

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FERMENTACION EN CULTIVO SUMERGIDO Y EN ESTADO SOLIDO DE LA GUAYABA DE DESECHO

Ing. Juan Jáuregui Rincón/Programa de Investigación en Alimentos.

RESUMEN

La fermentación en cultivo sumergido utilizando como sustrato jugo de guayaba tratado enzimáticamente con tres enzimas y posteriormente diluyéndolo hasta una concentración de sustrato fermentable del 2%, proporcionó menor cantidad de micelio y, por ende, menor cantidad de proteína por gramo de guayaba empleado, por lo que se concluye que el proceso fermentativo no es adecuado para realizarlo a nivel planta piloto o industrial. Se logró obtener un rendimiento de 0.12 y una productividad de 0.34 g/l/día, que son menores que las de la fermentación en estado sólido.

INTRODUCCION

La problemática actual que viven los productores de guayaba respecto a la producción y principalmente la comercialización ha dado pauta al desarrollo de alternativas que puedan ser viables y que se puedan implementar en los lugares de producción, ya que la guayaba contiene una buena cantidad de azúcares que son fermentables. Algunas de estas alternativas son: a) La fermentación en estado sólido de la guayaba de desecho (proyecto anterior 1991); b) Fermentación en cultivo líquido utilizando la guayaba de desecho (proyecto actual 1993); y c) Proyecto para 1994 "Utilización de la guayaba de baja clase para la obtención de productos alcohólicos".

Muchas de las fermentaciones que en sus inicios se realizaron utilizando la fermentación en estado sólido han sido llevadas a fermentación en cultivo sumergido utilizando fermentadores o biorreactores de gran volumen con la finalidad de: Producir más o menor precio, aumentar el rendimiento, disminuir la mano de obra y así bajar costos, tratar de automatizar el proceso, medir y controlar mejor las variables del proceso y disminuir los problemas de contaminación del sustrato por otros microorganismos.

Es por todo lo anterior que, como ya se había realizado el proceso de fermentación en estado sólido, se vislumbraba interesante investigar cuáles serían los resultados al someter a fermentación aeróbica en un biorreactor de cultivo sumergido el jugo que se obtendría de moler y prensar la guayaba, claro, utilizando el mismo microorganismo empleado en la fermentación en estado sólido y poder hacer una válida comparación.

Se consideró que si el sustrato sobre el cual actúa el *Aspergillus niger* son los azúcares de la guayaba, una vez obtenido el jugo se podría implementar en proceso fermentativo similar al usado para la producción de ácido cítrico usando una variedad diferente del mismo tipo de microorganismo a un nivel industrial.

Alguno de estos proyectos en un momento dado podría ayudar a disminuir el problema del qué hacer con los excedentes de guayaba que en el mercado se encuentran a bajo precio y que el productor mejor los deja perder en vez de darles mayor valor agregado.

Objetivos del trabajo

- 1.- Se obtendrá un inóculo de *Aspergillus niger* en un medio de cultivo sumergido usando un matraz agitado.
- 2.- Se encontrará la concentración óptima de azúcares disueltos fermentables en el medio de cultivo usando matraces agitados.
- 3.- Se encontrarán las condiciones óptimas para el crecimiento del hongo (flujo de aire, velocidad de agitación y tiempo de fermentación).
- 4.- Se separará la biomasa producida y se realizará la cuantificación de la proteína microbiana.
- 5.- Se realizarán varias fermentaciones para obtener los datos cinéticos del crecimiento del *Aspergillus niger*.
- 6.- Se obtendrán datos de cinética del crecimiento.
- 7.- Se compararán los resultados obtenidos con los de la fermentación en estado sólido.

MATERIAL Y METODOS

Material biológico utilizado.

Se empleó guayaba de desecho adquirida en el Centro Comercial Agropecuario y el microorganismo empleado fue *Aspergillus niger*.

Pretratamiento del sustrato.

