

## **Cultivo de *Aspergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae* en lactosuero para la producción de proteína unicelular destinada a la alimentación de ganado bovino**

G. González-González<sup>1</sup>, M.L. Ramirez-Castillo<sup>1</sup>, J. Chávez-Medina<sup>1,2</sup>, T.G.Cerón-Carrillo<sup>2</sup>, N.A. Santiesteban-López<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Posgrado en Biociencias, Universidad Politécnica de Puebla. <sup>2</sup> Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de Administración (Gastronomía y Alimentos) asantiesteban2@hotmail.com

**RESUMEN:** La capacidad nutritiva del lactosuero permite el cultivo de microorganismos como *Aspergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae*, los cuales poseen propiedades probióticas para el ganado bovino. El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso de lactosuero entero como medio de cultivo para la producción de biomasa de estos microorganismos bajo diferentes condiciones y tipos de cultivo. Los resultados obtenidos de la caracterización del lactosuero indican similitud entre los reportados por otros autores para suero de diferentes orígenes. Se llevó a cabo un diseño experimental de tres factores y dos niveles en matraz, donde se evaluó la temperatura de pasteurización o esterilización a 60 y 120 C respectivamente; pH inicial de 4 y 7; así como el uso de extracto de levadura, y 10 g / L. Los mejores resultados se obtuvieron a 60 C, pH=7 y en ausencia de extracto de levadura para *A. oryzae* y en presencia de ésta para el cultivo de *S. cerevisiae*. Estas condiciones se usaron para los cultivos lote en reactor, obteniéndose valores de biomasa máxima de 6.5 g/L para los cultivos axénicos de *S. cerevisiae* y *A. oryzae*, 4.80 g/L para el cultivo mixto.

**Palabras Clave:** *Aspergillus oryzae*, lactosuero, *Saccharomyces cerevisiae*.

**ABSTRACT:** The nutritional capacity of the whey allows the cultivation of microorganisms such as *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*, which have probiotic properties for cattle. The objective of this work was to evaluate the use of whole whey as a culture medium for the production of biomass of these microorganisms under different conditions and types of culture. The results obtained from the characterization of the whey indicate similarity between those reported by other authors for serum of different origins. An experimental design of three factors and two levels in flask was carried out, where the temperature of pasteurization or sterilization was evaluated at 60 and 120 C respectively; Initial pH of 4 and 7; as well as the use of yeast extract, and 10 g / L. The best results were obtained at 60 C, pH = 7 and in the absence of yeast extract for *A. oryzae* and in the presence thereof for the culture of *S. cerevisiae*. These conditions were used for batch-to-reactor crops, obtaining maximum biomass values of 6.5 g / L for the axenic cultures of *S. cerevisiae* and *A. oryzae*, 4.80 g / L for the mixed culture.

**Keywords:** *Aspergillus oryzae*, lactosuero, *Saccharomyces cerevisiae*.

**Área:** Microbiología y biotecnología

### **INTRODUCCIÓN**

La industria lechera se coloca en el tercer lugar en cuanto a importancia dentro de las actividades en la rama industrial mexicana. Según las estadísticas proporcionadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) durante el año 2016 se produjeron 11 607 493 000 litros de leche en el país, colocándolo en la novena posición a nivel mundial. En lo que respecta a la situación actual del sector lechero en el estado de Puebla, en el mismo año se produjeron 448 782 000 litros, posicionando al estado en el octavo lugar a nivel nacional (SIAP, 2015). Asimismo, la producción de distintos tipos de quesos alcanzó la cifra de 342 000 toneladas anuales nacionales y 5 475 toneladas estatales (Olguín, 2017).

El lactosuero, suero de leche o suero de queso es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración de queso. En general, existen 2 tipos de suero según el proceso de elaboración del queso: suero ácido y suero dulce, éste último corresponde al suero de mayor producción en México (Ávila, *et al.*, 2000).

Este subproducto de la industria lechera generalmente es usado, en pequeñas cantidades, para la alimentación de distintos tipos de ganado y el resto es desechado en los efluentes provocando contaminación al ambiente (García y López-Munguía, 1999). En el mundo existen distintas tecnologías para el reuso del lactosuero, desde suero deshidratado, bebidas saborizadas, productos fermentados hasta concentrados proteicos. Este trabajo se centró en la producción de proteína unicelular de *Aspergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae* mediante la fermentación del suero completo. Aunque actualmente los procesos de producción de biomasa se enfocan en el permeado obtenido por ultrafiltración, la desproteínización sólo reduce en un 10 % a la DBO y la ultrafiltración sólo se justifica en volúmenes bastante altos por el alto costo del proceso y el bajo rendimiento de proteína; por lo tanto, el uso de lactosuero entero sigue siendo la mejor alternativa.

