

EVALUACIÓN DEL BONIATO *TETUANADO* COMO SUSTRATO PARA LA OBTENCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA

Evaluation of the Weevil-damaged Sweet Potato as Substrate for Microbial Protein Obtaining

Lic. Antonio Montes-de-Oca-Olivares, Dra. C. Rosa C. Bermúdez,

Dr. C. Manuel Serrat-Díaz, mserrat@cebi.uo.edu.cu

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI), Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

La obtención de proteína microbiana a partir de desechos agrícolas y agroindustriales, constituye una valiosa alternativa para suplir la demanda de este vital principio alimentario. Los tubérculos del boniato (Ipomea batata) afectados por el Tetuán (Cylas formicarius) son considerados un desecho de nula utilidad, debido a su desagradable olor y sabor. En el presente trabajo se aborda la caracterización del boniato tetuanado, como sustrato alternativo para el cultivo de la levadura forrajera Candida utilis. Se encontró que éste presenta una composición similar a la del tubérculo sano, en cuanto a los contenidos de materia seca, azúcares reductores totales, nitrógeno y componentes minerales; su alto contenido de azúcares reductores (30-40 % base seca) recomienda su uso como sustrato para la producción de proteína unicelular. Para la degradación enzimática de los polisacáridos del boniato se ensayaron varias cepas de hongos filamentosos, de las cuales Aspergillus oryzae H/28-1 y Neurospora sp fueron los que propiciaron una mayor liberación de azúcares reductores al medio, destacando esta última. La levadura Candida utilis creció satisfactoriamente en los medios a base de boniato tetuanado, consumiendo más del 85 % de los azúcares reductores y alcanzando rendimientos de biomasa entre el 37 y 58 %; ambos indicadores fueron favorecidos por la adición urea como fuente de nitrógeno. El producto final adquiere un aroma agradable, lo que sugiere una mejor palatabilidad.

Palabras clave: proteína microbiana, ipomea batata, boniato tetuanado, candida utilis, amilasas fúngicas.

The production of microbial protein from agricultural and agroindustrial wastes is an important way to supply the demand of this essential nutritional principle. Sweet potato (Ipomea batata) tubercles damaged by weevil (Cylas formicarius) are considered a waste due to their unpleasant flavor. This research deal in the characterization of sweet potato damaged by weevil, as an alternative substrate for the culture of the fodder yeast Candida utilis. It was found that the damaged tubercle had a similar composition that the healthy one, concerning dry matter, total reducing sugars, nitrogen and minerals; the high content of reducing sugars (30-40 % dry weight) recommends the use of this waste as a substrate for single cell protein production. Several fungal strains were assayed to enzymatic degradation of sweet potato polysaccharides; from these ones, Aspergillus oryzae H/28-1 and Neurospora sp. were the more actives to release reducing sugars to the culture medium, being the last one the more prominent. The yeast Candida utilis showed a satisfactory growth in media formulated in basis to weevil-damaged sweet potato, reaching reducing sugar consumptions over 80 % and biomass yields of 37-58 %; addition of urea as nitrogen source improved both parameters of the growth. The fermentation's end-product acquired a pleasant flavor, which suggests a better palatability.

Key words: microbial protein, ipomea batata, weevil-damaged sweet potato, candida utilis, fungal amylases.

Introducción

Suministrar una dieta balanceada a una población mundial que sobrepasa los 6 000 millones de habitantes constituye uno de los principales

retos que enfrenta la producción de alimentos en la actualidad /23/. Esto implica la necesidad de desarrollar sistemas sostenibles de producción animal, capaces de asegurar un suministro estable de proteína de primera calidad. Pero tales sistemas

compiten con la alimentación humana en los requerimientos de alimentos con alto contenido proteico y energético /4/. En este sentido, la producción de proteína microbiana o proteína unicelular, como también se le conoce, constituye una alternativa para solventar esta limitación.

En Cuba existe una añeja tradición en la producción de la levadura *Torula (Candida utilis)*, a partir de mieles finales, mediante proceso de fermentación continua. No obstante, esta producción enfrenta dificultades desde el punto de vista de sus resultados económicos y su competitividad frente a las fuentes convencionales de proteínas, como la harina de soya /13/. En particular, se impone la búsqueda de nuevos sustratos, más baratos, como fuentes de carbono y energía.

