

Formulación de un medio de cultivo para la producción de pigmento a partir de *Serratia marcescens*

*Claudia María Toro Álvarez**, *Paula Andrea Patiño Naranjo**
y *Rigoberto Ríos Estepa***

(Recibido el 16 de febrero de 2001)

Resumen

Se estudiaron diferentes sustratos, como nutrientes más económicos, que favorecen la síntesis de prodigiosín con altos rendimientos, a partir del cultivo con una cepa nativa de *Serratia marcescens*. Como fuentes de carbono y nitrógeno se evaluaron almidón, gelatina, harina de maíz, harina de trigo y licor de maíz. Adicionalmente, se estudiaron peptona, sulfato, nitrato y citrato de amonio como fuentes de nitrógeno. Se encontró que con un medio de cultivo complejo, compuesto por gelatina y peptona, los niveles obtenidos en la producción del pigmento son similares a los alcanzados cuando se emplea un medio sintético más costoso, que involucra glicerol y peptona en su composición. Mediante el estudio del comportamiento del pH durante el cultivo, se demostró que la cepa empleada posee buena capacidad buffer. Finalmente, se desarrolló un diseño experimental central compuesto, con el fin de establecer las concentraciones de las fuentes de carbono y nitrógeno más adecuadas para obtener el mayor rendimiento de pigmento; se hizo un estudio cinético del proceso de biosíntesis del producto a partir de los sustratos seleccionados, para evaluar el comportamiento del cultivo en el nuevo medio y la producción de pigmento a partir de éste.

----- *Palabras clave:* prodigiosín, *Serratia marcescens*, pigmento y medio de cultivo.

Formulation of culture media for pigment production from *Serratia marcescens*

Abstract

Different substrates were studied as economical nutrients for supporting prodigiosin synthesis with high yield from the culture of a wild-type, red strain of *Serratia marcescens*. Starch, gelatin, corn flour, wheat flour and corn liquor were evaluated as nitrogen and carbon sources. Furthermore peptone and ammonium salts (nitrate, citrate and sulfate) also were studied as nitrogen sources.

* Grupo de Bioprocesos. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Antioquia.

** Profesor del Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Antioquia. rrios@udea.edu.co.

It was found that a complex media containing gelatin and peptone produces a pigment concentration similar as a synthetic media containing glycerol and peptone which is more expensive. The pH behavior was studied during the culture; it showed that the stock used has a good buffering capacity. Finally a central composite design was adopted in order to find the best concentrations of carbon and nitrogen sources. A kinetic study of prodigiosin biosynthesis was done with selected substrates in order to evaluate the behavior of the culture into the new media and the pigment production.

----- *Key words:* prodigiosin, *Serratia marcescens*, pigment and culture media.

Introducción

Los colorantes naturales se presentan como una alternativa ambiental, con aplicación en la industria textil. Así, se ha venido trabajando en la producción de prodigiosín, un pigmento rojo tripirrólico, sintetizado por la bacteria *Serratia marcescens*, como un metabolito secundario que puede ser empleado en el teñido de fibras sintéticas o naturales. La figura 1 muestra la estructura del prodigiosín.

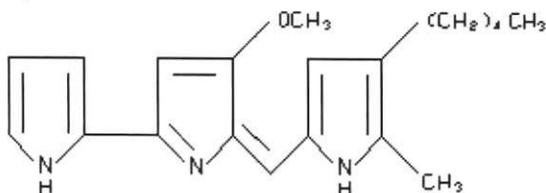


Figura 1 Estructura molecular del prodigiosín

En investigaciones previas se ha estudiado la biosíntesis de prodigiosín en el laboratorio: se han fijado las condiciones fisicoquímicas y operativas más apropiadas, se han examinado diferentes fuentes de carbono y nitrógeno y los efectos de diferentes sales sobre el cultivo [1]; se ha demostrado que los factores que más afectan el crecimiento de la bacteria y la producción del pigmento son el nivel de oxígeno disuelto, el pH, la temperatura y la composición del medio de cultivo [2].

