

PRODUCCIÓN CONTINUA DE PROTEÍNA MICROBIANA (*K. fragilis*) A PARTIR DE SUERO DE LECHE

Continuous Production of Microbial Protein (*K. fragilis*) from Whey

Harvey Quintero, Mawill Rodríguez Marval, Gisela Páez, José Ferrer, Zulay Mármol y Marisela Rincón

Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia,
Apartado 526. Maracaibo 4001-A, Edo. Zulia, Venezuela.

RESUMEN

Se estudió el cultivo continuo de la levadura *Kluyveromyces fragilis* ATCC 8554 en suero de leche desproteínizado y suplementado como función de la tasa de dilución (D), a pH 5,00 y temperatura 30°C. Se empleó un biorreactor Bioflo 4000 con un volumen de trabajo de 3 dm³, y controles automáticos de los flujos de alimentación, cosecha, temperatura, pH, y velocidad de agitación. La tasa de dilución se varió entre 0,15 y 0,36 h⁻¹. El suero de leche fue caracterizado, en términos de lactosa, nitrógeno, proteínas, fósforo y pH. La biomasa se determinó por medición de la densidad óptica. En los cultivos por carga no se detectó producción de etanol, indicando que no existieron condiciones limitantes de oxígeno. En cultivo continuo se determinaron los valores de la tasa específica de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}=0,530 \pm 0,017 \text{ h}^{-1}$), la constante específica de consumo de sustrato ($K_s=17,64 \pm 0,074 \text{ kg/m}^3$), el coeficiente de mantenimiento ($m=0,0414 \pm 0,018 \text{ kg de lactosa/kg de biomasa/h}$) y el rendimiento ($Y_c=0,874 \pm 0,181 \text{ kg de biomasa producida/kg de lactosa consumido para crecimiento}$). En cultivo continuo el valor máximo de concentración de biomasa fue de 26,0 kg/m³ a una tasa de dilución 0,15 h⁻¹. La máxima productividad fue 5,52 kg/m³.h a una tasa de dilución de 0,24 h⁻¹. El contenido de proteína microbiana fue de 42,9%, con una cantidad de cenizas de 2,6%, con valores de Fe, P y Ca comparables al de otras fuentes nutricionales tradicionales, lo que sugiere el potencial uso de esta levadura como suplemento en alimentación animal.

Palabras clave: Suero de leche, *Kluyveromyces fragilis*, cultivo continuo, tasa de dilución.

ABSTRACT

The continuous culture of the yeast *Kluyveromyces fragilis* ATCC 8554 was studied on deproteinized and supplemented

whey as a function of the dilution rate (D), at pH 5,00 and temperature 30°C, conditions previously determined from batch culture. A bioreactor Bioflo 4000 was used, with a volume work of 3 dm³ and automatic control of feed flow, harvest flow, temperature, pH and stirrer speed. The dilution rate was changed between 0,15 and 0,36 h⁻¹, by changing the feed flow. Whey was characterized, assessing its contents of lactose, nitrogen, protein, phosphorus and pH. The biomass concentration in culture medium was determined by optical density. In the batch cultures ethanol production was not detected, so did not exist limiting oxygen conditions. From continuous culture the maximum specific growth rate ($\mu_{\text{max}}=0,530 \pm 0,017 \text{ h}^{-1}$), the saturation constant ($K_s=17,64 \pm 0,074 \text{ kg/m}^3$), the maintenance coefficient ($m=0,0414 \pm 0,018 \text{ kg of lactose/kg biomass/h}$) and the growth yield ($Y_c = 0,874 \pm 0,181 \text{ kg of biomass produced/kg lactose consumed for growth}$) were determined. In continuous culture the maximum biomass concentration was 26,0 kg/m³ at D = 0,15 h⁻¹. The maximum productivity was 5,52 kg/m³.h at D = 0,24 h⁻¹. The yeast had a content of minerals comparable with other nutritious sources. Its protein and ash contents were 42,9% and 2,6%, which shows the yeast is suitable as a supplement in animal feed.

Key words: Whey, *Kluyveromyces fragilis*, continuous culture, dilution rate.

INTRODUCCIÓN

La polución ambiental y la escasez de alimentos son algunos de los problemas graves que enfrenta la humanidad, razón por la cual se encaminan esfuerzos hacia la búsqueda de alternativas que ofrezcan soluciones viables a estos problemas.

Un poluyente de elevado potencial contaminante, es el suero de leche, el cual es el subproducto más abundante de la industria láctea y se origina en la elaboración del queso. Una

parte del suero producido en esta industria, se utiliza en la alimentación animal, fabricación de yogurt y de bebidas fermentadas [18] y como suplemento en la elaboración de productos de panadería y confitería [6].

El suero de leche contiene componentes de alto valor nutritivo, pero en concentraciones muy pequeñas y en forma no siempre asimilable para los humanos [13]. El contenido de lactosa en el suero es de 4,5% aproximadamente y contiene además el 20% de las proteínas totales de la leche entera [13].

