

Producción microbiana de polihidroxicanoatos a partir de suero de leche

Castro-Ramos J. J.¹, Ramírez-Castillo M. L.¹, Toribio-Jiménez J.²

¹Laboratorio de Investigación y Posgrado, Universidad Politécnica de Puebla, Tercer Carril del Ejido Serrano S/N, San Mateo Cuanalá, Juan C. Bonilla, Puebla, CP 72640.

²Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Universidad Autónoma de Guerrero, Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas. Av. Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria Sur, Chilpancingo, Guerrero.

E-mail: job.castro@uppuebla.edu.m; letyram@unam.mx; jtoribio@uagro.mx

Abstract

Dada su biodegradabilidad los polihidroxicanoatos encuentran su principal aplicación en la fabricación de plásticos no contaminantes sin embargo, su producción es más costosa siendo la fuente de carbono el 40-50 % del costo del proceso. En este aspecto el suero de leche se presenta como un sustrato de nulo costo capaz de ser aprovechable dada su composición. En este proyecto se realizó una comparación de la producción de PHA por *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa*, habiéndose alcanzado el 38.9 % de PHA del peso seco celular de *P. putida* utilizando suero de leche como sustrato.

Palabras clave: PHA, suero de leche

1 Introducción

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros biodegradables de origen biológico los cuales, debido a sus propiedades físicas, pueden ser utilizados como sustitutos de plásticos petroquímicos [1]. Los PHA son sintetizados intracelularmente por algunos organismos procariontes para ser utilizados como fuente de carbono y energía de reserva [2]. Están compuestos por monómeros de ácidos hidroxialcanoicos formando homopolímeros o copolímeros por medio de la polimerización de su grupo hidroxilo con el grupo carboxilo del monómero siguiente [3]. En la Figura 1 se muestra la estructura general de los PHA.

Los PHA se clasifican según la cantidad de moléculas de carbono de sus monómeros constituyentes dando lugar a polímeros de cadena corta (PHAscl) y de cadena media (PHAmcl) [4].

Aunado a esto, el peso molecular determina las propiedades mecánicas del polímero y por lo tanto su campo de aplicación [5].

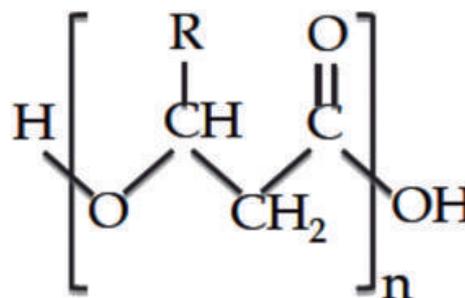


Figura 1. Estructura general de los PHA.

Adicionalmente el interés por los PHA se extiende al área médica dado que también presentan características de biocompatibilidad al no generar respuesta inmune cuando se introducen en tejidos blandos o en la sangre [6]. Un ejemplo de esto se encuentra en la ingeniería de tejidos, ésta consiste en generar tejidos, potencialmente órganos utilizando estructuras de PHA preformadas como moldes [7].

Entre los géneros de microorganismos que han sido descritos como productores de PHA se encuentran *Lactococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Pantoea* y *Gluconobacter*, *Pseudomonas* y *Azotobacter*. Algunos de éstos pueden acumular hasta el 90% de PHA de su peso en base seca [7], [8]. Tal es el caso de *Enterobacter cloacae* con la cual [9] reportan haber obtenido el 94 % de PHAmcl del peso seco celular utilizando lactosa como sustrato, mientras que [10] obtuvieron el 19.6 % con *Pseudomonas aeruginosa* y el 61.8 % con *Pseudomonas putida* utilizando aceite de arroz.

Por otra parte, la utilización de sustratos de bajo o nulo costo como son residuos y subproductos de algunas industrias toma cada vez más relevancia para disminuir los costos de producción. Particularmente en la producción de PHA la fuente de carbono representa del 40% al 50% del costo total del proceso. [11], [12].

