

Producción microbiana de biosurfactantes en lactosuero por *Pseudomonas aeruginosa*

BENAVIDES CARRASCO ARANTXA, RAMÍREZ CASTILLO MARÍA LETICIA¹

¹Laboratorio de Investigación y Posgrado, Universidad Politécnica de Puebla, 3er Carril del Ejido Serrano S/N, San Mateo Cuanalá, Juan C. Bonilla, Puebla, CP 72640, E-mail: arantxa.benavides@up Puebla.edu.mx

Compiled 28 de noviembre de 2017

*En el presente trabajo se muestra la cinética de producción de biosurfactantes, que son moléculas anfifílicas que tienen propiedades tensoactivas y emulsificantes con *Pseudomonas aeruginosa* en un cultivo lote, utilizando suero de leche previamente desproteinizado como fuente de carbono teniendo como máxima producción 18.6 g/L de biosurfactante crudo. También se midieron índices de emulsificación en aceite, diésel y gasolina después de 24 horas para comprobar la utilidad del biosurfactante obtenido.* © 2017 Universidad Politécnica de Puebla

OCIS codes:

<http://dx.doi.org/10.1364/ao.XX.XXXXXX>

1. INTRODUCCIÓN

Un biosurfactante básicamente es una molécula anfifílica producida por algún tipo de microorganismo, que posee tanto una región hidrofóbica como una hidrofílica, cuya principal propiedad es la de disminuir la tensión superficial entre líquidos inmiscibles con el agua, reduciendo por lo tanto la energía requerida para la formación de emulsiones e incrementando en el proceso la solubilidad de las mismas [1].

Actualmente casi todos los tensoactivos que se utilizan son derivados químicamente a partir del petróleo y las tres principales razones por las cuáles estos surfactantes sintéticos siguen siendo producidos en mayor cantidad son: la capacidad y costos de producción, aunados a la funcionalidad del tensoactivo, pero los biosurfactantes tienen varias ventajas sobre los surfactantes químicos ya que son menos tóxicos, son biodegradables y por lo tanto tienen una mejor compatibilidad con el medio ambiente, tienen mayor capacidad de formación de espumas [2] y la característica más importante desde el punto de vista biotecnológico, radica en que pueden ser sintetizados a partir de materias primas renovables y con el fin de economizar la producción se busca utilizar diferentes fuentes de carbono de fácil acceso y de bajo costo, tales como melaza, suero de leche, glicerina, cáscaras de naranja, aceites vegetales y desechos de la industria alimentaria [3].

Debido a sus múltiples propiedades, las aplicaciones de los biosurfactantes están tomando importancia en diversos campos, pueden ser utilizados como emulsificantes, agentes humectantes y espumantes, ingredientes de alimentos y bebidas, lubricantes,

detergentes, agroquímicos, cosméticos, productos farmacéuticos y en la industria minera y metalúrgica, pero también juegan un papel importante los procesos de recuperación de petróleo mediante el aumento de la solubilidad aparente de componentes de este hidrocarburo y la reducción efectiva de las tensiones interfaciales de aceite y agua [4].

Es por eso que en los últimos años, se ha buscado desarrollar e implementar el uso de biosurfactantes como tecnologías innovadoras enfocadas en biorremediación para limpiar zonas contaminadas por metales pesados, hidrocarburos y sus derivados, elevando los índices de degradación de estos y recuperando las zonas afectadas.

Tomando en cuenta los antecedentes de producción de biosurfactantes, se ha encontrado que las especies de *Pseudomonas* son buenas en la síntesis de los mismos y que en diferentes sustratos producen un tensoactivo de tipo ramnolípido [5].

Un ramnolípido es un compuesto formado por una molécula de ácido β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoico y una o dos moléculas de ramnosa (figura 1), de ahí la diferencia entre monoramnolípidos y dirramnolípidos [6].

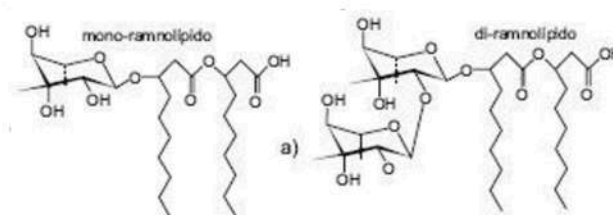


Fig. 1. Estructura de mono y di-ramnolípidos.