Fundamentación teórica

Los residuos de cosecha constituyen, por su abundancia y casi nula utilización, un gran potencial para su uso como fuentes de carbono y energía en la producción de proteína microbiana por vía fermentativa. Entre los muchos residuos agrícolas existentes en nuestro país, se ha prestado muy poca atención a los tubérculos del Boniato (*Ipomea batata*) afectados por el Tetuán (*Cylas formicarius*), los que debido a su desagradable olor y sabor son rechazados, incluso por los animales. Hasta el presente, el Tetuán es la única plaga del Boniato a la que se le concede importancia económica, ocasionando pérdidas de hasta un 40 % /11/. Por otro lado, el boniato es rico en almidón, con contenido que alcanza hasta el 80 % de su masa seca /19/, siendo este un polisacárido asequible a la hidrólisis enzimática, lo que representa otra de sus ventajas como fuente de carbono para la producción de proteína microbiana.

La levadura *Candida utilis* es uno de los microorganismos más usados para la obtención de proteína microbiana, sobre todo por su versatilidad en la utilización de una amplia gama de sustratos carbonados y su alto contenido de proteína /13/.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se realiza la evaluación del boniato

tetuanado como sustrato para el cultivo de *Candida utilis* para la obtención de proteína microbiana, empleando una etapa previa de degradación enzimática mediante fermentación en estado sólido.

Materiales y métodos

Colecta del boniato *tetuanado*, teniendo en cuenta los niveles de afectación ocasionados por el Tetuán.

Se utilizó el boniato dañado por el Tetuán procedente de la Empresa Agropecuaria "CAONAO", municipio II Frente, provincia Santiago de Cuba. Las muestras fueron escogidas en los meses de noviembre y diciembre del 2012. Para el establecimiento de los grados de afectación se determinó el peso seco del tubérculo y se le realizó una inspección visual, asignándose cuatro estadios o grados de afectación, según criterios establecidos por la producción agropecuaria, teniendo en cuenta coloración, grado de deterioro de la masa del boniato, presencia de larvas y otros.

Caracterización química del boniato tetuanado

Para ello se tomaron 5-6 tubérculos correspondientes al mismo grado de afectación y se limpiaron cuidadosamente, para eliminar restos de tierra u otras materias extrañas. Los mismos se picaron en porciones pequeñas (aprox. 1 cm³) y se mezclaron bien. Entonces, se pesaron 10 g y se secaron en estufa a 105 °C, hasta peso constante, para la determinación de la masa seca /12/. La muestra seca se sometió a trituración hasta convertirla en un polvo fino. Se pesó en balanza analítica 1 g de este polvo y se sometió a digestión con ácido sulfúrico concentrado, para la determinación del contenido de nitrógeno orgánico total según el método de Kjeldahl /2/.

Para la determinación del contenido de cenizas la muestra seca se sometió a calcinación a 540 °C /2/. En las cenizas se cuantificaron los elementos P, K, Ca, Mg e Fe. Los contenidos de P e Fe se evaluaron colorimétricamente según los métodos del ácido fósforomolibdico y del tiocianato /3/. Las

determinaciones de Ca y Mg se realizaron mediante análisis volumétrico por formación de complejos /13/. El contenido de K se estimó del contenido de cenizas, asumiendo que el 80 % de las cenizas vegetales corresponden a carbonato de potasio.

La determinación del contenido de azúcares reductores en el boniato *tetuanado* se realizó directamente en un homogenizado de la muestra fresca, mediante el ensayo del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) /2/. Para ello, se pesaron 10 g de muestra y se llevaron a un frasco Erlenmeyer de 250 mL. Se añadieron 10 mL de agua destilada y se calentó hasta ebullición, manteniéndose ésta por espacio de 10 minutos. Se trituró luego la mezcla en un mortero de loza, hasta lograr una papilla fluida, la cual se trasvasó cuantitativamente a un volumétrico de 100 mL, se enrasó con agua destilada y se homogenizó por inversión. Se procedió a la determinación de los azúcares reductores según el procedimiento descrito por Miller /2/, utilizando glucosa como estándar. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Microorganismos utilizados

Para la hidrólisis enzimática del boniato *tetuanado* se utilizaron diferentes cepas de hongos filamentosos: *Aspergillus niger* CCEBI 1003 y *Rhizopus oryzae* CCEBI 1006, ambas procedentes de la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente, Santiago de Cuba; *Aspergillus oryzae* H/28-1, obtenida del cepario del Instituto Cubano de Investigaciones en los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA); así como otras dos cepas, aisladas del medio natural en este trabajo y clasificadas como *Aspergillus sp* y *Neurospora sp*. Para la identificación de estos aislados ambientales, se tuvo en cuenta la morfología de la colonia y la observación microscópica de las estructuras vegetativas y reproductivas /7/. Los cultivos se conservaron en cuñas de agar Sabouraud a 4 °C.

