

ANEXO 5

SUSTRATO

5.1 Medios de fermentación

La preparación de medios para el desarrollo de procesos de fermentación es una etapa fundamental para asegurar la productividad de los mismos.

Los componentes de los medios constituyen los efectores externos de naturaleza química que desempeñan un papel 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.

Aunque para cada microorganismo existen unos determinados nutrientes esenciales para el desarrollo de su actividad, estos nutrientes pueden definirse de forma general.

Por un lado se ha de considerar a los macronutrientes, agregados en cantidades de gramos por litro que están representados por las fuentes de C, N, S, P, K y Mg, por otro lado están los micronutrientes o elementos trazas representados por las sales de Fe, Mn, Mo, Ca, Zn y Co que se agregan a los medios en cantidades de miligramos o microgramos por litro. También se han de tener en cuenta a los factores de crecimiento, que están constituidos generalmente por componentes orgánicos suministrados en baja concentración y que no son sintetizados ni metabolizados por las células, sino incorporados a estructuras celulares y de función metabólica específica, como vitaminas, algunos aminoácidos, ácidos grasos no saturados, etc..

El diseño de un medio de fermentación tiene como finalidad la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos correspondientes al proceso a desarrollar. Con tal objeto se debe tener en cuenta todos aquellos aspectos relacionados con el microorganismo, el proceso y los sustratos a 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.

5.2 Selección del sustrato.

Normalmente se utilizan diversas materias como sustrato, éstas deben de contener los elementos necesarios para conservar la vida de los microorganismos. Estos elementos son los carbohidratos, nitrógeno y sales adecuadas propias para cada tipo de microorganismo. Además se ha de suministrar oxígeno si se quiere aumentar el crecimiento de las células.

Hay diferentes procesos de preparación del sustrato, estos dependen de la materia prima utilizada.

Suelen usarse tres tipos de sustratos, las materias amiláceas, las azucaradas y las celulósicas. Las materias amiláceas, contienen almidón. En este grupo están las raíces, tubérculos y cereales. Las raíces se muelen, se exprimen y se desecan. El almidón se licua por ebullición a presión y luego se hidroliza enzimáticamente. Como las levaduras no contienen amilasas, lo mismo para las bacterias, el almidón debe ser hidrolizado previamente.

El grano que contiene almidón puede ser arroz, maíz, mijo o patatas. El grano puede ser usado entero o ser triturado.

En el caso del grano de maíz se introduce en agua, empapándose y sometido a una temperatura de 40 a 50°C. Después se tritura y licua.

En las plantas industriales modernas se operan con licuefacción en continuo seguida de una sacarificación. En tales procesos se inyecta primeramente vapor a 150°C durante unos tres minutos, luego se hace un vacío para refrigerar. Durante el proceso se añade alfa amilasas en los siguientes instantes:

- Antes del calentamiento para reducir la viscosidad provocada por el remojo.
- Después del calentamiento y del enfriamiento para la producción de glucosa, además de alfa amilasas también se añaden glucoamilasas.

En las materias azucaradas entran los subproductos de la industria azucarera como las melazas y mieles, además también está el mosto, jugos de diferentes frutas, jugos de caña de azúcar y de la remolacha.

Las melazas son un subproducto de la cristalización del azúcar.

Se obtienen de la remolacha calentando en agua rodajas de la misma.

Cuando la cristalización de las sustancias de la industria azucarera es ya imposible se separan los cristales y el líquido oscuro que fluye con un contenido del 50% de azúcar aproximadamente se denomina melaza.

La composición de las melazas de la caña de azúcar varía de un cultivo a otro ya que depende de la composición del suelo.

Su composición a groso modo se puede indicar en la siguiente tabla:

Tabla 4 Composición de la melaza

COMPUESTO	% V/V
Sacarosa	40-45
Azúcares Reductores	10-15
No azúcar	10-12
Sustancias minerales	7-10
Nitrógeno total	0,3

Para el caso de la caña de azúcar, el jugo se libera usando prensadores. El residuo prensado resultante de los tallos de la caña se llama bagazo. El 80% del bagazo puede ser quemado como fuente de energía en el proceso de destilación y el 20% restante puede ser fermentado después de la hidrólisis química.

El hecho del uso de la caña de azúcar trae grandes consecuencias ya que es una manera de impulsar la industria azucarera, actualmente en crisis.

