FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO (II) OPTIMIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS

María Caridad Julián Ricardo, Luis B. Ramos Sánchez, Yadira Suárez Rodríguez
Universidad de Camagüey

En la actualidad, la fermentación en estado sólido constituye un proceso que ofrece muchas ventajas para el desarrollo de bioprocesos y productos, siendo la optimización de medios de cultivo una etapa fundamental para alcanzar resultados exitosos.
En este trabajo, se analiza la información más reciente que se ha publicado sobre el tema, y no es suficientemente amplia en cuanto a abordar los métodos que deben emplearse. En los artículos revisados, se señala que aunque se incrementa el uso de la estadística, en el diseño de los experimentos y en el análisis de los resultados, aún no se generaliza el enfoque sistémico para garantizar la factibilidad técnico-económica.
Palabras clave: *fermentación en estado sólido, medios de cultivo.*

At the present time, the solid state fermentation constitutes a process that offers many advantages for the bioprocesses and products development, being the optimization of growth medium a fundamental stage to reach successful results.
In this work, it is analyzed the most recent information that has been published about this topic, and it is not enough wide in relation to the methods that should be used. In the reviewed articles, it is pointed out that although the use of the statistics is increased in the design of the experiments and in the analysis of the results, the systemic focus isn¨t still generalized to guarantee the technical-economic feasibility.
Key words: *solid state fermentation, growth medium.*

Introducción

La preparación de medios de cultivo para el desarrollo de procesos de fermentación es una etapa fundamental para asegurar la productividad de los mismos. Explica Ertola *et al*. /1/ que los componentes de los medios constituyen los efectos externos de naturaleza química, que desempeñan un rol esencial en los procesos, ya que deben cumplir con los requerimientos del crecimiento y de formación de productos, y además, suministrar energía para la síntesis de metabolitos y para el mantenimiento celular.

En la literatura, son muy escasos los debates sobre cuáles deben ser las técnicas más apropiadas para determinar las materias primas adecuadas y las proporciones en que deben estar en un medio, para que el resultado sea óptimo desde el punto de vista global de la tecnología. Este trabajo tiene como objetivo analizar la información más reciente que se ha publicado sobre el tema.

Desarrollo

Dentro del costo total de los productos biotecnológicos, las materias primas pueden representar, según Winkler /2/, entre un 30 y un 80 %, y según Ertola *et al*. /1/ entre un 10 y un 60 %, por lo que se hace prioritario disminuir el costo de los medios. Este planteamiento se corresponde con la tecnología de la *Saccharina* /3/, pues en la planta instalada en el CAI Siboney, de la provincia de Camagüey, se determinó que el costo de las materias primas representaba el 58 % del costo total. /4/

Correa /5/, citando a Ertola *et al*. /1/, señala como indispensable la optimización de los medios de cultivo en las situaciones siguientes:

. No existencia de información respecto a coeficientes de rendimiento de macro y microelementos para el cultivo del microorganismo determinado.
. Existencia de limitaciones nutricionales ocultas, especialmente de microelementos y factores de crecimiento.

. Uso de medios de cultivo conteniendo elementos en exceso respecto a los requerimientos nutricionales del microorganismo en cuestión, que pueden causar inhibición del crecimiento.
. Ensayo de sustancias estimulantes, activadoras e inhibidoras del crecimiento y formación del producto.
. Empleo de fuentes nutricionales no convencionales.

La optimización de medios de cultivo está íntimamente relacionada con su diseño y formulación. El diseño incluye la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos, y en la formulación se establecen las concentraciones de cada componente.

Ertola *et al*. /1/ plantean que se deben tener en cuenta todos aquellos aspectos relacionados con el microorganismo, el proceso y los sustratos para ser empleados, como son los requerimientos nutricionales del microorganismo y algunos específicos del proceso, la disponibilidad real de los componentes y consideraciones sobre las materias primas, y luego, Pandey *et al*. /6/ señalan sobre la selección del sustrato que depende de muchos factores, principalmente de los relacionados con su costo y disponibilidad.

Resulta indispensable tener en cuenta todos los procesos y operaciones que se realicen antes y después de la etapa fermentativa, y el conocimiento de los mecanismos bioquímicos que regulan la formación de algunos productos.

