Capítulo 3.

Producción masiva de *Rhodotorula glutinis* cepa LvCo7

Andrés Díaz García y Cindy Mejía Maldonado

Resumen

Para el diseño de un medio de cultivo adecuado para la producción de biomasa de la levadura *Rhodotorula glutinis* LvCo7 se aplicaron experimentos secuenciales a nivel de laboratorio, primero, un diseño exploratorio usando la técnica de microfermentación, para determinar el rango de concentraciones adecuadas de fuente de carbono, nitrógeno, sales y pH; posteriormente se aplicaron diseños eficientes para estandarizar las concentraciones de nutrientes y generar los parámetros de rendimiento y eficiencia del proceso en Erlenmeyer de 125 mL y 500 mL; por último, se validaron los resultados obtenidos en biorreactor STR con ajustes iniciales en los parámetros fisicoquímicos de la fermentación (agitación, aireación y pH).

Estas condiciones fueron utilizadas para la producción rutinaria de la biomasa requerida para los procesos de formulación del prototipo que fue aplicado en campo en el cultivo de mora.

Introducción

La producción masiva de un microorganismo para el desarrollo de un bioplaguicida es una etapa crítica del proceso de obtención de un bioproducto, ya que, dependiendo de la calidad de la biomasa producida en esta etapa, se podrán cumplir los requerimientos mínimos de concentración y pureza requeridos por las operaciones "aguas abajo" del proceso de fermentación; es decir, aquellas relacionadas con la formulación del bioproducto.

La estandarización de la producción masiva conlleva a la aplicación de múltiples herramientas metodológicas, técnicas analíticas y análisis estadísticos, por un lado, y requiere del conocimiento y la experiencia del investigador a cargo, por el otro.

El objetivo final es la definición de una estrategia detallada de la operación unitaria de fermentación, lo que involucra no solo el diseño de un medio de cultivo específico para el microorganismo, sino la determinación experimental de las condiciones fisicoquímicas clave (agitación, aireación, pH) que deben ser aplicadas en el transcurso del proceso, para alcanzar la productividad deseada.

Metodología

Diseño del medio de cultivo por microfermentación

Se determinó el efecto de la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, así como el pH, sobre el crecimiento de *R. glutinis* LvCo7, expresado como absorbancia y utilizando como microfermentador una placa de Elisa de 96 pozos de 400µL. Se aplicó un diseño factorial completo, evaluando tres niveles por factor (Tabla 4), lo que equivale a 3^3=27 tratamientos por triplicado, es decir, 81 pozos.

Adicionalmente, se tuvieron en cuenta los siguientes tratamientos: un control absoluto (pozo vacío), un control negativo (250 µl de agua estéril), un control positivo 1 (200 µl de caldo YM estéril), un control positivo 2 (200 µl de caldo YPD estéril) y un tratamiento sin sales en el que se dispensaron 25 µl del nivel alto de las soluciones de carbono y nitrógeno y 150 µl de agua, el pH se ajustó por adición de ácido o base. Las condiciones de fermentación fueron: temperatura de 28°C, agitación constante a 100 rpm y volumen de trabajo de 250µl.

Tabla 4. Niveles de los factores evaluados en el proceso de microfermentación para *R. glutinis* LvCo7

Nivel	Carbono ($g.l^{-1}$)	Nitrógeno ($g.l^{-1}$)	pH
-1	2,5	1	4
0	10	4	7
1	20	8	9

Se realizaron mediciones de absorbancia cada hora, durante 48 horas, en un lector de Elisa Asys Hitech® Expert 96 a 450 nm.

Los datos ajustados se sometieron inicialmente a un análisis de varianza, para determinar si alguno de los factores presentó un efecto significativo; posteriormente se realizó un análisis de Pareto para determinar la magnitud de dicho efecto y se analizaron los coeficientes del modelo generado, para determinar la dirección del efecto (positivo o negativo) sobre la variable de respuesta. Finalmente, se graficaron las respuestas por pares de factores, para generar las superficies de respuesta que permitieron visualizar en tres dimensiones hacia qué región se presentó el factor óptimo de la respuesta (absorbancia).

