

esencial en más de 200 desinfectantes recomendados por la EPA de EE.UU. Durante estos tiempos (Korany et al., 2018).

1.1 Descripción del problema

El uso de compuestos QACs ha aumentado debido a la situación de la pandemia. Dentro de la lista de desinfectantes para uso en contra SARS-CoV-2 avalada por la Environmental Protection Agency's (EPA) de Estados Unidos se encuentran 430 productos de los cuales aproximadamente la mitad poseen como compuesto principal activo QACs (Hora et al., 2020b). Los residuos de estos productos se han encontrado en aguas residuales domésticas y lodos, pero lo preocupante es que se han detectado residuos en afluentes de aguas tratadas, aguas superficiales y sedimentos. Si la concentración residual de QACs es elevada puede ser fulminante para los microorganismos presentes. De igual forma, existe una gran preocupación por la posibilidad de que esos residuos ayuden a la evolución de "superbugs" o bacterias resistentes a diversas drogas (Morrison et al., 2019)

El efecto residual también ha sido analizado en la aparición de productos secundarios como las N-Nitrosaminas. Estos compuestos se producen en la etapa final del tratamiento de agua al estar en contacto residuos de amonio con cloro (Piazzoli et al., 2018). Las N-Nitrosaminas son cancerígenas y representan un riesgo para la salud pública (Sang et al., 2019). Finalmente, una de las consecuencias que afectan directamente al medio ambiente es el efecto tóxico de estos residuos para los sistemas acuáticos y los organismos presentes en el suelo (Cruz et al., 2021; Mo et al., 2020). La toxicidad de QACs en algas aumenta con el tiempo y la concentración. De manera general, existe evidencia de que hay riesgos en cuanto a la presencia de residuos de QACs y el incremento en el uso de estos compuestos en los productos de consumo diario y masivo puede tener un gran impacto a largo plazo en el medio ambiente y la salud de los consumidores (Cruz et al., 2021; Dewey et al., 2021; Hora et al., 2020b)

1.2 Justificación del problema

La industria trata de innovar en nuevos compuestos de origen biológico que puedan reemplazar los compuestos peligrosos más comunes y proporcionar el mismo efecto deseado: la actividad antimicrobiana que puede ayudar a eliminar o disminuir cualquier peligro biológico potencial. El uso de compuestos biológicos como surfactantes biológicos, ácido peroxiacético, enzimas y aceites esenciales como productos sanitizantes ha sido ampliamente estudiado y se busca cambiar el impacto en la industria a partir del uso de estos (Al-Rousan et al., 2018; Boucher et al., 2021; Ribeiro et al., 2020; Tirloni et al., 2021; Wang et al., 2019a).

Dentro de la elaboración de productos sanitizantes eficaces se hace uso de varios componentes que cumplen funciones específicas necesarias logrando en conjunto tener una eficacia bactericida útil mientras se logran otras características tecnológicas requeridas por el mercado. Entre los compuestos principales se encuentran el cloro o el amonio cuaternario que cumplen la función bactericida del producto (Korany et al., 2018b; Morrison et al., 2019), junto con estos es común ver entre los ingredientes surfactantes tales como el lauril éter sulfato sódico (SLES) que ayudan a la remoción de partículas de suciedad facilitando así el proceso de limpieza y sanitización (Song et al., 2020). Finalmente, también se adicionan productos como el óxido de amina que funciona como estabilizante de la espuma y regulador de la viscosidad al igual que productos blanqueadores como el hidróxido de sodio que al reaccionar junto al cloro adquiere esta capacidad (Jahromi et al., 2020).

Se ha reportado que las moléculas de surfactantes biológicos (SB) muestran una excepcional actividad surfactante y emulsionante que pueden ser clasificadas por uso, propiedades y estructura química (Hassan et al., 2008). Los surfactantes biológicos tienen una concentración micelar crítica (CMC) baja y una alta estabilidad a pH, temperatura, concentraciones de sal y actividad biológica extremos (Dey et al., 2015). Del mismo modo, los SB han mostrado baja toxicidad o irritación, buena biodegradabilidad e incluso capacidad antibacteriana (Fei et al., 2020). Por lo tanto, los surfactantes biológicos se presentan como una opción adecuada para reemplazar los tensioactivos químicos. Se pueden sintetizar a partir de *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Rhodococcus spp.* y *Candida spp.* Un grupo influyente de surfactantes biológicos son los lipopéptidos (LP), producidos principalmente por el género *Bacillus*, siendo los más efectivos y eficientes, con gran interés en la industria terapéutica, cosmética y agroalimentaria (Nounou et al., 2017). La cepa productora *Bacillus subtilis* también es generalmente reconocida como segura (GRAS) por la FDA, que respalda el uso de sus subproductos como seguros y permite su uso en contacto directo con los consumidores y los alimentos (Nounou et al., 2017).

La surfactina LP producida por especies de *Bacillus* se usa para el control de biopelículas porque reduce la adhesión de bacterias patógenas a los alimentos en contacto con polipropileno (Mohsin et al., 2021; Théâtre et al., 2021). Por ejemplo, (Coronel-León et al., 2016a) demostraron que la LP producida por *Bacillus licheniformis* impidió la adherencia de microorganismos patógenos sobre superficies de polipropileno. A pesar de las excelentes ventajas y propiedades que ofrece el surfactante biológico, su uso comercial en la actualidad se encuentra limitado principalmente por problemas relacionados con los costos de producción (Mohanty et al., 2021). Por lo tanto, se han promovido estrategias que consideran los residuos y subproductos alimentarios agroindustriales (Balasubramani et al., 2022). Otro aspecto importante está relacionado con la pureza del compuesto de base biológica. En este contexto, la industria farmacéutica exige una pureza de los compuestos superior al 90%, mientras que para aplicaciones agroalimentarias los rangos pueden variar entre el 50-60% (Valenzuela Ruiz et al., 2020). Por lo tanto, esta investigación tiene como objetivo reportar la producción de un extracto crudo biosurfactante (BCE) de *Bacillus subtilis* DS03, utilizando un medio económico basado en un subproducto agroindustrial. Luego, se evaluarán las características físicas y químicas del BCE y su estabilidad bajo diferentes condiciones operativas. Además, se estudió la actividad biológica frente a *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. Finalmente, el BCE fue evaluado como un potencial sanitizante en sistemas abiertos de limpieza en un laboratorio de procesamiento de carne.

1.3 Objetivos

Objetivo General

Evaluar las características de las moléculas de surfactante biológico obtenido de *Bacillus subtilis* DS03 y su potencial aplicación como sanitizante en sistemas abiertos de limpieza en un laboratorio de procesamiento de carne.

Objetivos Específicos

1. Obtener extracto crudo de surfactante biológico producido por *Bacillus subtilis* DS03 utilizando como fuente de carbono melaza, suero de leche y almidón de yuca.
2. Evaluar las propiedades fisicoquímicas como estabilidad a diferentes temperaturas y pH, actividad emulsificante, concentración micelar crítica y capacidad antiadherente del extracto crudo del surfactante biológico.
3. Analizar la actividad antimicrobiana del surfactante biológico frente a *E. coli* ATCC 11775, *S. aureus* ATCC 12600 y *L. monocytogenes* ATCC 1911 y su efectividad en un sistema de limpieza COP en un laboratorio de procesamiento de carnes.

CAPÍTULO 2

2. MARCO TEÓRICO

Es importante tener en cuenta ciertos conceptos que ayuden a visualizar la importancia de la investigación e innovación en productos de limpieza enfocándolos directamente con su uso directo dentro de la industria de alimentos. Al ser un proceso tan sensible y de vital importancia, el uso de sanitizantes y desinfectantes no sólo representan un costo importante para la industria, sino que también uno de sus mayores contaminantes. Esta relación dual es la que permite enfocar esta investigación en la importancia de incluir estrategias de sostenibilidad al desarrollo de este tipo de productos para poder cumplir con las nuevas demandas y objetivos de la industria.

2.1 Actividades de limpieza

2.1.1 Sanitización

Dentro de las actividades principales en la industria de alimentos se encuentra el proceso de sanitización, la misma fue creada para asegurar la inocuidad de los alimentos y no representen un peligro para la salud de los consumidores. La sanitización es una ciencia aplicada que busca el diseño de prácticas y procesos que permitan mantener el ambiente de producción, procesamiento, preparación y almacenamiento de alimentos de una manera limpia e inocua (Marriott et al., 2018a)

Sus objetivos principales son:

1. Proveer alimentos sanos que se almacenen, procesen, transporten, preparen, comercialicen, y se vende en un medio ambiente limpio.
2. Prevenir la contaminación por peligros biológicos, químicos o físicos que causan enfermedades transmitidas por los alimentos.
3. Minimizar la proliferación del deterioro de los alimentos provocado por microorganismos. (Marriott et al., 2018b)

Para aplicar un proceso sanitización adecuado es necesario tener en cuenta que requiere de diseño, desarrollo, especificaciones de implementación que permitan ajustar el procedimiento a las necesidades específicas del producto que está siendo procesado dentro de la industria y que se encuentra en contacto con las superficies de trabajo.

Es debido a esto que, al momento de la construcción de equipos, localización de estos y demás aspectos relacionados con la producción del alimento se toman en cuenta varios factores que puedan facilitar las actividades de limpieza y sanitización. Dependiendo de estos factores como la naturaleza del material de contacto, las frecuencias de producción, la naturaleza química del producto elaborado y demás es que se escogen aquellos productos químicos y los debidos procedimientos necesarios para asegurar una correcta sanitización.

2.1.2 Sostenibilidad aplicada en la sanitización:

Debido al avance de las tecnologías y un nuevo escenario mundial donde las necesidades poblacionales se encuentran en constante cambio es necesario analizar las fallas o desventajas

de los procesos que han sido utilizados durante años y a partir de las mismas generar nuevas oportunidades que se encuentren alineadas con nuevas necesidades. A partir de esto la Organización de las Naciones Unidas (ONU) estableció la agenda 2030 que se encuentra compuesta por 17 Objetivos de Desarrollo Sostenibles (ODS) que buscan solucionar problemas mundiales de una manera cooperativa entre los gobiernos, la industria, la academia y la sociedad en general. Debido a esto se ha considerado alinear todos los esfuerzos en base a los ODS y su cumplimiento (Naciones Unidas, 2019)

Dentro de los ODS directamente relacionados con la problemática de estudios se encuentran: ciudades y comunidades sostenibles (11), producción y consumo responsable (12) y vida submarina (14). El enfoque principal de los objetivos es lograr transformar e innovar la manera en la que los procesos se realizan actualmente por una alternativa que se alinee más con el cuidado del medio ambiente y la promoción del desarrollo sostenible. Los residuos de los agentes de sanitización y desinfección pueden ser un desafío o problema en varios aspectos. Inicialmente, las características de estos como pH y su densidad pueden acelerar el proceso de degradación de los materiales con los que están hechos los equipos representando problemas económicos para la industria (Zaffora et al., 2021). Las características de ciertos materiales que son específicamente utilizados dentro de la industria alimentaria pueden verse afectadas como por ejemplo el acero inoxidable que como efecto del aumento de rugosidad debido a la corrosión puede ayudar a la adhesión de partículas orgánicas y por ende la formación de biofilms (Stoica, 2018).

2.2 Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAS):

Uno de los mayores riesgos biológicos que se pueden presentar dentro de las líneas de producción es la presencia de microorganismos patógenos. Estos microorganismos poseen características que pueden ocasionar enfermedades al consumidor. En ese aspecto es importante saber la diferencia entre una intoxicación e infección, así como el significado de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS). De acuerdo con la OMS, las ETAS son "*el conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos (por ejemplo: bacterias) o no biológicos (por ejemplo: metales pesados) en cantidades tales que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupo de personas*" (OMS, n.d.)

Una ETA específicamente puede ser una infección, una intoxicación o una infección mediada por toxina. En lo que compete aquellas que se ven relacionadas con la presencia de organismos vivos se encuentran la infección y la intoxicación mediada por toxinas (Adley & Ryan, 2016). La primera es producida cuando el ser humano consume un alimento contaminado por microorganismos patógenos vivos. Este tipo de ETA generalmente presenta síntomas como dolores de cabeza, fiebre, dolor estomacal, disentería, pero si no se trata a tiempo puede en algunos casos ocasionar la muerte dependiendo del tipo de microorganismo patógeno presente y la intensidad de la enfermedad (Pires et al., 2021)

Es importante tener en cuenta que el consumo de un solo patógeno no logra incurrir en la enfermedad, pero más bien se necesita de una cantidad suficiente para ocasionar la infección. Aparte es necesario que el alimento posea una matriz que soporte la supervivencia y crecimiento de los microorganismos, en algunos casos esto permite la producción de toxinas. Entre los 5 gérmenes que más enfermedades ocasionan transmitidos por alimentos se encuentran: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* y *Staphylococcus aureus* (CDC, n.d.)

Por otro lado, una intoxicación se da cuando en el alimento hay presencia de toxinas producidas por mohos o bacterias, las cuales son muy difíciles de eliminar por otros métodos de conservación de alimentos y pueden ocasionar enfermedades mucho más graves pues se ha demostrado la formación de toxinas que pueden afectar directamente al cerebro y al sistema nervioso provocando efectos catastróficos para el ser humano (Maresca, 2013).

2.3 Agentes de limpieza

Para llevar un correcto proceso de sanitización es necesario el uso de productos químicos, los mismos están permitidos bajo normativas específicas que establecen los parámetros para su uso. Los productos químicos sanitizantes más comunes son los hipocloritos, el dióxido de cloro, el ácido peroxiacético y los compuestos de amonio cuaternario (QACs) (Bernardi et al., 2018; Hua et al., 2019; Sethi et al., 2019) Principalmente, estos compuestos poseen la capacidad de disminuir la carga microbiana presente en superficies vivas como en superficies inertes.

El Ácido Peroxiacético (PAA) es una mezcla en equilibrio de peróxido de hidrógeno y ácido acético. Fue patentado para tratar superficies de frutas y verduras y reducir el deterioro por bacterias y hongos (Yu Neo et al., 2013). Afecta las membranas celulares de los microorganismos al romper sus enlaces químicos; también libera especies de oxígeno (ROS), que causan daños en el ADN y los lípidos (Mills et al., 2018).

Los compuestos de Amonio Cuaternario (QAC) son tensioactivos catiónicos efectivos contra una amplia gama de microbios, especialmente bacterias Gram-positivas, aunque no son tan efectivos en la fase de esporas. Su acción se basa en la actividad de las células microbianas; Los QAC desactivan la capacidad de la membrana para absorber nutrientes porque se une a los fosfolípidos ácidos en la pared microbiana (Kang et al., 2019; Korany et al., 2018b). Su aplicación varía de 100 ppm a 400 ppm; se utilizan principalmente sobre superficies en contacto con alimentos. Debido al uso diario de este compuesto, no solo como agente desinfectante algunos estudios abordan el potencial de la acumulación de sus residuos como contaminante para el medio ambiente. Estas altas concentraciones de residuos de QAC en aguas residuales y lodos pueden potencialmente convertirse en una amenaza para el ecosistema y la salud humana (Ismail et al., 2010). Varios estudios han demostrado que los QAC exhiben toxicidad para organismos acuáticos como microorganismos, invertebrados, algas y peces (Zhang et al., 2015)

El hipoclorito de sodio (NaClO) y el cloro (Cl_2) son los desinfectantes acuosos más comúnmente empleado (Zamuner et al., 2020). Las concentraciones más utilizadas son de 50 a 200 ppm según el producto que se esté desinfectando y su carga microbiana inicial. Debido a la interacción entre NaClO con los componentes orgánicos de alimentos y productos alimenticios, su uso se ha restringido debido al riesgo potencial de que estas interacciones puedan resultar en la formación de compuestos cancerígenos (Bhilwadikar et al., 2019).

2.4 Compuestos biológicos

Biosurfactantes

Los tensioactivos biológicos son moléculas anfipáticas que constan de restos tanto hidrófilos como hidrófobos. Son sintetizados por diversos microorganismos. Presentan una excelente actividad superficial, ayudando a reducir la tensión interfacial y teniendo propiedades detergentes y emulsionantes. Algunos tensioactivos biológicos también han mostrado actividad antimicrobiana, lo que puede ayudar a prevenir el deterioro de los alimentos (André et al., 2007).