La selección de las materias primas es una tarea compleja, y debe hacerse con un enfoque sistémico, teniendo en cuenta la mayor cantidad posible de elementos presentes en la tecnología. Según Ertola *et al*. /1/ "Es muy importante también la correcta elección de una determinada fuente cuando se presentan varias alternativas posibles. En este sentido, deben considerarse los costos, la disponibilidad y el problema de impurezas que puede acompañar a las distintas materias primas utilizadas".

Dustet e Izquierdo /7/ expresan específicamente sobre el uso de materiales lignocelulósicos como materia prima, que existen varias razones, por lo que resultan de gran interés, dentro de las que se encuentran que la materia lignocelulósica es la estructura del reino vegetal de mayor abundancia, es una fuente de materia prima renovable, existe una gran diversidad de materiales, siendo su composición química y resistencia al ataque microbiano sus diferencias fundamentales; estos aspectos deben tenerse en cuenta como punto de partida en la selección de las materias primas.

Ertola *et al.* /1/ expresan que una primera aproximación con respecto a las cantidades por utilizar de las diversas fuentes, lo da el conocimiento de la composición de biomasa del microorganismo para ser empleado. Es decir, en la formulación de un medio para producir una determinada cantidad de biomasa, se deben emplear las fuentes que aseguren como mínimo las cantidades de elementos requeridos.

Cuando el medio emplea materias primas cuya composición química no se conoce totalmente (materias primas complejas), como es el caso de los residuos agroindustriales, entonces la situación es más riesgosa para la tecnología, pues podría no ser viable económica y ecológicamente. /8/

Experiencias en la optimización de medios de cultivos

La selección de microorganismos como paso indispensable en el estudio de los procesos fermentativos, ha sido uno de los aspectos más abordados en la literatura de este tema. Dentro de los trabajos más recientes se encuentran los de Brizuela *et al.* /9/, Leifa *et al*. /10/, Herrera *et al*. /11/, Dustet e Izquierdo /7/, Ibarra *et al*. /12/ y Márquez *et al*. /13/

Los estudios se realizan de formas diversas, entre las más frecuentes se encuentran la valoración de: varios tipos de microorganismos en diferentes fuentes de carbono, dos o más tipos de microorganismos en un medio y el uso de cultivos mixtos en un medio, entre otros.

En el artículo de Brizuela *et al*. /9/ se hace la selección a partir de cinco tipos de microorganismos evaluando seis fuentes de carbono, en función de la producción de enzimas; Leifa *et al*. /10/ examinaron doce cepas de un

microorganismo en un medio de cultivo, en función del incremento de la biomasa, y Márquez *et al*. /14/ hacen su selección a partir del estudio de dos tipos de microorganismos en un medio; Herrera *et al*. /11/ y Dustet e Izquierdo /7/ evalúan el uso de cultivos mixtos para aumentar el rendimiento en la síntesis de biomasa, e Ibarra *et al*. /12/ investigan la actividad celulolítica de dos tipos de microorganismos en dos sustratos

En general, el método utilizado es elemental, se realizan los experimentos variando al microorganismo y/o la concentración del componente por ensayar, manteniéndose constantes las concentraciones de las demás materias primas, y no se analizan los costos, la disponibilidad, ni la calidad de las materias primas; las decisiones se basan en el incremento de la biomasa o la síntesis de productos, sólo en la publicación de Ibarra *et al*. /12/ se observa un uso adecuado de la estadística, tanto para el diseño de los experimentos como en el análisis de los resultados.

Varios son los factores que influyen en el crecimiento microbiano y en su actividad, que resultan de gran interés en la optimización de medios de cultivo en estado sólido, Pandey *et al*. /6/ señalan que el tamaño de la partícula y nivel de humedad son los más críticos, otros factores muy estudiados han sido la temperatura, el pH, la concentración, disponibilidad del sustrato, la aireación y la forma de inoculación entre otros.

Ramos /8/ presenta un resumen sobre los factores para investigar por etapas de investigación, poniendo ejemplos típicos en cada caso; para la formulación del medio de cultivo identifica el pH y la humedad del medio como variables medioambientales, por la influencia del tamaño de partícula se considera oportuno que esté incluida también.

