

INTRODUCCIÓN

A partir de 1965, las leyes de protección del medioambiente comenzaron a limitar el empleo de algunos tipos de surfactantes sintéticos debido a problemas de biodegradabilidad y toxicidad. En este contexto surge una nueva alternativa al empleo de surfactantes sintéticos: los biosurfactantes (BS). Además de su biodegradabilidad, estos compuestos presentan la ventaja adicional de ser producidos por microorganismos que pueden ser cultivados en fuentes renovables de nutrientes. Los microorganismos del género *Bacillus* y el lipopéptido que producen, la Surfactina, constituyen uno de los sistemas con mayor potencial comercial. Actualmente, la principal limitante de su aplicación a gran escala comercial radica en los elevados costos de producción que tienen aparejados. En este sentido, la utilización de sustratos de bajo costo y la optimización de los recursos utilizados en la producción representan estrategias prometedoras para aumentar la competitividad comercial de los BS. De esta forma, el objetivo del presente trabajo radica en optimizar la producción de BS empleando a *Bacillus amyloliquefaciens* como sistema biológico y subproductos de la industria local como sustratos en la composición de los medios de cultivo.

Tabla II. Diseño experimental para la optimización de la producción de BS empleando *B. amyloliquefaciens*

Factores			
N.º Experimento	Temperatura (°C)	Fuente de Carbono (Aceite/ Glicerol) (g/L/g/L)	Extracto Levadura (g/L)
1	30	9/9	0,75
2	40	9/9	0,75
3	30	18/0	0,75
4	40	18/0	0,75
5	30	9/9	1,5
6	40	9/9	1,5
7	30	18/0	1,5
8	40	18/0	1,5
9	35	13,5/4,5	0,75
10	35	13,5/4,5	0,75
11	35	13,5/4,5	0,75

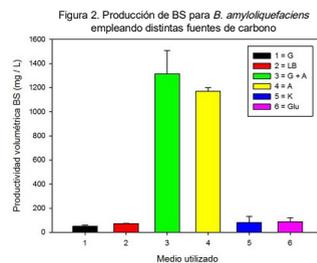


Figura 2. Producción de BS para *B. amyloliquefaciens* empleando distintas fuentes de carbono

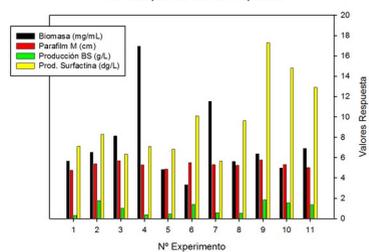


Figura 3. Valores obtenidos en cada experimento individual para las distintas respuestas

Tabla III. Modelo de ajuste de valores óptimos de producción de BS, obtenido a partir de los resultados del Diseño Experimental.

Temperatura (°C)	Aceite (g/L)	Ext. Levadura (g/L)	Cc. Surfactina (mg/L) Ajuste	Producción BS (g/L) Ajuste	Parafilm M Ajuste	Biomasa (g/L) Ajuste
35,4545	9	0,424242	153,060	1,84745	5,24526	3,86610
Desestabilidad compuesta						
0,931325						

OBJETIVOS

- ▶ Optimizar la producción de biosurfactantes empleando *Bacillus amyloliquefaciens* a partir del uso de subproductos de la industria local.
- ▶ Seleccionar las condiciones experimentales que permitan obtener un mejor grado de producción de biosurfactantes, en materia de rendimiento y actividad.

Tabla I. Composición de los medios de cultivo empleados para la producción de BS

Medios empleados (Composición en g/L)
1) Glicerol (GLI) 18; NaNO ₂ 2; Extracto de levadura (LEV) 1,5; NaCl 3; Na ₂ HPO ₄ 2,5.
2) NaCl 10; Peptona ácida de Caseína (PEP) 10; LEV 5.
3) GLI 9; Aceite de cocina usado (AC) 9; NaNO ₂ 2; LEV 1,5; NaCl 3; Na ₂ HPO ₄ 2,5.
4) AC 18; NaNO ₂ 2; LEV 1,5; NaCl 3; Na ₂ HPO ₄ 2,5.
5) Kerosene 9; GLI 9; NaNO ₂ 2; LEV 1,5; NaCl 3; Na ₂ HPO ₄ 2,5.
6) Glucosa 18; NaNO ₂ 2; LEV 1,5; NaCl 3; Na ₂ HPO ₄ 2,5.

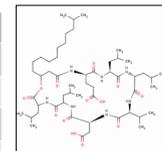


Figura 1. Estructura de la surfactina, principal detergente producido por bacterias del género *Bacillus*.

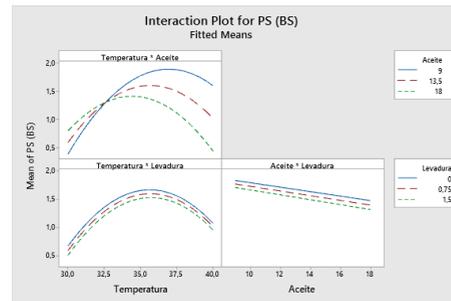


Figura 4. Gráficos de interacción entre factores para la respuesta de Producción de BS.

