

Producción de proteína unicelular mediante cultivo continuo de levadura en suero de leche desproteinizado*

EOVALDO HERNANDEZ**
EGDA MEZA***
NELA LOZANO***

RESUMEN

La tendencia mundial de usar menos suero de leche en la alimentación animal y la introducción de leyes para evitar la contaminación ambiental han conducido a la búsqueda de nuevos usos para el suero de leche. En el presente trabajo se hace un estudio de la producción de proteína unicelular a partir de suero de leche desproteinizado usando las levaduras *Kluyveromyces fragilis* NRRL-1190 y *K. fragilis* CBS-397.

Al suero desproteinizado por acidulación y calentamiento, se añadieron sales de amonio, potasio, magnesio, calcio, hierro, zinc y manganeso, se ajustó el pH a 4,5, se esterilizó y en un quimostato se inoculó con la levadura.

Los rendimientos obtenidos (basados en lactosa) en cultivo continuo fueron de 36 a 45 por ciento para *K. fragilis* NRRL-Y1190 y de 28 a 32 por ciento para *K. fragilis* CBS-397. La rata máxima de crecimiento para Y-1190 fué de $0,17 \text{ h}^{-1}$ y para CBS-397 de $0,27 \text{ h}^{-1}$. La productividad (en soluciones conteniendo 0,4 por ciento de lactosa) de Y-1190 fué de $0,16 \text{ g/l/h}$ y la de CBS-397 de $0,18 \text{ g/l/h}$. El contenido de proteína (N Kjeldahl x 6,25) de Y-1190 fué de 44 por ciento, el de CBS-397 de 59 por ciento.

Como la productividad de ambas levaduras es similar y CBS-397 tiene mayor contenido de proteína, ésta debería ser la levadura a utilizar en la producción de proteína unicelular a partir de suero de leche.

ABSTRACT

Single cell protein production by continuous culture of yeasts on deproteinized whey.

World trends to use less whey in animal feeding and new laws to control environmental pollution are leading researchers to the search of new uses for whey. In this work, single cell protein production by *Kluyveromyces fragilis* NRRL-Y-1190 and *K. fragilis* CBS-397 growing continuously on whey is studied.

* Recibido para su publicación el 9-3-79.

** Ph. D. (Bioquímica), Instituto de Investigaciones Agronómicas, Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo, Venezuela.

*** Estudiantes, Escuela de Ingeniería Química, Universidad del Zulia, Apartado 526, Maracaibo, Venezuela.

Protein was removed from whey by acidification and heating. Ammonia, potassium, magnesium, calcium, iron, zinc and manganese salts were added, pH adjusted to 4,5, the solution sterilized in a chemostat and yeast inoculum added.

Yields (based on lactose) were 36 to 45 per cent for *K. fragilis* NRRL-Y-1190 and 28-32 per cent for *K. fragilis* CBS-397. Maximum growth rate was 0,19 h⁻¹ for Y-1190 and 0,27 h⁻¹ for CBS-397. Productivity, in 0,4 per cent lactose solutions, was 0,16 g/l/h for Y-1190 and 0,18 g/l/h for CBS-397. Protein content (Kjeldahl N x 6,25) was 44 per cent for Y-1190 and 59 per cent for CBS-397.

As the productivity of both yeasts is similar and protein content of CBS-397 is greater than that of Y-1190, CBS-397 should be the preferred yeast to produce single cell protein from whey.

INTRODUCCION

El suero de la leche es el líquido residual de la transformación de la leche en queso, en caseína o en derivados de la caseína. Es el subproducto más abundante en las industrias lácteas de todos los países. La producción mundial de suero en 1973 fué de 74 millones de toneladas, menos del 30 por ciento de esta producción corresponde a los países en desarrollo, donde la fabricación y consumo de queso son todavía escasos.

