

# OBTENCIÓN DE BIOSURFACTANTES CON DIFERENTES PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS EMPLEANDO *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* Y DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO

Benedetti Gonzalo<sup>1</sup>, Haidar Carla Nahir<sup>1</sup>, Tubio Gisela<sup>1</sup> y Pellegrini Malpiedi Luciana<sup>1</sup>



<sup>1</sup>Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos Rosario (IPROBYQ), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, CP 2000, Rosario, Argentina



E-mail: benedettigonzalo97@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

A partir de 1965, las leyes de protección del ambiente 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 de ser producidos por microorganismos que pueden ser cultivados en fuentes renovables de nutrientes. Asimismo, el empleo de diferentes medios de cultivo puede resultar en la producción de diferentes tipos de BS por parte de un mismo microorganismo, representando una estrategia para ajustar la producción de BS de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas requeridas. Por lo expuesto, este trabajo tuvo como objetivo principal estudiar las propiedades fisicoquímicas de BS producidos por *B. amyloliquefaciens* empleando diferentes medios de cultivo (ver Tabla I). Para tal fin, se realizaron estudios de las propiedades superficiales/interfaciales, actividad emulsionante y análisis cromatográficos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivo de microorganismos.** Se realizó un cultivo en 3 etapas. Se empleó un cultivo inicial en medio sólido empleando LB-Agar Overnight a 37° C. Posteriormente, se realizó un preinóculo de 10 mL para cada medio utilizado (ver Tabla I), incubado por 24 h a 37°C. Por último, se realizó un cultivo de producción de 100 mL para cada medio, a 37°C y con una duración de 72 h.

### Caracterización fisicoquímica de los BS producidos.

Medidas de Tensión Superficial, utilizando un tensiómetro digital.

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.

Índice de Emulsificación, que consiste en la mezcla en partes iguales de un extracto de BS junto con kerosene, midiendo la altura de la emulsión formada en relación a la altura total del sistema.

Ensayos cromatográficos, mediante HPLC, para evaluar la presencia de Surfactina (ver Figura 1), el principal biosurfactante producido por bacterias del género *Bacillus*.

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

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

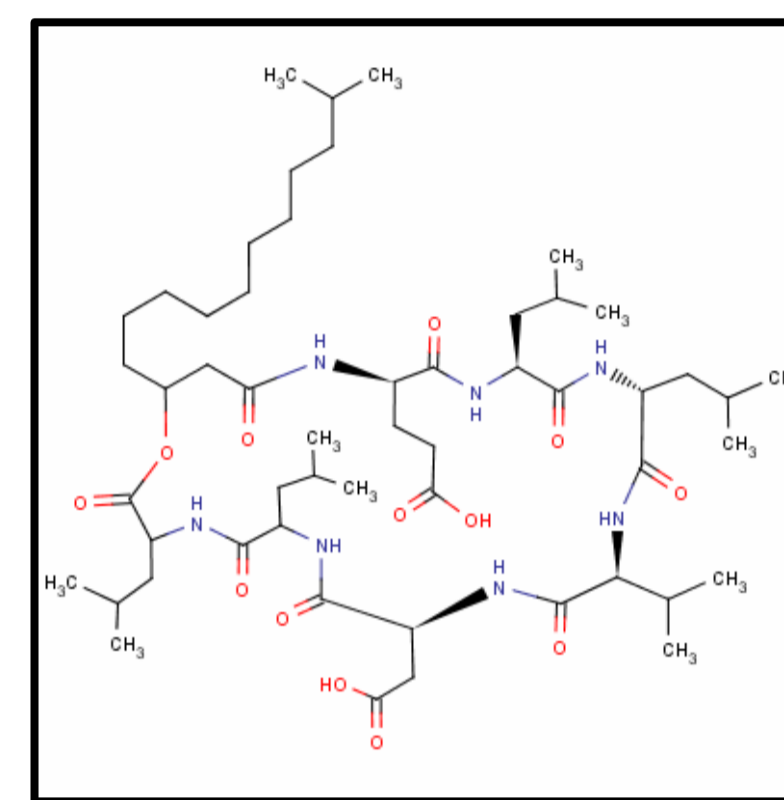


Figura 2. Medidas de Tensión superficial en los sobrenadantes libres de células luego de 24, 48 y 72 h de cultivo para los distintos medios empleados

