

Cinética del crecimiento microbiano en residuos de la industria azucarera por fermentación en estado sólido para la producción de alimento animal

María Caridad Julián Ricardo, Luís B. Ramos Sánchez y Kenia Ferrer Sifontes

Facultad de Química y Alimentos, Universidad de Camagüey

maria.julian@reduc.edu.cu

RESUMEN

Se presenta la cinética del crecimiento microbiano en la producción de alimento para animales por fermentación en estado sólido. Se empleó la levadura *Candida utilis* para el enriquecimiento proteico de bagazo de caña de azúcar; además, se utilizaron los residuos de la industria azucarera cachaza y miel y otros elementos como nutrientes en el medio de cultivo. Se estudió la respuesta dinámica del sistema en función de la temperatura en un rango de 25 a 45 °C, a través de las variables proteína verdadera y azúcares reductores totales. La fermentación duró 30 horas. Se empleó un modelo logístico para representar los datos experimentales utilizando el simulador *Model Maker*. Sus constantes mostraron dependencia con la temperatura, que se ajusta muy bien a polinomios. La constante específica de crecimiento máxima varía entre 0,059 8 y 0,112 3 h⁻¹; la concentración máxima de biomasa está en un rango entre 5,27 y 5,90 % base seca y el rendimiento biomasa-sustrato entre 0,055 1 y 0,102 3. La temperatura óptima para alcanzar máximo enriquecimiento proteico está entre 30 y 33 °C. Los parámetros determinados del modelo ajustado se corresponden con los observados en sistemas similares, según se reporta en la literatura.

Palabras claves: *alimentación animal, cinética microbiana, enriquecimiento proteico, fermentación en estado sólido*

Microbial Growth Kinetics in Manufacturing Feedstuff by Solid State Fermentation of Sugar Cane By-Products

ABSTRACT

Microbial growth kinetics in manufacturing feedstuff by a solid state fermentation process is dealt with. *Candida utilis* yeast was used for sugar cane bagasse protein enrichment; besides, filter cake mud and molasses residuals from the sugar cane industry as well as other ingredients were added as nutrients to the culture medium. The system dynamic response within a temperature range from 25 °C to 45 °C was studied taking into account the true protein and the total reducing sugars variables. The fermentation process lasted 30 hours. A logistic model was applied to display experimental data by the Model Maker software. Data constants showed a temperature dependence which actually matched polynomials. The maximal growth specific constant ranged from 0,059 8 h⁻¹ to 0,112 3 h⁻¹, the biomass maximal concentration from 5,27 % to 5,90 %, and the biomass-substrate yield from 0,055 1 to 0,102 3. Optimal temperature to reach a maximum protein enrichment ranged from 30 °C to 33 °C. Parameters determined by the adjusted model agreed with those observed in similar systems according to the literature in this field.

Key words: *animal feeding, microbial kinetics, protein enrichment, solid state fermentation process*

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de bioprocesos y productos mediante fermentación en estado sólido (FES) ha estado generando creciente interés en los últimos años, principalmente por sus resultados en bioremediación y biodegradación de compuestos riesgosos, enriquecimiento proteico de cosechas y de residuos agroindustriales, producción de enzimas, biopesticidas, entre otros.

Los residuos de la industria azucarera son empleados en la alimentación animal en múltiples formas. El enriquecimiento proteico del bagazo mediante FES ha sido una vía para la obtención de diferentes productos que se han introducido sa-

tisfactoriamente en diferentes especies y categorías de animales (Pedraza, 2000).

Este trabajo tiene como objetivo determinar la cinética del crecimiento microbiano en la producción de alimento para animales a partir de residuos de la industria azucarera por fermentación en estado sólido, midiendo la variación de la proteína verdadera y de los azúcares reductores totales (ART).

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del inóculo

El inóculo se elaboró propagando la levadura *Candida utilis*, suministrada por el Instituto Cubano de Investigaciones de la Caña de Azúcar. El

esquema incluyó pasos semejantes a los de Almazán *et al.* (1982) usados comúnmente en plantas de levaduras industriales. El medio de propagación líquido está formado por miel, sulfato de amonio, fosfato de amonio y agua destilada.

