



Influencia de la concentración y temperatura de fermentación de azúcares reductores obtenidos a partir de hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, en la obtención de un biopolímero empleando *Bacillus subtilis*

Influence of concentration and fermentation temperature of reducing sugars obtained from sugarcane bagasse's hydrolyzate, in obtaining a biopolymer using *Bacillus subtilis*

Cynthia Cabrera Ayala; Carol Novoa Izaguirre *

Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n. Ciudad Universitaria, Trujillo - Perú.

*Autor para correspondencia cnovoazaguirre@gmail.com (C. Novoa).

Recibido 25 Mayo 2016; Aceptado 12 Julio 2016

RESUMEN

En este trabajo se determinó el efecto que ejerce la temperatura de fermentación y la concentración de azúcares reductores en la producción de un biopolímero, utilizando la bacteria *Bacillus subtilis*. Para esto, se realizó un diseño experimental con dos variables independientes: concentración de azúcares reductores (10 g/L, 20 g/L y 30 g/L) y temperatura de fermentación (33 °C, 35 °C y 37 °C). En la hidrólisis del bagazo de caña de azúcar se usó el método de la hidrólisis ácida diluida. La biomasa se determinó mediante el peso seco celular y el contenido de biopolímero, por espectrofotometría molecular UV-VIS y espectrofotometría IR de transformada de Fourier. Los resultados muestran que a una concentración inicial de 30 g/L (gramos de azúcares reductores por litro de hidrolizado) y con la temperatura de fermentación de 37°C, la productividad máxima obtenida de biomasa respecto a sustrato ($Y_{x/s}$) fue de 0,014 g/g (gramos de biomasa producida por gramos de sustrato consumido); es decir 1,4% de rendimiento. Sin embargo, a las condiciones evaluadas, a una temperatura de fermentación de 35°C y con una concentración inicial de 20 g/L (gramos de azúcares reductores por litro de hidrolizado), se logró una productividad máxima de biopolímero respecto a biomasa ($Y_{p/x}$) igual a 0,34 g/g (gramos de biopolímero producido por gramos de biomasa producida); es decir 34,0% de rendimiento.

Palabras clave: bagazo de caña de azúcar, hidrólisis ácida, azúcares reductores, *Bacillus subtilis*, biopolímeros

ABSTRACT

In this work we have determined the effect of the fermentation temperature and the sugars reducing concentration in the biopolymer production, by using the bacterium *Bacillus subtilis*. For this, an experimental design was performed by using two independent variables: sugars reducing concentration (10 g/L, 20 g/L and 30 g/L) and fermentation temperature (33 °C, 35 °C and 37 °C). In the sugarcane bagasse's hydrolysis was used the method of the dilute acid hydrolysis. The biomass was determined by dry cell weight and the biopolymer content, by UV-VIS molecular spectrophotometry and IR spectrophotometry Fourier transformed. The results show that at an initial concentration of 30 g/L (grams of sugars reducing per liter of hydrolyzate) and with the fermentation temperature of 37 °C, the maximum productivity from biomass relative to the substrate ($Y_{x/s}$) was of 0.014 g/g (grams of produced biomass per gram of consumed substrate); i.e. 1.4% yield. However, to the evaluated conditions, at a fermentation temperature of 35°C and with an initial concentration of 20 g/L (grams of sugars reducing per liter of hydrolyzate), was achieved the maximum productivity from biopolymer relative to the biomass ($Y_{p/x}$) equal to 0.34 g/g (grams of produced biopolymer per grams of produced biomass); i.e. 34.0% yield.

Keywords: sugarcane bagasse, acid hydrolysis, reducing sugars, *Bacillus subtilis*, biopolymers.

1. Introducción

En el Perú, anualmente se generan más de 5,8 millones de toneladas de residuos sólidos (entre residuos industriales,

domésticos, etc.) que son difíciles de tratar, especialmente teniendo en cuenta que, según el informe de la Dirección General de Salud (DIGESA), en la actualidad existen

sólo 10 rellenos sanitarios autorizados y 30 no autorizados (es decir, botaderos) (Grupo La República, 2013).

Por otro lado, los polímeros se han convertido en uno de los acompañantes habituales en nuestra vida. La mayoría de los objetos que están a nuestro alrededor están constituidos total o parcialmente por alguno de ellos. Esto ha dado lugar a un gran desarrollo de la industria del polímero, lo cual ha generado problemas de contaminación, debido a su carácter inerte, lo que los hace inmunes a los microorganismos presentes en el medio ambiente, razón por la cual los plásticos de uso masivo derivados del gas o petróleo no son biodegradables. No obstante, existen polímeros biodegradables que son obtenidos de fuentes de materia prima renovables como el almidón del maíz, azúcares, aceites vegetales, entre otros, que se denominan biopolímeros (Centro de Información Técnica, 2007).

Algunos de estos biopolímeros son conocidos como polihidroxicanoatos (PHA), la principal ventaja de los PHA frente a los plásticos derivados del petróleo es que al ser producidos por microorganismos son biodegradables, por lo tanto no hay una acumulación en el medio ambiente (Serrano, 2010).

A pesar de las evidentes ventajas de los PHA frente a los plásticos derivados del petróleo, su uso está muy limitado debido a su alto costo de producción. Por este motivo, gran parte de las investigaciones realizadas sobre los PHA en los últimos años se han concentrado en reducir los costos de producción y aumentar la productividad utilizando diversas estrategias (de Almeida, 2004).

Domínguez *et al.* (2011), después de llevar a cabo el estudio para obtener azúcares reductores totales (ART) a partir del bagazo de caña de azúcar, observaron que la mayor concentración de ART (0,98252g/L) se obtuvieron en condiciones de temperatura de 45 °C y 75 °C y un tiempo de 60 y 90 minutos, respectivamente, ambos a una concentración de H₂SO₄ del 2% (Domínguez *et al.*, 2011).

Banacore *et al.*, (2012), en su investigación sobre la producción de polihidroxicanoatos por *Bacillus subtilis* utilizando glicerol como fuente de carbono,

concluyeron que la bacteria fue capaz de crecer a partir de glicerol, obteniéndose una biomasa de 2,2 g/L para la concentración de glicerol de 5 g/L (las que tomaron fueron de 1, 5, 10, 20 y 30 g/L) en un medio mínimo definido.

Los estudios realizados por Jian y Heiko (2008) demostraron que el bagazo de la caña de azúcar puede ser tratado previamente en una solución de ácido diluido, liberando azúcares y otros hidrolizados incluyendo ácidos orgánicos volátiles y furfurales y la utilización de estos hidrolizados por una bacteria aeróbica, *Ralstonia eutropha* para la biosíntesis de los bioplásticos de valor añadido, es decir, los polihidroxicanoatos (PHA). Los PHA fueron sintetizados y acumulados a 57% en peso de la masa de células en virtud de las relaciones C/N apropiadas.