Para la obtención de proteína microbiana se utilizó la cepa de levadura *Candida utilis* y-660, donada por el Departamento de Microbiología del Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado

(CNEA) de la Universidad de Oriente. La cepa se creció en cuñas de agar Sabouraud a 30 °C y se conservó en refrigeración a 4 °C, realizándose pases a medio fresco mensualmente.

Selección de hongos filamentosos para la degradación enzimática de los polisacáridos presentes en el boniato *tetuanado*.

Los hongos filamentosos se crecieron en placas de agar Sabouraud a 30 °C, hasta que se observó esporulación abundante y se prepararon entonces suspensiones de esporas de cada uno de ellos en agua destilada estéril (aprox. 10⁶ esp/mL).

Se llevaron a frascos Erlenmeyer de 250 mL 10 g del boniato *tetuanado* limpio, fragmentado en porciones pequeñas (aprox. 1 cm³), de tamaño homogéneo. Se añadieron 5 mL de agua destilada y se esterilizó a 121 °C durante 1 hora. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inoculó con 1 mL de suspensión de esporas, correspondiendo a cada ensayo uno de los microorganismos bajo estudio. Se incubó durante 3 días a 30 °C y se procedió a la determinación del contenido de azúcares reductores en el medio. Para ello, se trituró en un mortero de loza el contenido de cada Erlenmeyer hasta obtener una papilla fluida, se diluyó hasta 100 mL con agua destilada, se eliminaron los sólidos suspendidos mediante filtración y se siguió el procedimiento descrito por Miller /8/.

Para cada microorganismo se efectuaron tres ensayos independientes

Degradación enzimática del boniato *tetuanado*. Preparación del medio para el cultivo de *C. utilis*

Para esto, los tubérculos se lavaron previamente con abundante agua corriente para remover la tierra y otras materias extrañas, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron escurrir bien y secar al aire. Se tomaron 10 g del tubérculo, fragmentado en porciones de H 1 cm³, representativos de los diferentes estadios de afectación por el tetuán y se llevaron a frascos.

Los medios inoculados se incubaron durante 3 días a 30 °C. Bajo condiciones asépticas se extrajo el sustrato junto al micelio que ha crecido encima de él, se llevó a un mortero de loza y se sometió a trituración hasta lograr la textura de una papilla fluida. Se retornó ésta nuevamente al Erlenmeyer y se incubó durante 24 h a una temperatura comprendida entre 50 y 55 °C. Se elevó luego la temperatura a 75 °C durante 20 min y a continuación el contenido se trasvasó cuantitativamente a un volumétrico de 100 mL y se enrasó con agua destilada. Se filtró el contenido a través de una malla de acero inoxidable y se tomó una alícuota de 5 mL para la determinación de la concentración de azúcares reductores. Al resto del filtrado se le ajustó el pH a 5,4 y se suplementó con urea al 0,05 ó 0,1 % (m/v) cuando fue necesario. El medio se esterilizó a 121 °C durante 30 min.

Cultivo de *candida utilis*

A los medios de cultivo, preparados a base de los hidrolizados enzimáticos de boniato *tetuanado*, suplementados o no con urea, se les inoculó una suspensión de la levadura *C. utilis* y-660, para una concentración inicial de $1 \cdot 10^6$ cél/mL. Se les inyectó a los cultivos aire filtrado a una presión de 160 HPa durante 72 h, manteniéndose la temperatura a 30 °C. Al cabo de este tiempo se determinó el crecimiento del microorganismo mediante conteo directo en una cámara de Neubauer. Se midió, además, la concentración residual de azúcares reductores. La concentración

de biomasa se calculó multiplicando la concentración celular por el factor gravimétrico previamente determinado ($1,52 \cdot 10^{-8}$ mg/cél). El consumo de sustrato se calculó como la fracción de azúcares reductores consumida en la fermentación; el rendimiento de biomasa ($Y_{X/S}$) se definió como la razón entre la masa celular formada y la cantidad de sustrato consumido. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Se usó el análisis de varianza de clasificación simple para la determinación de diferencias estadísticas entre los parámetros examinados en los diferentes experimentos. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de rangos múltiples de Duncan. En todos los casos se utilizó una significación estadística del 5 %. Los datos se presentan como el valor de la media \pm desviación estándar.

Resultados y discusión

Caracterización del boniato *tetuanado*

En la tabla 1 se muestra la composición de 11 muestras de tubérculo correspondientes a distintos grados de afectación. El peso seco de los tubérculos evaluados estuvo aproximadamente entre el 22 y el 30 %. Para el boniato comercial se informa un 30 % de materia seca promedio /19/, valor similar a los encontrados para boniatos con bajo grado de afectación.