Finalmente, en este trabajo se propone utilizar el residuo de la industria quesera (suero de leche) como fuente de carbono, junto con la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* para sintetizar biosurfactantes en un cultivo lote y analizar la cinética de crecimiento de biomasa y de producción.

2. METODOLOGÍA

A. Materia Prima

El suero de leche utilizado en los experimentos fue recolectado de un establo en el Municipio de Puebla en el Estado de

Puebla. La principal actividad del lugar es la maquila de productos derivados de la leche.

A.1. Caracterización

La caracterización del residuo que se utilizó como materia prima, se llevó a cabo mediante un analizador ultrasónico (LAC-TOSCAN®), que reporta los siguientes parámetros: grasa (FAT), sólidos no-grasos (SNF), proteínas, lactosa y porcentaje de contenido de agua, temperatura (°C), pH, punto de congelación, sólidos, conductividad así como densidad de la muestra.

A.2. Microorganismo

Se utilizaron las bacterias de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas de la colección de microorganismos de la Universidad de Chilpancingo.

Las bacterias aisladas se sembraron en placas de agar sangre para observar su capacidad hemolítica y fueron incubadas durante 24 horas a 30°C, después de ese periodo fueron visualmente inspeccionadas y aquellas que presentaron una β -hemólisis se consideraron como posibles productoras de biosurfactantes [7].

A.3. Medio de cultivo

En la Tabla 1 se muestra la composición del medio sintético empleado para realizar el pre-inóculo en tubos, el inóculo en matraz y el cultivo en reactor de 1 litro en el cuál se cultivó la bacteria seleccionada.

Cuadro 1. Composición del medio sintético para la producción de biosurfactantes [8].

Reactivo	Concentración(g/L)
$NaNO_3$	2.0
$KHPO_4$	1.0
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
KCL	0.10
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.010
$CaCl_2$	0.001
Fuente de Carbono (suero de leche)	20.0

A.4. Proceso de fermentación

El suero fue inicialmente procesado ajustando el pH a 7 por medio de la adición de NaOH 1N y calentado posteriormente para mejorar la precipitación de la caseína, después se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 7500 rpm por un periodo de 12 minutos para remover la caseína, en su totalidad y el pH del sobrenadante fue nuevamente neutralizado y sometido a esterilización en autoclave (121°C durante 15 min) y finalmente el suero estéril fue inoculado con *P.aeruginosa*.

El cultivo lote para la producción de biosurfactantes se llevó a cabo en un reactor de 1L de capacidad total, con un volumen de trabajo de 400 ml a 30°C por 110 horas con agitación constante (150 rpm y 1 vvm de aireación). [9].

El 10% v/v del cultivo fue utilizado como inóculo y fue incubado por un periodo de 48 h.

A.5. Métodos analíticos

En estos experimentos, las variaciones puntuales en las concentraciones de biomasa, sustrato y producto se registraron durante un período total de 110 horas, tomando muestras para los análisis cada 4 horas. La biomasa se midió por el método de peso seco, la concentración de sustrato se calculó como el total de azúcares reductores y el producto, que fue identificado como glicolípido, que se estimó mediante un método de extracción con ácido clorhídrico.

A.5.1 Determinación de biomasa

El crecimiento de biomasa se siguió por medio de la lectura a 600 nm en un espectrofotómetro de la densidad óptica (DO) de la muestra, cuando fue necesario se realizaron diluciones con agua destilada para medir DO con valores menores de 1.

La determinación de la concentración de biomasa se realizó por el método gravimétrico. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 15 min en tubos Eppendorf previamente puestos a peso constante, se separó el paquete celular (biomasa) del sobrenadante y se hicieron dos lavados de la biomasa (el pellet fue resuspendido en agua destilada y recentrifugado.

La cantidad de biomasa fue determinada por diferencia de peso después de searla a 90°C por 24 h. El sobrenadante fue conservado y directamente utilizado para análisis de azúcares reductores e índice de emulsificación.

