

Una experiencia didáctica interdisciplinaria aplicada a la enseñanza de optimización sistemática de fermentaciones

Beccaria, A.; Miglieta, H.; Martínez, R.; Claus, J.; Mantovani, V.; Goicoechea, H. ()*

Resumen

Se realizó una experiencia docente interdisciplinaria con alumnos de la carrera de Licenciatura en Biotecnología en la que se propuso, mediante el uso de técnicas micro-biológicas simples, introducirlos en conceptos de quimiometría y familiarizarlos con los procesos fermentativos. El trabajo se planificó para ser desarrollado en dos semanas, en las que los alumnos estimaron y optimizaron los factores que mayor incidencia pueden tener en la producción de α -amilasa fúngica, con un medio de cultivo constituido por cereal molido. A través de la aplicación de técnicas de diseño experimental y análisis estadístico, seleccionaron los factores principales y aplicaron el método de la superficie de respuesta para conocer los valores óptimos de los factores seleccionados. Para el diseño y procesamiento de los datos, los alumnos aplicaron programas estadísticos especializados.

() Laboratorio de Fermentaciones, Curso de Fermentación en Sustrato Sólido y Cátedra de Química Analítica, Curso de Elementos de Quimiometría. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL.*

Introducción

El trabajo interdisciplinario se origina como consecuencia de los problemas que plantea el desarrollo científico-tecnológico, como la convergencia de distintas disciplinas sobre un objeto o sistema de conocimiento, para dar lugar a un enfoque integral que potencia el aprendizaje y la comprensión de dicho objeto o experiencia. Este enfoque científico y pedagógico posibilita nuevas aproximaciones y una inserción entre docentes de distintas áreas del conocimiento, facilitando rápidamente una integración.

Si se profundiza esta perspectiva, se observa que la ciencia y la tecnología de hoy han demostrado reiteradamente que el impacto del conocimiento en la acción (y especialmente en la solución de problemas prácticos), requiere de una fuerte interacción entre las disciplinas implicadas y aún más: en algunos casos hace necesaria la generación de nuevas disciplinas. De esta manera, tal como ha sido expresado, la interdisciplina de hoy se convierte en la disciplina del mañana.

Desde este punto de vista, se conformó un grupo docente de las distintas disciplinas que intervinieron que, mientras realizaban la propia experiencia interdisciplinaria, transmitían a los alumnos una enseñanza muy fuerte acerca de la integración de equipos multidisciplinarios, aspecto esencial en el desarrollo del perfil profesional del biotecnólogo.

El término quimiometría se emplea para describir el uso de métodos matemáticos, estadísticos y otros, basados en la aplicación de la lógica en el campo de la química, y en particular de la química analítica (Breton R., 2003). El diseño de los experimentos y la optimización de los procedimientos experimentales y las mediciones químicas constituyen una importante área de la quimiometría. Los objetivos de su aplicación pueden ser numerosos, desde el estudio de la influencia de diferentes factores sobre la robustez de un método analítico, hasta encontrar las condiciones que permitan un óptimo en la producción de una sustancia realizando, en todos los casos, el menor número posible de experimentos. Los procedimientos de optimización sistemática son llevados a cabo siguiendo la siguiente secuencia: 1) elección de una función objetivo, 2) selección de los factores más importantes y 3) optimización propiamente dicha. (Kellner R. et al., 1998).

Un experimento que presenta excelentes características, cuando de enseñar diseño experimental se trata, es el bioproceso (Capello G. et al, 2003). Éste puede ser descrito como un proceso en el cual determinados microorganismos convierten sustratos químicos en productos de alto valor agregado. Estos productos pueden ser de vital importancia para la sociedad moderna, abarcando desde productos tradicionales como cerveza, hasta productos de la química fina como antibióticos

(Kansiz M. et al., 2001). La obtención de estos productos se realiza mediante técnicas fermentativas, tanto en medio líquido como en medio sólido. La tecnología de producción mediante fermentación en sustrato sólido, si bien conocida desde la antigüedad, es una alternativa que hoy se encuentra altamente valorizada por su bajo impacto medioambiental: menor demanda de energía eléctrica, menor generación de efluentes y menor consumo de agua dulce. Además, presenta ventajas económico-operativas como disponer del producto en forma más concentrada y funcionar con equipos de baja complejidad (Viniestra-González G. et al, 2003).