La guayaba se trató enzimáticamente utilizando tres diferentes enzimas. La primera enzima usada fue Viscosime (enzima pectolítica) la segunda fue Termamil (enzima amilolítica termoresistente) y la tercera una Glucoamilasa (degradadora de oligosacáridos de glucosa obtenidos de la hidrólisis con amilasa). El producto obtenido fue un jugo con baja viscosidad y un mayor contenido de azúcar.

Análisis de jugo de guayaba

Los análisis practicados fueron: concentración de azúcares fermentables (se empleó el método de Miller, 1959), proteínas, grasa, cenizas y fibra cruda. Se usaron los métodos oficiales de A.O.A.C. (1980).

Preparación del inóculo

Las esporas fueron propagadas en un medio de agar-jugo de guayaba y posteriormente transferidas a un tubo estéril usando solución acuosa de twen 80 al 10% estéril. Las esporas se cuantificaron empleando cuenta directa al microscopio, y posteriormente se inoculó con éstas un matraz con jugo de guayaba al 2% y se incubó a 28°C en una cámara y se empleó un agitador orbital de matraces para mantenerlo en agitación constante a 100 rpm.

Desarrollo del proceso fermentativo

Se empleó un biorreactor de 2 litros de volumen total esterilizable, agitado con control de temperatura y agitación, el cual fue cargado con 1 litro de jugo de guayaba al 2% y se inoculaba con los pelet obtenidos en la etapa anterior. Las condiciones de la fermentación fueron: temperatura 28°C., agitación 75 rpm, flujo de aire 1.5 vvm, pH 3.5 y tiempo de fermentación 7 días.

Separación y cuantificación del producto final

Para realizar esto el mosto fermentado se somete a un proceso de filtración para separar el micelio, el cual es secado y se le determina el contenido de proteína y su peso seco. En el filtrado (líquido residual de la fermentación) se cuantifican los azúcares residuales disueltos.

Cinética de crecimiento del hongo

Para realizar ésta se preparó una corrida en el biorreactor y se tomaron muestras dos veces al día del caldo de fermentación y se analizaron los mismos compuestos que en el producto final. Esto se realizó varias veces manteniendo las mismas condiciones, para así conocer el comportamiento del microorganismo.

RESULTADOS

1.- Los primeros resultados obtenidos son:

Esquema general del tratamiento enzimático que se dio a las guayabas, ver el diagrama presentado en la figura 1.