Tabla 1
Composición nutricional del boniato *tetuanado*^a.

No. muestra	Masa seca (%) ^b	Azúcares reductores		Nitrógeno (%) ^c	C/N ^d
		(%) ^b	(%) ^c		
1	29,71	8,94	30,1	0,98	12,3
2	29,71	8,94	30,1	0,85	14,2
3	24,97	9,91	39,7	0,89	17,9
4	29,71	8,94	30,1	0,86	14,1
5	29,71	8,47	28,5	0,84	13,6
6	24,97	10,41	41,7	0,88	19,0
7	24,97	11,01	44,1	0,76	23,4
8	27,51	11,55	42,0	0,56	29,9
9	27,51	11,55	42,0	0,96	17,5
11	21,92	0,02	0,11	0,56	0,1
12	21,92	0,02	0,11	0,50	0,1

^a Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes (el coeficiente de variación fue inferior al 10 % en todos los casos); ^b Referido a la masa total; ^c Referido a la masa seca; ^d Solamente se consideró el carbono contenido en los azúcares reductores

La concentración de azúcares reductores, luego de sometidos a cocción los tubérculos, estuvo entre un 30 y un 44 % de la masa seca del tubérculo afectado, a excepción de las muestras 11 y 12, las cuales presentaban el mayor grado de afectación y un contenido mucho menor de azúcares reductores. Los contenidos de azúcares reductores y nitrógeno se encontraron dentro de los intervalos informados para este tubérculo /1-25/, lo cual indica que la afectación por el Tetuán, en sus estadios iniciales, no provoca cambios relevantes en el contenido de estos dos importantes factores nutricionales.

Teniendo en cuenta la composición elemental relativamente invariable de la biomasa microbiana y la estequiometría del crecimiento microbiano /6/, se puede evaluar adecuadamente la disponibilidad de nitrógeno en un medio de cultivo a través de la relación carbono/nitrógeno (C/N). En este caso, para el cálculo de dicha relación se asumió que todo el carbono disponible para el crecimiento de la levadura está contenido en los

azúcares reductores presentes (tabla 1). De acuerdo con la composición elemental promedio de las levaduras /6/, pueden considerarse adecuadas relaciones C/N entre 7,5 y 8, por lo que el boniato *tetuanado* resultó un sustrato deficitario en nitrógeno.

Otro aspecto a considerar al diseñar un medio de cultivo lo constituyen los elementos minerales, en particular P, K, Fe, Mg y, en menor medida, el Ca. La concentración de estos elementos se muestra en la tabla 2 y se aprecia que, en general, se encuentran en cantidades suficientes para suplir los requerimientos nutricionales de la levadura, a excepción del fósforo, que se encuentra muy por debajo de los requerimientos promedio de un medio de cultivo para levaduras /9/. El contenido mineral del boniato *tetuanado* resultó similar al informado para otros sustratos empleados para fines de enriquecimiento proteico o la producción de proteína unicelular a escala industrial (tabla 2), tales como la harina de yuca /16/, el bagazo de manzana /22/ y las melazas de caña/15/.

Tabla 2
Composición mineral del boniato *tetuanado* y otros
sustratos usados para enriquecimiento proteico por fermentación

Sustrato	Composición mineral (%)					
	P	K	Ca	Mg	Fe	Cenizas
Boniato <i>tetuanado</i> ^b	0,13	0,65	0,32	0,12	0,005	4,0
Yuca ^c	0,09	1,14	0,08	NR	0,003	2,6
Bagazo de manzana ^d	0,07	0,43	0,10	NR	NR	2,0
Melazas de caña ^e	0,6-2,0	1,5-5,0	0,4-0,8	0,06	NR	NR

^a Valores expresados como % del óxido con relación al peso seco; ^b Este trabajo; ^c Recalculados de Pandey *et al.* /16/; ^d Villas-Boas *et al.* /17/; ^e Olbrich /18/; NR, valor no reportado.

Selección de hongos filamentosos

El procedimiento seguido se basó en la fermentación en estado sólido del sustrato y la posterior evaluación de los acumulados de azúcares reductores en el medio de fermentación. Esto constituye un índice de la actividad amilolítica, fundamentalmente, por ser el almidón el componente mayoritario del tubérculo /5/. La acumulación de azúcares reductores resulta del balance neto de su formación, por hidrólisis del almidón, y de su consumo por el hongo, al utilizarlos como fuente de carbono y energía.

