

Estudio de la fermentación en zaranda de prehidrolizados químicos de muello mediante cepas de levadura sin enriquecer y enriquecidas en metionina

R. LÓPEZ PLANES

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

Recibido: 12 de enero de 1977

ABSTRACT. Two different strains of *Candida utilis* Y-900 and YE-11-10 were used the last one being a mutant richer in Methionine. Both were cultivated in chemical prehydrolyzates from sugar cane pith obtained with 1% sulfuric acid, at 140°C in 2.5 hours. The fermentation was carried out in a shaker. A factorial statistical design 2^{4-1} was used and adapted to the maximal specific velocity growth through a lineal equation with the independent variables: temperature, pH, concentration of yeast extract and peptone, and concentration of a solution of metal salts. For the Y-900 strain it was convenient to diminish the temperature, to work with a higher concentration of peptone and yeast extract, but the pH, the solution of metal salts and the interaction of the variables aren't significant. For the YE-11-10 strain we used a 2^{3-1} design, not considering the temperature, finding that neither the pH nor the solution of metal traces are significant. The best conditions for the fermentation were obtained with the YE-11-10 strain at pH = 5.5 without the solution of metal salts.

RESUMEN. Se utilizaron dos cepas de *Candida utilis* Y-900 y YE-11-10, esta última enriquecida en metionina, creciendo en prehidrolizados químicos de muello obtenidos a 140°C con ácido sulfúrico al 1% durante 2.5 horas. La fermentación se llevó a cabo en zaranda diseñando las experiencias mediante un plan factorial 2^{4-1} adaptado a la velocidad máxima de crecimiento en forma de un polinomio lineal con las variables temperatura, pH, concentración de extracto de levadura y peptona y concentración de solución de trazas de sales de metales. Del análisis estadístico se obtuvo para la cepa Y-900 que conviene disminuir la temperatura y aumentar la concentración de peptona y extracto de levadura pero que ni el pH, ni la solución de trazas de sales ejercen influencia, además las interacciones de variables no dieron significativas. Para la cepa YE-11-10 se usó un diseño 2^{3-1} , no considerándose la temperatura, obteniéndose que ni el pH, ni la solución de trazas de sales ejercen un efecto significativo. Las mejores condiciones de crecimiento se obtuvieron para la cepa YE-11-10 a pH = 5.5, y sin solución de trazas de sales.

INTRODUCCION

La fermentación de los prehidrolizados químicos de bagazo mediante levaduras, permite obtener biomasa rica en proteínas, aminoácidos y vitaminas con la cual enriquecer el pienso para la alimentación animal, pues la adición de un 2 a un 5% de levadura convierte el forraje en un alimento balanceado (*Barkan, 1968*).

El estudio de la fermentación de los prehidrolizados es importante por su alto contenido de furfural, el cual se ha comprobado que tiene un fuerte efecto inhibitorio del crecimiento de las levaduras (*Sánchez y López, 1973*) particularmente para concentraciones superiores a 50-60 mg/100 ml (*Sánchez y López, 1973; Gregr, 1972*). El hidroximetil furfural, otro posible inhibidor, no realiza un efecto inhibitorio apreciable en los rangos en que usualmente se encuentra (*Martín, 1975*). Aunque existen cepas de levadura que se adaptan a concentraciones de furfural relativamente elevadas. (*Radionova, 1965*), en los hidrolizados de madera se ha observado que las levaduras capaces de asimilar arabinosa y xilosa utilizan estos azúcares con dificultad (*Kriuchkova, 1962*).

Es conocido que la xilosa o la arabinosa pueden penetrar dentro de las levaduras de los géneros *Sacharomyces* y *Cándida* mediante un mecanismo de transporte biológicamente activo, distinto de la simple difusión osmótica (*Heredia y Solo, 1968; Cirilo, 1968*).