En este aspecto, el suero de leche se presenta como una alternativa importante. Es un subproducto de la industria láctea considerado por mucho tiempo como un problema de contaminación ambiental debido a su elevada carga orgánica [13] y altos volúmenes de producción [12], [14]. Sin embargo, por su contenido de lactosa así como de nutrientes y proteínas, el suero de leche puede ser utilizado como fuente de carbono y nutrientes en bioprocesos [15] además de que se ha estudiado su aprovechamiento en la obtención de proteínas de interés farmacéutico y alimenticio [16], [17].

En este proyecto se realizó la comparación de la producción de PHA por *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aeruginosa* utilizando suero de leche y suero de leche hidrolizado como sustrato.

Metodología

2.1 Microorganismos y medio de cultivo

P. putida y *P. aeruginosa* fueron donadas por la Universidad Autónoma de Guerrero mientras que *A. vinelandii*, *B. megaterium* y *E. cloacae* fueron proporcionadas por la Colección Nacional de Cepas Microbianas del CINVESTAV. Todas las cepas fueron sembradas en medio líquido PY glucosa y posteriormente conservadas en glicerol (50% V/V).

Los medios de cultivo utilizados en los procesos de fermentación fueron suero de leche y suero de leche hidrolizado.

2.2 Suero de leche

El suero de leche utilizado fue obtenido de una quesería de la localidad de Santa Ana Xalmimilulco del municipio de Huejotzingo, Puebla y almacenado a 4° C.

2.2.1 Tratamiento de suero de leche

Se incrementó el pH del suero de leche hasta 7.4 y se esterilizó en autoclave a 120°C por 15 min. Posteriormente se centrifugó a 7500 rpm por 15 min y se recuperó el sobrenadante manteniendo la esterilidad.

2.2.2 Hidrólisis ácida de suero de leche

Con el propósito de ampliar la comparación para la producción de PHA por las cepas mencionadas, se realizó una hidrólisis ácida de suero de leche, para de esta forma, obtener diferentes azúcares susceptibles de ser fermentados por los microorganismos. Se disminuyó el pH de suero de leche hasta 1.5 y se calentó a 90°C durante 1 h en agitación constante. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se ajustó el pH a 7.4. Se esterilizó en autoclave a 120°C por 15 min y posteriormente se centrifugó a 7500 rpm por 15 min y se recuperó el sobrenadante manteniendo la esterilidad.

2.3 Preparación del inóculo

Los inóculos fueron preparados colocando 0.1 ml de cada cepa conservada en glicerol en 50 ml de medio de cultivo con las siguientes composiciones: para *P. putida* y *P. aeruginosa* se utilizó en g/L: Na₂HPO₄ 6.7, KH₂PO₄ 1.5, (NH₄)₂SO₄ 1, MgSO₄ 7H₂O 0.2, CaCl₂ 0.01, (NH₄)₂HC₆H₅O₇ 0.06, FeSO₄ 0.01 y 1 ml de solución de sales traza; para *B. megaterium*: KH₂PO₄ 2, Na₂HPO₄ 0.6, MgSO₄ 7H₂O 1, Extracto de levadura 0.1 y 1 ml de solución de sales traza; para *A. vinelandii*: extracto de levadura 3, peptona 5; para *E. cloacae*: KH₂PO₄ 3, Na₂HPO₄ 6, NH₄Cl 2, NaCl 5 y MgSO₄ 7H₂O 1. En todos los medios se adicionó el 1% de glucosa.

La solución de sales traza contenía en g/L: H₃BO₃ 0.3, ZnSO₄ 0.1, NaMoO₄ 2H₂O 0.03, NiCl₂ 0.02 y CuSO₄ 5H₂O 0.01.

Todos los inóculos se incubaron a 30°C y 100 rpm en matraces con bafles durante 48 h.

2.4 Proceso de fermentación

Las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces de 500 ml con un volumen de operación de 100 ml utilizando como medio de cultivo suero de leche o suero de leche hidrolizado diluido 1:2 y adicionado con los componentes mencionados para cada microorganismo, excepto glucosa. Se agregaron 10 ml del inóculo correspondiente en cada uno de los matraces y se incubó a 30°C y 100 rpm durante 48 h.