A partir del cultivo de la cepa nativa de *Serratia marcescens* estudiada, se han obtenido 900-1.100 µg prodigiosín/ml empleando un medio de cultivo rico en glicerol y peptona [2, 3]; dichos sustratos son costosos, por lo que se restringe su utilización en un proceso fermentativo a gran escala. En este sentido, la formulación de un medio de cultivo compuesto por nutrientes de menor costo mejora la rentabilidad del proceso de producción del pigmento y hace más factible su empleo en la industria. Es así como, en esta investigación, a partir de la evaluación de diferentes sustratos como fuentes potenciales de carbono y nitrógeno, se encontró un medio de cultivo compuesto por gelatina y peptona que favorece la síntesis de prodigiosín y resulta más económico que los medios sintéticos usualmente empleados.

Materiales y métodos

Microorganismo

Se utilizó una cepa nativa pigmentada de *Serratia marcescens*, suministrada por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Antioquia. La bacteria fue aislada del ambiente e identificada mediante la evaluación de su antibiograma y de pruebas bioquímicas. La cepa se conservó a -20°C en tubos eppendorf que contenían caldo nutritivo y medio de conservación con glicerol; cada dos meses fue sembrada en agar nutritivo y mantenida a 4°C , haciendo repiques semanales.

Medios de cultivo

Los sustratos estudiados como posibles fuentes alternativas de carbono y nitrógeno fueron: almidón, gelatina, harina de maíz, harina de trigo y licor de maíz. Como fuentes de nitrógeno se evaluaron: peptona, sulfato, nitrato y citrato de amonio; estos reactivos fueron en grado analítico.

Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en matraces de 100 ml, por duplicado, en presencia de luz y con una cinética de 72 horas. Para favorecer la aireación, se empleó una relación volumen de medio a volumen de reactor: 1:5 y una agitación de 150 rpm. El pH inicial de los medios se ajustó en 7,2 y la temperatura se mantuvo entre 27 y 32°C .

El inóculo se cultivó manteniendo las mismas condiciones operativas empleadas para los cultivos en matraz y el volumen de inóculo utilizado fue 1% del volumen total del cultivo. La inoculación de los cultivos se realizó cuando la concentración de biomasa fue equivalente a 1 g/l.

La concentración de prodigiosín reportada corresponde al promedio entre los valores resultantes para el cultivo y la réplica.

Métodos analíticos

La extracción del pigmento se realizó empleando metanol acidificado, y la cuantificación se hizo

por espectrofotometría [4]. Las técnicas instrumentales empleadas para la identificación del prodigiosín fueron espectrofotometría visible-ultravioleta (Espectrofotómetro Unicam Helios α) y espectrometría de infrarrojo (Espectrómetro FTIR Mattson 5000).

Diseño experimental

A partir de los reportes bibliográficos [1, 2], se seleccionó un medio de cultivo compuesto por peptona 4 g/l y glicerol 9 ml/l de referencia para la evaluación de los diferentes sustratos como fuentes potenciales de carbono y nitrógeno.

Se desarrolló un diseño de factor único para evaluar la incidencia de la concentración de los nutrientes sobre la síntesis de pigmento, donde los factores estudiados fueron los sustratos alternativos como fuentes de carbono y la variable respuesta para cada experimento fue la concentración de prodigiosín obtenida para una cinética de 72 horas. De la misma forma, se evaluó el efecto de la concentración de peptona sobre la producción del metabolito, empleando gelatina como la fuente de carbono más adecuada. Buscando maximizar el rendimiento del pigmento se utilizó un diseño central compuesto, en el que se estudiaron como factores la concentración de la fuente de carbono y nitrógeno.

Resultados y discusión

Análisis químico del pigmento

El espectro de ultravioleta-visible (véase figura 2) muestra un pico bien definido de máxima absorbancia en 534,59 nm, el cual coincide con los reportes bibliográficos sobre la banda de absorción típica del prodigiosín en una longitud de onda de 535 nm, cuando el pigmento se encuentra en solución ácida [2, 5]. En el espectro de infrarrojo, el cual se muestra en la figura 3, se observan señales características de las estructuras resonantes y de los grupos amina, metilo y metoxi, presentes en la estructura del prodigiosín.

