

Protein enrichment of algae bagasse by solid-state fermentation

Olga M. Bravo, Belkis Llamozas de Colman and Carmen Maldonado

Laboratorio de Productos Naturales, Centro de Investigaciones Tecnológicas (CITEC),
Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda (UNEFM)
Autopista Coro-La Vela, antiguo FOPE. Tele fax: (068) 523931.

Abstract

As a residue of agar-agar extraction from agarophyte algae (*Gracilaria debilis*) in the Pilot Unit of the CITEC algae bagasse was obtained, treated with alkali (NaOH 5% p/p) or water at different liquid/solid ratios (L/S) and its digestibility was measured as microbial protein production of *Chaetomium cellulolyticum* grown on solid-state fermentation columns.

The bagasse shows the high raw protein (12.54%), cellulose (35.58%) and hemicelluloses contents (20.75%); besides, it contains residues of agar and other hydrocolloids (14.30%). This composition is similar to that of lignocellulosic residues, but without lignin and a higher protein content. It could therefore be used directly to feed ruminants since it satisfies their high energetic requirements, and protein requisite.

The treatments did not greatly change the bagasse composition neither significantly enhanced fungus growth compared to non-treated bagasse, which was used as a control. Fermented bagasse reached an average protein content of 18.47% and a final raw fiber content of about 37%, which makes possible the usage of the bagasse in the preparation of rations for pigs.

Key words: Algae bagasse, solid-state fermentation, microbial protein, *Chaetomium cellulolyticum*.

Enriquecimiento proteínico del bagazo de algas por fermentación en estado sólido

Resumen

Bagazo de algas obtenido como residuo de la extracción de agar-agar a partir de algas agarofitas (*Gracilaria debilis*) en la Unidad Piloto del CITEC, fue tratado con álcali (NaOH 5% p/p) o agua a diferentes relaciones líquido/sólido (L/S) y su digestibilidad medida como producción de proteína microbiana de *Chaetomium cellulolyticum* creciendo en columnas de fermentación en estado sólido.

El bagazo muestra contenidos altos de proteína cruda (12,54%), celulosa (35,58%) y hemicelulosas (20,75%); además, contiene residuos de agar y otros hidrocoloides (14,30%). Esta composición es similar a la de los residuos lignocelulósicos, pero sin lignina y un mayor contenido de proteína. Podría entonces ser usado como alimento para animales rumiantes puesto que satisfaría su alta demanda energética y sus requerimientos de proteína.

Los tratamientos no cambiaron la composición del bagazo ni tampoco incrementaron significativamente el crecimiento del hongo comparado con el bagazo no tratado, que fue usado como control. El bagazo fermentado alcanzó un contenido promedio de proteína de 18,47% y de fibra cruda de alrededor de 37%, lo cual hace posible su utilización en la preparación de raciones para cerdos.

Palabras clave: Bagazo de algas, fermentación en estado sólido, proteína microbiana, *Chaetomium cellulolyticum*.

Introducción

De manera similar a las plantas verdes, la pared celular de las algas rojas está compuesta de celulosa en estructura microfibrilar rígida, rodeando los xilanos (hemicelulosas) y pectinas. En ciertos géneros esta pared está rodeada por una capa mucilaginosa compuesta por hidrocoloides clasificados como agar, carragenina y gelatinas, los cuales son abundantes y de consistencia firme [1].

El agar, polímero de la galactosa, es uno de los hidrocoloides extraídos de las paredes celulares de las algas rojas de mayor significancia económica. En el Laboratorio de Productos Naturales del Centro de Investigaciones Tecnológicas (CITEC) de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda (UNEFM) se ha trabajado durante varios años en la optimización de procesos de extracción de este compuesto a partir de algas agarofitas, abundantes en las costas de la Península de Paraguaná, Estado Falcón.

