



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

# Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Carrera de Licenciatura en Farmacia**

**Estudio de algunas características de las cepas de  
levaduras y de su rendimiento celular utilizando  
un medio de cultivo a base de suero lácteo**

**Nº 147**

**Olena Petrenko**

**Tutor: Claudia Degrossi y Mónica Wachsman**

Departamento de Investigación  
Agosto 2005



**A mi marido y mis hijas por todo su apoyo y paciencia**



## Agradecimientos

- ✍ A la Doctora Mónica B. Wachsman y a la Doctora Claudia Degrossi, por todo el tiempo que dedicaron a mi trabajo, por su generosa ayuda y valiosos consejos.
- ✍ A la Doctora Lidia Gerasimovich por su orientación y apoyo durante el trabajo en el laboratorio SIBSA S.A.
- ✍ Al Doctor Máximo Barón por su colaboración e interés que mostró hacia mi trabajo.
- ✍ A Mariana Capasso, quien me ayudó a expresar mis ideas.
- ✍ A todos los integrantes del laboratorio de SIBSA S.A. y en especial a la Doctora Inna y Venjiamin por su gentil predisposición a ayudarme y responder mis preguntas.



# Índice

Resumen .....	9
Introducción .....	9
1. Proteínas unicelulares .....	9
2. Utilización de suero lácteo como medio de cultivo .....	11
2.1. Composición del suero lácteo .....	11
2.2. Problema ecológico originado por el suero lácteo .....	12
2.3. Principales usos del suero lácteo .....	12
3. Levaduras .....	14
3.1. Cultivo de levaduras utilizando suero lácteo .....	14
3.2. Características de las levaduras .....	14
3.3. Principales usos de las levaduras .....	16
3.4. Productos de la industria alimenticia .....	17
3.5. Composición típica de las levaduras .....	17
3.6. Importancia de algunos elementos de las levaduras en la alimentación .....	18
3.7. Beneficio del uso de la levadura <i>S. Cerevisiae</i> en la alimentación humana y animal .....	19
3.8. Ejemplos de uso de otros tipos de levaduras .....	19
Objetivos .....	20
Materiales y Métodos .....	20
1. Microorganismos .....	20
2. Medios de cultivo .....	20
2.1. Medio para preparar el inóculo .....	20
2.2. Medios para verificar la presencia de enzimas .....	20
2.2.1. Medio con lactosa de A. Kudriavchev .....	20
2.2.2. Medio con gelatina .....	20
2.2.3. Medio con almidón .....	20
2.3. Medio agar para conservar las cepas .....	21
2.4. Medio para determinar el rendimiento celular .....	21
3. Método de preparación del suero lácteo .....	21
4. Modo de preparación del inóculo para los ensayos .....	21
4.1. Preparación del inóculo .....	21
4.2. Estandarización de la concentración celular .....	21
5. Ensayo para verificar la capacidad de las levaduras de utilizar la lactosa .....	21
6. Ensayo para determinar el rendimiento celular de las cepas por separado y en conjunto .....	22
7. Estudio de las características de las cepas de levaduras .....	22
7.1. Ensayo para verificar la presencia de amilasas .....	22
7.2. Ensayo para verificar la presencia de proteasas .....	22
Resultados .....	22
1. Características de las cepas utilizadas .....	22
2. Ensayo para verificar la capacidad de las levaduras de utilizar la lactosa .....	23
3. Comparación de los rendimientos celulares de las cepas por separado y en conjunto, utilizando como medio de cultivo el suero lácteo .....	25
4. Utilización de diferentes concentraciones celulares de <i>Candida humicola</i> y de <i>Kluyveromyces fragilis</i> dentro del cultivo, para observar la modificación del rendimiento .....	26
5. Estudio de las características de las cepas de levaduras .....	26
5.1. Ensayo para verificar la presencia de amilasas .....	26
5.2. Ensayo para verificar la presencia de proteasas .....	27
Discusión .....	28
1. Análisis de los resultados .....	28
2. Características del producto rico en proteínas, vitaminas y micro elementos .....	29
Conclusiones .....	31
Bibliografía .....	32



## Resumen

La búsqueda de las posibilidades de obtención de productos proteicos ricos en vitaminas, aminoácidos y micro elementos para uso humano y animal es una preocupación actual. Una opción que se puede implementar para este fin, es el cultivo de microorganismos, por ejemplo, utilizando el suero lácteo como medio de cultivo. De esta manera se aprovecha la composición del suero que es rico en elementos básicos necesarios para la fermentación y a su vez se ayuda a solucionar el problema ecológico que generan sus componentes debido a su alta demanda de oxígeno.

Para obtener este producto es necesario elegir un microorganismo que utilice la lactosa (componente principal del suero) como fuente de carbono para su crecimiento. La elección más frecuente en estos casos son las levaduras por su composición y características.

Para el cultivo de las levaduras existen varios tipos de procedimientos: monocultivo, cultivo en conjunto con bacterias y cultivo mixto de levaduras.

En este trabajo se evaluó el rendimiento celular de distintas cepas de levaduras, utilizando el suero lácteo como medio de cultivo. En un primer momento, se analizaron las características microscópicas y macroscópicas de las cepas de las levaduras (*Kluyveromyces fragilis* Mp-8, *Saccharomyces cerevisiae* Mp-12, *Candida humicola* Mp-6), elegidas por el laboratorio SIBSA S.A. Luego se verificó su capacidad de utilizar la lactosa como fuente de carbono, a través del método de A. Kudriavchev. Se confirmaron los datos bibliográficos en relación a la capacidad de estas cepas de utilizar la lactosa. También se comprobó la presencia de proteasas (por el método de fluidificación de gelatina) y de amilasas (por coloración de iodo) lo que podría permitir la sustitución de la fuente de los componentes del medio de cultivo (por ejemplo se podrían utilizar los subproductos de la industria de bebidas alcohólicas).

En el ensayo siguiente se compararon los rendimientos celulares de las cepas por separado y en conjunto, utilizando como medio de cultivo el suero lácteo. Se observó la tendencia de los cultivos binarios a presentar un mayor rendimiento celular. Este dato podría ser de utilidad para las industrias interesadas en producir este producto proteico rico en vitaminas, aminoácidos y micro elementos, ya que normalmente se usa el monocultivo.

A raíz de estos ensayos se optó por el cultivo mixto binario de *Candida humicola* - *Kluyveromyces fragilis* (1 parte : 1 parte) que presentó un alto rendimiento (23,7 g/l). Se probaron diferentes concentraciones celulares de cada levadura dentro del cultivo para observar si se modificaba el rendimiento. Se observó un aumento de la biomasa (24,3 g/l) en la relación (1:2) pero para confirmar que existen diferencias significativas sería necesario realizar nuevos ensayos junto con su análisis estadístico.

Además, según los datos bibliográficos, las cepas de levaduras empleadas tienen un alto contenido de aminoácidos esenciales, de vitaminas del grupo B y de micro elementos muy importantes para la alimentación humana y animal.

Como resultado del trabajo realizado se eligió el cultivo mixto de *Candida humicola* - *Kluyveromyces fragilis* (1 parte: 2 partes) con rendimiento celular de 24,3 g/l, como el cultivo óptimo para obtener el producto mencionado (según las cepas disponibles y las condiciones de trabajo establecidas por el laboratorio SIBSA S.A.)

## Introducción

### 1. Proteínas unicelulares

En la última parte del siglo XIX se aislaron por primera vez, en cultivo puro, los microorganismos utilizados para la producción de alimentos (panadería, preparación de bebidas alcohólicas, industria láctea, etc.). Este desarrollo condujo rápidamente a un mejor conocimiento de las relaciones entre determinados microorganismos, sus actividades y sus productos (por ejemplo aminoácidos, vitaminas, alcohol, etc.). Actualmente, con los grandes avances de la biotecnología, los microorganismos están reemplazando cada vez más los procedimientos tradicionales (por ejemplo producción de enzimas y vitaminas). Este área genera mucho interés, ya que, en un futuro cercano nos encontraremos con el problema de la falta de proteínas para la alimentación humana y animal, pues la población se expande rápidamente pero la tierra cultivable y la ganadería, no. Una de las posibilidades para solucionar este problema son los microorganismos que pueden llegar a satisfacer algunas necesidades mundiales de alimentación. Posiblemente el uso potencial más importante de los microorganismos no sea como una dieta completa, sino como un complemento proteínico y vitamínico.

El suministro de proteínas es escaso en algunos alimentos, por esta razón los microorganismos que pueden proveerlas son de gran utilidad. En muchos casos, las células microbianas y de levaduras contienen más del 50% de proteínas (peso seco) y al menos en algunas especies, ésta es una proteína completa (contiene todos los aminoácidos indispensables para el hombre). Esto es importante pues, en un organismo vivo, los otros componentes como lípidos e hidratos de carbono se pueden inter convertir y sintetizar desde otros elementos, pero la insuficiencia de proteínas es más difícil de compensar, pues algunos aminoácidos esenciales no pueden ser sintetizados sino que tienen que ingresar con los alimentos (Brock y col., 1993). La incorporación de vitaminas y de micro elementos también es indispensable para el buen funcionamiento del organismo, ya sea humano o animal.

Por esta razón existe un gran interés en la producción extensiva de microorganismos como alimentos, especialmente en aquellas partes del mundo donde hay un suministro deficiente de las fuentes convencionales de alimentos. Según los datos de la OMS (Organización Mundial de la Salud) (Nikitin, 1996), el consumo diario de proteínas en los países desarrollados es de 45 - 50 g por persona, pero en los países subdesarrollados es apenas de 5 - 10 g. Esto significa que es necesario buscar otras fuentes de proteínas para la dieta, que contengan los aminoácidos necesarios para una buena alimentación.

Los microorganismos que se utilizan como fuente de alimento son conocidos con el nombre de **proteínas unicelulares**, para distinguirlas de las proteínas producidas por los animales y las plantas (Tortora y col., 1993).

Las propiedades que un microorganismo debería poseer para ser útil como fuente de proteínas son las siguientes:

- ✍ Ser de crecimiento rápido
- ✍ Requerir un medio de cultivo sencillo y barato
- ✍ Requerir un sistema de procesamiento sencillo
- ✍ No debe ser patógeno
- ✍ No debe ocasionar daños al ser ingerido
- ✍ Debe tener un bajo contenido de ácidos nucleicos
- ✍ Debe tener un alto valor nutritivo

Actualmente, los organismos más utilizados como fuentes de proteínas unicelulares son las levaduras pero también se usan bacterias, algas y mohos (Brock y col., 1993).

A continuación se presentan las características comparativas de estos microorganismos (Boze y col., 2001):

#### ✍ **Levaduras**

Las levaduras son los microorganismos más antiguamente conocidos, mejor estudiados y generalmente mejor aceptados por los consumidores. Las levaduras son raramente tóxicas o patogénicas y pueden ser utilizadas en la alimentación humana. A pesar de que su contenido de proteínas no excede el 60%, su concentración de aminoácidos esenciales tales como la lisina, el triptofano y la treonina es satisfactoria, aunque tiene un bajo contenido de metionina y cisteína. Las levaduras son muy ricas en vitaminas (grupo B) y su contenido en ácidos nucleicos es bajo ya que está en el rango de 4 a 10%.

En cuanto a su tamaño las levaduras son más grandes que las bacterias, lo que facilita la separación.

#### ✍ **Bacterias**

El rendimiento celular de las bacterias se obtiene en un tiempo corto y su volumen es mayor que en cualquier otra clase de microorganismos. Su contenido de proteínas puede llegar al 80%. Las concentraciones de los aminoácidos son equilibradas y tienen un alto contenido de lisina. Pero el porcentaje de ácidos nucleicos (10 - 16%) es mayor que en las levaduras.

Existe un número muy limitado de bacterias que puedan ser usadas en la industria alimentaria ya que muchas son patógenas. Por otra parte, el proceso de separación es limitado por su tamaño pequeño.