Con anterioridad hemos utilizado cepas de *Cándida* útilis, para la fermentación de prehidrolizados de bagazo, aunque también se han utilizado cepas de *Cándida* sp. en la fermentación de prehidrolizados acuosos de Pino y Alerce. El prehidrolizado se "sopla" con aire a 80°C para oxidar el furfural y disminuir su efecto inhibitorio. Las velocidades específicas obtenidas son del orden de 0.2 hora⁻¹ consumiendo del 94 al 96% de los reductores iniciales, en concentraciones del 2.3-3.7% y el furfural entre 0.036-0.069%. El rendimiento de biomasa fue de 50-63% (*Kalunianyz y Fisher, 1967*).

También se han obtenido resultados interesantes utilizando *Cándida* scotti; *Cándida* sp. y *Cándida* tropicalis en la fermentación simultánea de soluciones de prehidrolizados, hidrolizados y ácidos orgánicos. (*Dudkin, 1969*).

La disminución del furfural y el color de los prehidrolizados con ozono o con aire ha resultado en aumentos del rendimiento de levadura en un 13% (*Uzlov y Sharkov, 1967*).

El tratamiento con carbón activado de los prehidrolizados de pino ha sido utilizado también para eliminar materias colorantes e inhibidores del crecimiento (*Korolkov, 1967; Sapranov, 1966; Taraciuk, 1972*).

En nuestros trabajos previos de la fermentación de prehidrolizados químicos de bagazo utilizamos cepas de levadura que fermentaban regularmente los prehidrolizados constituidos mayormente por pentosas por lo que fue necesario buscar nuevas cepas y al efecto utilizamos una cepa Cándida útil denominada Y-900 procedente de P. S. Dawson del National Research Council of Canada y un mutante de esta cepa enriquecida en metionina mediante pases sucesivos en etionina con el fin de aumentar su contenido en metionina, la cual tiene un efecto notable en el crecimiento del ganado, estos mutantes, conocidos como YE-11-10, fueron desarrollados en el departamento de Genética del CENIC (*Alvarez y Herrera, 1975*) a los cuales deseamos agradecerle su cooperación. Como una parte de la temática general del trabajo se han aplicado métodos modernos de análisis para la determinación de metionina en estas cepas (*Sánchez y cols., 1975*).

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó como sustrato para la fermentación, prehidrolizado químico de meollo industrial, procedente del central FNTA, el cual fue prehidrolizado con ácido sulfúrico al 1% durante 2.5 a 3 horas en una autoclave a 134°C, obteniéndose una solución con 3% de reductores, una concentración de furfural de 60-75 mg/100 ml y un fuerte color oscuro que se acentuaba después de la neutralización con sosa hasta pH entre 4.5 y 5.5 inclusive con notable presencia de turbidez.

Este hecho no se nos había presentado en la fermentación de prehidrolizados químicos de bagazo y lo atribuimos a que el meollo posee un contenido de cenizas elevado, del orden del 8% del peso seco, de las cuales una parte pasa a la solución durante la prehidrólisis (*López Planes, 1974*).

Para eliminar estas dificultades se añadieron 2 g/l de carbón activado, filtrándose en filtro de porosidad G-3 recubierto con una capa de tierra de infusorios, disminuyéndose el color notablemente y la densidad óptica hasta valores de 0.1.

Se ajusta el pH a los valores de interés, esterilizándose a media atmósfera para evitar descomposición de los azúcares y posible nueva formación de furfural. En este proceso de esterilización hemos observado que el contenido de furfural baja hasta de 45 a 50 mg/100 ml que cae dentro del rango permisible.

La disminución de reductores en todo este proceso es del orden del 4% de los iniciales, quedándonos una solución con alrededor de 2.88% de reductores.

Se utilizaron dos cepas de *Cándida útilis*, la Y-900 y el mutante enriquecido en metionina YE-11-10.