Resultado

Del análisis de varianza se concluyó que solamente el factor nitrógeno presentó un efecto significativo sobre la absorbancia. Al complementar este análisis con la interpretación de la gráfica de Pareto (Figura 19), se obtuvo que el nitrógeno presentó un efecto aproximadamente dos veces superior con respecto al carbono y ocho veces con respecto al pH; este resultado indica que los niveles seleccionados de los factores fueron adecuados, ya que los efectos estandarizados estuvieron muy similares y poco significativos.

Igualmente, al analizar los coeficientes del modelo de predicción (datos no mostrados), se observó que todos los factores presentaron un efecto positivo, es decir, directamente proporcional sobre la respuesta. Sin

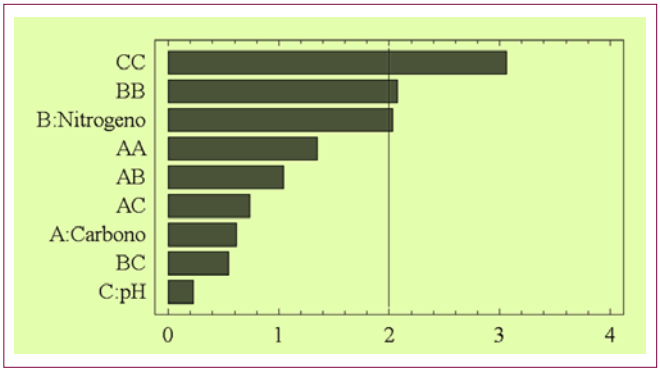

Figura 19. Gráfica de Pareto. En el eje Y se presentan los factores e interacciones evaluadas, y en el eje X, el efecto estandarizado de las mismas. La línea vertical azul representa la significancia del factor con un nivel de confianza del 95%.

embargo, el modelo generado presentó un bajo poder de predicción (15,6% de la variabilidad experimental), además de que el modelo está restringido al espacio experimental evaluado.

Al realizar el análisis individual de las superficies de respuesta, se pudo observar que la mejor respuesta se dirigió hacia los siguientes niveles: carbono, 0; nitrógeno, 0; pH, -1 o +1, puesto que la respuesta para carbono y nitrógeno es cóncava hacia arriba, mientras que la respuesta para pH es cóncava hacia abajo. También cabe resaltar el efecto del pH sobre la variable de respuesta, ya que, a pesar de que no es significativo, sí es muy importante su ajuste inicial en el nivel -1 o +1, puesto que si se usa el nivel cero, se cae en un "valle profundo" que disminuye la respuesta, como se observa en las gráficas tipo "silla de montar invertida", que son muy similares para las interacciones pH-carbono (Figura 20).