El procesamiento biotecnológico del suero de leche genera productos de interés para el sector agroindustrial, tales como bebidas fermentadas, ácidos orgánicos (ácido láctico y propiónico) y proteína microbiana. Para la obtención de estos productos se utilizan microorganismos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pelliculosa*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus* y *Kluyveromyces fragilis*) [9, 13, 15] que son capaces de consumir los nutrientes del suero, principalmente la lactosa, disminuyendo así su potencial contaminante, al mismo tiempo que se obtienen productos útiles.

La levadura *Kluyveromyces fragilis*, se utiliza ampliamente en el bioprocesamiento del suero de leche para obtener, entre otros productos, alcoholes (etanol y glicerol) [2, 9], enzimas (α y β -galactosidasa) [2, 14] y PUC [5, 8, 9]. Posee un elevado contenido de proteínas, lo cual la convierte en un potencial suplemento proteico para alimentación animal. Anteriormente conocida como *Saccharomyces fragilis*, su nombre actual es *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* [2]. Se encuentra en una gran variedad de frutas y es capaz de alterar la calidad de los quesos, el yogurt [12] y la leche [17]. Además interviene en la fermentación natural de licores [11].

Comparada con los métodos tradicionales de producción de proteínas para alimentación humana o animal, la producción a escala industrial de proteína microbiana presenta ciertas ventajas; por ejemplo, los microorganismos no dependen de las condiciones agrícolas o del clima, sino que son cultivados en grandes fermentadores, tienen una alta velocidad de multiplicación de masa, poseen un alto contenido de proteínas, la experimentación genética para mejorar el contenido proteico puede efectuarse en corto tiempo, su producción no está limitada por superficie o luz solar y pueden utilizar una gran variedad de fuentes de carbono. Además las instalaciones para la producción de proteína microbiana ocupan áreas limitadas y ofrecen altos rendimientos [3]. Cuando se compara la capacidad para sintetizar proteínas de animales y plantas frente a los microorganismos, éstos resultan mucho más eficaces y poseen cortos tiempos de duplicación.

El bioprocesamiento del suero de leche para obtener proteína microbiana, puede llevarse a cabo tanto en cultivo por carga como en cultivo continuo. En este último caso se obtiene una mayor productividad de biomasa, dado que se disminuye el tiempo de duración de todo el proceso. Por otra parte mediante el cultivo continuo es posible calcular los parámetros de crecimiento de los microorganismos empleados.

En general, la utilización del suero de leche como sustrato para producir proteína microbiana, puede ser una alternativa viable para cubrir en parte la aguda carencia proteica.

Producir proteína microbiana de *Kluyveromyces fragilis* y determinar los parámetros de crecimiento en cultivo continuo utilizando la lactosa del suero de leche como sustrato son los principales objetivos de esta investigación.

MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Microorganismo

Se utilizó la levadura *Kluyveromyces fragilis* ATCC 8554. Esta fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC), activada y mantenida en tubos de cultivo de 25 x 150 mm, sobre YM Bacto Agar en forma de cuña. Una vez sembrados, los tubos se incubaron aeróbicamente durante un lapso de 2 a 3 días a 30°C y posteriormente se almacenaron aproximadamente a 10°C, antes de su uso en un lapso no mayor de ocho días.

Suero de leche

El suero de leche, fue suministrado por la empresa Venelácteos ubicada en Maracaibo, estado Zulia. Se caracterizó midiendo los sólidos totales, cenizas, nitrógeno, proteínas, fósforo y lactosa [1, 7].

Desproteínización y suplernentación del suero de leche

Para desproteínizar el suero de leche se le aplicó un tratamiento termoácido, ajustando el pH a 4,5 antes de llevar al autoclave a 115°C durante 15 min. Luego se enfrió durante 24 horas en nevera a 4°C. se decantó para remover las proteínas precipitadas y se filtró con tierra de diatomeas colocadas sobre papel de filtro Whatman N°1 en un embudo de porcelana [9]. El suero de leche se suplementó con extracto de levadura al 0,1% p/v y sulfato de amonio al 0,2% p/v [5]. Todos los reactivos químicos utilizados como suplemento fueron de grado analítico. El pH se ajustó al valor deseado, según la fermentación a realizar, con HCl 6N y se esterilizó en lotes de 10 dm³ en un autoclave Felisa (México, D.F., México) a 115°C durante 20 min.

Métodos de análisis

Nitrógeno: El contenido de nitrógeno se determinó por el método de Kjeldah [1].

Proteínas: El contenido de proteínas se determinó como el porcentaje de nitrógeno multiplicado por el factor 6,25 para el caso de la levadura y por 6,38 para el caso del suero de leche [1].

Lactosa: El contenido de lactosa se determinó utilizando el método espectrocolorimétrico de Dubois y colaboradores [7].

Humedad: Se determinó el contenido de humedad de la levadura siguiendo el método de la A.O.A.C. [1].

Fósforo: El contenido de fósforo se determinó mediante el método espectrofotométrico del molibdo-vanadato de amonio [1].