Para tener un inóculo fresco, se sembró al microorganismo en placa con el medio de mantenimiento anteriormente desarrollado por nosotros y a las 48 horas de inoculación a la temperatura de 28°C se le añaden 5 ml de agua estéril, se raspa cuidando de tomar todas las colonias y se añade a un erlenmeyer que contenga 20 ml de agua estéril, se homogeniza bien y de ahí se inocula 1 ml en cada erlenmeyer de 500 ml con tubo lateral soldado, donde previamente se habían añadido 50 ml de prehidrolizados químicos con el pH y la concentración de nutrientes adecuada.

Estos erlenmeyer se colocaron en una zaranda a 100 golpes por minuto en un cuarto de temperatura constante. Siguiéndose el crecimiento por lecturas de D.O., (densidad óptica), a 660 nm en un espectrocolorímetro Spekol de la Carl Zeiss. Determinándose la velocidad específica máxima de crecimiento " μ_M " por la pendiente del diagrama semilogarítmico de D.O. contra el tiempo.

Las experiencias realizadas se diseñaron estadísticamente mediante un plan factorial 2^{4-1} , (*Bacon y Henson, 1971*) considerando como variables la temperatura, el pH, presencia de peptona y extracto de levadura y presencia de solución de trazas de sales, para la cepa Y-900.

La matriz D indica las experiencias realizadas.

X_1	X_2	X_3	X_4
(pH)	(Temperatura)	(Peptona y extracto de levadura)	(Solución de trazas de sales)
-1 (5.0)	-1 (30°C)	-1 (NO)	-1 (NO)
1 (5.5)	-1 (30°C)	-1	1 (SI)
-1	1 (33°C)	-1	1
1	1 (33°C)	-1	-1
-1	-1	1 (SI)	1
1	-1	1	-1
-1	1	1	-1
1	1	1	1

Los resultados de estas 8 experiencias permitirán calcular los coeficientes del polinomio.

$$\mu_M = a_0 + a_1 [\text{pH}] + a_2 [\text{Temp.}] + a_3 [\text{Peptona} + \text{Extracto de levadura}] + a_4 [\text{solución de trazas de sales}] + a_{12} [\text{pH}] [\text{temp.}] + \dots$$

aunque siempre se codifican las variables mediante la expresión:

$$X = \text{Variable codificada} = \frac{\text{Variable} - \frac{\text{Valor alto de la variable} + \text{Valor bajo de la variable}}{2}}{\frac{\text{Valor alto de la variable} - \text{Valor bajo de la variable}}{2}}$$

quedando el polinomio como:

$$\mu_M = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_{12} X_1 X_2 + \dots$$

Estos coeficientes se calculan mediante la regresión lineal matricial:

$$B = \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \\ \vdots \end{bmatrix} = [X'X]^{-1} X'Y = C X'Y$$

donde: X = matriz de las variables independientes

X' = transpuesta de X

Y = vector de los resultados experimentales

C = matriz de precisión

En nuestro caso particular:

$$B = (1/8) X'Y$$

Para la cepa YE-11-10 se hizo uso de un diseño estadístico 2^{3-1} eliminándose la temperatura como variable, trabajándose solo a 33°C.

En este caso la matriz D será:

X_1	X_2	X_3
(pH)	(Peptona + extracto de levadura)	(Solución de trazas de sales)
-1 (5.0)	-1 (NO)	1 (SI)
1 (5.5)	-1	-1 (NO)
-1	1 (SI)	-1
1	1	1

$$D = \begin{bmatrix} -1 (5.0) & -1 (NO) & 1 (SI) \\ 1 (5.5) & -1 & -1 (NO) \\ -1 & 1 (SI) & -1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

la cual corresponde a solo 4 experiencias.