Se ha estudiado el rendimiento y calidad del agar extraído a partir de diferentes especies de algas, épocas y sitios de recolección. Las especies utilizadas: *Gelidiella acerosa*, *Gracilaria domingensis* y *Gracilaria debilis*, las más abundantes por su biomasa, son recolectadas manualmente en las zonas Mangle Lloroso y Las Raíces, de la Península de Paraguaná. Los métodos de extracción utilizados: extracción acuosa natural, extracción por pretratamiento ácido y extracción con solución de polifosfato [2].

Los resultados obtenidos indican que la extracción por pretratamiento ácido presenta los más altos niveles de calidad representados por la fuerza de gelación del agar, un rendimiento variable según el tipo de algas utilizado y, además, por ser un proceso que requiere un número mínimo de etapas, ofrece economía en la utilización de la energía. Todo ello lo convierte en el diseño más factible para la extracción del agar-agar [2].

Actualmente se tiene en funcionamiento una Unidad Piloto de extracción de agar-agar por pretratamiento ácido y se realizan las pruebas necesarias para establecer las características de este importante producto que permitirían su mejor utilización. No obstante, como residuo del proceso de extracción el bagazo representa entre 60-70% del peso fresco de las algas y está carac-

terizado por altos contenidos de fibra, proteína cruda y sales minerales. La evaluación de su aprovechamiento ha evidenciado su valor potencial para la obtención de abono o acondicionador de suelos y la preparación de raciones con fines de nutrición animal [3] y, por sus propiedades adsorbtivas, su efectividad para la remoción del Sulfanato de Alquil-Bencilo Lineal (LAS), detergente sintético de uso doméstico e industrial [4].

La utilización del maíz y sus subproductos industriales así como de otros cereales en la elaboración de alimentos balanceados para animales monogástricos confronta graves problemas de disponibilidad debido a los bajos rendimientos y precio elevado, de allí que en Venezuela se han efectuado estudios con pollos y cerdos para determinar cómo se afectan los parámetros productivos con la incorporación de ingredientes alternativos a las raciones. Se han evaluado fuentes tan diversas como harina de lombriz californiana, de la planta leguminosa mata ratón y de follaje de yuca, pulpa de café ensilada y extracto de semillas cítricas [5-10].

En este estudio, se utiliza un proceso de fermentación en estado sólido para la obtención de un producto enriquecido con proteína microbiana, que pueda ser empleado en la elaboración de raciones para animales monogástricos.

Parte Experimental

Microorganismo e inóculo

Chaetomium cellulolyticum (ATCC 32319) fue cultivado en cuñas de agar conejarina (ATCC 340) a 37°C en donde produce ascosporas a los 7-12 días. Utilizando agua destilada estéril eran removidas las ascosporas y 10 ml de esta suspensión introducidas en una fiola de 250 ml que contenía medio mineral Mandels-Weber [11] y 1% de glucosa e incubados por 48 horas a 37°C y 200 rpm de agitación. Entonces, 10 ml de esta suspensión micelial eran transferidos a una fiola de 250 ml con el mismo medio y 1% de bagazo de algas, e incubado por 12 horas en las mismas condiciones. Se ajustó la concentración final del micelio a 3% p/v y un inóculo de 3% (p/p) fue usado para las fermentaciones.

Tratamientos del sustrato

El material utilizado fue bagazo de algas (*Gracilaria debilis*) obtenido durante la extracción de agar-agar por pretratamiento ácido en la Unidad Piloto del Laboratorio de Productos Naturales del Centro de Investigaciones Tecnológicas (CITEC) de la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda (UNEFM).

Este proceso de extracción consiste en tratar las algas frescas con HCl en una concentración menor de 1% seguido de una cocción a pH neutro. El ácido provoca la separación del agar-agar de otras sustancias presentes en la pared celular de las algas, como la celulosa y hemicelulosas, sin producir hidrólisis molecular. A estos pasos sigue una etapa de filtración en la cual se obtienen los residuos sólidos o bagazo. El filtrado es sometido a las etapas de gelificación, congelación, descongelación, filtración y secado que conducen a la obtención del agar-agar [2].

