

Selección de un medio de cultivo para la producción de biosurfactantes y la influencia de la aireación sobre el crecimiento celular y la tensión superficial en cultivo en biorreactor

Angeles Dominguez Rivera^{1*} · Miguel Angel Martinez Urbina² · Victor Eric Lopez y Lopez¹

1. Centro de Investigacion en Biotecnologia Aplicada del Instituto Politecnico Nacional, Carretera Estatal Sta. Ines Tecuexcomac-Tepetitla, 90700 Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, Mexico
2. Polaquimia S. A. de C. V., Km 144, Carretera Federal Mex-Ver S/N, 90460 Xaloztoc, Tlaxcala, Mexico

^{1*} Correo electrónico: adominguezr1502@alumno.ipn.mx

RESUMEN

Los biosurfactantes son moléculas anfifílicas producidas por una variedad de microorganismos incluidos las bacterias, levaduras y hongos filamentosos. En comparación a los surfactantes sintetizados químicamente, los biosurfactantes ofrecen ventajas como biodegradabilidad, baja toxicidad, propiedades espumantes y mayor selectividad; además de ser activos a temperaturas extremas, pH y salinidad, y ser producidos a partir de desechos industriales y materias primas renovables. Sin embargo, su uso sigue siendo limitado, debido al alto costo de producción y los bajos rendimientos que se obtienen, por lo que el desafío en la producción parece depender de una estrategia efectiva en el desarrollo del proceso de fermentación, que involucren, además de una cepa productora, la formulación adecuada de un medio de cultivo y condiciones ambientales apropiadas.

Palabras clave: tensión superficial, medio de cultivo, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, aireación.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphiphilic molecules produced by a variety of microorganisms including bacteria, yeasts and filamentous fungi. Compared to chemically synthesized surfactants, biosurfactants offer advantages such as biodegradability, low toxicity, foaming properties and greater selectivity; besides being active at extreme temperatures, pH and salinity, and being produced from industrial waste and renewable raw materials. However, their use remains limited, due to the high cost of production and the low yields obtained, so the challenge in production seems to depend on an effective strategy in the development fermentation process, that involve to a producing strain, a suitable formulation of a culture medium and appropriate environmental conditions.

Palabras clave: surface tension, culture medium, carbon source, nitrogen source, aeration.

1. INTRODUCCIÓN

Los biosurfactantes son moléculas de superficie activa producidas por una variedad de microorganismos, incluidos las bacterias, levaduras y hongos filamentosos. La actividad superficial hace a los biosurfactantes excelentes emulsificadores, espumantes y agentes

dispersantes, pudiendo ser aplicados como agentes humectantes, dispersantes, emulsionantes, espumantes, aditivos alimenticios, detergentes y como agentes de control biológico (Reis et al. 2013). A concentraciones por encima de la concentración micelar crítica (CMC), los biosurfactantes se asocian para formar micelas, bicapas y vesículas, la formación de estos agregados, permite reducir la tensión superficial e interfacial, e incrementar la solubilidad y biodisponibilidad de compuestos orgánicos hidrofóbicos (Santos et al. 2016). Un buen biosurfactante es capaz de reducir la tensión superficial del agua de 72 a 30 mN/m (Soberón-Chavez y Maier 2011).

