

Titulo

“LA ACIDIFICACIÓN BIOLÓGICA EN EL DESARROLLO DEL PROCESO FERMENTATIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR

Nelsy Herrera Coello, Centro de Análisis de Procesos. Facultad de Química y Farmacia; Pedro J. Iturria Quintero, Departamento de Licenciatura en Ciencias Químicas. Facultad de Química y Farmacia. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
nelsy@uclv.edu.cu

Resumen.

En el trabajo se realiza un estudio sobre la aplicación de bacterias lácticas como vía de acidificación biológica en el desarrollo del proceso fermentativo para la producción de proteína unicelular. Con el objetivo de evaluar el crecimiento de las bacterias lácticas en el tiempo, se realizó un estudio del comportamiento del pH y la acidez utilizando la miel final de caña como fuente de carbono, a diferentes concentraciones de sólidos solubles en el sustrato. Se pudo comprobar que ocurre un descenso del pH y un incremento de la acidez en el tiempo, lo que demuestra la posibilidad de obtener miel acidificada en un tiempo relativamente corto. A través de los estudios realizados se demostró que es factible conducir el cultivo de forma tal que se elimine totalmente el consumo de ácido sulfúrico por concepto de ajuste del pH en el proceso de propagación de la levadura de fermentación. La variante de cultivo mixto entre las especies de levaduras y bacterias ácido lácticas resultó la mejor alternativa por las ventajas que aporta en el desarrollo del cultivo de ambas especies sin la adición de nutrientes adicionales. Se alcanza un valor de pH adecuado para el proceso, y un contenido de biomasa de 8,52 g/L en un tiempo de fermentación de 8 horas, muy favorable al proceso de fermentación. Los resultados obtenidos resultan de interés en el estudio de cultivo mixto para su aplicación en el desarrollo de la fermentación para la producción de proteína unicelular.

Palabras clave: Acidificación biológica, bacterias Ácido lácticas, levaduras, proteína unicelular.

Abstract

In the present work is carried out a study of the application of lactic bacteria as a way of biological acidification in the development of fermentation process for the production of unicellular protein. With the objective of evaluating the growth of the lactic bacteria in the time, it was carried out a study of the behavior of pH and acidity using the final molasses of cane of sugar as a source of carbon, in different concentrations of soluble solids in the substratum. It could be proven that a descent of pH and an increment of acidity in the time were observed. This demonstrated the possibility to obtain acidified molasses at a relatively short time. It was also demonstrated that it is feasible to perform the cultivation in a such way that is eliminated totally the consumption of sulfuric acid by concept of adjustment of pH in the process of propagation of the yeast of fermentation . The variant of mixed cultivation between the species of yeasts and lactic acid bacteria was the best alternative due to the advantages that it contributes in the development of the cultivation of both species without the addition of additional nutrients. A value of appropriate pH for the process is reached, and a content of biomass of 8.52 g/L in 8 hours of fermentation is very favorable for the process of fermentation. The obtained results are of interest in the study of mixed cultivation due to their application in the development of the fermentation for the production of unicellular protein.

Key words: Biological acidification, lactic acid bacteria, yeasts, unicellular protein.

Introducción

La diversificación en la producción de azúcar de caña constituye para nuestra economía una necesidad imperiosa, pues nos permite desarrollarnos en la difícil coyuntura internacional en que vivimos, al no depender de las alzas y bajas de un solo producto.⁶

Entre los microorganismos utilizados en la producción de proteína unicelular se encuentran las levaduras. El género *Saccharomyces* incluye numerosas especies, entre las cuales se encuentra la *S. cerevisiae*, utilizada en las industrias de producción de biomasa proteica y alcohol etílico. La obtención de la cantidad de células necesarias para degradar el volumen de materia prima contenida en un fermentador se logra mediante el proceso de propagación de la levadura de fermentación en condiciones de pH y temperatura controlados. La acidificación del sustrato, para lograr el pH adecuado se logra con la adición de ácido sulfúrico. La alternativa de utilizar la acidificación láctica con este propósito resulta ventajosa desde el punto de vista ecológico dada la importancia del desarrollo de producciones limpias que no produzcan afectaciones al medio ambiente.

Los cultivos mixtos de microorganismos se emplean en los últimos años como alternativas muy efectivas en la obtención de diferentes productos y en especial de proteína unicelular en diferentes sustratos.^{1,2,5,6}

En nuestro trabajo se estudia la acidificación biológica del sustrato fermentativo mediante el empleo de un cultivo de bacterias ácido lácticas que permita el control del pH en el desarrollo de la fermentación aun sin la adición de nutrientes adicionales.