Cenizas: Se determinó cenizas mediante el método de la A.O.A.C. [1].

Biomasa: La concentración de biomasa en el medio se determinó turbidimétricamente, midiendo la absorbancia de la muestra en un Spectronic 20, Bausch & Lomb (Rochester, New York USA), a una longitud de onda de 580 nm [16].

Etanol: Para cuantificar la cantidad de etanol presente en las muestras se utilizó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Autosystem XL (Norwalk, Connecticut USA), con una columna 0070v-225 de sílica fundida, de 30 m de longitud y 0,5 mm de diámetro interno. Se utilizó un detector FID. Las condiciones de operación fueron: temperatura del horno 110°C, temperatura de inyección 180°C, temperatura del detector 200°C y flujo del gas de arrastre (nitrógeno) de 30 cm³1min.

Minerales: La determinación de minerales se hizo según los métodos de la A.O.A.C. en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 31310 (Norwalk, Connecticut USA), con llama de aire-acetileno [1].

Preparación del inóculo

El inóculo se preparó añadiendo a cada 100 cm³ de medio la suspensión de células obtenida de una cuña de mantenimiento a la cual se le agregaron de 10 cm³ de suero tratado y esterilizado. Posteriormente el inóculo se incubó a 30°C y 200 r.p.m. durante 8 h, en una incubadora INNOVA 4300 (New Brunswick, New Jersey, USA), para garantizar la fase logarítmica de crecimiento.

Cultivos por carga

Se realizaron cuatro cultivos por carga y por duplicado a temperaturas de 30°C y 35°C y pH iniciales de 4,7 y 5,0 a 200 r.p.m. en matraces erlenmeyer de 125 cm³ de capacidad nominal, con tapones de algodón. Se utilizó un volumen de trabajo de 12,5 cm³, de los cuales 2,5 cm³ estuvieron constituidos por el inóculo. Se utilizó una incubadora modelo INNOVA

4300 (New Brunswick, New Jersey, USA). Se midió cada hora durante doce horas el pH, la concentración de biomasa, la concentración de lactosa y la concentración de etanol.

Cultivo continuo

Se realizaron cinco cultivos continuos con tasas de dilución entre 0,15 y 0,36 h⁻¹ en un fermentador New Brunswick Scientific, modelo BioFlo 4000 (New Brunswick, New Jersey, USA). El pH se mantuvo constante (5,00), controlado con soluciones de HCl y NaOH 6 N. La temperatura se mantuvo constante a 30°C y la agitación en 200 r.p.m. El volumen de trabajo fue 3 dm³, con un inóculo del 10%.

Inicialmente se operó el biorreactor como un cultivo por carga, alcanzada la máxima concentración de biomasa (8 h después de la inoculación) se comenzó a suministrar medio fresco al biorreactor. Se midió la concentración de biomasa y lactosa finales en el estado estacionario.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición del suero de leche

La composición del suero de leche tanto fresco como desproteínizado y suplementado, se presenta en la TABLA I.

Puede notarse que la concentración de lactosa y de fósforo se incrementan levemente después de la desproteínización. También se observa que el porcentaje de proteínas y nitrógeno disminuyen considerablemente, lo cual es indicativo de la eficacia del método de desproteínización. En la TABLA I también se muestra que el suero de leche fresco tiene un pH de 6,09. Este valor de pH está por encima del punto isoeléctrico de la caseína, por lo cual parte de esta proteína puede permanecer en el suero después de la elaboración del queso. Por esta razón se ajusta el pH hasta 4,50, para garantizar la eliminación de la caseína.

Cultivos por carga

De los cultivos realizados por carga se obtuvieron las condiciones de pH y temperatura que posteriormente se utilizaron en el cultivo continuo. Durante estas pruebas no se controló el pH. En las FIGS. 1 a 4 puede observarse que el pH tiende a disminuir, alcanzándose en todos los casos un valor

TABLA I
CARACTERIZACIÓN PROMEDIO DEL SUERO DE LECHE

	Suero de leche fresco		Suero de leche desproteínizado suplementado y pH ajustado	
	\bar{X}	$\pm s$	\bar{X}	$\pm s$
Lactosa (kg/m ³)	43,90	0,1998	44,50	0,1998
Nitrógeno (%)	0,19	0,0017	0,09	0,0101
Proteínas (%)	1,20	0,0025	0,55	0,0032
Fósforo (kg/m ³)	0,30	0,0297	0,32	0,0098
pH	6,09	0,0007	4,50	0,0009