La producción venezolana de suero se puede estimar en mas 200.000 toneladas anuales, procedente de la elaboración de queso blanco criollo y de otros tipos de queso. En Venezuela, con la excepción de dos o tres fábricas de queso relativamente grandes, la mayor parte del suero se produce en cantidades pequeñas y en lugares dispersos, lo que hace difícil, por antieconómico, la instalación de plantas de aprovechamiento.

En Venezuela, donde no existen plantas para el tratamiento de los efluentes de las ciudades, el suero, al igual que éstos, es arrojado a los ríos. En el país no existen cifras sobre la cantidad de suero que es vertida a los ríos, pero es probable que se desperdicie una gran parte de la producción de suero. Una pequeña cantidad, que tampoco ha sido estimada, se emplea para suplementar la alimentación de cerdos y terneros.

En el país ya existen algunas plantas para producir suero en polvo, por secado del líquido. Aunque ésta parece ser una de las soluciones más empleadas actualmente para resolver el problema de la utilización del suero en gran escala, la venta del suero en polvo apenas si cubre los costos de procesamiento y transporte (1). Además, en muchos países se están presentando problemas de excedentes. En Venezuela, la planta de secado instalada en Caja Seca, Estado Zulia, no trabaja continuamente, ya que el producto no parece tener fácil mercado.

Existen otras alternativas que en condiciones como las venezolanas, podrían ser más viables. Tanto el suero fresco, como el suero desproteínizado pueden ser usados como medio de cultivo de microorganismos. Por fermentación de la lactosa del suero se pueden obtener productos tales como ácido láctico, etanol, vinagre, riboflavina, bebidas alcohólicas, enzimas y proteína unicelular. Según Reesen y Arnold (2), la fermentación del suero ofrece la mejor solución al problema del suero, ya que se produce una biomasa de alto contenido protéico y un efluente con un aceptable BOD₅.

En el presente trabajo se hace un estudio de la fermentación continúa de suero de leche, desproteínizado por dos levaduras diferentes.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

Los microorganismos empleados en este trabajo fueron las siguientes levaduras: *Kluyveromyces fragilis* NRRL-Y-1190 y *Kluyveromyces fragilis* CBS-397. Ambas levaduras fueron conservadas en papa-dextrosa-agar nutritivo.

Medio de Cultivo (Tabla 1)

El medio de cultivo utilizado fué suero de queso desproteínizado tal como se indicará posteriormente. El suero desproteínizado se diluyó 1:10 y por cada litro de suero diluido se agregaron 4,52 g de sulfato de amonio, 1,13 g de sulfato ácido de potasio y 10 ml de una solución de sales preparadas del modo siguiente:

MgSO ₄ .7H ₂ O	g/l 0,232
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,011
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,007
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,002
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,002

El pH se ajustó a 4,5 con hidróxido de sodio. El medio se colocó en un balón de seis litros, se tapó con algodón y con una cubierta de papel de aluminio y se introdujo en una estufa a 80°C. En esta forma el medio de cultivo está listo para ser utilizado. Se preparó en cantidades de seis litros.

TABLA 1.- Composición del suero desproteínizado usado en este trabajo.*

Componente	g / l
Lactosa	42,00
Proteína	2,84
Nitrógeno	0,82
Fósforo	0,25

* Este suero se diluyó 1:10 para ser fermentado

mB

Desproteínización del Suero

A cada 100 ml de suero crudo se agregaron 7 ml de ácido tricloroacético al 30 por ciento con el objeto de precipitar la proteína; para ayudar la precipitación se

calentó el suero hasta hervir, usando un agitador magnético con plancha calentadora; se enfrió, se decantó y luego se filtró a través de papel toallín y papel de filtro N° 42, hasta obtener un suero clarificado.