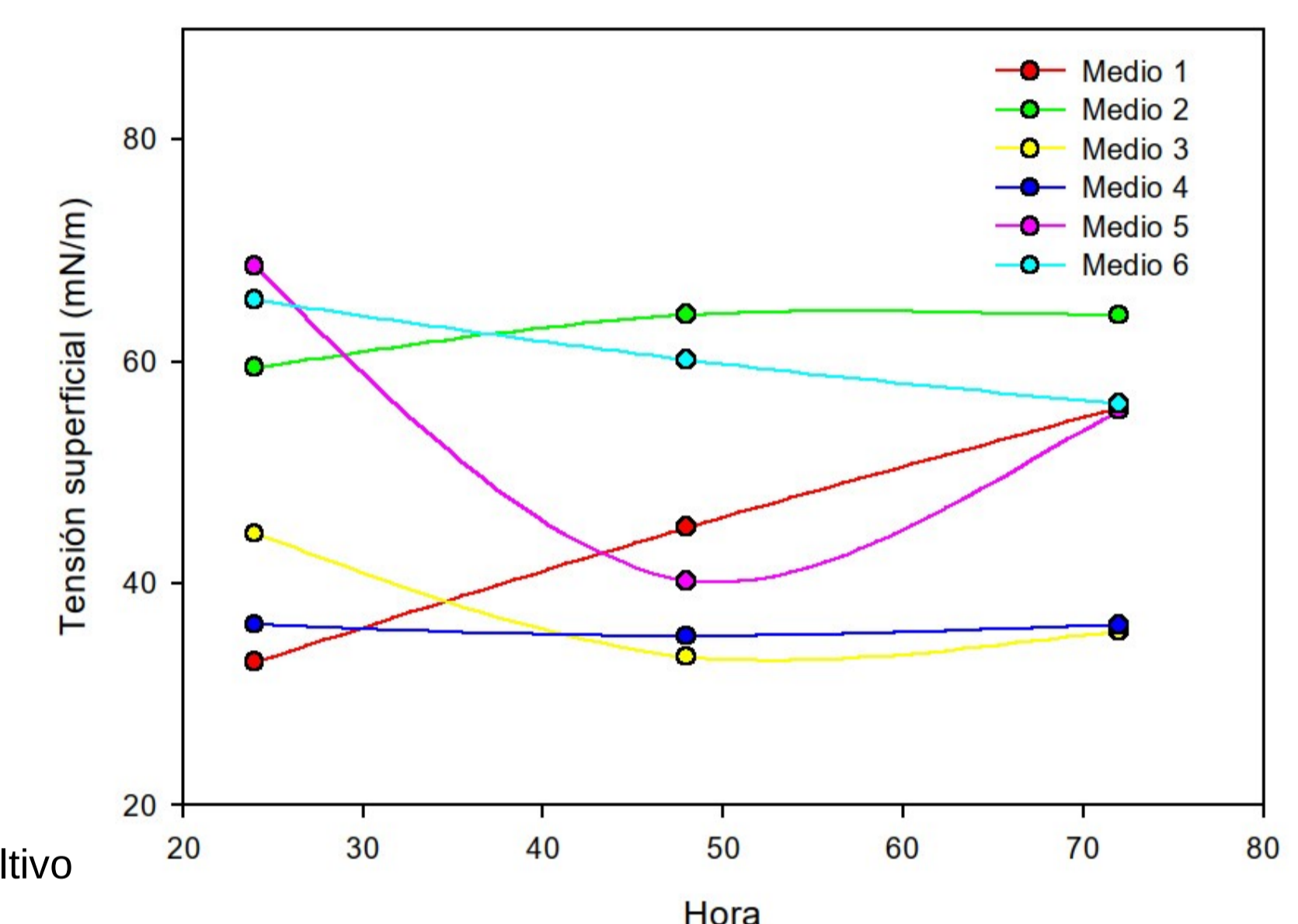


Figura 3. Resultados para el test de Parafilm M de los sobrenadantes libres de células luego de 24, 48 y 72 h de cultivo para los distintos medios empleados. Las barras de error representan el desvío estándar calculado a partir de dos experimentos independientes.

