

Selección de las cepas de levaduras crecidas en hidrolizados enzimáticos de bagazo de caña

L. LARA

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

Recibido: 6 de noviembre de 1980

ABSTRACT. 8 yeast strains were chosen to carry out the selection for SCP production from the enzymatic hydrolisates of the cellulosic wastes. The cellular yields and their specific growth rates were taken as basic parameters for the yeast selection. Previous to this choice, an Experimental Design with two controlled factors and two levels for each microorganism was developed. With the aim of comparing each microorganism in their best growth conditions. The tested temperatures were 30 and 37°C and the pH were 4 and 5. As carbon and energy source, enzymatic hydrolisates from sugar cane bagasse were used. The yeast strain S₆ (it was isolated in our laboratory, was chosen, which can grow at moderately high temperature and relatively low pH, important factors as them diminishes the contamination risks and simplifies the cooling system at the industry. This yeast has a good protein content and aminoacids balance.

RESUMEN. Se escogieron 8 cepas de levadura para hacer la selección con vistas a la producción de proteínas a partir de hidrolizados enzimáticos de desechos celulósicos. Como parámetros básicos se escogieron el rendimiento celular y la velocidad específica de crecimiento. Previamente se desarrolló un Diseño de Experimentos con 2 factores controlados y 2 niveles con el objetivo de comparar a cada microorganismo en sus mejores condiciones de crecimiento. Las temperaturas probadas fueron 30 y 37°C y los pH, 4 y 5. La fuente de carbono utilizada fue hidrolizado enzimático de bagazo de caña. Se escogió la cepa de levadura S₆ (aislada en nuestro laboratorio) la cual puede crecer bien a temperaturas moderadamente altas y pH relativamente bajos, importantes factores para eliminar riesgos de contaminación y simplificar el sistema de enfriamiento a la industria. Esta levadura tiene un buen contenido de proteínas y buen balance de aminoácidos.

INTRODUCCION

La disponibilidad de grandes cantidades de bagazo, meollo y otros desechos o subproductos de la caña de azúcar y la necesidad de encontrar

fuentes económicas y abundantes de proteínas con las cuales poder contribuir a la alimentación de nuestra masa ganadera, han motivado que se realicen estudios con fines de obtener proteína microbiana utilizando estos desechos. Una vía factible es la hidrólisis de los materiales celulósicos, producida por la acción de las enzimas con el fin de descomponer los polisacáridos obteniendo un hidrolizado con azúcares de bajo peso molecular, capaz de ser fermentado por micro-organismos que sintetizen proteína de alta calidad con elevados rendimientos. En este trabajo se estudia la factibilidad de utilizar los hidrolizados enzimáticos de bagazo de caña para utilizarlo como fuente de energía en el crecimiento de levaduras forrajeras.

Se escogieron ocho cepas con buenas características de crecimiento para realizar la selección, tomando como parámetros básicos el rendimiento celular obtenido con relación a su asimilación de los azúcares en solución y a sus velocidades específicas de crecimiento máximas, pero previa a la selección se desarrolló un plan con dos factores, controlados y dos niveles para cada micro-organismo.

Los factores analizados fueron temperatura y pH.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron para la selección ocho cepas de levadura:

S₁, S₂, S₃, S₄ y S₆; estas cepas de levadura fueron aisladas para el estudio.

S₅; *Candida utilis* 192. Fue donada por el Dpto. de Química de las Fermentaciones y Tecnología. Instituto Superior de Química y Tecnología. Praga, Checoslovaquia.

Y₉₀₀; procede a la colección de cultivos del Consejo Nacional de Investigaciones. Canada.

YE₁₁₁₁₀; es un mutante enriquecido en metionina, un 75% en relación a la cepa original Y₉₀₀, desarrollado por el Dpto. de Genética del CENIC. Habana, Cuba.