#### ✍ **Mohos**

La utilización de los mohos como biomasa (rendimiento celular) es relativamente nueva. Generalmente son usados para la producción de enzimas, ácidos orgánicos y antibióticos. Su tiempo de crecimiento (5 - 12 horas) es más lento en comparación con las levaduras y bacterias. El contenido de proteínas (50%) es frecuentemente menor que en otros microorganismos y es deficiente en algunos aminoácidos.

También su pared celular presenta problemas para ser digerida. Generalmente, el contenido de ácidos nucleicos es bajo (3 - 5%).

✍ **Algas**

El mérito potencial de las algas es su posibilidad de multiplicarse utilizando como fuente de carbono al ~~dióxido de carbono~~. **Algunos géneros** (*Cyanophyta*) pueden usar el nitrógeno de la atmósfera como fuente de nitrógeno.

Las algas son tradicionalmente usadas como complemento de los alimentos en distintas poblaciones como es el caso de México (*Spirulina platensis*) y de Chad (*Spirulina máxima*) pero tienen un bajo contenido de aminoácidos que contienen azufre. Su concentración en ácidos nucleicos es alrededor del 4 al 6%. Las algas son de fácil obtención pero su multiplicación es muy lenta, así que no siempre es conveniente usarlas en la industria.

## 2. Utilización del suero lácteo como medio de cultivo

Independientemente de qué microorganismo se utilice, para que el proceso de producción del producto proteico y vitamínico sea económicamente favorable es necesario elegir un medio de cultivo sencillo y barato. Los microorganismos pueden usar como sustrato muchas sustancias carbonadas, como la celulosa, el metanol, el suero lácteo o los derivados del petróleo. El petróleo ofrece el mejor rendimiento en su transformación en alimentos, pero su demanda como combustible hace caro su uso en la industria alimenticia. Los residuos de celulosa procedentes de la madera u otras plantas son los candidatos más obvios para ser utilizados como medios de cultivo, pero son relativamente pocos los microorganismos capaces de usar la celulosa o la lignina, a menudo presente en ellos (Tortora y col., 1993).

Actualmente, existen varias alternativas biotecnológicas que usan al suero lácteo como medio de cultivo, aprovechando su composición química para la elaboración de distintos productos en la industria alimentaria y reduciendo el problema ecológico que generan sus componentes (ver punto 2.2.: Problema ecológico originado por el suero lácteo) (Marth 1973; Grba y col., 2002; Revillion y col., 2003).

### 2.1. Composición del suero lácteo

La composición química del suero lácteo es variable, dependiendo de:

- ✍ los tratamientos a los que se someta la leche (calentamiento, centrifugación, homogeneización, etc.)
- ✍ las características intrínsecas del procesamiento de los diferentes tipos de derivados lácteos (tipo de cultivos utilizados, manipulación mecánica, procesos de membrana, etc.)
- ✍ los procesos de tratamiento que se le apliquen al suero (pasteurización, concentración, etc.)

Aunque el suero tiene alrededor del 93% de agua, su composición típica indica la presencia de varios elementos valiosos.

**Tabla 1**

**Composición típica del suero lácteo \***

Componentes	%
Hidratos de carbono	4.7- 5.0
Proteínas	0.8-0.9
Sales minerales	0.6-0.8
Grasas	0.2-0.3
Ácidos orgánicos	0.2-0.3
Agua	93.0

**Tabla 2.**  
**Composición detallada de 100 g de porción comestible del suero lácteo\***

Sales minerales		Vitaminas		Aminoácidos	
Sodio	45 mg	Vitamina A	3 ?g	Arginina	25 mg
Potasio	130 mg	Vitamina B1	35 ?g	Histidina	20 mg
Magnesio	8 mg	Vitamina B2	150 ?g	Isoleucina	60 mg
Calcio	70 mg	Nicotinamida	190 ?g	Leucina	95 mg
Manganeso	1 ?g	Ácido pantoténico	400 ?g	Lisina	80 mg
Hierro	100 ?g	Vitamina B6	40 ?g	Metionina	16 mg
Cobre	2 ?g	Biotina	1 ?g	Fenilalanina	35 mg
Cinc	140 ?g	Ácido Fólico	1 ?g	Treonina	70 mg
Fósforo	45 mg	Vitamina B12	200 ng	Triptófano	17 mg
Cloro	80 mg	Vitamina C	1 mg	Tirosina	30 mg
Flúor	10 ?g	Otros		Valina	60 mg
Yodo	8 ?g	Ácido láctico	130 mg		
Selenio	7 ?g	Ácido cítrico	160 mg		

Estos componentes del suero quedan después de la producción de diversos productos lácteos y constituyen un problema ecológico en el mundo entero (Ocampo Cervantes y col., 2000).

### 2.2. Problema ecológico originado por el suero lácteo

Debido a sus componentes, el suero representa un serio problema de contaminación cuando se vierte a los cursos de agua, ya que genera una demanda biológica de oxígeno (DBO) muy alta, de 40000 a 60000 ppm y una demanda química de oxígeno (DQO) de 50000 a 80000 ppm. Más del 90% de esas demandas se deben a la lactosa.

Cuando un compuesto con una alta DBO, tal como el suero lácteo, se vierte a un sistema ecológico acuático, los microorganismos que lo degradan demandan una gran cantidad de oxígeno disuelto en el agua creándose condiciones anóxicas.

Tomando en cuenta que la concentración del oxígeno disuelto es de 7 a 8 ppm para la mayoría de los cursos de agua, se necesita todo el oxígeno presente en 6000 litros de agua para oxidar los sólidos de sólo medio litro de leche entera (Vrisseyre, 1980).

También, se estima que la descarga a un curso de agua de 2,5 litros de suero por día tiene un poder contaminante equivalente al agua residual producida por un individuo. Esto implica, por ejemplo, que la manufactura de 1kg de queso ocasiona una contaminación semejante a la generada por aproximadamente cuatro personas (Ocampo Cervantes y col., 2000).

La legislación vigente prohíbe la eliminación de suero lácteo en cursos de agua y estanques. También crea ciertas limitaciones en las plantas de tratamiento de aguas residuales ya que aparecen problemas al encauzarlo en zanjas y lagunas construidas para tal fin, pues el ácido láctico impermeabiliza el suelo, lo que impide la filtración, formándose así, espejos de agua putrefactos que inciden negativamente en la conservación del ambiente (Leyte y col., 2003).

### 2.3. Principales usos del suero lácteo

Actualmente, existen varias formas de solucionar el problema ecológico del suero y aprovecharlo en distintas industrias (Vrisseyre, 1980). Algunos usos industriales del suero:

1. Fermentación (biomasa de levaduras, suero sin levaduras)

2. Desmineralización (suero desmineralizado)

3. Desproteización (proteínas del suero)

4. Suero desecado

5. Cristalización de la lactosa (suero sin lactosa, lactosa bruta o refinada)

La cantidad de suero producido anualmente en el mundo es de aproximadamente 400.000.000 de toneladas (Revillion y col., 2003).

En muchos países el suero y sus concentrados proteicos se utilizan en la fabricación de:

✍ alimentos lácteos (helados, yogur)

✍ productos cárnicos (carnes procesadas, embutidos)

✍ productos panificados (bases para pasteles, galletitas, barras nutritivas)

✍ productos de confitería (chocolates, coberturas, caramelos)

✍ bebidas (mezclas con cacao, cremas para café, bebidas para deportistas) (Engler, 2003)

Pero el contenido relativamente elevado en sales del suero seco y la excesiva dilución de sus componentes del suero fresco, debido a la presencia de un 93% de agua, exige la realización de tratamientos tecnológicos previos (desmineralización, concentración, deshidratación) para que sea apto para el consumo humano (Foster, 1969; Vrisseyre, 1980).

Según los datos de un artículo de V. Engler (Reciclando los desechos de la leche, 2003), donde analiza el uso de 450.000 toneladas de suero provenientes de la industria láctea Argentina (no de las queserías), se lo emplea para los siguientes fines:

El 62% es utilizado directamente para alimentación animal

El 33% se transforma en derivados como lactosa, caseínas y concentrados proteicos

El 4% se transforma en suero en polvo

El 1% es tratado como efluente

Estos datos (Engler, 2003) muestran que en la Argentina la mayor cantidad de suero se emplea para la alimentación animal (cerdos, vacas y terneros). Según ciertas investigaciones (Vrisseyre, 1980; Zalashko, 1991), existen algunas limitaciones para su utilización:

✍ Se observó que el aumento de peso en los animales depende mayormente de la dieta en general y no del agregado de suero.

✍ Se comprobó que al aumentar la cantidad de suero en la dieta disminuye la posibilidad del organismo de utilizarlo. Además no es recomendable la utilización de grandes cantidades de suero en la dieta de animales por el alto contenido de lactosa, que con el tiempo se acumula (la lactosa es de absorción lenta) y transita no hidrolizada por el intestino grueso donde sirve de sustrato para la multiplicación bacteriana causando diarreas de origen fermentativo.

Actualmente se buscan alternativas para la utilización del suero proveniente de la elaboración del queso. Este tipo de suero presenta un problema especial, que es su olor muy desagradable (por la presencia de aldehídos, acetato de etilo, ácido láctico), que dificulta su aplicación en la industria alimentaria (Zalashko, 1990). Sin embargo es posible usarlo para procesos químicos como la cristalización de la lactosa, pero esto requiere una tecnología especial que no puede ser instalada en todas las fábricas de queso. También es complicado manejar grandes volúmenes de suero para transportarlo a un lugar centralizado.

Según la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPYA, 2002), la producción quesera actual en la República Argentina se estima en unas 379.677 toneladas. En la fabricación de 1 kg de queso se generan aproximadamente 8 - 9 litros de suero (Ocampo Cervantes y col., 2000). Según estas proyecciones la cantidad aproximada de suero que se genera en la Argentina, sólo en la industria de quesos, es de alrededor de 3.417.000 toneladas.

Según los datos de la Cátedra de Fisiología Animal Veterinaria (Universidad del Salvador, 1998) en la República Argentina, en términos generales, el suero proveniente de las queserías suele tener tres destinos:

1. Efluentes: este subproducto es un elemento de polución que fue discutido en el punto 2.2.

2. Secado industrial: para aprovechar la materia seca del suero lácteo se requiere de un proceso de deshidratación industrial que sólo poseen las grandes empresas lácteas.

3. Alimentación porcina: es la alternativa más frecuente para establecimientos pequeños; a través de un sistema de tuberías el suero llega a los comedores porcinos.

El pequeño y mediano productor quesero en general no dispone de equipos de secadores industriales y su utilización en la alimentación porcina no siempre es posible, lo que hace que en muchas oportunidades el suero sea un efluente que provoca contaminación ambiental.

Como se puede observar más adelante, en muchos países se presenta el problema de la eliminación del suero de las queserías:

✍ En Estados Unidos anualmente se producen cerca de 13.600.000 toneladas de suero y solamente el 56% se procesa para obtener productos para la alimentación humana y animal (Reddy y col., 1976).

Según datos de Ghaly (2004), alrededor del 17% de este suero se tira como aguas residuales sin tratamiento previo y el 26% se deposita en la tierra, lo cual produce problemas ecológicos.

- ✍ En Francia se producen 6.000.000 de toneladas de suero por año, de las cuales el 20% se elimina como residuo (Thivend, 2004).
- ✍ En Egipto toda la cantidad de suero producida se elimina como residuo sin ningún tratamiento previo (Sanaa y col., 1991).

Por lo tanto, sería de interés desarrollar e implementar técnicas que permitan disminuir el grado de contaminación provocado por el suero lácteo y a su vez aprovechar los componentes valiosos de su composición (mencionados en la Tabla 2).

### 3. Levaduras

#### 3.1. Cultivo de levaduras utilizando suero lácteo

Hay muchos estudios (Bainotti y col., 1987; Ocampo Cervantes y col., 2000; Urbina y col., 2000; Ghaly y col., 2004), que proponen como opción, que las plantas de tratamientos biológicos del suero lácteo utilicen a las levaduras para reducir la carga de contaminantes y convertir a la lactosa en biomasa microbiana.