Inóculo

En un Erlenmeyer de 500 ml se colocaron 100 ml de medio de cultivo. Del cultivo en papa-dextrosa-agar inclinado se extrajo un asa con levadura y se sembró en el medio contenido en el Erlenmeyer. El Erlenmeyer con el cultivo, se colocó en un agitador de piso New Brunswick Co. Giratory Shaker, Modelo "V" girando aproximadamente a 300 r.p.m. Después de 72 horas de crecimiento, el contenido del Erlenmeyer constituye el inóculo a usar en el proceso de fermentación.

Fermentador

El fermentador utilizado se construyó con un balón de vidrio Pyrex de un litro de capacidad, al cual se le conectó, por el fondo, un tubo de rebose y por la boca se le adaptó un talón con orificios para toma de muestra, suministro de aire, adición de antiespumante, adición de hidróxido de sodio (para el control de pH), adición de nutrientes y el eje de un motor eléctrico para mover el agitador. El sistema completo es un "quimostato". El tubo de rebose se conectó por medio de una manguera a un balón recolector.

Aireación

Con un volumen de trabajo de 810 ml y una velocidad de agitación de 800 r.p.m. se usó un flujo de aire de 4,8 l/min. En estas condiciones no se observó limitación del crecimiento por oxígeno.

Fermentación

El proceso de fermentación se llevó a cabo en la forma siguiente. Se colocó el inóculo en el fermentador, se agregaron 710 ml de medio nutriente para completar el volumen de trabajo (810 ml) y se puso el fermentador en el baño termostático. Se cerró la salida del fermentador y con un flujo de aire de 4,8 l/min, una agitación de 800 r.p.m., una temperatura de 30°C y pH 4,5 se realizó la fermentación por cargas, durante 16 horas. Una vez transcurrido este tiempo se inició la fermentación continua. Una botella de seis litros de medio nutritivo, se introdujo en un recipiente con hielo (la baja temperatura evita el crecimiento de microbios contaminantes) y se conectó a través de una bomba peristáltica con la entrada de nutrientes al fermentador. Se abrió la salida del fermentador, se fijó un flujo en la bomba y se puso en marcha el proceso. Después de haber pasado cinco veces o más el volumen de trabajo del fermentador (suficiente para que el sistema alcance un estado de flujo estacionario), se tomó una muestra para efectuar los análisis y se cambió el flujo a un valor superior. Se esperó nuevamente hasta obtener un estado de flujo estacionario, se tomó una segunda muestra y así se siguió repitiendo el proceso para cada rata de dilución.

Durante el proceso se agregaron 2 ml de antiespumante cada 3 horas. El líquido fermentado, conteniendo la proteína microbiana, se decantó y se centrifugó, desechando el líquido sobrenadante. En el precipitado, lavado, secado y molido, se determinó proteína por el método de Kjeldahl.

Cosecha de Levadura

Para cada rata de dilución, $D = F/V$, se tomó una muestra, se midió su densidad óptica a 540 nm en un Spectronic 20 y la cantidad de lactosa para determinar la lactosa consumida por la levadura.