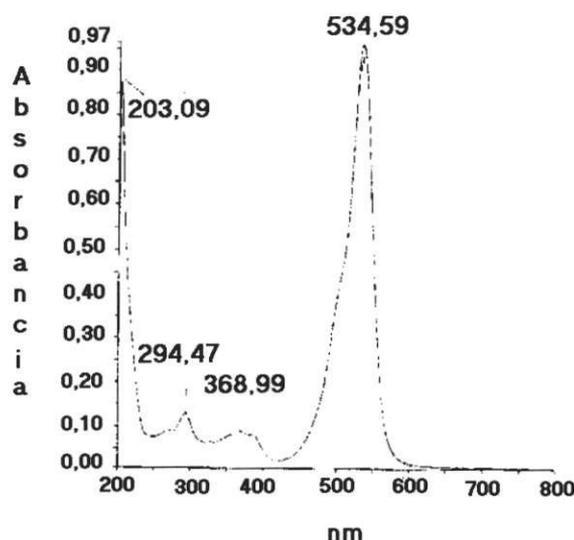


Figura 2 Análisis químico del prodigiosín. Espectro de ultravioleta-visible

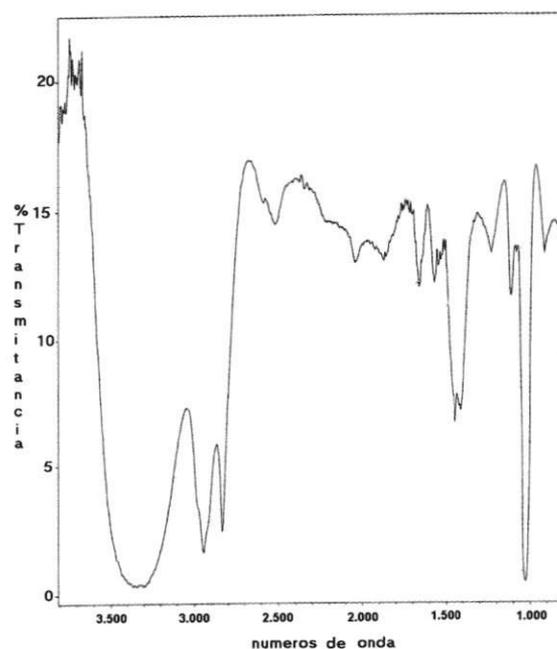


Figura 3 Análisis químico del prodigiosín. Espectro de infrarrojo

Estudio de los medios de cultivo

Sustratos alternativos como fuente de carbono

En la figura 4 se muestran los resultados del diseño experimental de factor único, realizado para