El presente trabajo resulta de la interacción entre dos grupos de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL), uno especializado en tecnología de las fermentaciones y el otro en el desarrollo de metodologías analíticas y aplicación de técnicas quimiométricas.

Debido a que ambos grupos dictan cursos de grado electivos en la carrera de Licenciatura en Biotecnología, se planteó la hipótesis de que una experiencia conjunta de los alumnos que tomaran los cursos beneficiaría el proceso de enseñanza-aprendizaje de conceptos abstractos como los planteados en el ámbito de la quimiometría.

En el presente trabajo se buscó estimular el flujo transversal de los alumnos, docentes y contenidos entre diferentes cursos, más allá de la pertenencia a cada disciplina, orientándose hacia el mejoramiento de la enseñanza-aprendizaje. Este eje adquiere gran importancia en el momento actual, tanto para la enseñanza como para la investigación y el ejercicio profesional, por lo que las estrategias de trabajo deberían garantizar esta vinculación.

Desde el punto pedagógico, la estrategia se enfocó a combinar situaciones: la presentación del problema entre los docentes y posteriormente con los alumnos, el análisis entre todos los participantes, la obtención experimental de los datos por los estudiantes; todas las actividades se cerraron con un informe discutido individual y grupalmente.

Los objetivos de las actividades a desarrollar por los alumnos fueron, en primer término, la selección y optimización de los factores más importantes que influyen y permiten la maximización del proceso de producción de α -amilasa en un medio de cultivo constituido por una mezcla de arroz y maíz molidos.

El sistema propuesto es especialmente conveniente para la enseñanza a nivel de grado, ya que el microorganismo seleccionado es no patógeno, de fácil crecimiento y mantenimiento, de sencillo seguimiento en cultivos, y permite ser empleado en fermentaciones en sustrato sólido (Abdel-Fattah Y. et al., 2002). Se trata de un trabajo interdisciplinario, en que los estudiantes optimizaron las condiciones para

obtener un producto biotecnológico, utilizando las herramientas teóricas y computacionales necesarias para alcanzar el fin (Strobel. R. et al., 1999). Esto permitió que los alumnos profundizaran el manejo de muestras reales en el campo de la química, y por lo tanto se mejore el proceso de enseñanza-aprendizaje.

Organización del trabajo experimental

Se realizaron reuniones entre los docentes de ambos grupos disciplinares para analizar, reflexionar y organizar los contenidos y el cronograma del desarrollo de la experiencia. Al inicio del curso esta reunión se extendió a los alumnos, donde se planteó el tema y el aporte que realizaban ambas disciplinas (biotecnología y quimiometría), interaccionando para optimizar un proceso fermentativo. Posteriormente los alumnos, mediante el uso de la PC y programas adecuados, trabajaron en la aplicación de diseños experimentales para discutir la selección de variables, y su posterior elección. Se trabajó experimentalmente con el sistema para obtener las primeras mediciones y, con los datos obtenidos, los alumnos trabajaron nuevamente con la PC, para tomar una resolución que les permitiera volver al sistema y ajustar las variables de dichos datos. En el análisis de los resultados intervinieron todos, permitiendo entrar en la segunda fase tendiente a optimizar la función objetivo

Finalmente se realizó el ajuste de optimización en un nuevo proceso de producción y se obtuvieron los nuevos datos, sobre los que se realizaron el análisis final y el informe.

Materiales y métodos

Microorganismos y sistemas de cultivo

*Se empleó una cepa de *Aspergillus niger* perteneciente al cepario del Laboratorio de Fermentaciones de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. La misma fue provista como cultivo en estría, sobre agar extracto de malta.*

En la etapa experimental se emplearon, como medio de cultivo, mezclas de proporciones variables de arroz y maíz, en las condiciones que se detallan en Resultados y Discusión. Luego de la preparación y acondicionamiento de las distintas mezclas, se inocularon con suspensiones de conidios del hongo y se dispusieron en recipientes cilíndricos de vidrio, de 140 mm de altura, por 90 mm de diámetro y por 5 mm de espesor. El extremo abierto de cada recipiente fue cubierto con folio de aluminio. La incubación se realizó a 32 °C. Cumplido el tiempo de incubación, se procedió a la extracción de la enzima presente en cada cultivo. Para esto se

empleó, en forma proporcional a la masa del cultivo presente en el frasco, dos volúmenes de una solución de cloruro de sodio ($0,145 \text{ mol L}^{-1}$). Se separó una alícuota de 1 mL y se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 5 minutos. El sobrenadante se empleó para determinar la actividad amilásica, mediante la técnica del lugol (Abbot L. et al., 1991).