A.5.2 Determinación de azúcares reductores

Como se comentó previamente, para este análisis se utilizó el sobrenadante obtenido de la centrifugación de las muestras y fue utilizado el método DNS (ácido denitrosalicílico) propuesto por Bernfield en 1951 [10], para su cuantificación se realizó una curva estándar de lactosa con concentración conocida de 0 a 2 g/L, y las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a una absorbancia de 540 nm

A.5.3 Determinación de índice de emulsificación

Para la medición de índice de emulsificación, se añadieron hidrocarburos (diésel, gasolina y aceite vegetal) a la fase acuosa que contiene el biotensioactivo en una proporción de 3:2, v/v, seguido de agitación vigorosa en un vórtex durante 2 minutos. El aceite, la emulsión y las capas acuosas se midieron en un intervalo de 24 horas . El índice de emulsificación se observó con respecto al tiempo [11] y está representado como E24 (%) y fue calculado de acuerdo a la ecuación 1.

$$\%I.E = \frac{\text{Altura de Emmulsión}}{\text{Altura Total}} \quad (1)$$

A.5.4 Recuperación de biosurfactante crudo

El tensoactivo se aisló de caldo libre de células por precipitación ajustando el pH del sobrenadante a 2.0 usando HCl y manteniéndolo a 4°C durante la noche.

El precipitado obtenido de este modo se centrifugó a 8000 rpm durante 20 minutos, se secó en la estufa hasta peso constante [12].

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Selección de cepa

En la figura 2 se muestra el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en una placa de agar sangre, en donde se puede observar el halo blanco (correspondiente a la β -hemólisis) que rodea a las colonias, por lo que se confirmó que la cepa era productora de biosurfactantes, ya que la hemólisis es considerada como un

indicativo de la lisis celular debido a la ruptura de la membrana, causada por la presencia de sustancias de superficie activas. [13]



Fig. 2. Cultivo de *P. aeruginosa* en agar sangre.

A.1. Análisis proximal

En la Tabla 2. Se muestran los resultados en porcentaje del análisis proximal realizado al suero de leche que se utilizó como materia prima.

Cuadro 2. Análisis proximal de suero de leche.

Parámetro	(%)
Grasas	0.874
Cenizas	0.480
Sólidos no grasos	6.568
Proteína	3.107
Lactosa	2.964
Agua añadida	33.563
Temperatura °C	23.733
Temperatura de congelación °C	-0.345
Densidad	24.457

A.2. Cinética del cultivo lote

El comportamiento de la fermentación se presenta en la figura 3, donde podemos notar que en las primeras 50 horas de cultivo no hubo una reducción notable de lactosa, ni un incremento acelerado en la producción de biomasa, fue hasta la hora 64 donde se dio la máxima producción de biosurfactante (18.6 g/L).

A.3. Índice de emulsificación

La actividad emulsionante está determinada por su fuerza en la retención de la emulsión de hidrocarburos o aceites en agua. El biotensioactivo extraído emulsionó eficazmente con el aceite, ya que la formación de la emulsión estable se observó con ella con alto índice de emulsificación con un valor de 68 % después de 24 horas.

El presente estudio también reveló que los índices de emulsión y estabilidad de emulsión del biosurfactante obtenido en

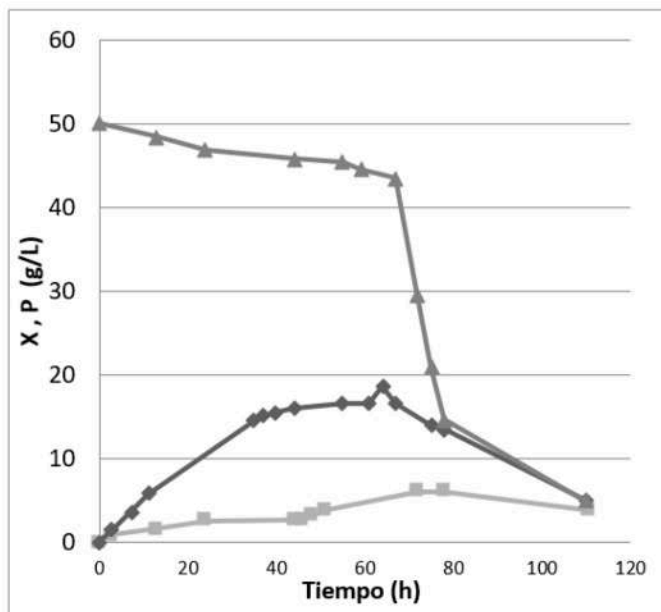


Fig. 3. Cinética de cultivo lote (Δsustrato) (◇producto) (biomasa).

aceite y diésel no fue tan eficaz, ya que se obtuvieron porcentajes de índices de emulsificación de 10.6 y 8.3 respectivamente. En el gráfico siguiente (Figura 4), se muestran los índices de emulsificación obtenidos a diferentes tiempos de fermentación.