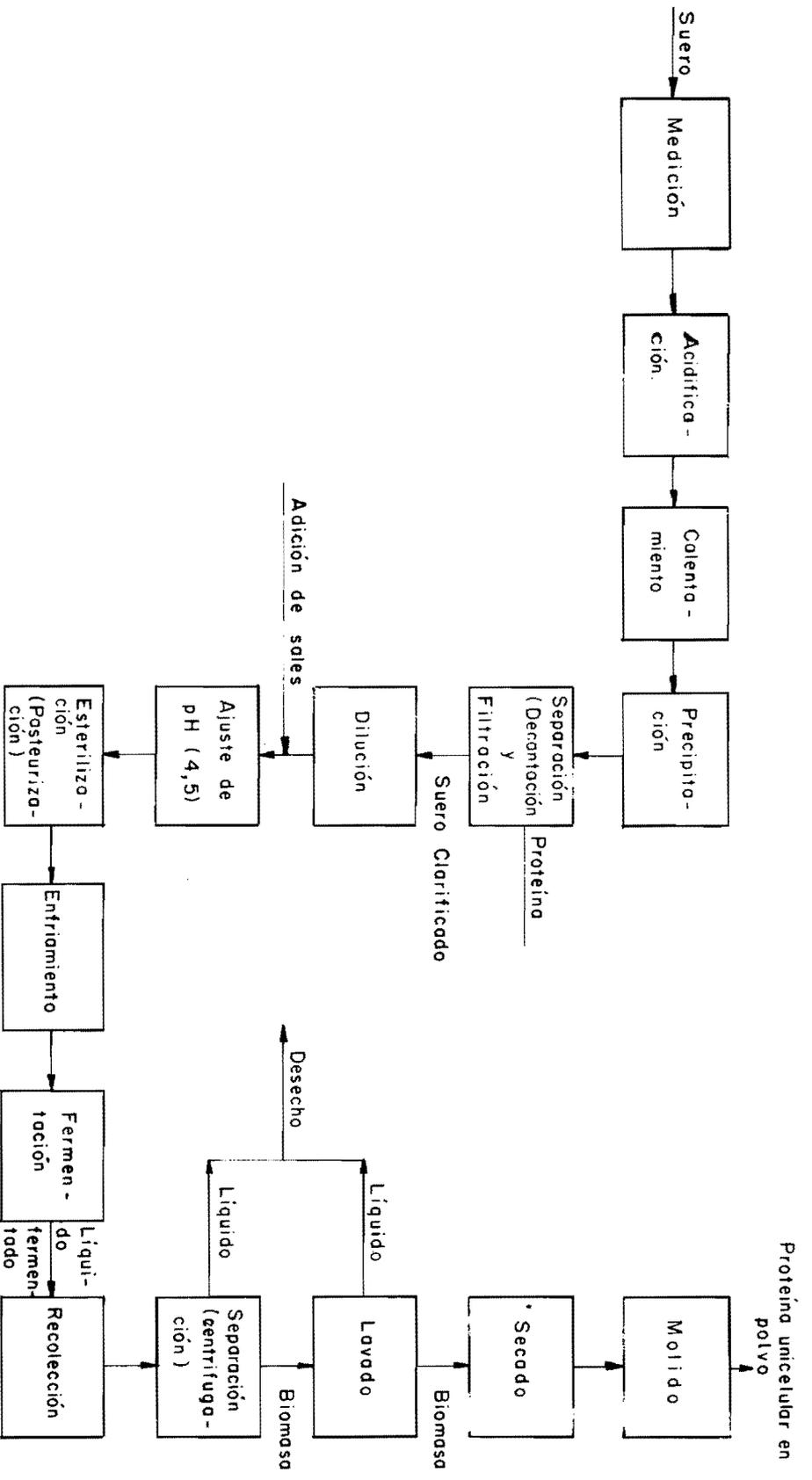


FIGURA 1. — Esquema del proceso de fermentación de suero de leche

m3

De la densidad óptica de la muestra se obtuvo, mediante curva de calibración, la concentración de células en mg de peso seco por ml.

Métodos Analíticos

La lactosa se determinó por el método de Dubois (3), la proteína por el método de biuret, el contenido de nitrógeno se midió por el método de micro Kjeldahl, el fósforo se determinó según Fiske-SuBarow.

Tiempo de duplicación de las levaduras

El tiempo de duplicación se obtuvo midiendo la densidad óptica del cultivo a 540 nm, a intervalos.

Velocidad máxima de crecimiento (μ_{max})

La velocidad máxima de crecimiento en el quimostato se determinó mediante la técnica de lavado (4).