Tienen algunas ventajas, como biodegradabilidad, baja toxicidad y biocompatibilidad. El surfactante más poderoso hasta la fecha es la surfactina, que es producida por *B. subtilis* (Wu et al., 2019).

Los tensioactivos biológicos se pueden usar en productos frescos como un elemento de recubrimiento natural o como un desinfectante usado para procesos de desinfección mientras se diluyen con agua en un cierto porcentaje. También pueden prevenir la formación de películas de bacterias patógenas. En 2016, de Araujo et al. evaluaron el potencial de dos tensioactivos biológicos contra la formación de películas por *L. monocytogenes* y *P. fluorescens* en diferentes tipos de superficies como acero inoxidable y poliestireno. El tratamiento con surfactina inhibe la adhesión de *P. fluorescens* al acero inoxidable en un 73%, y la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* en ambos materiales se redujo significativamente por el tratamiento con los biosurfactante.

2.5 Métodos de Análisis

Actividad emulsificante: Dentro del estudio de surfactantes biológicos esta propiedad es una de las más fundamentales (Fenibo et al., 2019). Esta propiedad permite caracterizarlos de acuerdo con el tamaño de gota después de la homogenización con otros compuestos. El tamaño de las gotas dentro de la emulsión permite evaluar la capacidad del surfactante de estar presente en mezclas con otros compuestos y esto puede representar una ventaja o desventaja dependiendo del uso final determinado para el compuesto (Reichert et al., 2018). Existen varios factores que pueden influir en el tamaño de gota dentro de la emulsión entre esas la concentración pura del surfactante utilizada en la mezcla. De igual manera, determinar la concentración necesaria de surfactante para obtener una buena emulsión es muy importante porque permite disminuir costos y ser más eficientes en el uso de los compuestos (Ozturk et al., 2014).

Concentración Micelar Crítica (CMC): Los surfactantes poseen la capacidad de tener una fracción hidrofílica y una lipofílica. Esto les da la capacidad de mezclarse con diversos tipos de compuestos y formar emulsiones. En el proceso de formación de esta nueva mezcla existen diversos fenómenos, a bajas concentraciones las moléculas de surfactante presentes dentro de una interfaz aire/agua se adsorben apuntando hacia al agua con la parte hidrofílica (cabeza) y hacia el aire con la parte lipofílica (cola), esto logra disminuir la tensión superficial del agua superando cierta concentración las moléculas comienzan a juntarse formando grupo esféricos donde la cabeza apunta hacia al agua pero la cola hacia al centro formando micelas (Pradhan & Bhattacharyya, 2018). Precisamente, este pequeño rango de variación en la concentración del surfactante que logra formar las micelas se denomina concentración micelar crítica (Pérez-Rodríguez et al., 1998)

CAPÍTULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1 Compuestos activos de estudio.

Los reactivos: dextrosa, extracto de levadura, nitrato de sodio (NaNO_3), fosfato disódico (Na_2HPO_4), fosfato monopotásico (KH_2PO_4), sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), cloruro de calcio (CaCl_2), Müller El caldo Hinton (MHB), el agar de soja tríptico (TSA), el agua de peptona y el cristal violeta se adquirieron de Merck (Merck, Alemania). Los solventes de grado analítico: cloroformo (CHCl_3), acetato de etilo ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), metanol (CH_3OH), ácido acético (33%, CH_3COOH) y ácido clorhídrico (37%, HCl) se obtuvieron de Fisher Chemicals (Fisher Scientific, Estados Unidos). Los componentes utilizados para la elaboración del producto de limpieza COP-A fueron hidróxido de sodio (NaOH), gluconato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NaO}_7$), tripolifosfato de sodio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), lauril éter sulfato de sodio (SLES) y agua desmineralizada, todos proporcionados por la empresa Chemicals Clean (Guayaquil, Ecuador). El aceite de aguacate (68 % de ácido linoleico), el aceite de soja (62 % de ácido oleico) y el aceite de coco (45 % de ácido palmítico) fueron proporcionados por una empresa comercial local, a saber, Laboratorio Cevallos (Guayaquil, Ecuador), melaza (caña de azúcar), suero de leche y almidón de yuca fueron donados por industrias locales (Molaza Tababuela, Industria Láctea Rey Lácteos y La Pradera, respectivamente). Los microorganismos *Escherichia coli* ATCC,11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 fueron adquiridos de Microbiologics (Minnesota, Estados Unidos).

3.2 Producción del extracto crudo de biosurfactante

La cepa *Bacillus subtilis* DS03 se aisló de cultivos de cacao y produjo el tensioactivo microbiano (Serrano et al., 2021). El medio utilizado para la producción de SB fue medio mineral inicial (MMI) (20 g/L dextrosa, 1 g/L de extracto de levadura, 8,5 g/L NaNO_3 , 5,7 g/L Na_2HPO_4 , 4 g/L KH_2PO_4 , 0,21 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, y 7×10^{-6} g/L CaCl_2). Se evaluaron tres fuentes alternativas de carbono para la producción de BCE: melaza, suero de leche y almidón de yuca a 20 g/L, como concentración de dextrosa en el medio de cultivo mineral inicial (MMI). Para la preparación de los medios de cultivo, las fuentes de carbono, nitrógeno y sales minerales se esterilizaron en autoclave (JP Selecta 4001759, Barcelona, España) durante 15 minutos a 121°C . Se inocularon matraces (Pyrex N°4980, VWR, USA) con 400 mL del medio de cultivo con suspensión bacteriana al 2 % v/v (turbidez 2 según estándar de McFarland) y se incubaron con agitación a 110 rpm (New Brunswick INNOVA 44R; Alemania, Hamburgo) durante 24 horas a 37°C .

Antes de retirar el BCE, las células bacterianas se retiraron del medio de cultivo mediante centrifugación a 8.000 xg durante 15 minutos a 4°C (centrífuga Avanti TM j-20; Bekman Coulter, Indianápolis, EE. UU.). Luego, los sobrenadantes libres de células se sometieron a precipitación ácida con HCl concentrado hasta alcanzar un pH de 2 y se dejaron durante la noche a 4°C en un tubo sellado (Ultracruz, EE. UU.). El BCE se recogió por centrifugación durante 20 minutos a 4°C , 11.000 xg, y se lavó dos veces con agua destilada ácida a pH 2 para eliminar cualquier

impureza. El BCE se secó en estufa (Thermo Scientific 6963, USA) a 40°C hasta obtener un peso constante y luego se cuantificó por gravimetría (g/L) (Serrano et al., 2021).

3.3 Evaluación de propiedades fisicoquímicas de BCE

Las propiedades de BCE se compararon con la fracción de extracto orgánico biosurfactante (BOE). El BOE se obtuvo de la extracción BCE con metanol (1:2 p/v). Las fases orgánicas se pasaron sobre sulfato de sodio anhidro, se concentraron en un evaporador rotatorio al vacío (Büchi, Suiza) y se pesaron. El BOE fue analizado mediante cromatografía en una columna de gel de sílice. La elución se llevó a cabo con cloroformo/metanol/hidróxido de amonio (65:35:5A). Las fracciones se recogieron en viales y se controlaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) con el mismo disolvente de elución. Luego, las fracciones se revelaron mediante ninhidrina (Sigma, St. Louis, MO) específica para el resto de aminoácido. Finalmente, las muestras que mostraron la presencia de aminoácidos y el mismo factor de retención (FR) fueron agrupadas y analizadas por medidas de tensión superficial (Coronel-León et al., 2015).

3.4 Estabilidad de SB a diferentes pH y temperatura

Se evaluó la estabilidad de BCE y BOE frente a diferentes condiciones de pH y temperatura. Se prepararon soluciones de BOE (620 ppm) y BCE (500 ppm) en 20 mL de agua destilada. Luego, se midió la actividad superficial en un tensiómetro K6 (Krüss, Hamburgo, Alemania) sometiendo las suspensiones a temperaturas de 4, 16, 26, 50, 60, 67, 75, 80, 90, 100 y 121 °C durante una hora. Asimismo, la solución se ajustó a los valores de pH 2, 3, 5, 7, 10, 11 y 13, utilizando HCl y NaOH.

Actividad emulsionante: Para BCE y BOE se evaluó la actividad emulsionante según la metodología descrita por (Coronel-León et al., 2015). Los aceites evaluados fueron aguacate, soya y coco. Los tubos se agitaron con un vortex (Vortex-Genie, Bohemia, N.Y, EE. UU.) durante 2 minutos y se dejaron reposar durante 24 horas. El índice de emulsificación (E24) se calculó por la relación entre la altura (mm) de la emulsión generada y la altura total (mm) de la mezcla, multiplicado por 100. Se utilizó agua destilada como control. El ensayo de emulsión se llevó a cabo utilizando una solución acuosa de SB de 100 ppm.

Concentración micelar crítica (CMC): La CMC del BCE y BOE se determinó a partir de una dilución madre de 620 y 500 ppm de cada compuesto, un tensiómetro Krüss K6 (Krüss, Hamburgo, Alemania), utilizando el método del anillo. Las diferentes concentraciones seriadas se prepararon en agua destilada a pH 7 en un volumen final de 20 mL. Posteriormente, se midió la tensión superficial de cada solución a 25 °C. Finalmente, se representaron gráficamente los datos de tensión superficial frente a las diferentes concentraciones. El punto de intersección de la pendiente de las dos porciones distintas del gráfico se utilizó para encontrar la CMC más allá de la cual no se observaron cambios en la tensión superficial (Romero-Peña et al., 2020).

3.5 Ensayo antiadherencia sobre superficie de poliestireno

La acción del pretratamiento de BCE se evaluó considerando tres modelos de microorganismos, *E. coli* ATCC 11775, *S. aureus* ATCC 12600 y *L. monocytogenes* ATCC 19115, que representan un problema por la formación de biofilms en las industrias cárnicas. En primer

lugar, se llenaron con 200 μL de varias concentraciones de BCE (2–4000 mg/L) las microplacas de 96 pocillos (Brand Plates, Wertheim, Alemania). Posteriormente, los microorganismos fueron inoculados en condiciones para formar biofilms utilizando el método planteado por (Coronel-León et al., 2016b). Luego, para la cuantificación de la inhibición de la adhesión microbiana, los pocillos se lavaron con agua destilada, se fijaron durante 15 minutos con metanol y se tiñeron durante 20 minutos con cristal violeta al 1% en peso. Después de lavar y secar, la mancha de los pocillos se diluyó con 200 μl de ácido acético y se determinó la absorbancia a 595 nm. Los porcentajes de inhibición de la adhesión microbiana se calcularon utilizando la Ecuación 1:

$$\text{Ecuación 1: Porcentaje de inhibición de la adhesión microbiana} = \left[1 - \left(\frac{A_c}{A_o}\right)\right] \times 100.$$

Donde A_c representa la absorbancia del micropocillo con BCE a la concentración (c), y A_o es la absorbancia del micropocillo control (ausencia de BCE). Para el postratamiento con BCE, las células microbianas adheridas se pusieron en contacto con 200 μL de diferentes concentraciones de BCE (2–4000 mg/L) y se incubaron a 25 °C durante 6 horas. La cuantificación se llevó a cabo como en el procedimiento de pretratamiento.

3.6 Actividad antimicrobiana de BCE: curva de letalidad

Se prepararon suspensiones de microorganismos con una densidad celular de aproximadamente 1×10^8 UFC/mL en agua de peptona tamponada a partir de un cultivo de crecimiento de 24 horas de cada cepa: *E. coli* ATCC 11775, *S. aureus* ATCC 12600 y *L. monocytogenes* ATCC 19115 en TSA a 30 °C. Para evaluar la actividad antimicrobiana de BCE se añadió a una concentración final de 800 ppm. El contacto entre BCE y los microorganismos se controló durante 60 minutos y los recuentos de células viables calcularon la viabilidad bacteriana en UFC/mL después de la exposición. Luego, se diluyó 10 veces en serie la suspensión bacteriana tratada, se esparcieron alícuotas de 0,1 ml en la superficie de la placa TSA y se incubaron a 37 °C durante 24 a 48 horas. Las suspensiones bacterianas de control se corrieron en paralelo. La viabilidad se calculó con la Ecuación 2, donde N es el número promedio de colonias contadas en tres placas y d es el factor de dilución (Coronel-León et al., 2017).

$$\text{Ecuación 2: Número de bacterias} = N/d$$

3.7 Diseño del sistema de limpieza fuera de lugar (COP) utilizando BCE

El potencial de BCE como producto de limpieza se evaluó mediante el diseño de un sistema abierto de limpieza en las instalaciones del laboratorio de procesamiento de carne en la planta piloto de ESPOL después de la producción de salchichas finas. La formulación de la salchicha se muestra en la Tabla 3.1. En primer lugar, se establecieron los equipos y utensilios críticos: cuchillos, molino, cortador, embutidor y rebanador. En segundo lugar, en colaboración con la empresa Chemical Cleans, se formularon tres productos para ser utilizados como agentes de limpieza después del proceso de elaboración de embutidos. El primer producto es un compuesto de referencia, denominado COP-A, descrito anteriormente. Para el producto COP-B se sustituyó el SLES por BCE al 5% v/v, manteniendo constante el resto de los ingredientes (gluconato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NaO}_7$), tripolifosfato de sodio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) y agua desmineralizada). Finalmente, el producto COP-C contiene BCE (5%) y agua desmineralizada. Los productos se evaluaron como parte de un proceso COP al 3 % v/v durante siete minutos recomendado por Chemicals Clean.

Tabla 3.1
Formulación de salchichas producida en el laboratorio de procesamiento de carne.

Materia Prima	% Composición
Cerdo	40
Res	20
Grasa	15
Cuero de cerdo	15
Proteína Aislada de soya	5
Nitritos	1
Condimentos	4

Fuente: Autor

3.7.1 Descripción del método de limpieza COP

Una vez establecidos los productos y las condiciones de aplicación, se procedió al proceso de limpieza, comenzando con el desmontaje de las partes móviles de los equipos y utensilios antes descritos. Posteriormente, los residuos orgánicos fueron barridos y se realizó el enjuague inicial a temperatura ambiente. A continuación, se aplicó la solución de limpieza y se realizó un lavado mecánico con esponjas y cepillos. Finalmente, se aplicó el enjuague final para eliminar restos de carne y detergente. Posteriormente, se realizó la verificación microbiológica.

3.7.2. Verificación microbiológica

Las muestras se analizaron microbiológicamente según los métodos propuestos por la normativa regional N° 461-2007/MINSA. Las muestras se tomaron después de la producción de salchichas para la carga microbiana inicial y después de los procedimientos de limpieza con los diferentes productos de limpieza. Después de la limpieza, se tomaron muestras al azar de varios puntos de las superficies. Cada muestra se tomó hisopando 100 cm² de la parte más crítica del equipo y utensilios: cuchillos, molino, cortador, embutidor y rebanador. Los hisopos con las muestras se colocaron en 10 mL de agua peptonada y se mezclaron durante dos minutos para liberar los microorganismos presentes. Para evaluar la eficiencia del proceso COP, se cuantificaron los microorganismos aeróbicos mesófilos viables y las coliformes totales utilizando métodos de conteo rápido (Compact Dry Nissui). Los resultados se expresaron como logaritmo de unidades formadoras de colonias (UFC)/cm². Además, la reducción de la carga microbiana se calculó mediante la Ecuación 3, donde Ci es el valor promedio de la muestra inicial antes del tratamiento y Cfm es el valor promedio de la muestra final después del tratamiento, ambos informados en log UFC/cm².

$$\text{Ecuación 3: Porcentaje de reducción de carga microbiana} = [(Ci - Cfm)/Ci] * 100 \quad (3)$$

3.8. Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico Statgraphics (USA, 2009). Se usaron estadísticas descriptivas para observar tendencias en el conjunto de datos, y todos los resultados se representaron como el promedio de tres experimentos independientes con su desviación estándar correspondiente. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95% para evaluar la reducción de la carga microbiana en las superficies utilizando las diferentes soluciones. Se realizó la prueba de Fisher de la Diferencia Mínima Significativa (LSD) al 95% de confianza para analizar qué grupos podían presentar diferencias significativas.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS

4.1. Producción de biosurfactante

En trabajos anteriores, se identificó a *B. subtilis* DS03 de cultivos de cacao para producir un extracto orgánico con alta actividad superficial. Una evaluación preliminar mostró que la producción de BCE se vio afectada por la fuente de carbono (p. ej., $C_6H_{12}O_6$), la fuente de nitrógeno (p. ej., $NaNO_3$) y las sales de fosfato (p. ej., Na_2HPO_4 y KH_2PO_4) (Serrano et al., 2021). Este estudio evaluó tres fuentes alternativas de carbono para la producción económica de BCE (es decir, almidón de yuca, suero y melaza) de acuerdo con un nuevo enfoque sostenible del proceso biotecnológico. Todas las fuentes de carbono alternativas contenían monosacáridos (es decir, glucosa y fructosa), disacáridos (p. ej., sacarosa y lactosa) y polisacáridos (p. ej., almidón).

El efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción de BCE, la tensión superficial y la biomasa se muestran en la Figura 4.1. En el medio con almidón de yuca (glucosa como componente mayoritario), se promovió significativamente el crecimiento de la cepa DS03 (1,1 g/L) en comparación con otros medios. Sin embargo, la producción de BCE fue limitada (0,08 g/L) y la tensión superficial fue la más alta (68 ± 1 mN/m), lo que indica una baja riqueza de SB en BCE. *Bacillus* DS03 en el medio con suero de leche (lactosa) mostró un crecimiento de 0,66 g/L y la producción de BCE más insuficiente ($0,045 \pm 0,1$ g/L) de todos los medios, con una tensión superficial de 49 mN/m, que fue menor en comparación al medio de almidón. La producción con melaza (es decir, rica en sacarosa, fructosa y glucosa) mostró la reducción más significativa en la tensión superficial (35 mN/m) que los otros medios, similar a la glucosa (en promedio $33,5 \pm 1$ mN/m). Además, la melaza en el crecimiento bacteriano reportó un aumento significativo en comparación con la glucosa y el suero, y se observó la mayor producción de BCE ($0,85 \pm 0,05$ g/L) incluso en comparación con el control ($0,618 \pm 0,04$).

La disminución de la tensión superficial fue significativa con *Bacillus* DS03 (35 mN/m) en comparación con un surfactante biológico producido por cepas de *Lactobacillus* (41,90 mN/m) también obtenido con melaza (Mouafo et al., 2018). Se informa que los tensioactivos adecuados disminuyen la tensión superficial a 35 desde 72 mN/m (Santos et al., 2016), lo que indica que *Bacillus* DS03 tuvo eficacia en la interfase. En comparación con la glucosa y otras fuentes de carbono, el incremento en la producción de BCE con la melaza se debió al contenido significativo de azúcar, minerales y vitaminas del sustrato. Estos resultados coincidieron con la producción eficiente de surfactante biológico a partir de *Bacillus subtilis* (Fonseca et al., 2007; Heryani & Putra, 2017a; Sharma et al., 2020; Valenzuela Ruiz et al., 2020). Por otro lado, la relación entre el crecimiento microbiano y la producción de BCE utilizando un medio que contiene melaza como fuente de carbono, $NaNO_3$ como fuente de nitrógeno y sales de fosfato (Na_2HPO_4 y KH_2PO_4) se muestra en la Figura 4.2

La fase de latencia duró alrededor de 9 horas, y esto se debe a que la melaza es un sustrato complejo. Posteriormente, la fase de crecimiento exponencial comenzó desde la hora 9 hasta la hora 15; simultáneamente, se evidenció una disminución significativa en la tensión superficial (67–53 mN/m). Después de 27 horas, se alcanzó la producción máxima de BCE (0,012–0,152 g/L) mientras que la tensión superficial disminuyó a su punto más bajo, 28,7 mN/m. Dado que esta relación ocurrió dentro de la fase estacionaria, se sugiere que BCE corresponde a un metabolito secundario. Sin embargo, es fundamental tener en cuenta que la tendencia de crecimiento de la cepa vuelve a aumentar después de 27 horas; este patrón podría estar asociado

con la compleja composición de la melaza. El comportamiento encontrado aquí es similar al descrito por (Coronel-León et al., 2016a), donde se observó la producción de liquenisina a partir de cepas de *B. licheniformis*. Durante la fase exponencial (12 a 36 horas), la producción de liquenisina aumentó proporcionalmente con el crecimiento microbiano y la reducción de la tensión superficial.

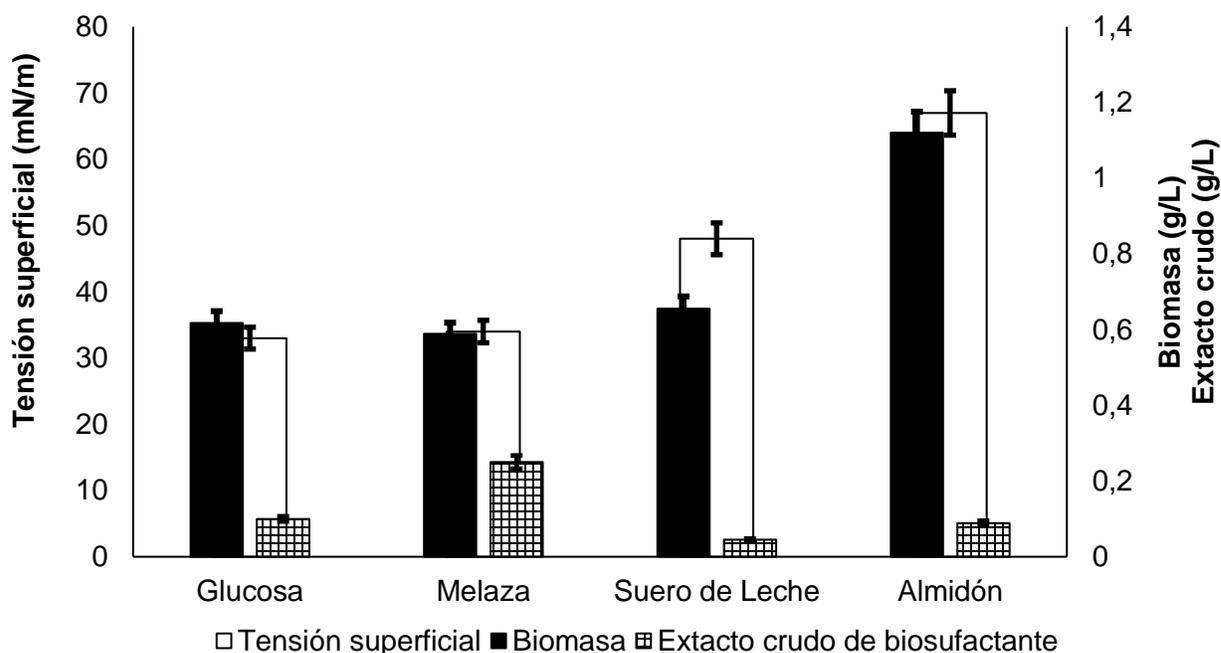


Figura 4.1 Producción de tensión superficial, biomasa y extracto crudo de biosurfactante en glucosa, melaza, suero y almidón por crecimiento de *Bacillus subtilis* DS03.

Fuente: Autor

Por lo tanto, el uso de residuos o subproductos agroindustriales como materia prima reducirá los costos iniciales. La melaza tiene 40–60% en peso de azúcares y aportan varios aminoácidos, vitaminas y sales inorgánicas. Por esta razón, los resultados de producción encontrados con *B. subtilis* DS023 están asociados con la composición de la melaza. Sin embargo, este resultado de producción no es una regla general. La utilización preferida de la fuente de carbono puede variar entre diferentes cepas de *Bacillus* spp., lo que puede atribuirse a diferencias en los niveles moleculares, según (Gaur et al., 2022).

Asimismo, la evidencia científica sugiere que la disponibilidad de azúcares hexosas y pentosas, como las mencionadas anteriormente, ayudan a determinar el patrón de crecimiento y la concentración de producción de surfactante por cepas de *Bacillus* (Sharma et al., 2020). También se ha demostrado que una alta concentración inicial de azúcar ayuda a minimizar los costos. En este término, *Bacillus* puede procesar altas concentraciones de glucosa, de ahí la posibilidad de utilizar fuentes de carbono con un porcentaje significativo de azúcar en su composición (Fonseca et al., 2007; Heryani & Putra, 2017b).

La melaza es una fuente esencial para la obtención de tensioactivos microbianos; sin embargo, es necesario mencionar que su uso también implica el desarrollo de estrategias adicionales para la purificación del producto. Estas técnicas incluyen diálisis, microfiltración y adsorción, que deben investigarse más a fondo para una mejor separación de los bioproductos de los medios de melaza complejos. Sin embargo, el grado de purificación del surfactante microbiano (SM) depende de la aplicación final de estos compuestos. Así, esta investigación se enfoca en BCE y sus propiedades descritas en la siguiente sección para desarrollar un proceso económico (Miljana Djordjević et al., 2019)

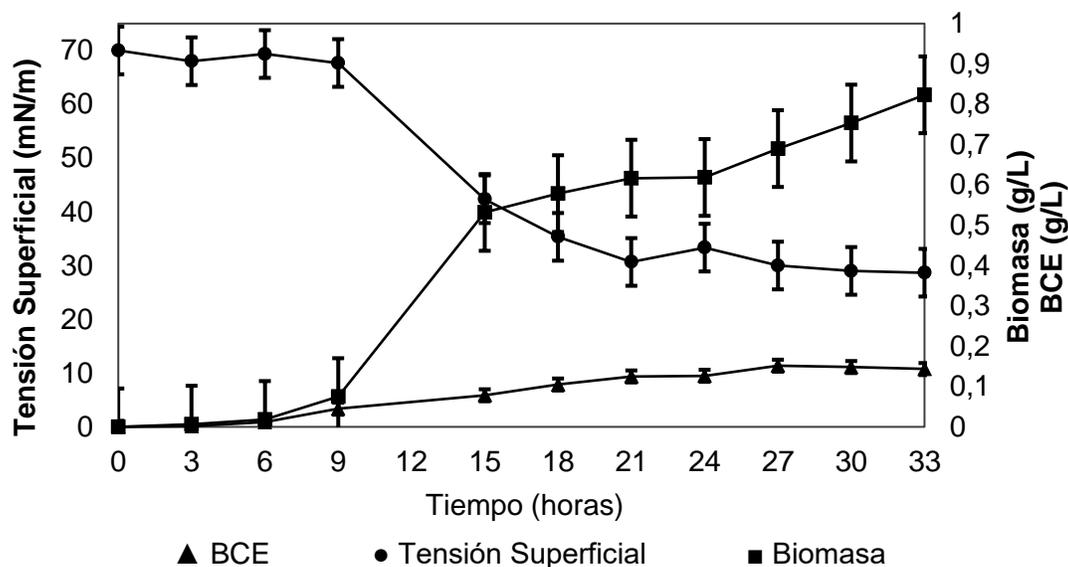


Figura 4.2 Evolución temporal de la producción de extracto crudo de biosurfactante, tensión superficial, producción de biomasa en medio de melaza por *B. subtilis* DS03.

Fuente: Autor

4.2. Propiedades fisicoquímicas y biológicas del BCE

El extracto orgánico biosurfactante (BOE) se obtuvo utilizando metanol, obteniendo una recuperación de 0,052 g/L. La purificación de BOE también se realizó mediante la técnica de cromatografía en columna a partir del extracto orgánico, a partir del cual se obtuvieron tres fracciones purificadas (BOE1, BOE2 y BOE3) y se agruparon en función de su polaridad. Las fracciones purificadas presentan valores de R_f BOE1 = 0,89, R_f BOE2 = 0,38 y R_f BOE3 = 0,12. En cuanto a la disminución de la tensión superficial de control (70 mN/m), BOE1 y BOE3 provocan una disminución de 45 mN/m y 53 mN/m, respectivamente. Por otro lado, la fracción BOE2 disminuyó la tensión superficial de 70 a 29 mN/m. Por lo tanto, la fracción que redujo la tensión superficial a más de 20 mN/m fue BOE2, y esta fracción se utilizó para comparar la estabilidad y las propiedades fisicoquímicas con el producto BCE.

4.2.1. Efecto del pH y la temperatura en la acción de BCE

Propiedades como la reducción de la tensión superficial son esenciales para la aplicación de BCE en sistemas de limpieza; por lo tanto, se evaluó a varios pH y temperaturas. La disminución del valor de la tensión superficial para BCE y BOE2 fue de 34 mN/m y 30 mN/m, respectivamente. Como se ve en la Figura 4.3, la tensión superficial de BCE y BOE2 se mantuvo constante en el rango de temperatura evaluado (4–121 °C). Permaneció estable hasta una temperatura de esterilización (121 °C). Por otro lado, la Figura 4.4 muestra que a medida que el pH aumentó de 6 a 14, la tensión superficial de BCE y BOE2 se mantuvo estable. En el caso de BCE, se observó un aumento significativo de la tensión superficial (59 mN/m) en condiciones ácidas (por debajo de pH 4). Corrobora la resistencia de los surfactantes biológicos al mantener su efectividad en condiciones extremas (Karlapudi et al., 2018).

Por ejemplo, el lipopéptido producido por *Nesterenkonia* sp. MSA31 es termoestable en rangos de temperatura entre 4 y 121 °C y a un pH de 6,0 a 9,0. Estas propiedades son adecuadas para las industrias de helados y cosméticos (Kiran et al., 2017). Además, el lipopéptido microbiano aislado de *Pontibacter korlensis* SBK-47 mostró estabilidad en un amplio rango de pH (4–10) y temperaturas de hasta 100 °C (Balan et al., 2016). Al mismo tiempo, (Hentati et al., 2019) informó que SM de *Bacillus stratosphericus* FLU5 mantuvo una tensión superficial constante (en promedio 35,5 mN/m) en un amplio rango de pH (2,1–12) y cubrió un amplio rango de temperatura (4–121 °C). Se sabe que el SB obtenido de *B. paralicheniformis* presenta estabilidad incluso después de esterilizarlo en autoclave a 121°C durante 20 min y mantenerse en almacenamiento durante 6 meses a -18 °C, mostrando una actividad superficial estable a pH entre 5 y 11 (Ahire et al., 2020).

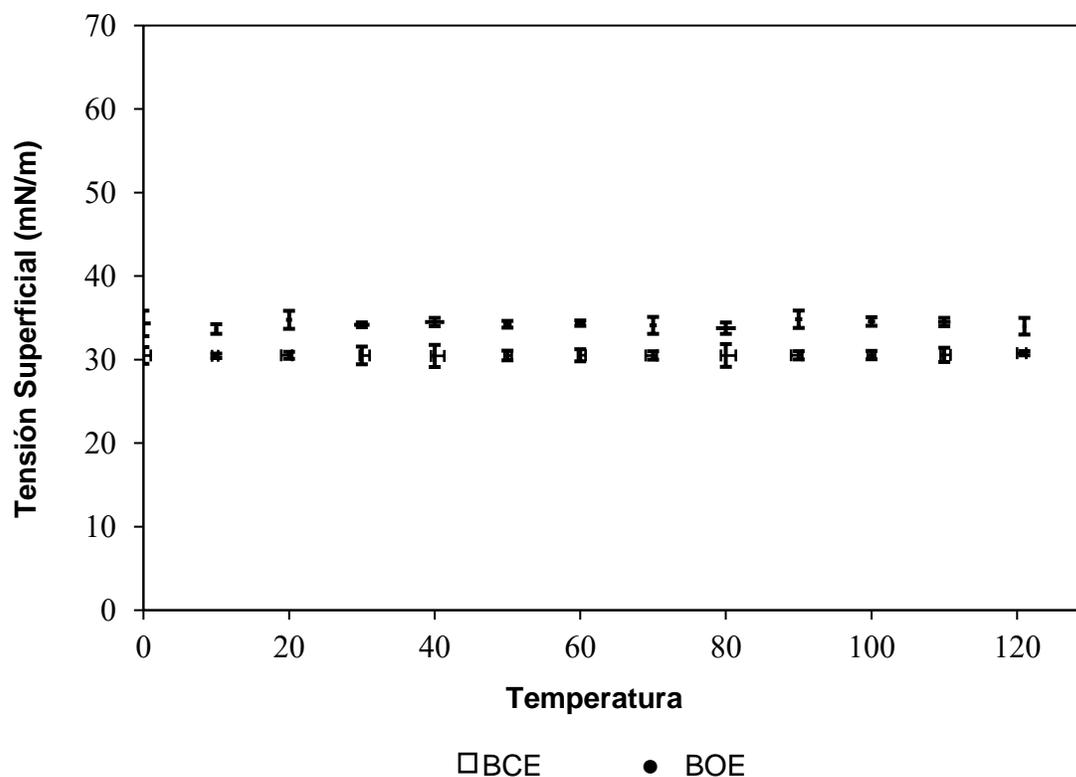


Figura 4.3 Tensión superficial vs. Temperatura.