En comparación a los surfactantes sintetizados químicamente, los biosurfactantes tienen ventajas como: biodegradabilidad, baja toxicidad, propiedades espumantes y mayor selectividad; además de ser activos a temperaturas extremas, pH y salinidad, y ser producidos a partir de desechos industriales y materias primas renovables (Banat et al. 2010; Yan et al. 2012). Sin embargo, su uso es limitado debido al alto costo de producción y los bajos rendimientos que se obtienen. Por lo que el éxito de producción depende de una estrategia robusta del proceso de fermentación, que involucre, además de la cepa productora, la elección de un medio de cultivo y condiciones de fermentación adecuadas. Motivo por el cual el objetivo del presente trabajo fue seleccionar un medio de cultivo y condiciones de aireación para la producción de biosurfactantes utilizando la bacteria *Bacillus sp.* BM33.5 previamente aislada e identificada.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La cepa *Bacillus sp.* BM33.5, seleccionada por su capacidad surfactante, fue cultivada en matraz Erlenmeyer de 1000 mL con 200 mL de medio. Para investigar diferentes composiciones de medio de cultivo sobre la producción de biosurfactantes, se utilizaron tres medios con ajuste inicial a pH 7, los cuales fueron: MSI a base de glucosa y sales minerales, KSAH y AQ713 a base de glucosa, fuentes de nitrógeno orgánicas y sales minerales, se inocularon a partir de asada y se cultivaron a 200 rpm por 96 h a 30 °C, se tomaron muestras en intervalos de tiempo definidos y se analizaron para determinar cuentas celulares, pH, dispersión de aceite y tensión superficial. La prueba de dispersión de aceite consistió en agregar 20 mL de agua

destilada en placas Petri, seguido de 20 mL de hidrocarburo ligero teñido con colorante Sudan III (sigma-Aldrich®), para finalmente agregar 10 µL de sobrenadante del cultivo microbiano libre de células y medir el diámetro del halo formado debido a la presencia de biosurfactantes. La tensión superficial se determinó mediante el método de gota pendiente, utilizando un tensiómetro DSA100 Krüss®. El cultivo en biorreactor se llevó a cabo en lote con medio KSHA, a 30°C, con 0.5 vvm, con condiciones de agitación de 155 y 500 rpm, pH 7 sin control posterior y con remoción continua de espuma mediante un mecanismo de trampa.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como puede observarse el crecimiento celular en el medio MSI fue demasiado lento en comparación a los otros dos medios (Fig. 1). El crecimiento alcanzó un máximo de 1.03×10^{10} células/mL a las 84 h, pero decayó abruptamente el número de células a 1.19×10^9 , la mayor reducción en tensión superficial fue de tan sólo 7 unidades a las 48 h con un valor de 63.3 mN/m, justo a la hora que también se observó el mayor halo en la dispersión de aceite, que también reflejó la poca reducción en tensión superficial con un diámetro de 0.4 cm (Fig. 1).

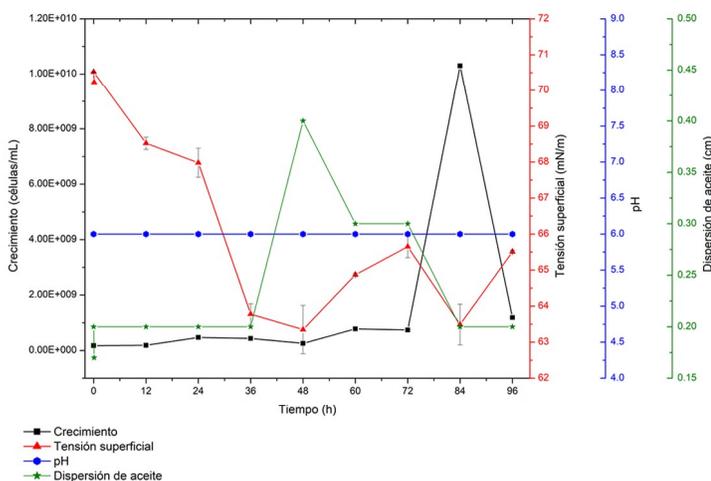


Figura 1. Perfil de crecimiento, tensión superficial, pH y dispersión de aceite para *Bacillus* sp. BM33.5 producida en matraz con medio MSI.

Para el medio AQ713 la fase de crecimiento exponencial comenzó a las 24 h, alcanzando su máximo a las 36 h con 1.45×10^{11} células/mL. Este medio presentó una baja tensión superficial en el medio con

40 mN/m a las 0 h, motivo por el cual el halo de dispersión de aceite fue de 5.5 cm, aunque durante las primeras 12 h se dio una ligera reducción en la tensión superficial, después fue incrementándose hasta alcanzar 47 mN/m a las 60 h, lo cual podría sugerir que este medio de cultivo no fue adecuado para la producción de biosurfactantes (Fig. 2).