Desarrollo

Materiales y métodos. Parte experimental

La materia prima empleada en los experimentos es la miel final de caña, esta requiere de un tratamiento previo de clarificación, operación necesaria para liberar la de una serie de sustancias que fomentan el peligro de infección.

Caracterización de la materia prima

Con el objetivo de conocer la calidad físico-química del sustrato se realiza la caracterización de la miel final utilizada en los diferentes experimentos empleando las técnicas analíticas tradicionales.^{3,4}

con un dispositivo distribuidor de aire de forma continua, durante un tiempo de 8 horas.

El control del proceso se llevó a cabo mediante la determinación de pH, Brix, Azúcares Reductores Totales, acidez y biomasa peso seco.^{3,4}

Estudio de la cinética de crecimiento de la levadura en sustrato con miel acidificada a expensas de las bacterias ácido lácticas.

El sustrato consiste en miel diluida con agua hasta alcanzar 6° Brix, esterilizado y con la adición de extracto de levadura como fuente de nitrógeno. Para la obtención de la miel acidificada se propagan las

Microorganismos empleados:

| Cepa | Procedencia |
|---------------------------------|----------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Levadura seca activa |
| <i>Lactobacilos acidofilo</i> | Cultivo puro |

Estudio del comportamiento del pH y la acidez en un sustrato con miel final y cultivo de bacterias acidófilas en proceso estático

En la ejecución de este experimento la miel es diluida con agua hasta 5, 10, y 13° Brix, teniendo en cuenta que el proceso de producción de proteína unicelular se desarrolla por etapas a diferentes concentraciones de sólidos solubles, según corresponde a la propagación del cultivo y posterior desarrollo del proceso. Como fuente de nitrógeno en el sustrato se utiliza el extracto de levadura. El sustrato esterilizado es inoculado con las bacterias ácido lácticas a la temperatura de 38 °C, durante un tiempo de 8 horas. El control del pH y la acidez como criterio del crecimiento del microorganismo se llevó a cabo cada 2 horas, hasta alcanzar el pH requerido^{3,4}.

Estudio del proceso de propagación de la levadura. Proceso convencional

Este se realiza en un medio compuesto de miel final de caña diluida con agua hasta 6° Brix y la adición de sales de amonio como fuente de fósforo y nitrógeno. El pH del sustrato es ajustado con H₂SO₄ concentrado hasta alcanzar el valor requerido en el proceso. El sustrato esterilizado es inoculado con la levadura de fermentación a la temperatura de 34 °C. La aireación se garantizó

bacterias ácido lácticas en el medio en proceso estático a la temperatura de 38 °C hasta que el pH descienda al valor requerido. Posteriormente se inocula la miel acidificada con la levadura de fermentación y en condiciones aeróbicas se desarrolla el cultivo a la temperatura de 34 °C, determinándose cada 2 horas los parámetros pH, Brix, Azúcares Reductores Totales y biomasa peso seco.^{3,4}

Desarrollo del cultivo mixto entre las bacterias ácido lácticas y la levadura de fermentación

· Propagación de las bacterias ácido lácticas
La propagación de las bacterias ácido lácticas requiere de la utilización de una fuente de nitrógeno. El extracto de levadura es un producto de alto costo y de difícil adquisición, por lo cual se evalúa la alternativa de desarrollar las bacterias ácido lácticas en cultivo mixto con la levadura de fermentación.

El proceso estático se desarrolla en incubadora a la temperatura de 38 °C mediante un inóculo de bacterias lácticas-levaduras en un sustrato con miel final diluida a 6° Brix hasta que el pH desciende al valor deseado.

· Propagación de la levadura de fermentación
El cultivo obtenido anteriormente se utiliza como inóculo en la propagación de la levadura de fermentación en sustrato de miel final diluida a 6° Brix en condiciones aeróbicas a la temperatura de 34 °C sin la adición de nutrientes adicionales. Se realizaron determinaciones de pH, Brix, Azúcares Reductores Totales, acidez y biomasa peso seco.^{3,4}

Resultados
Caracterización de la materia prima

En la Tabla 1 se muestra la caracterización de la miel final de caña que se empleó como sustrato en los estudios realizados.