Fuente: Autor

El amplio rango de pH observado y la temperatura frente a la estabilidad de la tensión superficial de BCE y BOE2 sugieren una buena compatibilidad en diversas aplicaciones industriales. Específicamente, productos de limpieza utilizados en los hogares y las industrias generalmente están sujetos a 25–60 °C y pH 7,0–11,0. Por lo tanto, esto sugiere que BOE2 y BCE son ingredientes prometedores termoestables y tolerantes al pH para formulaciones de limpieza (Fei et al., 2020). De manera similar, (Schultz & Rosado, 2020) describieron que la estabilidad del producto más limpio es esencial para los procesos industriales asociados con condiciones extremas de pH, temperatura y fuerza iónica.

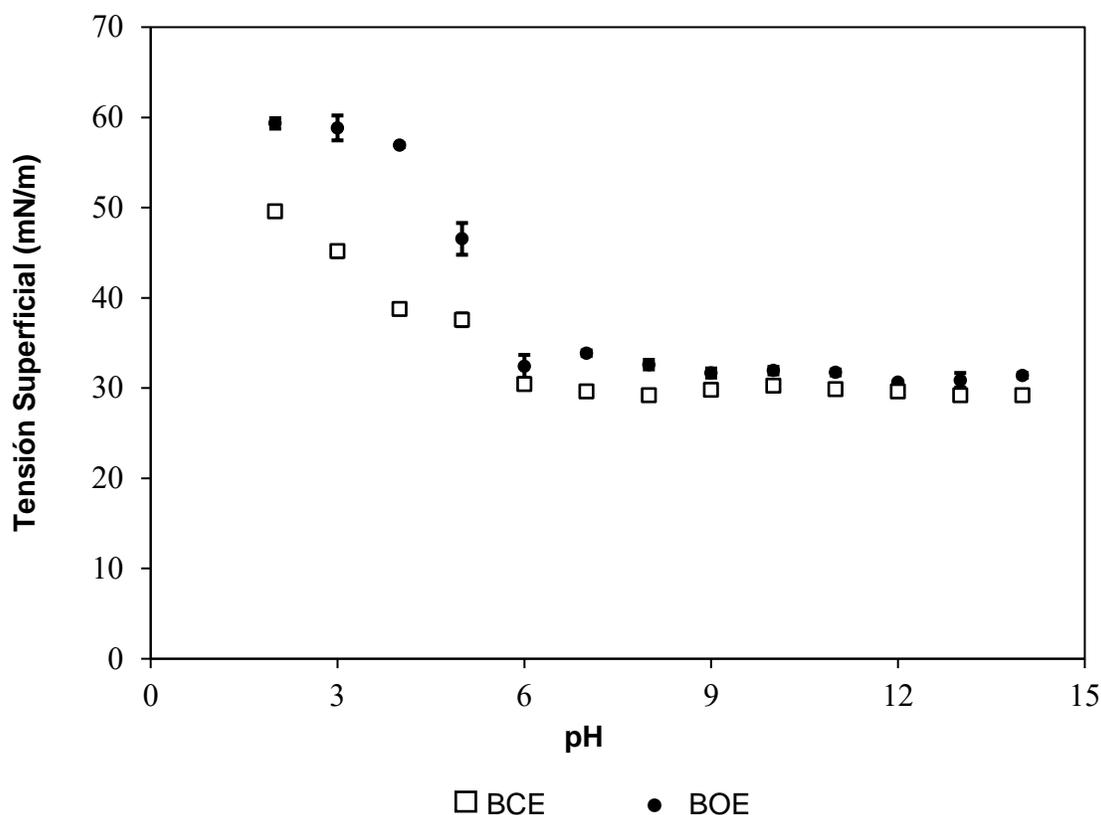


Figura 4.4 Tensión superficial vs. pH

Fuente: Autor

4.2.2. Actividad emulsionante

Cuando una solución que contenía BCE y BOE2 (por separado) estuvo en contacto con diferentes aceites, se encontró que ambos compuestos podían formar emulsiones estables con aceites de aguacate (68 % de ácido linoleico), soja (62 % de ácido oleico) y coco (45% de ácido palmítico). El índice de emulsificación (E24) con BCE fue superior al 80%, con todos los aceites estudiados. Mientras que, para BOE2, el índice de emulsificación con los aceites de aguacate, soja y coco fue de 98%, 95% y 81%, respectivamente. El índice de emulsificación designa la fuerza del tensioactivo para evitar la separación de fases (Suryanti et al., 2017). El BCE y el BOE2 actuaron sobre la mezcla de líquidos inmiscibles (es decir, medio acuoso/aceite vegetal),

formando una emulsión en ambas fases. La emulsión formada mostró un aspecto completo y homogéneo con la concentración analizada. Las tasas de emulsificación con BCE y BOE2 fueron superiores al 80% para los tres aceites ensayados, lo que mostró la mayor capacidad de ambos compuestos para estabilizar emulsiones con aceites vegetales durante 24 horas.

Con BCE y BOE2, los aceites de aguacate y soya formaron fuertes emulsiones aceite/agua, mientras que la mezcla con aceite de coco presentó una emulsión suave en su fase acuosa. Podría atribuirse a los ácidos grasos predominantes en estos aceites. El ácido palmítico es saturado y tiene una cadena más corta (C16:0) en comparación con los ácidos grasos insaturados como el oleico (C18:1 cis-9) y ácido linoleico (C18:2, cis-9,12), predominantes en los aceites de aguacate y soja, respectivamente (Essien et al., 2013). Ciertos estudios describen a los SB como compuestos de bajo peso molecular formados principalmente por glicolípidos y cadenas cortas de lipopéptidos, a diferencia de los bioemulsionantes (BE) de alto peso molecular (Caulier et al., 2019). Se sugiere que los lipopéptidos producidos por la especie *B. subtilis* con bajo peso molecular reducen la tensión superficial más que los emulsionantes (Koim-Puchowska et al., 2019). Sin embargo, el SB producido por la cepa DS03 demostró tener excelentes propiedades en la formación de emulsiones. La capacidad emulsionante va de la mano con el valor HLB (es decir, equilibrio hidrofílico-lipofílico), que denota la capacidad de un surfactante para formar emulsiones de aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O). En este caso, la capacidad del SB tuvo éxito en la formación de emulsiones O/W.

4.2.3. Determinación de la Concentración Micelar Crítica (CMC)

La CMC es la concentración a la que comienzan a formarse las micelas. Más allá de la CMC, no se notan cambios en las propiedades interfaciales (Rosen & Kunjappu, 2012). Las cepas deseadas producen SB con los valores de CMC más bajos y una alta reducción de la tensión superficial. En este estudio (Fig. 4.5 y 4.6), se puede observar una disminución progresiva de la tensión superficial a mayores concentraciones de BCE, alcanzando un valor mínimo de 33 mN/m y una CMC de 24,66 ppm. BOE también disminuyó la tensión superficial a 30 mN/m y tuvo una CMC de 19,16 ppm. La eficacia y la eficiencia pueden describir al SB. Por lo tanto, los resultados de CMC sugieren que BCE y BOE son eficientes debido a la baja concentración requerida para lograr la máxima reducción de la tensión superficial. Los valores de CMC también estuvieron cerca de los surfactantes biológicos lipopeptídicos de diferentes especies de *Bacillus* (Slivinski et al., 2012; Zhao et al., 2012). Según la literatura científica, una característica que hace que el SM sea superior a los tensioactivos sintéticos son los bajos valores de CMC (Fenibo et al., 2019b; Slivinski et al., 2012). Por ejemplo, LAS y SLES son compuestos aniónicos ampliamente utilizados en operaciones de limpieza y tienen una CMC de 100 ppm y 1100 ppm (Sulek et al., 2010), respectivamente. Con ambos compuestos, las concentraciones están por encima de BCE y BOE reportadas en este estudio.

Según los resultados, el BOE y el BCE tienen propiedades fisicoquímicas estables comparables a los surfactantes biológicos reportados por varios investigadores. Además, obtener un BCE requiere menos tiempo y recursos que un BOE. Por lo tanto, nuestra investigación demuestra la viabilidad de usar BCE para reemplazar BOE. Futuras secciones deben enfocarse en las propiedades biológicas de BCE y su potencial para ser parte del sistema de limpieza en el procesamiento de alimentos.

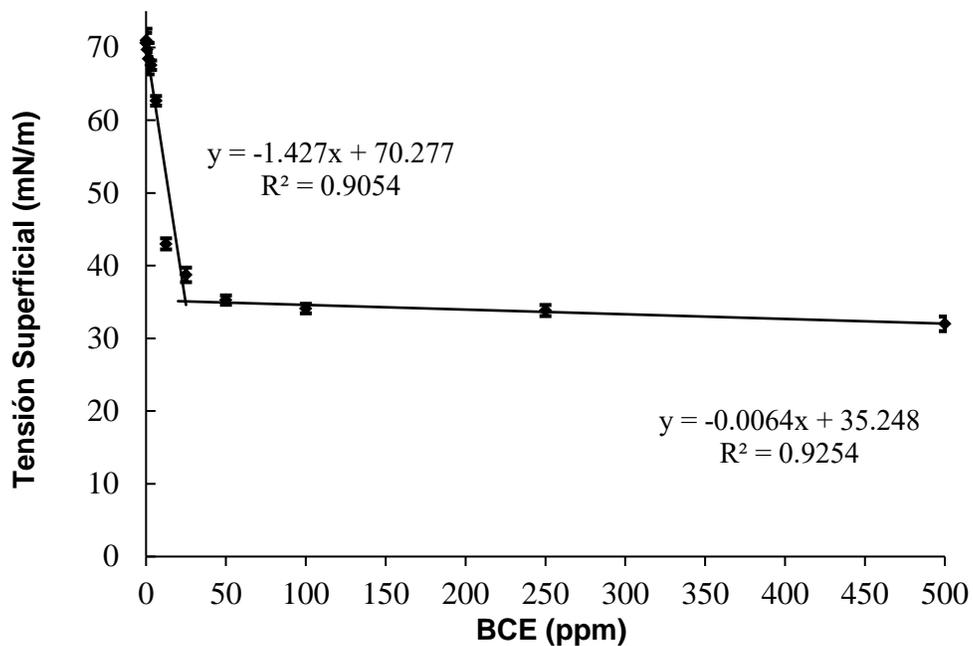


Figura 4.5 Concentración micelar crítica de extracto crudo de biosurfactante (BCE)

Fuente: Autor

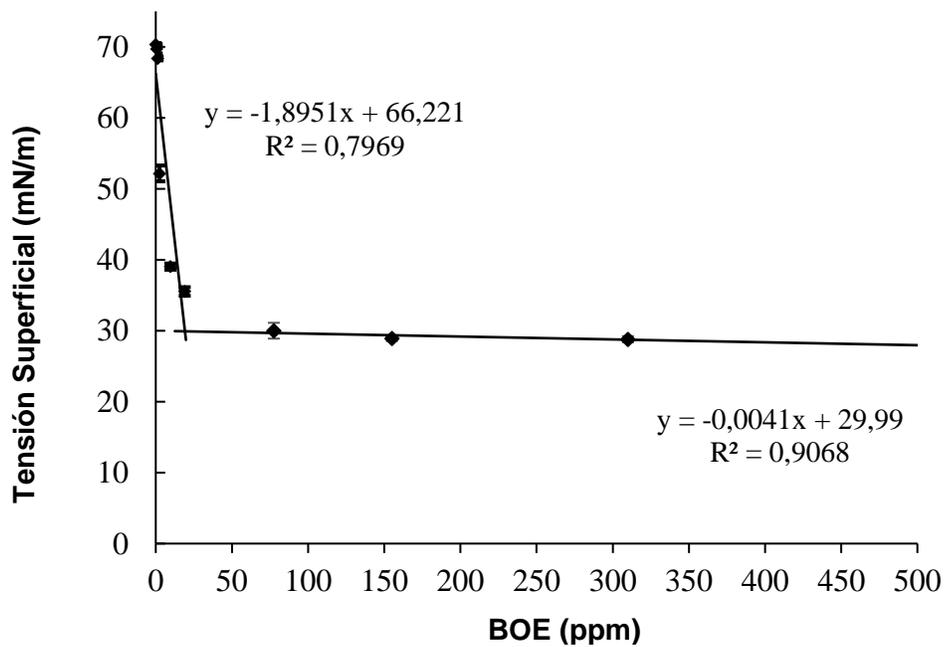


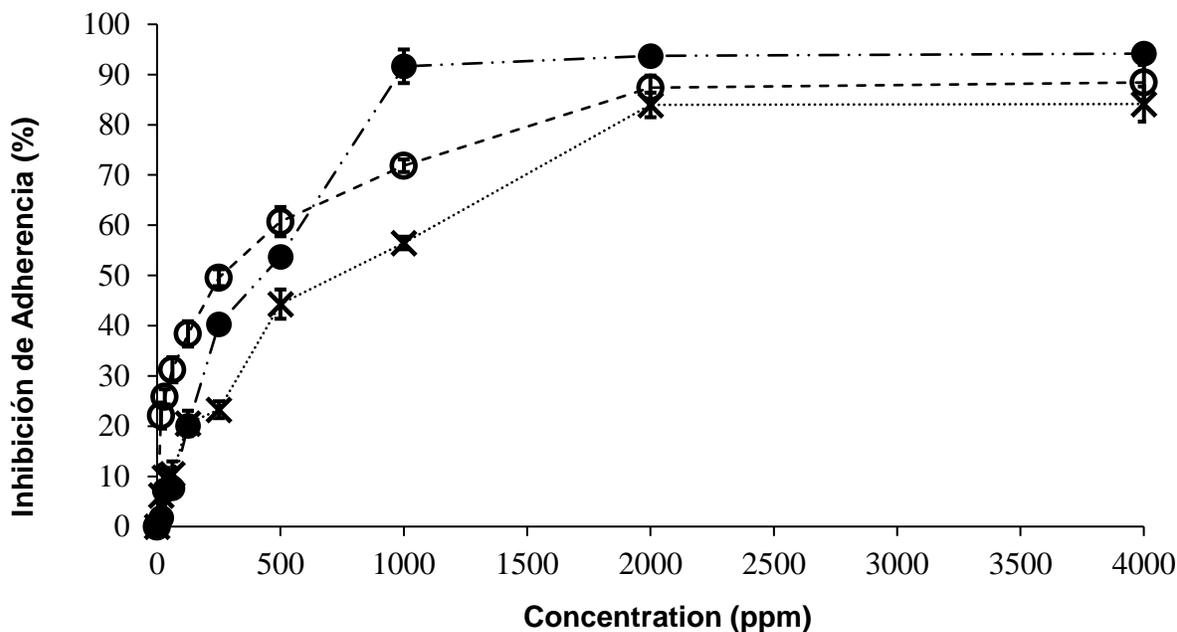
Figura 4.6 Concentración micelar crítica de extracto orgánico de biosurfactante (BOE)

Fuente: Autor

4.3. Ensayo de antiadherencia sobre superficie de poliestireno

El BCE presentó actividad antiadherente contra *E. coli* ATCC 11775, *S. aureus* ATCC 12600 y *L. monocytogenes* ATCC 19115. Cuando se pretrató una superficie de poliestireno con BCE, se observó una disminución aparente en la adhesión de bacterias (Fig. 4.7). El efecto antiadherente de BCE dependía de la concentración. A las concentraciones estudiadas hasta 1000 ppm, el mayor efecto antiadherente contra *E. coli* alcanzó el 91,64%. En cambio, se obtuvo una inhibición menor para *S. aureus* (56 %) y *L. monocytogenes* (71 %) a la misma concentración.