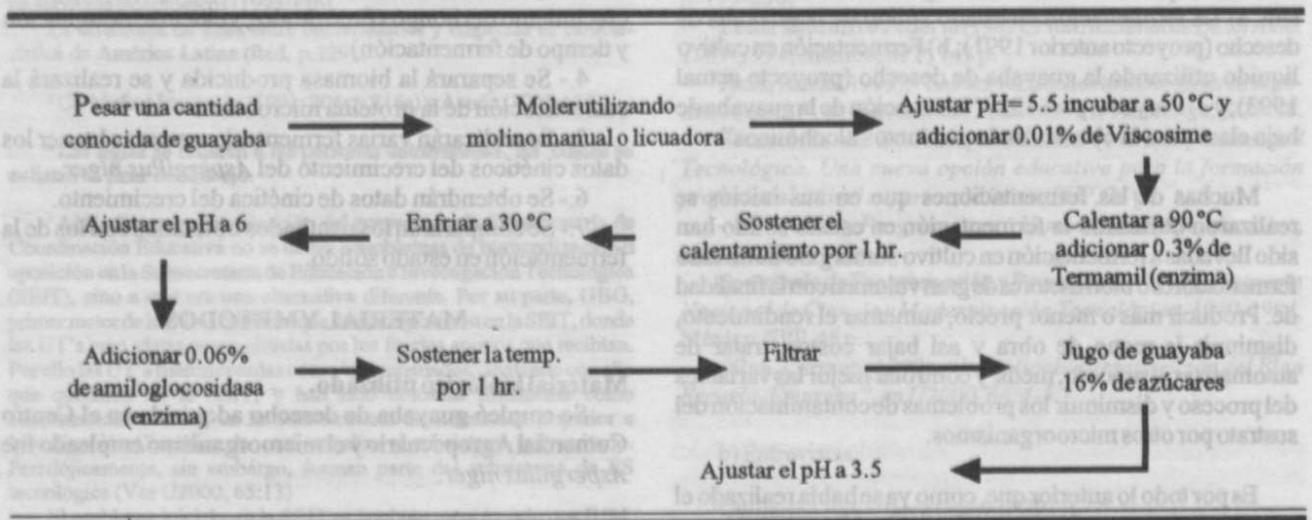


Figura 1.- Esquema del tratamiento enzimático del jugo de guayaba.

El rendimiento obtenido por este método enzimático es del 72%.

2.- Análisis del jugo de guayaba.

Los valores promedio de los diferentes componentes del jugo de guayaba con el tratamiento enzimático se muestran en la tabla 1.

COMPONENTE	% EN PESO
Azúcares fermentables	16. %
Proteína	0.3%
Grasa	0.2%
Fibra Cruda	0.0%
Cenizas	0.6%
pH(original)	3.5

Tabla 1. composición promedio del jugo de guayaba

3.- Fermentación en matraces agitados.

Se utilizó el jugo de guayaba a diferentes concentraciones para saber qué concentración de azúcares era la más óptima. En la tabla No. 2 se muestran dichos resultados.

No. de matraz	Conc. inicial de azúcares gr/100 ml.	Conc. final de azúcares gr/100 ml.	% Prot.
1	14	7.5	4.7
2	10	3.5	4.8
3	8	1.5	4.6
4	6	0.8	4.1
5	4	0.55	3.9
6	2	0.25	3.87
7	1	0.0	1.50

Tabla 2. obtención de la conc. óptima de azúcar, con 300 ml de medio, agitación de 75 rpm y 1 vvm de aire.

En base a los resultados mostrados en la tabla anterior se procedió a escalar el proceso a nivel de 1000 ml utilizando un fermentador para cultivo batch con agitación mecánica, medición de pH, control de temperatura. Los resultados obtenidos a este nivel fueron los mostrados en la tabla No. 3.

No. de Experimento	Cantidad de Micelio obtenida en gr.
1	2.4338
2	2.4981
3	2.4294
4	2.4300
5	2.4155
6	2.4285
7	2.3905
8	2.4350
9	2.4425
10	2.4068

Tabla 3. producción de micelio de *A. niger*, utilizando 1000 ml de jugo de guayaba al 2% en fermentador agitado. Con un tiempo de fermentación de 7 días a 28° C de temperatura.

Utilizando métodos estadísticos se calculó la desviación estándar, la varianza, la media de los datos obtenidos del crecimiento del micelio y a continuación se presentan los resultados.

valor medio = 2.43101 g/lit
desv. estándar = 0.0267
varianza = 0.000713

4.- Cinética del crecimiento

Resultados de la cinética de crecimiento de *A. niger* utilizando las mismas condiciones que en los experimentos anteriores. Las muestras fueron tomadas cada 24 hrs. durante los 7 días que dura el experimento y se analizaron los siguientes parámetros: a) cantidad de micelio producido, b) la cantidad de azúcar residual en el medio, y c) el % de proteína en el micelio. Los resultados se muestran en la tabla No. 4 y éstos fueron graficados para conocer el comportamiento en función del tiempo.

Tiempo en días	Concentración biomasa mg/ml	Concentración de azúcar residual mg/ml
0	0	20
1	0.15	17
2	0.76	13.8
3	1.415	12
4	1.956	9.8
5	2.275	7.5
6	2.352	5.75
7	2.431	5

Tabla 4. datos de la cinética de crecimiento y consumo de sustrato.

Las gráficas 1 y 2 se muestran en las siguientes páginas. La gráfica 1 muestra el comportamiento de la concentración de biomasa en función del tiempo y la gráfica 2 muestra cómo varía la concentración del sustrato (azúcar) también en función del tiempo.