La hidrólisis del almidón por microorganismos procede mediante el concurso de dos enzimas diferentes, las α -amilasas y las glucoamilasas. Las α -amilasas son endoenzimas que ocasionan la hidrólisis al azar de los enlaces α -(1,4)-glicosídicos de las cadenas lineales de amilosa, provocando una rápida licuefacción del almidón sin formación de azúcares simples, aunque queda sin hidrolizar una parte considerable del almidón formado por la amilopectina. Las glucoamilasas son exoenzimas,

que atacan tanto las cadenas de amilosa como las de amilopectina por su extremo no reductor, liberando glucosa /17/.

Los resultados obtenidos sugirieron como los mejores candidatos a las cepas *Aspergillus oryzae* H/28-1 y *Neurospora sp.* (tabla 3). Las cepas *Aspergillus niger* CCEBI 1003 y *Rizopus oryzae* CCEBI 1006 también exhibieron altos acumulados de azúcares reductores, aunque inferiores significativamente ($p < 0,05$) a las antes citadas.

El género *Aspergillus* es reconocido por exhibir una diversa y potente maquinaria enzimática extracelular /5/. Rahardjo *et al.* /18/ demostraron las ventajas de *A. oryzae* en la producción de α -amilasa. Estos autores señalan la capacidad de este hongo de desarrollar abundante micelio aéreo cuando se cultiva en fermentación en estado sólido. Esta capacidad le confiere la ventaja de acceder mejor al oxígeno y, con ello, se ve favorecida la síntesis de la enzima α -amilasa, la cual se reprime a bajas tensiones de oxígeno.

Tabla 3
Selección de hongos filamentosos para la degradación enzimática del boniato

Cepa	Azúcares reductores ^a (g/100 mL)
<i>Aspergillus niger</i> CCEBI 1003	8,13 ± 0,21 (c)
<i>Aspergillus</i> sp 1	4,37 ± 0,67 (d)
<i>Aspergillus</i> sp 2	3,64 ± 1,43 (d)
<i>Aspergillus oryzae</i> H/28-1	9,93 ± 1,17 (b)
<i>Rhizopus oryzae</i> CCEBI 1006	8,53 ± 0,78 (c)
<i>Neurospora</i> sp	10,64 ± 0,31 (a)

^a Azúcares reductores liberados al medio como consecuencia de la acción de los hongos sobre el boniato *tetuanado* (72 h de cultivo). Entre paréntesis, resultado de la prueba de Duncan de comparación de medias: letras diferentes señalan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medias de tres experiencias independientes

El género *Neurospora* no es frecuente en usos industriales, aunque Hölker ha informado la producción de lipasa por la especie *N. intermedia* /10/. También se ha referido la producción de la enzima glucoamilasa por *N. crassa*/17/, resultado éste que concuerda muy bien con los elevados acumulados de azúcares reductores encontrados en nuestro trabajo para la cepa de *Neurospora* sp. Por otro lado, el empleo de *Neurospora* sp tiene el atractivo adicional de que podría proporcionar una mayor palatabilidad al producto final, al poseer un aroma a frutas maduras, diferente a la mayoría de los hongos filamentosos.

Crecimiento de *Candida utilis* en medios a base de boniato *tetuanado* degradado enzimáticamente

La levadura *Candida utilis* es uno de los microorganismos más usados para la obtención

de proteína microbiana, sobre todo por su versatilidad en la utilización de una amplia gama de sustratos carbonados y su alto contenido de proteína /26,8,21/. Por esta razón, ha sido el microorganismo seleccionado para el presente estudio.

Como resultado de la metodología desarrollada, al cultivar los hongos filamentosos seleccionados sobre boniato *tetuanado* se evidenció su potente capacidad degradadora de los polisacáridos presentes en este sustrato, almidón principalmente, obteniéndose concentraciones de azúcares reductores de hasta el 44 % con relación al peso seco (tabla 4). Como el almidón constituye alrededor del 80 % de la masa seca del tubérculo, esto significa que se alcanzó más del 50 % de hidrólisis de este polisacárido, lo cual confirma la presencia de glucoamilasa en el complejo enzimático de la cepa de *Neurospora* sp. utilizada. De lo contrario, nunca podría haberse obtenido un grado de hidrólisis tan alto, ya que las α -amilasas no atacan la amilopectina, componente mayoritario del almidón /17,19/.