Es importante señalar que la inhibición máxima para cada microorganismo probado ocurrió en una concentración superior a 2000 ppm. Por el contrario, otro enfoque es romper la biopelícula formada por microorganismos. La Figura 4.7 muestra los datos obtenidos para el postratamiento con BCE, y estos valores de antiadherencia fueron inferiores a los reportados en el pretratamiento en todos los microorganismos probados. La disrupción máxima producida por BCE fue de 50,10% para *E. coli*, 55,77% para *S. aureus* y 59,44% para *L. monocytogenes* en una concentración superior a 250 ppm. Así, la acción de BCE fue más efectiva en el pretratamiento contra los tres microorganismos ensayados. Sin embargo, en términos de concentración de BCE, se utilizó una cantidad baja después del tratamiento para lograr la máxima inhibición. La capacidad de los microorganismos para producir un biofilm como protección contra las técnicas de desinfección podría desarrollar patógenos alimentarios resistentes a los antimicrobianos.



(●) *Escherichia coli*. (X) *Staphylococcus aureus*. (○) *Listeria monocytogenes*.

Figura 4.7 Respuesta de inhibición de la adherencia utilizando BCE en el pretratamiento.

Fuente: Autor

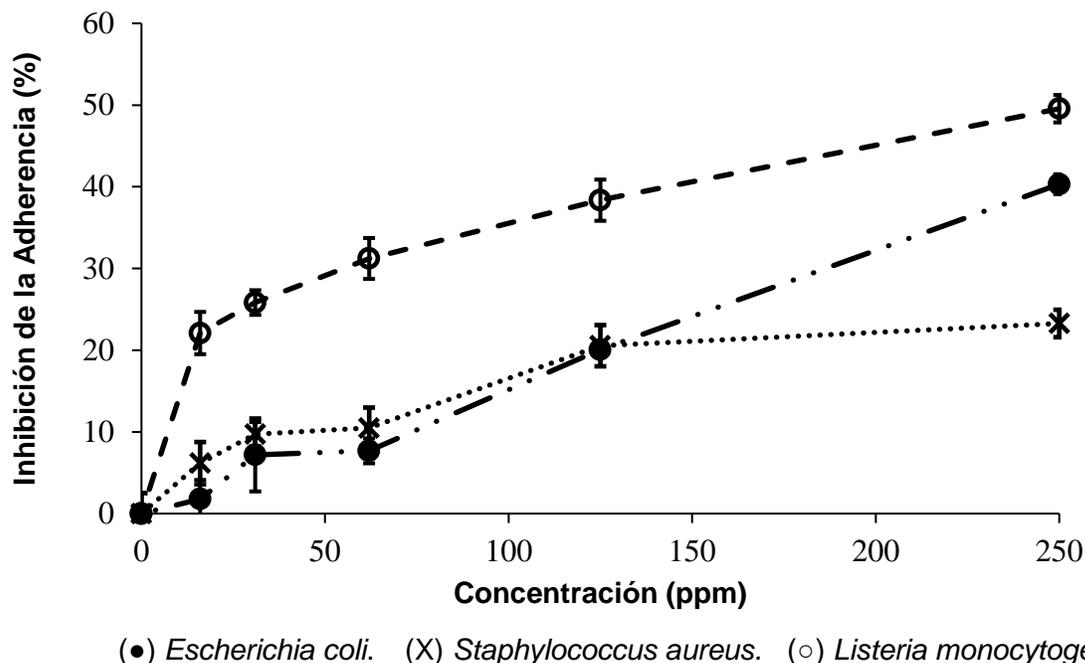


Figura 4.8 Respuesta de inhibición de la adherencia utilizando BCE en el pretratamiento para concentraciones bajas.

Fuente: Autor

Las industrias alimentarias eliminan los biofilms con diversos métodos, incluidas técnicas biológicas (p. ej., bacteriófagos, enzimas antibiofilms, bacteriocinas de bacterias del ácido láctico) (Yuan et al., 2019) y tensioactivos microbianos (p. ej., surfactina y ramnolípidos) (Nitschke & Silva, 2017). Varios investigadores han informado que la acción del SB en la prevención de formación de biofilms podría resultar de las fuerzas de repulsión entre las cargas negativas de la superficie microbiana y la carga negativa de la superficie recubierta con moléculas de SM (Coronel-León et al., 2016a). Asimismo, el efecto de disrupción resulta de la penetración y absorción de SM en la interfaz entre la superficie sólida y las bacterias formadoras de biopelículas adheridas, lo que reduce la tensión interfacial y facilita la eliminación de biopelículas (Nitschke & Silva, 2017). Los resultados obtenidos aquí también fueron informados por (Singh & Sharma, 2020a), que describieron que el lipopéptido (6 g/L) producido por *Bacillus tequilensis* inhibía más del 99% de los microorganismos en el acero inoxidable. Además, la pontifactina purificada mostró una actividad antiadherente máxima del 99 % contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae* a 2 mg/L (Balan et al., 2016).

Del mismo modo, (de Araujo et al., 2016) evaluaron el potencial de dos tensioactivos biológicos contra la formación de biofilms por parte de *L. monocytogenes* y *Pseudomonas fluorescens* en superficies como el acero inoxidable y el poliestireno. Informaron que los ramnolípidos y la surfactina exhibieron una actividad antiadherente sobre el poliestireno en un 79 % y un 54 %, respectivamente. Por el contrario, la formación de biopelículas en las superficies de acero inoxidable se redujo al 83 % y al 73 %, respectivamente. Estas observaciones sugieren que el BCE encuentra perspectivas prometedoras para muchas aplicaciones de limpieza. Además, (Smith et al., 2020) también indicó que el uso de productos que contienen surfactantes

biológicos junto con o como una alternativa a los limpiadores fuertemente químicos puede ser más efectivo en la desinfección.

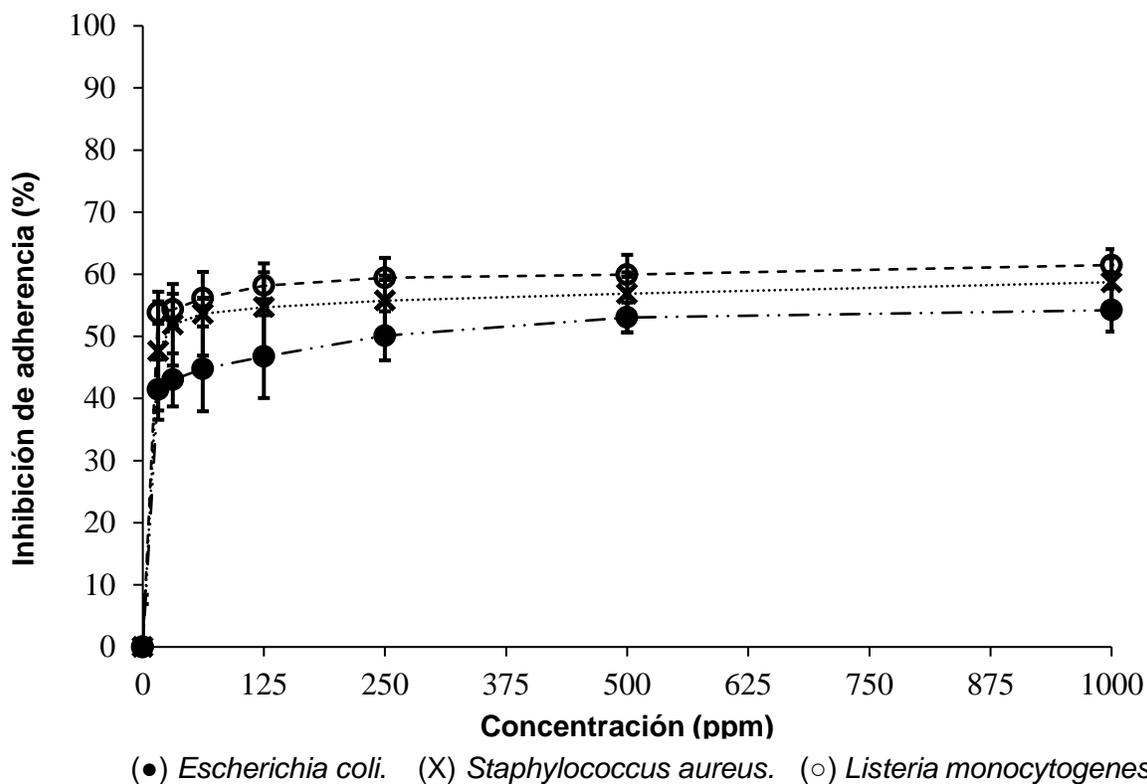


Figura 4.9 Respuesta de inhibición de la adhesión utilizando BOE en el postratamiento.

Fuente: Autor

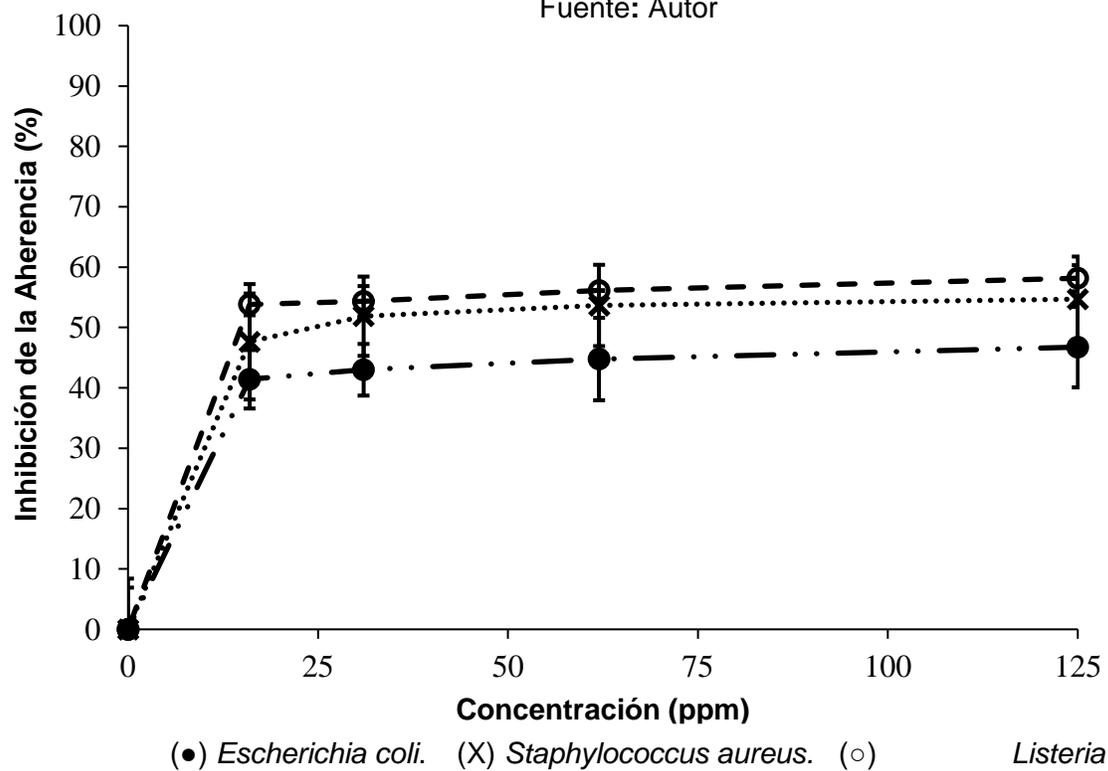


Figura 4.10 Respuesta de inhibición de la adhesión utilizando BOE en el postratamiento para concentraciones bajas.

Fuente: Autor

4.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se eligieron tres microorganismos, particularmente problemáticos para analizar la actividad antimicrobiana del BCE dentro la industria alimentaria. Cuando las células bacterianas se trataron a 800 ppm de BCE, se encontró una reducción efectiva de la viabilidad después de 15 min de tratamiento, logrando una reducción máxima (7 log UFC/mL) después de 60 min (Fig. 4.11). La disminución microbiana de *E. coli* y *L. monocytogenes* sigue un patrón similar. En los primeros 15 min de contacto con el BCE, aproximadamente una disminución de 8 a 4 log UFC/mL. El comportamiento de ambos microorganismos (Fig. 4.11.A y 4.11.C) mostró una reducción similar a lo largo de los 60 minutos, donde la disminución fue de 7 log UFC/mL.

De manera similar, *S. aureus* (Fig. 4.11.B) logró la misma tasa de reducción microbiana a los 60 minutos de contacto. Sin embargo, no mostró una disminución tan drástica en los primeros 15 minutos, pero disminuyó en 6 log UFC/mL a los 30 minutos. Al comparar los resultados con el control, se puede determinar que una reducción microbiana alcanzó aproximadamente el 90% a los 60 min de contacto independientemente del microorganismo en estudio. La única variación es la velocidad de acción, que puede depender de las características específicas de cada microorganismo y de cómo interactúan con el BCE.

Sin embargo, el efecto fue similar para *E. coli* y *L. monocytogenes*, independientemente de su naturaleza Gram-negativa o Gram-positiva. Mostraron el mismo patrón de comportamiento demostrando que el compuesto BCE tiene un importante efecto inhibitorio que permite eliminar hasta el 90% de los microorganismos en contacto directo con él en aproximadamente 60 min. Varios factores pueden afectar la eficacia antimicrobiana de los biocidas, pero el tiempo de contacto es probablemente el factor más crítico. Se informó una reducción similar (más del 90%) después de 1 hora de crecimiento en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas tratadas con biosurfactante lipopeptídico (6000 ppm) producido por *Bacillus tequilensis* cepa SDS21 (Singh & Sharma, 2020b). (Coronel-León et al., 2016a) también informaron una reducción en la viabilidad de 6 unidades logarítmicas cuando se usó liquenisina/catiónico (es decir, mezcla de tensioactivos de aminoácidos) contra *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes*. En consecuencia, el patrón obtenido aquí es consistente con la acción de los lipopéptidos convencionales. El efecto antimicrobiano mejoró a medida que aumentó el tiempo de contacto, lo que sugiere que el tiempo podría ser esencial para eliminar la población microbiana.

