

DETERMINACION DEL CRECIMIENTO DE *Saccharomyces cerevisiae* EN AGARES FORMULADOS CON EXTRACTOS DE DESECHOS AGROINDUSTRIALES I.

(Determination of growth of *Saccharomyces cerevisiae* in agars formulated with agroindustrial waste extracts I.)

Raúl Ochoa & Eduardo Valenzuela

Instituto de Microbiología. Facultad de Ciencias.
Universidad Austral de Chile. Casilla 167. Valdivia. Chile.

Palabras clave: *Saccharomyces*, cultivo, desechos agroindustriales.

Key words: *Saccharomyces*, culture, agroindustrial wastes products.

RESUMEN

Se utilizó *Saccharomyces cerevisiae* para determinar cuantitativamente su crecimiento en agares formulados en base a extractos obtenidos de desechos de *Lactuca sativa* (lechuga) y *Brassica oleracea* (repollo), aserrín de *Pinus radiata*, papel de diario de desecho y melaza como sustratos alternativos para el cultivo de esta levadura, con miras a la producción de proteínas unicelulares (SCP). Se prepararon los siguientes medios de cultivos: agar extracto vegetal (AEV), agar extracto aserrín (AFA), agar extracto papel (AEP) y agar extracto melaza (AEME), solos y suplementados con glucosa y NH_4NO_3 . Estos se sembraron con diluciones de la levadura e incubaron por 48 h a 25 °C, tras lo cual se hizo el recuento de las colonias. Como control se utilizó agar extracto de malta al 2 % (AEM).

El mayor recuento poblacional se registró en AEV (7.2×10^5 ufc/ml) y el menor en AEP suplementado con NH_4NO_3 (5.1×10^7 ufc/ml). A los 10 días de incubación, se obtuvieron colonias de 5 mm de diám. en AEV y solo puntiformes en AEP.

SUMMARY

In order to produce single cell proteins, *Saccharomyces cerevisiae* was used to qualitatively establish its growth in agars containing extracts obtained from *Lactuca sativa* (lettuce) and *Brassica oleracea* (cabbage) waste matter, *Pinus radiata* sawdust, waste newspaper as well as molasses like optional substrata intended for the culture of this yeast. The following culture media were prepared: agar extract vegetal (AEV), agar extract sawdust (AFA), agar extract paper (AEP) and agar extract molasses (AEME) either in pure form and with the addition of glucose and NH_4NO_3 . They were inoculated with yeast dilutions and then incubated for 48 h at 25 °C, colony count were then being carried out. Malt extract agar 2% (AEM) was employed as a control.

The biggest population was observed in AEV (7.2×10^5 ufc/ml) and the smallest one was seen in AEP added with NH_4NO_3 (5.1×10^7 ufc/ml). After a 10-day incubation period, 5 mm diameter colonies were obtained in AEV whereas in AEP pointed-like colonies were only achieved.

INTRODUCCION

El principal factor en la producción de proteínas unicelulares (SCP) es el costo de la fuente de carbono y energía, las que representan entre un 40 y un 50 % del costo final de producción (Cooney *et al.* 1980; Milner *et al.* 1978). De aquí la importancia del tipo de sustrato a usar, pues su costo, disponibilidad y la normalización de sus componentes inciden en el proceso (Rhodes & Fletcher, 1969).

La mayor parte de los procesos agroindustriales

producen altas cantidades de desechos orgánicos, los cuales últimamente están siendo aprovechados como sustratos para la producción de suplemento proteico elaborado en base a microorganismos (Worgan, 1976; Brown *et al.* 1989). Según Win *et al.* (1996) se ha utilizado, jarabe de glucosa obtenido de yuca y melaza de caña de azúcar como sustratos alternativos para el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae* con miras a la producción de SCP. Charsallah (1993), cultivó tres cepas levaduriformes en aguas residuales de plantas aceituneras, mientras que Gómez & Castillo

(1983), emplearon suero de queso como sustrato para el cultivo de *Candida pseudotropicalis* con el fin de producir Proteínas unicelulares (SCP). En general, estos desechos se aprovechaban directamente en alimentación animal, aunque su aporte en proteínas es escaso (Escobar & Parra, 1984). Sin embargo, son ricos en hidratos de carbono que, eventualmente, podrían ser utilizados como fuente de carbono y energía por los microorganismos en la producción de SCP (Litchfield, 1983). Además podrían constituir una forma rentable y no contaminante de reutilizar los desechos orgánicos que contaminan el medio ambiente, resolviendo los problemas temporales de depósito que generan (Enriquez & Rodríguez, 1983).