2.5 Determinaciones analíticas

2.5.1 PHA

El contenido de PHA se determinó por el método de digestión con hipoclorito de sodio y cloroformo [18] y posterior cuantificación gravimétrica. Se centrifugaron 15 ml de muestra a 7500 rpm por 12 min y se lavó la biomasa recuperada. Posteriormente se agregaron 5 ml de hipoclorito de sodio (5%) y 5 ml de cloroformo y se llevó a 30 °C en agitación

constante. Después de 1.5 h se centrifugó nuevamente bajo las condiciones mencionadas. Se sustrajo la fase inferior del centrifugado con ayuda de una pipeta, se colocó en un crisol puesto a peso constante y se secó a 70 °C durante 24 hrs. Se cuantificó por diferencia de pesos.

2.5.2 Biomasa

La determinación de biomasa se realizó por peso seco. Se colocaron 8 ml de muestra en viales puestos a peso contante y se centrifugó a 7500 rpm por 15 min. Posteriormente se decantó el sobrenadante, se lavó dos veces con agua destilada la biomasa recuperada y se secó en estufa a 70 °C hasta peso constante. Se realizó la cuantificación por diferencia de pesos.

2.5.3 Azúcares

Se determinó la concentración de azúcares reductores de suero de leche, hidrolizado de suero de leche y de las muestras de los cultivos por el método de DNS utilizando una curva estándar de lactosa de 0 a 2 g/L. Se realizaron diluciones de las muestras cuando fue necesario.

3 Resultados y discusión

Se obtuvo una concentración de azúcares reductores de 43.54 g/L en suero de leche y de 43.23 g/L en hidrolizado de suero de leche, por lo cual, después de las diluciones hechas (1:2) la concentración inicial de los medios de cultivo utilizados fue de aproximadamente 21.77 g/L y 21.61 g/L respectivamente. La Figura 2 presenta la concentración de biomasa obtenida a las 48 h de fermentación de cada una de las cepas cultivadas en suero de leche e hidrolizado de suero de leche.

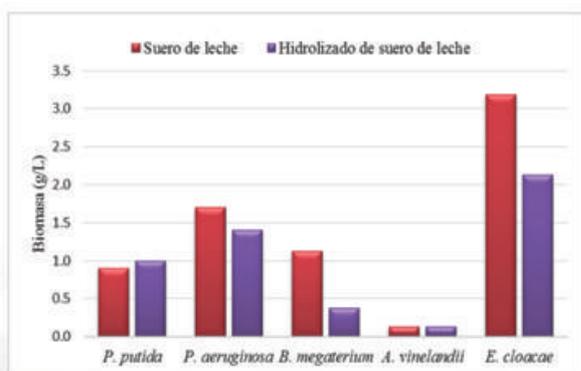


Figura 2. Concentración de biomasa a las 48 h de cultivo en suero de leche y suero de leche hidrolizado.

Puede observarse que la mayor concentración de biomasa fue alcanzada por *E. cloacae* en suero de

leche e hidrolizado de suero de leche con 3.19 g/L y 2.13 g/L respectivamente, seguida de *P. aeruginosa* con 1.7 g/L y 1.4 g/L. Los dos microorganismos presentaron mayor crecimiento en suero de leche. Por el contrario *A. vinelandii* presentó la menor producción de biomasa de las cepas comparadas en este estudio debido a que algunos autores indican que requiere de condiciones de aireación altas, siendo este un factor determinante para su crecimiento [19].