Tabla 4
Indicadores del crecimiento de
C. utilis sobre el mosto de boniato *tetuanado*

No. muestra ^a	AR ^b en el sustrato (% base seca)	AR ^b en el mosto (g/L)		Concentración celular ($\times 10^6$ cél/mL)	
		Inicial	Final ^c	Inicial	Final ^c
1	30,1	8,96	4,00	47,0	81,3
2 (*)	30,1	8,96	0,50	47,0	480,0
3 (*)	39,7	9,92	0,60	74,0	432,0
4	30,1	8,96	1,30	74,0	83,6
5 (*)	28,5	8,48	0,72	74,0	372,0
6	41,7	10,4	0,45	0,12	68,0
7 (*)	44,1	10,6	0,00	0,12	348,0
8 (*)	43,5	17,6	0,80	3,07	420,0
9	43,5	17,6	0,85	3,07	280,0
11 (*)	6,30	2,6	1,16	3,07	49,9
12 (**)	6,30	2,6	1,20	3,07	49,5

^a Asterisco entre paréntesis indica adición de urea, al 0,05 % (m/v) (*) y 0,1 % (m/v) (**)
AR: azúcares reductores; ^c A las 72 h de cultivo.

De las 11 muestras de hidrolizados de boniato *tetuanado* evaluadas como sustrato para el cultivo de *C. utilis*, en 9 de ellas (82 %) se alcanzaron concentraciones de azúcares reductores en el medio de cultivo muy cercanas o superiores a los 10 g/L (tabla 4), lo cual puede considerarse aceptable para propósitos de producción de proteína microbiana. En dos de las muestras estos valores estuvieron próximos al usualmente utilizado de 20 g/L. Estos resultados resultan interesantes desde el punto de vista de la aplicabilidad industrial de los resultados.

En la figura 1 se aprecia cómo la adición de urea favoreció el consumo de los azúcares reductores por la levadura. A excepción de las muestras 11 y 12, la adición de esta fuente de nitrógeno propició consumos de sustrato superiores al 85 %. La limitación de este macronutriente se traduce en un pobre aprovechamiento de la fuente de carbono, lo que concuerda con lo observado para otros microorganismos en el catabolismo de diferentes sustratos /12/.

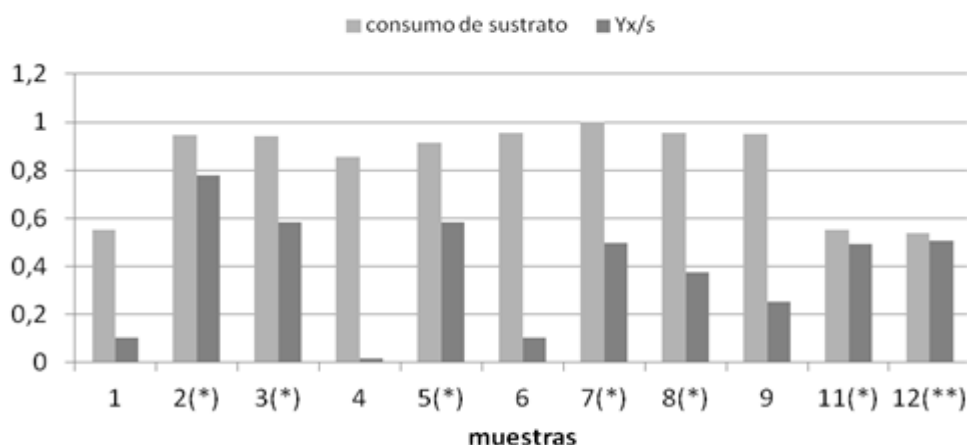


Fig. 1 Indicadores del crecimiento de *C. utilis* e medios a base de hidrolizados enzimáticos de boniato *tetuanado* en presencia o no de adición de urea (*, urea 0,05 %; **, urea 0,1 %).

En la figura 1 puede apreciarse que la adición de urea también favoreció de forma notable la conversión del sustrato en biomasa microbiana ($Y_{X/S}$), alcanzando valores próximos o superiores al 40 %, valor este usualmente encontrado en la producción de proteína unicelular cuando se utilizan carbohidratos como fuente de carbono y energía /6/. Debe notarse que en todos los casos, donde se adicionó urea las concentraciones celulares finales excedieron los $300 \cdot 10^6$ cél/mL, mientras que en sus contraparte sin urea ninguna alcanzó los $100 \cdot 10^6$ cél/mL (tabla 4), confirmando el carácter limitante del nitrógeno en el boniato *tetuanado*. Un incremento en la cantidad de urea adicionada del 0,05 % a 1 0,1 % no provocó cambios significativos en ninguno de los parámetros indicadores de la eficiencia del crecimiento (tabla 4, figura 1).