Brizuela *et al*. /9/, en su estudio de enriquecimiento proteico de residuos de cosecha cañera realizaron la optimización de algunos parámetros: tratamiento del residuo, tamaño de partícula temperatura, concentración de azúcares y relación nitrógeno/fósforo; en estos trabajos fueron probadas varias variantes de un medio original, sin embargo, no se explica por qué se escogían los niveles de los factores en estudio. La forma en que se presentan los diferentes medios modificados es más bien típica del método empírico de ensayo y error.

Leifa *et al.* /10/ investigaron tres factores que influyen en la degradación de componentes tóxicos en residuos de la producción de café: el contenido inicial de agua, la cantidad de inóculo y el tipo de sustrato, todos de gran importancia en la FMS. El método empleado para optimizar el medio consistió en fijar todos los parámetros excepto uno, el cual era variado hasta obtener su nivel óptimo.

Esa forma de trabajo tiene, obviamente, algunos inconvenientes; en primer lugar, se omiten las influencias que pudieran tener las interacciones entre los diferentes factores, lo cual puede conducir hacia un resultado que no coincida con el óptimo verdadero, por otro lado, este método normalmente demandará de un gran número de experimentos, trayendo como resultado el encarecimiento del proceso de desarrollo de la tecnología.

En el trabajo de Ooijkaas *et al*. /14/, ya se hace énfasis en la necesidad de realizar la optimización de medios de cultivo a partir de experimentos diseñados estadísticamente, y hace referencia a varios resultados exitosos obtenidos mediante la aplicación de estas técnicas.

Cira *et al*. /15/, investigando la estabilización de los desechos de camarón, aplicaron un diseño de experimentos al azar variando el tipo y la cantidad de fuente de carbono, así como el nivel de inóculo, y analizaron la respuesta en función de la acidificación del medio utilizando el programa SPSS, también realizaron una comparación de medias con prueba de Tukey.

Los autores Ibarra *et al*. /16/ analizan la influencia de la aireación en la bioconversión del bagazo de caña, realizando un experimento de clasificación simple con tres repeticiones; utilizan para el análisis de resultados la dócima de comparación de Duncan para discriminar diferencias entre las medias.

Dustet y Falony /17/ en el trabajo para optimizar la actividad enzimática de lipasas obtenidas por fermentación sólida, hacen uso del método de Box-Behnken de superficies de respuestas, estudiando

los factores humedad, concentración de glucosa y de aceite de oliva, a tres niveles, y utilizando tres fuentes de nitrógeno, realizando la optimización para cada una de las fuentes de nitrógeno, en función solamente de la actividad enzimática.

Trabajos muy novedosos los de Mas /18/, Mas *et al*. /19/ y Campos *et al*. /20, 21/, que estudian la influencia de campos electromagnéticos en sistemas fermentativos, tanto en la estimulación del crecimiento microbiano como en la producción de complejos enzimáticos a partir de subproductos agrícolas.

En el primero de Campos *et al*. /20/, se investiga la producción de enzimas a partir de residual cítrico, se emplean dos tipos de sustratos, realizando los experimentos con dos combinaciones; se observa en esta parte del trabajo cómo plantean que el tamaño de partículas óptimo se corresponde con el de la primera combinación, sólo por los resultados alcanzados en cuanto al crecimiento del microorganismo, estudiando esas dos variantes, no se presentan resultados que permitan llegar a esa conclusión, este procedimiento es característico de etapas iniciales de la investigación, cuando no se posee suficiente información sobre el metabolismo de los microorganismos.

Luego, especifican que en las condiciones de la experimentación el campo magnético aplicado incrementa la productividad del sistema. En el segundo trabajo /21/, evaluaron la influencia de las variables inducción magnética y tiempo de exposición al campo, obteniendo efectos positivos.

