

Cultivo semisólido de *Trichosporum penicillatum* en jarras giratorias, para la obtención de proteínas a partir de bagacillo de caña

J. POU^{1,2}, N. VITTORI¹, M. J. FERNANDEZ² y J. GARRIDÓ²

1. Departamento de Ingeniería Química, UNIMET (Caracas)

2. Instituto de Fermentaciones Industriales C.S.I.C., Madrid, Juan de La Cierva, 3, 28006 Madrid

Recibido en mayo de 1986

RESUMEN

La multiplicación de levadura en cultivo semisólido (c.s.s.) sobre bagacillo de caña hidrolizado, según los resultados obtenidos, permite aumentar el contenido proteico del bagacillo inicial para su utilización en la alimentación de ganado.

Los resultados aquí presentados corresponden al estudio del desarrollo de *Trichosporum penicillatum* (cepa 1735), sobre bagacillo hidrolizado en cultivo semisólido en un sistema de jarras horizontales giratorias (Rollacell). Estos ensayos se llevaron a cabo en busca de un sistema de c.s.s. que permitiera una mayor transferencia de O_2 , y por tanto, una mayor transformación de materia reductora (M.R.) en proteína. Utilizando los parámetros de cultivo de 30°C, 30 rpm y 6 l aire/min/100 g de bagacillo, se consiguió un coeficiente de proteína de 37 (37 g de proteína/100 g M.R.). Este coeficiente fue menor que al utilizar un sistema de cultivo semisólido en bandejas, con el que se obtuvo un coeficiente de proteína de 56.

A pesar de que el sistema de jarras giratorias no demostró ser el más adecuado para lograr mejor transferencia de O_2 y grado de mezcla, los resultados alcanzados con c.s.s. son altamente prometedores por los coeficientes de proteína obtenidos, destacándose que en un período de cultivo de 60 horas se ha logrado triplicar el contenido proteico del bagacillo inicial utilizado como sustrato.

SUMMARY

This work is part of the development of a process which by a simple technology was able to increase in protein content of sugar cane-bagasse pith for its use on animal feed.

Solid state fermentation of acid pretreated bagasse pith was conducted in rotating vessels using *Trichosporum penicillatum*. This work was carried out in order to look for a semi-solid substrate system who would permit one better oxygen transfer and then, one better transformation of reducing matter (R.M.) into protein.

Using the selected parameter of culture (30°C, 30 rpm and 6 l air/min/100 g of bagasse pith) a protein coefficient of 37 was obtained (37 g of protein/100 g R.M.).

Although the utilization of the rotating vessels didn't seem to be the most adequate system for the transformation of reducing matter into protein in due form the bad oxygen transfer, this system permits the initial protein content of sugar cane bagasse- pith utilized to be tripled in our experiments (3.5 percent to 9.4 percent).

INTRODUCCION

En este artículo se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo de *T. penicillatum* sobre bagacillo hidrolizado en cultivo semisólido (c.s.s.) en jarras horizontales giratorias (Rollacell). En nuestro caso, el estudio del c.s.s. utilizando las jarras giratorias se llevó a cabo, pues el c.s.s. en bandejas no es el sistema más adecuado por la inversión necesaria en espacio y mano de obra, para un proceso industrial con producto inicial y final de bajo precio.

Este sistema en jarras giratorias ha sido utilizado por otros autores, como lo demuestran los trabajos de Han and Anderson (1975), quienes utilizaron la paja de trigo como sustrato y las especies *Candida utilis*, *Aureobasidium pullulans* y *Trichoderma viride*, con un período de cultivo semisólido de dos a tres días, a temperatura ambiente, la proteína aumentó del 2,3 por ciento al 12 por ciento y la digestibilidad final del producto se incrementó en el 48 por ciento. Pamment *et al.* (1978) utilizaron diversos desechos celulósicos previamente deslignificados con NaOH y la especie utilizada fue *Chaetomium cellulolyticum*; el cultivo sólido se realizó, tanto en bandejas como en cilindros rotatorios, donde se introducía aire estéril humidificado a 37°C. Después de un tiempo de cultivo de 20 días, el contenido de proteína bruta se incrementó de 0,9 por ciento hasta 11 por ciento en bandejas perforadas y en el 8 por ciento en los cilindros rotatorios. Silman (1980), estudió el cultivo semisólido de *Aspergillus awamori* sobre salvado, en Rollacell modificado, para producir galactosidasa e invertasa.