Tabla 1. Caracterización de la miel final de caña

| Parámetros | Valores promedio |
|---------------------------------|------------------|
| pH (unidades) | 5,64 |
| °Brix | 87,6 |
| Cenizas (%) | 11,607 |
| Azúcares reductores totales (%) | 45,38 |

| | | |
|--|-----------------|-------|
| Azúcares reductores fermentables (%) | | 43,38 |
| Azúcares reductores infermentables (%) | | 2,00 |
| Nitrógeno | Base húmeda (%) | 0,317 |
| | Base seca (%) | 0,535 |
| Magnesio (%) | | 0,438 |
| Calcio (%) | | 1,586 |

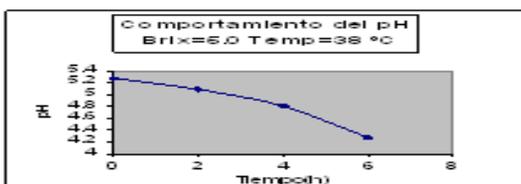


Figura 1

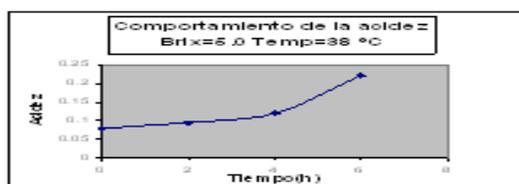


Figura 2

Resultados del estudio del comportamiento del pH y la acidez usando diferentes concentraciones de sólidos solubles en el sustrato

En las Figuras 1 y 2 se ofrecen los resultados utilizando concentración de sólidos solubles de 5° Brix en el sustrato. Se observa que ocurre un descenso del pH y un incremento de la acidez en el tiempo, alcanzándose un valor de pH de 4.27 y acidez de 0.22 a las 6 horas de incubación, en proceso estático.

El comportamiento del pH y la acidez a la concentración de sólidos solubles de 10° Brix (Figuras 3 y 4), es similar, aunque el valor de pH final a las 6 horas de incubación es algo superior al alcanzado a menor concentración de Brix en el sustrato. Este valor de pH de 4,52 resulta adecuado para el desarrollo del proceso de propagación de la levadura

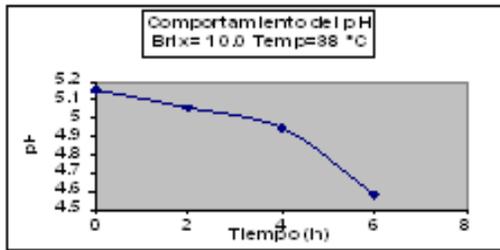


Figura 3

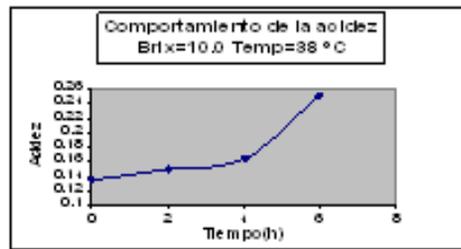


Figura 4

El comportamiento del pH y la acidez del sustrato a 13° Brix (Figuras 5 y 6) muestra que a las 6 horas de incubación el pH alcanza un valor de 4,83 y la acidez 0,27, mientras a las 24 horas, el pH exhibe un valor de 4,20 y la acidez de 0,55, lo que indica que el tiempo para alcanzar el pH requerido para el proceso es superior a las 6 horas, hasta un tiempo máximo de 24 horas, lo que requiere de un estudio posterior con el objetivo de definir este parámetro. Al incrementar la concentración de sólidos solubles en el sustrato (azúcares) se requiere de un tiempo mayor para alcanzar el pH adecuado para el desarrollo del proceso de propagación

Los valores de acidez alcanzados no inhiben el crecimiento de las bacterias ácido lácticas. Según se reporta en la literatura las bacterias lácticas cesan sus funciones vitales cuando la concentración alcanza el 2,5 % de ácido láctico. Estos resultados son favorables al desarrollo de una miel acidificada a expensas de las bacterias lácticas y de importancia práctica pues demuestra las posibilidades de obtener miel acidificada en un tiempo relativamente corto.