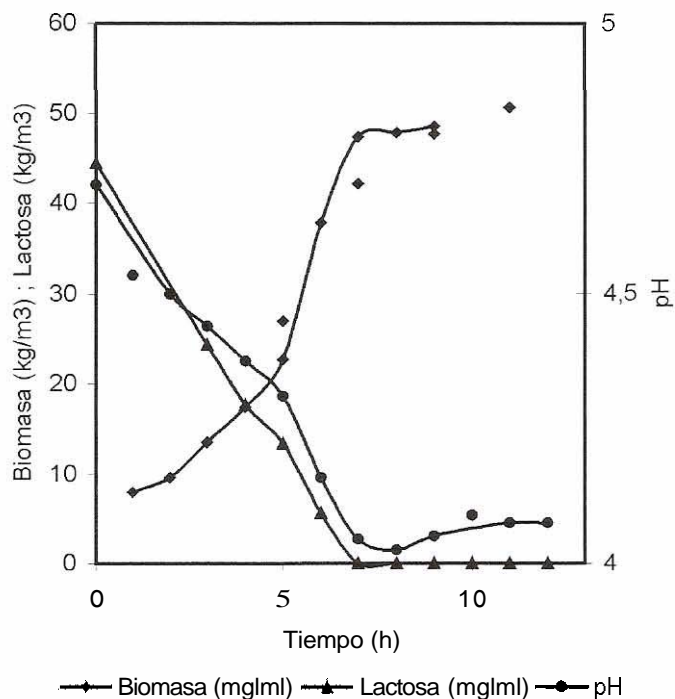


FIGURA 1. CRECIMIENTO EN CULTIVO CONTINUO DE *K. fragilis* EN SUERO DE LECHE A pH INICIAL 4,70 Y 30°C.

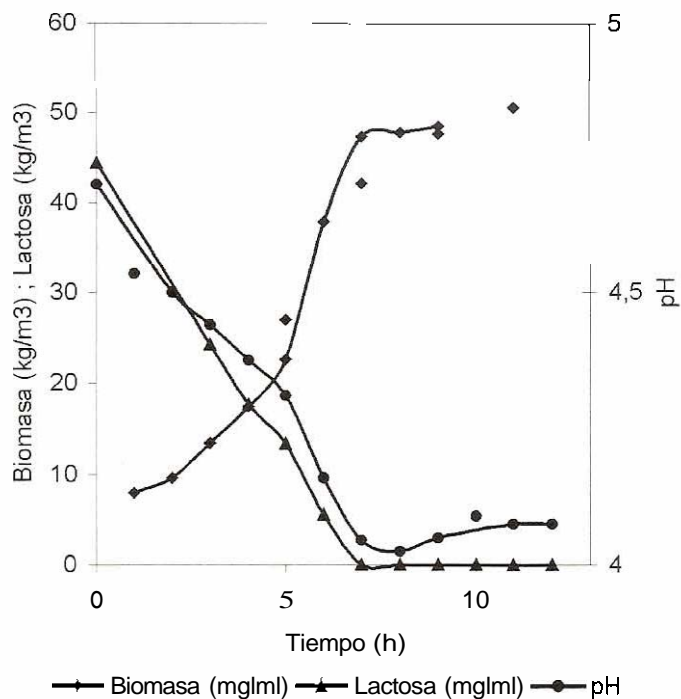


FIGURA 2. CRECIMIENTO EN CULTIVO CONTINUO DE *K. fragilis* EN SUERO DE LECHE A pH INICIAL 4,70 Y 35°C.

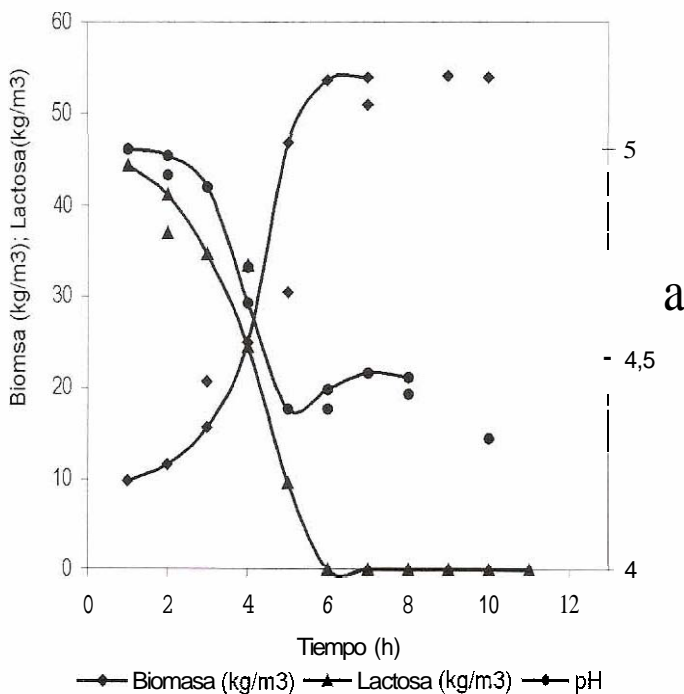


FIGURA 3. CRECIMIENTO EN CULTIVO POR CARGA DE *K. fragilis* EN SUERO DE LECHE A pH INICIAL 5,00 Y 30°C.

mínimo entre 4,0 y 4,4 alrededor de la hora 7 del crecimiento. Moresi y col. [15], reportan la acumulación de compuestos intermediarios durante el crecimiento de la *Kluyveromyces fragilis* en suero de leche; algunos de estos metabolitos pueden ocasionar la disminución del pH, sobre todo en condiciones de oxígeno limitantes, bajo las cuales se favorece el proceso anaerobio.