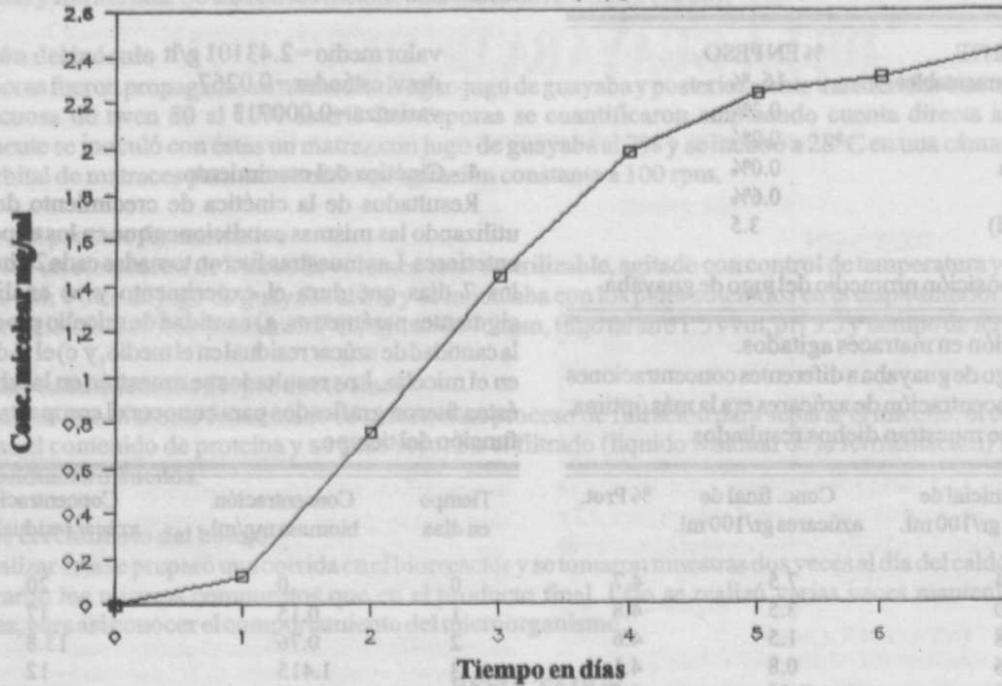
La gráfica No. 3 muestra los datos cinéticos del crecimiento de *A. niger* expresados como % de proteína al crecer sobre el sustrato sólido.

La gráfica No. 4 muestra las gráficas comparativas de los dos tipos de fermentaciones.

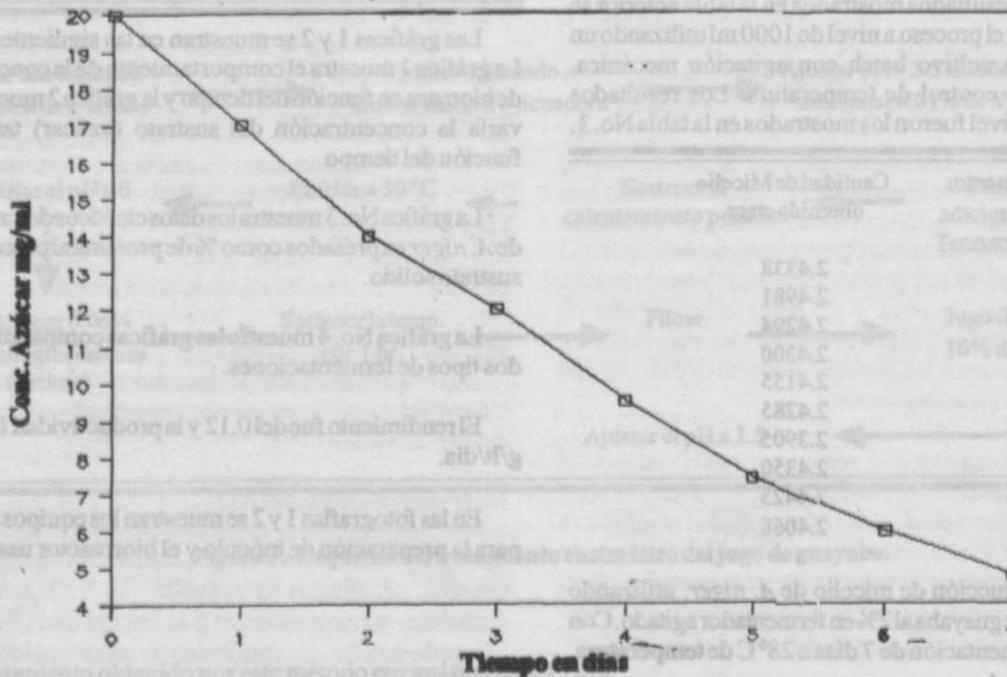
El rendimiento fue del 0.12 y la productividad fue de 0.34 g/lit/día.