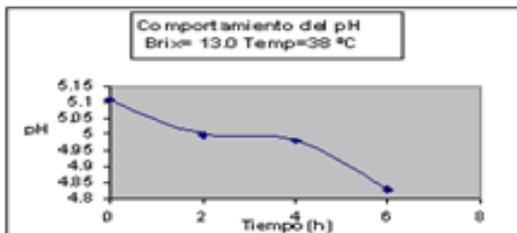


Figura 5

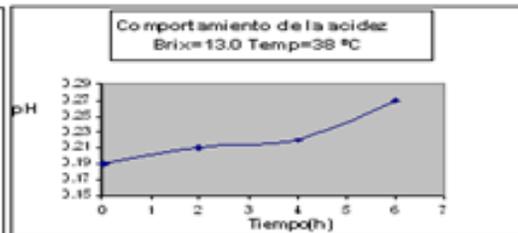


Figura 6

En la tabla 2 se ofrecen los resultados del estudio de propagación de la levadura utilizando un sustrato de miel final diluida suplementado con sales de amonio y control del pH con ácido sulfúrico a la temperatura de 34 °C.

Los resultados obtenidos se corresponden con las características de un proceso que se desarrolla en condiciones convencionales. Constituyen la base para los estudios posteriores con miel acidificada a expensas de las bacterias ácido lácticas.

Tabla 2. Estudio del proceso de propagación de la levadura. Proceso convencional.

| Parámetros | | | | | | |
|----------------------|-------------|-------|-----|------|-----|------|
| Tiempo(h) | | 0 | 2 | 4 | 6 | 8 |
| °Brix | | 6,5 | 5,5 | 4,7 | 4,3 | 4,3 |
| pH | | 4,1 | - | - | - | 3,4 |
| Biomasa (g/L) | Valor | 1,5 | - | - | - | 7,48 |
| | Incremento | 5,98 | | | | |
| Acidez (%) | | 0,49 | - | 0,54 | - | 0,64 |
| ART | Valor(g/L) | 30 | - | - | - | 2,4 |
| | Consumo (%) | 92 | | | | |
| Productividad (g/Lh) | | 0,748 | | | | |
| Rendimiento (%) | | 21,67 | | | | |

En la Tabla 3 se muestra el estudio sobre el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* en miel acidificada con bacterias lácticas utilizando las sales de amonio para garantizar la fuente de nitrógeno y fósforo en el sustrato.

Tabla 3. Propagación de levaduras en miel acidificada a expensas de bacterias lácticas

El proceso transcurre en un tiempo de 6 horas. Se logró una estabilización del pH favorable al proceso de fermentación, un incremento de biomasa hasta un valor de 8,52 g/L, un consumo de azúcares reductores de 91,3 %. La productividad alcanzó un valor de 1,14 g/Lh y el rendimiento biomasa sustrato fue de 24,89 %. Ocurre un incremento de la acidez hasta las 4 horas con una tendencia a disminuir en la etapa final del proceso, comportamiento que se justifica por la velocidad de formación de los ácidos orgánicos durante las primeras horas que es muy superior a la velocidad de degradación, cuando la levadura ha logrado asimilar la mayor parte de los nutrientes presentes en el sustrato.

En el trabajo, cuyo propósito es desarrollar un cultivo de bacterias ácido lácticas para obtener una miel ácida que garantice el control del pH en el proceso fermentativo, se requiere de un sistema de propagación del cultivo. La utilización del extracto de levadura por el costo del producto encarece el proceso productivo por lo que se evaluó la posibilidad de desarrollar las bacterias ácido lácticas en cultivo mixto con la especie de levadura, resultados que aparecen en la tabla 4.

| | | | | | |
|----------------------|------------|-------|------|------|------|
| Parámetros | | | | | |
| Tiempo(h) | | 0 | 2 | 4 | 6 |
| °Brix | | 6,2 | 5,9 | 4,3 | 4,3 |
| pH | | 4,10 | 4,06 | 4,05 | 4,06 |
| Biomasa (g/L) | Valor | 1,4 | 5,30 | 6,78 | 8,22 |
| | Incremento | - | 3,90 | 5,38 | 6,82 |
| Acidez (%) | | 0,54 | 0,67 | 0,72 | 0,62 |
| ART | Valor(g/L) | 30 | 19,6 | 3,6 | 2,6 |
| | Consumo(%) | 91,3 | | | |
| Productividad (g/Lh) | | 1,14 | | | |
| Rendimiento (%) | | 24,89 | | | |