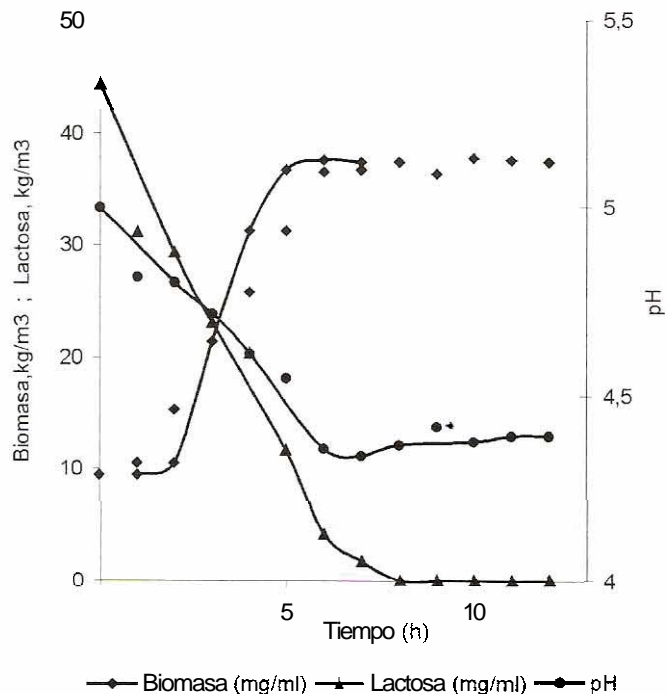


FIGURA 4. CRECIMIENTO EN CULTIVO POR CARGA DE *K. fragilis* EN SUERO DE LECHE A pH INICIAL 5,00 Y 35°C.

No se detectó etanol en el cultivo por carga, por lo cual no existió limitación por oxígeno. Se presentó una fase de adaptación corta. El cultivo por carga creció exponencialmente durante 6 horas, excepto para las condiciones de pH inicial 5,00 y temperatura 35°C, donde la fase de crecimiento exponencial tuvo una duración de cuatro horas. En todos los casos

la concentración de lactosa disminuyó progresivamente desde el comienzo del cultivo, hasta llegar a niveles no detectables al final de la fase de crecimiento exponencial.

La TABLA II, muestra los valores de la velocidad específica de crecimiento, (μ), determinados en la región de creci-

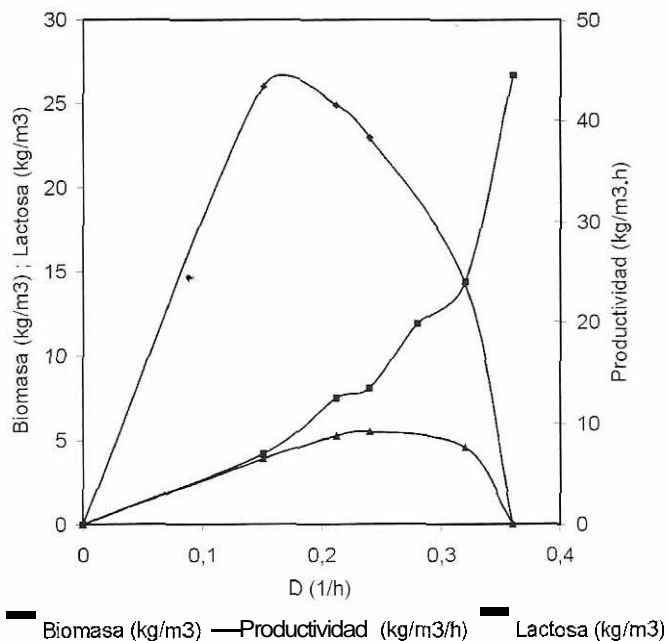


FIGURA 5. EFECTO DE LA TASA DE DILUCIÓN EN LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA, DE SUSTRATO Y PRODUCTIVIDAD EN EL ESTADO ESTACIONARIO DURANTE EL CULTIVO CONTINUO DE *K. fragilis* EN SUERO DE LECHE A pH 5,00 Y 30°C.

miento exponencial, y el ajuste lineal de los datos experimentales de la concentración de biomasa en función del tiempo. A 30°C y pH inicial de 5,00 se obtuvo la mayor velocidad específica de crecimiento (μ), 0,264 h⁻¹; condiciones también reportadas por Moresi y col. [15]. A estas condiciones se realizó el cultivo continuo.

Cultivo continuo: Establecidas las condiciones de operación a partir del cultivo por carga, se realizó el cultivo continuo, variando la tasa de dilución (D) y manteniendo constante la concentración inicial de lactosa en el suero. Se obtuvieron las concentraciones de biomasa, lactosa y la productividad en el estado estacionario a cada una de las tasas de dilución empleadas (entre 0,15 y 0,36 h⁻¹). La FIG. 5, presenta el comportamiento típico de un cultivo continuo con requerimientos de sustrato para mantenimiento a bajas tasas de dilución.

