

**ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DEL *Penicillium roqueforti* EMPLEANDO
COMO SUSTRATO LACTOSUERO VACUNO A DIFERENTES
CONCENTRACIONES DE LACTOSA.**

**(STUDY OF THE GROWTH OF *Penicillium roqueforti* EMPLOYING VACCINE
LACTOSUERO SUBSTRATE TO DIFFERENT LACTOSE CONCENTRATIONS)**

Rosjany Rivas, Teresa Mireles, Gabriel Cravo.

Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales “Ezequiel Zamora”
UNELLEZ. Programa Ciencias del Agro y del Mar. San Carlos-Estado Cojedes,
Venezuela.

ros_rivas_93@hotmail.com/ carmen_mireles_23@hotmail.com/ cravo50@gmail.com.

Recibido: 22-10-2017/ Aceptado: 16-01-2018

RESUMEN

El *Penicillium roqueforti*, es un hongo saprófito muy extendido en la naturaleza que interviene en la maduración de quesos azules desacidificando la pasta del mismo, mediante la degradación del ácido láctico producido por la fermentación bacteriana y que secreta enzimas proteolíticas, lipolíticas cuya acción, junto con la de las bacterias lácticas, determinan la textura, el sabor y el aroma final del queso. Con esta motivación, a través de la presente investigación se pretende estudiar el crecimiento del *Penicillium roqueforti* usando un sustrato no convencional como el lactosuero vacuno, subproducto de la industria láctea rico en nutrientes, muy abundante en la región llanera que normalmente es desechado al ambiente produciendo contaminación. Para ello se caracterizó químicamente el sustrato (lactosuero vacuno) a emplear en la producción del microorganismo, posteriormente se estableció la concentración óptima del sustrato en la producción de *Penicillium roqueforti*, luego se determinaron los parámetros cinéticos que caracterizan al microorganismo con la finalidad de obtener un modelo matemático para el proceso de desarrollo del mismo. Una vez culmina esta etapa, se simuló el comportamiento para el crecimiento del microorganismo en un sistema de control a lazo cerrado, a fin de validar los resultados obtenidos permitiendo afirmar que la máxima concentración de biomasa se ubicó en un rango cercano a $4,2 \times 10^9$ Ufc en un tiempo de 12 h empleando una concentración de 10% de lactosa, por lo que el modelo y las funciones de transferencia describen el proceso bajo estudio.

Palabras Claves: Crecimiento, *Penicillium roqueforti*, lactosuero vacuno, biomasa.

SUMMARY

Penicillium roqueforti is a naturally occurring saprophytic fungus that intervenes in the maturation of blue cheeses by deacidifying the pulp, by the degradation of the lactic acid produced by bacterial fermentation and secreting proteolytic and lipolytic enzymes whose action, together with that of the lactic bacteria, determine the texture, flavor and final aroma of the cheese. With this motivation, this research aims to study the growth of *Penicillium roqueforti* using an unconventional substrate such as bovine whey, a byproduct of the nutrient rich dairy industry, abundant in the region llanera is normally discarded to the environment producing contamination. For this purpose, the substrate (bovine whey) to be used in the production of the microorganism was characterized, subsequently the optimum concentration of the substrate was established in the production of *Penicillium roqueforti*, then the kinetic parameters characterizing the microorganism were determined in order to obtain a mathematical model for the process of development of the same. Once this stage culminated, the behavior for the growth of the microorganism in a closed loop control system was simulated in order to validate the results obtained allowing to state that the maximum concentration of biomass was located in a range close to 4.2×10^9 Ufc in a time of 12 h using a concentration of 10% of lactose, so that the model and transfer functions describe the process under study.

Key Words: Growth, *Penicillium roqueforti*, bovine whey, biomass.

INTRODUCCIÓN

P. roqueforti, es una de las especies más conocidas del género *Penicillium* debido a su amplia utilización en la fabricación de quesos azules, en especial del queso francés Roquefort que le da nombre. Es un hongo saprófito muy extendido en la naturaleza, encontrándose con frecuencia en el suelo, plantas y residuos orgánicos en putrefacción. Su crecimiento se ve favorecido en ambientes con humedad y temperaturas moderadas. Es el principal microorganismo que interviene en la maduración de quesos azules, cuyo consumo fue descrito ya en el año 23 D.C. por Plinio El Viejo en “Historia Natural” (Healy, 1999).