Algunos de los estudios (Ocampo Cervantes, 2000; Ghaly y col., 2004), que buscan la manera de disminuir el grado de contaminación que ocasiona el suero lácteo procedente de la manufactura de queso Cottage, indican reducciones de hasta el 87% de la demanda química de oxígeno, empleando levaduras.

Pero sería interesante implementar esta tecnología de tratamiento de este residuo no sólo para disminuir la demanda química y biológica de oxígeno, sino también para obtener una biomasa de alto contenido proteico y vitamínico que pueda ser utilizada como complemento dietario (Reddy y col., 1976; Bainotti y col., 1987; Zalashko, 1990; Sanaa y col., 1991; Urbina y col., 2000; Olvera-Novoa y col., 2002; Grba y col., 2002; Revillion y col., 2003; Ghaly y col., 2003).

Los primeros trabajos que se conocen donde se menciona la utilización de suero para la obtención de levaduras fueron realizados en Alemania. Ya en el año 1944, en Linche, se comenzó a utilizar suero desproteínizado y levaduras del género *Candida* como pienso para animales (Zalashko y col., 1999).

Actualmente, existen varios procedimientos (Vrisseyre, 1980), aplicados industrialmente en muchos países, que están basados en la utilización del suero lácteo como componente del medio para el cultivo de levaduras. Los procedimientos más importantes son:

- ✍ **S.A.V.** (Société des Alcools de Vexin), que se utiliza en Francia y en la ex URSS. Consiste en una fermentación continua seguida de la concentración y eliminación de todo el líquido. El producto obtenido contiene: 32% de proteínas, 25% de lactosa, 16% de cenizas, 5% de grasa y 4% de ácido láctico. Una preparación de estas características, pone a disposición de los fabricantes de piensos para aves, terneros y lechones, un complemento que permite equilibrar las raciones a base de cereales y proteínas vegetales.
- ✍ **Bel**, desarrollado en 1964 en Alemania. En este procedimiento se efectúa una desproteínización previa del suero y después una fermentación en continuo. La levadura así obtenida es separada, lavada, filtrada, plasmolisada y secada. Contiene un 47% de proteínas. Su valor biológico, según los datos obtenidos por el I.N.R.A. (Institut National de la Recherche Agronomique, Francia), hace de ella un excelente suplemento proteico, comparable a la levadura de cerveza. Las instalaciones industriales actualmente en funcionamiento tratan 250 000 litros de suero por día.
- ✍ **Whey**, desarrollado por la Knudsen Creamery Company en Estados Unidos. Las levaduras se siembran en el suero del queso, fundamentalmente del tipo Cottage, efectuándose la fermentación en continuo. Las células se separan por centrifugación y se deshidratan sobre cilindros rotatorios calientes. Su contenido de proteínas es del 54 - 58% y un 8 - 10% de cenizas.

Al utilizar el suero lácteo como medio de cultivo hace falta elegir una levadura que utilice la lactosa (componente principal) como fuente de carbono para su crecimiento. Más adelante se mencionan las características generales de las levaduras, ampliamente utilizadas en procesos biotecnológicos.

#### 3.2. Características de las levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares, con una morfología característica esférica u ovalada. Las levaduras se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza y se encuentran frecuentemente en forma de polvillo blanco que cubre los frutos y las hojas.

La mayoría de las levaduras se reproducen asexualmente por gemación multicelular o por gemación polar, mecanismo de reproducción mediante el cual una porción de protoplasma sobresale de la pared de la

célula de la levadura y forma una protuberancia; esta protuberancia, o yema, aumenta de tamaño y finalmente se desprende como célula de levadura neoformada. En algunas levaduras, y de forma especial en las que forman película, parece ser que la yema crece a partir de una prolongación tubuliforme de la célula madre. El material nuclear replicado se reparte entre la célula madre y la célula hija. Algunas especies de levadura se reproducen por fisión. Una célula de levadura puede formar hasta 24 células hijas por gemación. Algunas especies de levaduras forman yemas que no logran separarse por sí mismas y dan lugar a una corta cadena de células llamada pseudohifa.

Las levaduras se denominan «**verdaderas**» si producen esporas sexuales (*Ascomycetes*, *Basidiomycetes*). La reproducción sexual de las levaduras «verdaderas» (*Ascomycotina*) da lugar a la producción de ascosporas, desempeñando la función de asca la propia célula de la levadura. En la mayoría de las especies de levaduras verdaderas, la formación de ascosporas tiene lugar tras la conjugación de dos células. Tanto el número habitual por asca, como el aspecto de las ascosporas, son típicas de cada especie de levadura.

Las levaduras se denominan «**falsas**», si no producen ascosporas (*Deuteromycotina*). Este tipo de levaduras se reproducen por gemación multilateral. La célula de algunas levaduras se transforma en clasmidiosporas mediante la formación de una gruesa pared alrededor de la célula, tal como ocurre, por ejemplo, en algunas especies de los géneros *Candida*, *Rhodotorula* y *Cryptococcus* (Frazier, 1993).

La mayoría de las levaduras se consideran como organismos aerobios facultativos, lo que significa que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno. Si disponen de oxígeno las levaduras realizan una respiración aeróbica para metabolizar los azúcares hasta dióxido de carbono y agua.

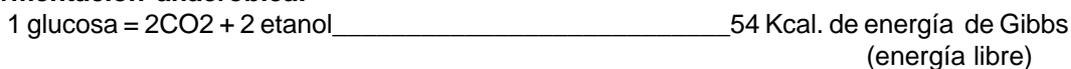
#### **Crecimiento aeróbico:**



Este tipo de crecimiento se aplica en los procesos de fermentación para la obtención de proteínas unicelulares.

Si carecen de oxígeno fermentan azúcares produciendo etanol y dióxido de carbono.

#### **Fermentación anaeróbica:**



Esta fermentación es la base de las industrias cervecera y vinícola (Tortora y col., 1993).

En el presente trabajo se van a utilizar levaduras de los siguientes géneros: *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, cuyas características se describen a continuación.

#### **Género *Kluyveromyces***

Estas levaduras pertenecen a la división *Ascomycotina*. Las levaduras de este género se reproducen por gemación multilateral, liberándose las esporas al llegar a su madurez (sus esporas son esféricas). En la actualidad, *K. marxianus* incluye las especies *K. fragilis*, *K. lactis*, *K. bulgaricus*, *Saccharomyces lactis* y *S. fragilis*. La *K. marxianus* es una de las levaduras que más abunda en los productos lácteos. Los especies pertenecientes al género *Kluyveromyces* producen b-galactosidasa y son potentes fermentadoras de la lactosa. La *K. marxianus* contiene la coenzima Q-6 e interviene en la fermentación del kumis (bebida láctea). Asimismo, se utiliza para obtener células de levadura a partir del suero lácteo (Jay, 1994).

#### **Género *Candida***

Este género pertenece a la división *Deuteromycotina* (levaduras «falsas»). Las células de estas levaduras pueden ser redondeadas, en forma de huevo o alargadas. Estas levaduras producen pseudohifas e hifas verdaderas (son yemas que no logran separarse por sí mismas y dan lugar a una corta cadena de células), con abundantes células gemantes o blastosporas. Algunas son formadoras de película (las que son levaduras oxidativas) y son capaces de alterar los alimentos. La especie *C. utilis* y *C. humicola* se cultivan para incorporarlas a los alimentos destinados al consumo humano y animal.

#### **Género *Saccharomyces***

Estas levaduras pertenecen a la división *Ascomycotina*.

Las células de estas levaduras pueden ser redondeadas, ovaladas o alargadas y pueden producir pseudohifas. Se reproducen por gemación multipolar mediante la producción de ascosporas. Las ascosporas, en número de una a cuatro por asca, suelen ser redondeadas u ovaladas. La especie *S. cerevisiae*, se emplea

en muchas industrias alimentarias, utilizándose cepas específicas en las fermentación del pan, en la fermentación de la cerveza inglesa, en la fermentación de los vinos, y en la producción de alcohol, glicerol e invertasa (Jay, 1994).

**Foto 1.** *Saccharomyces cerevisiae*. Fotografía de microscopía electrónica de barrido (2 mm) de la pagina de Internet.

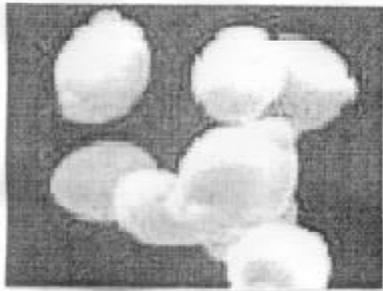


Foto 1

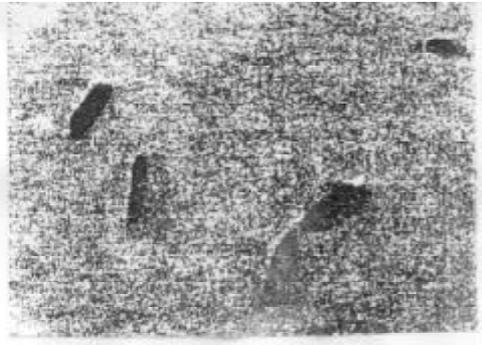


Foto 2

**Foto 2.** *Kluyveromyces fragilis*. Tinción gram. Foto de W. L. Flannery en *Microbiología de la leche*, Foster M.E., 1969.



Foto 1



Foto 2

### 3.3. Principales usos de las levaduras

Entre los principales empleos de las levaduras se destacan (Kameswara Rao, 2003):

1. *Producción de las células de levadura (biomasa)*
  - ✗ levadura desecada como complemento alimenticio
  - ✗ levadura desecada para pienso de animales
2. *Extracción de productos de su metabolismo* como aminoácidos, enzimas, vitaminas, alcohol, etc. para el consumo o el uso humano y/o animal.

En la tabla 3 se señalan ejemplos de los metabolitos primarios y secundarios que se obtienen en la industria alimentaria y farmacéutica.

**Tabla 3. Ejemplos de los metabolitos primarios y secundarios \***

	<b>Metabolitos</b>	<b>Organismo</b>	<b>Utilización</b>
Metabolitos primarios	Etanol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Kluyveromyces fragilis</i>	Industria de las bebidas alcohólicas
	Riboflavina	<i>Ashbya gossipii</i>	Nutrición
	Vitamina B12	<i>Pseudomonas denitrificans</i>	Nutrición
Metabolitos secundarios	Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Antibiótico
	Estreptomicina	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibiótico

\* (Kameswara Rao, 2003)

En la tabla 4 se señalan ejemplos de las enzimas que se obtienen por métodos biotecnológicos para el uso en la industria alimentaria y farmacéutica.

**Tabla 4. Ejemplos de las enzimas \***

<b>Organismo</b>	<b>Enzima obtenidas</b>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertasa
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Lactasa
<i>Saccharomycopsis lipolitica</i>	Lipasa

\* (Kameswara Rao, 2003)

**3.4. Productos de la industria alimenticia**

- ✍ Levadura de panadería
- ✍ Fermentación anaeróbica (alcohol)
- ✍ Obtención de ácido láctico

**3.5. Composición típica de las levaduras**

Algunos de estos usos están basados en la composición de las levaduras. Los componentes principales de la biomasa de levadura están presentados en la tabla siguiente:

Componentes	%	Componentes	%
Proteínas	45,0-55,0	Calcio	0,6-1,3
Hidratos de carbono	25,0-35,0	Fósforo	1,4-1,7
Grasas	2,0-5,0	Potasio	1,2-1,9
Cenizas	6,0-8,0	Magnesio	0,1-0,2
Hierro	9,3-35,0 mg/%	Cobre	2,0-13,4 mg/%
Molibdeno	1,3-12,3 mg/%	Cinc	3,3-16,3 mg/%

\* (Foster y col., 1969; Zalashko, 1990)

Alrededor del 70% del nitrógeno total de las levaduras esta en forma de proteínas, el 8 - 10% como purina y el 4% como pirimidina. El resto esta en forma de aminoácidos y nucleótidos.