El hidrolizado enzimático fue utilizado en este estudio como única fuente de carbón y energía (75% de los azúcares reductores presentes es glu-

cosa), completándolo con el medio de sales descrito por Ghose (1969), y modificado en este trabajo en base a las necesidades de crecimiento de las cepas de levaduras probadas. La composición del medio (g/l) fue la siguiente:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,4; KH_2PO_4 , 1,8; $(\text{NH}_3)_2\text{CO}$, 2,8; CaCl_2 , 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6; extracto de levadura 0,1. Para la esterilización se utilizó una autoclave a 121°C durante 10 minutos, posteriormente el medio fue suplementado con 50 ml de una solución estéril de trazas de elementos. La composición de elementos (mg/l) fue la siguiente: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,8; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5. Los cálculos se realizaron considerando un 55% de rendimiento celular. La composición celular que se tomó fue: 8% de nitrógeno, 4% de P_2O_5 y 0,6 de MgO . Para los cálculos se consideró 30 g de azúcares en el medio. Como parámetros básicos para la selección fueron escogidos el rendimiento celular y la velocidad específica de crecimiento.

Previo a esta selección fue desarrollado un Plan Factorial con dos factores controlados y dos niveles (Bacon and Henson, 1971; López Planes, 1975) para cada microorganismo, con el objetivo de comparar a cada uno en sus mejores condiciones de crecimiento.

Los factores controlados fueron la temperatura y el pH:

EXPERIMENTO	TEMPERATURA	pH
1	30	4
2	37	4
3	30	5
4	37	5

Se utilizó el método estadístico *t* de Student para comparar los valores promedios de la velocidad específica de crecimiento.

Para el crecimiento de la levadura se utilizó una zaranda rotatoria marca INFORS AG-CH-4015 BASEL, RFA.

Se prepararon corridas duplicadas con 50 ml de medio líquido en cada erlenmeyer de 500 ml, con tubos nefelométricos laterales, para facilitar la lectura de densidad óptica.

Se realizaron curvas de D.O. vs conteo en placa, D.O. vs conteo de cámara de Thomas, para cada micro-organismo con el objetivo de seguir el crecimiento por densidad óptica.

Se tuvo especial cuidado en que los inóculos tuvieran la misma cantidad de células (10^6 células/ml).

Determinaciones analíticas

Los azúcares reductores por el método colorimétrico de Somogyi (1974), Nelson (1952), para el % de proteínas se usó el método de Biuret (Norris, 1971). Para la composición de amino ácidos de la proteína se usó un analizador de aminoácidos inglés. La concentración de azúcares reductores (como glucosa) se determinó por el método de la glucosa-oxidasa (Alonso, 1971).

RESULTADOS

El análisis de las ocho cepas de levaduras dieron los siguientes resultados. En la Fig. 1 (a) (b) (c) (d), aparece graficado el logaritmo de concentración celular en relación al tiempo de fermentación durante la fase exponencial (desplazada para que comiencen en el origen) para cada cepa a las diferentes condiciones planteadas en el Diseño Factorial.

En la Tabla I, aparecen las velocidades específicas de crecimiento logarítmico y los rendimientos obtenidos en relación al sustrato utilizado así como sus desviaciones standards de cada cepa de levadura estudiada, para las diferentes condiciones del plan experimental.

En la Tabla II, aparecen los coeficientes del polinomio obtenido para cada cepa, así como también la varianza experimental global y el doble de la desviación standards de los coeficientes. Este último se empleó para determinar los términos significativos del polinomio con un 95% de confianza.

Del estudio de los valores de los coeficientes en las figuras se puede observar lo siguiente:

Cepa de levadura S₁

Se favorece el crecimiento celular, lo mismo, analizado por sus velocidades específicas de crecimiento (μ) que por los rendimientos obtenidos, cuando se trabaja con la menor temperatura y el más bajo valor

de pH (30°C y pH de 4), por tener signos negativos los coeficientes que acompañan a x_1 y a x_2 , siendo más importante el efecto del pH dado al valor del coeficiente de x_2 en relación con el de x_1 . Por último el término de la interacción es no significativo, por lo tanto, aunque cada variable por separado actúa sobre la μ y los rendimientos alcanzados, el efecto de su interacción no es apreciable.