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) reporta que, en Puebla, al cierre del año 2016 en la región de Cholula se produjeron 120 765 000 litros de leche que representan cerca del 27 % de la producción estatal. Los principales municipios productores fueron San Matías Tlalancaleca, Ocoyucan, San Gregorio Atzompa y San Martín Texmelucan con producciones mayores a los 9 mil litros anuales y concentraron cerca del 10 % de la producción estatal (SIAP, 2017). Dicha información nos permite ubicar en esta zona un nicho de oportunidad para la transformación del lactosuero en productos de valor agregado.

Debido al alto valor nutritivo de la proteína unicelular y los efectos probióticos que se le atribuyen a algunos microorganismos, el uso de hongos y levaduras como alimento animal se ha convertido en un tema de interés para la industria de la alimentación animal. Con base a lo anteriormente expuesto, en este trabajo se estudió la producción de biomasa de ambos microorganismos usando como sustrato el lactosuero, tanto en cultivos puros como mixtos.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se utilizó suero de leche entero como medio de cultivo para todas las fermentaciones, fue proporcionado por una quesería local en la comunidad de Santa María Tonantzintla, Puebla. El suero de leche se caracterizó mediante análisis proximal, analizándose las muestras por triplicado. Se realizó la caracterización físicoquímica del lactosuero para ello se determinó proteína por el método de micro-Kjeldahl, modificado de la norma NOM-155-SCFI-2003, lactosa se cuantificó mediante el método de DNS, usando un estándar de 4 g/L de lactosa para la elaboración de una curva de calibración y una dilución 1:40 de la muestra. Sólidos Totales se determinaron de acuerdo a la metodología especificada en la norma NMX-F-527-1992. Humedad se realizó mediante diferencia de pesos, como se indica en la norma NMX-F-083-1986. Cenizas se determinó con la metodología descrita en la norma NMX-F-066-S-1978. El pH se midió por medio de un potenciómetro digital marca Hanna previamente calibrado a pH 4 y 7.

Microorganismos. Se utilizó el hongo filamentoso *Aspergillus oryzae* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cepa ATCC 9763 ambas proporcionadas por la Facultad de Ciencias Químicas de la UNAM. Se sembraron en placas de agar de papa-dextrosa (PDA), posteriormente en tubos con 10 mL de caldo de papa-dextrosa (PDA), fueron incubados a 30 °C, 72 horas y 28 °C, 48 horas respectivamente y se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

### **Diseño Experimental**

El diseño factorial empleado para la evaluación del crecimiento de los microorganismos en lactosuero fue de 3 factores y 2 niveles, es decir un diseño experimental 2<sup>3</sup>. Para ello se tomaron en cuenta los siguientes factores: temperatura de pasteurización o esterilización, 60 y 120 °C; pH, 4 y 7; extracto de levadura 0 y 10 g/L, como se observa en la Tabla I. Cada tratamiento se realizó por duplicado y los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) a través del software estadístico Minitab 17 con el fin de determinar los factores de mayor impacto y cuáles tratamientos son significativamente diferentes entre sí.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La composición química del lactosuero proveniente de Santa María Tonantzintla se resume en la Tabla I, al tiempo en que se compara con los resultados obtenidos en otros dos trabajos relacionados procedentes de Veracruz, México (Miranda, 2009) y Granma, Cuba (Hernández, 2013).

**Tabla I.** Comparación del análisis químico proximal del lactosuero.

Composición (%)	Presente investigación (%)	Miranda y col (2009)	Hernández (2013)
Proteína	0.90 ± 0.16	0.94	2.54
pH	4.70 ± 0.01	4.22	4.77
Acidez	0.87 ± 0.003	0.32	0.33
Humedad	92.56 ± 1.11	—	94.79
Sólidos totales	7.60 ± 1.15	6.4	5.21
Cenizas	0.47 ± 0.02	—	0.49

El porcentaje de proteína total es similar al reportado por Miranda y *et al.*, aunque bajo en comparación con el expuesto por Hernández (2013). Comportamientos similares se muestran en las determinaciones de pH, humedad, sólidos totales y cenizas; en los que, aunque los resultados son cercanos, se observan pequeñas diferencias. Cabe destacar, que la composición química de los residuos de la industria lechera depende de diversos factores que van desde la alimentación y crianza de los bovinos hasta la manipulación de la leche y producto final (Loaiza, 2011).