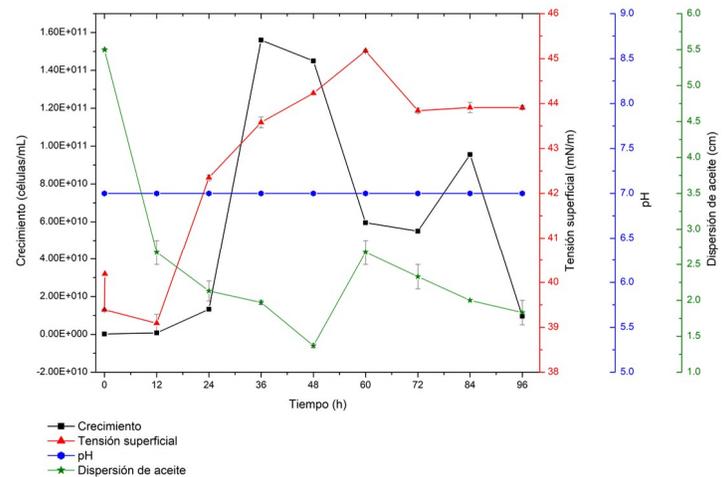


Figura 2. Perfil de crecimiento, tensión superficial, pH y dispersión de aceite para *Bacillus* sp. BM33.5 producida en matraz con medio AQ713.

Para el medio KSAH, el crecimiento acelerado inició a las 12 h y alcanzó un máximo de cuentas celulares de 7.8×10^{10} células/mL a las 48 h y se mantuvo un alta cuenta celular hasta las 72 h, justo después de comenzar el crecimiento acelerado, también empezó a decrecer la tensión superficial, reduciéndose de 50.1 a 28 mN/m a las 24 h, se mantuvo con valores de tensión superficial bajos a partir de las 24 h y hasta el final de la cinética, con valores que oscilaron entre 26 y 28 mN/m, la máxima reducción de 24 unidades fue a las 60 h con un valor de 26.2 mN/m, también a la hora de mayor reducción se pudo observar el mayor halo de dispersión de aceite con un diámetro de 6.3 cm (Fig. 3). Para este medio, se observó claramente que la producción de biosurfactantes estuvo asociada a crecimiento, similarmente a lo obtenido por Mejía (2008), quien reporto altas cuentas celulares (3.27×10^9) y actividad superficial asociada a crecimiento con este medio de cultivo y con la cepa industrial *B. subtilis* AQ, asociándolo al uso de harina de soya en el medio; Similarmente Kim et al. (1997), sugirieron que la producción del surfactante "surfactina", producido por *B. subtilis*, estuvo asociada a crecimiento utilizando un medio con glucosa.

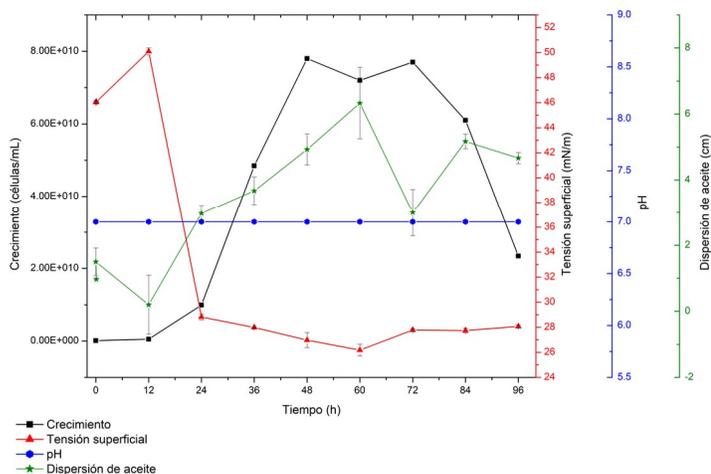


Figura 3. Perfil de crecimiento, tensión superficial, pH y dispersión de aceite para *Bacillus sp.* BM33.5 producida en matraz con medio KSAH.