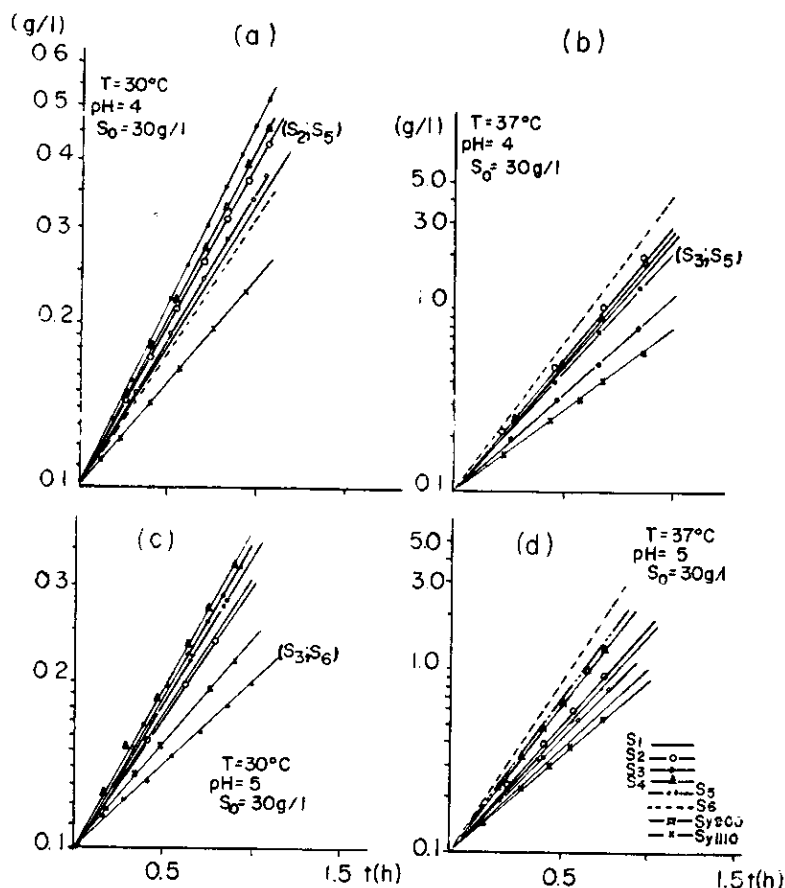


Fig. 1. Logaritmo de la concentración celular en relación al tiempo de fermentación de las 8 cepas a las diferentes condiciones de crecimiento. La concentración de azúcares reductores inicial fue de 30 g/l.

a) 30°C y pH = 4; b) 37°C y pH = 4; c) 30°C y pH = 5; d) 37°C y pH = 5

TABLA I

Velocidades específicas de crecimiento y rendimientos celulares así como sus correspondientes desviaciones standards para cada cepa de levadura a las diferentes condiciones de crecimiento

Exp.	$\frac{S_1}{\mu}$	$\pm S$	$\frac{S_2}{\mu}$	$\pm S$	$\frac{S_3}{\mu}$	$\pm S$	$\frac{S_4}{\mu}$	$\pm S$	$\frac{S_5}{\mu}$	$\pm S$	$\frac{S_6}{\mu}$	$\pm S$	$\frac{S_{y900}}{\mu}$	$\pm S$	$\frac{S_{y1110}}{\mu}$	$\pm S$
1	0,36	0,028	0,43	0,018	0,51	0,052	0,46	0,005	0,43	0,027	0,34	0,020	0,38	0,007	0,26	0,011
2	0,25	0,035	0,30	0,035	0,21	0,060	0,28	0,020	0,11	0,022	0,42	0,016	0,14	0,013	0,08	0,013
3	0,31	0,028	0,30	0,028	0,20	0,042	0,38	0,020	0,34	0,035	0,20	0,014	0,36	0,006	0,24	0,010
4	0,08	0,032	0,16	0,016	0,14	0,057	0,19	0,015	0,21	0,017	0,30	0,014	0,10	0,014	0,07	0,014

Exp.	$\frac{S_1}{\bar{Y}_{x/s}}$	$\pm S$	$\frac{S_2}{\bar{Y}_{x/s}}$	$\pm S$	$\frac{S_3}{\bar{Y}_{x/s}}$	$\pm S$	$\frac{S_4}{\bar{Y}_{x/s}}$	$\pm S$	$\frac{S_5}{\bar{Y}_{x/s}}$	$\pm S$	$\frac{S_6}{\bar{Y}_{x/s}}$	$\pm S$	$\frac{S_{y900}}{\bar{Y}_{x/s}}$	$\pm S$	$\frac{S_{y1110}}{\bar{Y}_{x/s}}$	$\pm S$
1	43,2	1,95	45,5	1,80	31,3	1,70	45,6	1,91	41,1	2,00	33,5	1,90	45,2	1,60	40,2	1,90
2	33,1	2,10	31,2	1,04	25,1	1,50	28,4	1,74	32,5	1,90	45,1	2,10	22,6	1,41	15,1	1,71
3	22,3	2,07	32,4	2,00	20,3	1,40	39,4	1,71	39,6	1,75	28,3	2,00	17,1	1,02	16,4	1,69
4	10,3	2,14	15,3	1,76	5,80	2,30	25,6	1,40	28,1	1,71	33,4	2,06	12,1	1,72	12,2	1,62