En ese mismo sentido en la presente investigación se empleó un sustrato no convencional, como el lactosuero para lograr la reproducción del microorganismo, debido a que contiene altos niveles de nutrientes que favorecen su crecimiento, permitiendo otorgarle un valor agregado a un subproducto de la industria láctea que representa un problema desde el punto de vista ambiental por sus altos niveles de

contaminación y que por un proceso de bioconversión se transforman en una nueva alternativa alimentaria.

Con referencia a lo anterior, el aproximadamente 90 % del total de la leche utilizada en la industria quesera es eliminada como lactosuero el cual retiene cerca de 55 % del total de ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales (Mena, 2002).

Tomando como base las reflexiones anteriores, a través de la presente investigación se pretendió estudiar el crecimiento de *Penicillium roqueforti* empleando como sustrato lactosuero vacuno con 15% lactosa. Para el logro de este propósito se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Diagnosticar el estado actual de los sistemas de control en los procesos de cultivo *Penicillium roqueforti*.
- Caracterizar químicamente el sustrato (lactosuero vacuno) a emplear en la producción del microorganismo.
- Establecer la concentración óptima del sustrato (lactosuero vacuno) en la producción de *Penicillium roqueforti*.
- Determinar los parámetros cinéticos que caracterizan al microorganismo *Penicillium roqueforti*.
- Obtener un modelo matemático para el proceso de crecimiento del microorganismo.
- Simular el comportamiento para el crecimiento del *Penicillium roqueforti* en un sistema de control a lazo cerrado.

FUNDAMENTACIÓN TEORICA

El *Penicillium roqueforti* es un moho ampliamente distribuido en la naturaleza. Posee colonias de color verde y aspecto verdoso que son inodoras. Los conidióforos son de pared netamente rugosa y las hifas de pared fina. En la actualidad está presente en el proceso de la maduración de diferentes quesos azules como los quesos franceses Roquefort, el alemán Cambozola, el italiano Gorgonzola, el danés Danablu y los quesos españoles Cabrales, picón, Bejestresviso y Valdeón (Jenkins, 1996; Fernández, 2010).

En ese mismo sentido el *Penicillium roqueforti* cumple dos funciones fundamentales en el proceso de elaboración del queso azul:

- Es responsable de la desacidificación de la pasta del queso, mediante la utilización del ácido láctico.
- Secreta enzimas proteolíticas y lipolíticas cuya acción, junto con la de las bacterias lácticas, determina la textura, el sabor y el aroma final del queso.

El ácido láctico que utiliza *Penicillium roqueforti* como fuente de carbono procede de la fermentación bacteriana de los hidratos de carbono presente en la pasta del queso. *Penicillium roqueforti* degrada rápidamente y en casi toda su totalidad el ácido láctico, lo que asegura la neutralización de la pasta del queso. Además, aprovecha las cavidades formadas por la producción de dióxido de carbono, como consecuencia del metabolismo heterofermentativo de las bacterias lácticas, para su implantación y posterior desarrollo.

La acción proteolítica llevada a cabo por *Penicillium roqueforti* sobre la pasta de queso es intensa y libera tanto péptidos de alto y bajo peso molecular, como aminoácidos. La aspartil-proteasa es la enzima predominante en este proceso. Esta endopeptidasa junto con la otra endopeptidasa fúngica, una metaloproteasa, son las encargadas de degradar las cadenas alfa y beta de la caseína (Fernández, 2010).

Por su parte el *Penicillium roqueforti* es aislado con frecuencia a partir de cereales, ensilajes y otras materias primas vegetales almacenadas en condiciones microaerófilas por largas temporadas (Frisvad *et al*; 2004). En dichas condiciones es capaz de producir gran variedad de toxinas que dañan estos productos que son usados en la alimentación animal.

Al igual que la mayoría de las especies pertenecientes al género *Penicillium*, *roqueforti* es un hongo aerobio, pero crece bien a bajas concentraciones de oxígeno (4,2%), no es capaz de esporular a 0 y 100% y se ve estimulado con bajas concentraciones de CO₂ (Golding, 1945; Pitt y Hocking, 1997).

Su temperatura óptima de crecimiento gira en torno a 35-40°C aunque resiste bien temperaturas bajas, superiores a 5°C, pudiendo alterar alimentos en refrigeración. A esas bajas temperaturas, su crecimiento sigue siendo rápido (Moreau, 1980).

Algunos trabajos recientes de investigación relacionados con el tema de estudio se citan a continuación:

Girado, (2010) estudiaron al *Penicillium roqueforti* para obtener una suspensión de esporas con vista en su uso en la producción de aroma de queso. Emplearon 2 métodos, usando como medio de cultivo agar extracto de malta y el otro con salvado de trigo. Con respecto al agar extracto de malta, analizaron factores como origen del inóculo, tiempo de incubación y cantidad de esporas a inocular. Para el salvado de trigo analizaron % de humedad, tiempo de incubación y cantidad de esporas a inocular. El rendimiento fue a favor del medio extracto de malta, neutralizando las ventajas en costo y facilidad de operación del medio de salvado de trigo.