En nuestro trabajo, el objeto de estos ensayos era buscar un sistema de cultivo semisólido que permitiera una mejor mezcla y aeración del cultivo para obtener el mayor y más rápido desarrollo de la especie de levadura utilizada, y una mejor transformación de materia reductora (M.R.) en proteína.

Al igual que en el caso del sistema de bandejas, el desarrollo de la especie de levadura permitiría obtener un producto fermentado enriquecido en proteína, constituido por el bagacillo hidrolizado más la biomasa, producto fermentado que una vez secado podría utilizarse para la alimentación de ganado, presentando la ventaja de constituir una fuente de proteína y un aporte de fibra.

MATERIALES Y METODOS

Microorganismos

La especie de levadura utilizada fue el *Trichosporum penicillatum* (cepa 1735), procedente de la colección del Instituto de Fermentaciones Industriales (C.S.I.C.) de Madrid, seleccionada en un anterior trabajo (Pou *et al.*, 1985a) por su buen rendimiento en biomasa frente a M.R. y utilizada por su característico crecimiento miceliar.

Métodos de análisis

En el cultivo semisólido de bagacillo, el desarrollo celular se determinó por el incremento del porcentaje de proteína bruta respecto a materia seca total (bagacillo hidrolizado más biomasa). Además, se determinó la materia reductora utilizada en el desarrollo de la levadura. El análisis de los azúcares totales se llevó a cabo según una modificación de Figarella (1978)* al método Shaffer-Somogyi (1941). La determinación cuantitativa de la proteína se llevó a cabo por el método KJELDAHL.

* Comunicación personal.

Sustrato

El sustrato utilizado fue el bagacillo de caña procedente de una empresa azucarera de Venezuela. Al bagacillo que llegó al laboratorio fue necesario efectuarle un previo tratamiento físico para eliminar el polvo antes de someterlo al tratamiento de hidrólisis ácida para obtener los azúcares utilizables por la levadura.

El bagacillo hidrolizado constituía una matriz celulósica adecuada para el desarrollo de la levadura en cultivo semisólido.

Material utilizado

Reactor horizontal rotatorio para cultivo semisólido de bagacillo: Marca NEW BRUNSWICK Mod. "Rollacell".

La adaptación del sistema para cultivo semisólido de bagacillo fue realizada por Vittori, Gabriel y Sciaivone*.

Métodos de cultivo

Cultivo semisólido en jarras horizontales giratorias. En este sistema de c.s.s. se operó del modo siguiente: por cada jarra se pesaron 30 g de bagacillo, que se sometió a un tratamiento de hidrólisis según las condiciones descritas (Pou *et al.*, 1985a). El bagacillo hidrolizado se neutralizó con NaOH 0,5 M hasta obtener un pH inicial de 4,5; después se enriqueció con el medio de cultivo cuyas cantidades fijadas por gramo de M.R. fueron KH_2PO_4 : 0,13 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,037 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0,14 g/l; urea: 0,125 g/l.

Estas sales se disolvieron en la cantidad de H_2O destilada necesaria para obtener la relación sólido-líquido elegida y esta solución se distribuyó en la superficie del mismo. Dichas jarras se colocaron en el Rollacell al máximo de revoluciones (100 rpm) durante 15', con objeto de que el medio de cultivo se dispersase por todo el sustrato antes de inocular los cultivos con un 2 por ciento (v/p) de células frescas cultivadas en fermentador (c.l.c.) con un contenido celular equivalente en materia seca a 3 g/l. En todos los casos los cultivos se realizaron a pH 4,5 y el aire introducido en las jarras se humedecía hasta el 100 por ciento. El desarrollo celular se siguió por el incremento del porcentaje de proteínas respecto a la materia seca total, tomándose como muestra el contenido total de la jarra, para de este modo tener una muestra homogénea.

RESULTADOS Y DISCUSION

En estos ensayos de cultivo semisólido con *T. penicillatum* en un sistema de Rollacell, se estudió la influencia del flujo de aeración, agitación y temperatura. Para ello se partió de los parámetros ya fijados en el sistema de bandejas, de capacidad de trabajo de las jarras (30 g) y de una relación sólido-líquido 1/7 (Pou *et al.*, 1985 a y b).