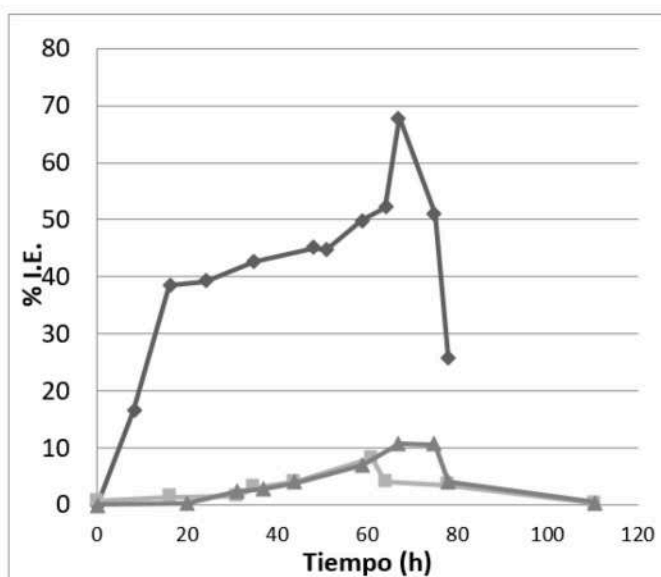


Fig. 4. Índices de emulsificación (Δgasolina) (◇aceite) (diésel).

4. CONCLUSIONES

Debido a la β-hemólisis presentada en la incubación en placas de agar sangre, la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resultó ser una bacteria productora de biosurfactantes.

La buena transferencia de oxígeno dentro del reactor es un parámetro imprescindible para la producción de biosurfactantes.

La mayor concentración de biosurfactante crudo fue de 18.6 g/L y el porcentaje de emulsificación más alto fue en aceite con

un 68%.

Se necesita hacer la caracterización del biosurfactante obtenido para poder determinar qué tipo de glicolípido es (ramnolípido o dirramnolípido).

5. NOMENCLATURA

t	tiempo, h
x	concentración de biomasa, gx/L
s	concentración de sustrato, gs/L
p	concentración de producto, gp/L
rpm	revoluciones por minuto, 1/min
vvm	volumen de aire por volumen de medio minuto, L/Lmin
V	volumen, L

6. AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de Maestría en Ingeniería de la Ing. Arantxa Benavides Carrasco.

A la Universidad de Chilpancingo por proporcionarnos los microorganismos para llevar a cabo los experimentos realizados.

7. REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. J. Giraldo, "Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* pb25: Evaluación de su actividad emulsificante y de remoción de metales pesados," Ph.D. thesis, Tesis de Licenciatura en Biología (Microbiología y Parasitología), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú (2012).
2. M. G. Rikalovic, G. Gojic-Cvijovic, M. M. Vrvic, and I. Karadzic, *Journal of the Serbian Chemical Society* **77**, 27 (2012).
3. A. K. Colak and H. Kahraman, *Environmental and Experimental Biology* **11**, 125 (2013).
4. M. M. Müller, J. H. Kügler, M. Henkel, M. Gerlitzki, B. Hörmann, M. Pöhnlein, C. Syldatk, and R. Hausmann, *Journal of biotechnology* **162**, 366 (2012).
5. M. Nitschke, S. G. Costa, and J. Contiero, *Process Biochemistry* **46**, 621 (2011).
6. M. Sánchez Martínez *et al.* (2010).
7. R. M. Jain, K. Mody, A. Mishra, and B. Jha, *Carbohydrate polymers* **87**, 2320 (2012).
8. P. S. Babu, A. Vaidya, A. Bal, R. Kapur, A. Juwarkar, and P. Khanna, *Biotechnology letters* **18**, 263 (1996).
9. K. Dubey and A. Juwarkar, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**, 61 (2001).
10. A. Worthington, New Jersey: Worthington Biochemical Corporation (1972).
11. D. G. Cooper and B. G. Goldenberg, *Applied and environmental microbiology* **53**, 224 (1987).
12. M. Nitschke, C. Ferraz, and G. M. Pastore, *Brazilian Journal of Microbiology* **35**, 81 (2004).
13. J. Toribio-Jiménez, J. C. V. Aradillas, Y. R. Ramírez, M. Á. R. Barreira, J. D. C. González, J. G. Luna, J. L. A. Noyola, and A. F. Torres, "Pseudomonas sp productoras de biosurfactantes," (2014).