Medio de cultivo para la FES

Se empleó un medio de cultivo optimizado con anterioridad (Julián *et al.*, 2005) con 66,38 % de humedad, 33,18 % de ART y una relación agua amoniacal-sulfato de amonio de 0,14 %. Se pesan las materias primas para preparar 800 g de medio, se diluye el sulfato de amonio en el agua y luego se añade y diluye la miel B; se mezclan el bagazo y la cachaza y luego se le añade la mezcla líquida preparada, se añade el inóculo, cuidando su distribución homogénea.

Descripción del experimento

El experimento se realizó siguiendo la estrategia de separación de las muestras antes de la fermentación (Viccini *et al.*, 2001), en una instalación compuesta por baños termostáticos que controlan la temperatura a $\pm 0,1$ °C, frascos de erlenmeyer con las muestras y termómetros digitales *Check Temp*, con una precisión de 0,1°C.

Se realizaron 6 corridas experimentales a las temperaturas de: 25; 30; 33; 35; 40 y 45 °C, con 16 muestras en cada corrida durante un tiempo de 30 horas. Los 800 g de medio se prepararon por corrida de forma tal que se pudieran distribuir 50 g por erlenmeyer, para retirar un frasco cada dos horas a partir del tiempo cero. El experimento se hizo por triplicado. Las muestras se secaron durante 48 horas en estufa a 70 °C. Posteriormente se efectuaron los análisis requeridos.

Métodos analíticos

Para el ajuste del modelo se trabajó con las variables: biomasa (X) expresada en función de la proteína verdadera y concentración de sustrato (S), en función de los ART.

La proteína verdadera se determinó en el Laboratorio del Centro de Estudios para el Desarrollo de la Producción Animal (CEDEPA) según el método de Berstein (precipitación con sulfato de cobre). Para el nitrógeno total se siguió el procedimiento AOAC (1995). Los ART se determinaron utilizando el método fenol-sulfúrico; la absorbancia se midió con un espectrofotómetro Ultrospec 2000, en el laboratorio de microbiología del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey.

Metodología de ajuste del modelo cinético

El ajuste del modelo se realizó utilizando los datos calculados de proteína verdadera y ART. Se empleó el programa profesional *Model-Maker*, desarrollado por *SB Technology Ltd.*, Reino Unido (1995) que permitió determinar los parámetros del modelo: constante específica de crecimiento máxima, concentración máxima de biomasa y rendimiento biomasa-sustrato. Se ajustó la dependencia de las constantes del modelo con la temperatura, con Microsoft Office Excel.

Modelo matemático para el crecimiento celular

Se formuló un modelo cinético que emplea la ecuación logística para el crecimiento celular y la expresión en dos términos propuesta por Pirt para el consumo de sustrato (Ramos, 2000; Asaff *et al.*, 2006):

$$\frac{dX}{dt} = rX \quad (2.1)$$

$$rX = \mu X \quad (2.2)$$

$$\mu = \mu_{MAX} \left(1 - \frac{X}{X_{MAX}} \right) \quad (2.3)$$

$$\frac{dS}{dt} = -rS \quad (2.4)$$

$$rS = \frac{rX}{Y_{XS} + mS} \quad (2.5)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ajuste del modelo cinético

En la figura se grafica la corrida de 33 °C. El comportamiento dinámico de la proteína verdadera para cada valor de temperatura se corresponde con las condiciones del experimento, no asépticas y sin aireación forzada. Los valores obtenidos a esa temperatura se encontraron entre 3,4 y 5,9 % base seca (BS). A esa temperatura se obtuvo el máximo incremento en la proteína verdadera con un valor de 2,5 % BS. Estos resultados son algo superiores a los obtenidos por Dusted e Izquierdo (2003) en condiciones experimentales similares.

Los valores de ART iniciales estuvieron entre 33,1 y 33,9 % BS; se encuentran dentro de los límites esperados según la formulación utilizada; el resto de los valores mantuvo un comportamiento descendente hasta alcanzar valores mínimos que estuvieron entre 7,2 y 17,7 % BS. En los experimentos realizados a 33 y 45 °C respectivamente, puede observarse cómo el mayor consumo se pre-

senta en la corrida donde hay mayor incremento de la proteína verdadera y el menor consumo en el experimento a mayor temperatura, donde el crecimiento es menor.