En todos los casos se trabajó con un bagacillo hidrolizado en las condiciones consideradas como óptimas en el estudio de hidrólisis (1 por ciento H_2SO_4 y 30' a 1 atm) (Pou *et al.*, 1985a) con lo cual se consiguió una cantidad de M.R. inicial de 20-22 por ciento.

En la figura 1 se presentan los resultados obtenidos con el desarrollo de *T. penicillatum* a diferentes flujos de aeración.

Los cultivos se realizaron a temperatura ambiente, con una agitación de 100 rpm. Como puede comprobarse, el porcentaje de proteína alcanzado con los dos flujos (1 l/min y 6 l/min/100 g bag.) era similar, pero la velocidad de desarrollo era mayor con el mayor flujo de aire. Este resultado era lógico ya que, en levaduras, un mayor aporte de oxígeno favorece la velocidad del desarrollo celular (Garrido *et al.*, 1978).

* Resultados no publicados

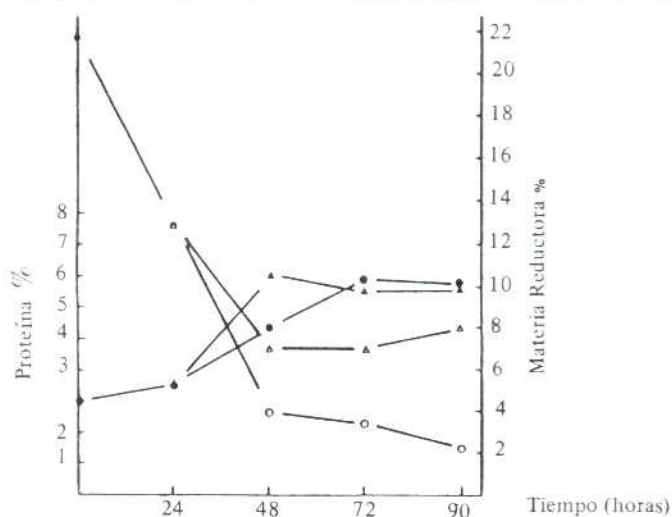


FIG. 1. Multiplicación de *Trichosporum penicillatum* sobre bagacillo hidrolizado con diferentes flujos de aeración.

Materia reductora ○ — ○ 1 l/min
 △ — △ 6 l/min
 Proteína ● — ● 1 l/min
 ▲ — ▲ 6 l/min

Cultivo semisólido en jarras giratorias a temperatura ambiente y 100 rpm. Restantes condiciones según se describe en el texto.

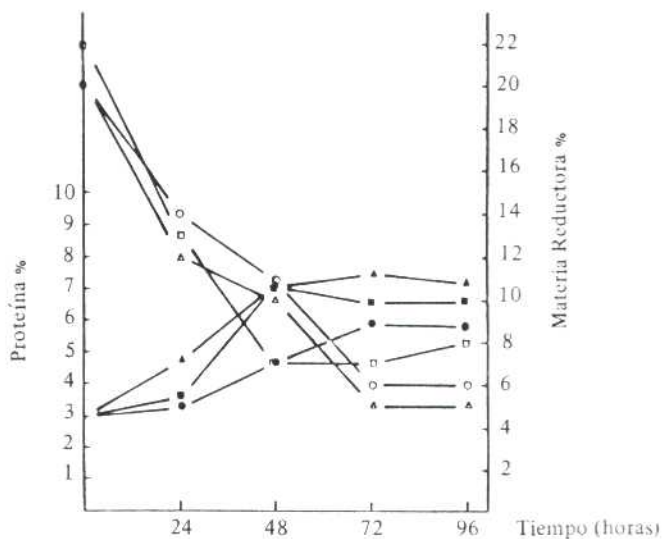


FIG. 2. Multiplicación de *Trichosporum penicillatum* sobre bagacillo hidrolizado con distinta agitación.

Materia reductora ○ — ○ 10 rpm
 △ — △ 30 rpm
 □ — □ 100 rpm
 Proteína ● — ● 10 rpm
 ▲ — ▲ 30 rpm
 ■ — ■ 100 rpm

Cultivo semisólido en jarras giratorias a temperatura ambiente y 6 l/min/100 g bagacillo. Condiciones según se describe en el texto.

