

Estudio de la fermentación en condiciones batch con *Candida utilis* Y-900 en prehidrolizados químicos de meollo.

C. RAMOS, R. LÓPEZ Y L. LLERENA

*Dpto. de Fermentaciones, Centro Nacional de Investigaciones Científicas,
Ciudad de La Habana, Cuba.*

Recibido: 26 de septiembre de 1977

Recibido: 27 de abril de 1978

ABSTRACT. The growth of a *Candida utilis* strain (Y-900) in chemical prehydrolyzates from pith with 8% of reducing sugars has been studied. The growth curves in a batch fermenter at different temperatures and in the presence or absence of yeast extract, as well as the curves of reducing sugar consumption are shown. The paper chromatogram of the sugars before and after the fermentation is presented. The specific growth velocities and the duplication times were statistically calculated. A sugar consumption of 24% of the initial sugar present was obtained in 9 hours and 79% in 24 hours, showing the utilization of xylose by the strain which gave a protein content of 43%.

RESUMEN. Se ha estudiado el crecimiento de cepas de *Candida utilis* en prehidrolizados químicos de meollo al 0,8% de azúcares reductores. Se muestran las curvas de crecimiento batch para distintas condiciones de temperatura y presencia en el medio de extracto de levadura. Además se presentan las curvas típicas de consumo de azúcares y la cromatografía de prehidrolizado antes de fermentar. Las velocidades máximas de crecimiento y los tiempos de duplicación se determinaron mediante regresión lineal. Como resultados se obtuvo un consumo del 24% de los azúcares iniciales en 9 horas y 79% de los azúcares en 24 horas, señalando la utilización de la xilosa por esta cepa, cuya biomasa dio un 43% de proteína.

INTRODUCCION

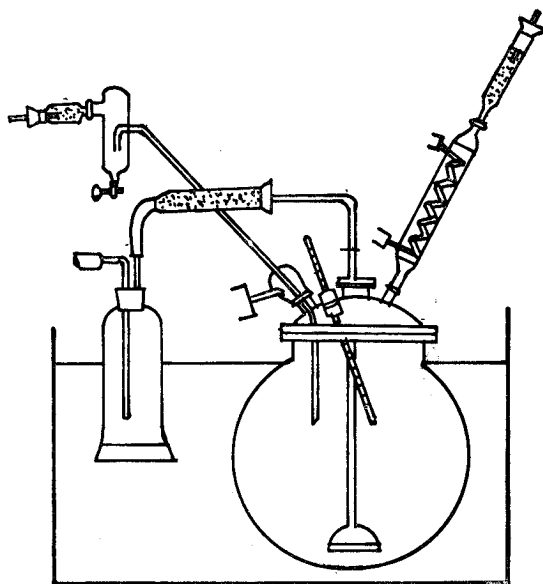
En la búsqueda de alimentos el hombre se ha dirigido a fuentes no convencionales. Estas fuentes no convencionales las constituyen principalmente los microorganismos tales como: bacterias, levaduras, hongos y algas.

A partir de los años de la II Guerra Mundial se incrementó el estudio y la aplicación de la fermentación de los hidrolizados partiendo de residuos celulósicos, para la alimentación (*Harris y cols., 1948*).

En los procesos hidrolíticos de los materiales celulósicos se aprovechan distintos tipos de estos desperdicios como son: madera, tallos de maíz, etc. La factibilidad del aprovechamiento del bagazo y el meollo en Cuba ha sido estudiada en el CENIC (*López, 1975*) y el ICIDCA (*Ocampo, 1973*).

El meollo (tejido parenquimatoso que constituye del 20 al 30% del bagazo) es un residuo producido en las fábricas de papel, por lo que la obtención de prehidrolizados químicos es factible y con perspectivas económicas para nuestro país.

En el presente trabajo se realiza un estudio del comportamiento de la cepa Y-900 *Cándida utilis* en condiciones batch, hallando el mejor rango de los parámetros: temperaturas y concentración de extracto de levadura.



Gráf. 1

MATERIALES Y METODOS

La fermentación se realiza en un fermentador de vidrio de dos litros de volumen efectivo, agitado por aire e introducido en un baño a temperatura constante, como se muestra en el Gráfico 1. Se pone un frasco con agua a la entrada del aire para reducir la vaporización en el fermentador y un condensador a la salida del aire. La frita porosa usada como difusor del aire, fue del tipo G-3.

Crecimiento directo con levaduras.

