

ESTUDIO DE LA COMPOSICION QUIMICA DE BIOMASAS CELULARES DE LEVADURAS¹

Hugo E. Scarinci², Graciela Umansky²
y Marta S. Carrasco de Mendoza³

Facultad de Ingeniería Química
Universidad Nacional del Litoral
Santa Fe, Argentina

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue analizar cepas de levaduras de posible utilización en alimentación animal, obtenidas por fermentación en sistema batch, utilizando suero efluente de quesería como sustrato hidrocarbonado principal.

Para el caso, se procedió al análisis químico de 10 cepas de levaduras seleccionadas en base a su capacidad productora de biomasa.

Según revelaron los resultados obtenidos, la composición química de las mismas es muy variable, presentando en todos los casos un alto contenido proteínico, buena solubilidad, y digestibilidad enzimática.

En todas ellas, el tenor de RNA es bajo, siendo este valor importante cuando la biomasa se destina a la alimentación humana. Por otra parte, el contenido en aminoácidos esenciales es adecuado, aunque deficitario en aminoácidos azufrados.

De las levaduras sometidas a ensayo, se destaca la No. 10: *Kluyveromyces marxianus var. lactis* por su adecuada relación entre el contenido proteínico y el de RNA, así como por la detección de metionina entre sus aminoácidos esenciales.

Manuscrito modificado recibido: 26-9-89.

- 1 Este trabajo se llevó a cabo bajo los auspicios de la Secretaría de Ciencias y Tecnología del Ministerio de Justicia y Educación de la Nación Argentina (SECYT), Subsidio No. 10670/83-8.
- 2 Miembros del Departamento de Bioingeniería, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santiago del Estero 2829, (3000) Santa Fe, Argentina.
- 3 Directora del Proyecto de SECYT: "Investigación de la Naturaleza Proteínica de Biomosas Celulares Producidas con Levaduras Lácteas Usando Suero de Quesería".

INTRODUCCION

El suero de quesería es uno de los efluentes industriales contaminantes del ambiente, y sólo un volumen parcial del mismo suele usarse en la alimentación animal, siendo en su mayor parte desaprovechado.

Esto ha dado lugar a numerosos estudios acerca de la factibilidad económica de su aprovechamiento (1-3), entre los cuales cobra gran importancia la producción de proteína unicelular (4). De esta última forma, se logra un preparado de alto contenido proteínico de posible aplicación en alimentación, así como la reducción de la demanda biológica de oxígeno del efluente utilizado como materia prima.

Muchos investigadores (5, 6) han concluido que las levaduras son los microorganismos que mejor se adaptan a la producción de biomasa proteínica, no sólo por su composición química adecuada, sino también por su fácil propagación.

En función de lo expuesto, se procedió a estudiar la recuperación del suero efluente de quesería, utilizándolo como sustrato base para la propagación de levaduras, las que pueden llegar a constituir una importante fuente de proteína.

Para ello, luego de aislar 50 cepas, se seleccionaron 10 de acuerdo con su capacidad productora de biomasa a fin de evaluar y comparar su calidad proteínica.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos Utilizados

Se trabajó con los siguientes géneros de levaduras: *Debaryomyces*, *Cándida*, *Kluyveromyces* y *Schizosaccharomyces*; las mismas fueron seleccionadas en un trabajo anterior (7, 8).

Preparación de la Muestra:

Las cepas de levaduras se desarrollaron en un medio de cultivo a base de suero residual de quesería, el cual se obtuvo de elaboraciones de quesos pategrás, de pasta semicocida, no lavada, cuya composición promedio es:

Lactosa	4.6 - 4.8 %
Materia grasa	0.6 %
Sólidos totales	7 %
Nitrógeno total	0.85 - 0.90 %

La propagación se llevó a cabo en un fermentador columniforme de vidrio de un litro de capacidad, que opera en sistema batch. Dicho proceso se optimizó con una metodología basada en la práctica de un conjunto de ensayos ordenados conforme una estructura de cuadrados latinos, que permite investigar tres factores simultáneamente (temperatura, pH y concentración inicial de lactosa). Teniendo en cuenta los rendimientos alcanzados (9, 10), se aconseja trabajar a una temperatura de 27°C y a pH:4 (factores que minimi-

zan el desarrollo bacteriano), con una concentración inicial de lactosa del 4.8%, que es la única variable que influye significativamente en el proceso. Se obtiene así un rendimiento óptimo en biomasa proteínica, lográndose un buen aprovechamiento del suero efluente de quesería.

Las biomasas de levaduras se concentraron por centrifugación, se lavaron y liofilizaron, quedando disponibles para ser sometidas a los análisis químicos que se detallan a continuación.

