

Diseño de enrejado simple y su aplicación en la obtención de un cultivo mixto de levaduras en la producción de biomasa proteica.

Design of simple grate and their application in the obtaining of a mixed culture of yeasts in the production of proteic biomass.

Autores:

Ing. Alfredo Marín Cárdenas. MSc*
Ing. Agustín García Rodríguez. DrC**
Ing. Nivaldo Santos Cuba. DrC.**
Ing. Nelsy Herrera Coello**
Ing. Mabel González Pérez*

*Facultad de Ciencias Agropecuarias; **Centro de Análisis de Procesos. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Carretera a Camajuani Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. E-mail: alfredomc@uclv.edu.cu

Resumen

Teniendo en cuenta que una alternativa para obtener concentrado proteico con vista a la alimentación animal es la biomasa proteica por tecnología simplificada a partir de miel final, cuyos resultados son aún insuficientes, específicamente por los bajos rendimientos y productividad del inóculo utilizado, nos propusimos el siguiente objetivo: realizar un estudio sobre tres cepas de levaduras en monocultivo y en cultivo mixto para lograr una cepa con alto rendimiento y productividad para la producción de biomasa proteica. Utilizamos tres cepas de levadura las cuales son, *Kluyveromyces fragilis* L/12-8-1 (L/1930), la *Kluyveromyces sp.* (L-4 UCLV) y la *Candida utilis*, las mismas se utilizan en monocultivos y en cultivo mixto en una relación de 0.5/0.5 entre ambas y una variante de 0.33/0.33/0.33 de cada una. Se utilizó un diseño de experimentos de mezclas del tipo enrejado simple donde se combinan estas cepas. El punto óptimo de la combinación de las cepas donde se obtiene la mayor eficiencia en cuanto a la producción de biomasa, rendimiento y productividad, es para la combinación de las cepas a 0.46 % *K. fragilis* y 0.54 % *Kluyveromyces* L-4 UCLV.

Palabra claves: Biomasa proteica, Cultivo mixto, Enrejado simple, Levaduras.

Abstract

Keeping in mind that an alternative to obtain concentrated protein with view to the animal feeding is the proteic biomass for technology simplified starting from final honey whose results are even insufficient, specifically for the low yields and productivity of the I inoculate used, we intended the following objective that is to carry out a study on three stumps of yeasts in monoculture and in mixed culture to achieve a stump with high yield and productivity for the production of biomass protein. We use it three yeast stumps which are, *Kluyveromyces fragilis* L/12-8-1 (L/1930), the *Kluyveromyces sp.* (L-4 UCLV) and the *Candida utilis*, the same ones are used in monocultivos and in mixed culture in a relationship of 0.5/0.5 between both and a variant of 0.33/0.33/0.33 of each one. You uses a design of experiments of mixtures of the simple put bars on type where they combine these stumps. The good point of the combination of the stumps where the biggest

efficiency is obtained as for the production of biomass, yield and productivity, it is for the combination from the stumps to 0.46% *K. fragilis* and 0.54% *Kluyveromyces L-4 UCLV*.

Key words: Mixed culture; Proteic biomass; Simple grate; Yeasts.

Introducción.

En las últimas décadas ha aumentado extraordinariamente la importancia de la Microbiología en lo referente al aprovechamiento adecuado de los cultivos de microorganismos en muchas áreas de la economía. En la industria de alimentos la mayoría de los cultivos son combinación de varias especies de microorganismos, con lo cual se consiguen las propiedades deseables en los alimentos, requisito previo para esto es que las especies entren en asociación simbiótica y se manifiesten estables.³

Si bien existen algunos antecedentes de investigaciones sobre estudios de cultivos mixtos, son escasos los trabajos previos considerando cultivos mixtos en condiciones aeróbica, aunque su utilidad se hace evidente como modelo a aplicar en la primera fase de la fermentación aerobia, donde la disponibilidad de oxígeno disuelto es mayor que en el resto del proceso.⁵

Son varios las investigaciones que se han llevado a cabo en función de lograr una cepa de cultivo mixto de microorganismos capaz de multiplicarse sobre residuos y subproductos agroindustriales, y de lograr altos rendimientos en la producción de biomasa.^{1,2}

A partir de los años 90, las plantas de *Levadura torula* han sido prácticamente detenidas por transformarse en un proceso no viable técnica y económicamente en Cuba.⁶ Una alternativa para esto ha sido la obtención de biomasa proteica por vía simplificada a partir de miel final, cuyos resultados son aún insuficientes, específicamente por los bajos rendimientos y productividad del inóculo utilizado.⁴

Teniendo en cuenta lo antes planteado nos propusimos como objetivo de este trabajo realizar un estudio sobre tres cepas de levaduras en monocultivo y en cultivo mixto para lograr una cepa con alto rendimiento y productividad para la producción de biomasa proteica, mediante el método de enrejado simple.