Este estudio empleado se interrelaciona con la investigación propuesta, debido a que el mismo fija su basamento en estudiar el crecimiento de *Penicillium roqueforti* utilizando un sustrato no convencional. De allí radica la importancia de lograr minimizar los insumos a fin de producir la mayor cantidad de biomasa, en un proceso biotecnológico de cultivo para producción a escala de laboratorio de cepas de la especie del microorganismo.

De igual manera Fernández (2010) aisló y caracterizó cepas de *Penicillium roqueforti* a partir de distintas variedades de queso azul. Además analizó la actividad proteolítica y eliminación de la producción de micotoxinas. Para la realización de este estudio, tomó en cuenta dos de los aspectos más característicos de la especie fúngica *Penicillium roqueforti*. En primer lugar, su uso en la industria alimentaria como principal microorganismo utilizado en la elaboración del queso azul. Y en segundo lugar su capacidad para sintetizar toda una serie de metabolitos secundarios tóxicos, conocidos con el nombre de micotoxinas.

Por otra parte González y Fernández (2005) estudiaron el efecto de la concentración inicial de lactosuero sobre la fermentación alcohólica con *Kluyveromyces*

fragilis. Inocularon lactosuero en conjunto de lactosa a diferentes concentraciones y el cultivo de *K. fragilis* en fase exponencial (bajo condiciones aeróbicas). Afirmaron que la finalidad era obtener la máxima biomasa posible, debido a que si las condiciones anaeróbicas comenzaban demasiado pronto la densidad de la población no sería lo suficientemente alta para obtener una buena velocidad de conversión. Obtuvieron resultados en donde la crecida de *k. fragilis* alcanzó la fase estacionaria entre las 26 y 30 horas, y donde la concentración de lactosa no influyó en el crecimiento del microorganismo.

Tomando como referencia lo anteriormente expuesto se empleó el método aplicado por González y Fernández (2006), en donde se inoculó el microorganismo en el lactosuero en conjunto de lactosa a diferentes concentraciones. A diferencia de los resultados obtenidos por los autores, en esta investigación si influyeron las variaciones de lactosa en el desarrollo microbiano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se encuentra contextualizada según Hurtado (2012), dentro de la investigación exploratoria, debido a que pretende ofrecer una visión general, de tipo aproximativo, respecto a una determinada realidad o un tema poco conocido o escasamente definido debido a la carencia de conocimiento del momento, empleando como procedimientos para la recolección de la información la *investigación documental*, a través de la lectura de la bibliografía que describe el proceso de cultivo de *Penicillium* la especie *roqueforti*, representado por el modelo desarrollado, y la relacionada con el estado del arte sobre el modelado, simulación para biorreactores semicontinuos; así como, la *observación directa* en forma general y detallada de los datos resultantes en las corridas de simulación del proceso bajo diversas condiciones de funcionamiento.

En este propósito la investigación se desarrolló mediante las siguientes fases:

Fase I: Diagnostico del estado actual de los sistemas de control en los procesos de cultivo *Penicillium roqueforti*. En esta fase se recopiló toda la información relacionada

con los sistemas de control para el crecimiento del microorganismo *Penicillium roqueforti* y el sustrato lactosuero vacuno.

Fase II: Caracterización química del sustrato (lactosuero vacuno) a emplear en la producción del microorganismo *Penicillium roqueforti*. En esta fase se determinó el pH, la acidez titulable y sólidos totales (° brix).

Fase III: Se estableció la concentración optima del sustrato (lactosuero vacuno) en la producción de *Penicillium roqueforti*. En esta etapa se ejecutaron todas las operaciones preliminares necesarias para el acondicionamiento del lactosuero vacuno a diferentes concentraciones de lactosa (5%, 10% y 15%) agregadas al biorreactor otorgándole las siguientes condiciones: temperatura de 32 ° C, pH 4 y aireación de 2 pie³/ min, luego se agregaron 3ml de la vitamina complejo B y próximamente el microorganismo con el fin de activar las células de las mismas. Se inoculó a través del cultivo puro de *Penicillium roqueforti* en 1700 ml del sustrato (lactosuero vacuno).