Humedad — Se determinó, por medio del método gravimétrico. Las muestras se secaron hasta obtener peso constante, en estufa a 105°C (11).

Cenizas — Estas se cuantificaron por el método gravimétrico a 650°C (11).

Nitrógeno total — Se determinó por el método de Kjeldahl (micro) (11), y la proteína total se estableció como proteína bruta ($N \times 6.25$).

Contenido proteínico — Se aplicó el método de Folin-Ciocalteu (12), y el valor correspondiente se obtuvo por comparación con una curva patrón trazada con albúmina bovina pura.

Nitrógeno digerible — Se realizó una digestión enzimática con pepsina a pH:2 durante 48 hr (11). El nitrógeno no digerido, que se retiene por filtración, se dosó por el método de Kjeldahl, y el nitrógeno digerible se obtuvo por diferencia con el nitrógeno total.

Índice de solubilidad de nitrógeno — La muestra se solubilizó en agua y el nitrógeno no retenido por filtración se determinó por Kjeldahl (13).

Núcleoproteínas — En este caso, se aplicó el método de Orcinol (14), efectuándose la extracción de RNA con ácido perclórico 0.5 N a 37°C. El contenido de RNA, hidrolizado a nucleótico, se analizó por reacción colorimétrica con el reactivo de orcinol, y la curva patrón se trazó con una solución de RNA-levadura (Sigma). Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi Perkin-Elmer 139 UV-VIS, a 670 nm.

Análisis cualitativo de aminoácidos — Se sometió la biomasa a hidrólisis básica y ácida para detección de los aminoácidos presentes en la misma (15). Luego se separaron éstos de los otros constituyentes celulares, por retención en columnas con resinas de intercambio iónico (amberlite IR-120 Protónica) (16-17). Los aminoácidos retenidos fueron eluidos con solución amoniacal al 10% a un ritmo de 120 ml/hr, hasta reacción negativa en el eluido.

Su identificación se hizo por cromatografía en capa delgada, aplicando la técnica ascendente bidimensional (15). Se utilizaron placas para cromatografía DC-Alufolien Kieselgel 60 (MERCK).

Se emplearon los siguientes sistemas de solventes:

- a) n-butanol:ácido acético:agua (80:20:20) v/v para la primera dirección.
- b) fenol:agua (70:30) w/w para la segunda dirección, y para visualizar los aminoácidos, se usó el reactivo de ninhidrina.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en experiencias realizadas en sistema batch con un fermentador columniforme de vidrio de 1 lt de capacidad, para obtener el concentrado celular.

El proceso se completa en ocho horas, alcanzándose una concentración celular que varía en un rango de 180 a 720 10^6 células/ml. La lactosa se consume totalmente durante la fermentación.

TABLA 1
RESULTADOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS
EN EL FERMENTADOR COLUMNIFORME

Levadura No.	Género y especie	Células/ml	Rendimiento ^a
2	<i>Debaryomyces hansenii</i>	240x 10 ⁶	24
9	<i>Cándida famata</i>	180x 10 ⁶	21
10	<i>Kluyveromyces marxianus var. lactis</i>	720x 10 ⁶	42
13	<i>Cándida famata</i>	310x 10 ⁶	34
14	<i>Schizosaccharomyces japonicus var. versatilis</i>	(b)	42
19	<i>Cándida famata</i>	235x 10 ⁶	25
26	<i>Kluyveromyces marxianus var. marxianus</i>	650x 10 ⁶	40
27	<i>Cándida Kefyr</i>	240x 10 ⁶	24
28	<i>Cándida Kefyr</i>	245x 10 ⁶	25
29	<i>Kluyveromyces marxianus var. lactis</i>	700x 10 ⁶	41

a Expresado como gramos/litro (base húmeda).

b No se obtuvo resultado.

Los datos obtenidos en la evaluación de la composición química de las biomásas analizadas se indican en la Tabla 2.

A partir de estos datos se deduce que la composición química de la biomasa es muy variable, según la cepa analizada.

Respecto al contenido de nitrógeno total, se observaron valores adecuados en todos los casos, siendo destacables en este aspecto las cepas números: 10 - 13 - 26 - 27 - 28 y 29.

En lo que se refiere a proteína verdadera determinada con reactivo de Folin-Ciocalteu, se observaron valores altos en las cepas números: 9 - 10 - 26 - 28 y 29.

Se pudo apreciar que el nitrógeno proveniente de proteína verdadera representa 61% y 97% del nitrógeno total, siendo la cepa 10 la que acusa la mayor cantidad de proteína verdadera y la mejor relación proteína verdadera/proteína total.