TABLA II

Coefficientes de la ecuación polinomial obtenida al aplicar el Plan Factorial 2² para cada cepa de levadura, y el doble de sus correspondientes desviaciones standards, así como la varianza experimental global para cada cepa

	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S _{y900}	S _{y1110}
S _y ²	9,61.10 ⁻⁴	5,76.10 ⁻⁴	2,92.10 ⁻⁴	2,25.10 ⁻⁴	6,25.10 ⁻⁴	2,56.10 ⁻⁴	1,00.10 ⁻⁴	1,44.10 ⁻⁴
2S _b	0,031	0,024	0,054	0,015	0,025	0,016	0,010	0,012
b ₀	0,250	0,294	0,265	0,327	0,273	0,315	0,245	0,210
b ₁	-0,085	-0,067	-0,090	-0,092	-0,113	0,045	-0,125	-0,040
b ₂	-0,550	-0,067	-0,095	-0,042	-0,030	-0,065	-0,015	-0,040
b ₁₂	-0,030	-0,002	-0,060	-0,002	-0,047	-0,005	-0,005	-0,050

	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S _{y 900}	S _{y 1110}
S _y ²	4,264	2,722	2,958	2,856	3,385	4,06	2,102	2,993
2S _b	2,065	1,650	1,720	1,690	1,840	2,015	1,45	1,73
b ₀	27,23	31,05	20,63	37,25	37,85	35,08	24,25	20,28
b ₁	-5,53	-7,80	-5,18	-10,25	-7,53	4,18	-6,90	-7,33
b ₂	-10,93	-7,20	-5,58	-4,75	-6,48	-4,23	-9,65	-6,68
b ₁₂	-0,48	-0,75	-5,08	3,35	1,78	-1,63	4,40	5,23

Cepa de levadura S₂

El análisis matemático de los coeficientes del polinomio indica que es recomendable para obtener una μ y rendimiento celular mayores, trabajar con los menores valores de temperatura y pH (30°C y pH de 4); los coeficientes x_1 y x_2 dan con signo negativo, no observándose efecto de interacción entre ambas variables.

Cepa de levadura S₃

Al trabajar con esta cepa deben utilizarse también, la menor temperatura y pH (30°C y pH de 4).

En este caso el coeficiente que acompaña al término de la interacción es significativamente mayor que dos veces la desviación standard del coeficiente, por lo que no puede despreciarse, esto indica que el efecto de interacción entre la temperatura y el pH, aunque pequeño debe considerarse.

Cepa de levadura S₄

Al trabajar con esta cepa deben utilizarse también, la menor temperatura y pH (30°C, pH = 4), pero al ser el valor del coeficiente de x_1 el doble del coeficiente de x_2 indica que tiene un mayor efecto la temperatura. No se observa efecto de interacción entre la temperatura y el pH.

Cepa de levadura S₅

Es de destacar que el efecto de la temperatura es mayor que el del pH, siendo recomendable utilizar los valores menores para ambos (30°C y pH = 4). No debe despreciarse el efecto de la interacción entre las dos variables.

Cepa de levadura S₆

En este caso, se debe emplear la mayor temperatura y el menor pH (37°C y pH = 4). No se observa efecto de interacción entre ambas variables.

Cepa de levadura S₉₉₀

De acuerdo al análisis del polinomio obtenido se recomienda trabajar con la menor temperatura, pero con el valor más alto de pH (30°C y pH de 5), no existiendo interacción entre el pH y la temperatura.

Cepa de levadura S₉₁₁₀₀

En este caso, también debe trabajarse con la menor temperatura y el valor más alto de pH (30°C y pH = 5). El no poderse simplificar el término del polinomio que representa la interacción, su efecto es de considerar.