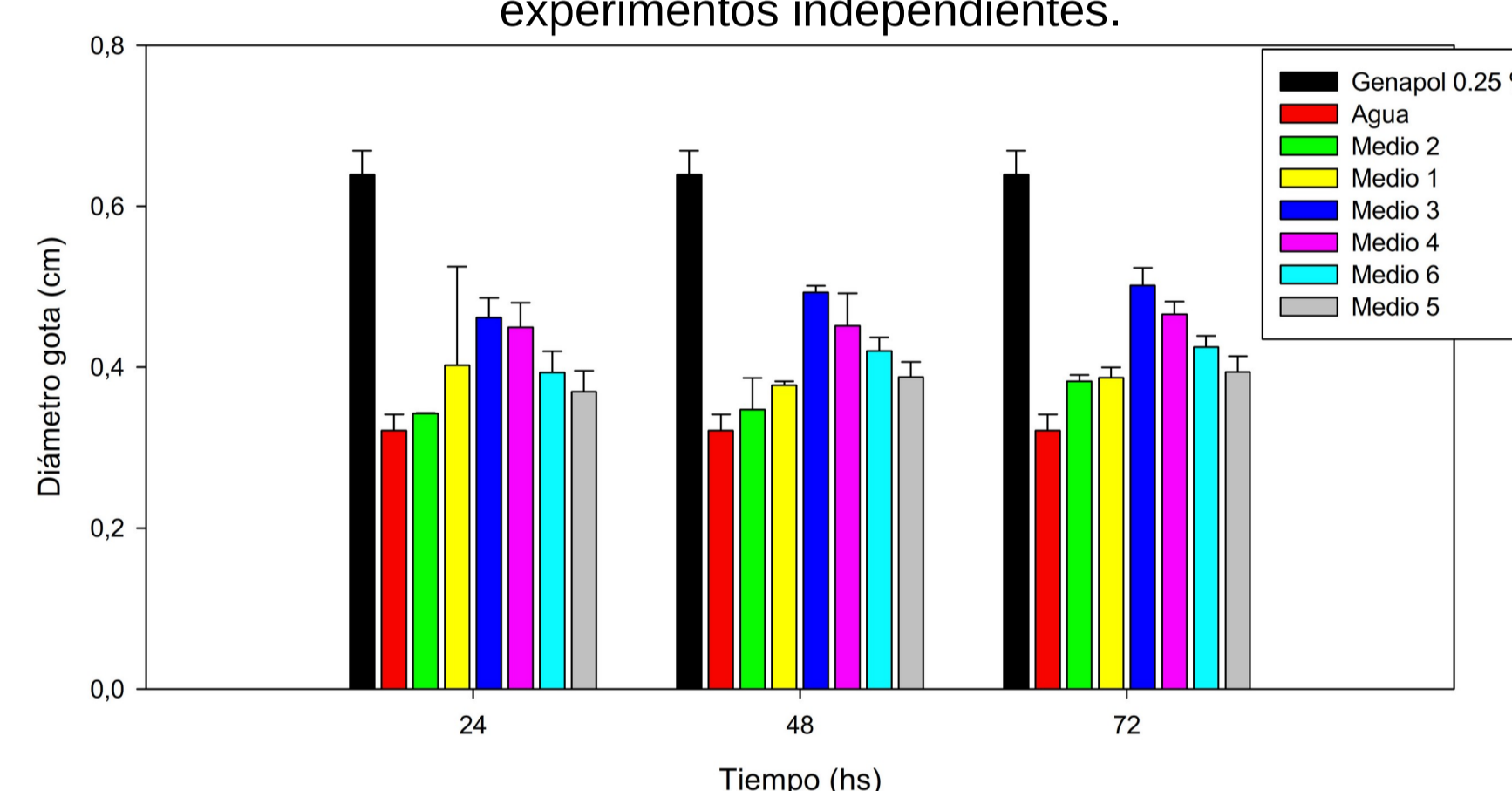