En este caso:

$$B = \begin{bmatrix} b_0 \\ b_1 \\ b_2 \\ b_3 \end{bmatrix} = (1/4) X'Y$$

para el polinomio:

$$\mu_M = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + \dots + b_3 X_3$$

Como se van a calcular tantos coeficientes como puntos experimentales haya, no quedarán grados de libertad para determinar un estimado interno de la varianza por lo que en cada plan factorial hemos realizado repeticiones y de esta forma tener un mejor estimado de la varianza del error puro que denotaremos por S^2 p.e. y se calcula por las expresiones usuales, (*Bacon y Henson, 1971; Köllner, 1971; López Planes, 1974*) y finalmente haciendo uso de los elementos de la diagonal de la matriz de precisión C se pueden calcular las varianzas de cada coeficiente del polinomio mediante:

Para el plan 2^{4-1}

$$S_{b_0}^2 = S_{b_1}^2 = S_{b_2}^2 = \dots = S_{b_{12}}^2 = (1/8) S^2 \text{ p.e.}$$

Para el plan 2^{3-1}

$$S_{b_0}^2 = S_{b_1}^2 = S_{b_2}^2 = S_{b_3}^2 = (1/4) S^2 \text{ p.e.}$$

Se considerarán como coeficientes significativos aquellos cuyo valor sea mayor que dos veces su desviación standard, para el intervalo de 95% de confianza.

Es conveniente aclarar, con respecto a las variables que indican presencia de extracto de levadura y peptona y presencia de solución de trazas de sales, que esta presencia se refiere a la concentración de estos compuestos, utilizada en el medio anteriormente desarrollado por nosotros, mediante una modificación del de Reese cuyas características se muestran en la Tabla I y todos los demás compuestos permanecen invariables usándose las concentraciones señaladas.

Composición de la solución de trazas de sales.

$\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g/l de agua destilada
$\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.4 g/l de agua destilada
$\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g/l de agua destilada
$\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.25 g/l de agua destilada

TABLA I
Composición del medio Reese modificado

SO ₄ (NH ₄) ₂	1.4	gramos/litro de prehidrolizado químico				
PO ₄ H ₂ K	2.042	"	"	"	"	"
Urea	0.3	"	"	"	"	"
Cl ₂ Ca	0.3	"	"	"	"	"
SO ₄ Mg 7H ₂ O	0.3	"	"	"	"	"
Peptona	0.5	"	"	"	"	"
Extracto de levadura	0.5	"	"	"	"	"
Solución de trazas de sales	50 ml	"	"	"	"	"

RESULTADOS

Las Figs. 1-4 muestran el crecimiento de la levadura Y-900 en las distintas condiciones del plan 2⁴⁻¹ graficando la D.O. en un diagrama semi-logarítmico contra el tiempo.

La Tabla II indica las condiciones experimentales de cada punto del plan, los resultados de μ_M y el valor $\Delta\mu_M^2 = (\mu_{M_1} - \mu_{M_2})^2$ para las dos experiencias de cada punto, lo cual nos permitirá calcular la varianza experimental S² p.e. mediante:

$$S_{p.e.}^2 = \frac{\sum_{i=1}^I \Delta\mu_M^2}{2I}$$

donde I = 8 = condiciones experimentales distintas.

Y con estos valores

$$S^2_{p.e.} = 10.84 \times 10^{-4}$$

$$S_{p.e.} = 0.033$$

de igual forma

$$S_{b_0}^2 = S_{b_1}^2 = S_{b_2}^2 \dots = S_{b_{12}}^2 = \dots = (1/8) S^2_{p.e.} = 1.36 \times 10^{-4}$$

de donde:

$$S_{b_0} = S_{b_1} = \dots S_{b_{12}} = 0.0116$$

y resolviendo la ecuación de regresión del plan factorial se obtuvo:

$$\begin{array}{ll} b_0 = 0.3596 & b_4 = 0.01188 \\ b_1 = - 0.00688 & b_{12} + b_{34} = - 0.01713 \\ b_2 = - 0.0226 & b_{13} + b_{24} = 0 \\ b_3 = + 0.0376 & b_{23} + b_{14} = 0.01763 \end{array}$$

donde se ha señalado el hecho de que por tratarse de un plan 2^{4-1} fraccionario, deben aparecer confundidos los coeficientes: $b_{12} + b_{34}$; $b_{13} + b_{24}$; $b_{23} + b_{14}$.