Como se observa en la Figura 3, la mayor concentración de PHA fue obtenida por *P. aeruginosa* (0.38 g/L) en hidrolizado de suero de leche, seguida de *P. putida* con una concentración de 0.35 g/L en suero de leche, mientras que *B. megaterium* y *A. vinelandii* obtuvieron la menor concentración de PHA con 0.1 g/L y 0.025 g/L respectivamente en ambos medios de cultivo

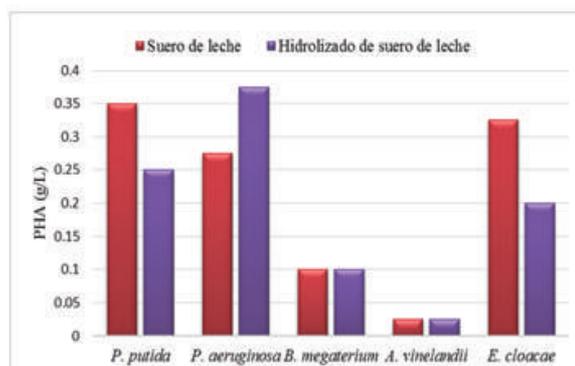


Figura 3. Concentración de PHA a las 48 h de cultivo utilizando suero de leche y suero de leche hidrolizado.

El mayor porcentaje de PHA del peso seco celular fue obtenido por *P. putida* con 38.89% (Figura 4) utilizando suero de leche siendo mayor al obtenido por [20] (25.7%) con hidrolizados de pasto y menor al obtenido por [10] (61.8%) con aceite de arroz grado alimenticio para PHAmcl.

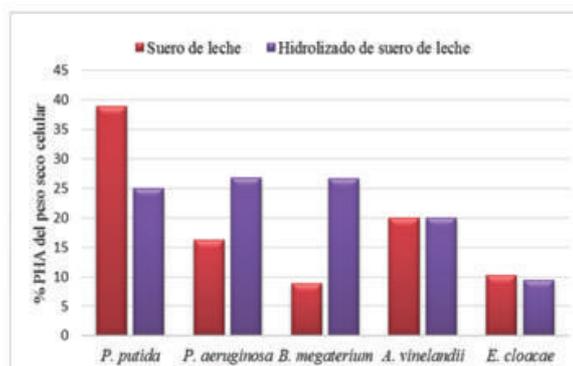


Figura 4. Porcentaje de PHA del peso seco celular.

Por su parte *P. aeruginosa* alcanzó un porcentaje de 26.8% utilizando hidrolizado de suero de leche en comparación con el 19.6 % reportado por [10] con aceite de arroz grado alimenticio para PHAmcl mientras que [21] obtuvieron el 60% utilizando ácido oleico como sustrato en un medio optimizado.

A pesar de haber presentado una baja producción de biomasa, *B. megaterium* alcanzó el 26.7 % de PHA del peso seco celular en hidrolizado de suero de leche, siendo mayor al reportado por [22] (0.76%) utilizando suero de leche como sustrato, mientras que [23] obtuvieron el 60% utilizando residuos lácteos con azúcar de palma en cultivo de estado sólido. Por su parte, [24] utilizando lactosa obtuvieron una concentración de biomasa de 0.4 g/L y un porcentaje de PHA del peso seco celular del 23%.

En suero de leche, *P. putida* alcanzó la mayor concentración de PHA con 0.35 g/L y el mayor porcentaje de PHA del peso seco celular con 38.89 % de la cepas utilizadas mientras que en los cultivos llevados a cabo en hidrolizado de suero de leche *P. aeruginosa* obtuvo la concentración más alta de PHA con 0.38 g/L y el mayor porcentaje de PHA del peso seco celular con 26.8 %.

Aunque *E. cloacae* produjo la mayor cantidad de biomasa en suero de leche (3.19 g/L) y suero de leche hidrolizado (2.13 g/L), solo fue capaz de acumular cerca del 10% de PHA del peso seco celular. Esto contrasta con lo obtenido por [9] quienes reportaron haber alcanzado un 94% utilizando un medio de cultivo con 8 g/L de lactosa como fuente de carbono. En la Figura 5 se observa al PHA obtenido de los cultivos realizados con *P. putida*.

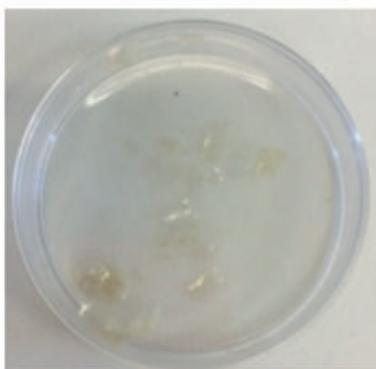


Figura 5. PHA obtenido de *P. putida*.

