

# ESTUDIO CINÉTICO DE LA HIDROLISIS ÁCIDA DE LEVADURA

FRANCISCO J. RODRIGUEZ\*, GEORGINA MICHELÉNA\* y MIGUEL A. OTERO\*

\* INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR (ICIDCA)

## Resumen

Se midió la liberación de diferentes fracciones de nitrógeno durante la hidrólisis ácida de células de levadura. Los resultados fueron analizados en términos de nitrógeno, l-lisina y biomasa total solubilizadas bajo diferentes condiciones de tratamiento de temperatura y concentración de ácido.

A 90°C y ácido sulfúrico 0,7 N se libera un total de 41 % de la biomasa a la solución. Respecto al nitrógeno total, se alcanzó una recuperación de 43 % en los sobrenadantes. Se demostró que más del 30 % del nitrógeno total solubilizado es liberado en los primeros dos minutos.

De acuerdo con los resultados de recuperación y composición final, el hidrolizado es comparable con la mayoría de los autolizados reportados en la literatura.

## Abstract

The release of different nitrogen fractions during the acid hydrolysis of yeast cells was measured. Results are analysed in terms of nitrogen, l-lysine and total biomass solubilised under various treatment conditions of temperature and acid concentration.

At 90°C and 0,7 N sulphuric acid a 41 % of total biomass is released to the bulk of solution. In respect of total nitrogen, a 43 % of recovery in supernatant was achieved. It was demonstrated that more than 30 % of total nitrogen leave the cells in the first 2 minutes.

According to recovery results and final composition the hydrolysate compares with most autolysates reported in literature.

## Introducción

La mayoría de los procesos fermentativos de cierta complejidad tecnológica tienen lugar en presencia de una fuente de nitrógeno orgánico. El proceso de producción de l-lisina requiere también de suministros específicos de nitrógeno orgánico<sup>1</sup> en forma de licor de maíz, leucina, homoserina u otros aminoácidos.

La disponibilidad de hidrolizados de proteínas como los de soya, pescado y otros productos derivados de la levadura (autolizado y extractos) para estos propósitos es fluctuante en los mercados internacionales y posee por demás altos precios.

La producción de l-lisina que se acometerá en nuestro país en el quinquenio próximo demandará de grandes volúmenes de licor de maíz u otro sucedáneo de características similares.

En Cuba existe una industria de producción de levadura forrajera bien establecida que puede satisfacer estas demandas siempre que se suministre en la forma adecuada.

La levadura tiene un alto valor nutricional limitado solamente por la pared celular que la hace poco digestible<sup>2</sup>. Se han reportado numerosos métodos para remo-

ver o romper la pared celular<sup>4,6-10</sup> sin embargo el éxito de cualquier proceso de este tipo dependerá de obtener un elevado rendimiento en un corto tiempo<sup>4</sup>.

El objetivo de este trabajo es el estudio de la hidrólisis de levadura por medio ácido y la optimización de este proceso.

### Microorganismo

Se empleó *Candida utilis* NRRL-Y-660 cultivada sobre mieles finales. La composición de esta materia prima se ofrece en la tabla 1.

Tabla 1. Composición promedio de la levadura utilizada

	%
Nitrógeno	8,35
Proteína Bruta	52,19
ARN	8,3
Lisina	4,02

### Hidrólisis ácida

El proceso se llevó a cabo con una suspensión de células de 130 g/l con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> entre 0,026 y 0,7 N y calentado desde 60 hasta 90°C en diferentes intervalos de tiempo a través de un diseño factorial completo 2<sup>3</sup> y posteriormente un 3<sup>2</sup>. Las muestras fueron neutralizadas con NaOH antes de ser analizadas.

### Análisis químico

**Nitrógeno total:** Se determinó según Kjeldahl en un analizador automático Kjeltex Auto 1030 (Tecator AB, Suecia)<sup>12</sup>.

**ARN:** Determinado según Rut<sup>13</sup> en los sedimentos después del tratamiento.

**Lisina:** Se realizó en un analizador automático de aminoácido KLA 5 (Hitachi LTD, Japón) de doble columna<sup>14</sup>.

La materia seca inicial y final se determinó por desecación a 105°C durante 24 horas.