DISCUSION

Cuando se compararon las 8 cepas, se eliminaron inicialmente la S_1 la S_{900} y la cepa S_{1100} , que fueron las que más pobres resultados reportaron a sus mejores condiciones de crecimiento.

Posteriormente se eliminaron las cepas S_2 y S_5 pues tanto sus velocidades específicas de crecimiento logarítmico, como sus rendimientos, no daban valores significativamente superiores a la cepa S_6 , sin embargo, esta última tiene sus mejores condiciones de crecimiento a 37°C o mayor y pH de 4, lo que es una gran ventaja desde el punto de vista del gasto de agua en el sistema de enfriamiento en una instalación industrial y evitar riesgos de contaminación.

La cepa S_1 también fue eliminada por los bajos rendimientos que se alcanzaron, tomando en cuenta que el principal objetivo es la producción celular.

Cuando se compararon mediante el test de Student las dos cepas restantes, es decir la S_4 y S_6 , se pudo observar que ambas cepas no presentan diferencias en relación a los rendimientos obtenidos. Al considerar sus velocidades específicas de crecimiento (μ), se reportó que la cepa S_4 , aunque su μ era solo ligeramente superior mostraba diferencias significativas. Después de un análisis más integral, que incluyó sus contenidos de proteínas y su composición de aminoácidos se decidió continuar los trabajos sólo con la cepa de levadura S_6 , en base a los siguientes factores:

Con ambas se obtienen rendimientos semejantes y no existen diferencias grandes en las μ alcanzadas por las dos cepas.

Sin embargo, con la S_6 se puede trabajar a temperaturas altas, factor importante en un país tropical como es Cuba, y aún pueden mejorarse los valores de μ , elevándose la temperatura, de acuerdo al diseño estadístico. Pero en el caso de la cepa S_4 ya no es práctico bajar más la temperatura para obtener mejores valores de U , como indica el diseño estadístico (menos de 30°C).

Ambas presentan un % de proteína semejante, pero la cepa S_6 tiene una mejor proporción de los aminoácidos esenciales (Tabla III).

TABLA III

Composición de aminoácidos (g/100 g de proteínas) de la cepa de levadura S₆ a 37°C, pH de 4 y una concentración inicial de azúcares de 30 g/l. También se reporta su Score Químico

ESENCIAL	
Lisina	6,90
Treonina	5,10
Valina	4,95
Metionina	1,42
Isoleucina	4,70
Leucina	6,57
Fenilalanina	4,70
Triptófano	1,55
NO ESENCIAL	
Alanina	6,09
Arginina	5,07
Cistina	1,05
Prolina	3,95
Serina	4,85
Tirosina	3,30

Score químico (metionina limitante): 64,55

(FAO,1965, proteína como standard)

(a) Método de Biuret

CONCLUSIONES

Después de realizado el diseño estadístico con cada cepa de levadura para determinar a qué condiciones era más favorable compararla y realizar la selección, se escogió la cepa de levadura S₆, pues puede alcanzar valores altos en sus velocidades específicas de crecimiento y en los rendimientos celulares, trabajando a pH de 4 y temperatura de 37°C o

más alta teniendo un 45% de proteínas verdaderas y un buen balance de aminoácidos.

Se debe continuar su estudio con el fin de encontrar sus condiciones óptimas de pH y temperatura, así como sus parámetros cinéticos.

RECONOCIMIENTOS

Queremos agradecer la ayuda en la realización de las experiencias a los técnicos Isora Iglesias y Susana Pérez, así como también al colectivo de analistas del Departamento de Fermentaciones.

REFERENCIAS

- BACON D. W. AND HENSON T. Statistical design and Model Building, Depart. of Chem. Eng. Queens University, Ontario, Canada 1971.
- GHOSE T. K. *Biotech. and Bioeng.*, 11, 239, 1969.
- LÓPEZ PLANES R. Notas de Estadística y Diseño de Experimentos Vol. II 1975.
- NELSON N. J. *Biol. Chemistry*, 153, 375, 1944.
- NORRIS J. R. AND RIBBONS D. W. Methods in Microbiology. Academic Press. Vol. 5B, 317-318 1971.
- ALONSO A. Comunicación Personal 1971.
- SOMOGYI M. *Journal Biological Chemistry* 195, 19, 1952.