La materia celulósica como la madera o residuos desechables del procesamiento de la misma son también usados como medio de cultivo.

La madera no ha sido utilizada aún en la producción comercial del etanol pero cada vez está tomando más importancia debido a la gran disponibilidad de residuos celulósicos.

Durante la producción de papel a partir de coníferas se obtiene un líquido sulfítico residual que contiene hexosas fermentables. Si este líquido proviene de árboles caducas no es rentable su uso en el proceso de fermentación ya que contiene una gran cantidad de azúcar en forma de pentosas. Esto no es beneficioso, como se dirá más adelante, porque la levadura *Saccharomyces Cerevisiae* no es capaz de tomar la fuente de carbono de tales azúcares de cinco carbonos. Tampoco lo es capaz la bacteria *Zymomonas Mobilis*.

En la investigación en laboratorio con microorganismo se usa normalmente productos químicos puros para la obtención de medios de cultivos.

A escala industrial esto no es económicamente rentable, por ello se toman sustratos complejos de alta eficiencia.

El uso de sustratos diversos a los productos químicos deben cumplir las siguientes condiciones:

- Es obligatorio un medio de cultivo óptimamente equilibrado para conseguir la máxima producción.
- La composición de los medios de cultivo debe ser constantemente adaptada al proceso de fermentación.
- En las fermentaciones de prueba en el laboratorio se debe calcular el rendimiento del proceso de producción del etanol y además la separación del mismo.

Como resumen se podría decir que los sustratos utilizables son los que se nombran a continuación:

- Toda materia orgánica rica en sacarosa, como es la caña de azúcar, melaza y sorgo dulce.
- Aquellas que lo sean en almidón como los cereales, maíz, trigo, cebada... y como los tubérculos, yuca, camote, patata, malanga...
- Además también se podrán usar como sustrato las sustancias orgánicas ricas en **celulosa**, como la madera y los residuos agrícolas.

El uso de uno u otro a escala industrial se seleccionará según los siguientes criterios:

- Tipo de materia prima disponible, cantidad anual
- Disponibilidad temporal de la materia prima, una cosecha al año, producción durante todo el año.
- Precio de la materia prima puesta en el lugar de la instalación.
- Precio de la gasolina en el país en donde se desea implantar la fábrica de producción de bioetanol.
- Existencia de exención de impuestos sobre hidrocarburos para la fabricación y comercialización de biocarburantes.

En el caso de nuestro diseño de la planta piloto usaremos el sustrato más económico y el de mayor disponibilidad.

Una vez elegido el sustrato se mezclará con los microorganismos y todo ello se diluirá en agua. También se pueden usar otros **medios de dilución** diferentes al agua pero han de cumplir una característica muy importante, no reaccionar químicamente con el medio de cultivo.

La concentración de sustrato dependerá del carbono suministrado por los azúcares, y éste a su vez depende de la materia prima empleada. La concentración de azúcar afecta a la velocidad de la fermentación, al comportamiento y al desarrollo de las células.

Una concentración óptima de azúcar está en dentro del 10-18%. El valor más empleado es el del 12%.

Si se trabaja con concentraciones muy altas de azúcar, como por ejemplo, sobre el 22% se da una deficiencia respiratoria en los microorganismos y con ello una disminución de la

velocidad de fermentación. Al trabajar con concentraciones muy bajas de azúcares el proceso se hace antieconómico al requerir altos volúmenes para la fermentación.

Para este estudio se ha seleccionado un subproducto de la industria azucarera de la remolacha. Se llama melaza y tiene una gran cantidad de azúcares.

5.3 Melaza

Se denomina melaza al residuo de la fabricación del azúcar. Cuando en la industria azucarera es ya imposible conseguir una mayor cristalización de las masas cocidas por los procedimientos usuales, se separan los cristales de azúcar de un el líquido espeso, pardo negruzco. Este líquido aún contiene un 50% de azúcar y es lo que se conoce como la melaza.

La melaza es una de las materias primas más importantes para la fabricación del alcohol.

La melaza puede provenir de la remolacha o de la caña de azúcar.

En Cuba, Puerto Rico,... la melaza proviene de la caña de azúcar. Sin embargo en España, Italia,... la melaza viene de la remolacha, y es la única fuente de producción importante de alcohol industrial.