Programa estadístico

El programa estadístico utilizado fue el Design-Expert 6.0.10 (Stat-Ease, Inc, Minneapolis, USA). El mismo permite realizar los diseños experimentales y analizar los datos obtenidos una vez realizadas las experiencias.

Desarrollo de la experiencia

El diseño del experimento lo realizaron los alumnos, en conjunto con los responsables de las distintas disciplinas, y se discutieron las variables relevantes a medir. Las actividades se organizaron de manera que sean continuas las distintas operaciones para optimizar tiempo, espacio y material; por ejemplo, unos pesaron las mezclas, otros acondicionaban e inoculaban.

En el análisis de los resultados obtenidos intervinieron todos, lo que permitió, en base a los resultados obtenidos, entrar en la segunda fase tendiente a optimizar la función objetivo.

Resultados y discusión

Una optimización sistemática, en primer lugar, requiere de la selección de una función objetivo, que corresponde, en el caso de un bioproceso, a la sustancia cuya producción se quiere optimizar. El sistema estudiado produce α -amilasa conforme se desarrolla el microorganismo. Por esta razón, se eligió como función objetivo la actividad de la enzima α -amilasa, que es indirectamente una medida de la concentración efectiva.

El segundo paso consiste en identificar los factores que, se supone, influyen sobre la función objetivo seleccionada. Aquí es donde los alumnos volcaron la experiencia y conocimientos adquiridos a lo largo de su carrera, ya que se necesita tener en cuenta las variables más importantes del proceso. Luego se realiza un diseño que permita, a través de una prueba estadística adecuada, seleccionar aquellos factores que tienen un efecto significativo. En la Tabla I puede observarse el diseño de Plackett-Burman utilizado en el presente caso (Capello G. et al, 2003; Vander Hieden Y. et al., 2001). Este tipo de diseño, que presenta la característica de cíclico, permite estudiar el efecto principal de un alto número de factores con

un reducido número de experimentos. La Tabla I muestra los experimentos realizados: los signos (+) y (-) indican la codificación de los niveles superior e inferior, respectivamente, de los factores considerados. Por otra parte, la Tabla II muestra las variables utilizadas y valores inferior y superior para cada una.

Tabla I: *Diseño de Plackett-Burman utilizado para el experimento de preselección de factores*

Experimento	Variables estudiadas						Act. amilásica (U mL ⁻¹)
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	
1	1	1	1	1	1	1	0,602
2	1	1	1	-1	-1	-1	0,562
3	1	-1	1	1	1	-1	0,131
4	-1	1	1	1	-1	-1	0,246
5	-1	1	-1	1	1	1	0,180
6	1	1	-1	-1	-1	1	0,058
7	1	-1	-1	-1	1	-1	0,274
8	-1	-1	1	-1	-1	1	0,420
9	-1	-1	1	-1	1	1	0,188
10	1	-1	-1	1	-1	1	0,196
11	-1	-1	-1	1	-1	-1	0,167
12	-1	1	-1	-1	1	-1	0,091

Una vez realizados estos experimentos, la aplicación de un análisis de la varianza (ANOVA), permite extraer conclusiones respecto de la significancia o no de los factores estudiados. La prueba está basada en que la probabilidad de que las diferencias en la respuesta, originadas por los cambios introducidos en los factores, sean mayores a las que se podrían esperar por errores aleatorios (Breton R., 2003; Kellner R., 1998; Morgan E., 1995). Los resultados obtenidos al realizar la prueba estadística, permitieron eliminar los efectos con altos valores asociados de probabilidad de que los cambios observados fueran debido al azar. Así, los factores que deberían optimizarse son: la cocción del sustrato (X1), su proporción relativa (X2) y la altura del sustrato (X3).