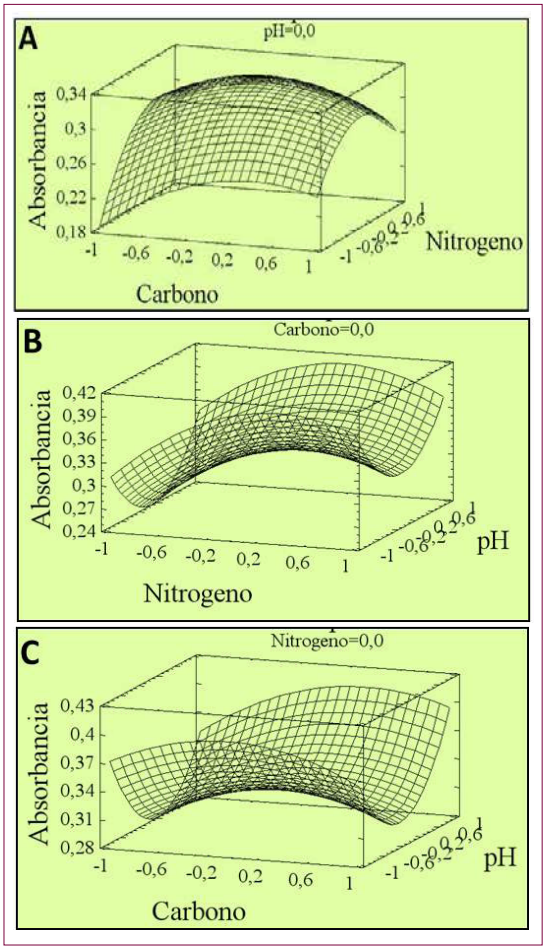

Figura 20. Comportamiento de la variable de respuesta en el espacio experimental. A. Factor pH. B. Factor nitrógeno. C. Factor carbono.

De acuerdo con el análisis gráfico, se formuló el medio de cultivo codificado como ML7 (fuente de carbono de 12,9 $g.L^{-1}$, de nitrógeno de 4,6 $g.L^{-1}$, una solución concentrada de sales 1X y pH inicial ajustado a 9,0), el cual se utilizó para estandarizar la producción masiva de la levadura en Erlenmeyer y biorreactores.

Metodología

Estandarización del proceso de producción masiva en Erlenmeyer

Se evaluó el crecimiento de la levadura en el medio ML7 en Erlenmeyer de 125 mL y 500 mL, en volúmenes de trabajo de 25 mL y 100 mL, respectivamente, con una concentración inicial de $1x10^{7}$ células.mL^{-1}, una temperatura de incubación 28°C y una agitación de 150 rpm. Para determinar

el crecimiento se realizaron muestreos hasta las 96 horas de fermentación y se les realizó su recuento en cámara de Neubauer. Al final de la cinética de crecimiento se cuantificaron los azúcares reductores mediante la técnica de DNS modificada (Godoy, 2002) y la viabilidad de las células, mediante el recuento en placa.

Adicionalmente se determinó el peso seco para los tiempos de fermentación óptimo y total; para esto se tomaron 1,5 mL de medio de cultivo y se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos, se descartó el sobrenadante y se determinó el porcentaje de humedad de la biomasa para posteriormente establecer el peso seco generado.

Resultado

Sin importar el volumen de trabajo, *R. glutinis* LvCo7 presentó una cinética de crecimiento con una primera fase caracterizada por un rápido crecimiento, seguida por una fase de disminución en la velocidad de crecimiento, hasta llegar al inicio de la fase estacionaria a la hora 42 (Figura 21), demostrando un efecto poco significativo del cambio de volumen sobre el crecimiento de la levadura, lo cual puede atribuirse a la similitud en la geometría y en el volumen de líquido y aire dentro de los Erlenmeyers, que se mantuvo proporcional en los dos niveles.