Entre los microorganismos empleados y que han tenido una mayor aceptación en procesos piloto de producción de SCP, usados como suplemento proteico en dietas de animales, se encuentran las levaduras de los géneros *Saccharomyces* y *Candida* (Milner et al. 1978).

Este trabajo tiene como objetivo determinar cuantitativamente el crecimiento de *S. cerevisiae* en agares formulados con extractos de desechos agroindustriales.

MATERIAL Y METODOS

Se usó una cepa de *S. cerevisiae* de origen australiano (Empresa Burn Hilps), se masificó sembrándola por estrías en placas Petri que contenían AEM al 2 %, y se incubaron por 48 horas a 25 °C.

Los extractos se elaboraron de la siguiente manera:

a) Extracto de vegetales (AEV): 400 gr. de restos de hojas de lechuga y de repollo se mezclaron con 1000 ml de agua destilada y se trituraron en una licuadora hasta obtener una mezcla homogénea, esta se depositó en botellas de vidrio y se esterilizó por 20 min en autoclave (1 atm de presión 121 °C), posteriormente se filtró a través de gasa, el filtrado obtenido se volvió a filtrar a través de papel filtro. El filtrado final se depositó en botellas y se esterilizó por 20 min en autoclave, y se almacenó a 4 °C hasta ser utilizado.

b) Extracto de aserrín (AEA): 150 g de aserrín de *Pinus radiata* de 10 años se mezclaron con 1200 ml de agua destilada. La mezcla obtenida se depositó en botellas y se esterilizó por 20 min en autoclave (1 atm., 121 °C). Luego se filtró, esterilizó y almacenó, tal como se explicó para el extracto de vegetales.

c) Extracto de papel (AEP): a 1200 ml de agua destilada se le agregaron 62 g de papel de diario previamente picado. La mezcla se trituró en una licuadora, se filtró y finalmente el extracto obtenido se depositó en botellas de vidrio, tras

lo cual se esterilizó y almacenó tal como se explicó para el extracto de vegetales.

d) Extracto de melaza (AEME): a 20 ml de melaza se le adicionaron 1000 ml de agua destilada. La mezcla obtenida se esterilizó por 20 min en autoclave (1 atm., 121 °C) tras lo cual se almacenó a 4 °C hasta su utilización

Los agares, AEV, AEA, AEP y AEME solos y suplementados, se prepararon mezclando 100 ml del extracto respectivo con 2 g de agar-agar. A los agares suplementados se les agregó 0.5 g de glucosa o NH_4NO_3 . Las mezclas así obtenidas se depositaron en matraces y se esterilizaron por 20 min en autoclave (1 atm., 121 °C). Finalizado el ciclo de esterilización los agares se repartieron en placas de Petri a razón de 10 ml por placa y se sembraron por triplicado con 0.1 ml de las diluciones 10^1 a 10^6 , preparadas a partir de un cultivo de 19 h de la levadura. Del mismo modo, se sembraron en AEM al 2 % como control. Una vez sembradas las placas se incubaron a 25 °C por 48 h, tras lo cual se realizó el recuento de las colonias, que se expresaron como unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml), también se observó el desarrollo cualitativo de las colonias formadas en cada uno de los agares comparándolas con el control (AEM al 2 %).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 1, se muestran las diferencias de tamaño de las colonias de *Saccharomyces cerevisiae* tras 10 días de incubación, llegando a medir 0.5 cm de diámetro las desarrolladas en AEV y que por el contrario en AEP sólo fueron puntiformes. De acuerdo a Rose & Harrison (1971), Ghosh & Samaddar (1991), Saddler (1993) y Marques & Bala (1994), colonias bien desarrolladas y poblaciones elevadas en número se obtienen cuando los microorganismos se cultivan en medios que contienen una fuente de carbono simple y una adecuada cantidad de nitrógeno, aspectos que en el presente ensayo, al parecer satisfacen los medios AEV y AEME.