El objetivo de este trabajo es obtener un bioplástico por fermentación usando *Bacillus subtilis* a partir de azúcares reductores obtenidos por hidrólisis ácida de los residuos de caña de azúcar (bagazo), como fuente de carbono, así mismo estudiar el efecto de la concentración de azúcares reductores fermentables iniciales y la temperatura de fermentación sobre el rendimiento del polihidroxicanoato obtenido. Asimismo, generar nuevas estrategias para el aprovechamiento de subproductos agroindustriales para la producción de nuevos materiales que sean sustitutos de los actuales plásticos sin el efecto adverso para el medio ambiente.

2. Materiales y métodos

Material de estudio

Se usaron 10 kg de bagazo de caña de azúcar, el cual fue obtenido de la empresa agroindustrial Cartavio S.A.A., Grupo Gloria - Perú. Además, se usó el microorganismo *Bacillus subtilis*, proporcionado por el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, el cual se encontraba conservado en agar.

Preparación de la materia prima

El bagazo de caña de azúcar llegó con una humedad aproximada del 50%, por lo que se tomó una muestra y se llevó a una estufa de 55 L de convección natural Memmert a

105 °C hasta peso constante (aprox. durante 2 horas). Luego, se continuó secando en la estufa hasta terminar con toda la muestra. El bagazo ya seco se molió en un molidor de grano, para posteriormente pasar por malla 40 y ser retenido por malla 70; seguido de esto se procedió a guardar el bagazo molido en bolsas herméticas para su conservación y posterior uso (Honorato, 1998).

La caracterización química de la materia se realizó según la metodología de Rowell (2005), que consistió en la determinación de lignina ácida soluble e insoluble, así como de α , β , γ – celulosa y extractivos en la biomasa.

El análisis bromatológico se realizó de acuerdo a las normas AOAC (1998) para determinar proteínas, grasas, fibra cruda, cenizas, humedad y carbohidratos.

Para la obtención de los azúcares fermentables se procedió a realizar una hidrólisis ácida con H_2SO_4 según la metodología descrita por Mussato (2008), usando una relación líquido/sólido de 8 g/g, 100 mg de H_2SO_4 g^{-1} de materia seca y un tiempo de reacción de 17 min.

Una vez terminada la hidrólisis, se filtró el líquido resultante al vacío, usando para esto un embudo Buchner de 8,5 cm de diámetro y usando papel filtro Whatman N°41. El filtrado obtenido se neutralizó usando NaOH en pellets, usando para esto un agitador magnético y, controlando el pH, se llevó el hidrolizado de un pH inicial de $0,9 \pm 0,05$ a un pH de $7,0 \pm 0,1$; al llegar a un pH cercano al punto final establecido, empezó a formarse un precipitado, por lo cual después de realizar la neutralización se centrifugó el hidrolizado para eliminar el precipitado.

Se midió la cantidad de azúcares totales fermentables (ATF) usando el método DNS de Miller (1959) y fueron almacenadas a 4 °C, hasta su posterior uso.

Activación del microorganismo

Para la activación y replicación se utilizó como medio el descrito por Aggarwal, (2011), el cual consistió en agar nutriente conteniendo: 15 g/L de agar, 3 g/L de extracto de carne, 5 g/L de peptona, 8 g/L de cloruro de sodio y 20 g/L de glucosa. Luego, se sembró en placas Petri y se incubó a 35 °C durante 3 días, para luego ser almacenado a 4 °C.

Diseño experimental

Para el desarrollo de la presente investigación se realizó un diseño experimental del tipo bifactorial, con 2 variables independientes: concentración de azúcares (10 g/L, 20 g/L y 30 g/L) y temperatura de fermentación (33 °C, 35 °C y 37 °C), cada uno con 3 niveles (3^2) y con una réplica por cada una, más la prueba en blanco. Por lo cual el número de pruebas fue de: $3^2 = 9 + 1$ (prueba en blanco) = 10 pruebas. (a) Variable independiente A: concentración de azúcares reductores, (b) variable independiente B: temperatura de fermentación, (c) variable C: prueba en blanco (en ausencia de *Bacillus subtilis*), (d) variable dependiente: gramos de biopolímero producido y (e) prueba en blanco: esta prueba se realizó para determinar si el inóculo del *Bacillus subtilis* influye en la concentración y temperatura, así como descartar si hay pérdidas de PHA. Se mantuvieron como variables fijas la velocidad de agitación (200 rpm), el pH inicial de la fermentación (7,0), la fuente de nitrógeno [$(NH_4)_2SO_4$] y el tiempo de la fermentación, que fue de 24 horas. Se estudiaron las interacciones entre los dos factores a ser evaluados y su efecto en la producción del biopolímero. Como unidad experimental se tomaron 250 mL de caldo fermentativo.

Preparación del inóculo

Como paso previo a la fermentación, se procedió a la preparación del inóculo, el cual se realizó en tres matraces de 100 mL. Luego se prepararon 30 mL de inóculo el cual contenía 24 mL de hidrolizado (pH = 7) con una concentración de 10, 20 y 30 g/L (dependiendo de la concentración a la que se esté trabajando) y 6 mL de solución mineral.

La solución de sales minerales se preparó según el método de Du (2001), para lo cual, 1 litro de solución contenía: 2,5 g de sulfato de amonio ($(NH_4)_2SO_4$), 5,8 g de fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), 3,7 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), 0,4 g de sulfato de magnesio ($MgSO_4$) y 1 mL de solución de microelementos, la cual para un litro de solución contenía: 2,78 g de sulfato de hierro (II) heptahidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), 1,98 g de cloruro de manganeso (II) tetrahidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$), 2,81 g de sulfato de cobalto (II) heptahidratado

($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 1,67 g de cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,17 g de cloruro de cobre dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y 0,29 g de sulfato de zinc (ZnSO_4).

Los matraces conteniendo el medio fueron llevados a la autoclave a 121 °C por 15 min. El medio una vez esterilizado se llevó a temperatura ambiente y se procedió a la siembra del microorganismo en condiciones de asepsia.

Luego se colocaron en la incubadora rotatoria a 33, 35 y 37 °C (dependiendo de la temperatura a la que se esté trabajando) y agitación de 200 rpm por un tiempo de incubación de 24 h.

Fermentación a escala Erlenmeyer

La fermentación se realizó por triplicado en matraces Erlenmeyer de 500 mL, usando: 20 mL de solución mineral y 75 mL de solución de hidrolizado (pH = 7).

Se llevó a la autoclave a 121 °C por 15 min para posteriormente adicionarse 5 mL de inóculo haciendo una relación inóculo/medio de fermentación de 5% v/v.

Se colocó en la incubadora rotatoria a 200 rpm a 33, 35, 37 °C (dependiendo de la temperatura a la que se esté trabajando) por 24 horas, tomando muestras cada hora.