La concentración de la biomasa en el estado estacionario disminuyó gradualmente a medida que aumentó la tasa de dilución, y luego cae rápidamente hasta alcanzar la tasa de dilución de lavado (0,36 h⁻¹). La máxima concentración de biomasa (26,0 kg/m³), se obtuvo a una tasa de dilución de 0,15 h⁻¹, y la máxima productividad (5,52 kg/m³.h) se alcanzó a 0,24 h⁻¹, por lo cual esta última se consideró la tasa de dilución óptima.

Los valores del coeficiente de mantenimiento (m) y el rendimiento celular (Y_c) se muestran en la TABLA III. Estos parámetros fueron obtenidos de la ecuación que describe el balance de sustrato en el estado estacionario:

$$(S_0 - S) D / X = D / Y_c + m, \text{ FIG. 6.}$$

TABLA II

VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO (μ) EN CULTIVO POR CARGA DE *Kluyveromyces fragilis* EN SUERO DE LECHE

pH inicial	T (°C)	μ (h ⁻¹)		Log(X) = Log(X ₀) + $\mu t/2,303$	r
		\bar{X}	$\pm s$		
4,70	30	0,229	0,008	Log(X) = 0,855 + 0,229t/2,303	0,995
	35	0,192	0,001	Log(X) = 1,032 + 0,192t/2,303	0,978
5,00	30	0,230	0,028	Log(X) = 0,950 + 0,230t/2,303	0,976
	35	0,211	0,013	Log(X) = 1,030 + 0,211t/2,303	0,989

TABLA III

RENDIMIENTO (Y_c) Y COEFICIENTE DE MANTENIMIENTO (m) PARA *Kluyveromyces fragilis* EN SUERO DE LECHE A pH 5,00 Y TEMPERATURA 30°C

m (kg lactosa/kg biomasa/h)		Y _c (kg biomasa producidos/kg lactosa consumidos)		r	Fuente
\bar{X}	$\pm s$	\bar{X}	$\pm s$		
0,0414	0,018	0,874	0,181	0,9965	Este estudio
		1,153 ^a	0,620 ^a	0,31	Moresi y col. [15]
		0,416 ^b			Walker y O'Neill [20]
		0,51 ^c			Ghanem [8]
		0,558 ^d			Castillo [5]

a Cultivo continuo en suero de leche. b Cultivo anaerobio por carga en suero de leche. c Cultivos mixtos sobre pulpa de remolacha. d Cultivo por carga en suero de leche.