Por ejemplo, analizando el extracto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que se usa en la industria alimentaria, se puede observar el alto contenido de aminoácidos esenciales. Esta característica de la levadura *S. cerevisiae* se utiliza para la producción del complemento dietario.

**Tabla 6. Contenido de los aminoácidos en extracto de la levadura *S. cerevisiae* (% de proteínas)\***

Aminoácidos	%	Aminoácidos	%
Lisina	8,2	Valina	5,5
Histidina	4,0	Isoleucina	5,5
Arginina	5,0	Tirosina	5,0
Leucina	7,9		

\* (Elinov, 1995)

### 3.6. Importancia de algunos elementos de las levaduras en la alimentación

Las levaduras contienen:

- ✎ **Proteínas** (50% de biomasa)
- ✎ **Vitaminas del grupo B** (B1, B2, B6, niacina, ácido fólico, biotina y ácido pantoténico), cuyas principales funciones son:
  - participar en las reacciones enzimáticas como co-enzimas (B1, B6, niacina, biotina y ácido fólico)
  - intervenir en la síntesis de los ácidos nucleicos (biotina y ácido fólico)
  - actuar como activadores de la respiración celular (B2 y niacina)
  - ayudar a la asimilación de otras vitaminas (ácido fólico, B12) (Nikitin, 1996)

✎ **Esteroles** (pro vitamina D)

Los esteroles (ergosterol) presentes en las levaduras se convierten en vitamina D2 activa (ergocalciferol) cuando se los irradian con luz ultra violeta (Stone, 1998).

✎ **Micro elementos** – en este grupo es importante destacar al selenio y al cromo, cuyos beneficios se conocieron durante los últimos años:

- **Selenio:** este antioxidante es necesario para la activación de los sistemas enzimáticos, tiene efectos protectores en el hígado y en otros tejidos. También activa a la enzima glutatina peroxidasa, que previene el daño oxidativo de la membrana celular (Stone, 1998).
- **Cromo:** es muy importante en la regulación del metabolismo de los azúcares. Esta regulación consiste en un complejo de cromo trivalente con péptidos biológicamente activos y aminoácidos que actúan en conjugación con la insulina para facilitar el metabolismo de los hidratos del carbono (Stone, 1998). Esto es muy importante para los diabéticos en general (chicos y adultos), ya que presentan un bajo contenido de cromo celular, lo que lleva a una menor posibilidad de absorción de cromo o a una disfunción en la tolerancia de la glucosa.

Si bien todavía no se conoce el mecanismo, los estudios indican que las personas que consumen cromo en forma orgánica tienen una reducción del azúcar en sangre y una reducción del colesterol y de los triglicéridos en el plasma.

### 3.7. Beneficios del uso de la levadura *S. cerevisiae* en la alimentación humana y animal

Las levaduras se han administrado a animales durante mas de 100 años, ya sea en forma de masa fermentada, de subproductos de las levaduras provenientes de cervecerías o destilerías, o de productos comerciales elaborados a base de levaduras específicamente para la alimentación animal (Sedano, 2004).

El tipo de levadura más antigua y más usada es *Saccharomyces cerevisiae*.

Según varios estudios (Reddy y col., 1976; Vrisseyre, 1980; Zalashko, 1990; Revillon y col., 2000; Brock y col., 2000; Olvera-Novoa y col., 2002) se han confirmado muchos beneficios del uso de esta levadura como complemento en la alimentación animal y humana. A continuación se dan algunos ejemplos de sus beneficios y funciones:

✂ **En cerdos** (Sedano, 2004):

- promueve el crecimiento
- aumenta la producción de leche materna
- facilita el aumento de peso
- estimula el funcionamiento del sistema inmune
- mejora la asimilación de nutrientes

✂ **En humanos** esta levadura se utiliza en alimentación y en medicina (Markmann, 2003)

· en individuos sanos:

- se aplica durante el embarazo y la lactancia, en niños durante el desarrollo y crecimiento
- complementa dietas vegetarianas
- refuerza el sistema nervioso favoreciendo el normal funcionamiento cerebral
- se usa como preventivo de afecciones vasculares (por su contenido en ácido fólico y ácidos grasos insaturados)

· en individuos enfermos:

- se usa en desnutridos en general, especialmente oncológicos y quemados
- se utiliza como protección hepática por daño medicamentoso
- se aplica para combatir los efectos de la anorexia
- activa el sistema inmunológico
- se utiliza como antianémico, preferentemente por su contenido de ácido fólico.

### 3.8. Ejemplos de uso de otros tipos de levaduras

Existen muchos ejemplos (Zalashko, 1999) de utilización de distintas cepas de levadura para la obtención del producto proteico y vitamínico. Podemos mencionar los siguientes:

- ✂ *Candida kefir*, *Candida humicola* (procedimiento S.A.V., Francia, Rusia)
- ✂ *K. utilis*, *K. fragilis*, *K. lactis* y *S. cerevisiae* (procedimiento Bel, Francia)
- ✂ *Candida utilis* (*Republica Checa*)
- ✂ *Candida tropicales* (Bulgaria)
- ✂ *Candida intermedia* (Austria)

A su vez los procedimientos para obtener el producto requerido pueden diferir en el modo de inoculación: monocultivo, cultivo en conjunto con bacterias, cultivo mixto de levaduras (Zalashko, 1999).

Ejemplos:

✂ Procedimientos basados en utilización de monocultivo (una levadura) son:

- **Bel, S.A.V., Whey** (anteriormente descriptos en el punto 3.1. de la Introducción)

✂ Procedimiento que utiliza un conjunto de levaduras y de bacterias:

- **Kilsk**: este proceso esta basado en el cultivo de la levadura *Candida crusei* y del *Lactobacillus bulgaricus*. Por medio de fermentaciones continuas se obtiene la biomasa.

✂ Procedimiento que utiliza dos cepas de levaduras:

- **Fromageries Bel** (Alemania): para este proceso se realiza previamente la desproteización del suero y la hidrólisis de la lactosa para poder cultivar la levadura *S. cerevisiae*. Luego se realiza la separación de la biomasa obtenida y se utiliza el líquido como medio de cultivo para otras levaduras como *K. fragilis* o *K. lactis*.

También existen algunos trabajos de investigación que buscan la posibilidad de obtener una mayor

biomasa, utilizando un cultivo binario de levaduras. Por ejemplo, los trabajos de Ocampo Cervantes y col (2000) y Urbina y col. (2000) realizados en México, seleccionan un cultivo mixto de levaduras con mayor rendimiento de biomasa para el tratamiento biológico del suero lácteo. Otros científicos (Okos y col., 2004) en Estados Unidos están diseñando un bioreactor para utilizar el cultivo mixto de levaduras *Kluyveromyces marxianus* y *Candida utilis* para la obtención de proteínas unicelulares.

Para realizar nuestro trabajo tomamos como ejemplo estos estudios por lo cual estudiamos los cultivos (mono y mixtos) de las levaduras a fin de observar su rendimiento celular y de esta manera obtener el producto proteico y vitamínico.

### Objetivos

El objetivo del presente trabajo consistió en el estudio de las características que abajo se detallan, de tres cepas de levaduras para evaluar su rendimiento celular, utilizando al suero lácteo como medio de cultivo. Este análisis de las levaduras está dirigido a la futura elaboración de un producto con alto contenido de proteínas, vitaminas y aminoácidos que podría ser usado como complemento en la alimentación humana y animal.

En la investigación se desarrollaron los siguientes puntos:

- ✍ Análisis de las características microscópicas y macroscópicas de las cepas de levaduras (*Kluyveromyces fragilis* Mp-8, *Saccharomyces cerevisiae* Mp-12, *Cándida humicola* Mp-6), elegidas por el laboratorio SIBSA S.A.
- ✍ Verificación de su capacidad de utilizar la lactosa como fuente de carbono.
- ✍ Comparación de los rendimientos celulares de las cepas por separado y en conjunto, utilizando como medio de cultivo el suero lácteo.
- ✍ Utilización de diferentes concentraciones celulares de cada levadura dentro del cultivo *Cándida humicola-Kluyveromyces fragilis* para observar la modificación del rendimiento.

También se verificó la presencia de proteasas y amilasas (este dato sirve para una futura elección de posibles fuentes de componentes del medio de cultivo a nivel industrial).

## Materiales y métodos

### 1. Microorganismos

Las cepas utilizadas fueron obtenidas de la colección de cepas industriales del Instituto de Preparados Biológicos de Berdsk, Rusia.

Se utilizaron tres cepas de levaduras:

- Kluyveromyces fragilis* Mp-8
- Saccharomyces cerevisiae* Mp-12
- Candida humicola* Mp-6

### 2. Medios de cultivo

#### 2.1. Medio para preparar el inóculo

- ✍ Con lactosa (g/l):  
Lactosa- 20,0; Peptona- 10,0; Extracto de levadura - 5,0
- ✍ Con dextrosa (g/l) para la cepa *S. cerevisiae*:  
Dextrosa- 20,0; Peptona- 10,0; Extracto de levadura - 5,0

#### 2.2. Medios para verificar la presencia de enzimas

##### 2.2.1. Medio con lactosa de A. Kudriavchev (Rodina, 1985) (g/l)

Lactosa – 50,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 4,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 2,5; MgSO<sub>4</sub> – 0,3

##### 2.2.2. Medio con gelatina (Catalogo, 1996) (g/l)

Gelatina – 100,0; Lactosa – 50,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 2,5; MgSO<sub>4</sub> – 0,3

##### 2.2.3. Medio con almidón (Catalogo, 1996) (g/l)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> –4,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -2,5; MgSO<sub>4</sub> –0,3; Almidón – 1,3; Agar – 2,7

### 2.3. Medio agar para conservar las cepas (g/l)

- ✂ Peptona –5,0; NaCl – 1,0; Agar – 15,0; Suero lácteo –1l
- ✂ Peptona–5,0; NaCl – 1,0; Agar – 15,0; Glucosa- 5,0 (para la cepa *S. cerevisiae*)

### 2.4. Medio para determinar el rendimiento celular (g/l)\*

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 4,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 2,0; MgSO<sub>4</sub> – 0,9; Agua de la maceración de granos de maíz – 1,6; Suero lácteo –1l.

#### \* Características del medio:

El cultivo de levaduras para determinar su rendimiento celular fue realizado en un medio de cultivo optimizado. Al suero lácteo se le agregaron las sales minerales necesarias pero en cantidades mínimas para no encarecer el proceso de producción. Descripción del medio:

- ✂ Suero lácteo - el valor de este componente se menciona en el punto 2 de la Introducción. El componente principal es la lactosa que se utiliza como fuente de carbono y de energía para la biosíntesis.
- ✂ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – este componente aporta nitrógeno mineral. El nitrógeno participa en la formación de los grupos amino (NH<sup>2+</sup>, NH<sub>2</sub><sup>+</sup>) en las moléculas de los aminoácidos y de los nucleótidos para la síntesis de las proteínas (Pert, 1978).
- ✂ MgSO<sub>4</sub> – los componentes Mg<sup>2+</sup> y S<sup>2+</sup> son necesarios para la formación de las enzimas; S<sup>2+</sup>- se necesita para la síntesis de los aminoácidos: cisteína, metionina y co-enzimas (biotina, tiamina).
- ✂ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – el grupo PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> es una fuente energética. Los componentes SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y K<sup>+</sup> son muy importantes para el crecimiento celular (están relacionados con la formación de RNA).
- ✂ Agua de la maceración de granos de maíz - este producto es fuente de nitrógeno orgánico y contiene biofactores de crecimiento. Gracias a sus componentes estimula el crecimiento y la productividad de los microorganismos porque contiene una gran cantidad de proteínas, aminoácidos, vitaminas y muchos elementos minerales (Pert, 1978).