Cuantificación de la producción de biomasa

Se realizó mediante la técnica de peso seco celular, el cual consistió en tomar 2 mL de muestra de manera aséptica, en tubos de ensayo previamente secados y pesados, y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min. El sobrenadante se separó para medir azúcares reductores, y el precipitado se colocó en la estufa a 105 °C hasta peso constante, de esta manera se pudo obtener el peso seco celular.

Cuantificación del consumo de azúcares

Se tomó el sobrenadante del proceso anterior y se usó para medir la concentración de azúcares reductores usando la metodología de Miller (1959).

Cuantificación del polihidroxialcanoato

Se tomaron 2 mL de muestra y se centrifugaron a 5000 rpm, se descartó el sobrenadante y el precipitado se trató según la metodología descrita por Martínez, (2004) y explicada con más detalle en la etapa de extracción y purificación. Los pellets una vez secos, se procedieron a

digerir con H_2SO_4 concentrado durante 30 min a 90°C y posteriormente se midió la absorbancia a 235 nm tomando como blanco H_2SO_4 concentrado.

Extracción y purificación

Una vez terminada la fermentación, se centrifugaron las soluciones obtenidas y se descartó el líquido sobrenadante, se resuspendieron con tampón fosfato – PBS (Eaton, 2005) y se centrifugaron a 6000 rpm por 15 min, luego se adicionó una solución de NaClO al 5% v/v y 10 mM de EDTA en una relación de 1:4 g de células/volumen de solución, se incubaron a 37 °C por 90 min para luego lavarse y centrifugarse con agua destilada (Martínez, 2004). Luego se procedió a lavar con acetona y con etanol y se dejó secar a temperatura ambiente.

Identificación del PHA

Para la identificación del biopolímero, se tomaron los pellets purificados en la etapa anterior y se llevaron a leer en el espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier, usando como muestra patrón el ácido poli – [(R) – 3 – hidroxibutirato], buscando los picos característicos del grupo carbonilo del polihidroxialcanoato.

Este paso se llevó a cabo gracias al Laboratorio de Investigación Multidisciplinaria (LABINM) de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico ANOVA para determinar los datos de rendimientos de biopolímero producido en base a biomasa producida.

3. Resultados y discusión

El bagazo de caña de azúcar resulta ser una fuente de biomasa con alto potencial de aprovechamiento para los procesos biotecnológicos por su alta concentración de celulosa y hemicelulosa (70,5% = 49,3 + 21,2; Tabla 1), lo que lo convierte en un sustrato ideal para la obtención de azúcares reductores, datos acordes a los obtenidos por Mussatto (2008) para la hemicelulosa alrededor del 22%.

Tabla 1. Caracterización química del bagazo de caña de azúcar en % peso libre de humedad

Prueba	Método	Ensayos			\bar{x}	S	CV
		1	2	3			
Extractivos	Ehrman, 1994	4,4	4,2	4,4	4,3	0,12	3%
Lignina insoluble	Ehrman, 1995	23,2	23,6	24,7	23,8	0,76	3%
Lignina soluble	Ehrman <i>et al.</i> , 1996	1,3	1,4	1,3	1,3	0,05	4%
Celulosa	TAPPI, 103. 1999	50,8	49,1	48,2	49,3	1,33	3%
Hemicelulosa	TAPPI, 203. 2000	20,4	21,8	21,4	21,2	0,73	3%
Cenizas	Ehrman, 1994	2,8	2,9	2,9	2,9	0,06	2%

Asimismo es importante tener en cuenta la cantidad de ligninas y extractivos presentes (30% aprox.), ya que estos compuestos pueden actuar como inhibidores de la fermentación en las etapas siguientes (Wang *et al.*, 2014).

Se nota que los valores porcentuales de grasas y carbohidratos son un poco bajos (Tabla 2) a diferencia de los resultados obtenidos por Avalos (2010) y Medina *et al.* (2007); sin embargo, los valores de proteínas son un poco más altos que los obtenidos por Avalos (2010). A pesar de esto, los valores de cenizas, humedad y fibra cruda, se encuentran dentro del rango de aceptabilidad marcado por los mismos autores.

El método de la hidrólisis ácida diluida empleada para la obtención de azúcares reductores, dio como resultados los expresados en la Tabla 3.

En esta hidrólisis el porcentaje de rendimiento de azúcares reductores respecto a hemicelulosas rondó el 150%, un alto rendimiento tomando en cuenta que se usó una autoclave en vez de un reactor para realizar las hidrólisis.

Se evaluaron los coeficientes de rendimientos de producción de biomasa del

Bacillus subtilis en base a la cantidad de sustrato consumido, para las diferentes temperaturas y concentraciones de azúcares reductores iniciales estudiadas, los resultados se pueden apreciar en la Tabla 4.

Tabla 2. Análisis bromatológico del bagazo de caña de azúcar en valores porcentuales

Prueba	Método AOAC, 954	Ensayos			\bar{x}	S	CV
		1	2	3			
P	01	1,15	1,13	1,18	1,15	0,025	2%
G	02	0,05	0,052	0,048	0,05	0,002	4%
C	03	2,80	2,90	2,90	2,87	0,058	2%
H	04	8,50	9,00	8,70	8,73	0,252	3%
FC	05	48,30	45,50	49,20	47,67	1,930	4%
CHO	06	39,20	41,42	37,97	39,53	1,747	4%

P = Proteínas, G = Grasas, C = Cenizas, H=Humedad, FC = Fibra cruda, CHO = Carbohidratos.

Tabla 3. Resultados de hidrólisis ácida débil a 10 muestras de bagazo de caña de azúcar

Hidrólisis	Peso (g)	Concentración de azúcares reductores (g/L)	Volumen de recuperación (ml)	Azúcares reductores (g)	% Rendimiento total	%Rendimiento de azúcares reductores respecto a hemicelulosas
1	30,0340	30,026	304	9,1	30,39	143,47
2	30,0051	31,913	288	9,2	30,63	144,60
3	30,0009	29,565	299	8,8	29,47	139,10
4	30,0055	31,836	306	9,7	32,47	153,27
5	30,0007	34,715	278	9,7	32,17	151,86
6	30,0036	30,267	321	9,7	32,38	152,86
7	30,0032	31,361	310	9,7	32,40	152,97
8	30,0009	29,366	315	9,3	30,83	145,56
9	30,0061	34,780	276	9,6	31,99	151,02
10	30,0034	31,042	312	9,7	32,28	152,38

Tabla 4. Rendimientos de biomasa producida en base a sustrato consumido $Y_{x/s}$ en porcentaje a diferentes concentraciones de azúcares reductores iniciales y temperaturas de fermentación

A.R. (g/L)	Temperatura		
	33°C	35°C	37°C
10	1,25	0,30	0,28
20	0,61	0,72	0,47
30	0,19	0,26	1,44

Al observar la tabla anterior, las mejores producciones de biomasa en relación al sustrato se dieron a la temperatura de 37 °C y concentración de azúcares reductores de 30 g/L, estos rendimientos alcanzados son comparables con los obtenidos por Banacore *et al.* (2012) que logra alcanzar hasta 0,25 g.g⁻¹ de rendimientos usando *Bacillus subtilis* y glicerol como fuente de carbono. Además, se evaluaron los coeficientes de rendimientos de biopolímero producido en base a la cantidad de sustrato, para las diferentes temperaturas y concentraciones de azúcares reductores iniciales estudiadas (Tabla 5).