Fase IV. Determinación de los parámetros cinéticos que caracterizan al microorganismo *Penicillium roqueforti*. Se ubicaron los sistemas semicontinuos, debido a que permiten utilizar soluciones simples de nutrientes y adquirir la Tasa de Crecimiento y Velocidad (μ).

Fase V. Obtención de modelo matemático para el proceso de crecimiento del microorganismo *Penicillium roqueforti*. En esta fase se emplearon como herramientas los balances de Masa y de Energía a fin de construir un modelo matemático que permita observar el comportamiento del sistema (ver ecuación 1). Con dicho modelo se simuló el comportamiento de tal manera de validar los resultados obtenidos experimentalmente.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

Fase VI. Simulación del comportamiento para crecimiento del *Penicillium roqueforti* en un sistema de control a lazo cerrado. En esta fase se empleó como herramienta el software MATLAB (Laboratorio de matrices), para el desarrollo de un bloque de función S en Simulink, siguiendo la información presentada en Co (2004), a fin de simular el comportamiento del sistema.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las figuras que se muestran a continuación representan el sistema simulado, donde la máxima concentración de biomasa se logra en un tiempo de 11 h con un rango cercano a 6×10^9 Ufc (figura a), la concentración de sustrato experimenta su máximo valor a las 1,5 horas en un rango aproximado de 2 g/l y comienza a agotarse a las 3 horas hasta volverse cero alrededor de las 7 horas (figura b), la concentración de etanol experimenta su máximo valor de 2,30 g/l alrededor de las 3 h hasta volverse 0,3 g/l a las 11 h (figura c), la concentración de oxígeno comienza a agotarse alrededor de las 3 h, hasta alcanzar $0,1 \times 10^{-3}$ g/l entre las 6 y 8 horas, para luego volverse 0 g/l aproximadamente a la hora 9 (figura d).

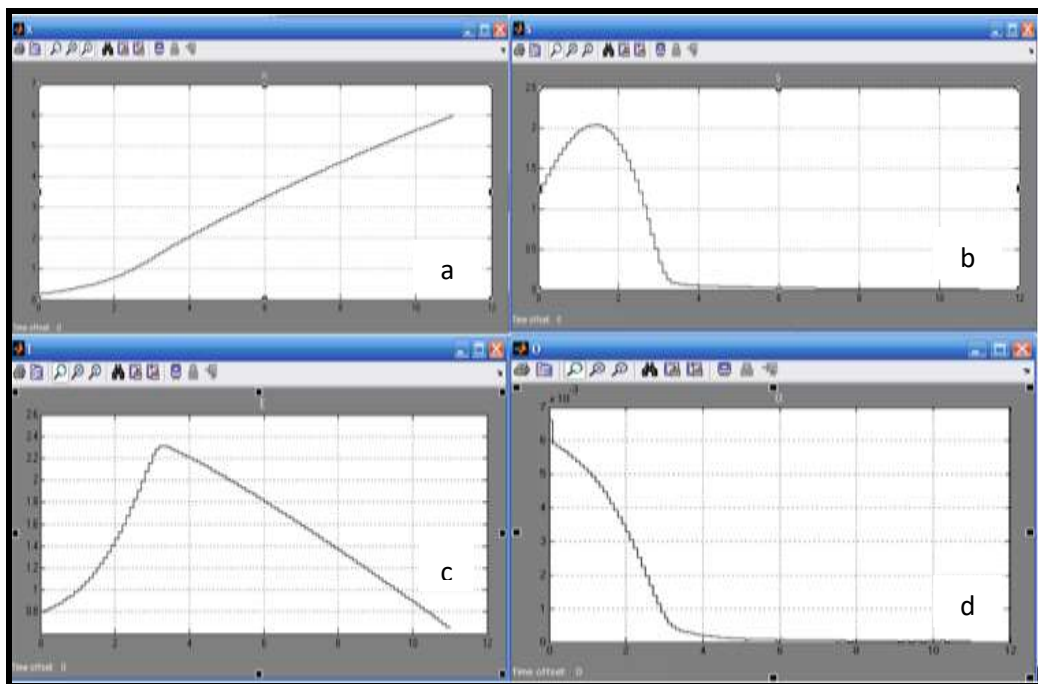


Figura 1. Perfiles de a) Biomasa x 10^9 (Ufc) y tiempo (h), b) Flujo de sustrato (g/l) y tiempo (h), c) Etanol (g/l) y tiempo (h), d) Oxígeno (g/l) y tiempo (h)

