

Fermentación por vía directa con bacterias celulolíticas de bagazo pretratado con altas concentraciones de hidróxido de sodio

G. IGLESIAS, R. LÓPEZ PLANES Y L. M. HERNÁNDEZ

Dpto. de Fermentaciones, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 26 de septiembre de 1977

Recibido: 27 de abril de 1978

ABSTRACT. Alkaline pretreatment of bagasse eliminates the protection effect of lignin and decreases the cristalinity of cellulose, improving the attack of the material by cellulolytic bacteria for obtaining animal consumption protein. The experiments were carried out with different solutions sodium hydroxide at a temperature of 180°C for one hour. Cellulomonas strains were used in shaker fermentations. The growth was followed through optical density measurements at 600 nm. Experiments indicated the convenience of using low concentrations of sodium hidroxide, for instance 4%. A diauxic growth was observed and the specific growth rates (M_1 and M_2) were calculated for the two steps of exponential growth. Values of $M_1 = 0,16 \text{ h}^{-1}$ and $M_2 = 0,088 \text{ h}^{-1}$ were observed for 4%, with 63% of bagasse consumed in 70 hours.

RESUMEN. Las técnicas de pretratamiento alcalino de bagazo permite eliminar el efecto protector de la lignina y disminuir la cristalinidad de la celulosa, permitiéndose de esta forma mejorar el ataque del material con bacterias celulolíticas y obtener proteína. Las experiencias se realizaron pretratando bagazo con sosa a diferentes concentraciones a una temperatura de 180°C en corriente de aire en la estufa durante una hora. Para la fermentación en zaranda se utilizó un cultivo de cellulomonas, siguiéndose el crecimiento mediante densidad óptica a 600 nm. Las experiencias realizadas indican la conveniencia de trabajar con concentraciones bajas de sosa, preferiblemente al 4%. Se ha comprobado nuevamente la aparición del comportamiento diáuxico, calculándose las velocidades específicas de crecimiento (M_1 y M_2) para las dos etapas de crecimiento exponencial obteniéndose para 4% de sosa los valores de $M_1 = 0,16 \text{ h}^{-1}$ y $M_2 = 0,088 \text{ h}^{-1}$ con consumos de bagazo del orden del 63% en 70 horas.

INTRODUCCION

Las técnicas de pretratamiento alcalino de bagazo permiten eliminar el efecto protector de la lignina y disminuir la cristalinidad de la celulosa, permitiéndose de esta forma aumentar el ataque del material con bacterias celulolíticas y obtener proteína de consumo animal (*Callihan y cols.*, 1973; *Dunlap*, 1969; *Enríquez*, 1973; *López y López*, 1973).

Se han realizado estudios pretratando bagazo con hidróxido de sodio a diferentes concentraciones con el fin de ampliar nuestros conocimientos de las técnicas de pretratamiento alcalino en el rango de altas concentraciones (mayor de 10%) que no había sido estudiado en detalle con anterioridad. (*López*, 1976).

Las desventajas fundamentales de este tipo de pretratamiento consiste en la pérdida de una parte apreciable de las hemicelulosas (las cuales constituyen el sustrato más fácilmente fermentable), el consumo de un alto porcentaje de sosa y la utilización de altas temperaturas (*López*, 1975). En la actualidad se han desarrollado otras técnicas como el pretratamiento con mezclas de ácido sulfúrico y nítrico (*López*, 1975; *López*, 1974) y el proceso de ozonólisis (*Ramos y cols.*, 1976) que parecen tener buenas perspectivas.

MATERIALES Y METODOS

El bagazo fue pretratado partiendo de 50 gramos de material molido al que se añadió 500 ml de una solución de hidróxido de sodio de concentración dada. Se agitó la mezcla durante 10 minutos. El material embebido se exprimió con una tela de nylon de 125 μ m de apertura y se colocó en una malla de acero inoxidable de 24 \times 13 cm y 180 μ m de apertura sometándose a la temperatura de 180°C durante una hora en la estufa cuyo control de temperatura es de \pm 3°C. Después se dispersó con agua destilada y se neutralizó a pH = 7. Se exprimió nuevamente con la tela de nylon y se secó a 80°C.

Para el crecimiento se utilizó un cultivo de *cellulomonas* IIbc (no identificadas) que 72 horas antes de la inoculación fueron sembradas en cuñas de agar carboximetil celulosa.