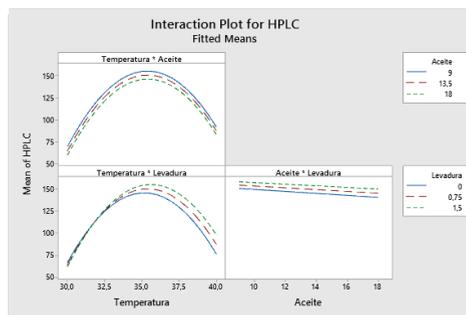


Figura 5. Gráficos de interacción entre factores para la respuesta de concentración de surfactina en los extractos de BS

MATERIALES Y MÉTODOS

▶ **Cultivo de microorganismos.** Con el fin de obtener condiciones óptimas para la producción de BS utilizando un aislamiento de *Bacillus amyloliquefaciens* como sistema de producción, se realizó en primera instancia una serie de cultivos evaluando la producción de BS empleando distintas fuentes de carbono, según se indica en la Tabla I. Posteriormente, se elaboró un diseño experimental del tipo de respuesta de superficie, con la utilización de 3 factores experimentales, cada uno con 3 valores experimentales; y 4 respuestas, según como se indica en la Tabla II. Las fuentes de carbono empleadas en el diseño experimental fueron aceite de cocina usado y glicerol proveniente de la industria del biodiesel.

▶ **Caracterización y cuantificación de los extractos de BS obtenidos.**

- ▶ Test de Parafilm M, que consiste en la siembra de distintas muestras en la superficie hidrofóbica de una tira de Parafilm M, evaluando la presencia de compuestos tensoactivos en función del diámetro de la gota formada. Se utilizó una solución de Genapol 0,25% como control positivo y una muestra de agua como control negativo.
- ▶ Cuantificación de la Producción de BS, mediante precipitación ácida seguida de extracción con acetato de etilo, recupero de la fase orgánica y evaporación del solvente.
- ▶ Ensayos cromatográficos, mediante HPLC, para evaluar y cuantificar la presencia de Surfactina (ver Figura 1), el principal biosurfactante producido por bacterias del género *Bacillus*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluando la producción de BS obtenida luego del empleo de distintas fuentes de carbono en los medios de cultivo, se observa que se obtienen valores máximos (1,1-1,3 g/L) cuando se encuentra presente en el medio el aceite de cocina usado. Teniendo en cuenta esto, se decidió emplear en el Diseño Experimental para la optimización de la producción de BS concentraciones variables de aceite de cocina usado y glicerol proveniente de la industria del Biodiesel.

Una vez obtenidos los resultados para el diseño experimental, analizando de forma individual el impacto de cada factor experimental, y la interacción entre los mismos, para cada respuesta, se observan distintas tendencias y niveles de incidencia entre cada una.

▶ Se observa que la producción de BS (Figura 4) alcanza valores máximos a temperaturas que se encuentran entre los 35 y 40 °C, en conjunto con concentraciones de aceite de 9 g/L en el medio de cultivo. Según el análisis estadístico, la variación de extracto de levadura no afecta de forma significativa el desempeño de esta respuesta.

▶ En cuanto a la concentración de surfactina en los extractos de BS (Figura 5), se observa un patrón prácticamente idéntico al de la producción de BS en general, lo cual es coherente con la naturaleza de las dos respuestas. Se observa una menor preponderancia de la variación de la composición de la fuente de carbono, y se observa a la temperatura como el factor predominante en la variabilidad de la respuesta.

▶ En base a los resultados obtenidos, se realizó un modelo de ajuste de valores óptimos de producción, según se indica en la Tabla III. Se observan resultados coherentes con lo analizado de forma individual, y un aceptable valor de deseabilidad compuesta (valor que se encuentra entre 0 y 1) y que representa qué tan bien se ajusta de forma global el modelo a cada una de las respuestas).

▶ De forma global, los resultados obtenidos son coherentes con lo reportado en la bibliografía, en donde se ha observado que la producción de BS encuentra correlación con el crecimiento celular cuando la disponibilidad de fuente de carbono es abundante, pero se observa que el crecimiento puede aumentar a expensas de la producción si la fuente de carbono se encuentra en proporciones subóptimas. Asimismo, la convivencia del sustrato hidrofóbico con glicerol presenta un mejor desempeño a raíz del crecimiento temprano facilitado por el glicerol, lo que permite la estimulación y producción de BS para el acceso al consumo de aceite. Ensayos subsiguientes permitirán confirmar la idoneidad del modelo de ajuste obtenido, así como también la caracterización de los BS obtenidos mediante la utilización de técnicas estructurales.

CONCLUSIONES

▶ Los resultados obtenidos hasta el momento incluyen un primer paso hacia la optimización de la producción de lipopéptidos a partir de *Bacillus spp.* Se ha demostrado la efectividad del uso de sustratos hidrofóbicos en la producción de BS, así como también la reducción efectiva de un compuesto costoso como lo es el extracto de levadura. Pasos subsiguientes incluyen el análisis estructural de los compuestos producidos, la consecuente optimización de otras variables de cultivo (pH del medio, tiempo de cultivo) y un ulterior cálculo de costos para la estimación de la aplicación comercial de los extractos obtenidos.