En la Figura 6 se muestra la concentración final de azúcares reductores de los cultivos llevados a cabo con suero de leche e hidrolizado de suero de leche. Puede observarse que *E. cloacae*, *P. putida* y *P. aeruginosa* consumieron la mayoría de los azúcares, mientras que *A. vinelandii* y *B. megaterium* presentaron un consumo mínimo.

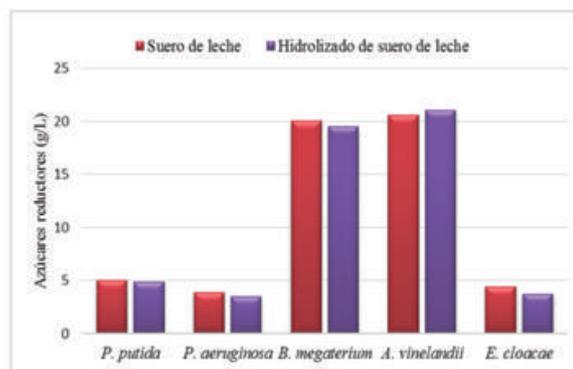


Figura 6. Azúcares reductores totales a las 48 h de cultivo con suero de leche y suero de leche hidrolizado.

4 Conclusión

Se realizó la comparación de la producción de PHA por *P. putida*, *P. aeruginosa*, *A. vinelandii*, *B. megaterium* y *E. cloacae* utilizando suero de leche e hidrolizado de suero de leche como sustrato. Se alcanzó una concentración máxima de PHA de 0.38 g/L con *P. aeruginosa* utilizando hidrolizado de suero de leche, mientras que el mayor porcentaje de PHA del peso seco celular fue obtenido por *P. putida* con el 38.89 % utilizando suero de leche como sustrato. La mayor producción de biomasa fue obtenida por *E. cloacae* sin embargo la producción de PHA fue baja alcanzando un porcentaje de PHA del peso seco celular de 10.2% y 9.4% para suero de leche e hidrolizado de suero de leche respectivamente.

Por otra parte, se realizó la determinación de azúcares reductores del suero de leche e hidrolizado de suero de leche obteniéndose una concentración de azúcares reductores de 43.54 g/L y 43.23 g/L respectivamente por lo cual representa una buena fuente de carbono de nulo costo.

Agradecimientos

Al CONACYT por la beca de maestría otorgada a Job Jonathan Castro Ramos.

Referencias

- [1] Andler, R. y Díaz, A. (2013). Ingeniería para producir plásticos desde bacterias. *Ingenierare*, 27, 29-36.
- [2] Castilhó, L. R., Mitchell, D. A., Freire, D. M. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 100, 5996-6009.