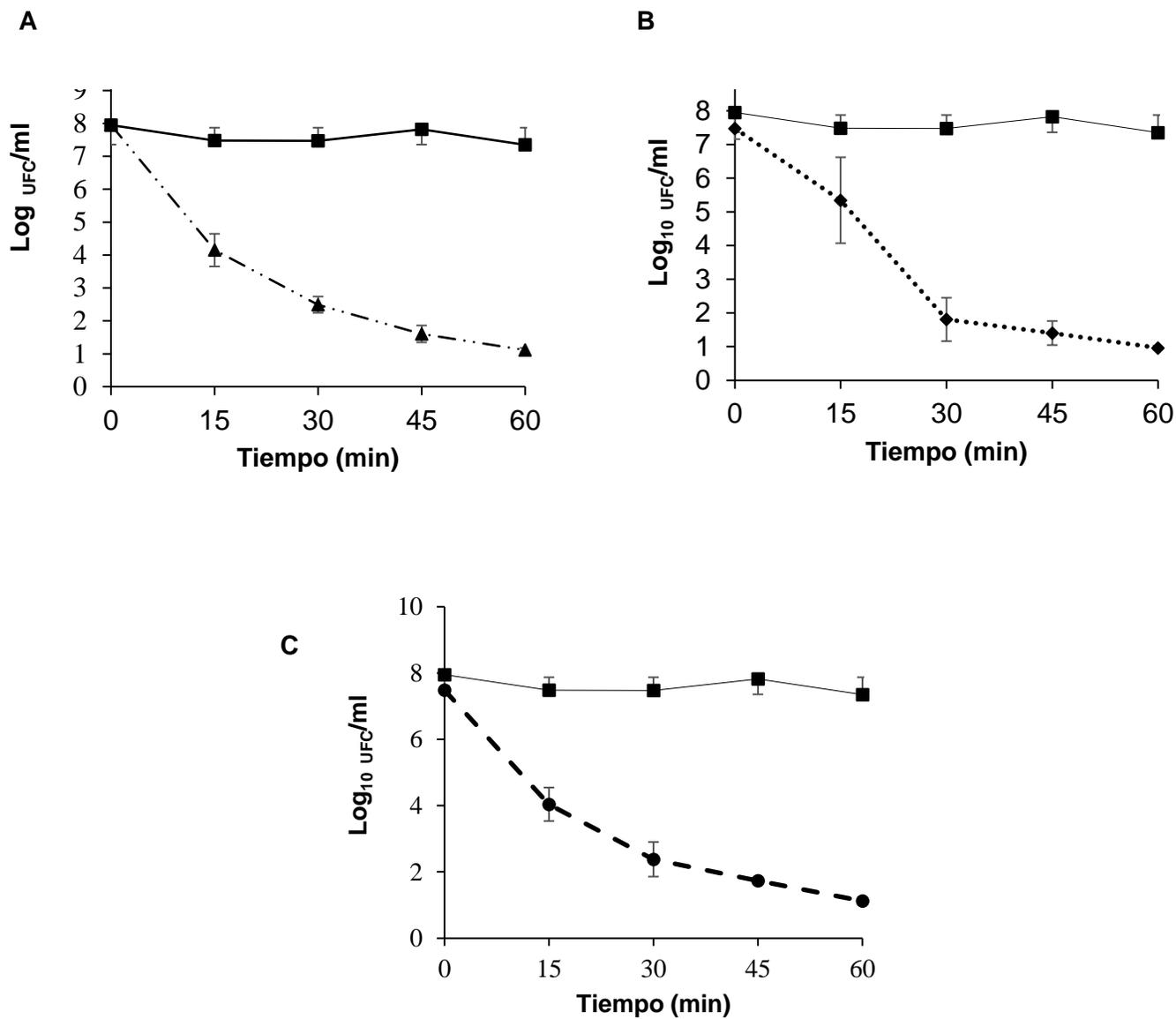


Figura 4.11 Reducción de la viabilidad celular (UFC/mL) versus tiempo para A) *Escherichia coli* (▲), B) *Staphylococcus aureus* (◆), C) *Listeria monocytogenes* (●) y control (■).

Fuente: Autor

4.5. Evaluación de BCE en un proceso de limpieza fuera de lugar (COP)

Del análisis cualitativo del proceso de embutidos, se determinaron las etapas de molienda, corte y embutido como puntos críticos debido al mayor tiempo de contacto entre la carne cruda y los equipos y utensilios utilizados. Por esta razón, la evaluación de los productos de limpieza se centró en estas etapas, que representan un mayor riesgo microbiano para el producto y el consumidor. Las cuchillas, el molino, el cortador, la embutidora y la rebanadora utilizadas en la producción de salchichas presentaron un recuento inicial de microorganismos aerobios mesófilos (Fig. 4.12) en un rango de 4,2 a 4,8 log UFC/cm². Asimismo, el rango inicial de recuento de coliformes totales (Fig. 4.13) fue de 3,5 a 4,6 log UFC/cm². La reducción de microorganismos en cuchillos, molino, cortador, embutidor y rebanador utilizados en el proceso de salchichas tratadas con los tres productos, COP-A, COP-B y COP-C, se muestran en la Figura 4.12. para aerobios mesófilos y 4.13 para coliformes totales.

En cuanto a los microorganismos aerobios mesófilos, tras la operación de limpieza con un producto convencional COP-A (Fig. 4.12), los recuentos se redujeron significativamente, reportando un rango de 0,15-1,25 log UFC/cm². De manera similar, el producto COP-B (Fig. 4.12) desencadenó una reducción en el recuento de estos microorganismos a un rango de 0,89 a 1,10 log UFC/cm². Tampoco se detectaron microorganismos aerobios mesófilos en la cortadora. Es importante mencionar que la reducción microbiana en cuchillos (de 4,62 a 2,64 log), molino (de 4,42 a 2,30 log), cortadora (de 4,35 a 2,31 log), embutidora (de 4,84 a 2,17 log) y rebanadora (de 4,28 a 1,83 log) usando COP-C (Fig. 4.12) como producto sanitizante fueron más bajas que los encontrados para el tratamiento convencional COP-A y el producto COP-B.

Basado en la American Public Health Association (APHA) (Association et al., 1995), el límite establecido para los microorganismos aerobios mesófilos fue de 2,00 log UFC/cm². Por encima de este límite indica condiciones higiénico-sanitarias insatisfactorias. Por lo tanto, nuestros resultados reportan que los conteos de placas aeróbicas de los productos COP-A y COP-B fueron inferiores al límite para la superficie evaluada. Mientras que el conteo de placas del proceso COP-C en todos los equipos y utensilios no logró condiciones higiénicas. La prueba ANOVA mostró diferencias significativas entre los tres productos ($p < 0.05$), pero la prueba LSD Fisher demostró que COP-A y COP B no tuvieron diferencias significativas, al contrario de COP-C, que sí tuvo diferencias con cada producto mencionado antes. Estos resultados respaldan el análisis cuantitativo donde COP-C mostró menos eficacia en la reducción de microorganismos aerobios mesófilos en las superficies probadas. Finalmente, se ha demostrado que COP-A y COP-B tienen un efecto similar sobre este tipo de microorganismos y pueden utilizarse como agentes de limpieza de superficies en la industria alimentaria.

Por otro lado, con los coliformes totales después de la operación de limpieza con un producto convencional COP-A (Fig. 4.13), los recuentos se redujeron mucho en un rango de 0,39 a 1,41 log UFC/cm², sin detección en embutidora y rebanadora. Asimismo, el producto COP-B (Fig. 4.13) desencadenó una reducción en el recuento de estos microorganismos en un rango de 1,15 a 1,29 log UFC/cm² y no se detectó en cuchillos, molinos, cortadores, embutidores y rebanadores. Con respecto al producto COP-C (Fig. 4.13), los conteos disminuyeron en promedio 2,55 log UFC/cm² para todos los equipos y utensilios. COP-C como producto más limpio fue menos efectivo que los productos COP-A y COP-B.

Con base en las recomendaciones de (Sneed et al., 2004), el límite establecido para coliformes totales es de 1,00 log UFC/cm²; por lo tanto, COP-A logró condiciones higiénicas satisfactorias para el molino, embutidora y rebanadora. En comparación, cuchillos y cortadores presentaron conteos superiores al límite recomendado. De lo contrario, con COP-B, el estándar

de limpieza se cumplió solo en la rebanadora. A pesar de la disminución del recuento de coliformes con COP-C, la reducción no fue satisfactoria. La prueba de ANOVA y LSD Fisher demostró que COP-A y COP-B no tuvieron diferencias significativas, a diferencia de COP-C, que tuvo diferencias con cada producto mencionado anteriormente, en relación con los resultados de los microorganismos aerobios mesófilos.

Como se mencionó, los productos COP-A y COP-B disminuyeron de manera eficiente los microorganismos aerobios mesófilos en todos los equipos y utensilios probados. Sin embargo, la acción de estos compuestos frente a coliformes totales depende de la superficie evaluada. Por ejemplo, COP-C no alcanzó ambos límites microbiológicos. Los resultados de la carga de reducción microbiana mostraron una disminución aparente de la carga microbiana inicial con todos los productos en todos los equipos y utensilios utilizados. Con COP-A, la reducción microbiana promedio fue de 83.14% y 85.66% para microorganismos aerobios mesófilos y coliformes totales, respectivamente. En la misma línea, COP-B provocó una disminución del 82,24% y 75,59% en microorganismos aerobios mesófilos y coliformes totales, respectivamente. Finalmente, los promedios de reducción microbiana con COP-C estuvieron en torno al 50,07% (microorganismos aerobios mesófilos) y al 35,58% (coliformes totales).

La reducción microbiana general sugiere que la acción de COP-A, COP-B y COP-C podría mejorarse mediante la aplicación de estrategias de prevención para reducir la carga microbiana inicial. Un enfoque preventivo podría ser la aplicación correcta y estricta de buenas prácticas de fabricación (GMP) para disminuir el riesgo de contaminación microbiana. La combinación con procedimientos de desinfección también puede ayudar, por ejemplo, al uso de operaciones físicas (p. ej., ultrasonido, tecnología de plasma, luz ultravioleta) o productos biológicos (p. ej., ácidos orgánicos, aceites esenciales, enzimas).

La disminución del recuento de microorganismos en los equipos y utensilios utilizados durante la producción de salchichas podría deberse a un mecanismo similar al detergente producido por el BCE (COP-B y COP-C) relacionado con la actividad de la superficie. Los SB penetran en las membranas biológicas y alteran su estructura y función, lo que puede deberse a la permeabilización o a la solubilización de la membrana (Aranda et al., 2005; Coronel et al., 2017). El efecto COP-B es comparable con (Brasil et al., 2017) en el que se encontró una disminución significativa ($2 \log \text{UFC/cm}^2$) en el número de microorganismos patógenos en cuchillos aplicando ultrasonido con agua potable clorada.

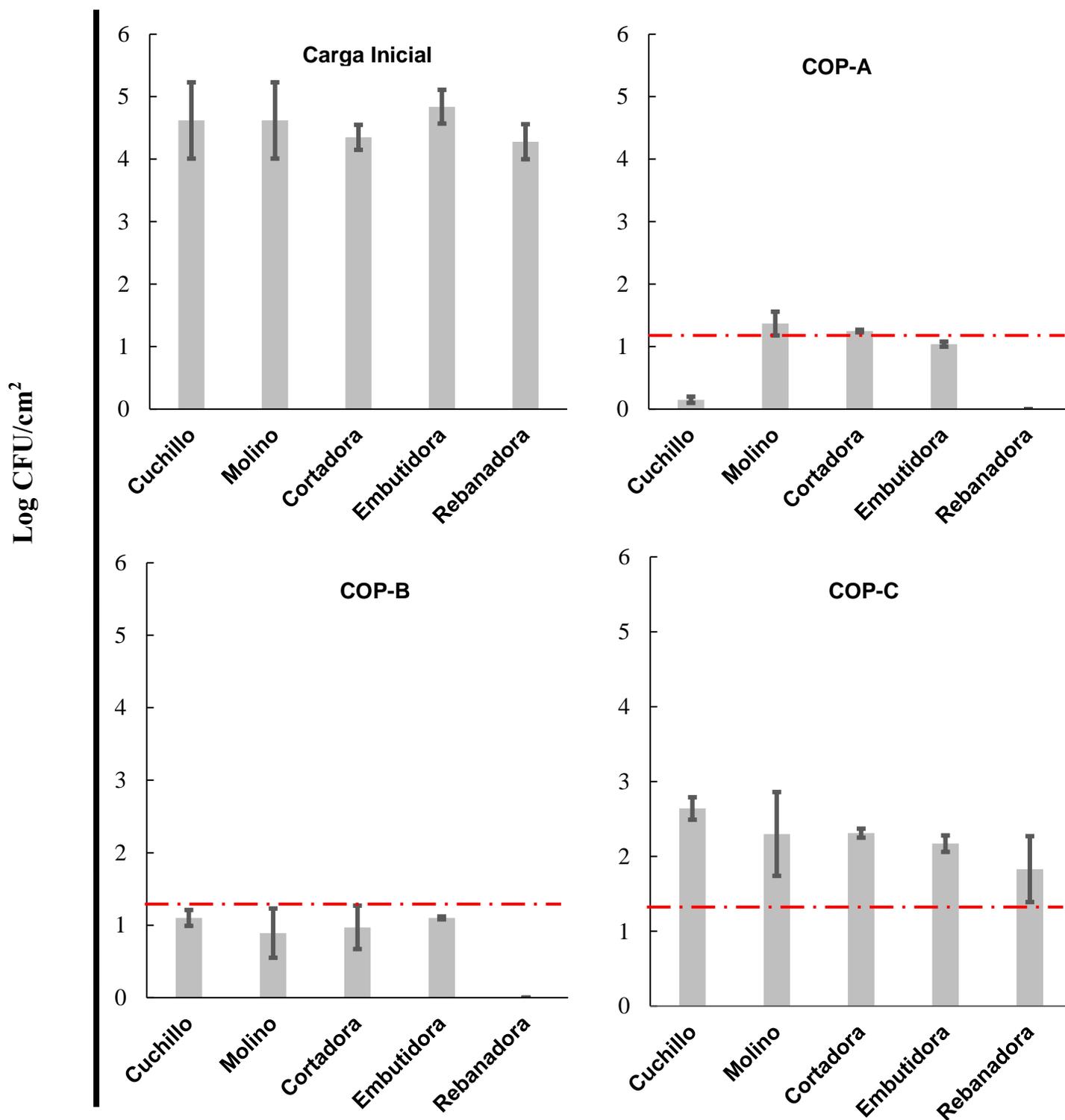


Figura 4.12 Perfil aerobio mesofílico de cuchillos, molino, cortador, embutidor y rebanador utilizados durante la producción de salchichas. El límite establecido se muestra en una línea roja

Fuente: Autor

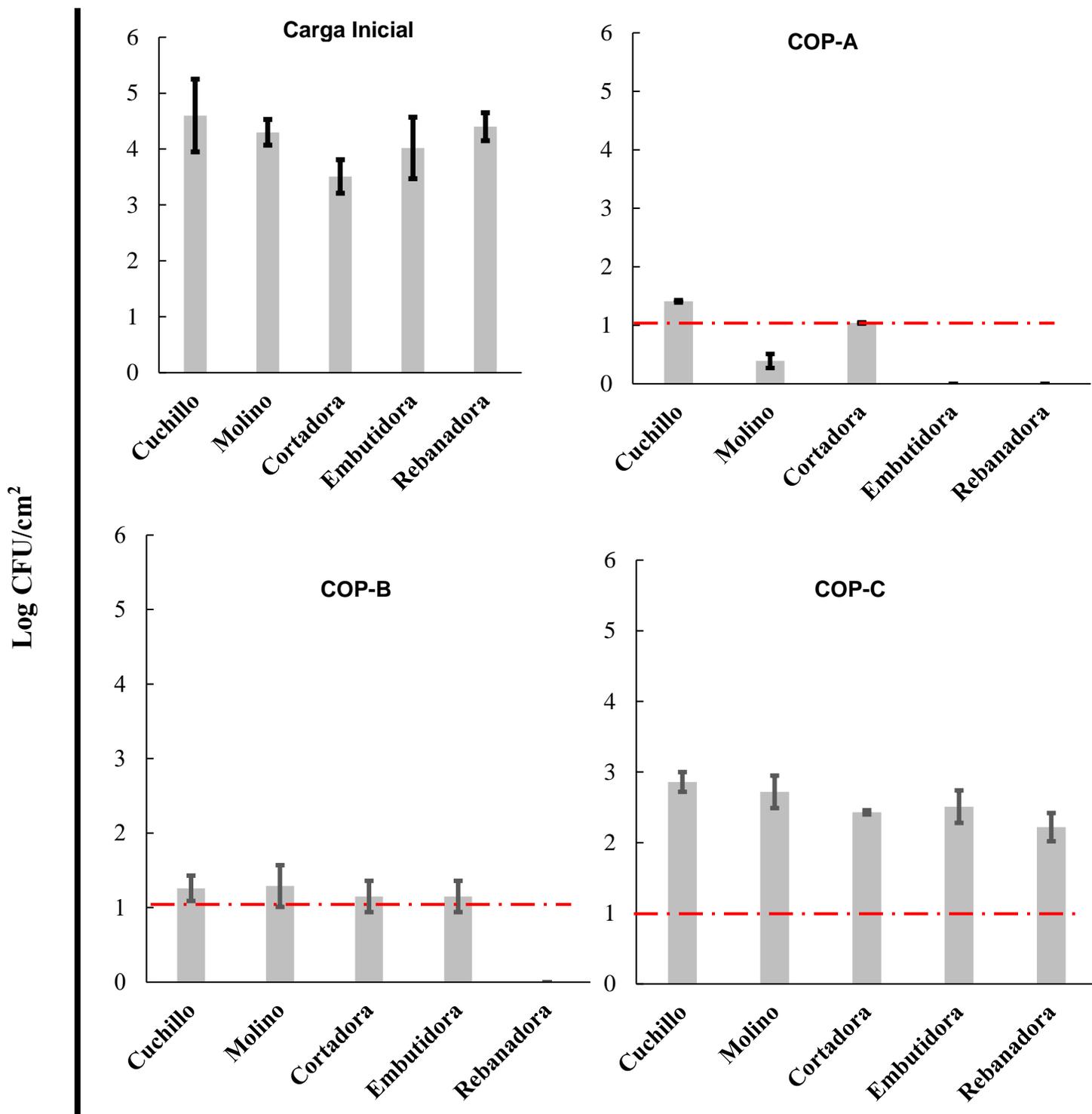


Figura 4.13 Perfil de coliformes totales de cuchillos, molino, cortador, embutidor y rebanador utilizados durante la producción de salchichas. El límite establecido se muestra en una línea roja