Los sustratos amiláceos son, en general, fácilmente hidrolizados a azúcares simples por los microorganismos /20/. Sin embargo, la mayoría son pobres en nitrógeno, lo que limita su aprovechamiento por fermentación. Khempaka, *et al.* /12/ emplearon la pulpa de yuca para demostrar la relación directa que existe entre la adición de nitrógeno como suplemento nutricional

y el consumo de azúcares en el proceso de fermentación, obteniendo como resultado una degradación más eficiente cuando se adicionó urea al 0,25 %. En nuestra experiencia quedó demostrado que la adición de urea al 0,05 % resultó óptima. Un resultado similar para *C. utilis* creciendo sobre bagazo de manzana fue informado por Villas-Boas *et al.* /22/ al suplementar el sustrato con sulfato de amonio.

En la figura 2 se muestra la cinética de la fermentación cuando se utilizó el mosto procedente de boniato con grado de afectación 3. La levadura presentó un crecimiento próximo al exponencial durante las primeras 48 horas, consumiendo más del 80 % de los azúcares reductores presentes inicialmente en el medio. A esta fase corresponde una velocidad específica de crecimiento máxima aproximadamente igual a $0,09 \text{ h}^{-1}$, inferior al $0,25 \text{ h}^{-1}$ informado por Zheng *et al.* /26/ para *C. utilis*. El máximo crecimiento se alcanzó al quinto día de cultivo, cuando la concentración celular resultó superior a $200 \cdot 10^6$ cél/mL, para un rendimiento de biomasa del 16 %. Un comportamiento cinético similar fue observado por Villas-Boas *et al.* /22/ al cultivar *C. utilis* sobre bagazo de manzana.

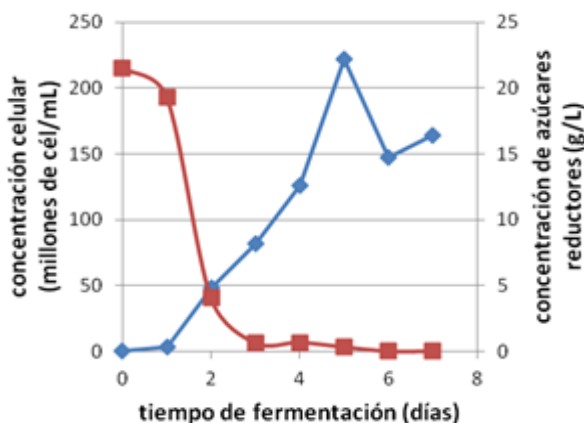


Fig. 2 Crecimiento de *C. utilis* en el medio a base de boniato *tetuanado*. Cinética del crecimiento (N, concentración celular) y del consumo de sustrato (AR, concentración de azúcares reductores).

Al utilizarse el mosto de boniato *tetuanado* con grado de afectación 2 se observó un incremento en la velocidad de crecimiento (a $0,248 \text{ h}^{-1}$) y en la concentración celular en la fase estacionaria a $700 \cdot 10^6$ cél/mL (datos no mostrados), para un rendimiento de biomasa próximo al 50 %. Estos

resultados sugieren la probable acumulación en el boniato *tetuanado* de compuestos tóxicos, inhibidores del crecimiento. Este aspecto que requerirá de estudios más detallados con vista a minimizar su posible influencia negativa en el crecimiento de la levadura.

Por último debe destacarse que, como consecuencia de los procesos fermentativos a que fue sometido el boniato *tetuanado*, el producto final luego del cultivo de *C. utilis*, adquiere un aroma agradable, lo que sugiere una mejoría en su palatabilidad que permita su uso como alimento.

Conclusiones

- Este es el primer reporte del uso del boniato *tetuanado* como sustrato para la producción de proteína microbiana.
- La metodología desarrollada permitió recuperar eficazmente la casi totalidad de los azúcares presentes en el sustrato, mediante una hidrólisis enzimática previa en un proceso de fermentación en estado sólido con un aislado de *Neurospora sp.*
- Los indicadores de crecimiento de *C. utilis* en medios de cultivo a base de boniato *tetuanado* demuestran la factibilidad de la metodología desarrollada, para la producción de proteína microbiana a partir de este sustrato, el cual mejora sus cualidades organolépticas durante las biotransformaciones que tienen lugar.