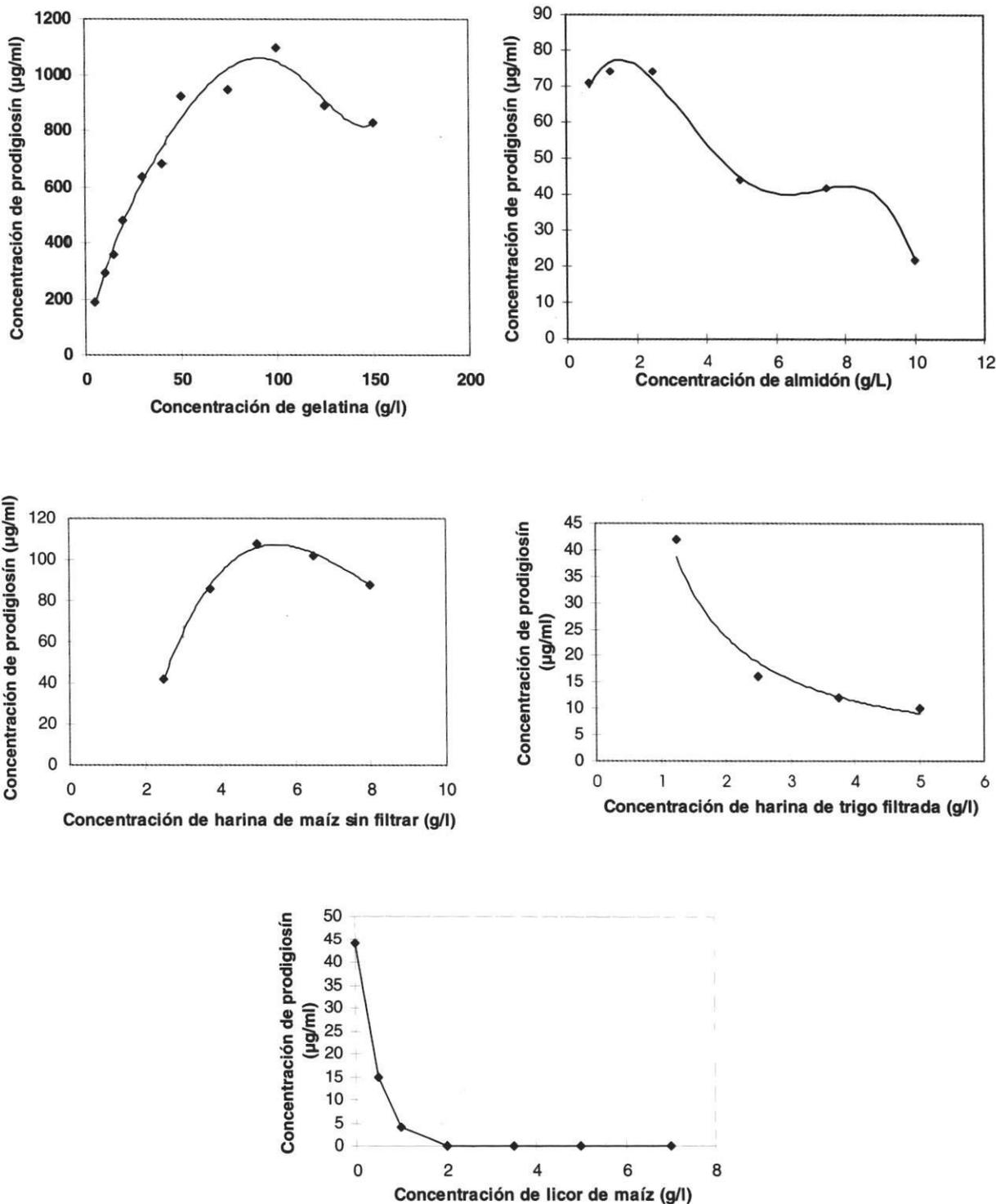


Figura 4 Influencia de la concentración de sustrato alternativo sobre la producción de prodigiosin
Fuente de nitrógeno: peptona 4 g/l, (a) gelatina, (b) almidón, (c) harina de maíz, (d) harina de trigo, (e) licor de maíz.

estudiar la incidencia de la concentración de los nutrientes alternativos como fuente de carbono sobre la síntesis del pigmento, empleando peptona en 4 g/l como fuente de nitrógeno. Los mejores rendimientos de prodigiosín se obtuvieron utilizando gelatina como fuente de carbono. En la figura 4a se observa que existe dependencia directa entre las concentraciones de metabolito producido y gelatina, hasta alcanzar una concentración de 50 g/l de sustrato, donde el rendimiento de pigmento tiende a estabilizarse. A partir de 100 g/l se presenta disminución de la concentración de prodigiosín, probablemente ocasionada por inhibición de la síntesis debida a altas concentraciones de gelatina. Con 100 g/l de gelatina se alcanza el mayor rendimiento (1.098 g prodigiosín/ml), pero dicho valor no fue reproducible dado que se alcanzó el límite de solubilidad de la gelatina y la viscosidad del medio fue muy alta, presentándose problemas de transporte de oxígeno. La cepa empleada tiene la capacidad de asimilar gelatina, dada la presencia de exoenzimas hidrolíticas producidas por la bacteria que favorecen el metabolismo de dicho sustrato.