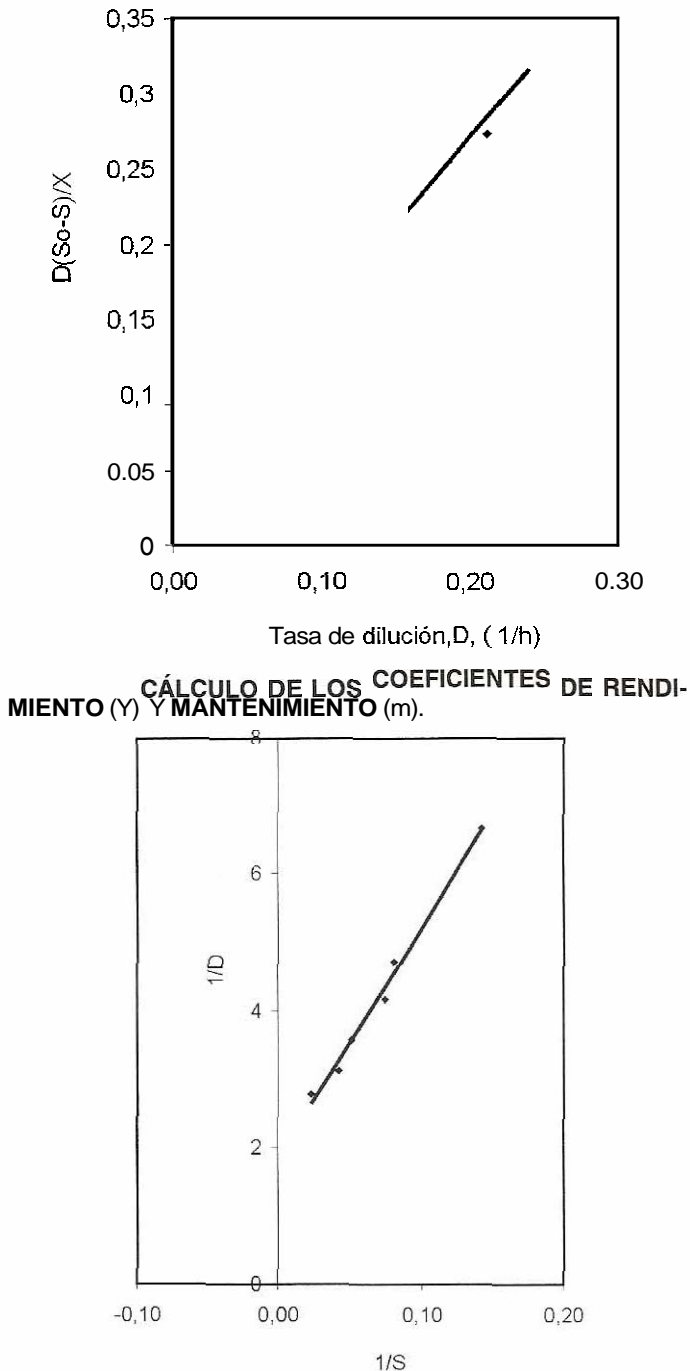


FIGURA 7. GRÁFICA DE LINE WEAVER - BURK PARA EL CÁLCULO DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO MÁXIMA Y DE LA CONSTANTE Ks EN CULTIVO CONTINUO DE *Kluyveromyces fragilis*.

Al comparar con los valores reportados por otros autores [5, 8, 15, 20]. se observan rendimientos variables de acuerdo al tipo de cultivo y al sustrato utilizado. Los valores más altos de rendimiento se obtienen en cultivo continuo utilizando suero de leche. El rendimiento Y_c , representa la cantidad de sustrato que la levadura utilizó sólo para crecimiento y no incluye el utilizado para funciones de mantenimiento. El coeficiente de mantenimiento (m), 0,0414 kg sustrato/kg de biomasa.h, representa la energía que la *Kluyveromyces fragilis* consume a partir de la lactosa para satisfacer sus propósitos de mantenimiento, tales como intercambio del material celular, trabajo osmótico para mantener el gradiente de concentración entre la célula y el medio exterior, movilidad celular, etc. [16].

En la TABLA IV se presentan los parámetros de crecimiento de la *Kluyveromyces fragilis* obtenidos en este estudio, y los reportados por Moresi y col. [15].

Estos parámetros se calcularon aplicando el modelo del quimiostato con requerimientos de energía de mantenimiento, y la linearización de Lineweaver-Burk [16], FIG. 7. Los valores de K_s indican la afinidad de la levadura por el sustrato utilizado, confirmando la conveniencia de adecuar el microorganismo desde la preparación del inóculo en el medio a emplear.

Composición de la levadura *Kluyveromyces fragilis*

En la TABLA V se presenta la composición de la levadura en base seca.

Si comparamos el contenido de proteínas de *Kluyveromyces fragilis* con el de otras fuentes de proteínas tradicionales, TABLA VI, se observa que el de esta levadura es mayor. También se determinó el contenido de minerales, TABLA VII, Comparándose con el de otros alimentos 10. Su alto contenido de proteínas, la hace adecuada para uso como suplemento en alimentación animal, ya que estudios preliminares reportan bajo contenido ácidos nucleicos, además de una distribución balanceada de los aminoácidos esenciales [4, 19].

CONCLUSIONES

Se produjo la proteína microbiana de *Kluyveromyces fragilis*, utilizando la lactosa del suero de leche como sustrato con un rendimiento del 87,4% a 30°C y pH inicial 5,00.

El comportamiento del cultivo continuo con respecto a la tasa de dilución evidenció el efecto de la energía de manteni-

**TABLA IV
PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE *K. fragilis* EN CULTIVO CONTINUO A pH 5,00 Y TEMPERATURA 30°C,
CON LA CORRESPONDIENTE CORRELACIÓN PROMEDIO DEL AJUSTE AL MODELO DE LINEWEAVER-BURK**

K_s (kg/m ³)		$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)		r	Fuente
\bar{X}	$\pm s$	\bar{X}	$\pm s$		
17,64	0,074	0,530	0,017	0,9898	Este estudio
1,2		0,93			Moresi y col. [15]

TABLA V
CARACTERIZACIÓN DE *K. fragilis* EN BASE SECA
EN ESTE ESTUDIO

%	\bar{X}	$\pm s$
Nitrógeno	6,72	0,0290
Proteínas	42,18	0,0301
Humedad	75,00	0,0235
Cenizas	2,60	0,0543

TABLA VI
CONTENIDO DE PROTEÍNAS DE ALGUNOS ALIMENTOS [10]

Alimento	Contenido de proteínas
Carne magra	21,5
Sardinas frescas	20,6
Carne de pollo	20,2
Atún enlatado	29,0
Huevos de gallina	12,4
Soya	33,4

TABLA VII
CONTENIDO DE MINERALES DE *Kluyveromyces fragilis* Y DE OTROS ALIMENTOS