Bibliografía

- 1 VILLAS-BOAS, S. G.; ESPOSITO, E.; Mitchell, D. A. "Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds". en *Animal Feed Science and Technology*, 98:1–12. 2002.
- 2 WENK, C. "Recent advances in animal feed additives such as metabolic modifiers, antimicrobial agents, probiotics, enzymes and highly available minerals-review". en *Asian Aust. J. Anim. Sci.*, 13:86–95. 2000.
- 3 KLIBANSKY, M. "Producción de proteínas y aminoácidos en Cuba. Situación actual y perspectivas". en *Subproductos y Derivados de la Agroindustria azucarera*, Colección GEPLACEA, Serie Diversificación, GEPLACEA, D. F. México. Págs. 233-256. 1988.
- 4 INIVIT (2007), *Instrutivo técnico del cultivo del boniato*, La Habana, Editorial del Ministerio de la Agricultura, 1-12.
- 5 RODRÍGUEZ Z. *Uso del boniato (Ipomoea batata Lam) en la tecnología de fermentación en estado sólido de la caña de azúcar (Saccharum officinarum)*, Tesis Doctoral, Universidad Agraria de la Habana "Fructuoso Rodríguez Pérez"/ Instituto de Ciencia Animal. La Habana. 2004.

- 6 A.O.A.C. *Official Methods of Analysis*. 16ta ed, Washginton, D.C., Ass. Off. Agric. Chem. 1995.
- 7 A.P.H.A. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th. Edn., M.A.H. Franson (M. Ed.), USA, American Public Health Association. 1989.
- 8 MILLER, G. L. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". en *Analytical Chemistry*, 31: Págs. 426–428. 1959.
- 9 FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. *Food Microbiology*, New Delhi, Tata Mc Graw Hill Publishing Company Limited. Págs. 398-415. 1990.
- 10 Acedo, A. E.; Data, S.; Quevedo, M. A. "Genotypic variation in quality and self-life of fresh roots of Phillipine sweet potato grown in two plain seasons", en *J. Sci. Food. Agric.* 72: 209-212. 1996.
- 11 Woolfe, J. A. "Chemical composition". en *Sweet potato an untopped food resource*, Cap. 2., Cambridge, UK, Cambridge University Press. Págs. 54. 1992.
- 12 COONEY, C. L.; RHA, C. K.; TANNENBAUM, S. R. "Single-cell protein: engineering, economics, and utilization in foods". en *Advances in Food Research*, 26:2-16. 1980.
- 13 ZHENG, SH.; YANG, M.; YANG, Z. "Biomass production of yeast isolate from salad oil manufacturing wastewater". en *Bioresource Technology*, 96: 1183–1187. 2005.
- 14 ERTOLA, R.; YANTORNO, O.; MIGNONE, C., *Microbiología Industrial*, Washington, DC, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, OEA. Pág. 103. 1989.
- 15 HAHN-HÄGERDAL B *et al.* "Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use". en *Microbial Cell Factories*, 4:31. 2005.
- 16 PANDEY, A. *et al.* "Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse". en *Bioresource Technology*, 74:81-87. 2000.
- 17 VILLAS-BOAS, S. G.; ESPOSITO, E.; MATOS DE MENDONÇA, M. "Bioconversion of apple pomace into a nutritionally enriched substrate by *Candida utilis* and *Pleurotus ostreatus*". en *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19:461–467. 2003.
- 18 Olbrich, H. "Biotin activity of molasses". en *Branntweinwirtschaft*, 113: 270. 1973.
- 19 PANDEY, A., *et al.* "Advances in microbial amylases". en *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 31:135–152. 2000.
- 20 DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. «Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: Opportunities and perspectives», en *International Journal of Biological Sciences*, 5(6): 578-595. 2009.
- 21 RAHARDJO, Y. S. P. *et al.* "Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate a-amylase aproduction in a model solid-state fermentation system". en *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 900–902. 2005.

-
- 22 HÖLKER, U. *et al.* Appl. Microbiol. Biotechnol, 64:175–186. 2004.
- 23 GÉLINAS, P.; BARRETTE, J. "Protein enrichment of potato processing waste through yeast fermentation". en Bioresource Technology,98:1138-1143. 2007.
- 24 THONGKRATOK, R.; KHEMPAKA, S.; MOLEE, W. "Protein enrichment of cassava pulp using microorganisms fermentation techniques for use as an alternative animal feedstuff". en Journal of Animal and Veterinary Advances, 9(22):2859-2862. 2010.
- 25 KHEMPAKA, S.; MOLEE, W.; GUILLAUME, M. "Dried cassava pulp as an alternative feedstuff for broiler: Effect on growth performance, carcass traits, digestive organs and nutrient digestibility". en J. Applied Poult. Res.,18:487-493. 2009.
- 26 Sun, H. *et al.* "Microbial production of raw starch digesting enzymes". en Afr. J. Biotechnol.,8:1734-1739. 2009.