TABLA 2
COMPOSICION QUIMICA DE LEVADURAS
(100 g base seca)

Análisis	Levaduras									
	2	9	10	13	14	19	26	27	28	29
N total	7.18	7.53	8.81	8.02	6.22	6.88	8.33	8.17	8.22	8.06
Proteína total ^a	44.87	47.06	55.06	50.12	38.91	43.00	52.06	51.06	51.37	50.37
Proteína verdadera ^b	33.42	45.50	53.47	30.55	33.36	33.89	47.43	37.85	47.01	46.64
N digerible	6.09	6.98	8.50	6.46	5.27	5.28	7.57	7.42	6.72	7.32
NSI ^c	80.92	77.16	44.04	54.36	77.17	37.94	54.50	60.95	55.11	54.96
RNA	6.35	10.41	4.63	4.43	5.27	5.28	5.77	6.50	5.27	5.39

a g de proteína total = g N x 6.25.

b Determinada con reactivo de Folin.

c Expresado como g N en solución/g N total.

Se determinaron valores variables y adecuados del índice de solubilidad de nitrógeno (NSI) en las biomásas sometidas a ensayo.

Los valores de nitrógeno digerible determinados por el método enzimático son elevados, destacándose la cepa 10 cuyo valor representa el 96.48% del nitrógeno total.

Los tenores de RNA determinados se encuentran dentro del rango normal citado en la bibliografía (5-15), correspondiendo los valores más bajos a las cepas 10 y 13. Este bajo contenido en RNA puede relacionarse con el sistema batch empleado en la propagación de las levaduras, lo que cobra gran importancia cuando la fuente proteínica es destinada a la alimentación humana.

En la Tabla 3 se exponen los Rf de los aminoácidos patrones obtenidos en cada uno de los sistemas de solventes empleados, ensayo efectuado como referencia para determinar cualitativamente el contenido de aminoácidos esenciales de las biomásas celulares.

TABLA 3

**VALORES DE Rf CORRESPONDIENTES A LOS AMINOACIDOS
ESENCIALES, DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA
EN CAPA DELGADA**

Aminoácidos	Sistemas de solventes	
	a- n-butanol:ácido acético:agua	b- fenol:agua
Lisina (Lis)	0.03	0.10
Treonina (Treo)	0.17	0.27
Valina (Val)	0.30	0.44
Metionina (Met)	0.32	0.49
Leucina (Leu)	0.40	0.48
Triptofano (Trip)	0.45	0.63
Fenilalanina (Fen)	0.34	0.56
Isoleucina (Ileu)	0.40	0.50

Los cromatogramas realizados mostraron la presencia de lisina, treonina, valina, leucina e isoleucina en todas las cepas estudiadas; también fenilalanina en todas las cepas excepto en la cepa 29. En cambio, triptofano se detectó exclusivamente en la cepa 10, y metionina, en las cepas 10 y 29 (Figuras 1 y 2), lo que las hace especialmente aptas para fines alimenticios. Esto no significa que dichos aminoácidos esenciales se encuentren totalmente ausentes en las demás cepas estudiadas, ya que la bibliografía (5) cita muchos casos en que se encuentran presentes en concentraciones tales que no son detectables por la técnica cromatográfica empleada. El mismo criterio resulta válido para explicar la no detección de fenilalanina en la cepa número 29.

En función de los resultados obtenidos, se concluye que existen cepas de levaduras con una composición química y una relación entre el contenido

proteínico y el de RNA, adecuados para su empleo en alimentación animal y/o humana, entre las que se destaca la cepa 10: *Kluyveromyces marxianus var lactis*.

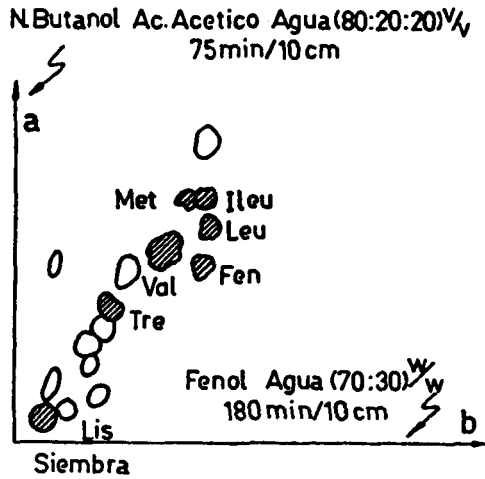


FIGURA 1

Cromatografía en capa delgada, por técnica ascendente bidimensional de la biomasa (cepa 10: *Kluyveromyces marxianus var. lactis*), luego de ser sometida a hidrólisis ácida