Con base a los resultados obtenidos, se decidió utilizar el medio KSAH para escalamiento en biorreactor. En la primera fermentación (Fig. 4), llevada a cabo a 155 rpm, los resultados revelaron que después de una fase de adaptación de 1 hora, comenzó a incrementar lentamente el número de células hasta las 11 h, para después de esta hora comenzar el crecimiento exponencial, que alcanzó una máxima concentración celular de 1.25×10^{10} células/mL a las 14 h, con una máxima velocidad de crecimiento μ_{\max} de 0.229 h^{-1} . La tensión superficial presentó un valor inicial de 39 mN/m en el medio, el cual se incrementó de manera ligera al inocular el medio, quedando en 42.7 mN/m a las 0 h, la tensión superficial fue en aumento hasta alcanzar un máximo de 51.8 mN/m a las 11 h, a partir de esta hora se puede observar una reducción que se mantuvo con valores oscilantes entre 42 y 38 mN/m hasta las 18 h, siendo justamente esta hora en la que se presentó la máxima reducción de 13.1 unidades con valor de 38.6 mN/m. La tensión superficial en la espuma recolectada al final del bioproceso presentó un valor de 30.2 mN/m y formó un halo de dispersión de aceite de 7.2 cm. En los resultados obtenidos en esta fermentación, no se alcanzaron valores de tensión superficial similares al matraz, incluso la máxima concentración celular fue más baja en el fermentador (1.25×10^{10}), que en matraz (7.8×10^{10}), lo cual coincide con los reportes de Chen et al. (2006) quienes reportaron que la máxima concentración de biomasa en biorreactor fue menor que la alcanzada en matraz, indicando un pobre crecimiento de *B. subtilis* en el biorreactor.

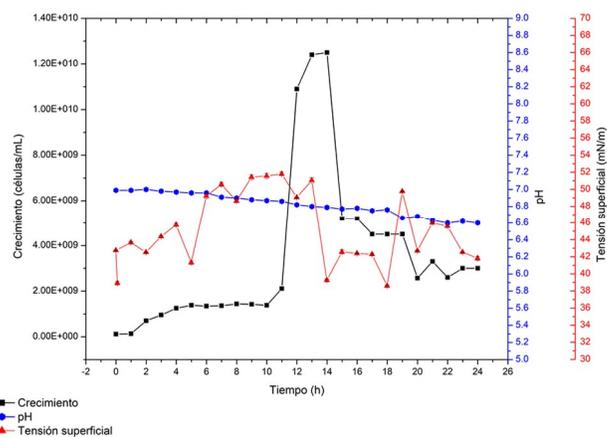


Figura 4. Fermentación 1 en biorreactor. Perfil de crecimiento, tensión superficial y pH para la cepa *Bacillus sp.* BM33.5 producida en lote a 155 rpm con medio KSAH.

La fermentación 2 (Fig. 5) se llevó a cabo con las mismas condiciones de operación que la fermentación 1, pero con una agitación de 500 rpm., al igual que en la fermentación 1 se observa una fase de adaptación de 1 hora, aunque el crecimiento en esta fermentación fue más lento, exponiendo una velocidad de crecimiento μ_{\max} de 0.11 h^{-1} , con la máxima concentración celular de 9.7×10^9 células/mL a las 18 h. Si bien se observa un perfil general de reducción en la tensión superficial justo a las horas de mayor número de cuentas celulares, la reducción de tensión superficial fue menor, con una máxima reducción de 6.4 unidades a las 20 h con valor de 28.5 mN/m. Aparentemente la velocidad de agitación afectó la formación de biosurfactantes, ya que, al generarse mayor espuma a causa de una mayor agitación, se puede perder biomasa al quedar atrapada en la espuma, y la biomasa en la espuma puede no tener acceso a los nutrientes requeridos, lo cual podría resultar en una síntesis de biosurfactante reducida. La tensión superficial de la espuma recolectada al término de la fermentación fue de 30.6 mN/m y formó un halo en la prueba de dispersión de aceite de 7 cm.