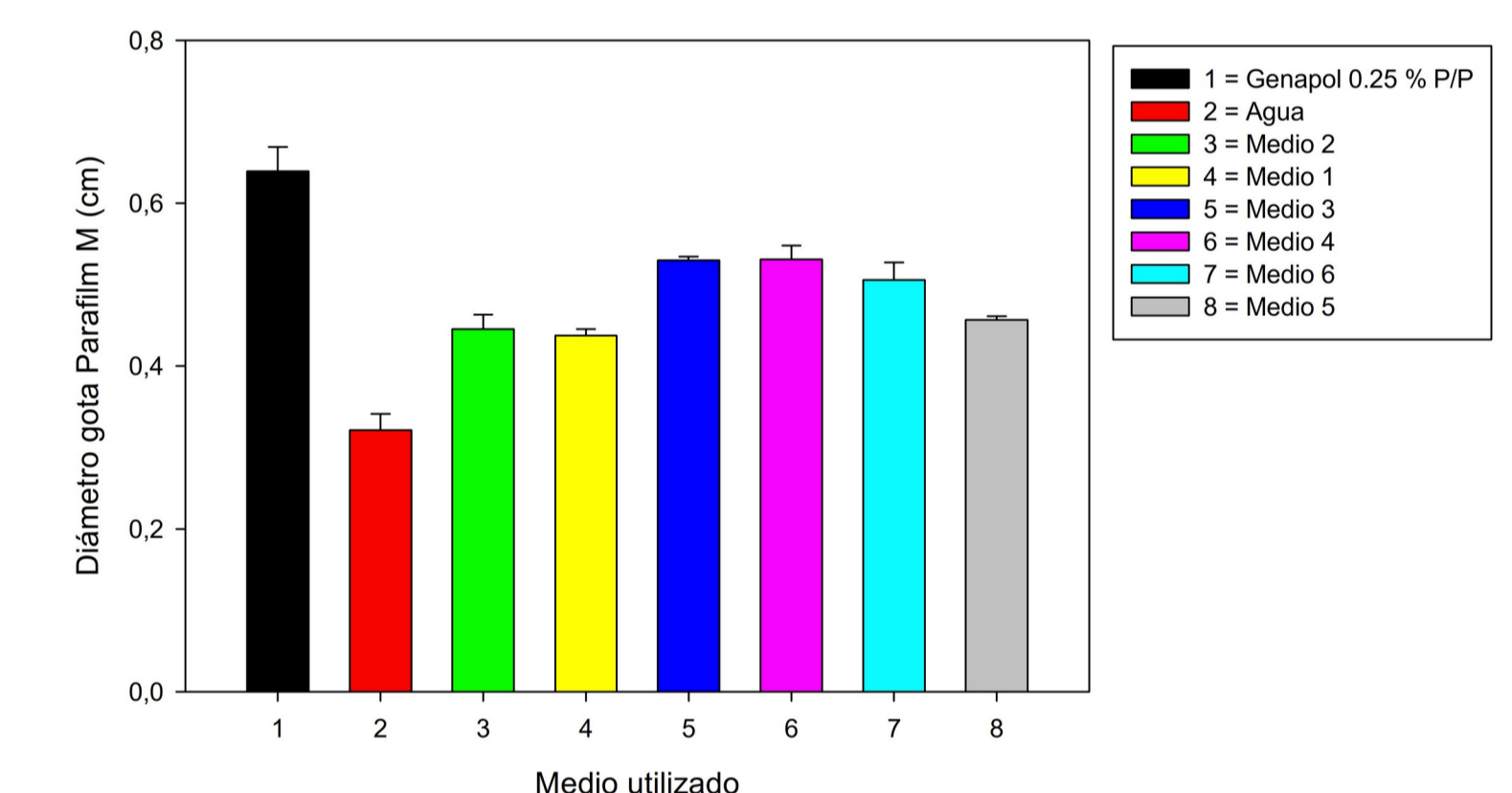