En la tabla aparecen las constantes ajustadas para cada una de las temperaturas estudiadas. El ajuste del modelo es altamente significativo pues en todos los casos se obtienen niveles de significación inferiores a 0,001 %.

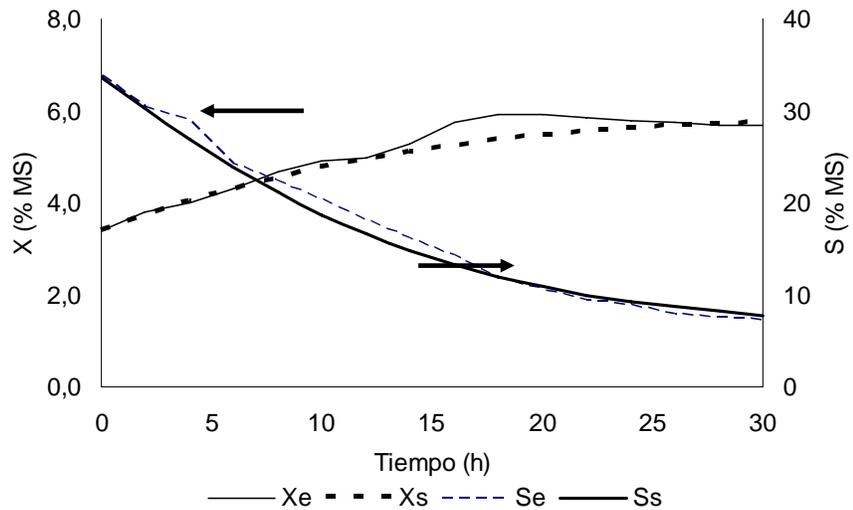
El valor de la constante específica de crecimiento máxima (μ_{MAX}) varía entre 0,059 8 y 0,112 3 h⁻¹, siendo este último su valor más elevado a la temperatura de 33 °C. Se corresponde con los estudios realizados por Ramos (2000) y con los valores reportados por Viccini *et al.* (2001) para la *Candida utilis* y duplica los obtenidos por Ferrer *et al.* (2004) para este microorganismo en desechos del procesamiento de la caña de azúcar.

La ecuación (3.1) describe la dependencia entre μ_{MAX} y la temperatura mediante un polinomio de tercer orden, la cual tiene un buen coeficiente de determinación, $R^2 = 0,951 4$

$$\mu_{MAX} = 0,001 2 T^3 - 0,015 3 T^2 + 0,048 3 T + 0,067 5 \quad (3.1)$$

Los valores de la concentración máxima de biomasa (X_{MAX}) se encuentran entre 5,27 y 5,90 % BS siendo este su máximo valor a la temperatura de 33 °C. Esta constante mantuvo un ligero ascenso durante los tres primeros valores de temperatura y luego desciende hasta la última corrida donde alcanza el valor más bajo. Este comportamiento se corresponde con el reportado para estos sistemas (Saucedo *et al.*, 1990; Ramos, 2000; Dalsenter, 2005). El crecimiento para la temperatura de 45 °C no se asocia al microorganismo inocu-

Ajuste del modelo cinético a los datos experimentales



lado, que es termófilo, sino a la flora microbiana presente inicialmente en las materias primas.

Se ajustó un polinomio de tercer orden que dio por resultado la ecuación 3.2 con un adecuado coeficiente de determinación ($R^2 = 0,926 3$).

$$X_{MAX} = 0,000 4 T^3 - 0,004 1 T^2 + 0,003 9 T + 0,099 9 \quad (3.2)$$

En cuanto al comportamiento de la constante que describe el rendimiento biomasa-sustrato (Y_{xs}) se puede observar que disminuye al aumentar la temperatura. Se ajusta muy bien con un polinomio de cuarto orden mediante la ecuación (3.3), con la que se obtuvo:

$$R^2 = 0,988 8.$$

$$Y_{xs} = 0,001 2 T^4 - 0,016 1 T^3 + 0,074 1 T^2 - 0,141 6 T + 0,184 3 \quad (3.3)$$

CONCLUSIONES

La cinética del sistema se ajusta al modelo logístico. Se alcanzan coeficientes de determinación altamente significativos en el rango de temperaturas estudiado. La constante específica de crecimiento máxima varía entre 0,059 8 y 0,112 3 h⁻¹.