La melaza de la remolacha, la usada en este estudio, posee una flora bacteriana muy numerosa que puede fácilmente originar fermentaciones butílicas y desnitrificación, ya que el pH óptimo de estas reacciones está alrededor de 6,5.

La melaza se ha de diluir antes de ser usada ya que tiene una concentración de azúcar demasiado alta. Su pH suele rondar los 6,5 y por ello se dan tales reacciones nada interesantes.

La contaminación por microorganismos extraños deja de ser un problema cuando se acidifica la melaza llegando a valores de pH bastantes ácidos, aproximadamente 4,0.

Este pH inhibe por completo la acción de otros microorganismos que no fermenten alcohol.

5.4 Requerimientos nutricionales

Los requerimientos nutricionales están determinados por el tipo de metabolismo celular, ya sea autotrófico, que corresponde a los microorganismos que obtienen el carbono del CO₂ como las algas y algunas bacterias, y los heterotróficos que necesitan compuestos orgánicos como fuente de carbono. Otro factor esencial está determinado por las condiciones del cultivo, si es aerobio o anaerobio. El O₂ es uno de los oxidantes más comunes en el metabolismo energético.

Otro requerimiento nutricional está constituido por las fuentes de nitrógeno que pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica. El nitrógeno es utilizado para la biosíntesis de proteínas, ácidos nucleicos y polímeros de la pared celular.

Los requerimientos de otros macronutrientes como el P y el S son suministrados en forma de HPO₄ y SO₄ (o aminoácidos azufrados).

Los requerimientos de K y Mg son también esenciales. Una parte importante del primero está unida al RNA de manera que los requerimientos de K aumentan con los factores que influyen en el aumento del RNA de las células, como la velocidad de crecimiento. El ión K actúa como coenzima y probablemente actúa como catión en la estructura aniónica de varios componentes celulares. El ión Mg es esencial para la estabilidad de los ribosomas y actúa como cofactor en numerosas reacciones del metabolismo. Tanto el K como el Mg se incorporan a los medios en forma de sales como fosfato y sulfato.

Con respecto a los micronutrientes se distinguen 2 categorías, los que son frecuentemente esenciales para el crecimiento como Ca, Mn, Fe, Co, Cu y Zn y los que son raramente esenciales como B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, e I.

En general los requerimientos de trazas de elementos son conocidos cualitativamente.

A veces es difícil demostrar un requerimiento de un micronutriente porque generalmente está presente en suficiente cantidad como impureza de los componentes principales. Los requerimientos de éstos compuestos pueden aumentar varias veces cuando el cultivo ha estado sujeto a aumentos de temperatura por encima de un valor óptimo.

En algunos procesos existe la necesidad de efectuar otros agregados, a parte de los nutrientes requeridos por los microorganismos y que representan los requerimientos específicos del proceso considerado.

El diseño correcto tiene que ver con las características bioquímicas propias y evolución de los parámetros de cada proceso. Por ejemplo, un proceso caracterizado por un descenso continuo de pH, debido al uso de una sal de amonio como fuente de nitrógeno, obliga a considerar en su diseño algún agregado que no corresponda a una exigencia nutricional, como es el caso del control de pH del mismo.

5.5 Esterilización

Esterilización significa la eliminación de toda forma de vida de un medio o material, lo que se lleva a cabo generalmente por medios físicos, por ejemplo, filtración, o por muerte de los organismos por calor, productos químicos...

Esta definición excluye por lo tanto cualquier técnica que resulte solamente en un daño a los microorganismos o atenuación de la actividad de cualquier tipo.

La palabra desinfección se aplica a la remoción o destrucción por cualquier vía de organismos vivos que pueden causar daño particular o infección. No significa por lo tanto la destrucción de todos los microorganismos, sino solamente de aquellos que pueden producir un resultado no deseado.

Un antiséptico es un desinfectante, o sea un agente químico usado para destruir microorganismos dañinos. Se utiliza en general para agentes a ser aplicados en animales o humanos.

Asepsia es la exclusión continuada de microorganismos contaminantes. Así por ejemplo el cultivo de microorganismos en el laboratorio es llevado a cabo asépticamente como en muchas fermentaciones industriales. El medio de cultivo es esterilizado para remover toda forma de vida y luego inoculado con el cultivo requerido. Se dice entonces que el sistema se mantiene en condiciones asépticas.