Materiales y métodos.

El método de investigación desarrollado por Scheffe,⁷ que se emplea en este trabajo consiste en esencia, en investigar las propiedades de los sistemas multicomponentes como una función de la composición. El método reconoce que la suma de las proporciones de cada componente en la mezcla debe ser la unidad, y por tanto el factor espacio es un simple regular, siendo el mismo explorado para puntos de composición correspondiente a un arreglo conocido como enrejado. Los componentes pueden ser puros o mezclas de ellos mismos.

Los estudios se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fermentaciones del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) de la Universidad Central de Las Villas y en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad central de Las Villas.

Para este estudio se emplearon 3 cepas de levaduras las cuales son, *Kluyveromyces fragilis* L/12-8-1 (L/1930) [**K. fragilis**] del banco de cepas del ICIDCA, La *Kluyveromyces sp.* (L-4 UCLV) [**K.L-4**], levadura autóctona obtenida en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad Central de las Villas y la *Cándida utilis* [**C. utilis**], banco de cepas de la planta de levadura industrial “Perucho Figueredo”.

Para la preparación del sustrato en el proceso fermentativo se utilizó miel final a una concentración de azúcares reductores totales (ART) de 20 g/L. Los nutrientes se calcularon de acuerdo a los requerimientos de nitrógeno y fósforo del cultivo, empleando urea y superfosfato triple comercial. Además al sustrato se le incorporó el cultivo de *Lactobacillus acidóphilos*, a una concentración de 0,5%.

Todas las fermentaciones se desarrollaron en un volumen de 20 litros, en un fermentador de acero inoxidable, a una temperatura de 38°C y con un suministro de aire de 2 vvm para asegurar un mezclado homogéneo en el biorreactor de borboteo.

El inóculo utilizado en todas las variantes garantizó una población de 10^7 ufc.

La parte experimental se realizó según un diseño experimental del tipo enrejado simple, para la optimización de la composición de la mezcla a diferentes proporciones de cada cepa en el inóculo que se le aplicaba al sustrato y nutrientes de igual composición a la misma temperatura constante en todos los casos, de manera que se asegurara que la respuesta de rendimiento y productividad del proceso fermentativo dependiera solamente de la proporción de cada cepa en el cultivo de microorganismos empleado como inóculo.

El diseño de experimento se ajustó a un Modelo Cúbico Especial de 7 experimentos, distribuidos según las combinaciones que se expresan en la tabla 1 y que se visualizan en la figura 1.

Tabla 1: Variantes utilizadas experimentalmente.

Experimentos	<i>C. utilis</i>	<i>K. fragilis</i>	K.L-4
1	1	0	0
2	0	0	1
3	0	1	0
4	0,5	0	0,5
5	0,5	0,5	0
6	0	0,5	0,5
7	0,333333	0,333333	0,333333

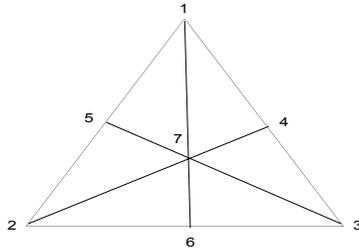


Figura 1. Puntos o zonas de evaluación.

Todas las variantes experimentales se realizaron por duplicado. Se muestreó al inicio a las 6 y 8 horas. Las variables de control del proceso fueron: pH, Brix, Biomasa y ART.

El modelo matemático empleado responde a la siguiente ecuación:

$$y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 \cdot X_2 + \beta_{13} X_1 \cdot X_3 + \beta_{23} X_2 \cdot X_3$$

X_1 : Cepa *C. Utilis*; X_2 : Cepa *K. Fragilis*; X_3 : Cepa *K.L-4*.

Se consideró como variable respuesta el rendimiento y la productividad del proceso fermentativo.

Resultados y discusión.