En la figura 2 se presentan los resultados obtenidos con diferente agitación. En este caso el cultivo se llevó a cabo con el flujo de aire elegido 6 l/min/100 g bag. y a temperatura ambiente. Puede comprobarse que los resultados obtenidos a 30 y 100 rpm eran sensiblemente mejores que los obtenidos con 10 rpm y presentaban un desarrollo más rápido. Al comparar los resultados obtenidos con 30 rpm y con 100 rpm, puede verse que eran muy similares, aunque con 30 rpm se iniciaba antes el desarrollo y se alcanzaba con 72 horas de cultivo un porcentaje de proteína ligeramente más alto (7,4 por ciento frente a 7,1 por ciento).

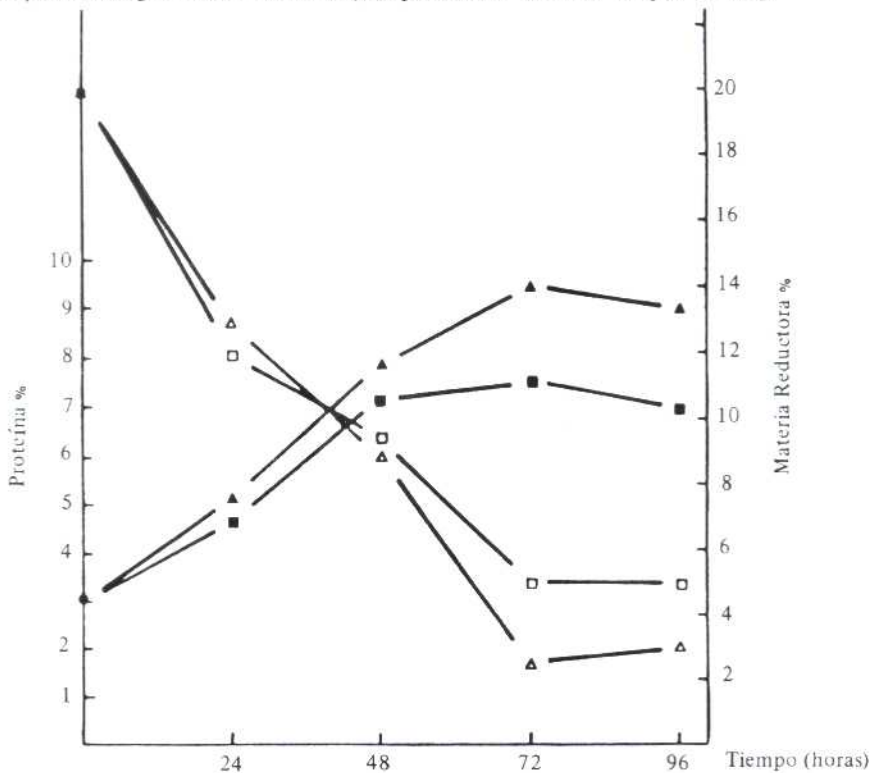


FIG. 3. Multiplicación de *Trichosporum penicillatum* sobre bagacillo hidrolizado a 30°C y a temperatura ambiente.

- 25°C □ — □ Materia reductora
 ■ — ■ Proteína
 30°C △ — △ Materia reductora
 ▲ — ▲ Proteína

Cultivo semisólido en jarras giratorias con 6 l/min/100 g bagacillo de flujo de aire y 30 rpm. Restantes condiciones según se describe en el texto.

En la figura 3 se presenta el desarrollo de *T. penicillatum* a 30°C y a temperatura ambiente bajo las mismas condiciones de aeración y agitación. Como puede verse, el desarrollo se inicia de un modo paralelo, pero a 30°C los resultados obtenidos son mejores que al cultivar el *T. penicillatum* a temperatura ambiente. A 30°C se obtuvieron 9,4 por ciento de proteína frente a 7,4 por ciento, lo cual supone un incremento de 27 por ciento.

En la tabla 1 se presenta una comparación de los resultados obtenidos en el desarrollo de *T. penicillatum* en cultivo semisólido en jarras giratorias. Puede verse fácilmente que

Tabla 1
COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL DESARROLLO
DE *Trichosporum penicillatum* SOBRE BAGACILLO HIDROLIZADO
CULTIVO SEMISOLIDO EN JARRAS GIRATORIAS (Rollacell)

Temperatura °C	*Tiempo de cultivo (horas)	Flujo de aire l/min	Agitación rpm	Proteína** %	Δ Proteína %
25	72	6	10	5,9	2,9
	72	1	100	6,9	3,9
	48	6	100	7,1	4,1
	72	6	30	7,4	4,4
30	72	6	30	9,4	6,4

* Período de cultivo donde se alcanza el máximo porcentaje de proteína indicado en (**)

el porcentaje de proteína aumenta en el cultivo con mayor flujo de aire 6 l/min, mayor temperatura 30°C y agitación de tipo medio (30 rpm).