Tabla 5. Rendimientos de biopolímero producido en base a sustrato consumido $Y_{p/s}$ en porcentaje a diferentes concentraciones de azúcares reductores iniciales y temperaturas de fermentación

A.R. (g/L)	Temperatura		
	33 °C	35 °C	37 °C
10	0,11	0,08	0,08
20	0,05	0,25	0,08
30	0,06	0,08	0,09

Los mejores rendimientos se obtuvieron a la temperatura 35 °C y 20 g/L de azúcares reductores usados; sin embargo, de manera general los rendimientos obtenidos son bajos en comparación a la investigación realizada por Raveendran *et al.* (2013) que obtuvo rendimientos producto sustrato de $Y_{p/s} = 0,45 \text{ g.g}^{-1}$ (45%), y esto se debería al uso de un hidrolizado sin tratamiento previo con baja concentración de azúcares reductores.

De la misma manera, se evaluaron los coeficientes de rendimientos de biopolímero producido en base a la cantidad de biomasa de *Bacillus subtilis* producida, para las diferentes temperaturas y concentraciones de azúcares reductores iniciales estudiadas (Tabla 6).

Tabla 6. Rendimientos de biopolímero producido en base a biomasa producida $Y_{p/x}$ en porcentaje a diferentes concentraciones de azúcares reductores iniciales y temperaturas de fermentación

A.R. (g/L)	Temperatura		
	33°C	35°C	37°C
10	9	25	28
20	9	34	18
30	31	31	6

El rendimiento de producción de biopolímero en base a la biomasa fue el factor decisivo a la hora de evaluar la producción en general. La mejor producción se dio a de 35 °C y 20 g/L de azúcares reductores iniciales; aunque hubo una producción menor de biomasa a estas condiciones ($Y_{x/s} = 0,0072$). El *Bacillus subtilis* se logra desarrollar para alcanzar un consumo de sustrato aceptable en comparación con las otras condiciones. Además, los rendimientos globales de obtención del biopolímero, son relativamente altos en comparación con los obtenidos por otros trabajos de similar índole (Banacore *et al.*, 2012 y Raavendran, 2013).

Se evaluó la producción de biomasa a temperaturas de 33, 35 y 37 °C y concentración de azúcares reductores iniciales de 10, 20 y 30 g/L. Se utilizó el paquete DMFit vrs. Para Excel (Figura 2), con el cual se obtuvo las curvas de crecimiento ajustadas y de las velocidades máximas potenciales.

Por lo contrario a lo esperado a la temperatura de 37 °C, al *Bacillus subtilis* le toma más tiempo para alcanzar la fase estacionaria, aproximadamente unas 5 horas, a 33°C se observa que el tiempo para alcanzar la fase estacionaria se reduce a 4 horas en promedio, lo que se reflejará en la velocidad máxima de crecimiento, a 35°C se esperaría que el tiempo para alcanzar la fase estacionaria y la velocidad de crecimiento sea mayor que a 33 °C, sin embargo aun cuando los tiempos a los que alcanza la fase estacionaria suelen ser menores, la velocidad de crecimiento no aumenta debido a que no hay un incremento en la producción de biomasa, esto puede deberse a un metabolismo más rápido por parte del *Bacillus subtilis*, que logra agotar los nutrientes esenciales para el crecimiento (fuente de nitrógeno) antes de lograr alcanzar concentración altas de biomasa.

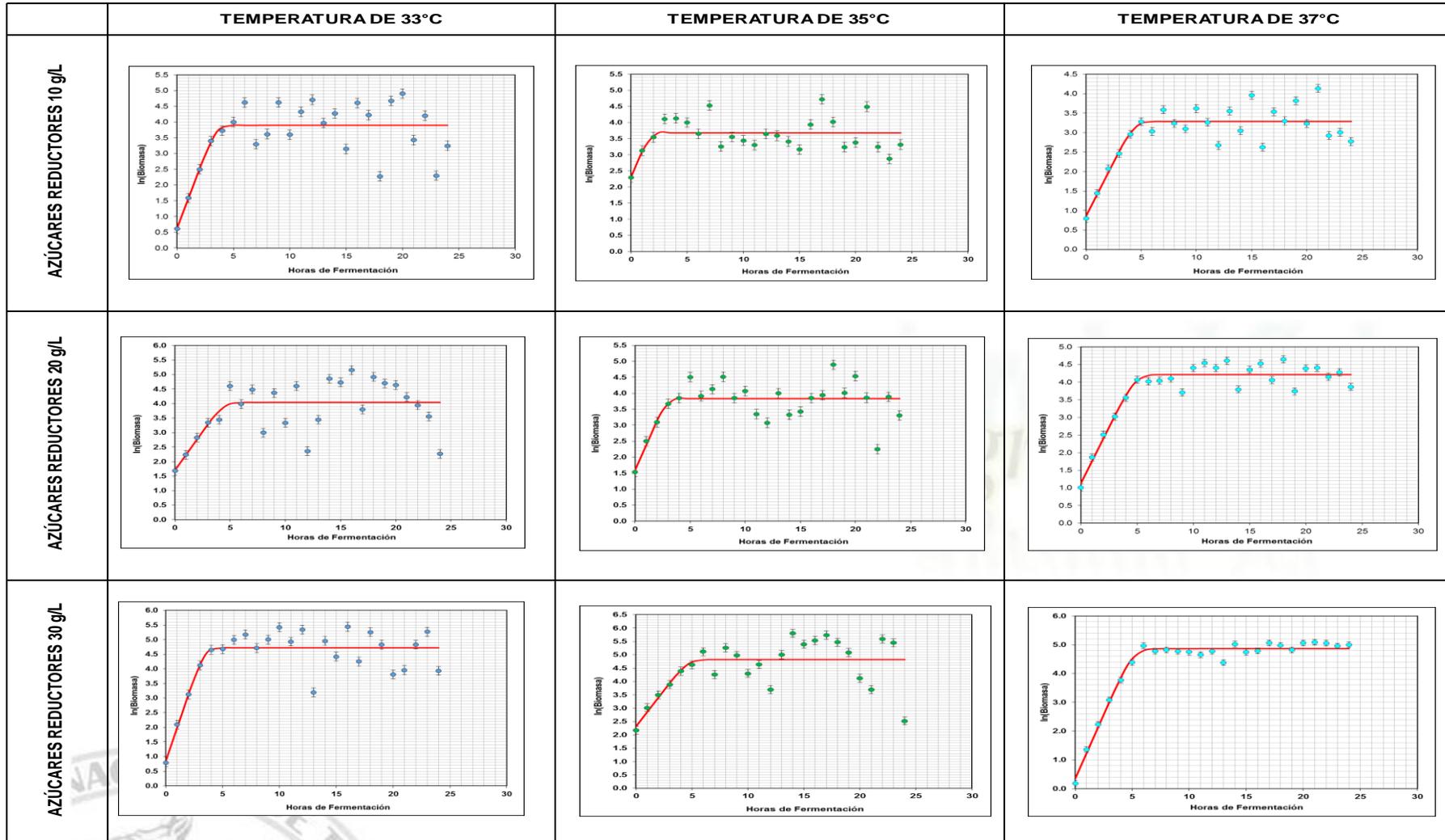


Figura 2. Producción de biomasa a 33 °C, 35 °C y 37 °C de temperatura de fermentación y 10 g/L, 20 g/L y 30 g/L de azúcares reductores iniciales usando *Bacillus subtilis*.