Las cepas para inocular se siembran con 48 horas de antelación en un medio hidrolizado. Se tuvo cuidado de que el inóculo sea lo más uniforme posible $10^7 \frac{\text{cel}}{\text{mil}}$. Las cepas corresponden a las levaduras *Cándida útilis* Y-900.

Técnica de pretratamiento.

El prehidrolizado fue obtenido por la acción del H_2SO_4 al 1% en condiciones estáticas a 2 atmósferas de presión y a temperatura de 134°C durante 230 minutos, correspondiendo este tratamiento a la hidrólisis de las hemicelulosas (López, 1974).

Obtenida la miel hidrolítica se lleva a pH 5.8 aproximadamente con NH_4OH , posteriormente se centrifuga el precipitado formado y se esteriliza. Luego se clarifica con carbón activado, se filtra por tierra infusoria y se esteriliza por filtro milipore.

La composición del prehidrolizado determinada mediante cromatografía de papel, elución de las manchas y análisis de los reductores mediante el método de Somogyi (1945) y Nelson (1944) fue:

Xilosa	} 90%	Glucosa	} 10%
Arabinosa		Galactosa	

lo cual se muestra en la Fig. 1.

El furfural final fue de 55 mg/100ml por el método de Jones.

El furfural tiene una acción inhibidora del crecimiento de la levadura y su concentración no debe pasar de 50 mg/100 ml. (Gregr, 1972)

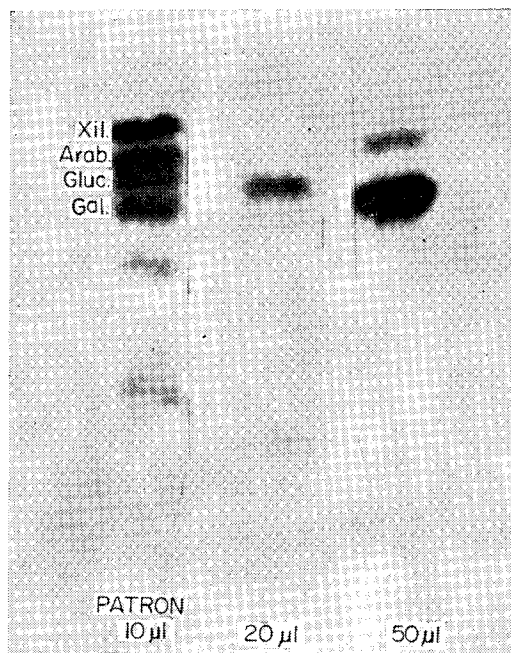


Fig. 1. Cromatografía del Hidrolizado.

Determinación del crecimiento.

La concentración celular fue seguida turbidométricamente en un fotocolorímetro a 660 nm y por conteo directo al microscopio mediante cámara de Thomas.

El consumo de azúcares se mide por el método de Schoorl (*Bates, 1942*) y pentosas por el de Jones, (*1961*).

El medio se constituye con la adición de distintos nutrientes.

En estudios anteriores se ha visto que el medio posee gran cantidad de sales minerales que no son necesarias añadirlas (*Sánchez y López, 1973*).

Composición de los nutrientes: Urea 0,3 g/litro $\text{Po}_4\text{H}_2\text{Na}$ 2,042 g/litro y extracto de levadura 0,5 g/litro.

El resultado del análisis de proteína se da como $\text{N} \times 6,25$, determinado por el método de Kjeldahl.

Para determinar el flujo de aire óptico se aplicó el método del sulfito (*Cooper y cols., 1944*) el cual dio 400 l/h.

Tratamiento matemático.

Para esta cepa se desarrolló el plan factorial 2^2 manteniendo constantes: flujo de aire 400 l/h, concentración inicial de reductores 0,8 g/100 ml y pH 5,5-6.

Las variables fueron: Temperatura y adición o no de extracto de levadura. Las experiencias se representan en la matriz experimental D.

$$D = \begin{array}{cc} \begin{array}{c} T \\ X_1 \end{array} & \begin{array}{c} \text{Ext.} \\ X_2 \end{array} \\ \left\{ \begin{array}{cc} -1 \text{ (30°C)} & -1 \\ -1 \text{ (33°C)} & -1 \text{ (no)} \\ -1 & 1 \text{ (si)} \\ 1 & 1 \end{array} \right\} \end{array}$$

Se ajustó un modelo matemático del tipo:

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_{12}$$

donde: y : valor de los resultados que serán las velocidades específicas máximas de crecimiento (μ max).