Considerando como significativos aquellos coeficientes mayores que $2Sb_0 = 2Sb_1 = \dots = 2Sb_{12} = \dots = 0.0232$

El polinomio quedará finalmente:

$$\mu_M = 0.356 - 0.023 X_2 + 0.0376 X_3$$

Se observa que conviene disminuir la temperatura y añadir peptona y extracto de levadura, pero que el pH no ejerce efecto notable en ese rango, no es necesario añadir trazas de sales pues el medio debe poseer los suficientes, lo cual es lógico por tratarse de un prehidrolizado de meollo que como ya señalamos debe poseer suficiente concentración de sales en solución debido a que el meollo tiene una alta concentración de cenizas.

Si se desea volver a las variables originales sólo es necesario sustituir las definiciones de X_2 y X_3 .

Si se comparan estos valores de μ_M de la cepa Y-900 en la fermentación de prehidrolizados de meollo con los obtenidos en nuestros trabajos anteriores con cepas salvajes fermentando prehidrolizados de bagazo en las mejores condiciones experimentales ($\mu_M = 0.282$), por ejemplo, se ve que la cepa Y-900 presenta una velocidad específica de crecimiento mucho mayor.

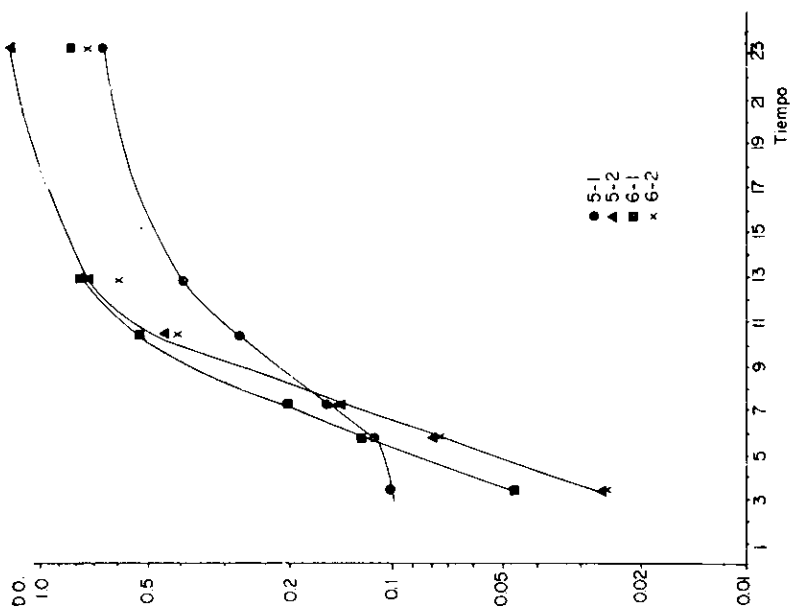


Fig. 2. Fermentación de prehidrolizados de meollo industrial. Ceba Y-900.