### 3. Método de preparación del suero lácteo

Se utilizó suero lácteo (concentración de lactosa 50 g/l) proveniente de la industria de quesos de la empresa de productos lácteos «La Serenísima».

Para los ensayos realizamos la desproteinización y la esterilización del suero de la siguiente manera (Mishyn, 2002):

- ✂ Se calentó a 95° C y se mantuvo el suero lácteo a esta temperatura durante 1 hora para desnaturalizar y coagular las proteínas, luego se decantó.
- ✂ La esterilización fue efectuada a 115° C durante 20 min.

### 4. Modo de preparación del inóculo para los ensayos

#### 4.1. Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se cultivaron las levaduras por separado en matraces Erlenmeyer estériles de 500 ml que contenían 200 ml del medio de cultivo estéril (2.1), pH - 5,5. Los matraces se mantuvieron en agitación constante a 54 ciclos/min y a una temperatura de 28° C durante 16 horas.

#### 4.2. Estandarización de la concentración celular

Al finalizar la preparación del inóculo debe realizarse la estandarización de la concentración celular a utilizar en los distintos ensayos. Para este fin se utilizó el método de recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC):

- 1) Se realizaron diluciones de las suspensiones celulares, con solución fisiológica, en tubos de ensayo. Se realizaron 8 diluciones a cada cepa.
- 2) Se sembraron 0,2 ml de las tres últimas diluciones, por duplicado, en las placas con agar (ver punto 2.3. de Materiales y Métodos)
- 3) Se incubaron las placas a 28° C durante 24 horas.
- 4) Se determinó el número de colonias en cada placa y se calculó el número de UFC/ml en la muestra original.

Este dato se utilizó para poder calcular el volumen del inóculo de cada levadura y así preparar un medio de cultivo con una concentración celular inicial de 10<sup>7</sup> UFC/ml.

### 5. Ensayo para verificar la capacidad de las levaduras de utilizar la lactosa (Rodina, 1985)

Con este propósito, se realizó el ensayo utilizando el medio de cultivo con la concentración de lactosa

50g/l indicado en el punto 2.2.1. de Materiales y Métodos. Para cada inóculo (1 ml) se preparó un tubo con 9 ml del medio y 0,5 ml de azul de bromotimol (pH 6,7 - 7,0). Se incubó 72 horas a una temperatura de 28° C. Se empleó como control el medio de cultivo sin inocular.

Al terminar el tiempo de incubación se observaron los resultados, manifestados por los cambios de color del medio y la variación de los pH según los indicadores de Klark.

## 6. Ensayo para determinar el rendimiento celular de las cepas por separado y en conjunto

Para evaluar los rendimientos celulares de las cepas o conjunto de cepas, se analizaron dos tipos de cultivos:

### Monocultivos:

- *Kluyveromyces fragilis*
- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Candida humicola*

### Cultivos mixtos binarios\*:

- *Kluyveromyces fragilis* – *Saccharomyces cerevisiae*
- *Candida humicola* - *Kluyveromyces fragilis*
- *Candida humicola* – *Saccharomyces cerevisiae*

\* La relación entre las concentraciones celulares de las dos levaduras fue de 1:1.

Se agregó la cantidad calculada del inóculo de cada levadura a matraces Erlenmeyer de 500 ml que contenían el medio de cultivo estéril de pH 5,5, indicado en el punto 2.4. de Materiales y Métodos.

Para obtener la misma concentración celular en los monocultivos y en los cultivos mixtos se varió el volumen del medio de cultivo (200 ml para monocultivos y 400 ml para cultivos mixtos).

Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los matraces se mantuvieron en agitación constante a 54 ciclos/min., a una temperatura de 28° C durante 36 horas.

Luego de esta incubación, se determinó el rendimiento celular mediante el peso seco de la biomasa.

Para obtener este dato, las muestras se filtraron a través de membranas de fibra de vidrio (Whatman Gf/C) de 1.2 mm. La masa celular retenida en las membranas se lavó con agua destilada para eliminar los constituyentes minerales solubles que pudieran estar presentes y posteriormente, las membranas se colocaron en una estufa a 70° C durante 2 horas y después a 40° C hasta obtener el peso constante.

El rendimiento celular se estimó por la diferencia de peso, usando una balanza Acelab V – 1 mg, con exactitud de 0,001 g.

## 7. Estudio de las características de las cepas de levaduras

### 7.1. Ensayo para verificar la presencia de amilasas (Catalogo, 1996)

Para verificar la presencia de estas enzimas se realizó el ensayo de la siguiente manera:

Se preparó el medio de cultivo según lo indicado en el punto 2.2.2. de Materiales y Métodos. Se esterilizó al 0,5 atm durante 30 min y se llenaron con 20 ml del medio placas de Petri, dejándolas luego enfriar.

Las cepas investigadas se sembraron en la superficie del medio y se incubaron 72 h a una temperatura de 28° C. Para interpretar los resultados se le agregó 3 ml de solución de lugol – yodo (0,5%) en dilución de 1: 5 (1 parte del lugol y 5 partes de agua) a cada placa.

La ausencia de coloración azul indicó la presencia de enzimas amilasas.

### 7.2. Ensayo para verificar la presencia de proteasas (Catalogo, 1996).

Para realizar este ensayo se prepararon 100 ml del medio indicado en el punto 2.2.3. de Materiales y Métodos y se dejó reposar la gelatina durante 40 - 60 min. Se esterilizó al 0,5 atm durante 15 min y se llenaron los tubos con 8 - 9 ml del medio preparado.

Se sembraron las cepas en el medio de cultivo tibio y se incubaron en posición de 45° a 28° C durante 7 días. Al terminar el tiempo de incubación, los tubos se colocaron en heladera a 4 - 8° C durante 4 horas y luego se observaron los resultados. La presencia de proteasas se determinó por la licuefacción de la gelatina.

## Resultados

### 1. Características de las cepas utilizadas

Para la obtención del producto proteico y vitamínico se seleccionaron las cepas de levaduras utilizadas habitualmente por muchos países en la industria alimentaria. Estas cepas de levaduras cumplen con las

características necesarias para ser utilizadas en la obtención de complementos alimentarios (no son patógenas, tienen alto contenido nutritivo, no ocasionan daños al ser ingeridas).

✍ **Características macroscópicas y microscópicas**

Se observaron las características macroscópicas (forma y tipo de colonia) y microscópicas por inmersión con el microscopio óptico «Arcano», con aumento de 1000 X para estudiar las características morfológicas de las levaduras. Los preparados fueron coloreados con la técnica de Gram.

Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 7. Características macroscópicas y microscópicas**

<b>Cepas</b>	<b>Macroscópicas</b>	<b>Microscópicas</b>
<i>S.cerevisiae</i>	Colonias planas, lisas, brillantes, color crema. Estructura de las colonias: triable	Unicelular, forma de huevo, gemación multipolar Gram positivo
<i>K. fragilis</i>	Colonias de textura pastosa, color crema-amarillo Estructura de las colonias: granulosas	Forma de huevo u ovoide, alargado, gemación multipolar Gram variable
<i>C. humicola</i>	Colonias de textura áspera (rugosa) de color gris, bordes con pliegues	Seudohifas largas, células cilíndricas. Gram positivo

**2. Ensayo para verificar la capacidad de las levaduras de utilizar la lactosa**

Se dio prioridad a las levaduras que tuvieran la posibilidad de producir un alto rendimiento celular, rico en aminoácidos esenciales, vitaminas y micro elementos y que se diferencien a su vez por el modo de utilización de la lactosa.

Como paso previo a la comparación del rendimiento celular de las levaduras en el medio de cultivo con suero lácteo, fue importante confirmar la posibilidad de las levaduras elegidas de hidrolizar la lactosa (por presencia de la enzima b-galactosidasa ).

El esquema de la hidrólisis es el siguiente:

Lactosa P glucosa + galactosa (Zalashko y col., 1999)

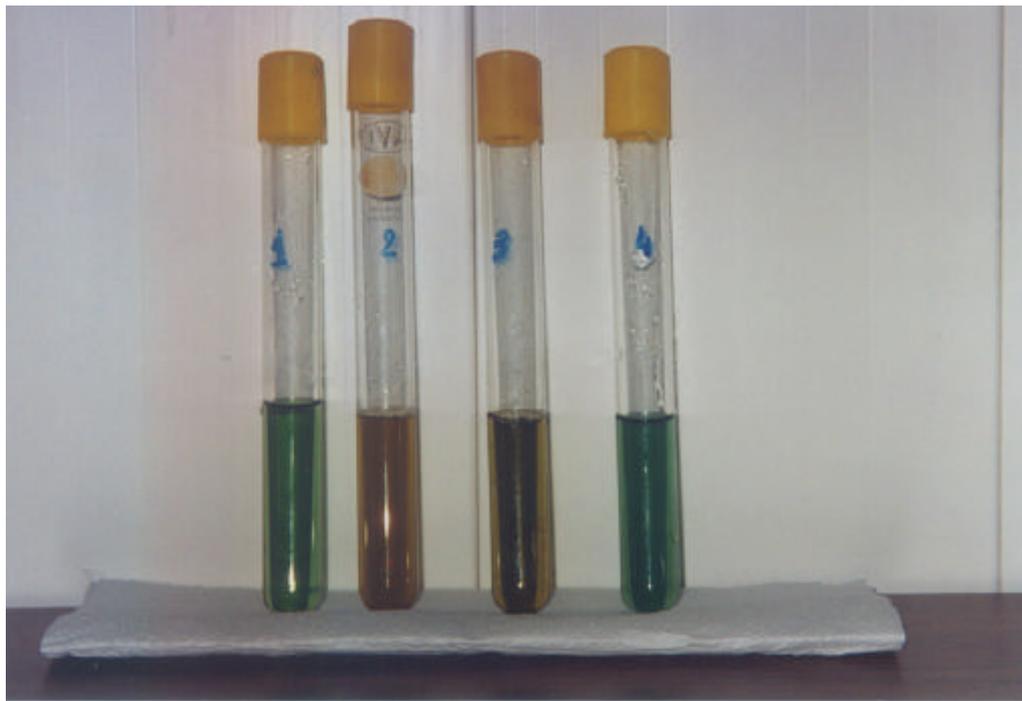
Con este propósito, se realizaron los ensayos de la manera descrita en el punto 5 de Materiales y Métodos. Los resultados se evaluaron en 72 horas, observando el crecimiento celular y los cambios de color del medio.

Las cepas que utilizaron lactosa como fuente de carbono presentaron un notable crecimiento celular en este medio de cultivo, cambiaron su pH virando el indicador de azul verdoso a amarillo por acidificación del medio.

**Tabla 8. Resultados de la capacidad de las cepas de utilizar la lactosa (72horas)**

Cepas	Macroscópicas	Microscópicas
<i>S.cerevisiae</i>	Colonias planas, lisas, brillantes, color crema. Estructura de las colonias: triable	Unicelular, forma de huevo, gemación multipolar Gram positivo
<i>K. fragilis</i>	Colonias de textura pastosa, color crema-amarillo Estructura de las colonias: granulosas	Forma de huevo u ovoide, alargado gemación multipolar Gram variable
<i>C. humicola</i>	Colonias de textura áspera (rugosa) de color gris, bordes con pliegues	Seudohifas largas, células cilíndricas. Gram positivo

**Foto 3. Capacidad de las cepas de utilizar la lactosa**



1. *Saccharomyces cerevisiae* Mp-12
2. *Kluyveromyces fragilis* Mp-8
3. *Candida humicola* Mp-6
4. Control

**Observaciones:**

La cepa *C. humicola* presentó la formación de una película en la superficie del tubo, lo que constituye una de las características de las levaduras oxidativas (Frazier, 1993).