Figura 4. Resultados para el test de Parafilm M de los extractos de BS para los distintos medios empleados. Las barras de error representan el desvío estándar calculado a partir de dos experimentos independientes.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Medidas de Tensión superficial.** Se observa el mayor descenso en la tensión superficial (40% del valor inicial) del sistema para el sobrenadante correspondiente al medio 5, alcanzado a las 48 h de cultivo (Figura 2). En el resto de los medios no se perciben variaciones en el mismo orden que para el medio conteniendo Glucosa como fuente de carbono.

**Ensayo de Parafilm M.** Para las determinaciones realizadas sobre las muestras correspondientes a los sobrenadantes libres de células a distintos tiempos de cultivo (Figura 3) se observó la presencia de compuestos tensoactivos (evidenciada en diámetros de gotas significativamente superiores al valor obtenido por la muestra de agua) en todos los medios transcurridos 72 h de cultivo, y se reportó una diferencia significativa de los medios 3 y 4 con respecto al resto. Esto indicaría la presencia de una mayor cantidad de compuestos con actividad de superficie, o bien, la presencia de compuestos con mayor grado de descenso de la tensión interfacial. Con respecto a las determinaciones realizadas sobre los extractos de BS (Figura 4), se observan resultados coherentes con los mencionados anteriormente. En todos los extractos se obtienen diámetros de gotas significativamente superiores a la muestra de agua, indicando la presencia de compuestos tensoactivos. Los medios 3 y 4, ambos con presencia de aceite de cocina usado, presentan un mayor descenso de la repulsión entre la superficie de la gota y la superficie del film.

**Índice de emulsificación.** Se observa la mayor capacidad emulsificante entre kerosene y el extracto de BS correspondiente al medio 5 (Figura 5). De la misma forma, la emulsión formada por este extracto presenta un carácter visual mucho más compacto y viscoso, así como también una fase acuosa mucho más traslúcida que el resto de los extractos (ver Figura 6). Contrariamente, los medios 3 y 4 presentan una fase superior menos compacta y viscosa, y una fase inferior turbia, pudiendo indicar la presencia de compuestos hidrofóbicos dispersos en el extracto.

**Ensayo cromatográfico.** El análisis del cromatograma del patrón comercial de surfactina (Figura 7A) denota la naturaleza compleja e isofórmica de los extractos obtenidos para estos compuestos. Analizando el cromatograma correspondiente al extracto de BS del medio 4 (Figura 7B) se observa la coincidencia de 4 picos con respecto al patrón comercial (marcados en azul), indicándose la presencia de surfactina en los extractos obtenidos. A su vez, se observan también picos de grandes áreas (marcados en naranja) que no se encuentran en el patrón comercial. Esto indicaría la presencia de compuestos en el extracto de otra naturaleza estructural y fisicoquímica.

Figura 5. Índice de emulsificación de los extractos de BS para los distintos medios empleados. Las barras de error representan el desvío estándar calculado a partir de dos experimentos independientes.