Se observan en los resultados que la concentración de ART decrece en el tiempo a expensas de un incremento de la biomasa, característico de los sistemas a batch donde las condiciones del proceso cambian continuamente, se incrementa la densidad celular y disminuye la concentración de sustrato, teniendo un comportamiento similar en todas las variantes en los ART, comenzando la fermentación en todas las variantes con valores alrededor de 20,6 g/L de ART y terminando la fermentación con valores de ART alrededor de 3,8 g/L, no siendo así para la producción de biomasa (Figura 2) las cuales presentan diferencias significativas, que observamos el valor máximo en la variante (6) con el cultivo mixto (6) 0,5 *K. fragilis*/0,5 *K.L-4* con 7,85 g/L, siendo superior en un 14% a las variantes que le siguen, que son la (3) la cepa *K.L-4* con 6,95 g/L y variante (2) la cepa *K fragilis* con 6,75 g/L.

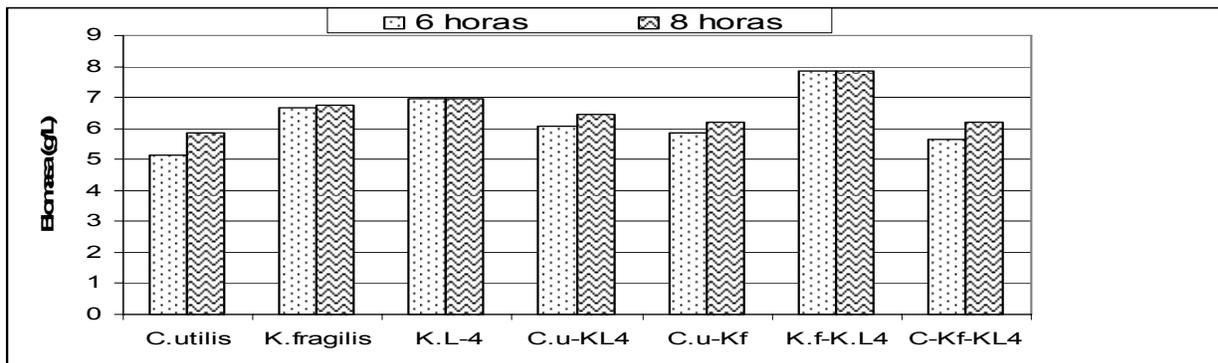


Figura 2. Biomasa obtenida a diferentes horas

Al observar los resultados del rendimiento biomasa/sustrato (Figura 3) y la productividad (Figura 4) vemos que presentan un mejor comportamiento la variante (6) cultivo mixto de 0,5 *K. fragilis*/0,5 *K.L-4* con un valor de 36,66% y productividad de 0,78 (g/Lh) la cual difiere del resto, siendo superiores en un 16,9% para el rendimiento y un 17,9% para la productividad para las variantes que le siguen que son las cepas en monocultivo de *K.fragilis* y la *K.L-4*.

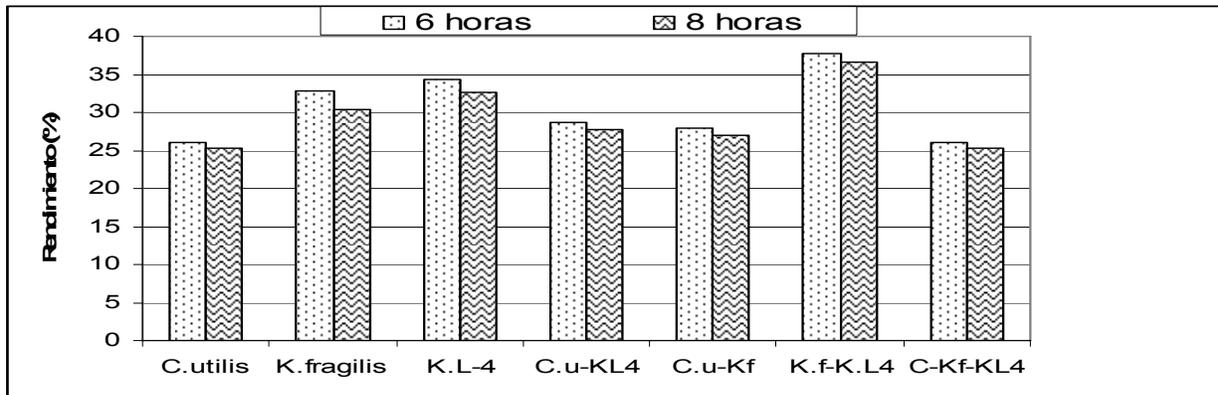


Figura 3. Rendimiento obtenido a diferentes horas.