Durante los ensayos realizados también se evaluó el consumo de azúcares reductores durante el proceso fermentativo: a 33 °C se alcanzó en promedio un 83% de rendimiento, esto puede ser debido a que el *Bacillus subtilis* consume una mayor cantidad de azúcar para poder alcanzar la fase estacionaria y luego para convertir el excedente de azúcares reductores en polímero; al ser su metabolismo más lento, puede ser posible que no afecte en exceso la inhibición de algunos compuestos en el hidrolizado; mientras que a 35 °C el mejor rendimiento se obtuvo a una concentración de azúcares reductores iniciales de 10 g/L (88%), sin embargo el rendimiento para una concentración de azúcares iniciales de 20 g/L es mucho menor (63%), finalmente a 37 °C se obtuvieron los rendimientos más bajos, 38% de rendimiento para una concentración de azúcares reductores iniciales de 30 g/L, debido posiblemente a un rápido consumo de los nutrientes limitantes (fuentes de nitrógeno), lo cual también se verá reflejado en una menor cantidad de biopolímero producido. De manera similar se buscó determinar si las concentraciones de azúcares reductores iniciales tienen algún efecto en el consumo de sustrato, sin embargo los datos obtenidos son variados: a 10 g/L de concentración de azúcares reductores iniciales se observan rendimientos altos (88% y 82% para temperaturas de 35 °C y 37 °C, respectivamente), siendo el mejor rendimiento a 33 °C con 92%, esto debido a una baja cantidad de compuestos inhibidores en el hidrolizado de bagazo de caña de azúcar, mientras que a 20 g/L de concentración de azúcares reductores iniciales los rendimientos tienden a bajar en comparación a los valores obtenidos a una concentración de azúcares reductores iniciales de 10 g/L, especialmente para una temperatura de 35 °C (63%), por último, a 30 g/L de concentración de azúcares reductores iniciales, los rendimientos que se obtuvieron fueron los más bajos, 38% de rendimiento para una temperatura de 37 °C, lo cual puede deberse a que bajo estas condiciones el *Bacillus subtilis* tiene un mejor metabolismo, sin embargo esto no indica que habrá una mejor producción de biopolímero.

Una de las variables a estudiar dentro del presente trabajo, es la temperatura de fermentación a la cual el *Bacillus subtilis* trabajará para la producción del biopolímero.

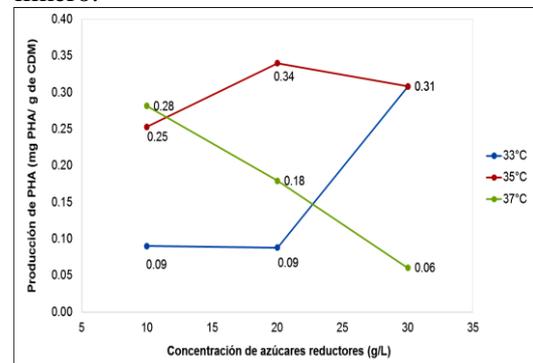


Figura 3. Influencia de la temperatura de fermentación en la producción del biopolímero.

Los mejores rendimientos en cuanto a la obtención del biopolímero se obtuvieron para la temperatura de 35 °C. Asimismo, aunque no exista una relación directa entre la temperatura de fermentación y la composición del biopolímero (Fernández *et al.*, 2005), ésta sí influye en la producción de biomasa; sin embargo, aunque se esperaría mejores rendimientos a esta temperatura, esto no se ve así en los ensayos experimentales, siendo esto resultado de que a mayor temperatura el *Bacillus subtilis* presenta un mejor metabolismo y por ende menor acumulación del biopolímero.

Otra variable a estudiar en el presente trabajo fue la concentración de azúcares reductores iniciales los cuales provienen de la hidrólisis ácida débil del bagazo de caña de azúcar.

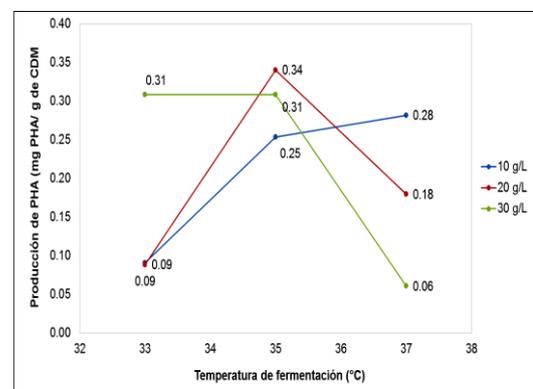


Figura 4. Influencia de la concentración de azúcares reductores iniciales en la producción del biopolímero.

Los mejores rendimientos en cuanto a obtención del biopolímero se lograron a una concentración de azúcares reductores de 20 g/L. A concentraciones mayores se muestra una disminución en la producción del biopolímero, probablemente debido a que con mayores concentraciones de hidrolizado haya una mayor carga de compuestos que inhiben el crecimiento bacteriano y por consiguiente la producción de biopolímero, ya que el hidrolizado no recibe ningún tratamiento de purificación previa.

De manera conjunta se evaluaron los parámetros definidos anteriormente (Tabla 7).

Tabla 7. Producción de biopolímero a diferentes concentraciones de azúcares reductores iniciales y temperaturas de fermentación

A.R. (g/L)	Mg PHA/gCDM		
	Temperatura		
	33 °C	35 °C	37 °C
10	0,09	0,25	0,28
20	0,09	0,34	0,18
30	0,31	0,31	0,06

La mejor producción para el presente trabajo se obtuvo a 35 °C y 20 g/L de azúcares reductores (0,34 mg PHA/g de CDM), disminuyendo esta producción cuando se incrementa o disminuye la temperatura.

Para la identificación del PHA, mediante espectrofotometría molecular UV- VIS, se convirtió la muestra resultante en ácido crotónico ($C_4H_6O_2$) por digestión ácida con ácido sulfúrico concentrado y luego se

buscó la máxima absorción ultravioleta entre 190 nm y 280 nm.