Las harinas de maíz y de trigo presentan gran cantidad de sólidos insolubles, por tanto se hicieron ensayos para determinar si la presencia de dichos sólidos puede o no aumentar la producción de prodigiosín. Para la harina de maíz, los rendimientos de prodigiosín fueron mejores cuando los sólidos insolubles presentes en el medio no se retiraron, y en el caso de la harina de trigo, la producción de pigmento fue muy similar cuando se filtraron y cuando no se filtraron los sólidos.

Al usar almidón y harina de trigo como fuente de carbono, hubo pigmentación pero el rendimiento no alcanzó valores apreciables. Como se observa en las figuras 4b y 4d, se presenta disminución en la concentración de prodigiosín al finalizar el cultivo a medida que se incrementa la concentración de la fuente de carbono, y la máxima acumulación de pigmento se logra al emplear 1,25 g/l de sustratos alternativos en

ambos casos. El crecimiento de biomasa y la biosíntesis no son favorecidos en los medios de cultivo que contienen almidón y harina de trigo. Empleando harina de maíz como fuente de carbono se obtuvieron buenos rendimientos en la producción del pigmento, pero la concentración de prodigiosín fue significativamente menor que la lograda usando gelatina como sustrato. En la figura 4c se muestra cómo la concentración de prodigiosín aumenta, hasta alcanzar el máximo con 5 g/l de harina de maíz, y a partir de dicho valor decrece.

En la figura 4e, se evidencia que al emplear licor de maíz se inhibe la pigmentación, y a partir de una concentración de 2 g/l de este sustrato no se produce pigmento.

Sustratos alternativos como fuente de nitrógeno

La viabilidad de emplear los sustratos seleccionados como fuente de nitrógeno se evaluó utilizando glicerol en 9 ml/l como fuente de carbono. En todos los cultivos se observó poco crecimiento de biomasa, y sólo se apreció formación de producto en el medio compuesto por gelatina y glicerol, aunque el rendimiento obtenido fue muy bajo (24 g/ml). Se dedujo, entonces, que la bacteria no emplea los nutrientes alternativos como fuente de nitrógeno.

Fuentes de nitrógeno. Como fuente de carbono se utilizaron los sustratos alternativos en sus niveles más apropiados, obtenidos a partir del diseño experimental de factor único, y se probaron peptona y sales de amonio (nitrato, citrato y sulfato) como fuentes de nitrógeno. En todos los medios de cultivo que contenían sales de amonio se apreció muy poco crecimiento de biomasa, y se observó nuevamente que la presencia de gelatina favorece la síntesis del pigmento, aunque los rendimientos fueron muy bajos (50-100 g/ml) en comparación con los obtenidos al emplear peptona como fuente de nitrógeno (800-950 g/ml). Estos resultados permiten inferir que, de los compuestos estudiados como fuente de nitrógeno, sólo

la peptona es efectiva y suple los requerimientos nutricionales de la bacteria para el crecimiento y biosíntesis del prodigiosín. Además, se confirma que la fuente de nitrógeno constituye un factor importante en el proceso de producción del pigmento, como lo reportan algunos investigadores [2, 6].

Finalmente, se empleó un diseño experimental de factor único para evaluar peptona como fuente de nitrógeno, usando gelatina como fuente de carbono.

En la figura 5a se observa que el aumento en la concentración de peptona genera incremento en la síntesis de pigmento. Este comportamiento se presenta hasta 4 g/l, y a partir de este punto la producción del metabolito permanece aproximadamente invariable. Para una concentración de gelatina de 100 g/l (véase figura 5b), la concentración de producto y de peptona son directamente proporcionales hasta 6 g/l de peptona; concentraciones más altas de la fuente de nitrógeno generan una disminución de la concentración final de prodigiosín, lo cual indica, posiblemente, inhibición por acumulación de este sustrato. Aunque la acumulación de pigmento es superior cuando se utiliza gelatina en 100 g/l y peptona en 6 g/l, no es significativamente mayor que al emplear gelatina en 50 g/l y peptona en 4 g/l, como para justificar el incremento de costos que implica el

uso del medio con mayor concentración de sustrato.