En las fotografías 1 y 2 se muestran los equipos utilizados para la preparación de inóculo y el biorreactor usado.

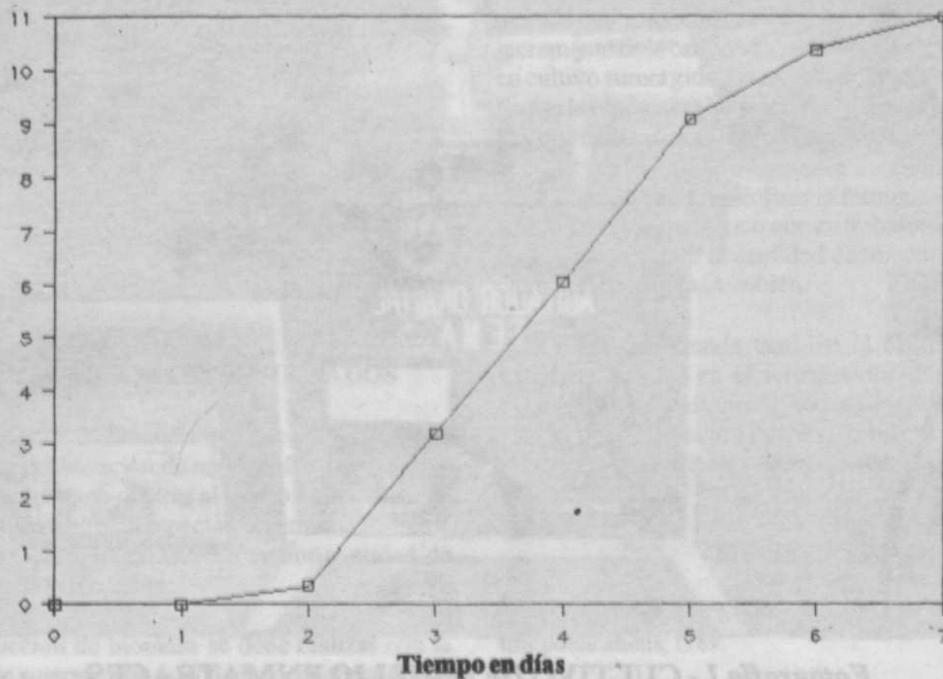
**Gráfica 1.- CINETICA DE CRECIMIENTO.
A. niger en jugo de guayaba 2%**