Pasteurización es el término aplicado al proceso que se utiliza para la destrucción de algunos de los microorganismos posiblemente presentes en materiales sensibles al calor como la leche y cerveza. Consiste en calentar la leche, por ejemplo a 62 °C, mantenerla a esta temperatura 30 minutos y después enfriarla lo más rápidamente posible. Esta técnica no es de ninguna manera un procedimiento de esterilización. Es solamente un método para destruir organismos patógenos y al mismo tiempo disminuir el nivel de aquellos organismos que más pueden deteriorar la leche.

La razón fundamental para efectuar la esterilización en Microbiología Industrial es para evitar la competición por los nutrientes en medios de cultivo y permitir así que el cultivo de microorganismos específicos que se utilizan en un proceso de fermentación de los rendimientos esperados en biomasa y/o metabolitos específicos.

Los métodos de esterilización pueden ser de tres tipos, por destrucción total de microorganismos, por muerte o inactivación y por eliminación con medio físicos.

Por destrucción total se entiende un proceso muy violento, que casi siempre implica calentamiento apreciable del material, como ocurre con la aplicación de una llama, que es lo que hacemos en el laboratorio cuando flameamos un ansa de platino o las bocas de tubo de ensayo o erlenmeyers. Otra manera de destruir contaminantes es con el uso de poderosos agentes oxidantes. Por supuesto ésta metodología, aunque es efectiva, está muy restringida en su empleo.

La muerte o inactivación significa la eliminación de microorganismos sin que exista necesariamente desintegración de las células. Se puede efectuar por calentamiento, seco o húmedo, por radiaciones o por agentes químicos. El calor húmedo, generalmente en forma de vapor bajo presión, es muy útil y de gran valor en la esterilización en el laboratorio, que se efectúa en autoclave, o en la industria cuando se esterilizan los medios de cultivo y los equipos de fermentación. En el caso de los autoclaves, se pueden alcanzar presiones de 1 a 3 atmósferas. En escala grande el equipo de producción es esterilizado con vapor saturado bajo presión, y la presión requerida debe ser alcanzada en todas las partes del equipo y el aire debe ser purgado totalmente del sistema (como ocurre también en el caso de los autoclaves) porque la transferencia de calor disminuye mucho en ese caso.

Después de la esterilización se mantienen las condiciones asépticas, haciendo pasar vapor por las válvulas y sellos.

La eliminación física está restringida a la esterilización de gases líquidos, y es fundamentalmente llevada a cabo por filtración mediante filtros absolutos o filtros fibrosos.

Los filtros absolutos son de materiales cerámicos, de vidrio o de metal sinterizado con poros tan pequeños que la penetración de los microorganismos no es posible.

Los filtros fibrosos no son absolutos y el material filtrante puede ser lana de vidrio, amianto y esteres de celulosa, siendo las fibras de un diámetro variable de 0.5 a 15 micrones.

La cinética de la esterilización por calor húmedo tiene aplicación en la esterilización de medios de fermentación, está caracterizada bastante aproximadamente por una reacción cinética de primer orden.

Si N_0 es el número de organismos viables presentes inicialmente y N es número viable al final se tendrá que la ecuación de velocidad de muerte será:

$$-\frac{dN}{dt} = k \cdot N \quad \text{Integrando se obtiene} \quad \ln \frac{N_0}{N} = k \cdot t$$

N/N_0 es la fracción de organismos viables que sobreviven después del tratamiento por calor durante el tiempo t y K = constante de velocidad de destrucción, que depende de la temperatura según la clásica ecuación de Arrhenius:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}}$$

Si se gráfica el $\ln k$ en función de $1/T$ se obtendrá una línea recta, siendo la inclinación igual a $-E/R$ y la intersección de la recta con la ordenada, el valor de la constante de Arrhenius.

La ecuación de velocidad de muerte necesita una aclaración, ya que la misma no admite una disminución del número de organismos a cero, porque si N es cero, t debería ser infinito. Para resolver este problema supongamos que $N = 0.1$ y calculemos el valor correspondiente de t . No podemos decir que después de ese tiempo sobrevivirá una décima parte de un

microorganismo, pero si podemos decir que habrá sólo una probabilidad de 1 en 10 de que sobreviva un microorganismo.