El pico mostrado en la Figura 5 podría deberse a la presencia del doble enlace presente en el ácido crotónico, el cual es producto de la hidrólisis de la muestra resultante. A su vez, la curva de color fucsia se inclina hacia la izquierda probablemente debido a que se trata de un ácido (estándar de poli - (R) - 3 - polihidroxitirato). Por otro lado, la curva correspondiente al hidrolizado no presenta ningún pico debido a que no hay presencia de biopolímero.

Para la cuantificación del biopolímero se usó el mismo método utilizado para la identificación del biopolímero, digestión con ácido sulfúrico y su posterior lectura en UV-VIS (Law y Slepecky, 1960) para esto se realizó una curva de calibración usando como patrón polihidroxitirato a diferentes pesos.

El análisis de espectrofotometría infrarroja de transformada de Fourier, se llevó a cabo usando un patrón de poli - (R) - 3 - polihidroxitirato.

A la temperatura de 35 °C apareció un pico ancho a 1050 cm^{-1} que podría ser el correspondiente a un enlace simple de C-O, asimismo, se observó un pico ancho alrededor de los 3350 cm^{-1} posiblemente debido a la presencia de humedad en la muestra. A la temperatura de 37 °C, la señal a 1050 cm^{-1} se mantuvo, pero aparecieron dos picos a 1650 cm^{-1} y a 1550 cm^{-1} posiblemente por la presencia del grupo carbonilo.

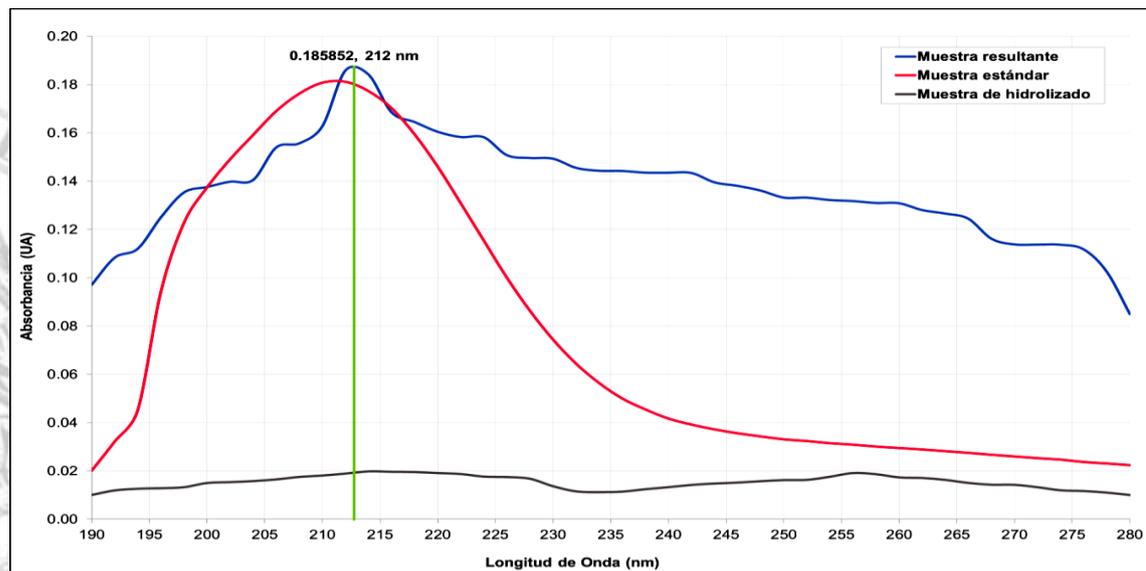


Figura 5. Identificación de PHA por espectrofotometría molecular UV- VIS a 212 nm.

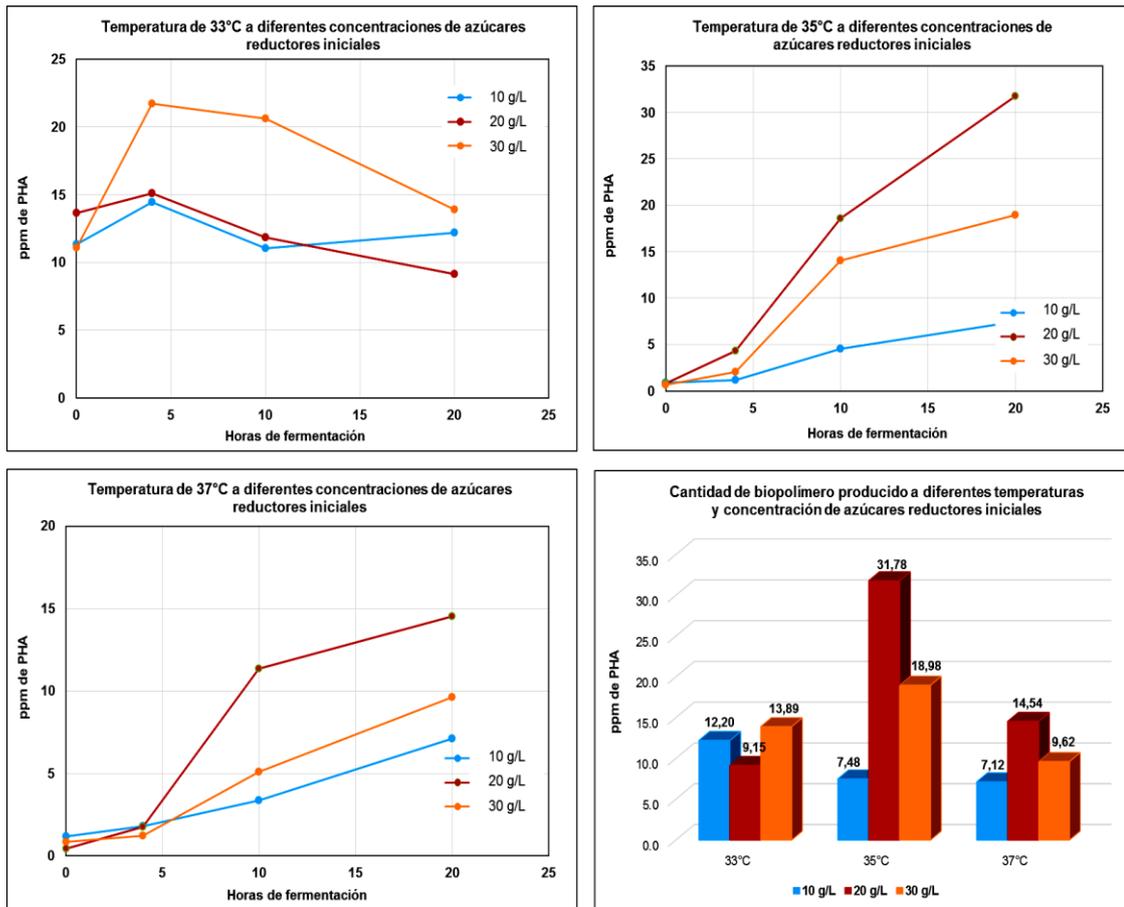


Figura 6. Curvas de producción del biopolímero (ppm) a 33, 35 y 37 °C de temperatura de fermentación y 10, 20 y 30 g/L de azúcares reductores iniciales y su cuantificación mediante UV-VIS.