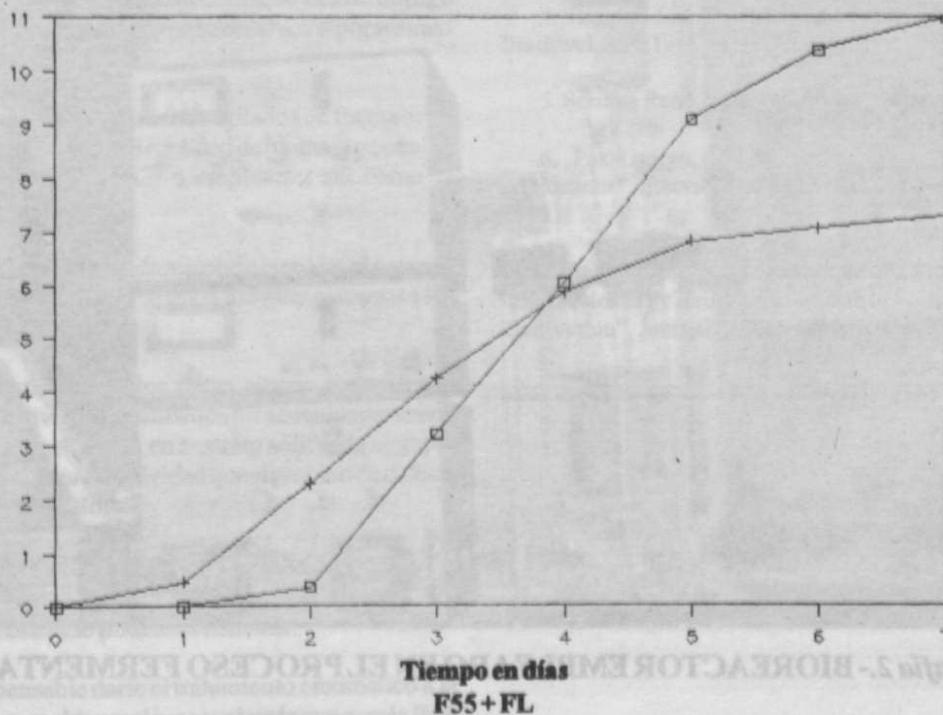
**Gráfica 2.- CINETICA DE CONSUMO DE AZUCAR.
A. niger en jugo de guayaba 2%**



**Gráfica 3.- CINETICA DE CRECIMIENTO DE
A. niger sobre guayaba y por fermentación sólida**

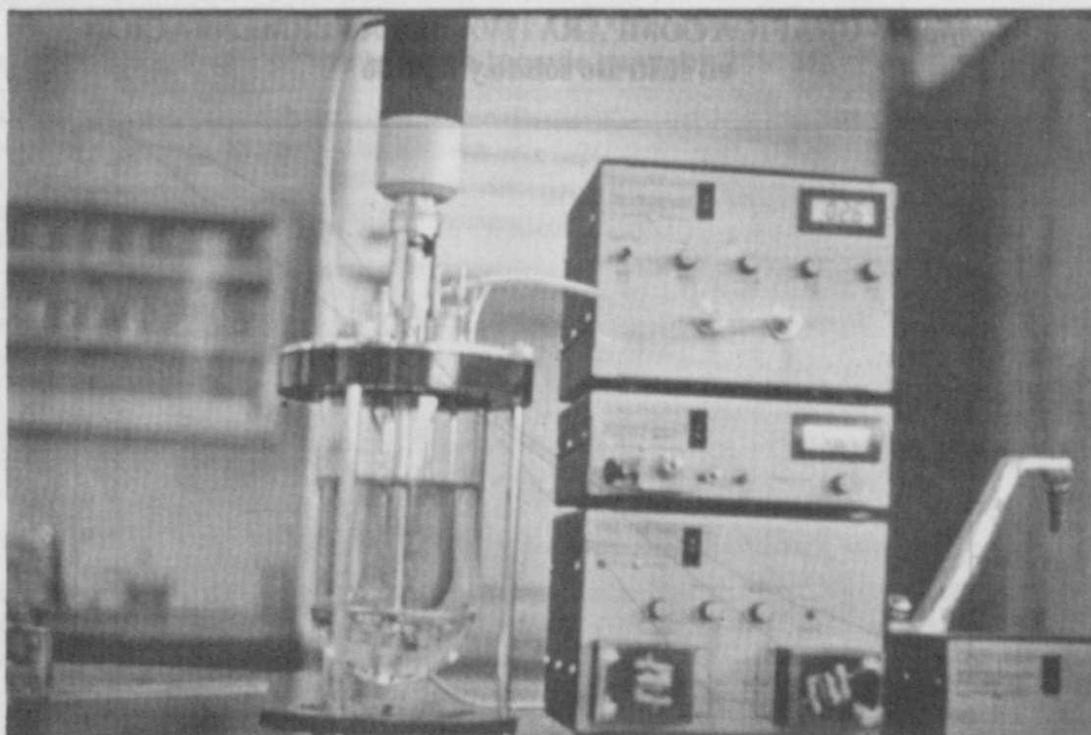


**Gráfica 4.- GRAFICA COMPARATIVA DE LA FERMENTACION
en sustrato sólido y líquido**





Fotografía 1.- CULTIVO DE MICELIO EN MATRACES.