El peor resultado obtenido con 100 rpm, cuando teóricamente debía ser mejor con una mayor agitación, podría ser originado porque el sistema de entrada del aire de la jarra no parece ser el más adecuado, ya que el flujo de aire tenía la entrada por el centro de la jarra, y como el bagacillo tiende a pegarse a las paredes con una agitación mayor, el aire prácticamente no penetraba a través de la masa, por lo que no se lograron los mejores rendimientos esperados.

Teniendo en cuenta el incremento Δ en porcentaje de proteína, puede verse que el resultado obtenido (Δ de 6,4) en las condiciones más favorables (30°C de temperatura, 6 l/min de flujo de aire y 30 rpm de agitación), representa un aumento del 220 por ciento frente al resultado obtenido (Δ de 2,9) en las condiciones menos favorables.

Tabla 2
COEFICIENTE DE TRANSFORMACION EN PROTEINA DE *Trichosporum penicillatum*
EN CULTIVO SEMISOLIDO SOBRE BAGACILLO DE CAÑA HIDROLIZADO

Temperatura de cultivo °C	Flujo** de aire l/min	Δ Proteína %				Coeficiente* de proteína			
		Bandejas				Bandejas			
		A	B	C	Jarras	A	B	C	Jarras
25	1	0,6	1,4	2,7	3,9	23	20	—	21
	6	0,6	2,1	2,9	4,4	17	35	36	29
30	1	1,7	3,3	4,6	—	46	47	42	—
	6	1,8	3,6	5,6	6,4	49	51	56	37

* g de proteína producida/100 g de M.R. consumida

** Por 100 g de bagacillo

Materia reductora (M.R.) inicial: Bandejas 4,7 por ciento en A; 9 por ciento en B y 14 por ciento en C; 22 por ciento en jarras

En la tabla 2 se presenta una comparación entre los resultados obtenidos con los dos sistemas utilizados en cultivo semisólido: el sistema estático en bandejas, cuyos resultados se han presentado en un artículo anterior (Pou *et al.*, 1985b) y el sistema de jarras horizontales rotatorias.

Como podemos observar, el Δ de proteína obtenida en todos los casos estaba directamente relacionado con la diferente concentración de M.R. inicial. Indudablemente, ante los resultados obtenidos podemos ver que a temperatura de 30°C, se obtienen mejores Δ de proteínas, que trabajando en las mismas condiciones, pero a temperatura ambiente (p. ej. 5,6 por ciento frente a 2,9 por ciento con el hidrolizado C en bandejas y 6,4 por ciento frente a 4,4 por ciento en jarras). Esta influencia de temperatura es mayor en el caso de cultivo en bandejas, probablemente a causa de que en las jarras los cambios de temperatura han de ser forzosamente más lentos que en las bandejas, pues estas constituyen un sistema más abierto.

Observando el Δ de proteína, parece que el mejor resultado se obtiene con cultivo semisólido en jarras (6,4 por ciento frente a 5,6 por ciento), ya que presentaba un mejor Δ de proteína. Pero si se tiene en cuenta el coeficiente de proteína (g de proteína producida/100 g de M.R. consumida), puede apreciarse que el mejor resultado obtenido se logró utilizando un cultivo semisólido en bandeja. El desarrollo en bandejas sobre el hidrolizado de mayor contenido en M.R. (hidrolizado C), presenta un coeficiente de proteína de 56 frente a 37 obtenido en jarras. Este resultado se debe, probablemente, a una mala distribución de aire en las jarras, por lo que se obtiene una mala transformación de la M.R. presente en la matriz celulósica en biomasa.