RESULTADOS Y DISCUSION

En las Figuras 2 y 3 se presenta el proceso de fermentación continua de las levaduras *Kluyveromyces fragilis* NRRL-Y-1109 y *Kluyveromyces fragilis* CBS-397, respectivamente. Las curvas de utilización de la lactosa por estas levaduras no se asemejan a las curvas teóricas de utilización de sustratos de bajo peso molecular (5). Con moléculas pequeñas la concentración de sustrato desciende bruscamente al alcanzarse ratas de dilución cercanas a la rata crítica de dilución. En la fermentación del suero de leche, la concentración de lactosa decrece gradualmente, de un modo análogo a cuando el sustrato es un polímero. El fenómeno no se estudió con más detalle.

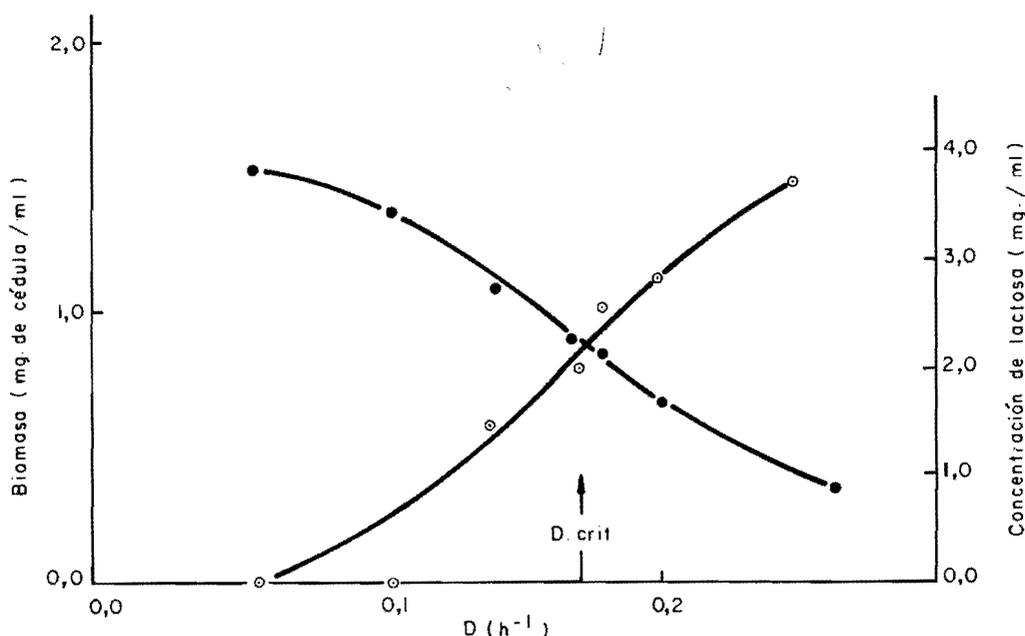


FIGURA 2. — Efecto de la rata de dilución (D, h^{-1}) sobre la concentración de biomasa (●) y concentración de la lactosa (○) durante el crecimiento de *Kluyveromyces fragilis* NRRL - Y - 1109 en suero de queso desproteínizado. La concentración de la lactosa en el suero fué 4,2 mg/ml