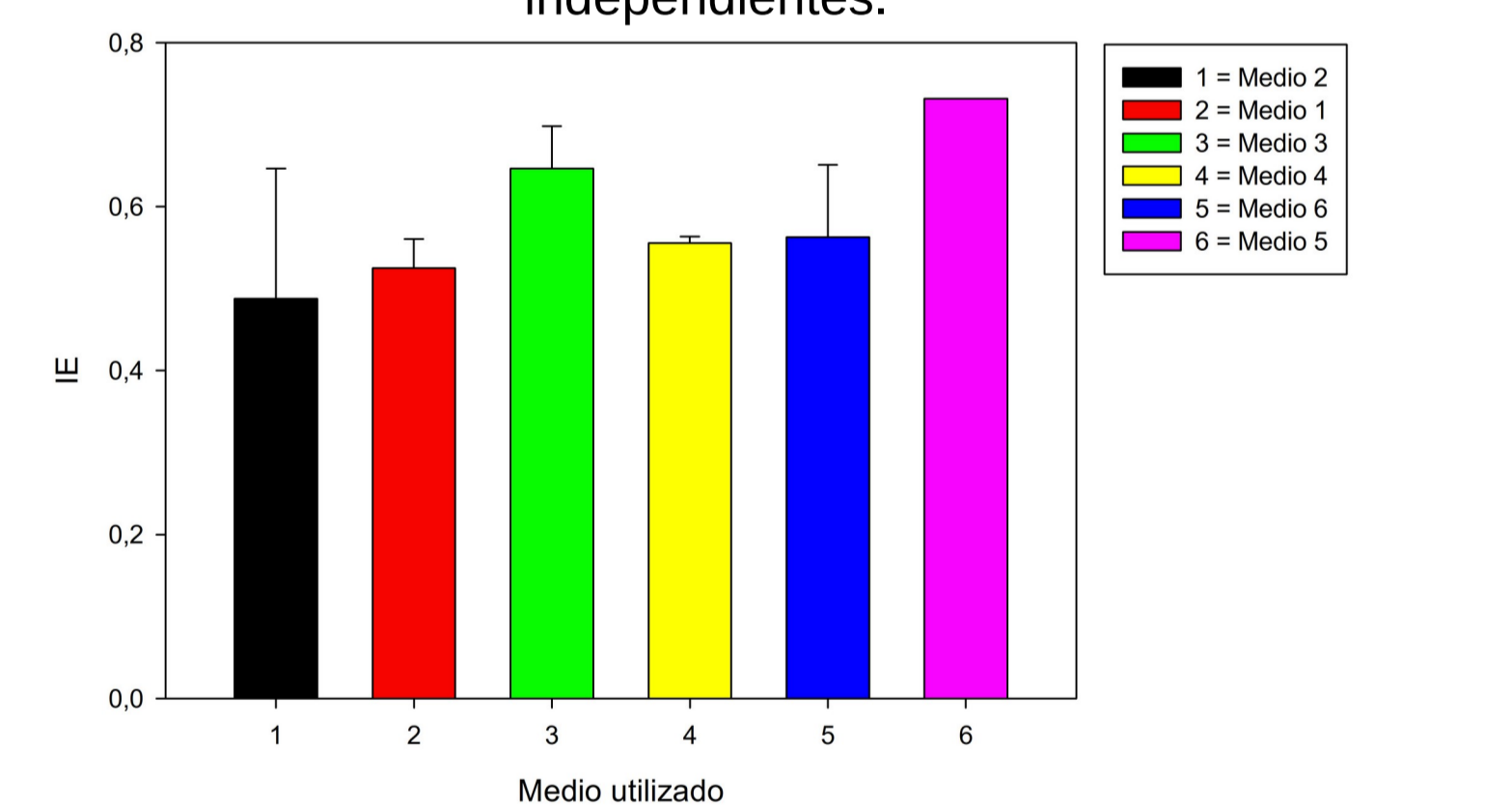


Figura 6. Emulsiones formadas entre los extractos de BS para los distintos medios empleados (1-6) y kerosene.