Selección del medio de cultivo

A partir de un diseño central compuesto, se estudiaron las concentraciones de peptona y gelatina como factores para evaluar la interacción entre ellos y buscar la combinación de sus niveles que permitan maximizar la variable respuesta (concentración de prodigiosín). En la tabla 1 se especifican los factores y sus niveles. La tabla 2 muestra los resultados experimentales del diseño empleado, donde se consideran cuatro puntos extremos, cuatro puntos axiales y cinco repeticiones del punto central.

Tabla 1 Factores y niveles para el diseño experimental central compuesto

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
Peptona	3 g/l	5 g/l
Gelatina	50 g/l	80 g/l

A partir del análisis del tratamiento estadístico de los resultados experimentales, se define el modelo cuadrático como el más adecuado para predecir el comportamiento de la variable respuesta. En la tabla 3 se presenta el análisis de varianza (ANOVA) para dicho modelo.

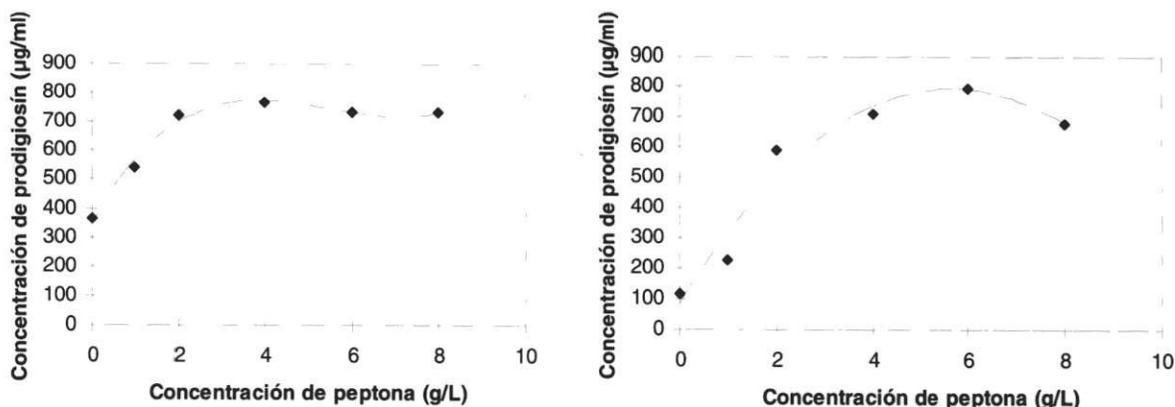


Figura 5 Influencia de la concentración de peptona sobre la producción de prodigiosín
Fuente de carbono: gelatina. (a) 50 g/l, (b) 100 g/l.

Tabla 2 Resultados experimentales para un diseño central compuesto (fuente de carbono: gelatina, fuente de nitrógeno: peptona)

<i>Experimento</i>	<i>Concentración de gelatina (g/l)</i>	<i>Concentración de peptona (g/l)</i>	<i>Concentración de prodigiosín (µg/ml)</i>
1	3,00	50,00	818,00
2	5,00	50,00	815,00
3	3,00	80,00	888,00
4	5,00	80,00	970,00
5	2,59	65,00	698,00
6	5,41	65,00	821,00
7	4,00	43,79	797,00
8	4,00	86,21	929,00
9	4,00	65,00	923,00
10	4,00	65,00	934,00
11	4,00	65,00	934,00
12	4,00	65,00	914,00
13	4,00	65,00	919,00

Tabla 3 ANOVA para el modelo cuadrático de superficie de respuesta

<i>Source</i>	<i>Sum</i>	<i>Degrees of freedom</i>	<i>Mean Square of Squares</i>	<i>F Value</i>	<i>Prob > F</i>
Model	62795,91	5	12559,18	9,56	0,0049
Residual	9197,79	7	1313,97		
Lack of Fit	8874,99	3	2958,33	36,66	0,0023
Pure Error	322,80	4	80,70		
Total	71993,69	12			