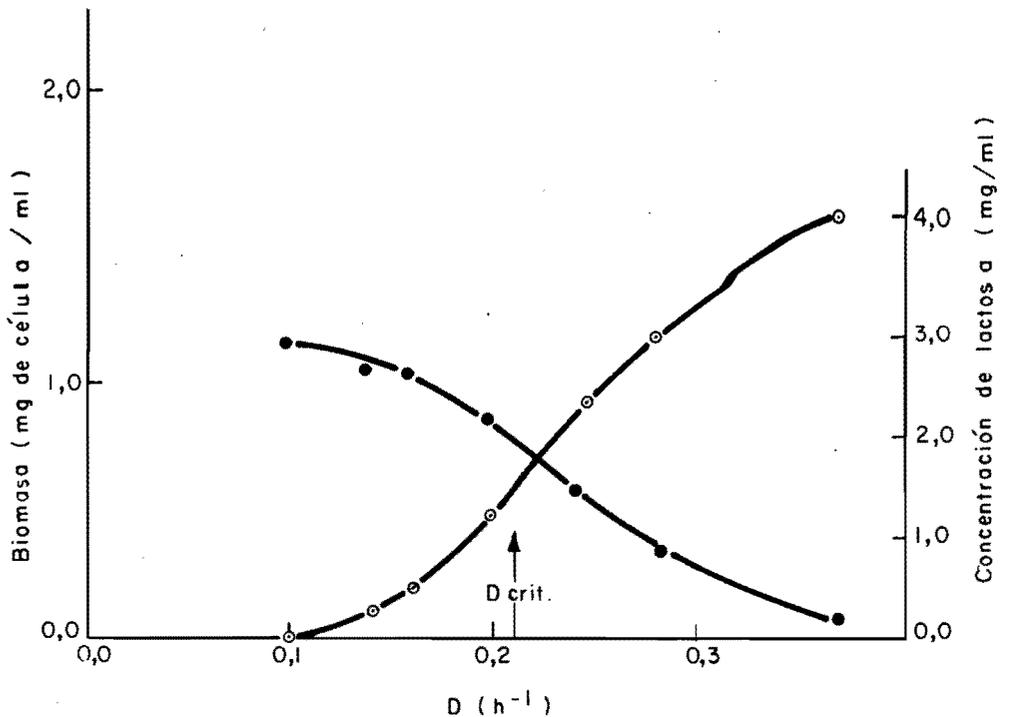


FIGURA 3 .— Efecto de la tasa de dilución (D, h^{-1}) sobre la concentración de biomasa (●) y concentración de lactosa (○) durante el crecimiento de *Kluyveromyces fragilis* CBS-397 en suero de queso desproteinizado. La concentración de lactosa fué de 4,2 mg/ml.

30

Los rendimientos variaron con la tasa de dilución. Para la levadura *K. fragilis* NRRL-Y-1109, el rendimiento fué de 36 a 45 por ciento, para tasas de dilución de 0,06 a 0,18 h^{-1} . Para *K. fragilis* CBS-397, el rendimiento fué de 28 a 32 por ciento, para tasas de dilución de 0,10 a 0,24 h^{-1} .

La tasa óptima de dilución para *K. fragilis* NRRL-Y-1109 fué 0,17 h^{-1} . La productividad cuando se trabajó a esta tasa de dilución, fué 0,16 g células/l/h (Figura 4). La tasa óptima de dilución para *K. fragilis* CBS-397 fué 0,21 h^{-1} , con una productividad de 0,18 g células/l/h (Figura 5). Aunque los rendimientos de las dos levaduras son distintos, cuando ambas se cultivan a sus tasas óptimas de dilución, la productividad es similar.

El contenido de proteína fué de 44 por ciento en *K. fragilis* NRRL-Y-1109 y de 59 por ciento en *K. fragilis* CBS-397.

Aunque el rendimiento de *K. fragilis* NRRL-Y-1109 es superior al de *K. fragilis* CBS-397, su productividad es similar, por lo que teniendo en cuenta el más alto contenido de proteína de la última, ésta debería ser la levadura a utilizar en la producción de proteína unicelular para alimentación animal o humana.