Los valores de μ max se hallaron ajustando los puntos de la fase "log" de la curva de crecimiento por regresión lineal, obteniéndose de la pendiente de dicha recta el valor buscado, la varianza y el coeficiente de correlación lineal. Con los cuatro valores de μ max correspondientes a las experiencias del plan factorial se procede a calcular los coeficientes del modelo mediante el sistema matricial usual para este plan (*Bacon y Honson 1971; Köllner, 1971*).

RESULTADOS Y DISCUSION

En materiales y métodos se hizo referencia a la formación de un precipitado oscuro en la neutralización del prehidrolizado lográndose su

parcial eliminación por centrifugación. Durante la fermentación volvía a aparecer el precipitado, lo que se muestra en algunas de las curvas de crecimiento seguidas por densidad óptica en la primera y segunda horas de fermentación. La presencia de este precipitado se señala en la literatura (*Grondal, 1945*). Este interfiere el crecimiento cuando se presenta grandes cantidades lo que hace que destruya las cepas. Además falseaba los análisis por masa seca y las lecturas por D.O., que nos llevó a seguir la fermentación por conteo directo en cámara de Thomás, teniendo en cuenta los errores de este método.

Se proyecta hacer un estudio del precipitado para conocer su naturaleza así como su influencia en la fermentación y su posible eliminación.

Para tratar de eliminar cualquier fenómeno de coloración en el prehidrolizado se le da un tratamiento con carbón activado y térmico que en todos los casos fue el mismo. No obstante se observan distintos valores de densidad óptica del prehidrolizado en el momento de la inoculación.

En la Fig. 2 se muestra una curva de crecimiento siguiendo por conteo en el microscopio y densidad óptica, se observa además el consumo de azúcares reductores. Curvas análogas fueron obtenidas para cada experimento, las cuales fueron crecidas durante 10 horas, o sea la primera etapa del crecimiento.

Cuando las fermentaciones se mantenían durante 24 horas, aparecía alrededor de las 10 horas un escalón, o sea, la velocidad de crecimiento comenzaba a disminuir para luego volver a aumentar y permanecer constante de nuevo, dando una segunda velocidad de crecimiento. Este comportamiento puede estar relacionado con el consumo de los distintos azúcares que constituyen el prehidrolizado.

El consumo de azúcares reductores para la primera etapa (10 horas) promedia 24%, el consumo para la fermentación a las 24 horas promedia 75%, llegando a consumir 81% en 30 horas, siendo estos valores buenos para el consumo de reductores.

Desarrollo del plan experimental 2^a

En las Figs. 3-6 se muestran la primera etapa de crecimiento de la levadura. Cada curva corresponde a un punto del plan experimental con

su repetición. Se muestran los valores de conteo y densidad óptica. La determinación del polinomio se hará por los pendientes del conteo al microscopio. Los valores vienen resumidos en la Tabla I.

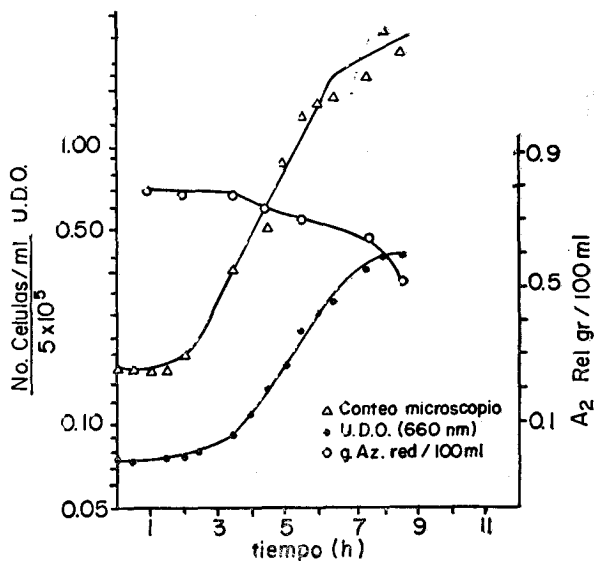


Fig. 2. Fermentación de prehidrolizados químicos *Candida utilis* Y-900, sin extracto, 33°C.