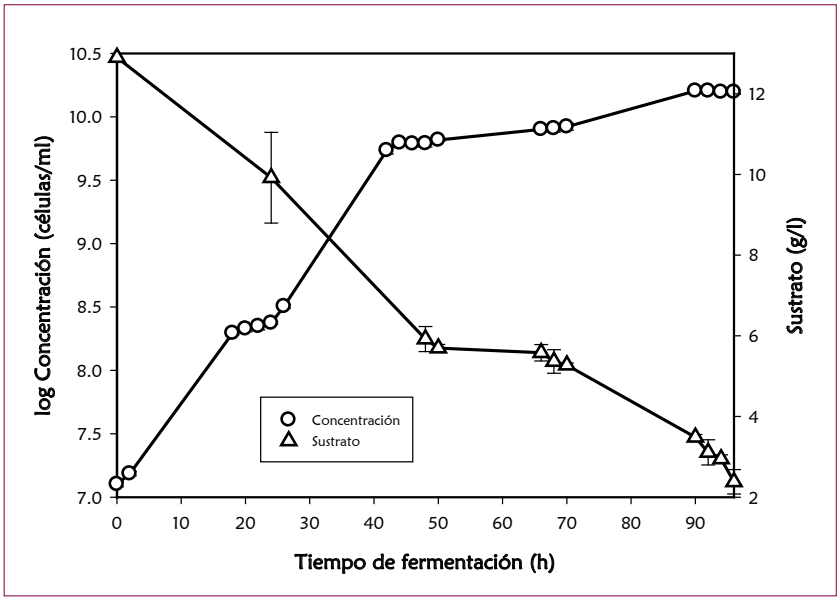

Figura 21. Cinética de crecimiento de *R. glutinis* LvCo7 en Erlenmeyer de 500 mL.

Al finalizar el tiempo de fermentación se presentó un consumo de sustrato superior al 97% y 82% en Erlenmeyer de 125 mL y 500 mL, respectivamente; esto indica que el medio de cultivo es eficiente y que los requisitos nutricionales que las células de levadura requieren para su crecimiento y división (carbono, nitrógeno y microelementos) se encuentran balanceados (Tabla 5); adicionalmente, este hecho garantiza una concentración de sustrato residual muy baja en la biomasa final, facilitando el diseño de las operaciones unitarias de concentración y purificación. Al comparar las magnitudes obtenidas, se observó en Erlenmeyer de 500 mL una disminución en la biomasa seca, que conllevó a un descenso de la productividad y a un menor consumo de sustrato (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros de eficiencia de *R. glutinis* LvCo7 en Erlenmeyers de 125mL y 500mL

Volumen mL	Hora	Biomasa seca ($g.L^{-1}$)	Productividad ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	Rendimiento ($g.g^{-1}$)	Sustrato consumido (%)
125	96	11,30	0,11	0,89	97
500	96	9,38	0,10	0,89	82

En esta etapa se dilucidaron las cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato para la levadura y se clarificaron algunas tendencias y fenómenos que deben ser corroborados a nivel de biorreactor, en los que las condiciones de agitación y aireación son muy diferentes. Por ahora, los resultados son promisorios, ya que la concentración celular final está cercana a $1x10^{10}$ células.mL^{-1} al final de la fermentación, que es el objetivo para poder llevar a cabo las operaciones unitarias "aguas abajo".

Metodología

Validación del proceso de producción de biomasa en biorreactor Airlift

Para validar la producción de la levadura se utilizó un biorreactor Airlift con una capacidad de 20 litros de lazo interno, con tubos concéntricos diseñado por Flórez y Díaz (2002) y que consta de tres secciones: una de ascenso, otra de descenso y otra de desgasificación (Figura 22). Este tipo de equipos tienen la particularidad de no usar agitación mecánica, dado que el aire que se inyecta al sistema cumple con las funciones de aireación, agitación y homogeneización.

Se realizó la cinética de crecimiento de *R. glutinis* LvCo7, utilizando un volumen efectivo de trabajo de 10 litros, con una concentración inicial de