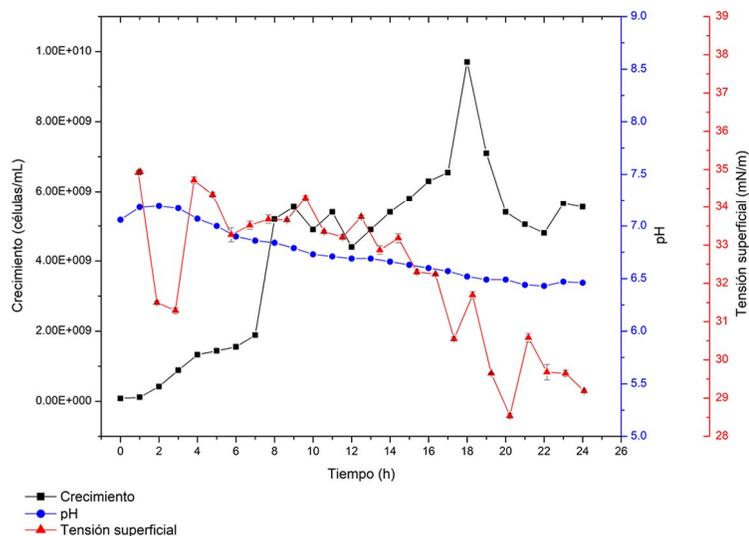


Figura 5. Fermentación 2 en biorreactor. Perfil de crecimiento, tensión superficial y pH para la cepa *Bacillus sp.* BM33.5 producida en lote a 500 rpm con medio KSAH.

4. CONCLUSIÓN

El medio KSAH, con fuente de nitrógeno orgánica, resultó ser el más efectivo para la producción de biosurfactantes para la cepa *Bacillus sp.* BM33.5 a nivel matraz. Por su parte, el efecto de la aireación y agitación a nivel biorreactor mostraron tener papeles significativos en la producción de biosurfactantes porque estos parámetros aumentan el oxígeno requerido mediante un mejor mezclado del medio, lo cual transfiere oxígeno del gas a la fase líquida.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el soporte financiero otorgado para la realización de este proyecto a Polaquimia S.A. de C.V.

6. REFERENCIAS

- Banat I M, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti M G, Fracchia L, Smyth T, Marchant R (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87:427-444.
- Chen C Y, Baker S C, Darton R C (2006) Batch production of biosurfactant with foam fractionation. *J Chem Technol Biotechnol.* 81:1923-1931.
- Kim H S, Yoon B D, Lee C H, Suh H H, Oh H M, Katsuragi T, Tani Y (1997) Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *J Ferment Bioeng.* 84:41-46.
- Mejia M L, Lopez y López V E (2008) Evaluación del efecto de la relación carbono nitrógeno y el nivel de oxígeno disuelto sobre la producción de biosurfactantes a partir de *Bacillus subtilis*. Tesis de maestría. Centro de investigación de biotecnología aplicada- IPN. Tlaxcala, México.
- Reis R S, Pacheco G. J, Pereira A G, and Freire D M G (2013) "Biosurfactants: production and applications," in *Biodegradation — Life of Science*. Edited by R Chamy and F. Rosenkranz (Rijeka: InTech), 31-61 pp.
- Santos D K F, Rufino R D, Luna J M, Santos V A, Sarubbo L A (2016) Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int J Mol Sci* 17:1-31.
- Soberon-Chavez G, Maier R (2011) Biosurfactants: a general overview. *Biosurfactants. Microbiol Monographs* 20:1-11.
- Yan P, Lu M, Yang Q, Zhang H, Zhang Z., Chen R (2012) Oil recovery from refinery oily sludge using a rhamnolipid biosurfactant-producing *Pseudomonas*. *Bioresour Technol* 116: 24-28.