Tabla 4: Propagación del cultivo mixto bacterias ácido lácticas-levadura

| | | | | |
|---|------|------|---------|------|
| Volumen (mL) | 100 | | 200(**) | |
| Tiempo (h) | 0 | 24 | 0 | 24 |
| pH | 5,12 | 4,57 | 4,92 | 4,15 |
| (Células/mL)*10 ⁶ lactobacilos | 10 | 35 | 11 | 75 |

| | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|
| (Células/mL)*10 ⁶ levaduras | 175 | 370 | 104 | 325 |
|--|-----|-----|-----|-----|

Tabla V: Evaluación del cultivo mixto bacterias ácido lácticas-levaduras.

| Parámetros | | | | | |
|----------------------|------------|-------------|------|------|------|
| Tiempo(h) | | 0 | 2 | 4 | 6 |
| °Brix | | 6,2 | 6,2 | 4,9 | 4,8 |
| pH | | 4,92 | 4,9 | 4,88 | 4,71 |
| Biomasa (g/L) | Valor | 1,5 | 4,9 | 7,0 | 8,52 |
| | Incremento | - | 3,4 | 5,5 | 7,02 |
| Acidez (%) | | 0,20 | 0,20 | 0,22 | 0,23 |
| ART | Valor(g/L) | 30 | - | 10 | 7,2 |
| | | Consumo (%) | 76 | | |
| Productividad (g/Lh) | | 1,17 | | | |
| Rendimiento (%) | | 30,79 | | | |

Como se aprecia en la etapa de propagación se logra una disminución del Brix a un valor de 4,7 en un tiempo de 6 horas. El incremento de biomasa alcanza un valor final de 8,52 g/L. La productividad alcanzó un valor de 1,17 g/Lh y el rendimiento biomasa sustrato fue de 30,79 %. El consumo de azúcares reductores es de 76 % con respecto al valor inicial de este parámetro en el sustrato.

Como se puede observar en los resultados obtenidos la variante constituida por el cultivo mixto entre las bacterias y la especie de levadura representa una alternativa a considerar en estudios posteriores por las ventajas que aporta en el desarrollo del cultivo sin la adición de nutrientes adicionales como fuente de nitrógeno en la propagación de las bacterias lácticas.

Las diferentes alternativas de cultivo estudiadas reflejan que la variante de inoculación del sustrato con bacterias lácticas sustituye a la adición de ácido sulfúrico para el control del pH en el proceso. Se observa además que mediante el desarrollo y crecimiento de las bacterias lácticas el proceso transcurre con una mayor eficiencia en productividad y rendimiento en el proceso fermentativo aun en

condiciones donde no se añaden sales de amonio al sustrato fermentativo.

Por otra parte, la no utilización de productos químicos, ácido sulfúrico y sales inorgánicas, constituye un aspecto de vital importancia en la preservación y cuidado del medio ambiente.

Conclusiones

1. La utilización de las bacterias ácido lácticas en el proceso de obtención de proteína unicelular elimina totalmente el consumo de ácido sulfúrico por concepto de ajuste del pH en el sustrato fermentativo.
2. El cultivo mixto entre las bacterias ácido lácticas y la especie de levadura constituye una alternativa de interés por las ventajas que aporta en el desarrollo del cultivo sin la adición de nutrientes adicionales.
3. El proceso se desarrolla en condiciones ambientales favorables a la no utilización de productos químicos que pueden resultar tóxicas para el hombre y a la vez la reducción de desechos contaminantes, lo que constituye un elemento importante en el desarrollo de tecnologías más limpias, estrategia actual como una manera de disminuir el impacto ambiental de los procesos productivos.

Bibliografía

1. González, M.B.E.; T. M. Gómez y S. Z. Jiménez: "Bacteriocinas de probióticos." *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición*. Vol. 4. No. 2, webmaster@uanl.mx
2. Gutiérrez, C. M.: Biotecnología Agroindustrial. Agroindustrias org. <http://www.ecompanyperu.org>, 2001.
3. Herly, N. S.: *Manual de los derivados de la caña de azúcar*, 2da. Edición, ICIDCA, 1990.
4. Herrera, A. y M. Quintana: *Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología Industrial*, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 1976.
5. Marin, A.: Desarrollo de la tecnología de producción del BIOPRANAL, Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas, Facultad de Química y Farmacia, UCLV, 2008.
6. Otero, M. A.: Producción de proteína unicelular a partir de subproductos de la industria azucarera, ICIDCA, Editorial Científico-Técnica, Ciudad de La Habana, 1982.