Ya veremos que por razones de seguridad podemos fijar el valor de $N = 0.001$ o sea fijar una probabilidad de 1 en 1000 de sobrevivencia.

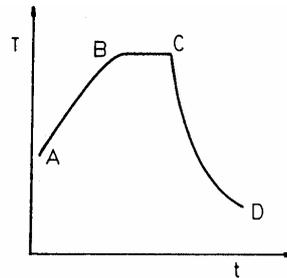


Fig.29 Variación de la temperatura en función del tiempo en un proceso de esterilización en Batch.

La figura 29 muestra una curva típica de la esterilización en batch de un medio en un fermentador. La curva AB representa la etapa de calentamiento, la parte BC corresponde a la etapa de mantenimiento y CD es la etapa de enfriamiento. Durante la primera y última etapa ocurre parte de la destrucción térmica de organismos presentes en el medio debido a que se alcanza temperatura elevada sobre todo en la última parte de la curva AB y la primera parte de la curva CD. Se considera que la temperatura a partir de la cual se produce destrucción de esporos es 100 °C. Por lo tanto tendremos eliminación de esporos de 100 a 120 °C durante la etapa de calentamiento y de 120 a 100 °C durante la correspondiente al enfriamiento. Los tiempos de calentamiento y enfriamiento varían de acuerdo al volumen del equipo. En fermentadores industriales de 60.000 l por ejemplo esos tiempos están en el orden de 28-30 min. y 11-14 min. para los períodos de calentamiento y enfriamiento respectivamente.

En la práctica de la esterilización es necesario tener presente que la calidad nutriente del medio debe ser preservada todo lo posible, razón por la cual, es imprescindible diseñar un ciclo de esterilización lo más efectivo posible pero al mismo tiempo lo más corto posible.

Podremos definir un término *nabla* (∇) que representa la magnitud de la disminución del número de organismos viables de manera que:

$$\nabla = \ln \frac{N_0}{N} = k \cdot t \quad \text{Y por tanto se cumpliría } \nabla = A \cdot t \cdot e^{-\frac{E}{RT}}$$

Sin embargo parte de la destrucción ocurre en la etapa de calentamiento y otra parte en la de enfriamiento, de manera que:

$$\nabla_{Total} = \nabla_{Calentamiento} + \nabla_{mantenimiento} + \nabla_{enfriamiento}$$

El calentamiento y el enfriamiento transcurren a temperaturas variables, así que es necesario integrar la ecuación para tales periodos. Así se puede determinar la cantidad de esporas que se han eliminado en ese transcurso de tiempo. Se debe conocer el volumen inicial de esporas y se ha de llegar a 120°C.

$$k dt = A \cdot e^{-\frac{E}{RT}} dt$$

Existen datos, en bibliografía, de cálculo de tiempo de mantenimiento para la esterilización de 45,000 l de medio (con un valor de $N_0 = 2 \times 10^7$ esp/ml) que demuestra que son necesarios solamente 8,8 min como tiempo de mantenimiento a 120 °C.

Debe tenerse en cuenta que estas consideraciones son válidas para el cálculo del tiempo de esterilización mínimo, a 120 °C, en fermentadores industriales del volumen considerado. En el caso del laboratorio cuando utilizamos un autoclave y deseamos esterilizar distintos recipientes con volúmenes diversos de medio, el tiempo de calentamiento y de enfriamiento no son generalmente considerados, salvo en el caso de equipos que tengan un período de calentamiento y de enfriamiento prolongado, los que por otra parte no son recomendados para su uso en el laboratorio. Lo que es importante en este caso es el tipo de recipiente, su geometría y el volumen de medio a esterilizar.

El tiempo de esterilización (o sea el tiempo de mantenimiento a 120 °C) requerido por ejemplo para tubos de ensayo de 18 x 50 mm es de 12-14 min y para tubos de 38 x 200 mm, de 15-20 min. Erlenmeyers de 2000 ml requieren de 30-35 min mientras que si son de 125 ml el tiempo es de 12-14 min. En cambio un frasco pyrex cuadrado de 1000 ml requiere 30-35 min y una botella de suero de 9000 ml 50-55 min. Estos tiempos aseguran la eliminación de esporos bacterianos de las especies más resistentes.