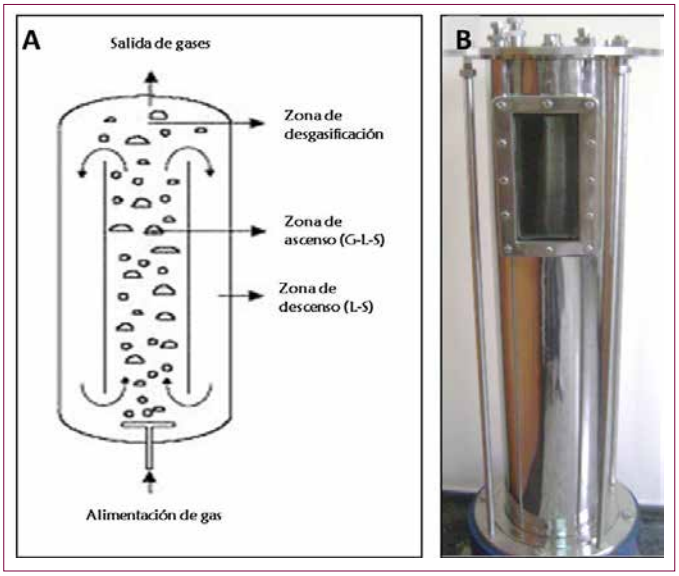

Figura 22. A. Vista esquemática de las secciones de un biorreactor Airlift de lazo interno con tubos concéntricos (Fuente: http://www.revistavirtualpro.com/revista/index.php?ed=2006-01-01&pag=18). B. Vista general del equipo utilizado en el presente trabajo (Fuente: Díaz, 2011).

$1{,}3x10^{7}$ células.mL^{-1} y una temperatura de incubación de 28°C. Se realizaron muestreos regulares hasta la hora 96, para determinar la concentración celular por conteo en cámara de Neubauer, azúcares reductores, pH y peso seco a las 24, 52 y 72 horas.

Resultado

La cinética de crecimiento es típica con tres fases: una inicial de crecimiento exponencial, una intermedia de desaceleración y una final cuasi-estacionaria, para alcanzar una concentración celular final de $1{,}3x10^{9}$ células.mL^{-1}. Este valor es inferior con respecto al obtenido en Erlenmeyer de 500 mL, en el que se alcanzaban valores de $1x10^{10}$ células.mL^{-1}.

Hasta la hora 52 de fermentación solo se presentó un consumo del 40% de la fuente de carbono (Tabla 5), a diferencia de la fermentación en Erlenmeyer de 500 mL, en la que fue superior al 80%, obteniéndose un rendimiento de 0,7 $g.g^{-1}$.

Por otra parte, el consumo de sustrato al finalizar el tiempo de fermentación establecido fue de 52%, manteniendo el rendimiento a través del tiempo, sin

embargo en este lapso de tiempo la productividad disminuyó de 0,16 $g.L^{-1}.h^{-1}$ a 0,09 $g.L^{-1}.h^{-1}$, debido a la disminución en la velocidad de crecimiento (Tabla 6). El valor de consumo de sustrato fue inferior en un 21% con respecto al obtenido en Erlenmeyer de 500 ml; este fenómeno, aunado con la concentración celular final, es indicadores de que el proceso de fermentación en biorreactor Airlift demostró ser menos eficiente que el llevado a cabo en Erlenmeyer, bajo las condiciones evaluadas. Esto se podría atribuir a que la luz es un factor importante en el crecimiento de las levaduras del género *Rhodotorula* (Yen *et al.*, 2011), y en el caso del biorreactor Airlift, debido a su diseño, las levaduras no están expuestas a una fuente de luz constante, lo que pudo tener un efecto negativo sobre el crecimiento microbiano.

Tabla 6. Parámetros de eficiencia obtenidos con *R. glutinis* LvCo7 en biorreactor Airlift de 20 litros

Hora	Peso seco ($g.L^{-1}$)	Productividad ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	Rendimiento ($g.g^{-1}$)	Sustrato consumido (%)
72	6,70	0,09	0,9	52

En la cinética de crecimiento se observó una fase de crecimiento exponencial hasta la hora 26, cuando se obtuvo la mayor velocidad de crecimiento (0,13 h^{-1}), con un tiempo de duplicación de 5,4 horas, seguida de una fase de desaceleración del crecimiento hasta 0,05 h^{-1} y un tiempo de duplicación de 13,7 h a partir de la hora 26 (Figura 23). Finalmente, a partir de la hora 50 se presentó una fase cuasi-estacionaria, con una disminución de la velocidad específica de crecimiento hasta 0,02 h^{-1}, con aumento en