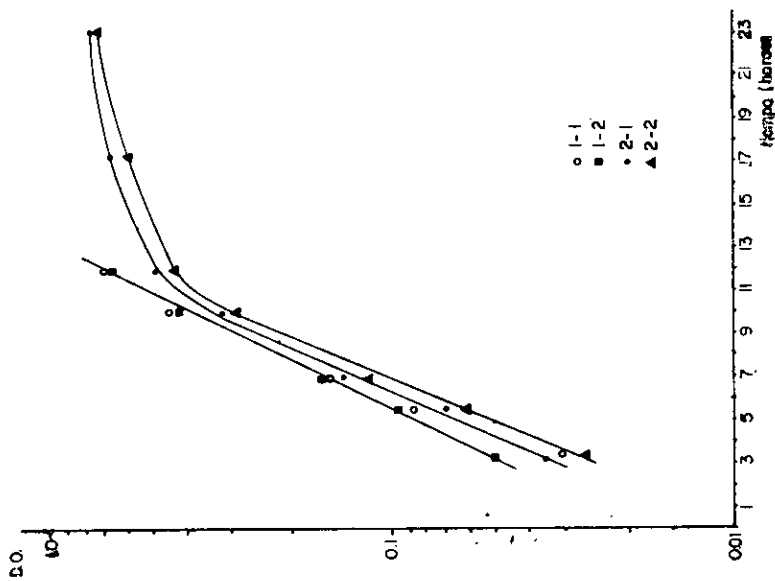


Fig. 1. Prehidrolizado químico de meollo industrial fermentación con Y-900.

TABLA II

Fermentación de prehidrolizados de meollo con Y-900

Muestra	pH	Temp.	Peptona + Extracto	Trazas de sales	μ_M	μ_M promedio	$\Delta\mu_M^2$ $\times 10^4$	t_d
1-1	5	30°C	no	no	0.319	0.305	7.84	2.17
1-2					0.291			2.38
2-1	5.5	30	no	sí	0.333	0.349	9.61	2.08
2-2					0.364			1.09
3-1	5	33	no	sí	0.330	0.353	20.25	2.1
3-2					0.375			1.85
4-1	5.5	33	no	no	0.273			2.53
4-2					0.241	0.281	24.01	2.88
4-3					0.309			2.24
4-4					0.302			2.29
5-1	5	30	sí	sí	0.465	0.439	28.1	1.49
5-2					0.412			1.68
6-1	5.5	30	sí	no	0.396	0.436	62.4	1.75
6-2					0.475			1.46
7-1	5	33	sí	no	0.346	0.369	20.25	2.00
7-2					0.391			1.77
8-1	5.5	33	sí	sí	0.35	0.345	1.0	1.98
8-2					0.34			2.02

Las Figs. 4 y 5 muestran el crecimiento de la cepa YE-11-10. En la Tabla III se muestran los resultados.

$$\mu_M = 0.42 + 0.0175 X_1 - 0.04 X_2 + 0.005 X_3$$

para este caso:

$$S^2 \text{ p.e.} = 8.75 \times 10^{-4}$$

$$S \text{ p.e.} = 0.03$$

$$S^2 b_0 = S^2 b_1 = S^2 b_2 = S^2 b_3 = (1/4) (8.75 \times 10^{-4}) = 2.19 \times 10^{-4}$$

de donde todos los coeficientes mayores de $2Sb_0 = 2Sb_1 = \dots = 0.03$ serán significativos y el polinomio quedará.

$$\mu_M = 0.42 - 0.04 X_2$$

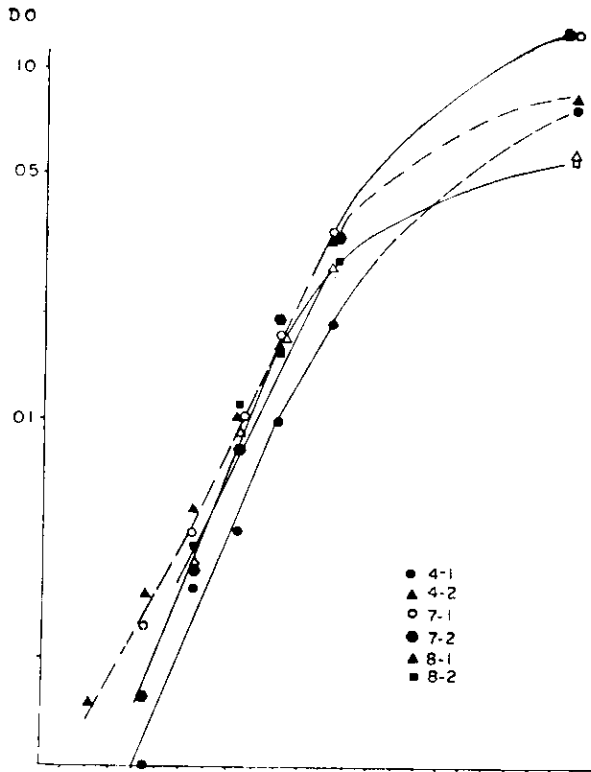


Fig. 3. Fermentación de prehidrolizados químicos de meollo industrial con cepas de *Cándida utilis* Y-900.