TABLA I

Condiciones		Corrida I			Corrida II			Promedio
x_1	x_2	Y_{i1}	S	r	Y_{i2}	S	r	Y_i
-1	-1	0.3466	0.001	0.998	0.2569	0.0103	0.9985	0.3017
1	-1	0.5560	0.0847	0.9609	0.3621	0.0382	0.9944	0.4590
-1	1	0.5945	0.0915	0.9698	0.3719	0.0175	0.9988	0.4832
1	1	0.2434	0.010	0.9984	0.3725	0.030	0.9886	0.3079

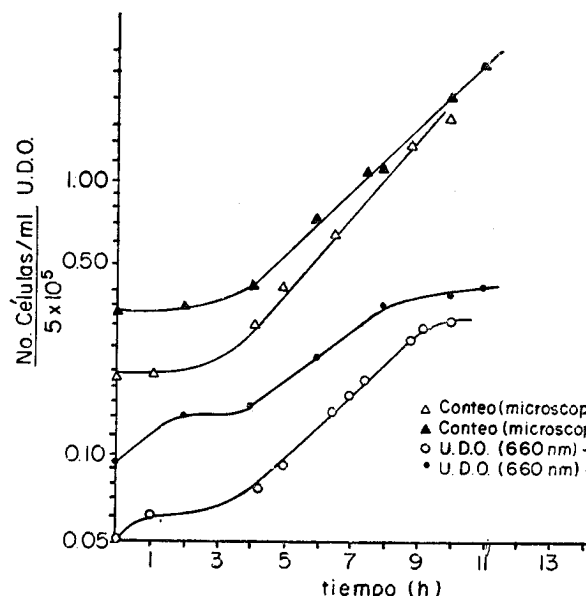


Fig. 3. Fermentación de prehidrolizados químicos *Candida utilis* Y-900, 30°C, sin extracto.

Haciendo uso de las repeticiones se calculó la desviación standard de las ocho corridas dando: $S_{b_1} = 0,06$.

El error experimental es del orden de la segunda cifra por lo tanto los valores de "y" con más de dos cifras no son significativos, por lo que se tomarán los valores redondeados hasta la segunda cifra, además los coeficientes b_1 , b_2 son menores que su error llegando a la conclusión que ni la temperatura, ni la presencia de extracto de levadura en el medio son significativos. El valor de b_{12} es ligeramente mayor al error aunque no es distinto con un 95% de confianza, es evidente que el aumento de la concentración de extracto provoca un ligero aumento en la velocidad específica de crecimiento.

El valor promedio de μ_{\max} para la cepa en el rango de 30-33°C y 0.5 g/l de extracto de levadura es de: 0.38 h^{-1} para un tiempo de duplicación de: 2,57 h.

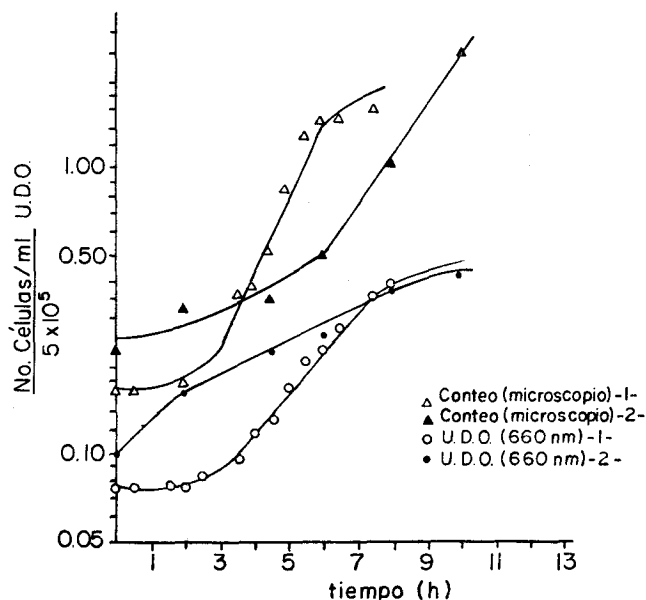


Fig. 4. Fermentación de prehidrolizados químicos *Candida utilis* Y-900, 33°C, sin extracto.

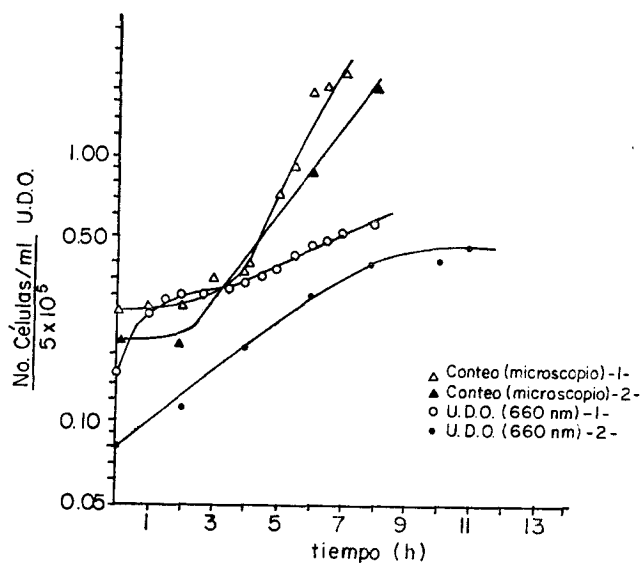


Fig. 5. Fermentación de prehidrolizados químicos *Candida utilis* Y-900, 33°C, con extracto.