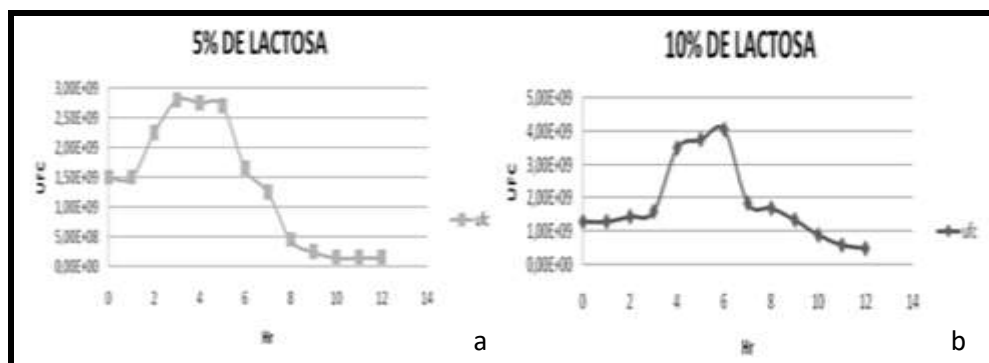


Figura 2. Perfiles de a) Concentración de Dióxido de Carbono, b) volumen del Biorreactor.

Si se comparan los resultados de biomasa mostrados en la figura 1, correspondientes al sistema simulado a lazo cerrado donde el máximo crecimiento es de 6×10^9 Ufc en 12 horas, con la figura 2.b cuyo crecimiento máximo es de $4,2 \times 10^9$ Ufc, se puede observar que en la primera existe una mayor producción de biomasa durante las 12 horas, con una fase de adaptación más corta, por lo que el sistema se logra ajustar con precisión.

CONCLUSIONES

Luego de los resultados obtenidos se han establecido las siguientes conclusiones:

- El modelo y funciones de transferencia obtenidas mediante la función S MATLAB que contiene la descripción del proceso bajo estudio logran ajustarse con un grado de exactitud elevado al comportamiento de los valores presentados en la literatura utilizada como referencia.
- Durante el lapso de control de 12 horas, el sistema simulado a lazo cerrado produjo una mejor respuesta con respecto al sistema desarrollado experimentalmente, demostrando que puede ajustarse con precisión a la estrategia de control propuesta.
- Al relacionar las tres gráficas experimentales del sustrato lactosuero vacuno se puede afirmar que la corrida de 10% de lactosa, presenta mejores condiciones para la producción del *Penicillium roqueforti*, logrando un rango cercano a $4,2 \times 10^9$ Ufc en un tiempo de 12 h.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Co, T. 15 de noviembre de 2014. Short Tutorial on Matlab. (2004). [on line]. <http://www.chem.mtu.edu/~tbco/cm416/MatlabTutorialPart5.pdf>.
- Fernández, M. (2010). Aislamiento y caracterización de cepas de *Penicillium roqueforti* variedades de queso azul. Análisis de la actividad proteolítica y eliminación de la producción de micotoxinas. Tesis Doctoral. León, España. 230 p.
- Frisvad, J.; Smedsgaard, J.; Larsen, T.; Samson R. (2004). Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology* Vol. 49. Pp: 201-241.
- Girado, G. (2010). Obtención de suspensión de esporas de *penicillium roqueforti*. [artículo en línea]. *Dialnet*. No. 322, [20/05/2016]. Pp: 95-100. Disponible en <http://dialnet.unirioja.es > servlet > articulo>.
- Golding, N. (1945). The Gas Requirements of Molds. IV. A Preliminary Interpretation of the Growth Rates of Four Common Mold Cultures on the Basis of Absorbed Gases. *J. Dairy Sci* Vol. 28. Pp: 737-750.
- González, P.; Fernández, M. (2005). Efecto de la concentración inicial del lactosuero sobre la fermentación alcohólica con *kluveromyces fragilis* [artículo en línea]. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. Año 2006, No 26 [20/05/2016]. Disponible en <http://scielo.org.ve > scielo>.
- Healy, J. (1999). Pliny the Elder on science and technology. Oxford University Press; Oxford.
- Jenkins, S. (1996). Cheese. Primer Workman Publishing Company; New York.
- Mena, W. (2002). Formulación y elaboración de dos bebidas refrescantes con base en suero dulce de queso fresco y sabores de frutas. Tesis de grado de licenciatura. Honduras. 57p.
- Moreau, C. (1980). El *Penicillium roqueforti*, morphologie, physiologie, interet en industrie fromagere, mycottoxines. *Lait* Vol. 60. Pp: 254-271.
- Pitt, J.; Hocking, A. (1997). Fungi and food spoliage. Second Edition. University Press, Cambriage. Great Britain.