El medio de cultivo tiene por composición:

$\text{PO}_4\text{H Na}_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	15 g/l
$\text{PO}_4\text{H}_2 \text{K}$	3 g/l
Cl N H_4	1 g/l
Cl Na	0,5 g/l

Se completan 990 ml de esta solución a 1 litro con solución de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 2,5 % y 1 ml de solución de tiamina al 1%.

Se prepararon muestras duplicadas para el ataque celulolítico en erlenmeyers de 500 ml con tubos de ensayo soldados lateralmente para facilitar la lectura de la densidad óptica (D.O.) que se efectuó en un espectrocolorímetro (Spekol) a 600 nm.

En cada frasco se colocaron 0,22 gramos de bagazo pretratado seco y se inoculó con 50 ml de medio de cultivo colocándose en una zaranda longitudinal a temperatura de 30 a 31°C.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las Figs. 1, 2 y 3 muestran las curvas de crecimiento de la bacteria celulolítica sobre bagazo sometido a distintos tratamientos alcalinos.

Se aprecian las altas densidades ópticas alcanzadas y las dos pendientes de crecimiento correspondientes al comportamiento diáuxico. (*Enriquez, 1977*).

La Tabla I muestra los valores de las dos velocidades específicas de crecimiento M_{1A} y M_{2A} calculadas mediante regresión lineal, la densidad óptica máxima alcanzada a las 70 horas y el bagazo consumido en cada fermentación.

Si se comparan estos valores de las velocidades específicas de crecimiento (M_{1A} y M_{2A}) con los obtenidos por López (M_{1B} y M_{2B}) se observa que en nuestro caso hemos obtenido valores superiores para ambas velocidades.

Aunque no tenemos una explicación definitiva este hecho podría deberse a:

1. Estado fisiológico diferente de la cepa en nuestras fermentaciones y las de López (*1975, 1976*).
2. Diferencia de aereación en los erlenmeyers como consecuencia de la densidad de los tapones, diferencia de agitación al usar nosotros una zaranda longitudinal y López (*1975, 1976*) una circular, etc.
3. Otras causas.

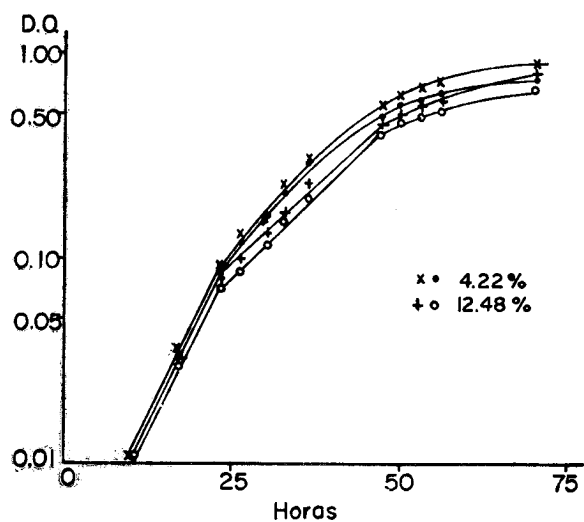


Fig. 1. Curvas de crecimiento de la bacteria celulolítica sobre bagazo sometido a distintos tratamientos alcalinos.

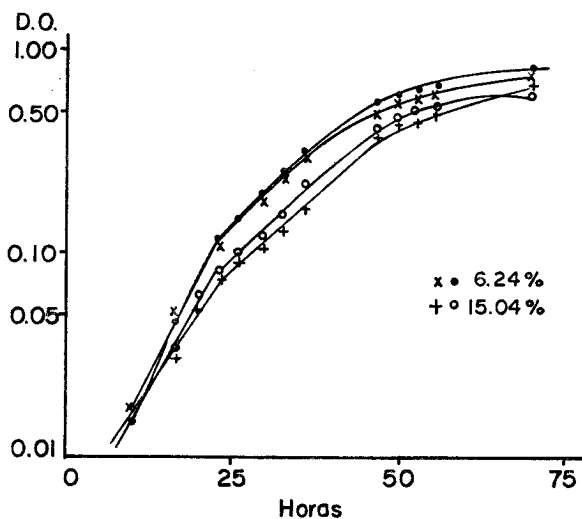


Fig. 2. Curvas de crecimiento de la bacteria celulolítica sobre bagazo sometido a distintos tratamientos alcalinos.