### Diseño experimental

Los resultados obtenidos a través del diseño dan lugar a los polinomios siguientes:

$$MSS = 9,6738 + 0,08064T - 0,02253A + 0,01046TA$$

$$NS = 2,1471 - 0,0045 T - 0,134A + 0,0028t + 0,0025 TA$$

$$MS = 0,5559 - 0,0005T + 0,0569A - 0,00093TA$$

En todos los casos los análisis se hicieron por triplicado con el objetivo de obtener un estimador de la dispersión interna de la data.

A partir de la evaluación de estos polinomios se obtuvieron las superficies de respuestas que aparecen en la figura 1. Se evidencia de las mismas, que las diferentes variables independientes del sistema no influyen en el mismo sentido sobre todas las respuestas analizadas.

La materia seca solubilizada (MSS), que es un índice integral de la acción del ácido sobre la biomasa, se ve influida mayormente por las altas concentraciones de ácido. Se obtienen las mayores respuestas en el sentido del incremento del ácido y la temperatura.

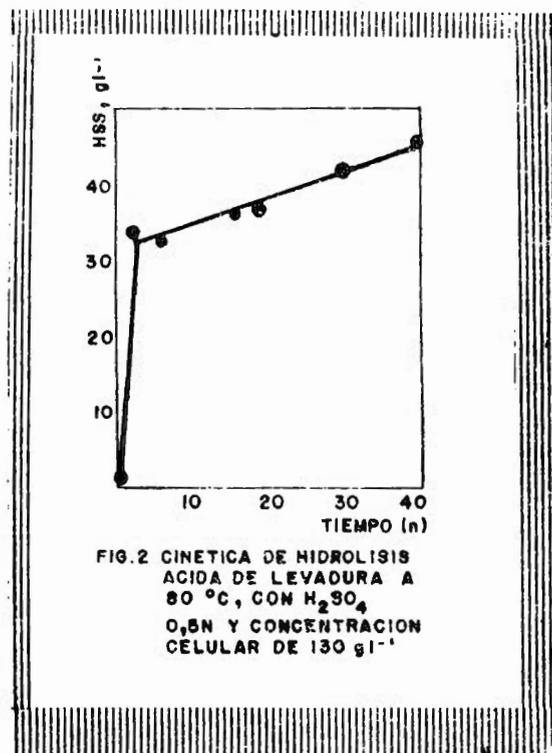
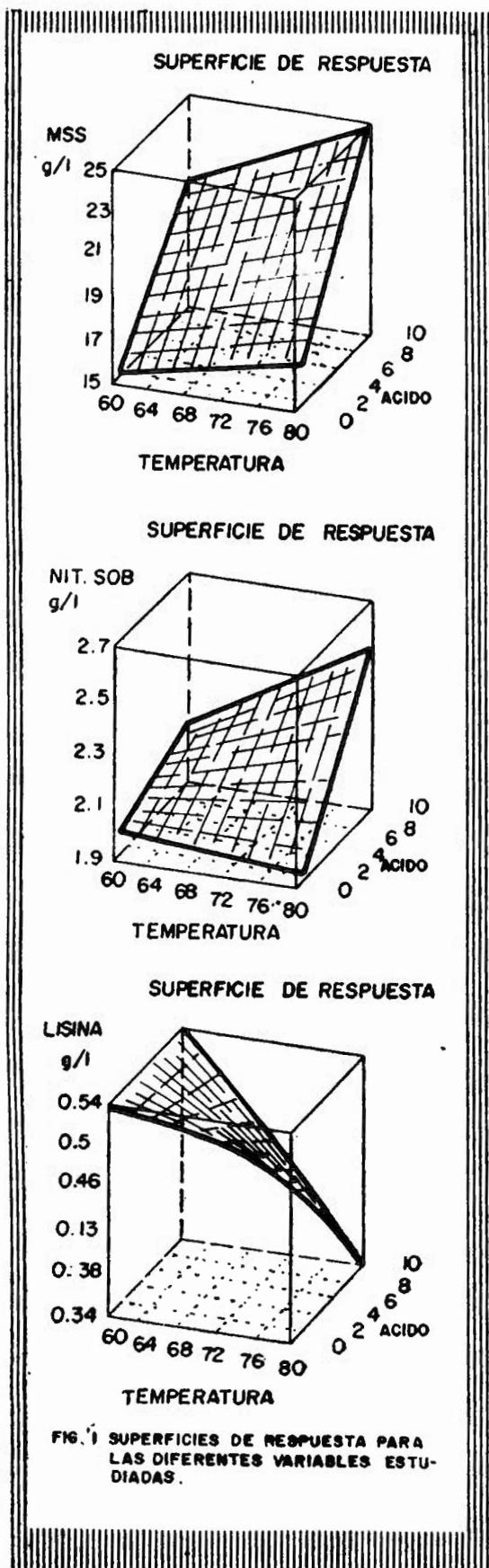
El nitrógeno en sobrenadante (NS) se ve afectado de manera similar, aunque en menor medida, influyendo también más agudamente el ácido que la temperatura.