Fotografía 2.- BIOREACTOR EMPLEADO EN EL PROCESO FERMENTATIVO.



ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1.- El tratamiento enzimático que recibe la pasta de guayaba, permite la obtención de un jugo fácil de filtrar y además con un incremento del tres al cuatro por ciento más de azúcares fermentables. Respecto al rendimiento éste también se incrementó, obteniéndose menor cantidad de residuos después de la filtración.

2.- La producción de biomasa se debe realizar con la concentración de sustrato más adecuada, de manera que la cantidad residual de éste sea mínima y permita obtener la mayor cantidad de micelio. El valor de la concentración escogido fue el de dos por ciento, en el reporte de avance se comentó que la concentración óptima era seis por ciento; pero pruebas posteriores y análisis de más muestras nos dieron el de dos por ciento. Así, con un litro de medio con dos por ciento de sustrato dará igual cantidad de micelio que 125 ml de jugo con 16% de sustrato, en caso de no haber inhibición por sustrato o algún metabolito.

3.- La fermentación en matraces agitados en forma orbital, permitió obtener una buena cantidad de biomasa y conocer qué cantidad de aire húmedo a emplearse, así como la velocidad de agitación.

4.- Respecto a la cantidad de micelio obtenido, el proceso resultó con bastante éxito ya que éstos son muy cercanos a los reportados con otros sustratos.

5.- La comparación de los datos cinéticos de ambos procesos fermentativos, los resultados presentados permiten observar que la fermentación en sustrato sólido da mejores rendimientos y mayor productividad que el proceso de cultivo sumergido (medio líquido).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Del trabajo realizado podemos concluir:

1.- Es indispensable darle el tratamiento enzimático a la guayaba molida para obtener el jugo y además que es más fácil

de bombear, filtrar y la fermentación se realiza en condiciones bien asépticas.

2.- La fermentación en estado sólido de la guayaba de desecho es más conveniente ya que se logra un mayor incremento de la cantidad de proteína que en la fermentación en cultivo sumergido, como lo muestra la gráfica No. 4. Por lo que la hipótesis planteada fue parcialmente falsa, ya que hay que realizar otras fermentaciones con otras condiciones.

3.- Se recomienda realizar la fermentación utilizando la adición de cloruro férrico que en trabajos anteriores ha permitido incrementar la cantidad de micelio y por lo tanto la cantidad de proteína también.

4.- Se recomienda también el cambio del móvil de agitación, ya que en el fermentador donde se realizó el experimento se tenía que dejar de agitar pues el micelio crece en el móvil de agitación (turbina Ruhston 6 paletas), se debe cambiar por un agitador de helicoidal.

BIBLIOGRAFÍA

1. Primrose, S.B., "Modern Biotechnology", Blackwell scientific publications, 1989.
2. Demain, Salomón, "Biology of Industrial Microorganisms", Butterworths, 1985.
3. Demain, Salomón, "Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology", American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1986.
4. Higgins I.J., Best D.J. and Jones J., "Biotechnology", Blackwell, S.P., 1988.
5. Scriban René, "Biotecnología", Manual Moderno, 1985.
6. Pak-Lamyu, "Fermentation Technologies Industrial Applications", Elsevier Applied Science, London and New York, 1990.
7. Bailey Michel J. and Linko Matti, "Production of Beta-Galactosidase by *Aspergillus oryzae* in Submerged Bioreactor Cultivation", Journal of Biotechnology, 16 (1990) 57-66.