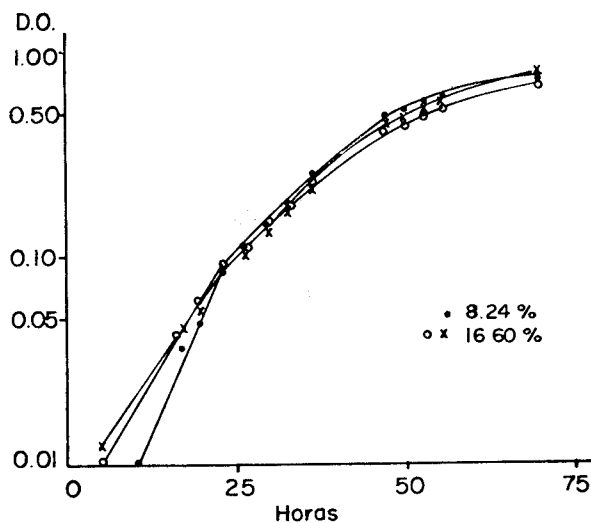


Fig. 3. Curvas de crecimiento de la bacteria celulolítica sobre bagazo sometido a distintos tratamientos alcalinos.

TABLA I

Concentración de sosa	M_{1A}	S_{M1A}	r	M_{2A}	S_{M2A}	r	D. O. (70 h)	Bagazo Consumido %
4,22%	0,159	0,015	0,995	0,0894	0,0033	0,999	0,73	59,7
	0,158	0,017	0,994	0,0873	0,0042	0,998	0,87	68,0
6,24%	0,163	0,018	0,998	0,0739	0,0017	0,999	0,82	56,2
	0,152	0,012	0,997	0,0759	0,0034	0,998	0,77	58,8
8,24%	0,168	0,020	0,985	0,0803	0,0022	0,998	0,74	50,5
	0,167	0,016	0,992	0,0802	0,0027	0,996	0,76	55,3
12,48%	0,156	0,013	0,999	0,0749	0,0022	0,999	0,66	52,5
	0,150	0,036	0,990	0,0718	0,0039	0,996	0,77	54,6
15,04%	0,139	0,038	0,988	0,0690	0,0034	0,995	0,63	51,3
	0,130	0,058	0,968	0,0691	0,0041	0,999	0,65	49,0
16,60%	0,110	0,023	0,993	0,0679	0,0010	0,999	0,76	57,3
	0,120	0,034	0,987	0,0688	0,0035	0,974	0,72	56,5

La Fig. 4 muestra en conjunto los valores obtenidos en este trabajo y en los de López (1975, 1976) para las velocidades específicas de crecimiento en la etapa logarítmica. Es importante apreciar que se obtienen valores similares para valores de concentración de sosa entre 4 y 12%.

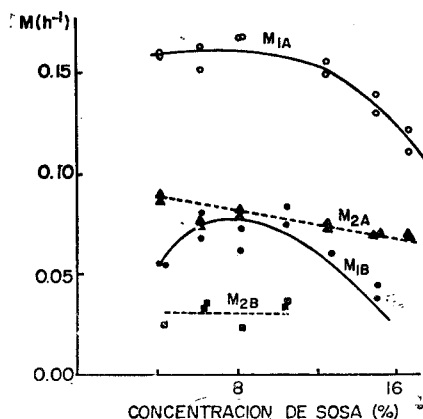


Fig. 4. Variación de las velocidades específicas de crecimiento con la concentración de sosa (M_{1B} y M_{2B} valores obtenidos por López).

Al analizar estadísticamente mediante la prueba "t" de Student en los resultados se observaron diferencias significativas al comparar las velocidades específicas de crecimiento M_{1A} de las muestras tratadas entre 4 y 12% con las muestras del 15 y 16%, con un 95% de confianza. El error experimental no permitió discriminar entre las muestras tratadas del 4 al 12%, aunque por razones económicas es más lógico trabajar al 4%.

En las experiencias de López (1975, 1976), al comparar las velocidades M_{1B} se llega a un resultado semejante aunque se obtuvieron las mejores velocidades específicas de crecimiento entre 6 y 10% y se observan diferencias significativas entre las muestras del 6 al 10% y las muestras del 12 y 15% no así entre las muestras de 4 y 6% cuya diferencia aunque grande no es significativa con un 95% de confianza.