El bagazo secado a temperatura ambiente (28°C) hasta aproximadamente 5% de humedad, molido y tamizado (1 mm) fue tratado con agua o álcali (NaOH 5% p/p) a relaciones L/S de: 0,5; 1; y 2, por 2,5 horas a temperatura ambiente. El bagazo tratado con agua fue lavado tres veces con agua destilada, mientras que el tratado con álcali fue lavado con agua destilada acidificada (pH 2). El pH fue ajustado a 6 con NaOH al 2% y las muestras fueron secadas a 60°C por 48 horas [12-14].

Fermentación en estado sólido

Las fermentaciones fueron realizadas en una unidad de fermentación en columnas a escala de laboratorio [15] que consiste de 30 columnas de vidrio con entrada individual de aire saturado (4 l/h), colocadas en un baño de agua a una temperatura controlada de 37°C. El contenido de humedad inicial del bagazo fue ajustado a su humedad de saturación con medio Chahal-Gray modificado [16] y como fuente de nitrógeno se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en una relación C/N de 15.

El bagazo humedecido y esterilizado en autoclave (121°C por 15 min) fue inoculado y transferido en condiciones asépticas a las columnas, las cuales eran llenadas con 40 g de muestra. Siete fermentaciones fueron realizadas por duplicado, correspondiendo tres a bagazo tratado con

agua (BTA), tres a bagazo tratado con álcali (BT) y una a bagazo no tratado (BNT) usada como control. BTA-0,5, BTA-1 y BTA-2 corresponden a bagazos tratados con agua a relaciones L/S de: 0,5; 1; y 2, respectivamente; y BT-0,5, BT-1 y BT-2 corresponden a bagazos tratados con álcali a las relaciones L/S respectivas. Dos muestras eran tomadas aleatoriamente de cada corrida cada 24 horas.

Métodos analíticos

El bagazo de algas fue caracterizado antes y después de las fermentaciones determinándose los siguientes parámetros: materia seca, pérdida de materia seca, ceniza, proteína cruda [17], celulosa y hemicelulosas [18]. El bagazo fermentado en las columnas fue pesado; 10 g de la muestra fueron usados para la determinación de humedad en una termobalanza (OHAUS, 6010) y 5 g mezclados con 50 ml de agua destilada para la determinación del pH [15].

La ganancia neta de proteína se calcula como: $\text{GNP} = (\text{KP} - \text{K}_0\text{F}_0) \times 1.000/\text{K}_0$. En donde: K_0 y K son el peso seco del sustrato en kg al inicio y a cada tiempo de la fermentación, P_0 y P son los contenidos de proteína cruda en % al inicio y a cada tiempo de la fermentación [19]. El consumo de celulosa y hemicelulosas se calcula mediante la expresión: $\text{U}_i = (\text{G}_0\text{F}_0 - \text{GF}) \times 100/\text{G}_0\text{F}_0$ [16]. En donde: U_i es el consumo del componente; G_0 y G son el peso seco en gramos del sustrato al inicio y a cada tiempo de la fermentación; F_0 y F son el porcentaje del componente al inicio y a cada tiempo de la fermentación.

Análisis estadístico

Las diferencias entre los resultados fueron analizadas de acuerdo a la prueba Ji Cuadrado no paramétrica con un nivel de significancia de $P < 0,05$ [20].

Resultados y Discusión

La Tabla 1 muestra la composición del bagazo de algas, el cual presenta contenidos altos de proteína cruda, celulosas y hemicelulosas. Presenta también una considerable cantidad de lo que podrían ser restos de agar, otros hidrocoloides y ceniza no soluble (14,30%). Los contenidos de celulosa y hemicelulosas fueron similares

a los encontrados en los desechos lignocelulósicos, pero este material no contiene lignina y presenta mayor contenido de proteína. Por lo tanto, el bagazo podría ser utilizado directamente como alimento para animales rumiantes puesto que satisfaría su alta demanda energética y, además, su contenido proteico se encuentra por encima del nivel crítico de 7% considerado necesario para mantener el consumo voluntario [21]. En la zona del Estado Falcón podría utilizarse en pequeños rumiantes (ovinos y caprinos).