- [3] Almeida, A., Ruiz, J. A., López, N. I., Pettinari, M. J. (2004). Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Revista Química Viva*, 3, 122-133.
- [4] González, Y., Meza, J. C., González O., Córdova, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 29 (1), 77-115.
- [5] Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., Segura, D. (2014). Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. *Microbial Biotechnology*, 7(4), 278–293.
- [6] Jain, R., Tiwari, A. (2014). Bioplastics for use in medical industry. *Asian Journal of Pharmaceutics*, April-June 2014.
- [7] Segura, D., Noguez, R., Espín, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. Recuperado el 5 de noviembre de 2015 de: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_31.pdf
- [8] Cardona, A. C., Mora, A. L., Marín M. (2013). Identificación Molecular de Bacterias Productoras de Polihidroxialcanoatos en Subproductos de Lácteos y Caña de Azúcar. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 66 (2), 7129-7140.
- [9] Samrot, A. B., Avinesh, A. B., Sukeetha, S. Senthilkumar, P. (2010). Accumulation of Poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] in *Enterobacter cloacae* SU-1 During Growth with Two Different Carbon Sources in Batch Culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163, 195–203.
- [10] Silva-Queiroza, S. R., Silvaa, L. F., Pradellaa, J. G. C., Pereiraa, E. M., Gomez, J. G. C. (2009). PHAMCL biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. *Journal of Biotechnology*, 143, 111–118.
- [11] Sureshbabu, R. K. P., Venkatraman. D., Kalimuthu, K., Jeyaraj, M., Neelamegam, R. y Sangiliyandi, G. (2009). Synthesis of PHB nanoparticles from optimized medium utilizing dairy industrial waste using *Brevibacterium casei* SRKP2: A green chemistry approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74 (1), 266–273.
- [12] Pantazaki, A. A., Papaneophytou, C. P., Pritsa, A. G., Liakopoulou-Kyriakides, M., Kyriakidis, D. A. (2009). Production of polyhydroxyalkanoates from whey by *Thermus thermophilus* HB8. *Process Biochemistry*, 44, 847–853.
- [13] Aguirre E. J., Ramírez, A., Aguilar, J. M., Álvarez, M. M. (2009). Producción de proteína y biomasa probiótica de *Lactobacillus casei* liofilizadas a partir de suero de leche de cabra. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 8 (1), 67-76.
- [14] 3A Business Consulting. (2009). International Whey Market Overview. Recuperado el 10 de Noviembre de 2015 de, [http:// www. Adpi.org/Portals/0/PDF/09Conference/TAGEAFFERTSHOLT. pdf](http://www.Adpi.org/Portals/0/PDF/09Conference/TAGEAFFERTSHOLT.pdf)
- [15] García, M., Quintero, R., López, A. (2004). Biotecnología alimentaria. Quinta edición. Editorial Limusa, S.A. de C.V., México, D.F.
- [16] Ha, E., Zemel, M. (2003). Functional properties of whey, whey components, and essential aminoacids: mechanisms underlying health benefits for active people (Review). *Journal of Nutritional Biochemistry*, 14, 251–258.
- [17] Hernández, M., Vélez, J. F. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8 (2), 13-22.
- [18] Jacquel, N., Lo C., Wei, Y., Wu, H., Wang, S. (2008). Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). *Biochemical Engineering Journal*, 39, 15–27.
- [19] Peña, C., Castillo, T., Núñez, C., Segura, D. (2011). Bioprocess Design: Fermentation Strategies for Improving the Production of Alginate and Poly- β -Hydroxyalkanoates (PHAs) by *Azotobacter vinelandii*. En *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* (A. Carpi, ed.), pp. 217-242, InTech.
- [20] Davis, R, Kataria, R., Cerrone, F., Woods, T., Kenny, S., O'Donovan, A., Guzik, M., Shaikh, H., Duane, G., Gupta, V. K., Tuohy, M. G., Padamatti, R. B., Casey, E., O'Connor, K. E. (2013). Conversion of grass biomass into fermentable sugars and its utilization for medium chain length polyhydroxyalkanoate (mcl-PHA) production by *Pseudomonas* strains. *Bioresource Technology*, 150, 202–209.
- [21] Dalal, J., Sarma, P. M., Mandal, A. K., Lal, B. (2013). Response surface optimization of poly (3-hydroxyalkanoic acid) production using oleic acid as an alternative carbon source by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomass and Bioenergy*, 54, 67-76.
- [22] Gungormedi, G., Demirbilek, M., Mutlu, M. B., Denkbaz, E. B., Cabuk, A. (2014). Polyhydroxybutyrate and Hydroxyvalerate Production by *Bacillus megaterium* Strain A1 Isolated from Hydrocarbon-Contaminated Soil. *Journal of Applied Polymer Science*, 131 (15), 1-8.
- [23] Sathiyarayanan, G., Saibabab, G., Kiranc, G. S., Selvind, J. (2013). A statistical approach for optimization of polyhydroxybutyrate production by marine *Bacillus subtilis* MSBN17. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 170– 177.
- [24] Gouda, M. K., Swellam, A. E., Omar, S. H. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 156, 201–207.