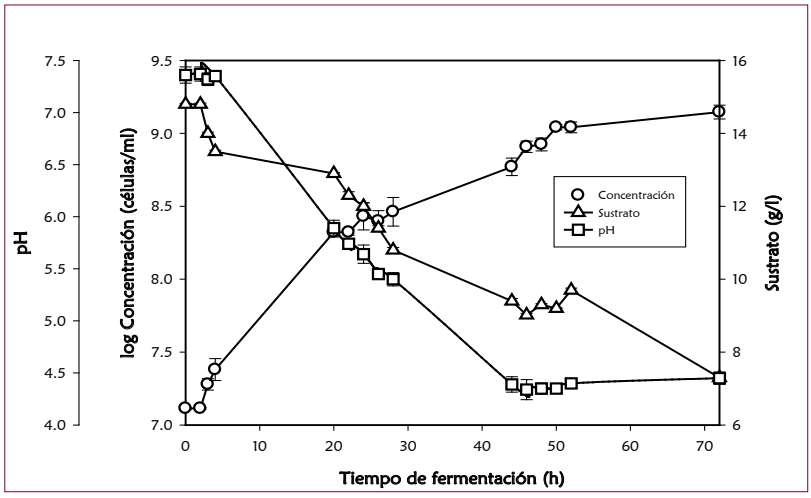

Figura 23. Cinética de crecimiento, consumo de sustrato y evolución del pH para *R. glutinis* LvCo7 en biorreactor Airlift de 20 litros.

el tiempo de duplicación hasta un valor de 43,3 h, para un total de ocho generaciones a través de todo el proceso (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros cinéticos obtenidos con *R. glutinis* LvCo7 en biorreactor Airlift de 20 litros

Variable	Fase I (hora 0-26)	Fase II (hora 26-50)	Fase III (hora 50-72)
Modelo cinético	0,1291x – 0,0204 $R^2 = 0,98$	0,0506x + 1,7105 $R^2 = 0,98$	0,0157x + 3,4911 $R^2 = 0,97$
Velocidad específica μ_x	0,13 h^{-1}	0,05 h^{-1}	0,02 h^{-1}
Tiempo de duplicación t_d	5,4 h	13,7 h	43,3 h
No. de generaciones	5	2	1
No. total de generaciones	8		

Los cambios en las cinéticas obtenidas en biorreactor, en comparación con la obtenida con Erlenmeyer, son resultado del cambio en el tipo de aireación y en los patrones de flujo y agitación, así como el cambio de volumen de producción.

Metodología

Validación del proceso de producción de biomasa en biorreactor STR

Para validar la producción de la levadura se utilizó un biorreactor STR Infors, modelo Labfors 3® (Figura 24). Se realizó la cinética de crecimiento de *R. glutinis* LvCo7, utilizando un volumen efectivo de trabajo de ocho litros con una concentración inicial de $1x10^7$ células.mL^{-1}, una temperatura de incubación de 28°C, aireación de 0,5 vvm y agitación de 150 rpm. Se realizaron muestreos regulares hasta la hora 66, para determinar la concentración celular por conteo en cámara de Neubauer, azúcares reductores, pH y peso seco.

Resultados

La aireación y agitación mecánica favorecieron la transferencia de sustrato y de oxígeno a través de todo el medio de cultivo, ya que se presentó una mayor velocidad de crecimiento durante las primeras 18 horas, correspondiente a 0,22 h^{-1}, es decir, casi el doble de la velocidad de crecimiento, en comparación con el biorreactor Airlift; sin embargo, posteriormente se presentó un fenómeno similar de desaceleración del crecimiento que se reflejó en una velocidad de 0,05 h^{-1} (Tabla 8), que disminuyó hasta 0,02 h^{-1} y que se puede