De este modo nuestros resultados concuerdan con los **datos bibliográficos** (Foster 1969; Zalashko, 1990; Romano, 2001; Ghaly 2004), indicados en la Tabla 9:

**Tabla 9. Modo de utilización de la lactosa**

Levaduras elegidas	Modo de utilización de la lactosa
<i>K. fragilis</i>	Oxidación (y fermentación)*
<i>C. humicola</i>	Oxidación
<i>S. cerevisiae</i>	No utiliza**

\* fermentación – este dato fue obtenido según datos bibliográficos (ya que no se realizó el ensayo en condiciones anaeróbicas)

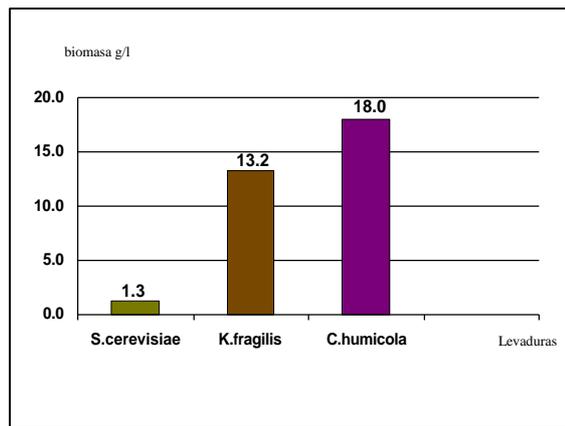
\*\* la cepa *S. cerevisiae* fue elegida para este estudio, pese a que no utiliza la lactosa como fuente de carbono, pues al cultivarla con otras levaduras es capaz de utilizar los metabolitos de éstas y así obtener una alta biomasa (Urbina y col., 2000).

**3. Comparación de los rendimientos celulares de las cepas por separado y en conjunto, utilizando como medio de cultivo el suero lácteo**

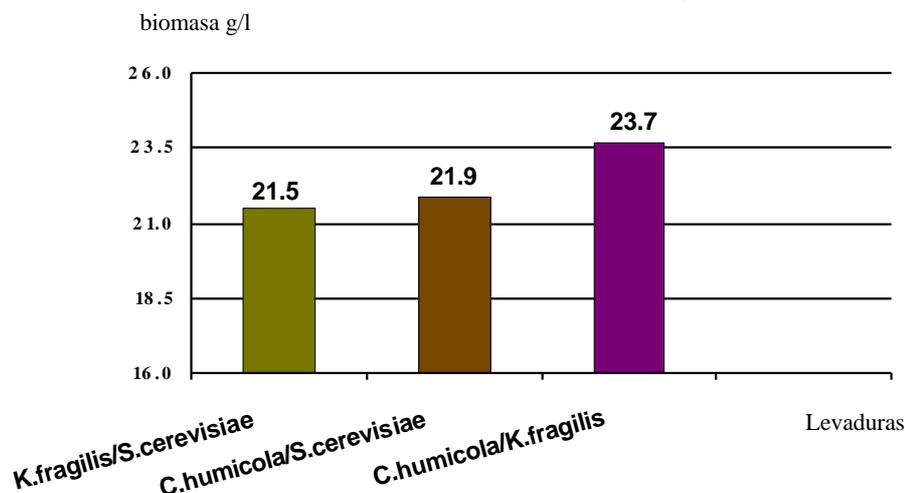
Para comparar los rendimientos celulares y elegir la/s cepa/s con mayor rendimiento se realizaron los ensayos, indicados en el punto 6 de Materiales y Métodos.

El rendimiento de la biomasa se estimó por la diferencia del peso y los resultados se presentaron en los siguientes gráficos.

**Gráfico 1. Rendimientos celulares de las cepas cultivadas por separado**



**Gráfico 2. Rendimientos celulares de las cepas cultivadas en conjunto**



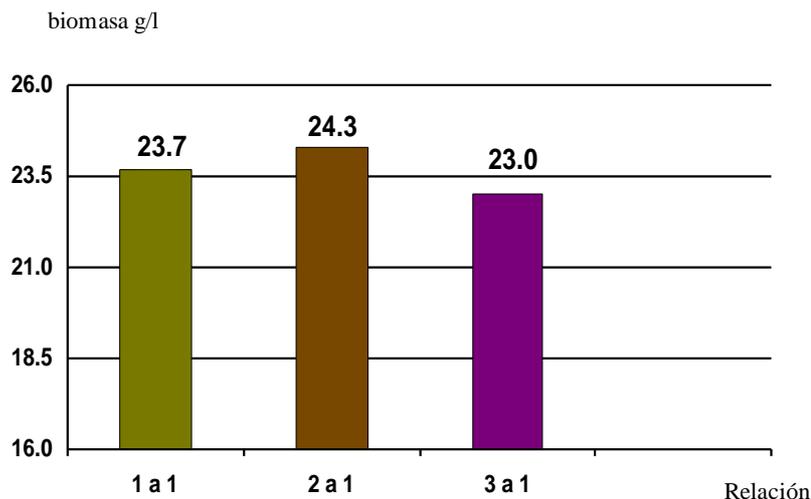
Los gráficos presentados fueron realizados, tomando el promedio de los resultados de 9 ensayos por cepa.

#### 4. Utilización de diferentes concentraciones celulares de *Kluyveromyces fragilis* y de *Candida humicola* dentro del cultivo, para observar la modificación del rendimiento

Teniendo en cuenta los ensayos se eligió el cultivo mixto binario de *Candida humicola* - *Kluyveromyces fragilis* (1 parte:1 parte) que presentó el mayor rendimiento (23,7 g/l) para realizar los nuevos ensayos. Se probaron diferentes concentraciones celulares de cada levadura dentro del cultivo para observar si se modificaba el rendimiento. Para este fin se ensayaron las siguientes relaciones: 1:1, 1:2, 1:3. Se cultivaron las muestras en las condiciones descritas en los ensayos anteriores (ver el punto 6 de Materiales y Métodos).

Los resultados se estimaron por la diferencia del peso y se indican en el gráfico 3.

**Gráfico 3. Diferentes concentraciones celulares de *Kluyveromyces fragilis* y de *Candida humicola* dentro del cultivo**



\* 2 partes de *K. fragilis* y 1 parte de *C. humicola*

3 partes de *K. fragilis* y 1 parte de *C. humicola*

El gráfico presentado fue realizado tomando el promedio de los resultados de 6 ensayos por cepa.

#### 5. Estudio de las características de las cepas de levaduras

##### 5.1. Ensayo para verificar la presencia de amilasas

El método está basado en que la enzima  $\alpha$ -amilasa hidroliza el almidón (hidrato de carbono). Como resultado de la hidrólisis se forman las dextrinas que no se colorean con el yodo (Babichkaia, 1985).

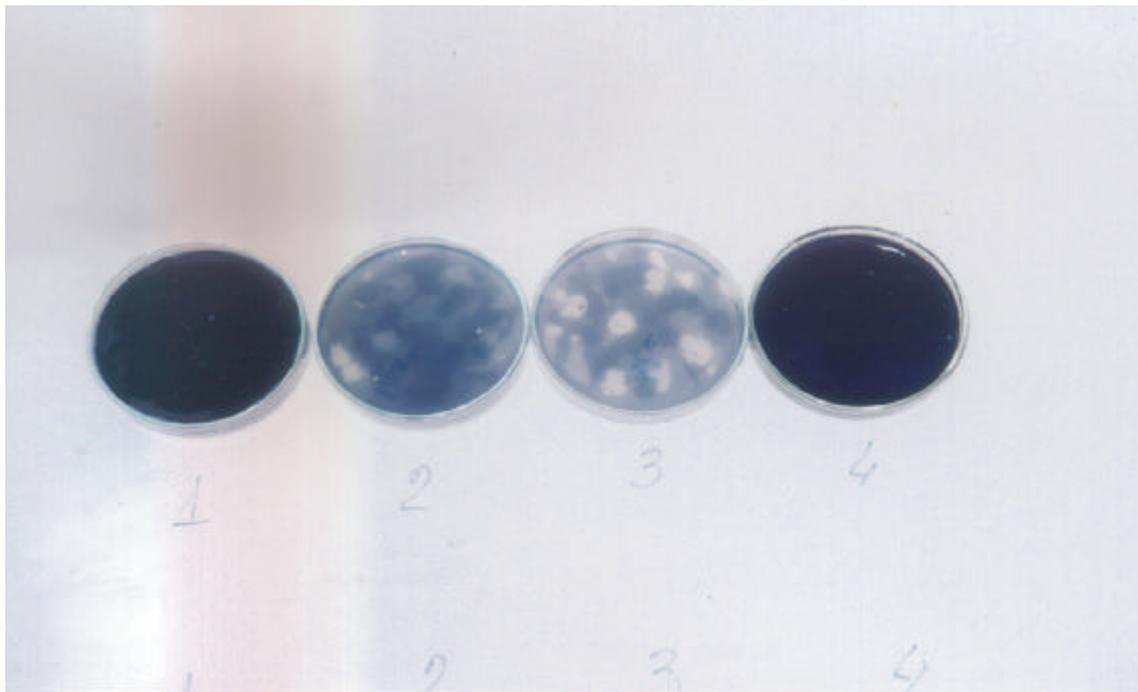
Para verificar la presencia de esta enzima se hizo el ensayo, descrito en el punto 7.1. de Materiales y Métodos.

Al terminar el periodo de incubación se observaron los resultados, que se presentan en la Tabla 10. La ausencia de coloración azul indicó la presencia de enzimas amilasas.

**Tabla 10. Presencia de amilasas**

Cepas	Ausencia de coloración azul
<i>S. cerevisiae</i>	-----
<i>C. humicola</i>	+++
<i>K. fragilis</i>	++++
Control	-----

**Foto 4. Presencia de amilasas**



1. *Saccharomyces cerevisiae* Mp-12
2. *Kluyveromyces fragilis* Mp-8
3. *Candida humicola* Mp-6
4. Control

### 5.2. Ensayo para determinar la presencia de proteasas

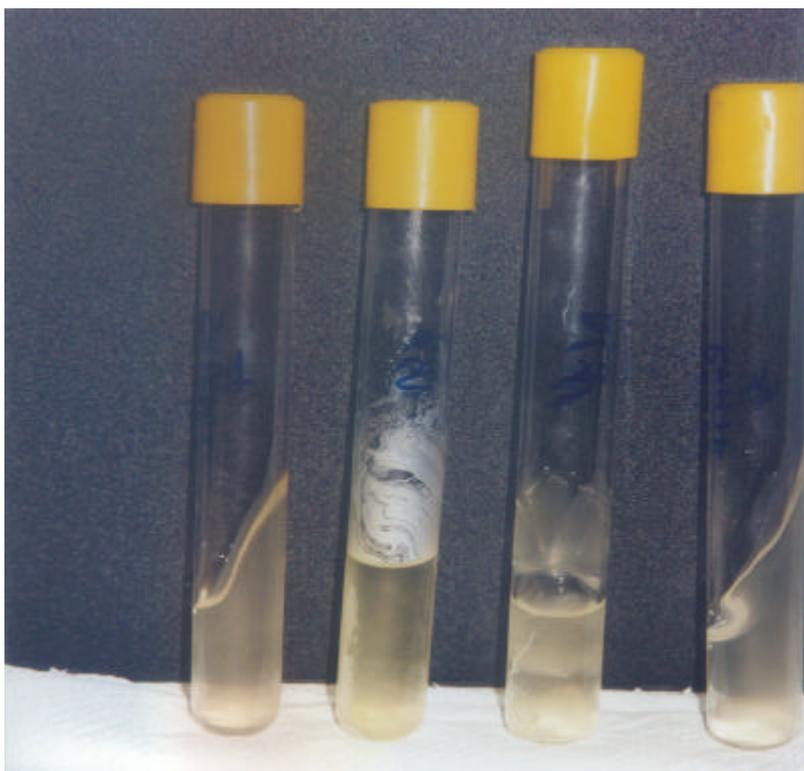
El método está basado en la capacidad de las proteasas de fluidificar la gelatina (Babichkaia, 1985).