Para la segunda velocidad específica de crecimiento M_{2A} se observa una tendencia ligeramente descendente a medida que aumenta la concentración de sosa. El análisis estadístico señala diferencias significativas entre

4% y las restantes concentraciones, lo que de nuevo señala la conveniencia de usar esta concentración en el tratamiento.

La Fig. 5 muestra los resultados de densidades ópticas alcanzadas a distintos tiempos versus la concentración de sosa, observándose el hecho importante de que esta aumenta a medida que disminuye la concentración. En el trabajo anterior de López (1975) se observó que a concentraciones de sosa menores de 4%, la velocidad específica de crecimiento disminuía de la concentración, por lo que se decidió no estudiar la zona de concentraciones menores de 4%. Visto lo anterior, podemos señalar que la concentración de sosa adecuada debe estar cercana al 4%. En estas condiciones existe un porcentaje alto de pentosanos y celulosa residual aunque un valor de cristalinidad alto también (López, 1975). Concuere da con este planteamiento el hecho de que el bagazo consumido es mayor en las condiciones de 4% de sosa. Además las mayores densidades ópticas alcanzadas en nuestro trabajo (70 horas) y en el de López, (1976) a las 150 horas, corresponden a las concentraciones de 4% de sosa en el tratamiento.

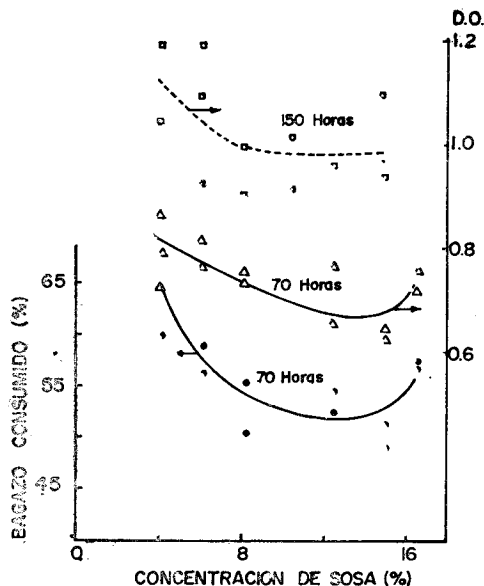


Fig. 5. Consumo de bagazo y densidades ópticas máximas alcanzadas en función de la concentración de sosa.

CONCLUSIONES

Las experiencias realizadas con sosa indican la conveniencia de trabajar con concentraciones bajas, preferiblemente al 4%.

Se han encontrado diferencias no explicadas entre los valores de las velocidades específicas de crecimiento de las dos etapas del comportamiento diáuxico M_{1A} y M_{2A} obtenidas en este trabajo y las obtenidas por López (1975, 1976). No obstante en ambos casos se llega a la conclusión de que la zona cercana al 4% de sosa en el pretratamiento es la más adecuada.

RECONOCIMIENTOS

Deseamos agradecer la colaboración brindada en la realización de experiencias y análisis a las compañeras técnicas Jacqueline Ham, Lucía Román, Nancy Ravelo e Isolina Argüelles.

REFERENCIAS

- CALLIHAN C. D., SRINIVASAN V. R., DUNLAP CH. E. *Patent* 3, 761, 355, Sept. 25, 1973.
- DUNLAP CH. Proteins from Waste Cellulose by Chem. Microb. Process Ph. D. Thesis. Louisiana State Univ. Jan. 1969.
- ENRÍQUEZ MOURIZ A. Obtención de proteínas unicelulares a partir de bagazo por crecimiento directo. IV Seminario Científico CENIC. Dic. 1973.
- ENRÍQUEZ MOURIZ A. Tesis de Especialidad. CENIC. Univ. de la Habana, Marzo, 1977.
- LÓPEZ PLANES R. y LÓPEZ I. Tratamiento alcalino de bagazo y meollo. Degradabilidad mediante enzimas y micro-organismos. IV Seminario Científico CENIC. La Habana 1973.
- LÓPEZ PLANES R. Tratamiento alcalino de bagazo y meollo. Degradabilidad mediante micro-organismos. *Revista CENIC*, 7, 349, 1976.
- LÓPEZ PLANES R. Disertación para C. Sc. Univ. Habana CENIC. Oct. 1975.
- LÓPEZ PLANES R. Patente RP. 34 159, Nov., 1974.
- RAMO R., LÓPEZ PLANES R., PÉREZ REY R., IGLESIAS G., ZAIKOV G. E. y SLUTZKY B. Patente RP 34, 463, Feb. 1976.