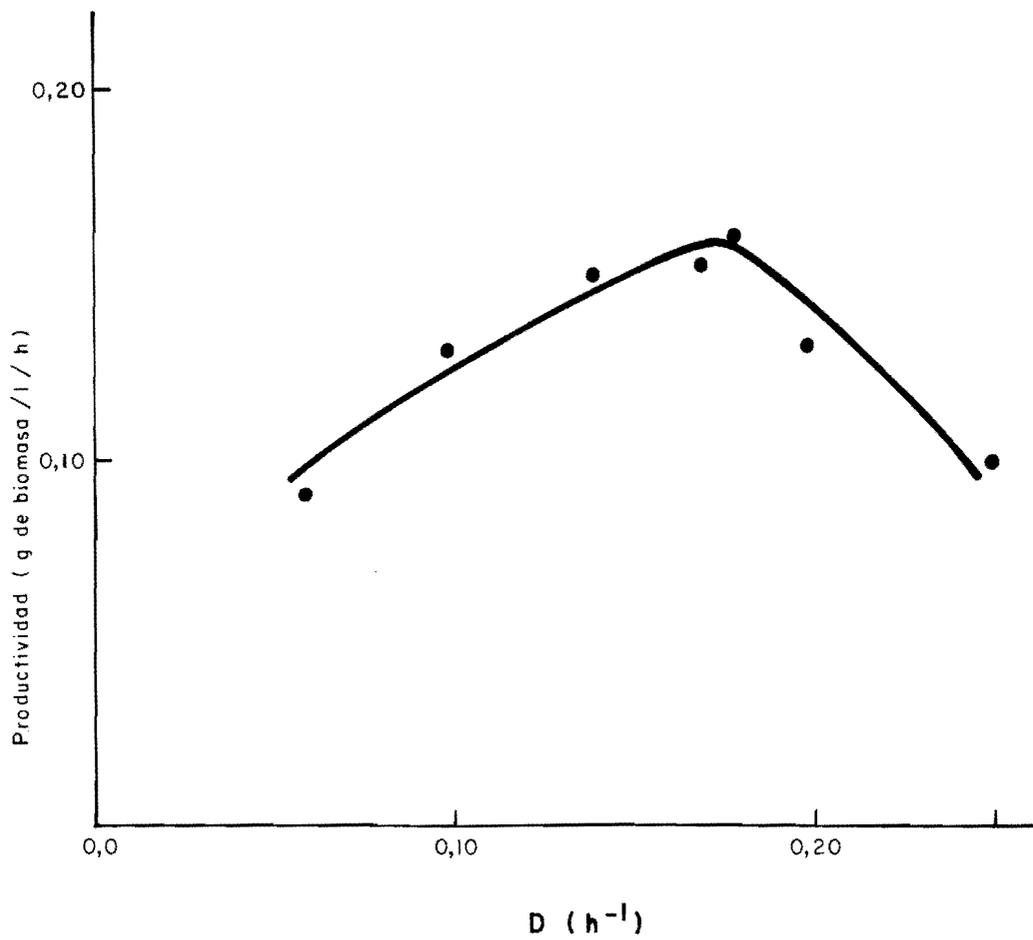


FIGURA 4 . _ Efecto de la velocidad de dilución sobre la producción de biomasa por *K. fragilis* NRRL - Y - 1109