En la Tabla 1, se presentan los recuentos poblacionales de *S. cerevisiae* obtenidos tras su cultivo en agares formulados en base a extractos de residuos agroindustriales. En el medio de cultivo control se obtuvo una población de 7.1×10^8 ufc/ml, si ésta se compara con la obtenida en los agares elaborados sin adición de una fuente de carbono o nitrógeno, el mayor crecimiento poblacional de *S. cerevisiae* se registró en AEV con un recuento de 7.2×10^8 ufc/ml y el menor en AEP con un recuento de 1.1×10^8 ufc/ml. En trabajos similares, Win et al. (1996), establecieron una población levaduriforme de 4.8×10^7 y 2.1×10^8 ufc/ml, tras cultivar *S. cerevisiae* en los sustratos alternativos jarabe de glucosa

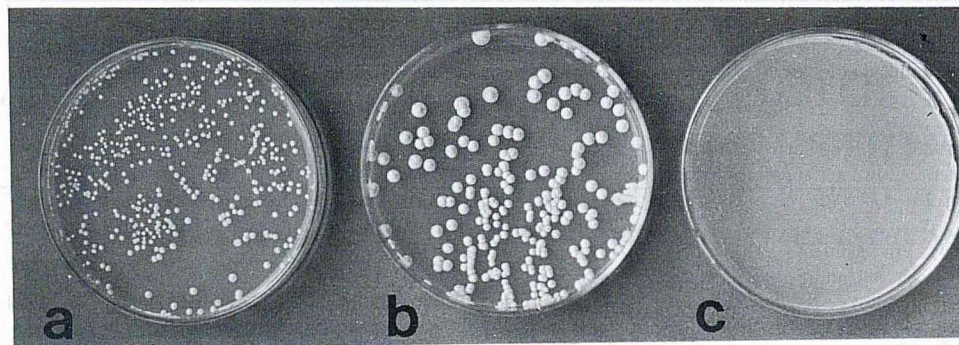


Figura 1. Tamaño de las colonias de *S. cerevisiae* obtenidas en agares formulados en base a extractos agroindustriales: (a) en agar de malta al 2% (control); (b) en agar extracto vegetal; (c) en agar extracto de papel.

provenientes de yuca y melaza de caña de azúcar, respectivamente.

Tabla 1. Recuentos poblacionales de *S. cerevisiae* en agares formulados en base a extractos agroindustriales.

SUSTRATOS	RECuento (ufc/ml)
Agar extracto de malta (control)	7.1×10^8
Agar extracto de papel (AEP)	1.1×10^8
Agar extracto de aserrín (AEA)	1.7×10^8
Agar extracto de vegetales (AEV)	7.2×10^8
Agar extracto de melaza (AEME)	5.7×10^8
AEP + Glucosa	3.3×10^8
AEA + Glucosa	4.4×10^8
AEV + Glucosa	6.7×10^8
AEME + Glucosa	6.8×10^8
AEP + NH_4NO_3	5.1×10^7
AEA + NH_4NO_3	8.1×10^7
AEV + NH_4NO_3	6.4×10^8
AEME + NH_4NO_3	7.0×10^8

En los agares formulados a base de distintos extractos y suplementados con glucosa, el mayor recuento poblacional se detectó en AEME con 6.8×10^8 ufc/ml y el menor en AEP con un recuento de 3.3×10^8 ufc/ml. En los agares formulados en base a los distintos extractos y suplementados con NH_4NO_3 , el mayor recuento poblacional se cuantificó en AEME con 7.0×10^8 ufc/ml, y nuevamente en AEP se registró el menor 5.1×10^7 ufc/ml. Por su parte, Gómez & Castillo (1983) y Rale (1984), han suplementado sustratos con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o amonio 0.3 %, al cultivar *Candida pseudotropicalis* en suero de queso y *Hansenula sydowiorum* sobre efluentes de fábricas conserveras de piñas respectivamente, reflejando que se pueden obtener poblaciones levaduriformes cuando se cultivan en sustratos alternativos para la producción de proteínas unicelulares.

Por último, si se comparan los recuentos poblacionales de *S. cerevisiae* en el agar control versus los obtenidos en los agares formulados a base de distintos extractos suplementados y no suplementados, el mayor recuento se registró en AEV con 7.2×10^8 ufc/ml y el menor en AEP más NH_4NO_3 con 5.1×10^7 ufc/ml.

Como se ha señalado el menor desarrollo y tamaño de las colonias se detectó en AEA y AEP. Esto se debería a la constitución química de ambos medios, los dos son ricos en celulosa-lignina y deficientes en nitrógeno, por lo tanto la relación C:N no es óptima. Al respecto, Saddler (1993) y Patel (1995), señalaron que para obtener una máxima producción de biomasa celular y sus proteínas es necesario, en medios de cultivos deficientes en nitrógeno, modificarlos químicamente. Además, el medio AEA contendría taninos y resinas que limitarían el desarrollo de los microorganismos, incluidas las levaduras, como lo han indicado Greenhill (1979) y Barrera (1997).