Tabla II: Variables estudiadas en el experimento de preselección

Variable	Definición	Valor (-1)	Valor (+1)
X1	Cocción	Sin cocción	Con cocción
X2	Proporción del sustrato A: arroz; M: maíz	0,2A + 0,8M	0,8A + 0,2M
X3	Altura del cultivo	0,5 cm	5 cm
X4	Volumen de agua adicionada por cada 100 g de sustrato	30 mL	50 mL
X5	Inóculo	10 ⁵ conidios/g	10 ⁸ conidios/g
X6	Tiempo de cosecha	48 horas	72 horas

Una vez seleccionados los parámetros previamente citados, se procedió a la tercera etapa de la optimización. Una de las maneras en que se pueden obtener los valores de los parámetros que proporcionan un máximo en la actividad amilásica es la construcción de la superficie de respuesta (Cagigal E. et al, 2001; Capello, G. et al., 2003). Este método consiste en realizar una serie de experimentos según un diseño estadístico adecuado. Los diseños que se pueden utilizar son: factorial completo a tres niveles, central compuesto y diseño de Box-Behnken. En la Tabla III se muestran los niveles de los factores correspondientes al diseño central compuesto. Éste fue elegido por requerir cinco niveles de los factores y, por lo tanto, proporcionar mejores posibilidades de estudiar interacciones entre los mismos.

Tabla III: Diseño central compuesto utilizado para el experimento de superficie de respuesta (MSR)

Experimento	Variables seleccionadas para MSR				Actividad amilásica (U mL ⁻¹)
	X2 (%)	codificada	X3 (cm)	codificada	
1	88,4	-1	2,3	-1	0,137
2	60,0	-1	10,0	1	0,364
3	19,8	-1,41	5,5	0	0,469
4	31,6	1	2,3	1	0,553
5	60,0	0	5,5	1,41	0,513
6	31,6	0	8,7	0	0,560
7	88,4	0	8,7	-1,41	0,460
8	100,0	1	5,5	-1	0,485
9	60,0	1,41	1,0	0	0,443

Los resultados de la optimización se obtuvieron al ajustar la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_2 + \beta_2 x_3 + \beta_3 x_2 x_3 + \beta_4 x_2^2 + \beta_5 x_3^2 \quad (1)$$

donde se incluyen términos cuadráticos para cada factor, así como un término de interacción entre ambos. El ajuste y la derivación de la ecuación (1) permiten conocer los valores de los parámetros y los valores de los factores que proporcionan un máximo de la función objetivo. Los resultados obtenidos para la presente experiencia, considerando los valores de las variables codificados tal como están en la Tabla III, fueron: $\beta_0 = 0.56$, $\beta_1 = 0.063$, $\beta_2 = 0.046$, $\beta_3 = -0.040$, $\beta_4 = -0.074$ y $\beta_5 = -0.058$. Como puede observarse, todos los coeficientes son significativos. Este hecho se corroboró con el ANOVA, que arrojó valores de probabilidad indicativos de la significancia de todos los coeficientes de la ecuación (1). La superficie puede ser visualizada en la Figura 1, mientras que la Figura 2 muestra la gráfica de contorno para facilitar la observación de las coordenadas correspondientes al máximo de la función. Estas coordenadas corresponden a los siguientes valores: 68.1 % (P/P) de arroz y una altura del sustrato de 65,9 mm.

Figura 1

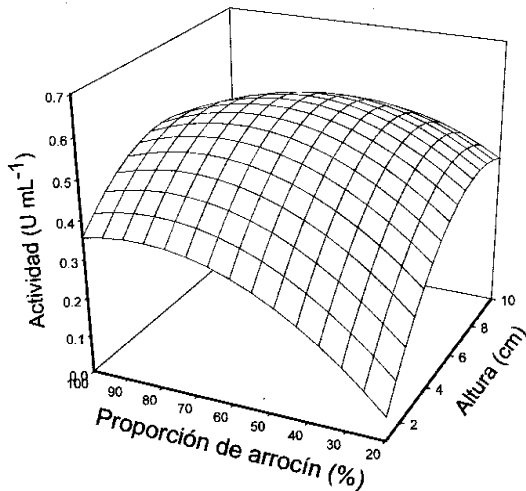
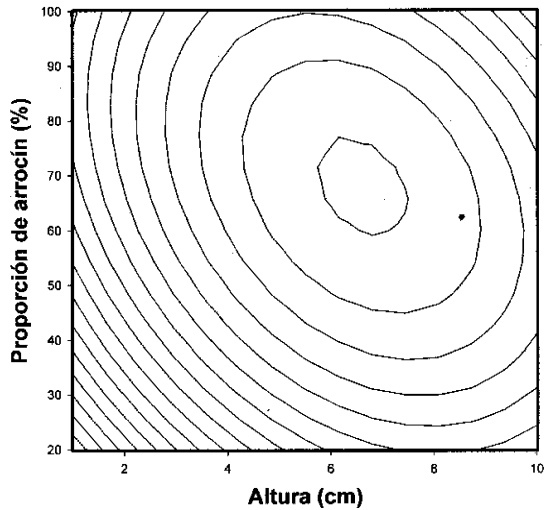


Figura 2



La amplitud de las posibilidades de la teoría y estrategias que ofrece la quimiometría supera, a veces, las posibilidades operatorias en el momento de llevar a la práctica los experimentos. Éste es un interesante desafío que requirió, por un lado, de una fuerte retroalimentación al momento de concretar las ideas y, por otro, agudizar el ingenio práctico para afrontar esas exigencias, sin sacrificar para nada los propósitos de la interrelación.