Para verificar la presencia de estas enzimas se realizó el ensayo según la técnica indicada en el punto 7.2. de Materiales y Métodos. Al terminar el período de incubación se observaron los resultados, que son presentados en la Tabla 11.

**Tabla 11. Presencia de proteasas**

Cepas	Fluidificación del medio
<i>S. cerevisiae</i>	+
<i>C. humicola</i>	++
<i>K. fragilis</i>	++++
Control	No presenta

### Foto 5. Presencia de proteasas



1. *Saccharomyces cerevisiae* Mp-12
2. *Kluyveromyces fragilis* Mp-8
3. *Candida humicola* Mp-6
4. Control

Como se puede observar, las cepas estudiadas tienen diferentes grados de actividad de las proteasas. En las cepas que presentan mayor actividad sería posible la utilización de sustratos que contengan almidón como componentes del medio de cultivo.

## Discusión

### 1. Análisis de los resultados

El laboratorio SIBSA S.A. se interesó en la posibilidad del cultivo de las levaduras utilizando al suero lácteo como componente del medio de cultivo para la obtención de un producto alimenticio con alto contenido de aminoácidos, vitaminas y micro elementos. Con este fin, se utilizaron tres cepas de levaduras que tienen diferente modo de utilización de la lactosa. Los resultados obtenidos concordaron con los datos de la bibliografía (Foster y col., 1969; Zalashko, 1990; Romano y col., 2001; Ghaly y col., 2004).

También se realizaron ensayos para comparar el rendimiento celular de las cepas por separado y en cultivos mixtos binarios, utilizando al suero lácteo como componente del medio de cultivo.

En los monocultivos se observaron los siguientes resultados (se tomó su promedio):

- ✍ La cepa *S. cerevisiae* no creció significativamente en el medio de cultivo con suero lácteo por no poder utilizar la lactosa como fuente de carbono (porque no tiene la enzima  $\beta$  - galactosidasa). El escaso crecimiento (1,3 g/l) que presentó puede deberse a la utilización de algunos componentes del suero lácteo como el ácido láctico (Champagne, 1990).
- ✍ La cepa *Candida humicola* y la cepa *Kluyveromyces fragilis* presentaron un rendimiento celular de 18,0 g/l y 13,2 g/l respectivamente. Estos resultados reflejan su alta posibilidad de crecer en un medio de cultivo con lactosa.
- ✍ Al comparar la biomasa obtenida entre la *Candida humicola* (18,0 g/l) y la *Kluyveromyces fragilis* (13,2 g/l) se observa la tendencia a un mayor rendimiento de la *C. humicola*. Estos resultados son similares a los

obtenidos por el investigador Wasserman (Zalashko, 1990), quien al cultivar las levaduras en el suero lácteo obtuvo 12 g/l más de biomasa de la cepa *Candida humicola* que de la cepa *Kluyveromyces fragilis*.

Estas diferencias se podrían relacionar con las diversas formas de utilización de la lactosa (oxidación y/o fermentación). La *C. humicola* emplea la oxidación, en cambio la *K. fragilis* emplea ambos mecanismos según las condiciones del medio (aeróbicas o anaeróbicas).

Según los datos bibliográficos (Zalashko, 1990), las levaduras que tienen la capacidad de oxidar y fermentar la lactosa según las condiciones del cultivo, en el proceso aeróbico pueden reservar una cantidad significativa de energía, para utilizarla luego en condiciones anaeróbicas. Esto podría explicar la diferencia de velocidad del crecimiento y aumento de la biomasa en comparación con las levaduras que tienen sólo el proceso oxidativo. Estas últimas en el proceso aeróbico aprovechan prácticamente toda la energía para el intercambio constitutivo y como consecuencia tienen un mayor rendimiento celular en tiempo corto.

El siguiente paso del trabajo fue estudiar los rendimientos celulares de los cultivos mixtos binarios, que presentaron los siguientes resultados:

✎ Los cultivos mixtos de *K. fragilis* – *S. cerevisiae* (21,5 g/l) y de *C. humicola* – *S. cerevisiae* (21,9g/l) presentaron rendimientos celulares más altos que cada una de las cepas por separado (13,2 g/l - 1,3 g/l y 18,0 g/l - 1,3 g/l respectivamente).

De estos datos podemos inferir que la cepa *S. cerevisiae* esta utilizando algunos metabolitos producidos por la *K. fragilis* y la *C. humicola* para su crecimiento.

✎ El mayor rendimiento se observó en el cultivo de *C. humicola* - *K. fragilis* (23,7 g/l) en comparación con otros cultivos binarios. Esto se puede relacionar con que ambas cepas tienen la posibilidad de oxidar la lactosa, o sea que tienen una buena fuente de carbono para crecer.

Es necesario tener en cuenta que el rendimiento celular fue obtenido en un laboratorio experimental (se realizaron los ensayos en matraces, sin aeración dosificada). Seguramente a nivel industrial, al modificar las condiciones de fermentación los resultados sean más elevados.

Como resultado de los ensayos realizados en las cepas de *K. fragilis*, *S. cerevisiae* y *C. humicola* se observó la tendencia a una mayor obtención de biomasa en los cultivos mixtos que en los monocultivos. Este dato preliminar podría ser de utilidad para las industrias que deseen obtener un producto rico en proteínas, vitaminas y micro elementos, ya que normalmente se emplean monocultivos.

A raíz de estos ensayos realizados, el laboratorio SIBSA S.A. eligió para su trabajo el cultivo mixto binario de *Candida humicola* - *Kluyveromyces fragilis* (1:1) que presentó un alto rendimiento (23,7 g/l). Se investigaron las diferentes relaciones entre las concentraciones celulares iniciales de las levaduras, para observar la variación del rendimiento. Se observó que al cultivar las dos cepas de levaduras en relación de 1:1, las células de la cepa *Cándida* predominaban en el cultivo al final de la incubación. Al modificar las concentraciones, se observó que al aumentar la cantidad de *K. fragilis* (2 partes) hubo una leve tendencia a un mayor rendimiento (24,3 g/l). Se podría suponer que al cambiar las condiciones de fermentación a nivel industrial, esta tendencia sería más significativa. Pero para confirmar este resultado sería necesario repetir el ensayo, aplicando pruebas estadísticas.

Para que el proceso de fermentación a nivel industrial sea rentable es necesario elegir fuentes alternativas para medio de cultivo, ya que las utilizadas en el laboratorio tienen un alto costo por su pureza química (exceptuando el suero lácteo y el agua de la maceración de granos de maíz). Generalmente, en producciones similares (cultivo de levaduras) se utilizan como componentes del medio de cultivo los desechos de otras industrias (alimentaria, cervecera, etc.). Para facilitar su futura búsqueda, se realizaron los ensayos que verificaron la presencia de proteasas y amilasas en las cepas estudiadas. La confirmación de estas características bioquímicas posibilita la elección de una gran cantidad de desechos industriales que tienen los elementos nutritivos necesarios. Por ejemplo, la presencia de proteasas indica que pueden ser utilizadas como fuentes de nitrógeno para el medio de cultivo elementos como la gelatina, el salvado del maíz, del arroz y del trigo y los subproductos de las industrias de bebidas alcohólicas que utilizan cereales.

La presencia de amilasas posibilita como fuente de carbono el uso del almidón, de los desechos de las industrias que en su proceso de producción utilicen arroz, papa o maíz.

## 2. Características del producto rico en proteínas, vitaminas y micro elementos

Por los datos obtenidos en los puntos 3 y 4 de Resultados, el laboratorio SIBSA S.A. eligió el cultivo binario *C. humicola* - *K. fragilis* (1 parte : 2 partes) para elaborar el producto rico en proteínas, vitaminas y micro elementos para ser utilizado como complemento en la alimentación animal y evaluar su posible aprovechamiento en la industria alimentaria.

Los beneficios que se mencionarán están relacionados con todos los cultivos de las levaduras estudiadas en el presente trabajo. Los principales son:

- ✂ Como durante la fermentación se utiliza la lactosa, el producto es apto, incluso para las personas que no toleran la lactosa. Este problema es debido a la ingestión de productos que contienen lactosa (principalmente leche no fermentada) y los bajos niveles de b - galactosidasa intestinal (Marquina y col., 2003).
- ✂ La levadura enriquece el suero lácteo con sus aminoácidos, vitaminas y micro elementos.

A partir de los datos bibliográficos de otros investigadores (Zalashko, 1990; Zalashko y col., 1999; Boze y col., 2001) que cultivaron las levaduras estudiadas utilizando suero lácteo como medio de cultivo se sabe que estas cepas tienen alto contenido de proteínas en su composición.

**Tabla 13. Características de las levaduras (g por 100g de peso seco)\***

Levaduras	Nitrógeno	Proteínas	Grasas
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	9.0	54.0	1.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8.4	53.0	6.3
<i>Candida humicola</i>	9.6	57,6	8.9

\* (Zalashko y col., 1999; Boze y col., 2001)

Por los análisis realizados a los productos obtenidos cultivando levaduras en suero lácteo se conoce (Zalashko, 1990; Zalashko y col., 1999; Boze y col., 2001) que las proteínas de las cepas estudiadas son muy ricas en aminoácidos esenciales (Tabla 14).

Es posible, que la mezcla obtenida, cultivada a base de suero lácteo, presenta la misma composición de elementos. Seguramente puedan encontrarse rangos de variación cuantitativa relacionados con las diferencias en el proceso de fermentación (medio de cultivo, aeración, etc.).

**Tabla 14. Contenido de aminoácidos esenciales en los productos obtenidos de las levaduras cultivadas a base del suero lácteo (% de proteínas)\***

Aminoácidos	<i>K. fragilis</i>	<i>C. humicola</i>	Aminoácidos de la leche entera
Lisina	10.20	5.32	6.90
Histidina	1.87	1.45	5.50
Arginina	7.08	2.99	2.57
Ácido aspartico	11.16	6.55	5.06
Treonina	6.46	3.63	3.50
Serina	6.96	3.77	5.00
Ácido glutámico	13.26	9.18	11.70
Prolina	4.31	2.59	3.90
Glicina	4.63	2.85	0.40
Alanina	8.17	4.90	3.50
Valina	7.78	3.65	3.80
Metionina	∞	0.81	0.80
Isoleucina	6.00	7.95	10.30
Tirosina	3.42	2.78	2.00
Fenilalanina	5.39	3.09	1.50

\*(Zalashko y col., 1999; Boze y col., 2001)

Al comparar las cantidades de aminoácidos de las levaduras analizadas se observa que la composición es muy parecida a la de los aminoácidos contenidos en la leche entera. También las levaduras contienen mayor cantidad de lisina que la soja y los guisantes. Su contenido en treonina e isoleucina no es superado por ningún elemento vegetal (Markmann, 2002).

Las levaduras también son ricas en vitaminas del grupo B. En la siguiente tabla se pueden observar algunas vitaminas, la importancia de las mismas fue tratada en la Introducción.

**Tabla 15. Vitaminas presentes en el producto obtenido de la levadura *K. fragilis* cultivada a base de suero lácteo (mg/g) \***

Vitaminas	<i>K. fragilis</i>
Tiamina	24.1
Riboflavina	36.0
B6	13.6
Ácido nicotínico	280.0
Ácido fólico	6.83
Ácido pantoténico	67.2
Biotina	1.96

\*(Zalashko, 1990)

También se observa una concentración significativa de ácidos grasos insaturados lo que es importante ya que ellos ayudan a controlar los lipoproteínas de baja densidad (LDL).

**Tabla 16. Lípidos presentes en los productos obtenidos de las levaduras cultivadas a base de suero lácteo (% de lípidos) \***

Lípidos	<i>K. fragilis</i>	<i>C. humicola</i>
Ácidos grasos saturados	25.1	42.4
Ácidos grasos insaturados	73.6	57.5

\*(Zalashko, 1990)

En base a estos datos se puede considerar que el producto obtenido puede encontrar diferentes usos como complemento alimentario o en medicina, por poseer las siguientes características:

- ☒ Fuente natural de proteínas de alta calidad
- ☒ Abundancia del complejo vitamínico B

## Conclusiones

En el presente trabajo se realizó el análisis de las cepas y de los rendimientos de las levaduras cultivadas por separado y en cultivos mixtos, utilizando al suero lácteo como un componente del medio de cultivo. Como resultado preliminar, se observó el mayor rendimiento en los cultivos binarios de las cepas estudiadas.