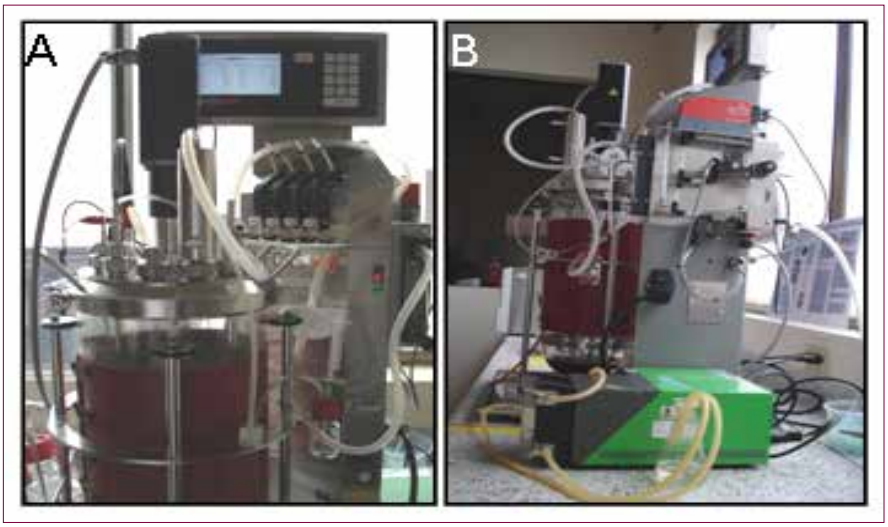

Figura 24. A. Vista frontal del biorreactor Labfors 3®; se observa el display LCD que permite el monitoreo y control de las variables de la fermentación, los sistemas de acople del vaso de vidrio con la tapa en acero inoxidable con 12 puertos, el acople del motor que suministra la agitación y las cuatro bombas peristálticas disponibles. B. Vista lateral del biorreactor; se observa el sistema de mezclado de gases, la conexión a la fuente de poder, la chaqueta para el control de la temperatura y el acople con una bomba peristáltica externa (Fuente: Díaz, 2011).

considerar como fase estacionaria. El pH final estuvo en el orden de 4,7, valor que estuvo 0,2 por encima en comparación con el biorreactor Airlift (Figura 25); por otra parte, la concentración celular final fue de $3x10^9$ cél. mL^{-1}, tres veces mayor a la concentración obtenida en el biorreactor Airlift.

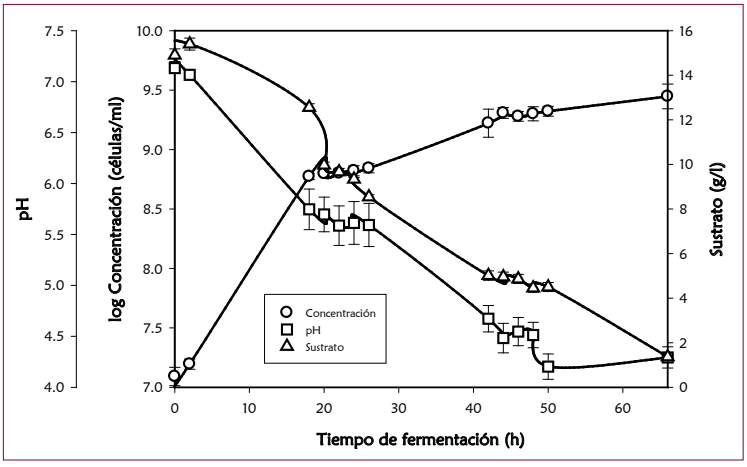

Figura 25. Cinética de crecimiento, consumo de sustrato y evolución del pH para *R. glutinis* LvCo7 en biorreactor STR de 13 litros.