En general, la composición del bagazo no resultó fuertemente afectada por los tratamientos acuoso y alcalino. Sin embargo, se encontró cierta reducción en la concentración del material mucilaginoso restante en BT-2, BTA-0,5 y BT-1 (6,30, 7,96 y 9,30%, respectivamente).

La Tabla 2 muestra los contenidos de proteína cruda de cada sustrato antes y después de la fermentación. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los bagazos tratados con agua (BTA) y álcali (BT) ni entre éstos y el bagazo no tratado (BNT). En promedio se alcanzó hasta 18,47% de proteína por efecto de la fermentación microbiana.

En la Figura 1 se muestra el contenido de proteína cruda de los sustratos durante la fermentación de los bagazos BNT, BT-2 y BTA-2. Estos últimos fueron los sustratos que alcanzaron los mayores contenidos de proteína (20,52% y 20,29% al $t = 5$ días, respectivamente). La Ganancia Neta de Proteína fue de 25,4, 48,0 y 66,0 g para los bagazos BNT, BT-2 y BTA-2, lo cual indica que la fermentación microbiana resultó un procedimiento adecuado para incrementar el valor proteico del bagazo de algas.

Los contenidos de proteína alcanzados en los bagazos fermentados se acercan a los requerimientos nutricionales de los cerdos, los cuales requieren 20-24% de proteína en las raciones [22], aunque el contenido de fibra cruda (FAD) de alrededor de 37% determinaría su utilización sólo como ingrediente en la formulación del alimento.

Las mediciones de la humedad y el pH realizadas durante las fermentaciones muestran que ambos parámetros se mantienen casi constantes a lo largo del proceso, como se evidencia en la Figura 2 en la cual se grafican los resultados obtenidos para el BT-2. Esto indicaría, por una parte,

Tabla 1
Composición química del bagazo de algas (BNT)¹

Componente	%
Proteína	12,54
Celulosa	35,58
Hemicelulosas	20,75
Otros	14,30
Materia seca	94,96
Cenizas	10,96

¹En base seca.

Tabla 2
Contenido de proteína cruda de los sustratos antes y después de la fermentación¹

Sustrato	Proteína cruda (inicial)%	Proteína cruda (final) ²
BNT	12,54	15,73
BTA-0,5	12,07	19,05
BTA-1	12,49	18,45
BTA-2	12,02	20,29
BT-0,5	11,92	18,00
BT-1	11,80	17,27
BT-2	13,77	20,52

¹En base seca. ²Valores promedio de dos fermentaciones.

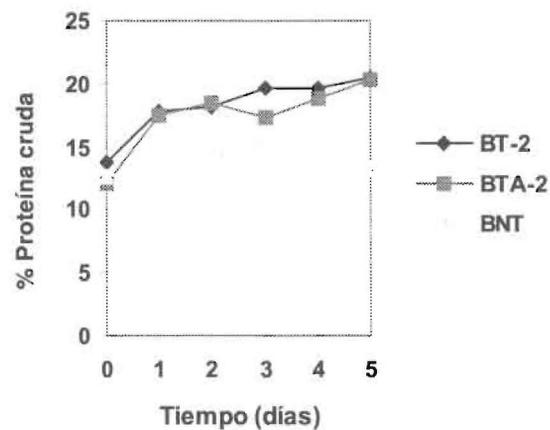


Figura 1. Contenido de proteína cruda durante la fermentación.

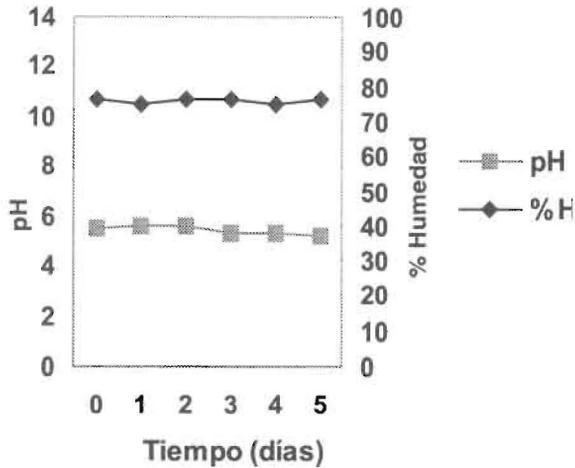


Figura 2. Cambios del pH y humedad durante la fermentación del BT-2.

el buen funcionamiento del equipo y, por la otra, la ausencia de condiciones inhibitorias tanto para la producción de enzimas como para la hidrólisis [14].