Por otra parte, Mas /18/ en su estudio sobre efectos biológicos del campo electromagnético en el crecimiento de microorganismos, indica que los beneficios pueden ser en determinado rango de inducciones y arreglos de exposición, debido a que a altas intensidades y tiempo de exposición prolongados se pueden presentar efectos perjudiciales en el microorganismo expuesto; esta autora luego obtuvo efectos positivos en la producción de enzimas /19/. Los resultados son muy prometedores, y sientan las bases para extender estos estudios a otros procesos fermentativos.

Se debe destacar, que la optimización del medio de cultivo generalmente se reduce a maximizar la producción de biomasa o de productos, criterios éstos que sólo garantizan un buen desempeño técnico de la etapa fermentativa; los métodos de optimización estadísticos se emplean de manera creciente, sin embargo, todavía con limitaciones, y en la mayor parte de los casos hay falta de un enfoque de sistema, con lo cual el óptimo es válido para la etapa fermentativa, pero no se puede garantizar que lo sea para el proceso en su conjunto.

Los trabajos analizados hasta aquí se caracterizan porque en ellos la función objetivo es una variable técnica, y el problema no se plantea teniendo en cuenta las relaciones existentes entre la composición del medio de cultivo, la economía del proceso y el resto de las operaciones unitarias de la planta.

Ramos /8/ desarrolló un método general para la formulación de medios de cultivo, donde se combinan las técnicas de optimización estadística con la programación lineal para encontrar un compromiso técnico-económico entre los elementos principales del diseño: los microorganismos, los consumidores del producto y el proceso tecnológico. A partir del método general propuesto, dedujo un modelo para diseñar medios con el objetivo de obtener alimentos enriquecidos con proteína unicelular mediante FES, a partir de residuos de la industria azucarera.

El método se ha aplicado satisfactoriamente estudiando diferentes variantes /22, 23, 24, 25, 26/, García /27/ lo valora favorablemente en su análisis sobre la solución tecnológica viable del enriquecimiento proteico de los residuales y subproductos sólidos de la industria de la caña de azúcar.

Conclusiones

1. Se realiza la optimización de medios de cultivo teniendo en cuenta factores diversos, unos muy estudiados y otros muy novedosos, demostrándose que son muchas las expectativas que existen.
2. El uso de la estadística se incrementa, tanto en el diseño de los experimentos como en el análisis de los resultados, pero aún no se utiliza de forma rigurosa con todos los recursos que ofrece.

3. El enfoque sistémico que tiene en cuenta a los microorganismos, el proceso tecnológico y el futuro cliente del producto no se generaliza, lo que impide garantizar la factibilidad técnico-económica del proceso.