Tabla 3

COMPARACION DE RESULTADOS OBTENIDOS EN EL DESARROLLO DE
Trichosporum penicillatum SOBRE BAGACILLO DE CA EN DISTINTOS TIPOS DE CULTIVO

Tipo de cultivo	Tiempo de cultivo (horas)	M.R. consumida g/l	M.R. consumida %	Biomasa g/l	Proteína %	Coficiente de proteína
Líquido	15	8,7	17,4*	5,9	4,2*	24
s.s.s. en bandejas	60	—	10	—	5,6	56
s.s.s. en jarras	72	—	17,5	—	6,4	37

s.s.s. — Sustrato semisólido

M.R. — Materia reductora/100 g bagacillo

Coficiente de proteína — g proteína producida/100 g M.R. consumida

* Valor obtenido por cálculo a partir del cultivo líquido (36 por ciento de proteína/materia seca)

En la tabla 3 se presenta una comparación de los resultados en el desarrollo de *T. penicillatum* en cultivo líquido o en cultivo semisólido, en bandejas o en jarras. Los resultados que aparecen de cultivo sumergido convencional (c.s.c.) y de cultivo semisólido (c.s.s.) en bandejas, pertenecen a resultados ya publicados (Pou *et al.*, 1985 a y b).

Podemos observar que los coeficientes de proteína obtenidos (g de proteína producida/100 g de M.R. consumida) son de 24, 56 y 37 respectivamente. Sin embargo, el tiempo de cultivo necesario para alcanzar dicho coeficiente es de 72 horas en las jarras, 60 horas en las bandejas, y solamente 15 horas en el caso de cultivo sumergido convencional. Teniendo en cuenta que en un cultivo líquido el rendimiento en biomasa sobre M.R. suele ser del 60 por ciento y que esta biomasa contiene un 50 por ciento de proteína, en el cultivo líquido podría alcanzarse un coeficiente de proteína de 30.

Por tanto los valores alcanzados con el sistema de bandejas (49-56) demuestran que el cultivo semisólido es un mecanismo eficaz para transformar la M.R. en proteína a partir de residuos celulósicos.

El alto coeficiente conseguido sobre el hidrolizado C parece estar relacionado con un mejor aporte de aire en el sistema de bandejas. Este hecho (tabla 2), como ya se ha dicho, indica la necesidad de trabajar con mayores transferencias de O_2 que permitan utilizar materias reductoras del orden de 25-30 por ciento en condiciones tales que se consiga una máxima transformación en proteína.

A pesar de que la utilización del sistema de jarras giratorias no presenta una buena transformación de azúcar en proteína (coeficiente de proteína menor que en bandejas) el sistema más adecuado deberá ser un fermentador tubular rotatorio con un buen mecanismo de distribución de O_2 , para conseguir elevadas transformaciones de materia reductora en proteína.

Por tanto en el futuro desarrollo tecnológico de este proceso ha de diseñarse este tipo de fermentador que permitirá mantener la homogeneidad del producto junto con una temperatura uniforme y una alta transferencia de O_2 .

AGRADECIMIENTOS

Los autores de este artículo quieren agradecer al Consejo Nacional de Investigación Científica y Técnica de Venezuela (CONICIT) su ayuda económica.

REFERENCIAS

- GARRIDO, J.; M. J. FERNANDEZ; E. DEL AMO; J. TABERA y F. GARRIDO (1978). *Single cell Protein from Synthetic Ethanol. Utilitation of pure O_2 in a New Desing Fermentor*. Presentada al Fifth International Congress of Food Science and Technology, celebrado en septiembre en Kyoto (Japón).
- HAN, W. Y. y W. A. ANDERSON (1975). *Semisolid Fermentation of Raygrass Straw*. Appl. Microbiol. **30**: 930-934.
- PAMMENT, N.; W. C. ROBINSON y M. MOO-YOUNG (1978). *Solid State cultivation of Chaetomium cellulolyticum on alkali-pretreated sawdust*. Biotech. and Bioeng. **20**: 1735-1744.
- POU, J.; X. FIGARELLA; M. J. FERNANDEZ y J. GARRIDO (1985a). *Obtención de proteínas a partir de bagacillo de caña. I. Estudio de hidrólisis de bagacillo y selección de especies de levaduras*. Microbiol., español, **38**: 81-88.
- POU, J.; M. J. FERNANDEZ y J. GARRIDO (1985b). *Obtención de proteínas a partir de bagacillo de caña. II. Estudio de la multiplicación de Trichosporum penicillatum en cultivo semisólido en bandejas*. Microbiol., español, **38**: 89-95.
- SHAFFER, P. A. y M. SOMOGYI (1941). *Sugar analysis*. Edited by Wiley and Sons Inc., New York, 39ª edición.
- SILMAN, R. W. (1980). *Enzyme formation during solid-substrate fermentation in Rotating vessels*. Biotech. and Bioeng., **22**: 411-420.