Asimismo, la señal que apareció a la temperatura de 35 °C (3350 cm^{-1}), que corresponde al O-H de la molécula de agua.

A la temperatura de 33°C apareció un pico ancho a 1010 cm^{-1} que podría ser el correspondiente a un enlace simple de C-O.

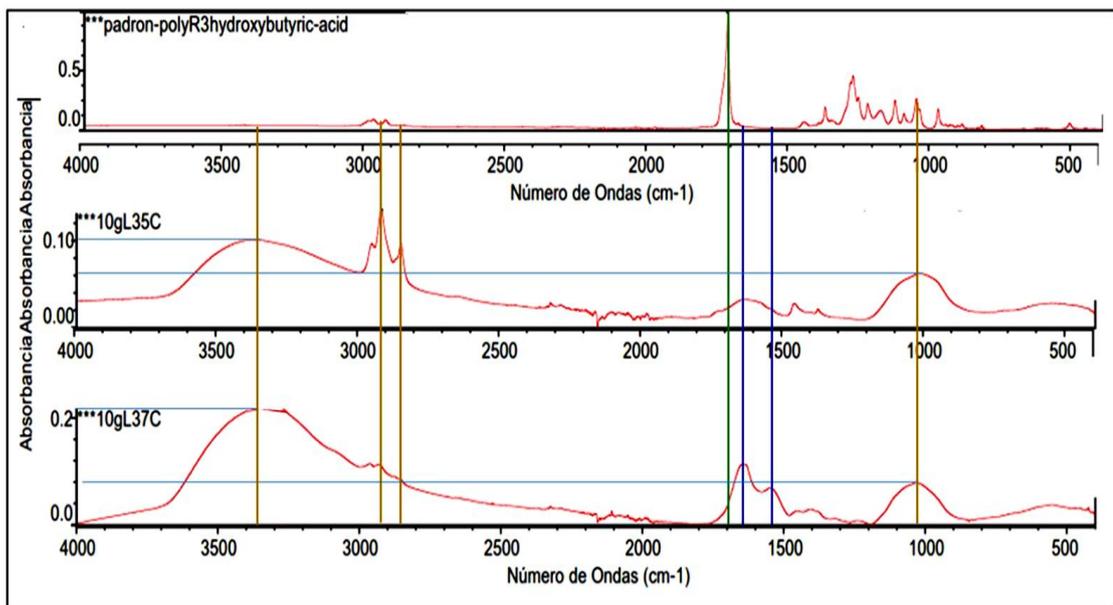


Figura 7. Comparación de espectros IR entre patrón PHA y producto de la biotransformación a 35° y 37 °C para una concentración de 10 g/L de azúcares reductores.

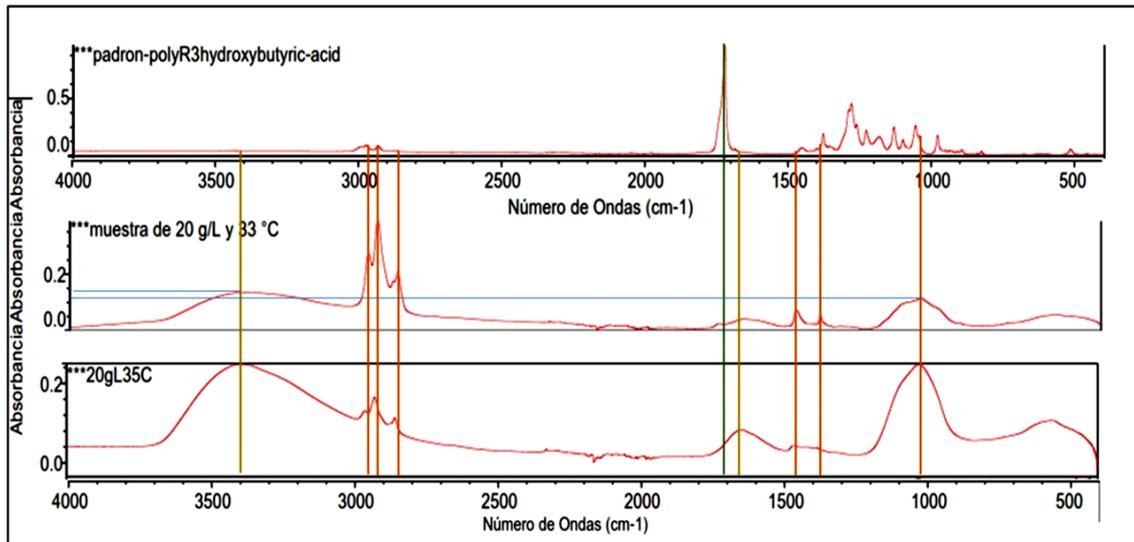


Figura 8. Comparación de espectros IR entre patrón PHA y producto de la biotransformación a 33° y 35 °C para una concentración de 20 g/L de azúcares reductores.

Por otro lado, cuando la temperatura fue de 35 °C, la señal a 1010 cm^{-1} se mantuvo, pero aumentó la absorbancia de la señal, asimismo se presentó un pico a 1650 cm^{-1} , probablemente debido a la presencia del grupo carbonilo. Se observó además una señal a 3350 cm^{-1} que podría ser el correspondiente al enlace O-H de la molécula de agua. Se evidencia además que cuando se incrementó la temperatura, manteniendo la concentración de azúcares reductores hubo un incremento de la señal del O-H de la molécula de agua y la del enlace simple de C-O.

A la temperatura de 33 °C aparecieron dos picos contiguos a 1375 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} ,

que podrían deberse a la presencia de un radical metilo. Por otro lado, cuando la temperatura fue de 35 °C, apareció una señal a 1650 cm^{-1} posiblemente por la presencia del grupo carbonilo. A su vez, la señal que apareció a 3395 cm^{-1} posiblemente fue debido a la presencia de humedad en la muestra. Finalmente, a la temperatura de 37°C, aparecieron dos picos contiguos a 1375 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} , que podrían deberse a la presencia de un radical metilo, se observó también una señal a 1600 cm^{-1} posiblemente por la presencia del grupo carbonilo.