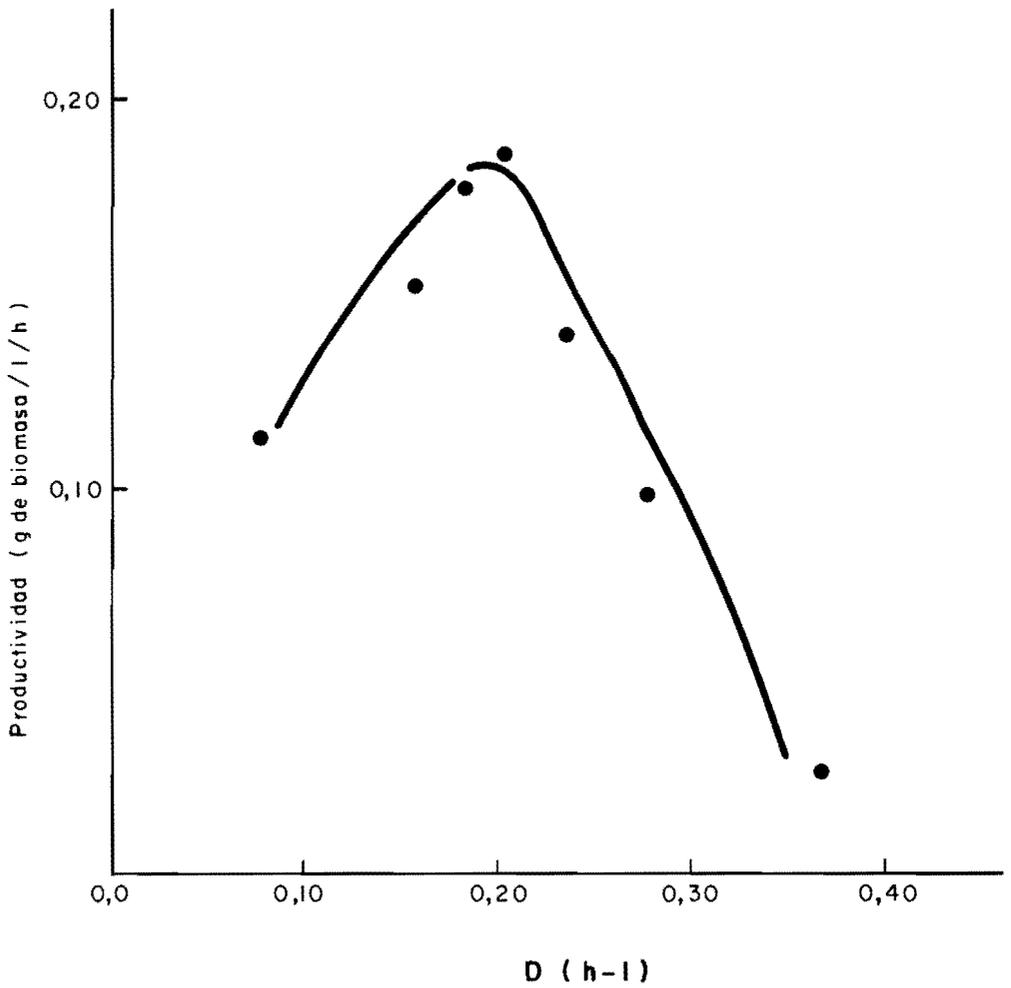


FIGURA 5 — Efecto de la velocidad de dilución sobre la producción de biomasa, por *K. fragilis* CBS - 397

m3

TABLA 2. Rendimiento de *K. fragilis* NRRL-Y-1109 a diferentes ratas de dilución.

Rata de dilución D. (h ⁻¹)	Rendimiento, Y. Porcentaje
0,06	36
0,10	38
0,14	41
0,17	45
0,18	45

TABLA 3. Rendimiento de *K. fragilis* CBS-397 a diferentes ratas de dilución.

Rata de dilución D. (h ⁻¹)	Rendimiento Porcentaje
0,10	28
0,14	27
0,17	28
0,21	29
0,24	32

LITERATURA CITADA

1. NIELSEN, P.S. Ultrafiltration of skim milk and whey. De Danske Mejeriers Maskin fabrik Information 1-1975: 3-9. 1975.
2. REESEN, L. & ARNOLD, J. New considerations on complete utilization of whey. Nordeuropaeisk Mejeri-Tidsskrift 39 (4): 95, 106-108 (1973). Tomado de Dairy Science Abstracts 36 (2): 44 (1974). 1973.
3. GILLES, J., HAMILTON, P. & SMITH, F. Colorimetric determination of sugar. Analytical Chemistry 28: 350. 1956.
4. JANNASCH, H. J. Bacteriology 99: 156. Original no consultado, tomado de ACR. Dean, S.J. Pirt y D.W. Tempest (editores) "Environmental Control of Cell Synthesis and Function", Academic Press, 1972. p. 239. 1969.
5. TEMPEST, D.W. The continuous culture of microorganisms. In J.R. Norris & D.W. Ribbons (editores). Methods in Microbiology. Academic Press, London y New York. Vol. 2: 259-276. 1970.