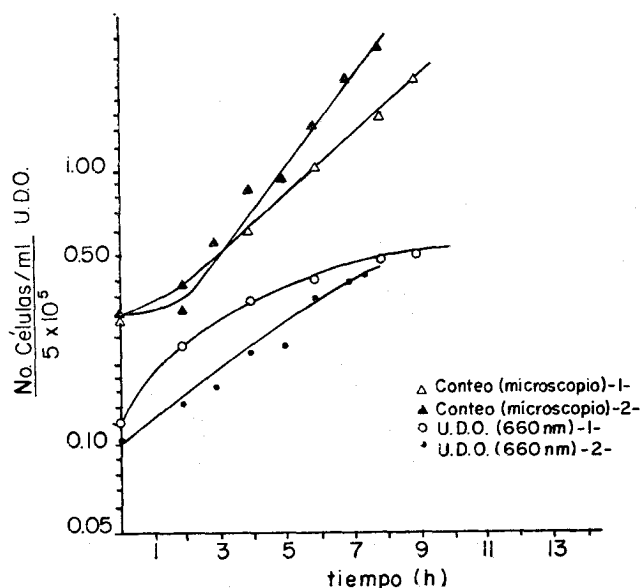


Fig. 6. Fermentación de prehidrolizados químicos *Candida utilis* Y-900, 33°C, con extracto.

CONCLUSIONES

La cepa crece en prehidrolizados químicos de meollo consumiendo los azúcares presentes en un 75% en 24 horas y dando la biomasa 42,7% proteína.

Se presentó en el crecimiento un escalón que se proyecta estudiar en otro trabajo.

La cepa Y-900 dio un valor de velocidad máxima de crecimiento de $0,38 \text{ h}^{-1}$ con un tiempo de duplicación de 2,57 h.

El plan experimental desarrollado demostró que ni la temperatura, ni la concentración de extracto de levadura son significativos con un 95% de confianza.

Se recomienda ampliar el rango de temperatura y tratar de no considerar la presencia de extracto de levadura por razones económicas, así como trabajar a pH menores para mejor esterilidad.

Se debe estudiar el precipitado formado y su forma de eliminación para obtener mejores valores de rendimiento.

REFERENCIAS

- BACON D. W. AND HENSON T. Statistical Design and Model Building. Dept. of Chem. Eng. University Ontario Canadá, 1971.
- BATES F. AND ASSOC. Polarimetry, Saccharimetry and Sugars C 440 Nat. Bureau of Standards. U.S. Gov. Wash., 1942.
- COOPER C. M., FORNSTROM G. A. AND MILLER S. A. *Ind. Eng. Chem.* 36, 504, 1944.
- GREGG B. 40ta. Conferencia de la ATAC, 1972.
- GRONDAL B. AND BERGER W. *Chem. Met. Eng.* 52, 6, 1945.
- HARRIS E. E., SAEMAN J. F. AND MARGUARAT R. R. *Industrial and Eng. Chem.* 40, 7, 1948.
- JONES H. L. *TAPPI*, 44, 10, 1961.
- KÖLLNER H. Planificación de experimentos en la Ing. Química *Serie 6*, No. 7, 1971.
- LÓPEZ R. Tesis de Candidatura CENIC, Univ. de la Habana, 1975.
- LÓPEZ R. Est. Cinético de la prehidrólisis del meollo. 1era. y 2da. parte VII Conf. de Química de Oriente Univ. de Oriente, Dic. 1974.
- NELSON N. J. *Biol. Chem.* 153, 315, 1944.
- OCAMPO G., TRIANA C. Y AGUILAR G. El bagazo materia prima para la producción de celulosa y derivados ICIDCA, 1973.
- SÁNCHEZ O. Y LÓPEZ R. IV Sem. Científico del CENIC. Dic. 1973.
- SOMOGYI M. J. *Biol. Chem.* 160, 61, 1945.