C.V. = 4,15
 $R^2 = 0,8722$

Como se observa en el ANOVA, el modelo seleccionado es estadísticamente significativo, ya que la probabilidad de que los factores no tengan efecto sobre la respuesta es de 0,49%. Los términos que tienen mayor significancia estadística son *A* (peptona), *B* (gelatina) y la interacción A^2 , lo cual

se muestra en la tabla 4. Dichos términos son los que más influyen sobre la concentración de prodigiosín, por consiguiente la ecuación del modelo queda:

$$\text{Prodigiosín} = 924,80 + 31,62A + 51,46B - 67,27A^2$$

Tabla 4 Coeficientes para cada término del modelo cuadrático

Term	Coefficient Estimate	Standard Error	t-Value	Prob > t
Intercept	924,80	16,21		
A-peptona	31,62	12,82	2,47	0,0430
B-gelatina	51,46	12,82	4,02	0,0051
A ²	-67,27	13,74	-4,90	0,0018
B ²	-15,52	13,74	-1,13	0,2959
AB	21,25	18,12	1,17	0,2794

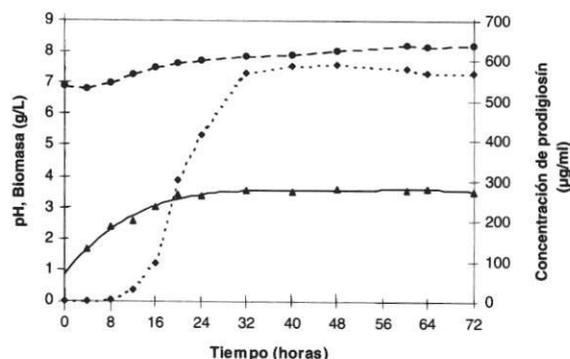
El ajuste del modelo a los resultados experimentales es del 87%, como lo indica el valor del coeficiente de correlación múltiple R^2 en la tabla 3, dicha correlación es bastante baja para maximizar la concentración de prodigiosín.

En la tabla 5, se muestran las nueve soluciones o combinaciones de las concentraciones de peptona y gelatina para maximizar la variable respuesta, que se encontraron mediante la optimización. Se espera obtener la máxima concentración de pigmento con un medio de cultivo cuya composición involucra peptona en 4,41 g/l y gelatina en 79,98 g/l. Sin embargo, los resultados de la optimización no son confiables dado que el modelo no predice la respuesta adecuadamente.

Los resultados obtenidos al realizar el seguimiento del crecimiento de biomasa, el pH y la síntesis del producto para una cinética de 72 horas se muestran en la figura 6. La cinética del crecimiento celular muestra que la etapa exponencial empieza a las cuatro horas, rápidamente, y tiene una duración de 20 horas; a partir de ese momento la concentración de biomasa tiende a estabilizarse y comienza la fase estacionaria. La síntesis de prodigiosín se inicia a las ocho horas de cultivo, y durante las primeras 16 horas la cantidad de metabolito producido es poca. La máxima producción del pigmento ocurre entre las 16 y 32 horas de cultivo, período en el cual finaliza la fase de crecimiento y se inicia la etapa estacionaria.

Tabla 5 Composición del medio de cultivo para maximizar la concentración de prodigiosín

Concentración de peptona (g/l)	Concentración de gelatina (g/l)	Concentración de prodigiosín predicha ($\mu\text{g/ml}$)
4,44	79,75	970,49
4,40	79,85	970,82
4,37	79,52	970,16
4,46	79,75	970,34
4,39	79,50	970,15
4,31	79,80	970,25
4,37	79,92	970,92
4,41	79,98	971,07
4,48	79,91	970,45

**Figura 6** Cinética de biomasa, pH y producto para un medio de cultivo con gelatina (80 g/l) y peptona (5 g/l) • pH, ▲ Biomasa, ◆ Prodigiosín.