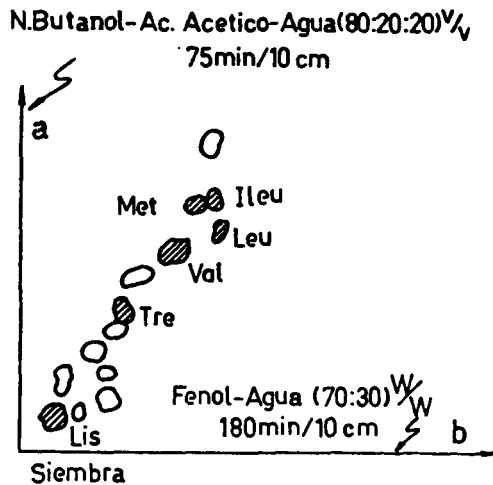


FIGURA 2

Cromatografía en capa delgada, por técnica ascendente bidimensional de la biomasa (cepa 29: *Kluyveromyces marxianus var. lactis*), luego de ser sometida a hidrólisis ácida

SUMMARY

CHEMICAL COMPOSITION STUDY OF CELLULAR BIOMASS OF YEASTS

This work is aimed at analyzing yeast strains, possibly used in animal feeding, obtained by batch cultivation from cheese whey as main carbohydrate substrate.

For that purpose 10 yeast strains selected for its biomass production capacity were chemically analyzed.

From the results, it can be observed that the chemical composition of the strains is quite variable, showing in all cases high protein content, good solubility and enzymatic digestibility.

In all of them, the RNA content is low, being this important if the biomass is utilized in human feeding. On the other hand, they have an adequate content of essential amino acids, although the sulphur amino acids content is deficient. Among the tested yeasts, *Kluyveromyces marxianus var. lactis* (No. 10) stands out for the good relationship it has between protein and RNA content, as well as for the detection of methionine among its essential amino acids.

BIBLIOGRAFIA

1. Jelen, P. & M. Le Maguer. Feasibility evaluation of cheese whey processing in small plants. *J. Dairy Sci.*, 59: 1347 - 1352, 1976.
2. Moulin, G., P. Galzy & F. Perron. Etude de quelques souches de levures isolées du fromage. *Le Lait*, 53: 237-245, 1973.
3. Moulin, G. & P. Galzy. Une possibilite d'utilisation du lactoserum, la production de levure. *Industries Alim. et Agricoles*, 11: 1337-1340, 1976.
4. Hoogerheide, J. & K. Yamada. Guidelines for testing of single cell protein destined as protein source for animal feed. *Appl. Chem.*, 51: 2537-2560, 1979.
5. Rose, H. Biomass from whey. In: *Economic Microbiology*. New York, N.Y., Academic Press Inc., 1979, p. 208-269.
6. Vananuvat, P. & J. Kinsella. Production of yeast protein from crude lactose by *Saccharomyces fragilis*. Batch culture studies. *J. Food Sci.*, 40: 336-339, 1975.
7. Bonino, A., M. Carrasco, A. Flamini, M. Olivo & F. Pomar. Aislamiento y conservación de cepas de levaduras lácticas autóctonas. *Rev. Fac. de Ing. Qca. UNL*, 44: 123-132, 1980.
8. Kriger Van Rij, N.J. *The Yeast*. 3rd. ed. B.V. Gromigen, The Netherlands, Elsevier Sc. Publishers, 1984.
9. Olivo, M., G. Vignolo, E. Luciano, E. Comini & M. Carrasco. Propagación de levaduras lácteas. Optimización de parámetros de producción a escala semipiloto. *Rev. Fac. de Ing. Qca. UNL*, 47: 19-23, 1985.
10. Bainotti, A., J.C. Basfilico & M.S. Carrasco de Mendoza. Optimización de condiciones para la producción discontinua de proteína unicelular utilizando suero de leche. *Rev. Arg. de Microbiología*, 19 (1): 1-7, 1987.
11. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of the AOAC*. 13th. ed. Washington, D.C., The Association, 1980.
12. Lawry, O., N. Rosembrough, A. Farr & R. Randall. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 295-297, 1951.

13. American Oil Chemists Society. **Official and Tentative Methods of the AOCS. Nitrogen Solubility Index.** BA 11-65. ed. Champaign, Illinois, 1973.
14. Trevelyan, W. & J. Harrison. Studies of yeasts. **Biochem. J.**, **63**: 23-33, 1956.
15. Stahl, E. **Thin-Layer Chromatography.** E. Stahl. (Ed.) 2nd ed. New York, N.Y., 1969.
16. Hamilton, P. Ion exchange chromatography of amino acids. **Anal. Chem.**, **30**: 914-919, 1958.
17. Moore, S., D. Spackman & W. Stein. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. **Anal. Chem.**, **30**: 1185-1190, 1958.