Del presente estudio se puede concluir que el extracto de vegetales resultó ser el con mejores perspectivas para el desarrollo de *S. cerevisiae* con miras a la producción de SCP, de acuerdo a los recuentos y tipos de colonias obtenidas. Por el contrario, el sustrato que presentó una menor calidad nutritiva para la levadura fue el extracto de papel.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la DID, proyecto S-9-03 Universidad Austral de Chile, por el apoyo económico concedido para esta investigación y a la Médico Veterinaria Srta. Andrea Contreras por su ayuda en la elaboración del summary.

REFERENCIAS

- Barrera, S. (1997). Estudio taxonómico y enzimático cualitativo de los hongos *Deuteromycotyna* y *Zigomycotina* aislados de aserrín de *Pinus radiata* D. Don almacenado a la interperie en el aserradero Vista Alegre de Valdivia. Tesis de Licenciatura en Ciencias, Fac. de Ciencias Universidad Austral de Chile.
- Brown, C.; Campbell, I. & Priest, F. (1989). Introducción a la Biotecnología. Editorial Acirbia, S.A. España.

- Cooney, C.; Rha, C. & Tannenbaum, S. (1980). Single-cell protein: Engineering, economics and utilization in foods. *Adv. Food Res.* 26: 1-52
- Enriquez, A. & Rodriguez, H. (1983). High productivity and good nutritive values of cellulolytic bacteria grown on sugarcane bagasse. *Biotechnology and Bioengineering* 25: 877-880
- Escobar, A. & Parra, R. (1984). Procesamiento y tratamiento físico-químico de los residuos de cosecha con miras al mejoramiento de su valor nutritivo. En: Estrategia para el uso de residuos de cosecha en la alimentación animal. Editores Manuel Ruiz, Arnoldo Ruiz y Danilo Pezo. Ottawa, Ont., Canadá. CIID.
- Gharsallah, N. (1993). Production of single cell protein from olive mill wastewater by yeast. *Environmental Technology* 14: 391-395
- Chosh, S. & Samaddar, K. (1991). Characterization and biomass production potential of yeast flora of some natural sources of Kalyani. *Journal of Xycopathological Research* 29: 111-117
- Cómez, A. & Castillo, F. (1983). Production of Biomass and B-D-Galactosidase by *Candida pseudotropicalis* grown in continuous culture on whey. *Biotechnology and Bioengineering* 25: 1341-1357
- Greenhill, A. (1979). Método de diagnóstico de la fertilidad del suelo en un vivero forestal central. Tesis Ingeniería Forestal, Fac. de Ciencias Forestales Universidad Austral de Chile, 115pp
- Litchfield, J. (1983). Single-cell protein. *Science* 219: 740-746
- Cooney, C.; Rha, C. & Tannenbaum, S. (1980). Single-cell protein: Engineering, economics and utilization in foods. *Adv. Food Res.* 26: 1-52
- Marques, T. & Bala, W. (1994). Cell growth for spirit production and possible use of yeast in animal diets. *Unimar Ciencias* 2: 35-38
- Milner, M.; Scrimshaw, N. & Wang, D. (1978). Protein Resources & Technology. AVI Publishing Company, Inc.
- Patel, G. (1995). Utilisation of chemically modified liquor of *Hedicago sativa* (alfalfa) for yeast SCP production. *Indian Journal of Agricultural Research* 29: 139-144
- Rale, V. (1984). SCP from pineapple cannery effluents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19: 106-109
- Rhodes, A. & Fletcher, D. (1969). Principios de Microbiología Industrial. Pergamon Press Ltd. Oxford. Inglaterra.
- Rose, A. & Harrison, J. (1971). The Yeast. Vol 3. Yeast Technology. Academic Press Inc. (London) Ltd.
- Saddler, J. (1993). Bioconversion of forest and agricultural plant residues. C.A.B International. U.K.
- Win, S.; Impoolsup, A. & Noomhorm, A. (1996). Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch. *Journal of Industrial Microbiology* 16: 117-123
- Worgan, J. (1976). Wastes from crop plants as raw material for conversion by Fungi to food or livestock feed. En: Food from waste. Ed. by Birch, Parker & Worgan, London.