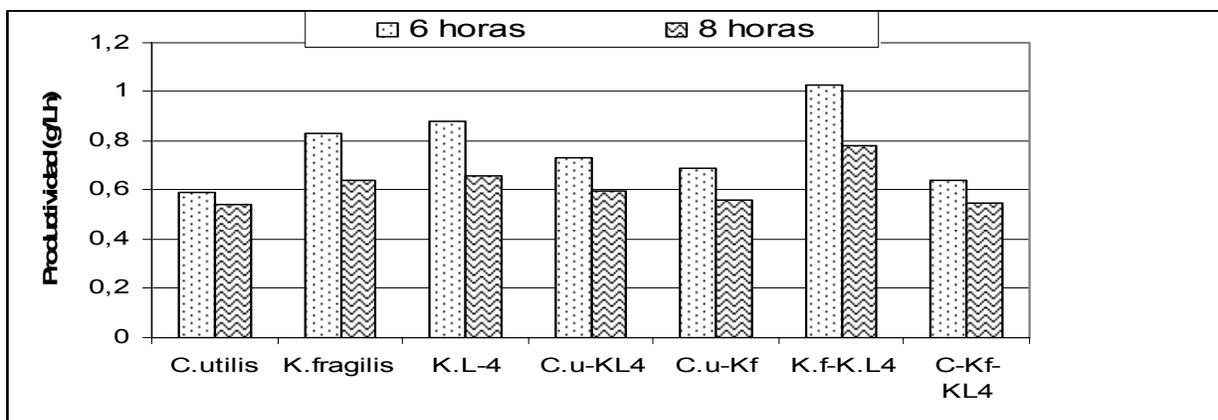


Figura 4. Productividad obtenida a diferentes horas.

Al estudiar los resultados obtenidos en cuanto al pH vemos que son similares de forma general tanto a las 6 y 8 horas en todas las variantes, pero es significativo que el pH más bajo se obtiene en la variante (6) cultivo mixto de 0,5 *K. fragilis*/0,5 *K.L-4* con un valor de 4,0 a las 6 horas lo cual es muy favorable ya que en ese valor no crecen las bacterias contaminantes de este medio fundamentalmente las proteolíticas.

Los resultados obtenidos fueron procesados estadísticamente según metodología para el diseño de experimento del tipo enrejado simple. Los modelos obtenidos para las variantes rendimiento y productividad a las seis horas se muestran a continuación:

$$Y_{\text{Rendimiento}} = 26,055 * X_1 + 32,745 * X_2 + 34,33 * X_3 + (- 5,74) * X_{12} + (-5,81) * X_{13} + 17,05 * X_{23} + (-149,295) * X_{123}$$

$$Y_{\text{Productividad}} = 0,59 * X_1 + 0,825 * X_2 + 0,88 * X_3 + (0,88) * X_{12} + (-0,02) * X_{13} + 0,71 * X_{23} + (-5,235) * X_{123}$$

A partir de los modelos cúbicos especiales del diseño experimental de enrejado simple para cada una de las propiedades seleccionadas, se observan en las figuras 5 a la 7 donde se expone una amplia y detallada información, dada por las isolíneas a todos los niveles de composición, lo que permite obtener una selección de la mejor región de combinación (Figura 7) que va desde 0,05 *K.fragilis* con 0,95 *K.L-4* y 0,91 *K.fragilis* con 0,09 *K.L-4*, y aún más exactamente el punto óptimo de la combinación de las cepas donde se obtiene la mayor eficiencia en cuanto a la producción de biomasa (7,86 g/L), rendimiento (37,84%) y productividad (1,03 g/Lh), siendo el mismo para la combinación de las cepas a 0,46 *K. fragilis* y 0,54 *K.L-4*.