Conclusiones

1.-Es muy importante el conocimiento previo que los estudiantes han alcanzado en las asignaturas/cursos previos para la selección de los factores del sistema.

2. En la presentación del informe final y la discusión del mismo, se muestra cualitativamente el aprendizaje logrado tanto en el campo del conocimiento como en el proceso experimental, herramienta valiosa que los alumnos podrán aplicar eventualmente en el desarrollo de su tesina y, posteriormente, en su campo profesional.

3. La complementariedad interdisciplinaria alcanzada dio como resultado un conjunto de experimentos más simples, con conclusiones más precisas, rápidas y de menor costo. Esto demuestra que es muy importante instrumentar la cooperación entre diferentes disciplinas para lograr una mirada amplia, que permita organizar

estrategias adecuadas para abordar la enseñanza de temas específicos.

4. Se observó que es fundamental se constituya un equipo, bien denominado multidisciplinario. Esto significa diversidad de funciones organizadas para lograr un objetivo, para que los docentes de una carrera no trabajen en compartimentos estancos, sino formando una red y construyan entre todos un saber compartido, que beneficia especialmente al alumno.

Bibliografía

- **Abbot, L. B.; Wenger, W.C. y Lott, J.** 1991. "Enzimas", en *Química clínica. Teoría, análisis y correlación*. Kaplan, L.A. y Pesce, A.J. (eds.). Médica Panamericana, Buenos Aires.
- **Abdel-Fattah, Y. y Z. Olama.** 2002. "L-asparaginase production by *Pseudomonas aeruginosa* in solid-state culture: evaluation and optimization of culture conditions using factorial designs". *Process Biochemistry* **38**: 115-122.
- **Breton, R.** 2003. *Chemometrics. Data analysis for the laboratory and chemical plant*, Wiley, New York.
- **Cagigal, E.; L. González; R.M. Alonso y R.M. Jiménez.** 2001. "Experimental design methodologies to optimise the spectro-fluorometric determination of Losartan and Valsartan in human urine". *Talanta*, **54**: 1121-1133.
- **Capello, G.; H.C. Goicoechea; H.F. Miglietta y V.E. Mantovani.** 2003. "Teaching Chemometrics Using a Bioprocess: Systematic Optimization of Procedures". *Chem. Educator*, **8**: 371-374 (DOI 10.1333/s00897030729a).
- **Francis, F.; A. Sabu; K. Nampoothiri; S. Ramachandran; S. Ghosh; G. Szakacs y A. Pandey.** 2003. "Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*". *Biochem Eng J* **15**: 107-115.
- **Kansiz, M.; J. R. Gapes; D. MacNaughton; B. Lendl y K. C. Schuster.** 2001. "Mid-infrared spectroscopy coupled to sequential injection analysis for the on-line monitoring of the acetone-butanol fermentation process". *Anal. Chim. Acta* **438**: 175-186.
- **Kellner, R.; J. M. Mermet; M. Otto y H. M. Widmer.** 1998. *Analytical Chemistry*, Wiley-VCH (Weinheim), 759-773.
- **Morgan, E.** 1995. *Chemometrics: Experimental design*. John Wiley & Sons (Chichester), 151-188.
- **Strobel, R. y G. Sullivan.** 1999. "Experimental design for improvement of fermentation", en *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. A. Demain y J. Davies (eds.). ASM (Washington) 80-93.
- **Vander Hieden, Y.; A. Nijhuis; J. Smeyers-Verbeke; B.G.M. Vanderginste y D.L. Massart.** 2001. "Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation". *J. Pharm. Biom. Anal.*, **24**: 723-753.
- **Viniegra-González, G.; E. Favela-Torres; C. Aguilar; S. Romero-Gomez; G. Días-Godínez; y C. Augur.** 2003. "Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems". *Biochem Eng J* **13**: 157-167.