% Mineral (g/100g)	<i>K. fragilis</i> (En este estudio)		Carne [10]	Sardinas [10]	Pollo [10]	Atún [10]	Huevos [10]	Soya [10]
	\bar{X}	$\pm s$						
Ca	0,457	0,0148	0,006	0,127	0,014	0,060	0,055	0,296
P	0,19	0,021	0,2152	0,303	0,02	0,23	0,2	0,553
Fe	$83,33 \times 10^{-4}$	0,021	0,0027	0,002	0,0015	0,0022	0,002	0,0121
Mg	0,212	0,004						
Mn	Trazas							
Zn	$90,87 \times 10^{-4}$	0,028						
Cu	Trazas							
K	0,404	0,0127						
Na	1,17	0,0494						

miento a bajas tasas de dilución. El máximo valor de productividad fue de 5,52 kg biomasa/m³.h y se obtuvo a una tasa de dilución óptima de 0,24 h⁻¹. La máxima concentración de biomasa en el estado estacionario fue 26,0 kg biomasa/m³ a una tasa de dilución de 0,15 h⁻¹. La máxima velocidad específica de crecimiento en cultivo continuo fue $\mu_{\text{máx}} = 0,530 \pm 0,017 \text{ h}^{-1}$. El valor del $K_s = 17,64 \pm 0,074 \text{ kg/m}^3$ (0,0516 Molar), indicó la afinidad por la lactosa del suero.

El contenido de proteína microbiana y la cantidad de cenizas, con valores de Fe, P y Ca comparables al de otras fuentes nutricionales tradicionales, sugieren el potencial uso de esta levadura como suplemento en alimentación animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A.O.A.C. Official Methods of Analysis. 15th edition. **As**-**so**ciation of Official **Analytical** Chemists. Arlington, Virginia. 1990.
- [2] **AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATC)**. Catalogue of yeast. 18 th edition. 230 pp.1991.
- [3] **BU'LOCK, J.; KRISTIANSE, B. Basic** Biotechnology. Academic Press. USA. 315 pp. 1987.
- [4] **CARRASCO, M.; BASILICO, J.; UMANSKY, G.; SCAR-**
INCI, H. Biological value of the unicelular protein of *Kluy-*
veromyces marxianus var. *lactis*. Arch. **Latinoam. Nutr.**,
41 (1): 72-8, Mar 1991.
- [5] **CASTILLO, F.; SÁNCHEZ, S.** Estudio sobre el creci-
miento de *Kluyveromyces fragilis* en suero de leche para
la producción de proteínas de levaduras. Acta Científica
Venezolana. 29: 113-118, 1978.
- [6] **DE WIT, J.N.** Nutritional and functional characteristics of
whey proteins in food products. **J. Dairy. Sci.** (81): 597-
608,1998.
- [7] **DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J.; REBERS, P.;**
SMITH, F. Colorimetric method for determination of sug-
ars and related substances. Analytical Chemistry. 28
(3): 350-356. 1956.
- [8] **GHANEM, K.** Single cell protein from beet pulp by mixed
culture. Microbiología, 8 (1): 39-43. Apr. 1992.
- [9] **GOUGH, S.; FLYNN, O.; HACK, C.; MARCHANT, R.**
Fermentation of molasses using a thermotolerant yeast,
Kluyveromyces marxianus IMB3: simplex optimisation of
media supplements. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46
(2):187-90, Sep. 1996.
- [10] **INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICIÓN.** Tabla de com-
posición de alimentos para uso práctico. Revisión 1994.
División de Investigaciones en Alimentos. Publicación

54. Serie Cuadernos Azules. Caracas, Venezuela:18-60. 1994.
- [11] LACHANCE, M. Yeast communities in a natural tequila fermentation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 68(2):151-60.1995.
- [12] MACKAY, A. Growth of fermentative and non-fermentative yeast in natural yoghurt, stored in poliestirene cartons. *Int. J. Food Microbiol.* 15(3-4): 383-8, Mar-Apr .1992.
- [13] MAUBOIS, J.L. Whey. its biotechnological signification. *Biotechnology*, 2: 814-24, 1989.
- [14] MONTIEL, X. Producción de β -D-galactosidasa por *Kluyveromyces fragilis* en cultivo por carga con lactosuero como sustrato. **Rev. Tec. Ing. Uni. Zulia.** 23 (2):134-140. 2000.
- [15] MORESI, M.; TRUNFIO, A.; PARENTE, E. Kinetics of continuous whey fermentation by *Kluyveromyces fragilis* *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 49: 205-222, 1990.
- [16] PIRT, S. **Principles of Microbe and Cell Cultivation.** Blackwell Scientific Publications. London: 274 pp.1975.
- [17] ROOSTITA, R.; FLEET, G. Growth of yeast in milk and associated changes to milk composition. *Int. J. Food Microbiology.* 31(1-3): 205-219, 1996.
- [18] SALMINEN, S.; GORBACH, S.; SALMINEN, K. Fermented whey drink and yogurth type products with *Lactobacillus*. *Food Technology.* 6 :112. 1991.
- [19] SCARINCI, H.; UMANSKY, G.; CARRASCO, M. "Chemical composition of the cellular biomass of yeast". *Arch. Latinoam. Nutr.* 40 (4): 594-602, Dic 1990.
- [20] WALKER, G.; O'NEILL, J. Morphological and metabolic changes in the yeast *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* NRRL y 2415 during fermentation of lactose. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 49: 75-89,1990.