Tabla 8. Parámetros cinéticos obtenidos con *R. glutinis* LvCo7 en biorreactor STR de 13 litros

Variable	Fase I (hora 0-18)	Fase II (hora 18-44)	Fase III (hora 44-66)
Modelo cinético	0,2171x – 0,1284 $R^2 = 0,99$	0,0485x + 2,8179 $R^2 = 0,97$	0,0169x + 4,2238 $R^2 = 0,94$
Velocidad específica μ_x	0,22 h^{-1}	0,05 h^{-1}	0,02 h^{-1}
Tiempo de duplicación t_d	3,2 h	14 h	41 h
No. de generaciones	6	2	1
No. total de generaciones	9		

Adicionalmente, en el sistema de tanque agitado se observó un mayor consumo de sustrato (superior al 90%), en un menor tiempo (66 horas), cuando se comparó con el sistema Airlift, en el que apenas se alcanzó un consumo de 52% en 72 horas de fermentación. En procesos de fermentación similares se ha demostrado que la agitación mecánica (en el orden de 200 rpm) favoreció la producción de biomasa de la levadura *R. glutinis*, hasta alcanzar una concentración celular de 10,35 $g.L^{-1}$ en un periodo de tiempo de 94 horas (Tinoi *et al.*, 2005).

Al analizar los parámetros de eficiencia se observó que la productividad fue de 0,14$g.L^{-1}.h^{-1}$, que es un 60% superior a la obtenida en Airlift (0,09 $g.L^{-1}.h^{-1}$) (Tabla 9). Por otro lado, la biomasa final obtenida en el biorreactor STR fue 37% mayor, en comparación con la obtenida después de 72 horas en el biorreactor Airlift, lo que indica que las condiciones de agitación y aireación son adecuadas para la producción de biomasa; esto se ha demostrado para aislamientos de esta levadura (Aksu *et al.*, 2007).

Tabla 9. Parámetros de eficiencia obtenidos con *R. glutinis* LvCo7 en biorreactor STR de 13 litros

Hora	Peso seco g/L	Productividad ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	Rendimiento ($g.g^{-1}$)	Sustrato consumido (%)
66	9,17	0,14	0,65	91,17

Conclusión

Se diseñó un medio de cultivo económico y eficiente para la producción de biomasa de la levadura *R. glutinis* LvCo7 a nivel de laboratorio y se estandarizó una metodología de producción masiva que incluyó el ajuste de condiciones fisicoquímicas en dos tipos de biorreactores (tanque agitado y Airlift). Con los resultados obtenidos se seleccionó el sistema de tanque agitado como el ideal para la producción de biomasa, en ensayos que

involucren esta levadura a nivel de invernadero y campo, ya que con éste se presentó la mayor productividad (0,14 g biomasa.litro^{-1}.hora^{-1}), con un aprovechamiento del sustrato superior al 90%.

Adicionalmente, la información experimental generada permitirá la definición de una estrategia de escalamiento para la producción de biomasa a nivel piloto o industrial.

Referencias bibliográficas

Aksu, Z. & Eren, A.T. (2007). Production of Carotenoids by the Isolated Yeast of *Rhodotorula glutinis*. En: *Biochemical Engineering Journal*. 35: 107-113.

Flórez, J. & Díaz, A. (2002). *Diseño y puesta en marcha de un reactor Airlift para la producción masiva de microorganismos de interés en control biológico*. Ingeniería Química. Fundación Universidad de América. Bogotá, D.C. Colombia.

Godoy, R. (2002). Método DNS para la determinación de azúcares reductores totales en melaza, sustrato de fermentación y vinos. En: *Manual de métodos analíticos*. Departamento de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, D.C. Colombia.

Tinoi, J.; Rakariyatham, N. & Deming, R.L. (2005). Simplex Optimization of Carotenoid Production by *Rhodotorula glutinis* Using Hydrolyzed Mung Bean Waste Flour as Substrate. En: *Process Biochemistry*. 40: 2551-2557.

Yen H., W. & Zhang, Z. (2011). Enhancement of Cell Growth Rate by Light Irradiation in the Cultivation of *Rhodotorula glutinis*. En: *Bioresource Technology*. 102: 9279-9281.