Fuente: Autor

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. Se logró obtener BCE utilizando como fuente de carbono suero de leche, almidón de yuca y melaza, sin embargo, se logró determinar que utilizando un enfoque de economía circular con melaza se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la eficacia del compuesto obtenido. Este compuesto reportó la mejor actividad superficial al reducir la tensión interfacial y mostrar baja concentración para saturar el medio.
2. Los efectos de condiciones extremas como temperatura y pH en los compuestos crudo y orgánico obtenidos se comportaron de maneras distintas. Para el caso de ambos compuestos mantuvieron su capacidad de reducción de la tensión superficial a temperaturas entre 4 a 121°C. En el caso del pH, se determinó que sometidos a pH bajos la tensión superficial aumentaba significativamente. Sin embargo, las condiciones de limpieza en los hogares o industrias para la potencial aplicación del producto generalmente se encuentran en temperatura de 25 a 60°C y pH 7.0 – 11.0, por lo que los resultados obtenidos indican que su potencial aplicación de manera comercial bajo estas condiciones es posible.
3. Ambos compuestos obtenidos mostraron una buena capacidad para formar emulsiones estables con los aceites estudiados de aguacate, soja y coco. La formación de una buena emulsión es una de las características más importantes al estudiar estos compuestos ya que nos indica que tiene un buen equilibrio hidrofílico-lipofílico lo que le permite a los SB penetrar en emulsiones para facilitar el proceso de limpieza. De igual forma, da la posibilidad de que se use en mezcla con otros compuestos biológicos para la formulación de soluciones sanitizantes y de limpieza con más características que añadida a su propuesta de valor.
4. El extracto biosurfactante crudo demostró capacidad antiadherente frente a *E. coli* ATCC 11775, *S. aureus* ATCC 12600 y *L. monocytogenes* ATCC 19115 sobre superficies de poliestireno. El mejor resultado se obtuvo con un tratamiento de 250 ppm sobre la superficie de contacto con el compuesto BCE. Esta característica permite indicar que su utilización potencialmente ayuda a la protección de las superficies de poliestireno frente a la formación de biofilms.
5. La limpieza de cuchillos, molinos, cortadores, embutidoras y rebanadoras utilizando COP-B (BCE 5% v/v) promovió una disminución significativa en el número de microorganismos aerobios mesófilos y coliformes totales. Por lo tanto, esta investigación propone utilizar SB semipurificado como una excelente oportunidad para desarrollar un proceso económico para diversas aplicaciones. Además, la formulación de una estrategia de productos biológicos/químicos podría reducir los impactos ambientales.

5.2 Recomendaciones

1. El análisis del comportamiento de los compuestos BCE y BOE luego de algún tiempo de almacenamiento debería ser analizado a mayor profundidad para determinar si el tiempo afecta la eficacia de los compuestos frente a las propiedades estudiadas en este trabajo.
2. El uso de estos compuestos dentro de la industria puede darse en mezcla con otros compuestos orgánicos que le añadan otras características que se consideren importante dentro del mercado. Para una correcta transición desde el laboratorio a la comercialización es necesario determinar que otras propiedades busca el consumidor dentro de este tipo de productos.
3. La capacidad antimicrobiana de los compuestos debe ser analizada frente a diversos tipos de microorganismos que tengan importancia para la industria alimentaria. Sería importante analizar su efecto frente a mohos y levaduras en un futuro trabajo.
4. El uso de los compuestos con otro fin comercial debería ser analizado, como su potencial aplicación sobre frutos y verduras como un sanitizante directo de bajo impacto ambiental que podría evitar la presencia de residuos químicos en productos mínimamente procesados.

BIBLIOGRAFÍA

- Adley, C. C., & Ryan, M. P. (2016). The Nature and Extent of Foodborne Disease. *Antimicrobial Food Packaging*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800723-5.00001-2>
- Ahire, J. J., Kashikar, M. S., Lakshmi, S. G., & Madempudi, R. (2020). Identification and characterization of antimicrobial peptide produced by indigenously isolated *Bacillus paralicheniformis* UBBLi30 strain. *3 Biotech*, 10(3). <https://doi.org/10.1007/S13205-020-2109-6>
- Al-Rousan, W. M., Olaimat, A. N., Osaili, T. M., Al-Nabulsi, A. A., Ajo, R. Y., & Holley, R. A. (2018). Use of acetic and citric acids to inhibit *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* in tabbouleh salad. *Food Microbiology*, 73, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.001>
- André, P., Fernandes, V., Arruda, I. R. de, Fernando, A., Botelho, A., Araújo, A. A. de, Maria, A., Maior, S., & Ximenes, E. A. (2007). R14 Against Multidrug-Resistant Bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4), 704–709. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400022>
- Aranda, F. J., Teruel, J. A., & Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1713(1), 51–56. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2005.05.003>
- Association, A. P. H., Association, A. W. W., & Federation, W. E. (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. [1000]-[1000].
- Balan, S. S., Kumar, C. G., & Jayalakshmi, S. (2016). Pontifactin, a new lipopeptide biosurfactant produced by a marine *Pontibacter korlensis* strain SBK-47: Purification, characterization and its biological evaluation. *Process Biochemistry*, 51(12), 2198–2207. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2016.09.009>
- Balasubramani, R., Awasthi, K., Varjani, S., Karmegam, N., Huzairi, M., Zainudin, M., Zulkarnain, A., Sahira Azmi, A., Muniandy, S., Sakai, K., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2022). Enhancement of Agro-Industrial Waste Composting Process via the Microbial Inoculation: A Brief Review. *Agronomy* 2022, Vol. 12, Page 198, 12(1), 198. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12010198>
- Bernardi, A. O., Stefanello, A., Garcia, M. V., Parussolo, G., Stefanello, R. F., Moro, C. B., & Copetti, M. V. (2018). Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry. *Lwt*, 97, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.037>
- Bhilwadikar, T., Pounraj, S., Manivannan, S., Rastogi, N. K., & Negi, P. S. (2019). Decontamination of Microorganisms and Pesticides from Fresh Fruits and Vegetables: A Comprehensive Review from Common Household Processes to Modern Techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12453>
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiology*, 3(3), 529–563. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>
- Boucher, C., Waite-Cusic, J., Stone, D., & Kovacevic, J. (2021). Relative performance of commercial citric acid and quaternary ammonium sanitizers against *Listeria monocytogenes*

- under conditions relevant to food industry. *Food Microbiology*, 97(November 2020), 103752. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103752>
- Brasil, C. C. B., Barin, J. S., Jacob-Lopes, E., Menezes, C. R., Zepka, L. Q., Wagner, R., Campagnol, P. C. B., & Cichoski, A. J. (2017). Single step non-thermal cleaning/sanitation of knives used in meat industry with ultrasound. *Food Research International*, 91, 133–139. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.11.030>
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10(FEB), 302. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00302/BIBTEX>
- CDC. (n.d.). *Foodborne Germs and Illnesses | CDC*. Retrieved July 20, 2021, from <https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>
- Chatterjee, A., & Abraham, J. (2018). Microbial Contamination, Prevention, and Early Detection in Food Industry. In *Microbial Contamination and Food Degradation* (pp. 21–47). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811515-2.00002-0>
- Coronel, J. R., Marqués, A., Manresa, Á., Aranda, F. J., Teruel, J. A., & Ortiz, A. (2017). Interaction of the Lipopeptide Biosurfactant Lichenysin with Phosphatidylcholine Model Membranes. *Langmuir*, 33(38), 9997–10005. https://doi.org/10.1021/ACS.LANGMUIR.7B01827/ASSET/IMAGES/MEDIUM/LA-2017-018273_0010.GIF
- Coronel-León, J., de Grau, G., Grau-Campistany, A., Farfan, M., Rabanal, F., Manresa, A., & Marqués, A. M. (2015). Biosurfactant production by AL 1.1, a *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: production, chemical characterization and properties. *Annals of Microbiology*, 65(4), 2065–2078. <https://doi.org/10.1007/S13213-015-1045-X/FIGURES/6>
- Coronel-León, J., Marqués, A. M., Bastida, J., & Manresa, A. (2016a). Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 99–111. <https://doi.org/10.1111/JAM.12992>
- Coronel-León, J., Marqués, A. M., Bastida, J., & Manresa, A. (2016b). Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 99–111. <https://doi.org/10.1111/JAM.12992>
- Coronel-León, J., Pinazo, A., Pérez, L., José Espuny, M., Marqués, A. M., & Manresa, A. (2017). Lichenysin-geminal amino acid-based surfactants: Synergistic action of an unconventional antimicrobial mixture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 149, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.10.008>
- Cruz, J. V., Magalhães, W. L. E., Cademartori, P. H. G., Dorta, D. J., de Oliveira, D. P., & Leme, D. M. (2021). Environmental concerns about the massive use of disinfectants during COVID-19 pandemic: an overview on aquatic toxicity. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL CONTAMINATION*, 16(1), 107–117. <https://doi.org/10.5132/EEC.2021.01.14>
- de Araujo, L. V., Guimarães, C. R., Marquita, R. L. da S., Santiago, V. M. J., de Souza, M. P., Nitschke, M., & Freire, D. M. G. (2016). Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. *Food Control*, 63, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.036>
- Dewey, H. M., Jones, J. M., Keating, M. R., & Budhathoki-Uprety, J. (2021). Increased Use of Disinfectants During the COVID-19 Pandemic and Its Potential Impacts on Health and

- Safety. *ACS Chemical Health & Safety*, 29(1), 27–38. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHAS.1C00026>
- Dey, G., Bharti, R., Sen, R., & Mandal, M. (2015). Microbial amphiphiles: a class of promising new-generation anticancer agents. *Drug Discovery Today*, 20(1), 136–146. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2014.09.006>
- Donaghy, J. A., Jagadeesan, B., Goodburn, K., Grunwald, L., Jensen, O. N., Jespers, A., Kanagachandran, K., Lafforgue, H., Seefelder, W., & Quentin, M. C. (2019). Relationship of Sanitizers, Disinfectants, and Cleaning Agents with Antimicrobial Resistance. *Journal of Food Protection*, 82(5), 889–902. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-373>
- Essien, E., Antia, B. S., & Peter, N.-U. S. (2013). *Lagenaria siceraria (Mol.) Standley. Properties of Seed Oils and Variability in Fatty Acids Composition of Ten Cultivars*. International Journal of Natural Products Research. https://www.researchgate.net/publication/318661738_Lagenaria_siceraria_Mol_Standley_Properties_of_Seed_Oils_and_Variability_in_Fatty_Acids_Composition_of_Ten_Cultivars
- Fei, D., Zhou, G. W., Yu, Z. Q., Gang, H. Z., Liu, J. F., Yang, S. Z., Ye, R. Q., & Mu, B. Z. (2020). Low-Toxic and Nonirritant Biosurfactant Surfactin and its Performances in Detergent Formulations. *Journal of Surfactants and Detergents*, 23(1), 109–118. <https://doi.org/10.1002/JSDE.12356>
- Fenibo, E. O., Douglas, S. I., & Stanley, H. O. (2019a). A Review on Microbial Surfactants: Production, Classifications, Properties and Characterization. *Journal of Advances in Microbiology*, 18(3), 1–22. <https://doi.org/10.9734/JAMB/2019/V18I330170>
- Fenibo, E. O., Douglas, S. I., & Stanley, H. O. (2019b). A Review on Microbial Surfactants: Production, Classifications, Properties and Characterization. *Journal of Advances in Microbiology*, 18(3), 1–22. <https://doi.org/10.9734/JAMB/2019/V18I330170>
- Ferk, F., Mišík, M., Hoelzl, C., Uhl, M., Fuerhacker, M., Grillitsch, B., Parzefall, W., Nersesyan, A., Mičeta, K., Grummt, T., Ehrlich, V., & Knasmüller, S. (2007). Benzalkonium chloride (BAC) and dimethyldioctadecyl-ammonium bromide (DDAB), two common quaternary ammonium compounds, cause genotoxic effects in mammalian and plant cells at environmentally relevant concentrations. *Mutagenesis*, 22(6), 363–370. <https://doi.org/10.1093/mutage/gem027>
- Fonseca, R. R., Silva, A. J. R., de França, F. P., Cardoso, V. L., & Sérvulo, E. F. C. (2007). Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 137–140(1–12), 471–486. <https://doi.org/10.1007/S12010-007-9073-Z>
- Gaur, V. K., Sharma, P., Sirohi, R., Varjani, S., Taherzadeh, M. J., Chang, J. S., Yong Ng, H., Wong, J. W. C., & Kim, S. H. (2022). Production of biosurfactants from agro-industrial waste and waste cooking oil in a circular bioeconomy: An overview. *Bioresource Technology*, 343, 126059. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126059>
- Hassan, F. M., Kathim, N. F., & Hussein, F. H. (2008). Effect of Chemical and Physical Properties of River Water in Shatt Al-Hilla on Phytoplankton Communities. *E-Journal of Chemistry*, 5(2), 323–330. https://www.academia.edu/6733100/Effect_of_Chemical_and_Physical_Properties_of_River_Water_in_Shatt_Al_Hilla_on_Phytoplankton_Communities

- Hentati, D., Chebbi, A., Hadrich, F., Frikha, I., Rabanal, F., Sayadi, S., Manresa, A., & Chamkha, M. (2019). Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *167*, 441–449. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.10.036>
- Heryani, H., & Putra, M. D. (2017a). Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, *27*, 49–54. <https://doi.org/10.1016/J.EJBT.2017.03.005>
- Heryani, H., & Putra, M. D. (2017b). Dataset on potential large scale production of biosurfactant using *Bacillus* sp. *Data in Brief*, *13*, 196–201. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2017.05.037>
- Hora, P. I., Pati, S. G., McNamara, P. J., & Arnold, W. A. (2020a). Increased Use of Quaternary Ammonium Compounds during the SARS-CoV-2 Pandemic and Beyond: Consideration of Environmental Implications. In *Environmental Science and Technology Letters* (Vol. 7, Issue 9, pp. 622–631). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00437>
- Hora, P. I., Pati, S. G., McNamara, P. J., & Arnold, W. A. (2020b). Increased Use of Quaternary Ammonium Compounds during the SARS-CoV-2 Pandemic and Beyond: Consideration of Environmental Implications. *Environmental Science and Technology Letters*, *7*(9), 622–631. https://doi.org/10.1021/ACS.ESTLETT.0C00437/ASSET/IMAGES/ACS.ESTLETT.0C00437.SOCIAL.JPEG_V03
- Hua, Z., Korany, A. M., El-Shinawy, S. H., & Zhu, M. J. (2019). Comparative Evaluation of Different Sanitizers Against *Listeria monocytogenes* Biofilms on Major Food-Contact Surfaces. *Frontiers in Microbiology*, *10*(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02462>
- Ismail, Z. Z., Tezel, U., & Pavlostathis, S. G. (2010). Sorption of quaternary ammonium compounds to municipal sludge. *Water Research*, *44*(7), 2303–2313. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.12.029>
- Jahromi, R., Mogharab, V., Jahromi, H., & Avazpour, A. (2020). Synergistic effects of anionic surfactants on coronavirus (SARS-CoV-2) virucidal efficiency of sanitizing fluids to fight COVID-19. *Food and Chemical Toxicology*, *145*, 111702. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2020.111702>
- Jardak, K., Drogui, P., & Daghrir, R. (2016). Surfactants in aquatic and terrestrial environment: occurrence, behavior, and treatment processes. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(4), 3195–3216. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5803-x>
- Kang, J. H., Park, J. B., & Song, K. bin. (2019). Inhibitory activities of quaternary ammonium surfactants against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* inoculated on spinach leaves. *LWT*, *102*, 284–290. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.12.046>
- Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., Dirisala, V. ramu, & Kodali, V. P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, *4*(3), 241–249. <https://doi.org/10.1016/J.PETLM.2018.03.007>
- Kiran, G. S., Priyadharsini, S., Sajayan, A., Priyadharsini, G. B., Poulouse, N., & Selvin, J. (2017). Production of lipopeptide biosurfactant by a marine *Nesterenkonia* sp. and its application in food industry. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JUN), 1138. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01138/BIBTEX>