Constantes del modelo logístico

T (°C)	μ_{MAX} (h ⁻¹)	X_{MAX} (% BS)	Y_{xs}	R^2	F	P (%)
25	0,1 020	5,4	0,10	0,97	504,45	< 0,001
30	0,1 104	5,8	0,09	0,98	1094,03	< 0,001
33	0,1 123	5,9	0,09	0,98	726,62	< 0,001
35	0,0 845	5,7	0,07	0,99	2797,27	< 0,001
40	0,0 717	5,4	0,06	0,98	800,21	< 0,001
45	0,0 598	5,3	0,05	0,99	11868,03	< 0,001

μ_{MAX} , constante específica de crecimiento máxima; X_{MAX} concentración máxima de biomasa; Y_{xs} , rendimiento biomasa-sustrato.

Cinética del crecimiento microbiano en residuos de la industria azucarera por fermentación en estado sólido para la producción de alimento animal

Se obtiene un enriquecimiento proteico con valores máximos de proteína verdadera 5,3 y 5,90 % BS, adecuado para las condiciones del experimento, no asépticas y sin aireación forzada.

La temperatura óptima para alcanzar un máximo enriquecimiento proteico se encuentra en el rango de 30 a 33 °C .

REFERENCIAS

- AOAC: Official Methods of Analysis, 16th Edition, Association of Official Analytical Chemists, AOAC International, Washington, DC., 1995.
- ASAFF, A.; C. CERDA, G. VINIEGRA Y M. DE LA TORRE: "Carbon Distribution and Redirection of Metabolism in *Paecilomyces fumosoroseus* During Solid-State and Liquid Fermentations", *Process Biochemistry* (41): 1303-1310, 2006.
- ALMAZÁN, O.; M. KLIBANSKY Y M. A. OTERO: *Producción de proteína unicelular a partir de sub-productos de la industria azucarera*, p. 74, Ed. Científico-Técnica, La Habana, Cuba, 1982.
- DALSENTER, F. D.: Efeito da temperatura na cinética de crescimento de *Rhizopus oryzae* em cultivo no estado sólido, tesis presentada en opción al grado científico de doctora en Ciencias Bioquímicas, Brasil, 2005.
- DUSTET, J. Y E. IZQUIERDO: 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, Villa Clara, Cuba, 2003.
- FERRER, J.; Y. DAVALILLO, C. CHANDLER, G. PÁEZ, Z. MÁRMOL Y E. RAMONES: "Producción de proteína microbiana a partir de los desechos del procesamiento de la caña de azúcar (bagacillo)1", *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*, 12 (2): 59-65, 2004.
- JULIÁN, MARÍA CARIDAD; L. RAMOS, Y. SUÁREZ, K. CABRERA Y Y. ESCALONA: Optimización del medio de cultivo para la producción de Bagames, Memorias de la Conferencia Internacional las Ciencias Técnicas y Agropecuarias por un Desarrollo Sostenible, Universidad de Camagüey, Cuba, 2005.
- PEDRAZA, R.: "Bagazo rico en proteína (Bagarip). Alimento animal obtenido por fermentación en estado sólido", *Revista de Producción Animal*, Universidad de Camaguey, Cuba, 12: 45-51, 2000.
- RAMOS, L. B.: Aplicación de la modelación matemática para el desarrollo de la tecnología del Bagarip, tesis presentada en opción al grado científico de doctor, Universidad Central de Las Villas, Villa Clara, Cuba, 2000.
- SAUCEDO, G.; M. GUTIÉRREZ, G. BACQUET, M. RAIMBAULT Y G. VINIEGRA: "Heat Transfer Simulation in SSF", *Biotechnology and Bioengineering*, 35: 802-808, 1990.
- VICCINI, G.; D. MITCHELL, S. BOIT, J. GERN, A. DA ROSA, R. COSTA, F. D. DALSENTER, O. VON MEIEN Y N. KRIEGER: "Analysis of Growth Kinetic Profiles in SSF", *Food technol. biotechnol.*, 39 (40): 1-22, 2001.

Recibido: 8/7/2007

Aceptado: 11/8/2007