Bibliografía

1. Ertola, R.; Yantorno, O.; Mignone, C., *Microbiología industrial*, http://www.science.oas.org/Simbio/mbio_ind/mbio_ind.htm, Ben Gurion University, Israel, 1994.
2. Winkler, M. A., "Optimization and Time-Profiling in Fermentation Process", *Progress in Industrial Microbiology*, vol. XXV, 1988, págs. 91-150.
3. Elías, A.; Lezcano, O., "Effect of the Inclusion of Levels of Maize Meal on the Fermentation of Sugar Cane", *Cuban J. Agric. Sci.*, 28, No. 321, 1994.
4. Oquendo, H.; Ramos, L. B., "Cálculo del costo de producción de la *Saccharina* en el CAI Siboney", Informe interno, Grupo de Bioingeniería U. C., 1991.
5. Correa, H., "Aspectos fundamentales de las fermentaciones en estado sólido (FES)",http://www.monografías.com. Consultado 15/11/06
6. Pandey, A.; Soccol, C.; Mitchell, D., "New Developments in Solid State Fermentation: I-Bioprocesses and Products", *Process Biochemistry* 35, págs. 1153–1169, 2000. www.elsevier.com:locate:procbio.
7. Dustet, J.; Izquierdo, E., "Enriquecimiento en proteína unicelular y obtención de celulasas: dos alternativas para la transformación del bagazo de caña de azúcar", Memorias II Conferencia Internacional de Química, Santa Clara, 2003.
8. Ramos, L. B., Aplicación de la modelación matemática para el desarrollo de la tecnología de fermentación del Bagarip, Tesis presentada en la opción al grado científico de doctor en ciencias técnicas, Abril de 2000.
9. Brizuela, M., *et al*., "Enriquecimiento proteico de residuos de cosecha cañera por FES con hongos filamentosos", *LABORAT – acta,* vol. X, No. 3, 1998.
10. Leifa, F.; Pandey, A.; Soccol, C., "Solid State Cultivation – an Efficient Method to Use Toxic Agroindustrial Residues", *J. Basic Microbiol*, 40, 3, págs. 187–197, 2000.
11. Herrera, N., *et al*., "Estudio comparativo de cepas de levaduras en la producción de biomasa proteica para la alimentación animal", *Memorias II Conferencia Internacional de Química,* Santa Clara, 2003.
12. Ibarra, A., *et al*., "Determinación de la actividad celulolítica de los crudos enzimáticos de dos cepas de *Trichoderma viride* obtenidos por FES de harinas de leguminosas", Memorias VI Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química, La Habana, Cuba, 2008, págs. 1634 – 1637.
13. Márquez, E., Cento, V.; Fernández, Y., "Influencia de la temperatura y el tipo de levadura en la fermentación cervecera", *Memorias VI Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química*, La Habana, Cuba, 2006, pág. 1295.
14. Ooijkaas, L., *et al*., "Defined Media and Inert Supports: Their Potential as Solid-State Fermentation Production Systems", *TIBTECH*, vol. XVIII, 2000, págs. 356 – 360.
15. Cira, L.; Huerta, S.; Shirai, K., "Fermentación láctica de cabezas de camarón (*Penaeus sp*) en un reactor de fermentación sólida", *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. I, Nos. 1 – 2, 2002, págs. 45 – 48.
16. Ibarra, A., *et al*., "Biotransformación del bagazo de caña por *Trichoderma viride* M5-2 en un biorreactor estático de fermentación sólida", http://www.monografías.com, consultado 10/11/2006.
17. Dustet J. C.; Falony, G., "Obtención de lipasas de *Aspergillus niger* por fermentación sólida", *Memorias VI Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química,* La Habana, Cuba, 2006, págs. 1705–1708.
18. Mas, S., "Efectos biológicos del campo electromagnético en el crecimiento de microorganismos. Mecanismos de acción", *Revista Cubana de Química,* vol. XVII, No 1, 2005, pág. 161.
19. Mas, S., *et al*., "Enriquecimiento enzimático de un bioproducto con la aplicación de campos magnéticos", *Memorias Congreso Biotecnología Habana*, 2005, págs. 223.
20. Campos, M., *et al.,* "Producción de enzimas a partir de residual cítrico para alimento animal empleando campos electromagnéticos", *Revista Cubana de Química*, vol. XVII, No 1, 2005, pág. 152–153.
21. _____, "Bioproductos para la alimentación animal bajo campos electromagnéticos", *Memorias Congreso Biotecnología Habana*, 2005, pág. 223.
22. Ramos, L.; Parra, C.; García, A., "Formulación de medios de cultivo con residuos agroindustriales" Parte I, Revista Bibliográfica, *Centro Azúcar*, Año 27, No.1, 2000.
23. _____, "Formulación de medios de cultivo con residuos agroindustriales. Parte II-Fundamentos de un nuevo método", *Centro Azúcar*, Año 27, No. 2, 2000, pág. 71.
24. _____, "Formulación de medios de cultivo con residuos agroindustriales. Parte III- Optimización del crecimiento de *Cándida* utilis en residuos de la industria azucarera", *Centro Azúcar*, Año 27, No. 3, 2000, págs. 9-18.
25. Julián, M. C., "Optimización del medio de cultivo para la producción de Bagames", *Memorias de la Conferencia Internacional AGROQUIM*. U. C., 2005.

26. Suárez, Y., "Formulación de un medio de cultivo para el crecimiento de la *Candida utilis*: efecto de las fuentes de nitrógeno empleadas", *Memorias VI Congreso Internacional de Química. e Ingeniería Química,* La Habana, Cuba, 2006, pág. 1365.

27. García, A., "Aproximaciones a la solución tecnológica viable del enriquecimiento proteico de los residuales y subproductos sólidos de la industria de la caña de azúcar", *Memorias II Conferencia Internacional de Química,* Santa Clara, 2003.