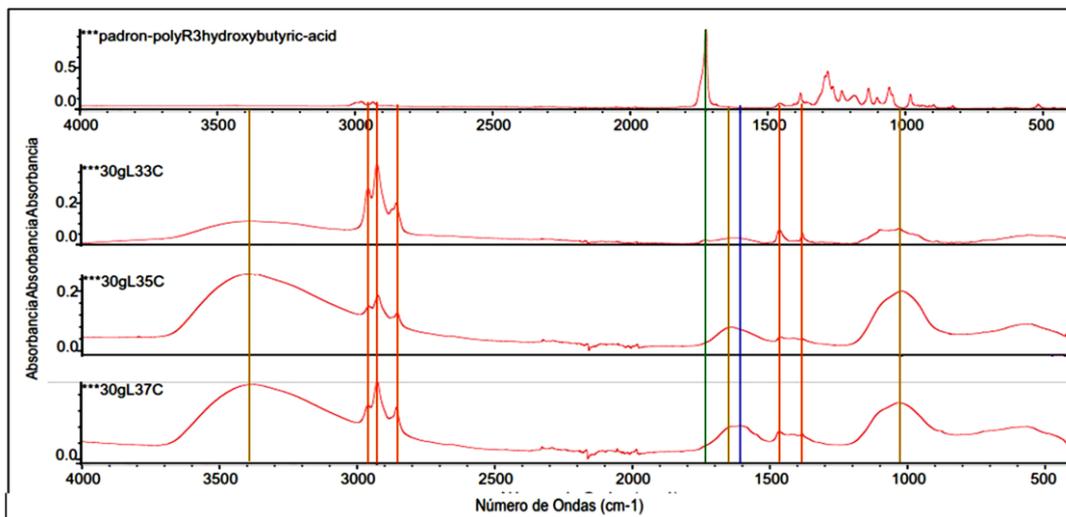


Figura 9. Comparación de espectros IR entre patrón PHA y producto de la biotransformación a 33, 35 y 37 °C para una concentración de 30 g/L de azúcares reductores.

4. Conclusiones

La concentración de azúcares reductores a partir de bagazo de caña de azúcar, a diferencia de la temperatura de fermentación, no influye de manera significativa en la obtención del biopolímero usando *Bacillus subtilis*. A su vez, la concentración inicial de azúcares reductores adecuada para una mayor producción del biopolímero se determinó en 20 g/L, mientras que la temperatura adecuada para una mayor producción del biopolímero fue de 35 °C produciendo una cantidad de biomasa de 0,34 g.g⁻¹. En conclusión, se obtuvo el biopolímero (polihidroxialcanoato) a partir del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar empleando *Bacillus subtilis*.

Referencias

- Aggarwal, N.; Goel, V.; Kumari, A.; Mittal, A.; Singh, G.; Yadav, A. 2011. Optimization of poly-β-hydroxybutyrate production from *Bacillus* species. *European Journal of Biological Sciences* 3 (4): 112-116.
- De Almeida, A.; López, N.; Ruiz, J.; Pettinari, J. 2004. Bioplásticos: una alternativa ecológica. *Revista Química Viva* 3 (3): 122-133.
- AOAC. 1998. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry.
- Avalos, C. 2010. Utilización de la caña de azúcar fresca y picada (20, 40, 60 y 80%) más alfalfa en crecimiento y engorde de cuyes. Tesis de grado para obtención del título de Ingeniero Zootecnista. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. 31 pp.
- Banacore, A.; Martínez, G.; Saravia, V. 2012. Producción de polihidroxialcanoatos (PHA) por *Bacillus* sp. utilizando glicerol como fuente de carbono. Tesis de grado en licenciatura en biología opción biotecnología. Instituto de Ingeniería Química. Uruguay. 53-56.
- Centro de Información Técnica. 2007. Degradación de los materiales plásticos. Entidad Técnica Profesional Especializada en Plásticos y Medio Ambiente 21: 3.
- Domínguez, M.; Alcalá, V.; Álvarez, A.; Castrejón, T.; Granados, M.; Hernández, F.; Tapia, J. 2011. Estudio de la Cinética de la Hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar sin pretratamiento para la obtención de azúcares reductores. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 12 (3): 153-159.
- Du, G.; Chen, J.; Yu, J.; Lun, S. 2001. Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutrophus* in a two-stage culture system. *Journal of Biotechnology* 88: 59-65.
- Eaton, A.; Clesceri, L.; Rice, E.; Greenberg, A. 2005. Standard Methods for the examination of water & wastewater. Centennial Edition. Edición 21. EE.UU. 8: 43-44.
- Fernández, D.; Bassas, M.; Llorens, J.; Manresa, A.; Marqués, A.; Rodríguez, A.; Solanas, A.; Viñas, M. 2005. Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. *Biochemical Engineering Journal* 26 (2): 159-167.
- Grupo La República. 2013. Diez rellenos sanitarios no son suficientes para tratar toneladas de basura en el Perú. Disponible en: <http://larepublica.pe/04-12-2013/10-rellenos-sanitarios-no-son-suficientes-para-tratar-toneladas-de-basura-en-peru>
- Honorato, J.; Hernández, J. 1998. Determinación de componentes químicos de la madera de cinco especies de encino del estado de Puebla. *Madera y Bosque* 4 (2): 79-93.
- Jian Y.; Heiko S. 2008. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Biores Technol* 99: 8042–8048.
- Law, J.; Slepecky, R. 1960. Assay of Poly-β-hydroxybutyric acid. Universidad de Harvard. EE.UU. 82 (1): 33-36.
- Martínez, J.; Carballo, M.; Fernández, A.; Galego, N.; López, A.; Marín, D.; Núñez, R.; Rodríguez, M.; Villaverde, M. 2004. Producción de Polihidroxialcanoatos en Bacterias Diazotrofas. I. Influencia de la aeración en la síntesis de Poli-β-Hidroxibutirato *Azospirillum brasilense* CEPA 7. *Revista Biología* 18(1): 87-95.
- Medina, H.; Martínez, M.; Bonilla, J. 2007. Caracterización Bromatológica de materias primas y subproductos en el Municipio de Quibdó, Chocó. *Revista Institucional Universidad Tecnológica del Chocó: Investigación, Biodiversidad y Desarrollo* 26 (2): 11.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31: 426-428.
- Mussato, S.; Dragone, G.; Roberto, I.; Teixeira, J. 2008. Total Reuse of Brewer's Spent Grain in Chemical and Biotechnological Processes for Production of Added-Value Compounds. *Bioenergy: Challenges and Opportunities* 1: 1-6.
- Raveendran, S.; Binod, P.; Pandey, A.; Silviya, N. 2013. Pentose-rich hydrolysate from acid pre-treated rice straw as a carbon source for the production of poly-3-hydroxybutyrate. *Biochemical Engineering Journal* 78: 67-72.
- Rowell, R. 2005. Cell Wall Chemistry. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. Taylor & Francis Group. Edición 1. EE.UU. 70-71.
- Serrano, J. 2010. Polihidroxialcanoatos (PHAs): Biopolímeros producidos por microorganismos. Una solución frente a la contaminación del medio ambiente. *Teoría y Praxis Investigativa* 5 (2): 79-84
- Wang, W.; Johnson, D.; Hunsinger, G.; Pienkos, P.; Yang, S. 2014. Connecting lignin-degradation pathway with pre-treatment inhibitor sensitivity of *Cupriavidus necator*. *Frontiers in Microbiology* 5: 247-251.