Los modelos obtenidos para las variantes rendimiento y productividad a las ocho horas se muestran a continuación:

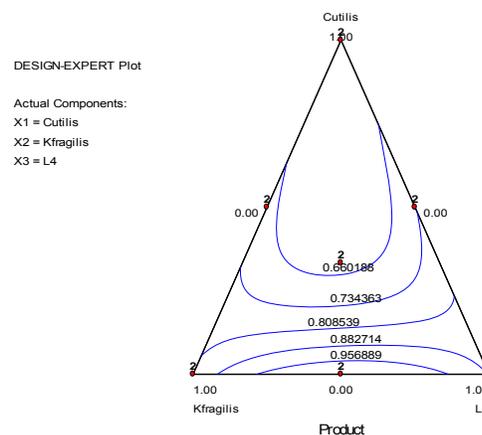
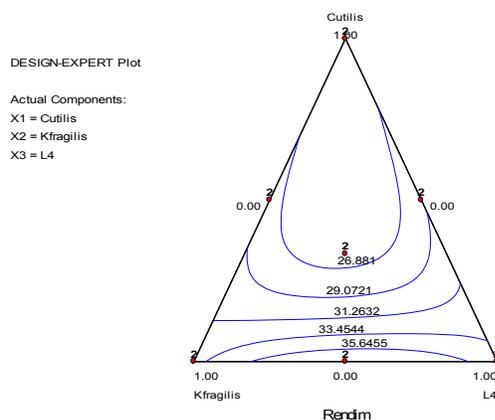
$$Y_{\text{Rendimiento}} = 25,185 * X_1 + 30,45 * X_2 + 32,64 * X_3 + (-3,65) * X_{12} + (-4,43) * X_{13} + 20,44 * X_{23} + (-146,7) * X_{123}$$

$$Y_{\text{Productividad}} = 0,535 * X_1 + 0,635 * X_2 + 0,66 * X_3 + (-0,1) * X_{12} + 0,01 * X_{13} + 0,53 * X_{23} + (-2,94) * X_{123}$$

Además, a partir de los modelos cúbicos especiales del diseño experimental de enrejado simple para dichas propiedades seleccionadas, obtuvimos las figuras 8 a la 10 donde se observa una amplia y detallada información dada por las isolíneas a todos los niveles de composición, lo que permite obtener una selección de la mejor región de combinación (Figura 10) que va desde 0,1 *K. fragilis* con 0,9 *K.L-4* y 0,85 *K. fragilis* con 0,15 *K.L-4*, y aún más exactamente el punto óptimo de la combinación de las cepas donde se obtiene la mayor eficiencia en cuanto a la producción de biomasa (7,85 g/L), rendimiento (36,71%) y productividad (0,78 g/Lh), siendo el mismo para la combinación de las cepas a 0,46 *K. fragilis* y 0,54 *K.L-4*.

Figura 5: Variable de respuesta rendimiento a 6 horas.

Figura 6: Variable de respuesta productividad a 6 horas.



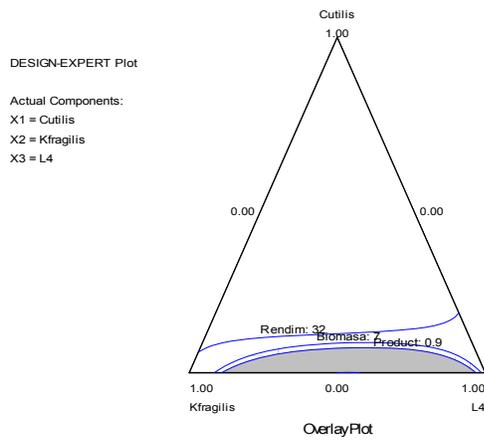


Figura 7: Zona óptima de las variables de respuesta a las 6 horas.

Figura 8: Variable de respuesta rendimiento a 8 horas.

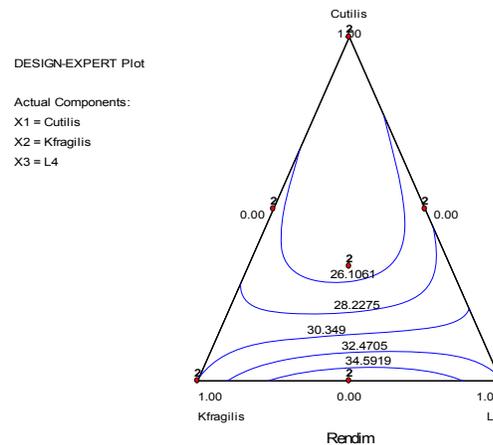


Figura 10: Zona óptima de las variables de respuesta a las 8 horas.