El nitrógeno total, incluye una parte importante ( $\approx 10\%$ ) de nitrógeno amínico. Sin embargo es este último el que se utiliza por las células del cultivo de interés para la biosíntesis del producto. Por esa razón se siguió la liberación de lisina al medio que es una parte del anterior y puede dar una medida de proporción del nitrógeno amínico.

La superficie obtenida presenta una forma poco coincidente con las anteriores. Se obtienen las mejores extracciones a bajas temperaturas ( $\approx 60^\circ\text{C}$ ) disminuyendo la respuesta en la medida que aumentamos esta variable que por demás es la de mayor importancia. Los niveles de lisina en el sobrenadante son extremadamente bajos. Los valores más altos son del orden de 0,54 g/l, correspondientes al 12% del total de lisina presente en la célula.

Este resultado es un indicador del pobre nivel de hidrólisis alcanzado bajo estas condiciones. Por tanto, es pertinente variar los parámetros de tratamiento a través de un diseño factorial 3<sup>2</sup>.

Antes de realizar estos experimentos se llevó a cabo una cinética de hidrólisis en el tiempo con el objetivo de definir la verdadera influencia del tiempo a través de la MSS. Los resultados se ilustran en la figura 2.



La reacción es prácticamente instantánea entre el ácido y la biomasa bajo las condiciones establecidas. En un intervalo de 2 minutos, más del 30 % de la biomasa se solubiliza, alcanzándose valores de 16,25 g.l<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> de materia seca disuelta al sobrenadante. Entre 2 y 40 minutos la velocidad de solubilización es 50 veces menor obteniéndose como promedio sólo 0,32 g.l<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Dado que el objetivo de este trabajo es solubilizar la mayor cantidad de biomasa y por ende de nitrógeno se tomó para el nuevo diseño factorial 3<sup>2</sup> el valor de concentración de ácido 0,5 N como nivel inferior, trabajando la temperatura entre 70 y 90° C.

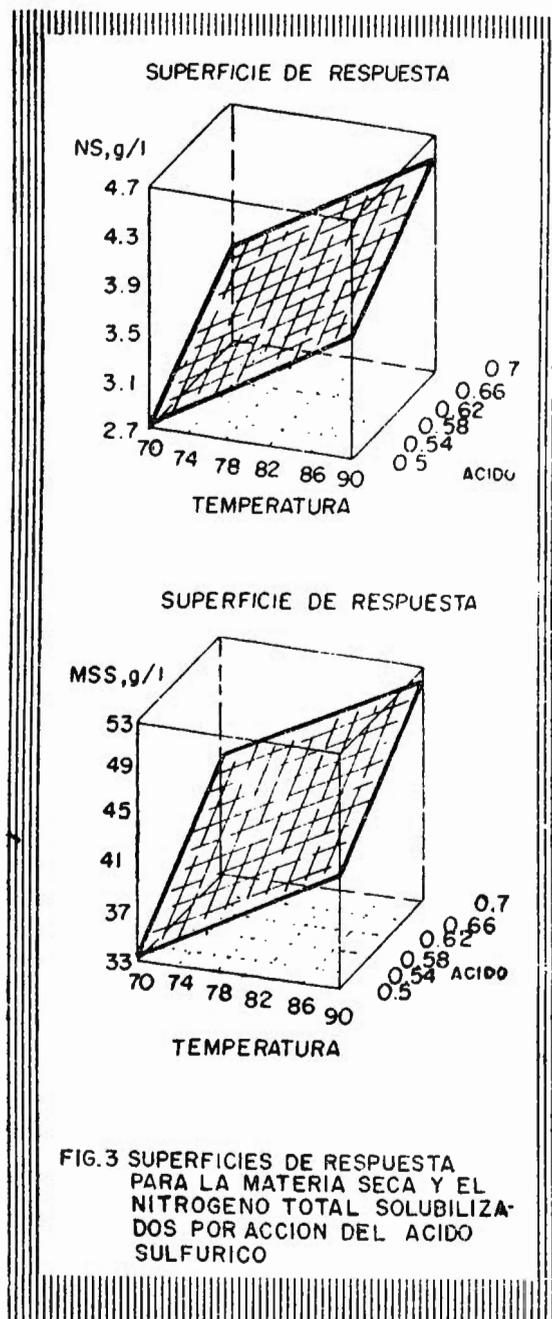
Los polinomios obtenidos en este diseño, una vez descodificadas las variables, fueron los siguiente:

$$MSS = - 22,3875 + 0,4608 T + 47,05 A$$

$$MS = - 2,8917 + 0,0509 T + 3,9 A$$

La evaluación de los mismos generó la superficie de respuestas que aparecen en la figura 3.

Tanto el nitrógeno como la biomasa total experimentan un incremento superior a 40 U por ciento con relación a los resultados obtenidos en los experimentos del factorial 2<sup>2</sup>.



El aumento de la temperatura y en particular del ácido ejercen una influencia notable en los valores obtenidos como era de esperar, en función de la mayor agresividad del medio.

El NS se eleva desde  $2,6 \text{ g.l}^{-1}$  correspondiente al 24 % de nitrógeno total presente hasta  $4,7 \text{ g.l}^{-1}$  que significa el 43 %. Los resultados equiparan estos hidrolizados con los extractos más eficientes, desde el punto de vista de composición, que se reportan en la literatura<sup>7,8</sup>.

La MSS se eleva hasta  $53 \text{ g.l}^{-1}$ , es decir el 41 % del total presente.

### Conclusiones

- El tratamiento ácido en concentraciones de 0,7 N de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y a temperaturas de  $90^\circ\text{C}$  permite la solubilización de la biomasa presente en el 41 % y 43 % para el nitrógeno, con un tiempo corto (de 2-5 minutos).
- El hidrolizado obtenido a nivel de laboratorio es comparable en términos de composición con los autolizados reportados en la literatura técnica.

### Bibliografía

1. K. Nakayama: *Comprehensive Biotechnology*. Ed. Pergamon Press Toronto, 1985.
2. K. Nakayama: *The Microbiol production of aminoacids*. Tokyo, 1972. p. 397.
3. J. C. Johnson: *Yeast for good other purposes*. Naves Data Corp. New Jersey 1977, p. 138.
4. M. Kawal and N. Milkai: Pat. EU 3682778 (1972).
5. M. D. Sulkane; Pat. EU 3681195 (1972).
6. R. Ciaveu, C. Colla and Cavazzoni: Pat. EU 3997397 (1976).
7. H. Sugimoto, H. Takeuchi: Pat. EU. 3961080 (1976).
8. S. Jardini and A. Zotti: Pat. EU. 3934039 (1976).
9. V. Kalina, P. Nicholas: Pat. EU. 3821080 (1974).
10. Y. Nakabayashi: Pat. EU. 39624666 (1976).
11. F. H. Sharpell: *Comprehensive Biotechnology*. Ed. Pergamon Press, Toronto, 1985. vol. 3. p. 965.
12. Tecator AB: Application Note. AN 30/81, 1981.
13. M. Rut: *Kuasny Prumysl.* 19, 1973, 131.
14. HITACHI: *Manual de Instrucción analizador KLA-5*. Japón: (1977).
15. J. A. Weber: *Brazil Acucareiro*, 23, 1977, 21.
16. J. A. De Baaij, F. W. Jansen: *Science Tools*. 33 (1), 1986, 17.