En la Figura 3 se presenta el consumo de celulosa y hemicelulosas durante la fermentación del BT-2. Se observa que durante las primeras 24 horas de la fermentación el hongo degrada celulosa y hemicelulosas, pero a partir del segundo día el consumo de celulosa aumenta hasta llegar a 62% en el quinto día, mientras que el de hemicelulosas disminuye a 13%. Estos resultados contrastan con los reportados para la fermentación de bagacillo de caña de azúcar por *Chaetomium cellulolyticum*, en la cual el hongo degrada las hemicelulosas durante todo el proceso pero sólo comienza a utilizar la celulosa después del segundo día de la fermentación [23].

Conclusiones

Por su alto contenido energético y proteico el bagazo podría ser utilizado directamente como alimento para animales rumiantes.

La composición del bagazo no es muy afectada por los tratamientos acuoso y alcalino.

No se encontraron diferencias significativas entre los contenidos de proteína de los bagazos tratados con agua (BTA) y los tratados con álcali (BT) ni entre éstos y el bagazo no tratado (BNT). En promedio se alcanzó hasta 18,47% de proteína por efecto de la fermentación microbiana.

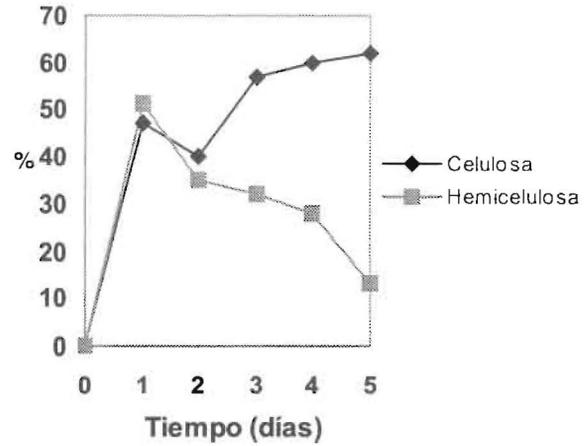


Figura 3. Consumo de celulosa y hemicelulosas durante la fermentación.

Los bagazos fermentados presentan composiciones químicas que se acercan a los requerimientos nutricionales de los cerdos, aunque el elevado contenido de fibra cruda determinaría su utilización sólo como ingrediente en la formulación del alimento.

Agradecimientos

Los autores expresan su gratitud al CONICIT por sus aportes financieros a través del proyecto S1-2589 y al Decanato de Investigación de la UNEFM.

Referencias Bibliográficas

1. Bold H., Alexopoulos C. y Delevoras, T. "Morphology of plants and fungi". Harper International Edition. e.4. New York, USA (1980), 888 p.
2. Llamozas B. "Desarrollo industrial para la producción de agar-agar". Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Area de Investigación. Centro de Investigaciones Tecnológicas. (1993) (Trabajo de Ascenso).
3. Sánchez E., Llamozas B. y Maldonado, C. "Aprovechamiento potencial de los residuos de algas: tres casos". Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Area de Tecnología. Departamento de Química. (1994) (Trabajo de Ascenso).