Se observa que el pH no ejerce un efecto significativo, por lo que industrialmente será recomendable trabajar a pH bajo para eliminar contaminaciones. La solución de trazas de sales no es necesaria y además el efecto negativo de X_2 está en favor de no añadir la peptona y extracto

de levadura. Este hecho es interesante pues nos señala claramente que el nuevo mutante YE-11-10 no requiere la adición de peptona y extracto de levadura mientras que la cepa Y-900 sí la requería, por otra parte esta cepa YE-11-10 resiste mejor las altas temperaturas pues manifiesta un valor de μ_M promedio a 33°C de 0,42 mientras que la Y-900 de $\mu_M = 0,337$ considerando solo las experiencias a 33°C y de μ_M promedio = 0.382 a 30°C.

O sea que existe una diferencia significativa con más de un 95% de confianza entre el μ_M de la cepa YE-11-10 y la Y-900.

No es necesario hacer los cálculos para determinar que la cepa YE-11-10 presenta, además, mejor velocidad de crecimiento que la *Cándida utilis* salvaje usada por nosotros en nuestro primer trabajo ($\mu_M = 0.282$) y que la *Cándida* sp. usada por Kalunianyz ($\mu_M = 0.20$).

Finalmente queremos señalar que el contenido de metionina de esta cepa YE-11-10 oscila entre 0.8 y 0.9 mg/100 mg de peso de biomasa seca, contra 0.5-0.6 para la Y-900 según habíamos determinado anteriormente (Sánchez y cols., 1975).

TABLA III

Fermentación de prehidrolizados de meollo con cepa YE-11-10, a 33° en zaranda

Muestra	pH	Peptona + extracto	Solución de trazas de sales	μ_M	t_d	μ_M promedio
1-1	5	no	sí	0.45	1.54	0.45
1-2				0.45		
2-1	5.5	no	no	0.428	1.62	0.47
2-2				0.511	1.36	
3-1	5	sí	no	0.356	2.07	0.355
3-2				0.353	2.11	
4-1	5.5	sí	sí	0.412	1.68	0.405
4-2				0.399	1.74	

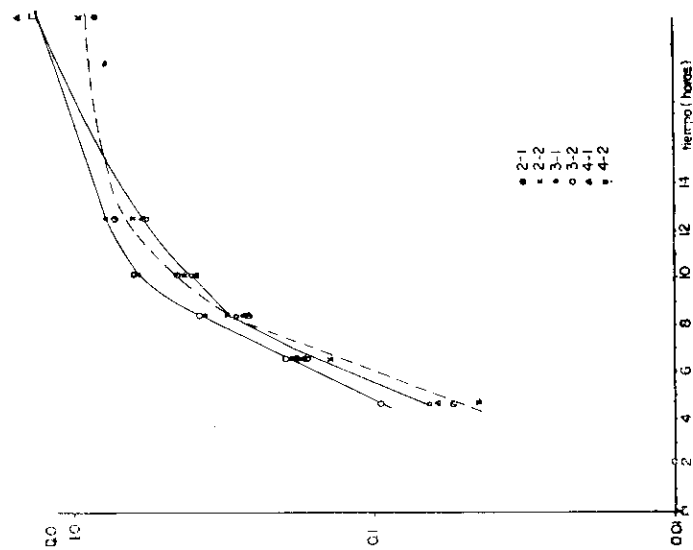


Fig. 5. Fermentación de prehidrolizados químicos de meollo industrial con cepa Y-900.