Los resultados de los ensayos pueden servir para la elección de las cepas de levaduras dirigidas a la futura elaboración de un producto con alto contenido de proteínas, vitaminas y aminoácidos que podría ser usado como complemento en la alimentación humana y animal.

Para la elaboración del mismo podría utilizarse como componentes del medio de cultivo no sólo al suero lácteo sino que también otros subproductos de la industria alimenticia.

Gracias a los resultados obtenidos en este trabajo el laboratorio SIBSA S.A. eligió el cultivo binario de *Candida humicola* - *Kluyveromyces fragilis* (1:2) para la elaboración de un producto destinado a complementar la alimentación animal.

La fabricación del producto a partir de las levaduras utilizadas presenta varias ventajas:

- Es un proceso económico (no es necesaria una alta tecnología, no se utilizan métodos especiales de limpieza, los componentes del medio de cultivo son desechos de otras industrias), que se puede realizar incluso en las fábricas de queso.
- La utilización del suero de queso que acarrearía grandes problemas ecológicos al ser vertido como efluente.
- Implica la obtención de un producto con alto contenido de aminoácidos, vitaminas del grupo B y micro elementos.

Sería necesario estudiar las condiciones que posibiliten optimizar el rendimiento del producto, para facilitar su producción industrial (aeración, búsqueda de distintas fuentes de componentes para el medio de cultivo, elección de tipos de fermentación).

También, sería de gran interés un estudio exhaustivo de la composición del producto a fin de lograr un mejor aprovechamiento para el uso humano.

## Bibliografía

Astapovich N.I., Borisenko O.N. *Utilización de los microorganismos en agronomía* (ruso), 1ª ed., Astrel, Minsk, Rusia Blanca, 1998: 50-54.

Babichkaia B.G., Grel M.B. *Industria Láctea* (ruso), 2ª ed., Zdorovie, Minsk, Rusia Blanca, 1985: 109-112.

Bainotti A.E., Basilio J.C., Carrasco de Mendoza M.S. *Optimización de condiciones para la producción discontinua de proteína unicelular utilizando el suero de leche*. Revista Argentina de Microbiología **19**, 1-7 (1987).

Boze H., Moulin G., Galzy P. *Production of microbial biomass*. Montpellier, France, 2001: 168-175.

Brock T.D., Madigan M.T. *Microbiología*, 6ª ed., Prentice Hall Iberia, Madrid, 1993: 407-410.

Brock T.D., Madigan M.T., Martinko Y.M., Parker I. *Biología de los microorganismos*, 8ª ed., Prentice Hall Iberia, Madrid, 2000: 456-459.

*Catálogo de los métodos de determinación de la flora patógena de las infecciones intra hospitales* (ruso), Ministerio de Salud, Moscu, 1996: 45-48.

Cátedra de Fisiología Animal - Veterinaria, Universidad del Salvador. *Efecto de la administración de fármacos en el comportamiento de la gotera esofágica*. Proyecto de la investigación, convenio USAL – INTA, 1998.

[www.salvador.edu.ar/ua3-2-5-07proyecto1998.htm](http://www.salvador.edu.ar/ua3-2-5-07proyecto1998.htm)

Champagne C.P., Goulet J., Lachance R.A. *Production of Bacters' yeast in cheese whey ultrafiltrate*. Applied and Environmental Microbiology, **2**, 425-430 (1990).

Drach, V.P., Tvoroshkina A.A. *Alimentos*, **3** (1), 20-21 (2001).

Elinov, N.P. *La base de la biotecnología* (ruso), 1ª ed., Nauka, San Petersburgo, Rusia 1995: 381-382.

Englier V. *Reciclado los desechos de la leche*. Centro de Divulgación Científica – SEGBE – FCEyN, 12 de agosto de 2003. [www.fcen.uba.ar/prensa/noticias.html](http://www.fcen.uba.ar/prensa/noticias.html)

Foto de *Saccharomyces cerevisiae*. Página en Internet

[www.distans.livstek.lth.se:2080/yest.htm](http://www.distans.livstek.lth.se:2080/yest.htm)

Foster M.E., Nelson F.E., Speck M.L., Doetsch R.N., Olson J.C. *Microbiología de la leche*, 1ª ed., México 1969: 465-466.

Frazier W.C., Westhoff D.C. *Microbiología de los alimentos*, 4ª ed., Acribia S.A., Zaragoza, España, 1993: 41-49.

Ghaly A.E., Kamal M.A. *Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction*. Water Research, **38** (3), 631-644 (2004).

Grba. S., Stehlik-Tomas V., Stanzer D., Vahcic N., Skrlin A. *Selection of yeast strain Kluyveromyces marxianus for alcohol and biomass production on whey*. Chem. Biochem. Eng., **16** (1), 13-16 (2002).

Jay J.M. *Microbiología moderna de los alimentos*, 3ª ed., Acribia, S.A., Zaragoza, España, 1994: 36-39.

Kameswara Rao C. En: *Fermentation biotechnology*. Foundation for Biotechnology Awareness and Education. Copyright 2003: 1-12

[www.fbae.org/channels/general\\_issues/fermentation\\_biotechnology.htm](http://www.fbae.org/channels/general_issues/fermentation_biotechnology.htm)

- Leyte E.R., Cervellini J.E., Braun R.O. *Desempeño productivo de cerdos en el periodo de crecimiento-terminación, alimentación con ración seca restringida y lacto suero*. Publicación de Facultad de Agronomía, U.N.L.Pampa, C.C. 300 (6300), Santa Rosa, (2003): 1-3.
- Markmann C. *La levadura de cerveza: un producto natural*. Ver en: [www.sexovida.com/publicacion/articulos/levadura.htm](http://www.sexovida.com/publicacion/articulos/levadura.htm)
- Marquina D., Santos A. *Probióticos, prebióticos y salud*. Dpto de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid. Actualidad, **32**, 24-27 (2003).
- Marth E.H. *Utilization of whey through fermentations*. 10<sup>th</sup> Annual Marschall Invitational Italian Cheese Seminar at Holiday Inn N° 2, Madison, Wisconsin, April 30 and May 1, 1973: 1-9.
- Mishyn L., Zalashko M., Kartsel A. *Scale-up of ethanol production from whey*. Microbiology and Biotechnology of the XXI century: proc. Int. Conf., Minsk, Rusia Blanca, 22-24 June 2002.
- Nikitin, G.A. *La base de bioquímica de la industria biológica* (ruso), 1ª ed., Visha shkola, Kiev, Ucrania, 1994: 172-174.
- Nikitin G.A. *Industria de Microbiología* (ruso), 1ª ed. Editorial Vsesvit, Moscu, 1996: 236-263.
- Ocampo Cervantes O., Urbina C.E., Juárez Ramírez C., Ruiz Ordaz N., Galíndez Mayer J. *Depuración del suero común cultivo mixto de levaduras, utilizando un sistema por lote alimentado y alimentado repetido*. Tecnología Láctea Latinoamericana, México, **20**, 44-52 (2000).
- Okos M.R. *Production of yeast single-cell protein by utilizing food wastes*. Ver en: [www.ecn.purdue.edu/ABE/Research/research95/okos.piaz.96.html](http://www.ecn.purdue.edu/ABE/Research/research95/okos.piaz.96.html); 1996.
- Olvera-Novoa M.A, Martínez-Palacios C.A., Olivera-Castillo L. *Utilization of torula yeast (Candida utilis) as a protein source in diets for tilapia (Oreochromis mossambicus Peters) fry*. Aquaculture Nutrition, **8** (4), 257 (2002).
- Pert S.D. *Fundamentos de cultivación de microorganismos* (ruso), 1ª ed., Mir, Moscu, 1978: 147-157.
- Rech R., Cassini C., Secchi A., Ayub M. *Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of beta-galactosidase by Kluyveromyces marxianus*. J.Ind. Microbiol. Biotechnol., **23** (2), 91-96 (1999).
- Reddy C.A., Henderson H.E., Erdman M.D. *Bacterial fermentation of cheese whey for production of a ruminant feed supplement rich in crude protein*. Applied and Environmental Microbiology, **32** (6), 796-776 (1976).
- Revillion J.P., Brandelli A, Záchia Ayub M.A. *Production of yeast extracts from whey for food use: market and technical considerations*. Cienc. Tecnol. Aliment., **20** (2), 1-8 (2000).
- Revillion J.P., Brandelli A, Záchia Ayub M.A. *Production of yeast extract from whey using Kluyveromyces marxianus*. Braz. Arch. Biol. Technol., **46** (1), 1-12 (2003).
- Rodina A. G. *Métodos de microbiología del agua* (ruso), 1ª ed. Academia de Ciencia de Rusia, Moscu, 1985: 157-159.
- Romano P., Ricciardi G., Salzano G., Suzzi G. *Yeast from Water búfalo mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area*. International Journal of Food Microbiology, **69** (1), 45-51 (2001).
- Rossi-Alva J.C., Miguez Rocha-Leao M.H. *A strategic study using mutant-strain entapment in calcium alginate for production of S. cerevisiae cells with high invertase activity*. Biotechnol. Appl. Biochem., **38**, 43-51 (2003).
- Sanaa O., Soraya S. *Microbial biomass and protein production from whey*. Journal of Islamic Academy of Sciences, Egypt, **4** (2), 170-172 (1991).
- Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimentos. *Producción real de queso en Argentina*. [www.sagpya.gov.ar](http://www.sagpya.gov.ar) 2002.
- Seguí, Y. *Métodos de microbiología de la tierra* (ruso), 1ª ed., Kolos, Moscu, Rusia 1983: 246-247.
- Sonawat H.M., Agrawal A., Dutta S.M. *Production of beta-galactosidase from Kluyveromyces fragilis grown on whey*. Folia microbial, Praha, **26** (5), 370-376 (1981).
- Stone C.W. *Yeast products in the feed industry*. A practical guide for feed professionals. Diamond V mills, Inc. Cedar Rapids, Iowa. 1998: 3-14.
- [www.diamondv.com/articles/booklet/booklet.html](http://www.diamondv.com/articles/booklet/booklet.html)
- Szczodrak J. *Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized B-galactosidase from Kluyveromyces fragilis*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **10** (6), 631-637 (2000).
- Thivend P. *Use of whey in feeding ruminants*. Ver en: [www.fao.org/DOCREP/004/X6512E/X6512E09.htm](http://www.fao.org/DOCREP/004/X6512E/X6512E09.htm)
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. *Introducción a la microbiología*, 3ª ed., Acribia, S.A., Zaragoza, España 1993: 284-285.
- Urbina C.E., Juárez Ramírez C., Ruiz Ordaz N., Galíndez Mayer J. *Selección de un cultivo mixto de levaduras para el tratamiento biológico del suero lácteo*. Tecnología Láctea Latinoamericana, México, **19**, 44-47 (2000).

Vrisseyre R. *Lacto logia técnica*, 2ª ed., Acribia, Zaragoza, España, 1980: 454-459, 586-588.

Zalashko M.V. *Métodos de utilización de lacto suero* (ruso), 2ª ed., Ciencia y tecnología, Minsk, Rusia Blanca, 1990: 34, 80, 105, 116, 124-128.

Zalashko M.V., Zalashko L.S. *Cultivos microbiológicos a base de suero lácteo* (ruso), 1ª ed., Ciencia y tecnología, Minsk, Rusia Blanca 1999: 66, 75-77, 156.

Zalashko M.V., Grushenko M.M. *Utilización de suero lácteo en industria* (ruso), *Molochnaya promyshlennost* (Industria Láctea), **3**, 25-28 (2001).