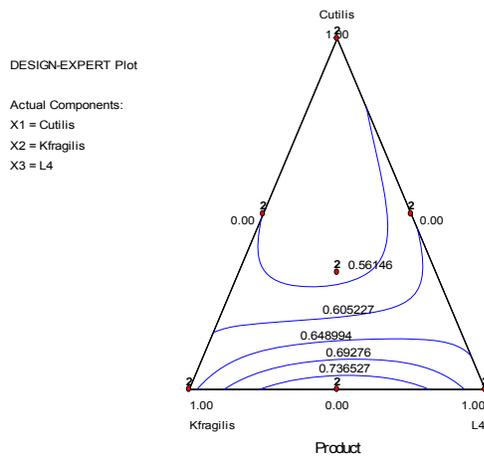
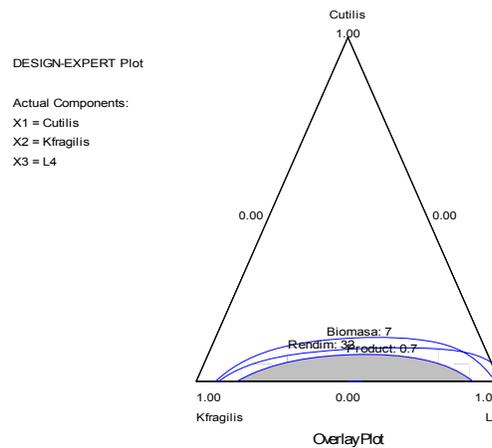


Figura 9: Variable de respuesta productividad a 8 horas



Al realizar un análisis de los resultados obtenidos a las 6 horas en las principales variables analizadas como producción de biomasa, rendimiento, productividad y velocidad específica de crecimiento, se observa que hay un mejor comportamiento que a las 8 horas y como podemos apreciar en ambos muestreo el punto óptimo de combinación de las cepas es el mismo, por lo que proponemos realizar la fermentación de este cultivo mixto en la obtención de biomasa proteica en estas condiciones de trabajo a 6 horas, optimizando el tiempo de fermentación en 2 horas.

Conclusiones

- El estudio realizado demuestra la factibilidad de aplicar el diseño experimental de enrejado simple, para predecir la zona más prominente y el punto óptimo de la combinación de varias cepas de microorganismo para diseñar un cultivo mixto.

- El cultivo mixto presenta mejores resultados que las cepas en monocultivo, siendo las mas promisorias las combinaciones de *K. fragilis* con *K.L-4 UCLV*.
- La zona de combinación entre las cepas *K. fragilis* y *K.L-4 UCLV* para obtener buenos resultados va desde 0,1 *K. fragilis* / 0.9 *K.L-4* y 0,85 *K. fragilis*/ 0.15 *K.L-4*.
- Proponemos disminuir a 6 horas el tiempo de fermentación al utilizar este cultivo mixto de cepas de *K. fragilis* con *K.L-4 UCLV*.

Bibliografía.

1. Guerra G, Casado G, Sánchez MI, y otros. 2003. Utilización de azúcares y licores por diferentes cepas de Levaduras: Aplicación en la alimentación animal. Memorias CD. II Conferencia Internacional de Química de la Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba.
2. Herrera N, García A, Marín A y Díaz I. 2003 "Estudio comparativo de cepas de levaduras en la producción de biomasa proteica para la alimentación animal." Memorias CD. II Conferencia Internacional de Química de la Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba.
3. Kunz B. 1986. Cultivo de microorganismos para la producción de alimentos. Editorial ACRIBIA, S.A. Zaragoza. España.
4. López JL, Pérez R, Toriza F, y otros. 1998. Biomasa proteica semirústica. Una opción al productor de cerdos. Recopilación de los resultados obtenidos por el CIBA. V Aniversario.
5. Nally MC, Maturano YP, Vázquez F y Toro ME. 2005. Comportamiento de una cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae killer* y su isogénica sensible respecto de diferentes fuentes de nitrógeno en cultivos mixtos. Revista Argentina de Microbiología. Volumen 37. No. 2. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.
6. Santos R, Herrero ER, Pedraza J, y otros. 2000. Estrategia de análisis de alternativas para la reactivación de las instalaciones actuales de levadura torula. Memorias del VI Congreso Internacional sobre Azúcar y sus Derivados de la Caña. Diversificación 2000. Cuba.
7. Scheffe H. 1958. Experiments with mixture. Journal of Ryal. Statistical Society, serie B. Vol. 20. Pág. 314-360.