En la Tabla II se agrupan los efectos que tienen los tres factores sobre la producción de biomasa resultado del análisis de varianza (ANOVA) realizado. Aquellos valores de P (Probabilidad) menores a 0.05 representan un efecto significativo en la respuesta, que en este caso representa la biomasa producida. Así, se observa que los factores correspondientes al pH y la temperatura tienen efecto significativo sobre la producción de biomasa, no así la adición de extracto de levadura. En contraste, se observa que tanto las interacciones dobles como la triple no generan efectos relevantes en la respuesta. Diversos autores han estudiado la influencia de distintas fuentes de carbono y nitrógeno, así como su relación, en la producción de biomasa y metabolitos, Torres y col. reportan que la fuente de carbono es el principal factor involucrado en la producción de la biomasa fúngica cuando se encuentra en concentraciones cercanas a 50 g/L, no así cuando la concentración de azúcar es baja y el nitrógeno se convierte en el elemento limitante (Torres, *et al.*, 2011). En ese sentido, el extracto de levadura es una fuente de nitrógeno más que de carbono y dado que el lactosuero por sí mismo contiene nitrógeno orgánico proveniente de la caseína y una mezcla de aminoácidos, éste elemento no limita el crecimiento del hongo mientras exista lactosa; por lo tanto, la adición de extracto de levadura no es un factor que afecte significativamente la producción de biomasa Tabla II. Análisis de varianza para la biomasa de *A. oryzae*.

**Tabla II.** Análisis de varianza para la biomasa de *A. oryzae*.

Efectos	SC sec	GL	MC ajust	F	P
pH	229.788	1	229.788	35.300	0.000*
T	577.091	1	577.091	88.654	0.000*
EL	2.409	1	2.409	0.370	0.547
T*pH	17.508	1	17.508	2.690	0.111
pH*EL	12.570	1	12.570	1.931	0.175
T*EL	10.926	1	10.926	1.678	0.205
T*pH*E L	6.733	1	6.733	1.034	0.317

Error	156.228	24	6.510		
Total	1013.253	31	32.686		

\*P<0.05, IC=95 %

En la Tabla III se observa que los factores con efecto significativo en la respuesta (P<0.05) son la interacción entre temperatura-pH y temperatura-extracto de levadura.

**Tabla III:** Análisis de varianza para la biomasa de *S. cerevisiae*.

Efectos	SC sec	GL	MC ajust	F	P
pH	0.163	1	0.163	0.789	0.388
T	0.715	1	0.715	3.455	0.083
EL	0.184	1	0.184	0.889	0.361
T*pH	11.028	1	11.028	53.249	0.000*
pH*EL	0.544	1	0.544	2.626	0.126
T*EL	28.578	1	28.578	137.991	0.000*
T*pH*E	0.024	1	0.024	0.115	0.739
L					
Error	1.657	8	0.207		
Total	42.893	15	2.860		

\*P<0.05, IC=95%

Al finalizar cada cultivo, éstos fueron liofilizados y se obtuvieron productos en polvo compuestos del sustrato residual y biomasa; a cada uno de estos productos se les realizaron los análisis propuestos en la metodología con el fin de caracterizar sus propiedades fisicoquímicas y determinar su uso como alimento para ganado bovino. Cabe destacar que la proteína cruda está compuesta del nitrógeno orgánico que compone los aminoácidos y el nitrógeno no proteico o inorgánico presente en forma de urea y otras sustancias de desecho. Los carbohidratos corresponden a los azúcares residuales en el caldo de cultivo y compuestos estructurales del microorganismo; mientras que las cenizas son sales minerales principalmente.

La biomasa de *A. oryzae* también se compone principalmente de proteína cruda, carbohidratos y cenizas; también se observa un mayor porcentaje de grasa, humedad y ácidos nucleicos pero un porcentaje menor de fibra cruda.