- Koim-Puchowska, B., Kłosowski, G., Mikulski, D., & Menka, A. (2019). Evaluation of various methods of selection of *B. subtilis* strains capable of secreting surface-active compounds. *PLOS ONE*, *14*(11), e0225108. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0225108>
- Korany, A. M., Hua, Z., Green, T., Hanrahan, I., El-Shinawy, S. H., El-Kholy, A., Hassan, G., & Zhu, M. J. (2018a). Efficacy of ozonated water, chlorine, chlorine dioxide, quaternary ammonium compounds and peroxyacetic acid against listeria monocytogenes biofilm on polystyrene surfaces. *Frontiers in Microbiology*, *9*(OCT), 2296. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02296>
- Korany, A. M., Hua, Z., Green, T., Hanrahan, I., El-Shinawy, S. H., El-Kholy, A., Hassan, G., & Zhu, M. J. (2018b). Efficacy of ozonated water, chlorine, chlorine dioxide, quaternary ammonium compounds and peroxyacetic acid against listeria monocytogenes biofilm on polystyrene surfaces. *Frontiers in Microbiology*, *9*(OCT), 2296. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02296/BIBTEX>
- Maresca, M. (2013). From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol. *Toxins* *2013*, Vol. 5, Pages 784–820, *5*(4), 784–820. <https://doi.org/10.3390/TOXINS5040784>
- Marriott, N. G., Schilling, M. W., & Gravani, R. B. (2018a). *Sanitation and the Food Industry* (pp. 1–17). https://doi.org/10.1007/978-3-319-67166-6_1
- Marriott, N. G., Schilling, M. W., & Gravani, R. B. (2018b). *Sanitation and the Food Industry*. 1–17. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67166-6_1
- Miljana Djordjević, Zita Šereš, Nikola Maravić, & Marijana Djordjević. (2019). Molasses: Desugarization processes and purification treatments. In K. Maddison & R. Fuller (Eds.), *Molasses: Forms, Production and Uses: Vol. I* (I, pp. 97–123). NOVA.
- Mills, J., Horváth, K. M., & Brightwell, G. (2018). Antimicrobial effect of different peroxyacetic acid and hydrogen peroxide formats against spores of *Clostridium estertheticum*. *Meat Science*, *143*(April), 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.020>
- Mo, L. Y., Liu, Y. A., Zhu, J., Qin, L. T., Liang, Y. P., & Zeng, H. H. (2020). Benefits from hazards, benefits from nothing, and benefits from benefits: the combined effects of five quaternary ammonium compounds to *Vibrio qinghaiensis* Q67. *Environmental Sciences Europe*, *32*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12302-020-00310-Z/FIGURES/5>
- Mohanty, S. S., Koul, Y., Varjani, S., Pandey, A., Ngo, H. H., Chang, J. S., Wong, J. W. C., & Bui, X. T. (2021). A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. *Microbial Cell Factories* *2021* *20*:1, *20*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/S12934-021-01613-3>
- Mohsin, M. Z., Omer, R., Huang, J., Mohsin, A., Guo, M., Qian, J., & Zhuang, Y. (2021). Advances in engineered *Bacillus subtilis* biofilms and spores, and their applications in bioremediation, biocatalysis, and biomaterials. *Synthetic and Systems Biotechnology*, *6*(3), 180–191. <https://doi.org/10.1016/J.SYNBIO.2021.07.002>
- Morrison, K. R., Allen, R. A., Minbiole, K. P. C., & Wuest, W. M. (2019). More QACs, more questions: Recent advances in structure activity relationships and hurdles in understanding resistance mechanisms. *Tetrahedron Letters*, *60*(37), 150935. <https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2019.07.026>

- Mouafo, T. H., Mbawala, A., & Ndjouenkeu, R. (2018). Effect of different carbon sources on biosurfactants' production by three strains of *Lactobacillus* spp. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5034783>
- Naciones Unidas. (2019). *Informe de los Objetivos de Desarrollo Sostenible*. https://unstats.un.org/sdgs/report/2019/The-Sustainable-Development-Goals-Report-2019_Spanish.pdf
- Nitschke, M., & Silva, S. S. e. (2017). Recent food applications of microbial surfactants. *Https://Doi.Org/10.1080/10408398.2016.1208635*, 58(4), 631–638. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1208635>
- Nounou, M. I., Zaghoul, T. I., Ahmed, N. A., Eid, A. A., & El-Khordagui, L. K. (2017). Skin permeability enhancement by *Bacillus subtilis* alkaline protease: Application to transdermal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 529(1–2), 423–432. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.06.057>
- Obe, T., Nannapaneni, R., Schilling, W., Zhang, L., McDaniel, C., & Kiess, A. (2020). Prevalence of *Salmonella enterica* on poultry processing equipment after completion of sanitization procedures. *Poultry Science*, 99(9), 4539–4548. <https://doi.org/10.1016/J.PSJ.2020.05.043>
- OMS. (n.d.). *Enfermedades transmitidas por alimentos - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. Retrieved July 20, 2021, from <https://www.paho.org/es/temas/enfermedades-transmitidas-por-alimentos>
- Ozturk, B., Argin, S., Ozilgen, M., & McClements, D. J. (2014). Formation and stabilization of nanoemulsion-based vitamin E delivery systems using natural surfactants: Quillaja saponin and lecithin. *Journal of Food Engineering*, 142, 57–63. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2014.06.015>
- Pérez-Rodríguez, M., Prieto, G., Rega, C., Varela, L. M., Sarmiento, F., & Mosquera, V. (1998). A Comparative Study of the Determination of the Critical Micelle Concentration by Conductivity and Dielectric Constant Measurements. *Langmuir*, 14(16), 4422–4426. <https://doi.org/10.1021/LA980296A>
- Piazzoli, A., Breider, F., Aquillon, C. G., Antonelli, M., & von Gunten, U. (2018). Specific and total N-nitrosamines formation potentials of nitrogenous micropollutants during chloramination. *Water Research*, 135, 311–321. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2018.02.019>
- Pires, S. M., Desta, B. N., Mughini-Gras, L., Mmbaga, B. T., Fayemi, O. E., Salvador, E. M., Gobena, T., Majowicz, S. E., Hald, T., Hoejskov, P. S., Minato, Y., & Devleeschauwer, B. (2021). Burden of foodborne diseases: think global, act local. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 39, pp. 152–159). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.01.006>
- Potter, B. D., Marcy, J. A., Owens, C. M., Slavik, M. F., Goodwin, H. L., & Apple, J. K. (2012). Impact of performance-based sanitation systems on microbiological characteristics of poultry processing equipment and carcasses as compared with traditional sanitation systems. *Journal of Applied Poultry Research*, 21(3), 669–678. <https://doi.org/10.3382/JAPR.2011-00513>
- Pradhan, A., & Bhattacharyya, A. (2018). An Alternative Approach for Determining Critical Micelle Concentration: Dispersion of Ink in Foam. *Journal of Surfactants and Detergents*, 21(5), 745–750. <https://doi.org/10.1002/JSDE.12165>

- Reichert, C. L., Salminen, H., Badolato Bönisch, G., Schäfer, C., & Weiss, J. (2018). Concentration effect of Quillaja saponin – Co-surfactant mixtures on emulsifying properties. *Journal of Colloid and Interface Science*, 519, 71–80. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2018.01.105>
- Ribeiro, B. G., Guerra, J. M. C., & Sarubbo, L. A. (2020). Biosurfactants: Production and application prospects in the food industry. *Biotechnology Progress*, 36(5), e3030. <https://doi.org/10.1002/BTPR.3030>
- Romero-Peña, M., Ng, E. K., & Ghosh, S. (2020). Development of thermally stable coarse water-in-oil emulsions as potential DNA bioreactors. *https://Doi.Org/10.1080/01932691.2020.1794886*, 42(14), 2075–2084. <https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1794886>
- Rosen, M. J., & Kunjappu, J. T. (2012). *Surfactants and Interfacial Phenomena: Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781118228920>
- Sang, C., An, W., Han, M., & Yang, M. (2019). Health risk assessment on N-nitrosodimethylamine in drinking water and food in major cities of China with disability-adjusted life years (DALYs). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 412–417. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.11.128>
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS17030401>
- Schultz, J., & Rosado, A. S. (2020). Extreme environments: a source of biosurfactants for biotechnological applications. *Extremophiles*, 24(2), 189–206. <https://doi.org/10.1007/S00792-019-01151-2/FIGURES/3>
- Serrano, L., Sosa Moreno, A., Sosa Del Castillo, D., Bonilla, J., Romero, C. A., Galarza, L. L., & Coronel-león, J. R. (2021). Biosurfactants synthesized by endophytic Bacillus strains as control of Moniliophthora perniciosa and Moniliophthora roreri. *Scientia Agricola*, 78. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2020-0172>
- Sethi, S., Nayak, S. L., Joshi, A., & Sharma, R. R. (2019). Sanitizers for fresh-cut fruits and vegetables. In *Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Technologies and Mechanisms for Safety Control*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816184-5.00005-7>
- Sharma, R., Singh, J., & Verma, N. (2020). Statistical optimization and comparative study of lipopeptides produced by Bacillus amyloliquefaciens SAS-1 and Bacillus subtilis BR-15. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 25, 101575. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101575>
- Singh, A. K., & Sharma, P. (2020a). Disinfectant-like activity of lipopeptide biosurfactant produced by Bacillus tequilensis strain SDS21. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 185, 110514. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2019.110514>
- Singh, A. K., & Sharma, P. (2020b). Disinfectant-like activity of lipopeptide biosurfactant produced by Bacillus tequilensis strain SDS21. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 185, 110514. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2019.110514>
- Slivinski, C. T., Mallmann, E., de Araújo, J. M., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2012). Production of surfactin by Bacillus pumilus UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based

- on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. *Process Biochemistry*, 47(12), 1848–1855. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2012.06.014>
- Smith, M. L., Gandolfi, S., Coshall, P. M., & Rahman, P. K. S. M. (2020). Biosurfactants: A Covid-19 Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1341. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01341/BIBTEX>
- Sneed, J., Strohhahn, C., Gilmore, S. A., & Mendonca, A. (2004). Microbiological evaluation of foodservice contact surfaces in Iowa assisted-living facilities. *Journal of the American Dietetic Association*, 104(11), 1722–1724. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2004.08.026>
- Song, Y., Lee, J. H., Jung, I., Seo, B., & Hwang, H. (2020). Molecular Dynamics Simulations of Micelle Properties and Behaviors of Sodium Lauryl Ether Sulfate Penetrating Ceramide and Phospholipid Bilayers. *Journal of Physical Chemistry B*, 124(28), 5919–5929. https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.0C02856/SUPPL_FILE/JP0C02856_SI_001.PDF
- Stoica, M. (2018). Sustainable Sanitation in the Food Industry. *Sustainable Food Systems from Agriculture to Industry*, 309–339. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811935-8.00009-3>
- Sulek, M. W., Wasilewski, T., & Kurzydłowski, K. J. (2010). The effect of concentration on lubricating properties of aqueous solutions of sodium lauryl sulfate and ethoxylated sodium lauryl sulfate. *Tribology Letters*, 40(3), 337–345. <https://doi.org/10.1007/S11249-010-9668-3/FIGURES/5>
- Suryanti, V., Handayani, D. S., Marliyana, S. D., & Suratmi, S. (2017). Physicochemical Properties of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas fluorescens* Grown on Whey Tofu. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 176(1), 012003. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/176/1/012003>
- Tao, J., Liu, W., Ding, W., Han, R., Shen, Q., Xia, Y., Zhang, Y., & Sun, W. (2020). A multiplex PCR assay with a common primer for the detection of eleven foodborne pathogens. *Journal of Food Science*, 85(3), 744–754. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15033>
- Théâtre, A., Cano-Prieto, C., Bartolini, M., Laurin, Y., Deleu, M., Niehren, J., Fida, T., Gerbinet, S., Alanjary, M., Medema, M. H., Léonard, A., Lins, L., Arabolaza, A., Gramajo, H., Gross, H., & Jacques, P. (2021). The Surfactin-Like Lipopeptides From *Bacillus* spp.: Natural Biodiversity and Synthetic Biology for a Broader Application Range. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 118. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.623701/BIBTEX>
- Tirloni, E., Bernardi, C., Celandroni, F., Ghelardi, E., & Stella, S. (2021). Effectiveness of lactic and acetic acids on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in primo sale fresh cheese. *LWT*, 151, 112170. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.112170>
- Valenzuela Ruiz, V., Gálvez Gamboa, G. T., Villa Rodríguez, E. D., Parra Cota, F. I., Santoyo, G., Santos-Villalobos, S. de los, Valenzuela Ruiz, V., Gálvez Gamboa, G. T., Villa Rodríguez, E. D., Parra Cota, F. I., Santoyo, G., & Santos-Villalobos, S. de los. (2020). Lipopeptides produced by biological control agents of the genus *Bacillus*: a review of analytical tools used for their study. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(2), 419–432. <https://doi.org/10.29312/REMEXCA.V11I2.2191>
- Wang, J., Sun, Y., Tao, D., Wang, S., Li, C., Zheng, F., & Wu, Z. (2019a). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and naturally present microbe counts on lettuce using an acid mixture of acetic and lactic acid. *Microorganisms*, 7(10), 4–6. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7100373>

- Wang, J., Sun, Y., Tao, D., Wang, S., Li, C., Zheng, F., & Wu, Z. (2019b). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and Naturally Present Microbe Counts on Lettuce using an Acid Mixture of Acetic and Lactic Acid. *Microorganisms* 2019, Vol. 7, Page 373, 7(10), 373. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7100373>
- Wu, Q., Zhi, Y., & Xu, Y. (2019). Systematically engineering the biosynthesis of a green biosurfactant surfactin by *Bacillus subtilis* 168. *Metabolic Engineering*, 52(August 2018), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2018.11.004>
- Ying, G. G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. In *Environment International* (Vol. 32, Issue 3, pp. 417–431). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.07.004>
- Yu Neo, S., Yan Lim, P., Kai Phua, L., Hoon Khoo, G., Kim, S.-J., Lee, S.-C., & Yuk, H.-G. (2013). Efficacy of chlorine and peroxyacetic acid on reduction of natural microflora, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on mung bean sprouts. *Food Microbiology*, 36, 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.001>
- Yuan, Y., Qu, K., Tan, D., Li, X., Wang, L., Cong, C., Xiu, Z., & Xu, Y. (2019). Isolation and characterization of a bacteriophage and its potential to disrupt multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 128, 329–336. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2019.01.032>
- Zaffora, A., di Franco, F., & Santamaria, M. (2021). Corrosion of stainless steel in food and pharmaceutical industry. In *Current Opinion in Electrochemistry* (Vol. 29). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2021.100760>
- Zamuner, C. F. C., Dilarri, G., Bonci, L. C., Saldanha, L. L., Behlau, F., Marin, T. G. S., Sass, D. C., Bacci, M., & Ferreira, H. (2020). A cinnamaldehyde-based formulation as an alternative to sodium hypochlorite for post-harvest decontamination of citrus fruit. *Tropical Plant Pathology*, 45(6), 701–709. <https://doi.org/10.1007/s40858-020-00338-9>
- Zhang, C., Cui, F., Zeng, G. ming, Jiang, M., Yang, Z. zhu, Yu, Z. gang, Zhu, M. ying, & Shen, L. qing. (2015). Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *Science of the Total Environment*, 518–519, 352–362. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.007>
- Zhao, Y., Yang, S. Z., & Mu, A. B. Z. (2012). Quantitative analyses of the isoforms of surfactin produced by *Bacillus subtilis* HSO 121 using GC-MS. *Analytical Sciences : The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 28(8), 789–793. <https://doi.org/10.2116/ANALSCI.28.789>