Después de las 32 horas la concentración de pigmento sigue aumentando en forma lenta hasta las 48 horas, momento en el que la cantidad de pigmento en la bacteria alcanza su máximo valor.

En la cinética de pH se observa que en las primeras cuatro horas se presenta una leve disminución, luego incrementa lentamente y permanece estable durante las últimas dieciséis horas de cultivo. El aumento de pH se produce durante la

fase de crecimiento exponencial y el período en el que se produce el pigmento. El seguimiento de pH durante el cultivo no muestra grandes variaciones; esto demuestra que la cepa estudiada posee buena capacidad buffer, lo cual constituye una característica propia de algunas especies de *Serratia* como se referencia en diversas investigaciones [7, 8]. Otros resultados experimentales permiten concluir que la presencia de soluciones tampón en el medio causa efectos adversos sobre el cultivo de la cepa nativa utilizada, disminuyendo la producción de prodigiosín [3].

Conclusiones

En los análisis químicos hechos se identificaron grupos funcionales que hacen parte de la estructura del prodigiosín; el espectro de ultravioleta-visible muestra un pico de máxima absorbancia en 535 nm típico del pigmento. Se puede concluir, entonces, que a partir del cultivo con los sustratos estudiados y la metodología descrita se logró obtener el prodigiosín.

A partir de la evaluación de diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, se encontró un medio de cultivo alternativo que favorece la biosíntesis de prodigiosín y es más económico que los medios empleados habitualmente, dado que se reemplaza glicerol como fuente de carbono por gelatina comercial, un nutriente de bajo costo que aporta carbono y nitrógeno al microorganismo, permitiendo disminuir la concentración de peptona como fuente de nitrógeno a la mitad del nivel con el cual se han obtenido los más altos rendimientos [3].

La bacteria *Serratia marcescens* produce exoenzimas hidrolíticas que oxidan gelatina, pero que no poseen la capacidad de metabolizar almidón en cultivos sumergidos. De la misma manera, la experimentación realizada mostró que la presencia de licor de maíz en el medio inhibe la biosíntesis del pigmento.

En el tratamiento estadístico de los resultados experimentales, el modelo matemático empleado se ajusta parcialmente a los puntos del diseño central compuesto, además no predice en forma adecuada el comportamiento de la variable respuesta (concentración de prodigiosín). En consecuencia, las concentraciones de peptona y gelatina determinadas como las apropiadas para maximizar la producción del pigmento pueden variar sensiblemente, al igual que el rendimiento del producto.

Referencias

1. Rjazantseva, I. *et al.* "Effect of various growth conditions on pigmentation of *Serratia marcescens*". En: *Microbios*. Vol. 79. No. 320. pp. 155-161. 1994.
2. Williams, R. and Qadri, S. *The genus Serratia*. By A., Von Graeveniz and S. J. Rubin. Boca Ratón, Florida. CRC Press Inc. pp. 31-75. 1980.
3. Patiño P. y Toro C. *Formulación de un medio de cultivo complejo para la producción de prodigiosín a partir de Serratia marcescens*. Medellín. Colombia. Tesis de grado. Ingeniería Química. Universidad de Antioquia. 2000.
4. Millicent, C. *et al.* "Thiamine-induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosin". En: *Journal of Bacteriology*. Vol. 96. No. 3. pp. 609-616. 1968.
5. Hubbard, R. and Rimington, C. "The biosynthesis of prodigiosin, the tripyrrylmethene pigment from *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*)". En: *Biochemical Journal*. Vol. 46. No. 2. pp. 220-225. 1950.
6. Williams, R. "Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*". En: *Applied Microbiology*. Vol. 25. No. 3. pp. 396-402. 1973.
7. Rius, N. *et al.* "Buffering capacity of pigmented and no pigmented strains of *Serratia marcescens*". En: *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 60. No. 6. pp. 2.152-2.154. 1994.
8. Solé, M. *et al.* "The effect of pH on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*". En: *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 19. pp. 341-344. 1994.