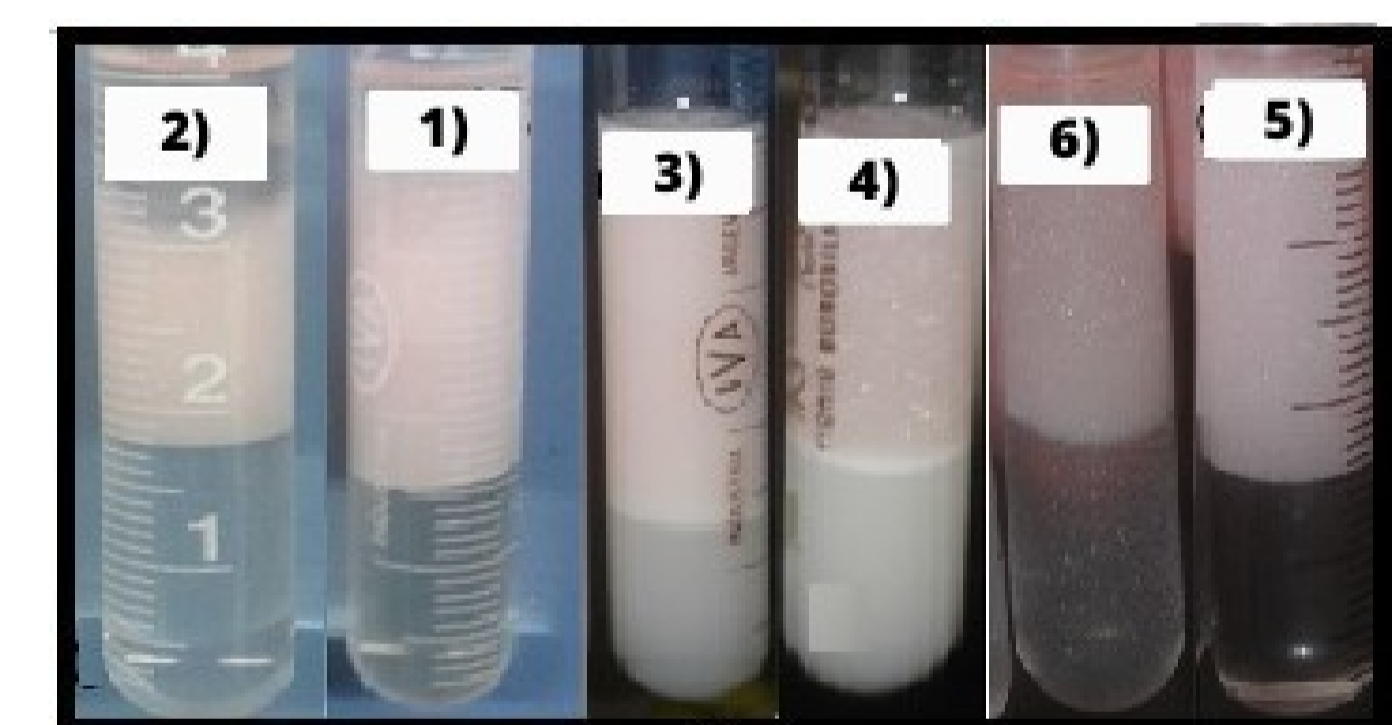
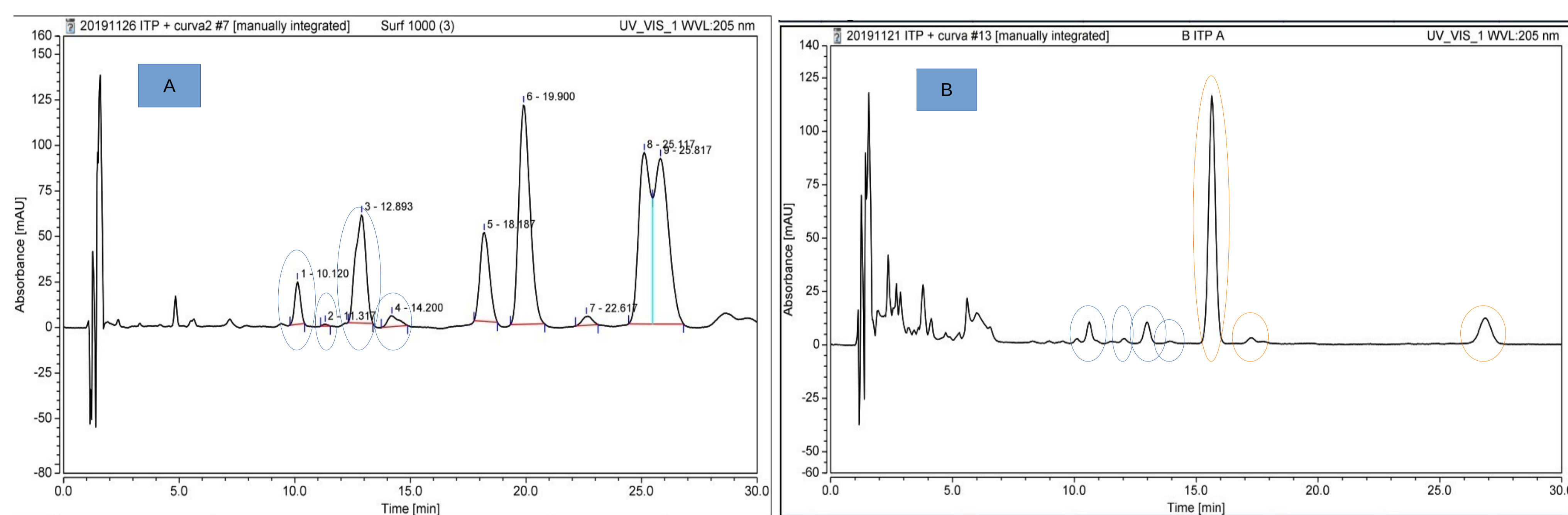


Figura 7. Cromatogramas correspondientes a un patrón comercial de surfactina (A) y un extracto de BS correspondiente al medio 4 (B), obtenidos luego de una corrida de HPLC. En azul se indican los picos coincidentes en ambas muestras, y en naranja los picos correspondientes a compuestos exclusivos del extracto del medio 4.



## CONCLUSIONES

En función de los resultados obtenidos para los distintos ensayos fisicoquímicos, estructurales y de actividad, se puede concluir que la composición de los medios de cultivo utilizados, así como también la naturaleza de la fuente de carbono utilizada para la producción de BS tiene una relación directa con la composición de los extractos de BS obtenidos y el grado de actividad de superficie que los mismos manifiestan.

Los resultados alcanzados apuntarían en la dirección de una composición novedosa de BS producidos por parte del microorganismo utilizado cuando se emplean fuentes de carbono hidrofóbicas en los medios de cultivo.