En el caso de la biomasa obtenida del cultivo mixto, los componentes mayoritarios no cambian; sin embargo, el componente principal son los carbohidratos, seguidos de la proteína cruda y las cenizas. El resto de los componentes presenta valores similares a los calculados para *S. cerevisiae*.

Se observó que en la mayoría de los casos, *A. oryzae* posee mayor contenido de los componentes analizados salvo fibra cruda, nitrógeno total y nitrógeno no proteico. En cuanto al contenido de cenizas, grasa, ácidos nucleicos, fibra cruda y nitrógeno no proteico, la biomasa del cultivo mixto tiene valores intermedios entre los correspondientes a los cultivos axénicos y sólo presenta contenidos menores de proteína verdadera, resultando ser el que presentó mayor contenido de carbohidratos.

Los resultados obtenidos a partir de la caracterización del lactosuero fueron similares a los reportados por otros autores, sobre todo en concentraciones de lactosa (3.63 %) y proteína (0.90 %) que se encuentran dentro de los rangos reportados en la literatura.

El estudio ANOVA realizado a los diferentes tratamientos para el cultivo de *A. oryzae* y *S. cerevisiae* demostró que las mejores condiciones para el cultivo de ambos microorganismos en suero entero son: pH=7 y pasteurización a 60 °C. Aunque para el caso de la levadura fue necesario añadir extracto de levadura al sustrato.

Ambos microorganismos son capaces de consumir los azúcares contenidos en el lactosuero y, a su vez, producir biomasa; obteniéndose valores de biomasa máxima de 6.5 g/L para los cultivos axénicos de *S. cerevisiae* y *A. oryzae*, 4.80 g/L para el cultivo mixto.

El microorganismo que se desarrolla mejor en lactosuero entero es *A. oryzae* tanto en el cultivo axénico como en el cultivo por etapas, destacando éste último por permitir una mayor productividad.

El contenido proteico del producto final de los cultivos de *S. cerevisiae* (63 %), *A. oryzae* (41 %) y mixto (32 %) obtenido es similar a lo reportado en la literatura (30 %-54 %). Sin embargo, el sustrato residual aporta otras características al producto final como el aumento de cenizas y nitrógeno no proteico.

### BIBLIOGRAFÍA

- Ávila, R.M., Cárdenas, A.y Medina, A.L. 2000."Tratamiento del lactosuero utilizando la técnica de electrodiálisis," *Interciencia*, vol. 25, no. 2, pp. 80–84
- Badui, S. 2006. *Química de los alimentos*. Pearson.
- CANILEC, 2011. *El libro blanco de la leche y los productos lácteos*. Vol. I. Cámara Nacional de Industriales de la Leche,
- Food and A. Organization.1997. "Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición," Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Tech. Rep.
- García, M y López-Munguía, A. 1999. *Biotecnología Alimentaria*. Limusa,
- Hernández, R. 2013. "Caracterización fisicoquímica de un producto tipo cajeta elaborado a partir del suero dulce de quesería," Master's thesis, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana,
- INEGI, "Encuesta nacional agropecuaria 2014," Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Tech. Rep., 2014.
- Miranda, O.P. 2009. "Características físico-químicas de sueros de queso dulce y ácido producidos en el combinado de queso de bayamo," *Rev Cub Aliment Nutr*, vol. 19, no. 1, pp. 21–25.NMX-F-066-S-1978. *Alimentos: Determinación de cenizas en alimentos*, Secretaría de Economía,
- NMX-F-083-1986. *Alimentos: Determinación de humedad en productos alimenticios*, Secretaría de Economía,
- NMX-F-206-1986. *Alimentos Lácteos. Determinación de acidez expresada como ácido láctico en leche en polvo*, Secretaría de Economía,
- NMX-F-360-S-1981. *Alimentos: Determinación de cloruros como cloruro de sodio*, Secretaría de Economía,
- NOM-155-SCFI-2003. *Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado: Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba*, Secretaría de Economía, 2003.
- Ramírez, J. 2012. "Aprovechamiento industrial de lactosuero mediante procesos fermentativos," *Revista Especializada de Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*, vol. 6, no. 1, pp. 69–83
- SAGARPA, SIAP, "Panorama de la leche en México," Secretaría de Agricultura, Gadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Tech. Rep., 2015.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017, Julio) Cierre de la producción pecuaria por municipio. [Online]. Available: [http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario\\_siapx\\_gobmx/apecmpio.jsp?id=4](http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/apecmpio.jsp?id=4)