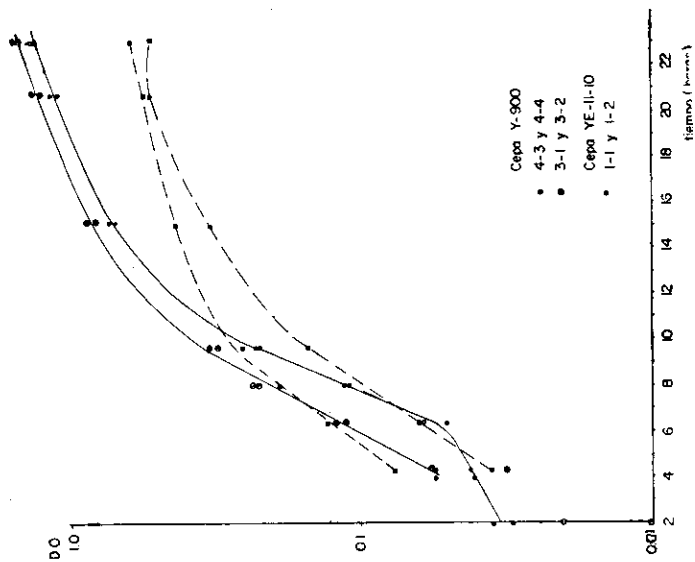


Fig. 4. Fermentación de prehidrolizados químicos de meollo industrial con cepas de *Cándida utilis* Y-11-10.

REFERENCIAS

- ALVAREZ X. Y HERRERA L. *Revista CENIC* 6, 87, 1975.
- BACON D. AND HENSON T. Statistical Design and Model Building Department of Chem. Eng. Queen's Univ. Ontario, Canada, 1971.
- BARKAN N.V. *Gidroliznaya i Lesokhim Prom.* 8, 1, 1968; 1, 1, 1968.
- CIRILO V. *J. of Bacteriology.* Feb., 604, 1968.
- DUDKIN M.S. *Gidroliz i Lesokhim Prom.* 4, 5, 1969.
- GREGG B. 40ta. Conferencia de la ATAC. Cuba, 1972.
- HEREDIA D.F. AND SOLO A. DE LA FUENTE. *European J. Biochem.* 5, 321, 1968.
- KALUNIANZYZ N.P. AND FISHER P.N. *Gidroliznaya i Lesokhim Prom.* 8, 1967.
- KÖLLNER H. Planificación experimental en la Ingeniería Química. Univ. de La Habana. *Serie* 6, 7, 1971.
- KOROLKOV I.I. *Gidroliz i Lesokhim Prom.* 1, 1967.
- KRIUCHKOBA A.P. *Gidroliz i Lesokhim Prom.* 2, 5, 1962.
- LÓPEZ PLANES R. 7ma. Conf. de Química de Oriente; Univ. de Oriente, Cuba. Dic., 1974.
- LÓPEZ PLANES R. Notas de Estadísticas y Diseño Estadístico, Centro Nac. de Inv. Cient., Univ. de La Habana, 1975.
- MARTÍN A. Informe Temático sobre "Miel Hidrolítica" CID. No. 111, 2.5 D. ICIDCA, Cuba, 1975.
- RADIONOVA G.S. *Gidroliznaya i Lesokhim. Prom.* 2, 1965.
- SÁNCHEZ O. Y LÓPEZ PLANES R. IV Sem. Científico del CENIC, Dic. 1973, La Habana, Cuba.
- SÁNCHEZ O. ALVAREZ X., LÓPEZ PLANES R. Y HERRERA L. *Revista Cenic*, 6, 77, 1975.
- SAPRONOV A.P. *Sajarnaya Promishlenost* 8, 10, 1968.
- TARACIUK D.D. *Gidroliz. i Lesokhim. Prom.* 5, 7, 1972.
- VZLOV G.A. AND SHARKOV V.I. *Kont. Khim. Technolog. Lening. Lesotek. Akad.* 61, 1967.