4. Alastre N. y Llamozas B. "Estudio sobre adsorción del bagazo de las algas en la remoción de las aguas residuales". Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Area de Tecnología. Departamento de Química. (1994) (Trabajo de Ascenso).
5. Acurero G., Pérez S., Alvarez R., Alvarado L., Capó de Blanco E. y Castillo P. "El arroz en cáscara como alternativa en la alimentación de cerdos". Zootecnia Tropical. Vol. 2, N° 1 y 2 (1984), 30-38.
6. Chacón M., Romero de Acosta I. y Monsalve D. "El mata ratón (*Gliricidia septum*) en la alimentación de pollos de engorde". En: Celina de Portal (ed). VI Congreso Nacional de Avicultura. Memorias. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela (1996), 425-430.
7. Cioccia A., Sánchez J. y Brito O. "Valor energético del follaje de yuca en la alimentación de pollos". Act. Cient. Venezolana. Vol.37, N°1 (1986), 421-424.
8. Romero de Acosta I., Huérfano T., Calderón U., Ramírez J. y Molina W. "Niveles de aceptabilidad de pulpa de café ensilada en la alimentación de aves". En: Celina de Portal (ed). VI Congreso Nacional de Avicultura. Memorias. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela (1996), 483-486.
9. Romero de Acosta I., Chacón I., Méndez G., Bautista O. y Molina W. "Evaluación de pulpa de café ensilada con 5% de melaza y bacterias en pruebas de consumo con pollos de engorde". En: Celina de Portal (ed). VI Congreso Nacional de Avicultura. Memorias. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela (1996), 487-490.
10. Theis W., Cruz W. y Silva L. "Uso de extractos de semillas cítricas como factor de mejoramiento de los parámetros nacimientos y pollos de primera en reproductoras pesadas". En: Celina de Portal (ed). VI Congreso Nacional de Avicultura. Memorias. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela (1996), 491-492.
11. Mandels M. y Weber J. "The production of cellulase". Adv. Chem. Series N° 95 (1969), 395-414.
12. Bravo O., Ferrer A., Aiello C., Ledesma A. y Dávila M. "Groth of *Chaetomium cellulolyticum* in solid state fermentation of sugar cane bagasse treated with water and alcali at several liquid/solid ratios". Biotechnol. Lett. Vol. 16, N° 8 (1994), 865-870.
13. Ferrer A., Aiello C., Bravo O., Ledesma A., Zabala I. y Dávila, M. "Utilización de residuos de cosecha y subproductos agrícolas en la producción de alimentos para animales rumiantes". Revista de Agronomía (LUZ), Vol. 11, N°2 (1994), 207-223.
14. Ferrer A., Aiello C., Bravo O., Ledesma A., Zabala I. y Dávila M. "Segundo informe técnico del proyecto CONICIT CNIGB-4. Degradación enzimática de residuos lignocelulósicos: su utilización en la producción de enzimas y bioproteínas". (1992).
15. Raimbault M. y Alazard D. "Culture method to study fungal growth in solid fermentation". Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 9 (1980), 199-209.
16. Abdullah A., Tengerdy R. y Murphy V. "Optimization of solid substrate fermentation of wheat straw". Biotechnol. Bioeng. Vol. 27 (1985), 20-27.
17. AOAC. Methods. Horwitz (ed). e. 30. "Association of official analytical chemists". Washington D.C. USA (1980).
18. Van Soest P. y Wine R. "Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. The determination of plant cell constituents". J. Assoc. Off. Anal. Chem. Vol. 450 (1967), 150.
19. Menezes T., Silva J., Baldini V., Papini R. y Sales A. "Protein enrichment of citrus wastes by solid substrate fermentation". Process Biochem. (1989), 167-171.
20. Downie N. y Hecth R. "Métodos estadísticos aplicados". Editorial Harla. México (1983). 229.
21. Moore J. "Determination of voluntary intake and digestion coefficients of cured forages". In: Harris L. (ed). Nutrition research techniques for domestic and wild animals. Ed. Logan. Utah, USA (1970), 5.101p.
22. Ly J. "Las bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición de animales monogástricos en el trópico". Seminario taller: Sistemas intensi-

- vos para la producción animal y de energía renovable con recursos tropicales. Cali, Colombia (1988), 24-40.
23. Carrizales V. y Sáenz D. "Enriquecimiento proteínico del bagacillo de caña mediante

cultivo semisólido de *Chaetomium cellulolyticum*. Act. Cient. Venezolana. Vol. 37 (1986), 580-586.

Recibido el 27 de Abril de 1998

En forma revisada el 24 de Septiembre de 1998