

Optimización de la producción de biomasa de *Kluyveromyces marxianus* en lactosuero

Eluk D, Nagel OG, Althaus RL.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L. Kreder 2805 - (3080).
Esperanza, Santa Fe, Argentina. deluk@fcv.unl.edu.ar

El lactosuero es el principal subproducto de la industria láctea y se obtiene como consecuencia del proceso de fabricación de quesos. Debido a su contenido en lactosa, vitaminas y proteínas, su descarte - sin tratamiento previo-, constituye una fuente importante de contaminación ambiental. Por ello, el lactosuero no debería considerarse un desecho, sino una materia prima para la obtención de distintos productos de valor agregado³. Una alternativa interesante es utilizar el lactosuero para la producción de biomasa mediante la fermentación con levaduras. Entre éstas, *Kluyveromyces marxianus*, destaca debido a su elevada tasa de crecimiento y capacidad de asimilar lactosa.² Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue determinar las mejores condiciones operativas (nivel de aireación y concentración de fuente nitrogenada) para optimizar la producción de biomasa minimizando la lactosa residual y la proteína residual.

Se utilizó un Diseño Experimental de Matriz de Doehlert que permite evaluar los efectos de aireación (Volumen Medio por Minuto: VVM) y de la concentración de fuente nitrogenada (Peptona de Caseína: PC) sobre el crecimiento de *K. marxianus* mediante un mínimo número de experimentos (siete, ver Fig. 1). Este diseño utiliza tres niveles de aireación, cinco concentraciones de PC y permite analizar los efectos lineales, cuadráticos e interacción, con un mínimo número de grados de libertad.

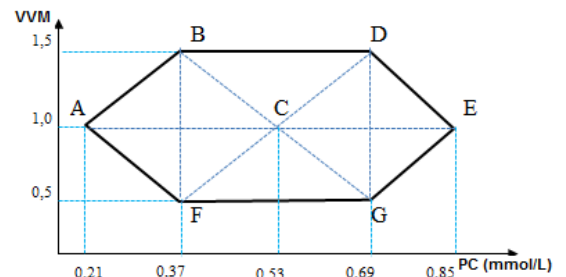


Fig. 1: Diseño Doehlert

En este trabajo se utilizó lactosuero (conteniendo 4 g/L de lactosa) desproteinizado mediante tratamiento térmico a 120°C durante 20 minutos, seguido por la remoción de las proteínas precipitadas mediante filtración¹. Luego se fortificó con 0,5 g/100 mL de extracto de levadura y diferentes concentraciones de PC estériles, según Fig.1. Los siete fermentadores se inocularon con 20% m/V de suspensión de *K. marxianus* de modo tal obtener uniformidad en la Densidad Óptica inicial ($DO_0 = 0.210 \pm 0.015$). Cada fermentador se incubó a 42°C durante un tiempo de 24 hs, las agitaciones y ajustes de pH a 7,5 con NaOH 1N se realizaron con una frecuencia de dos horas. El recuento celular se llevó a cabo a través de mediciones de DO a 620 nm utilizando un espectrofotómetro Boeco Modelo S-20 Vis & S-22 UV/Vis. Las lecturas de DO se convirtieron a Biomasa (B: g/L) previa calibración mediante un Modelo de Regresión Lineal ($B = 0,0005 + 0,243 \cdot DO$; $R^2 = 0,98$). La concentración de lactosa residual (mmol/L), se analizó mediante una técnica enzimática colorimétrica basada en la hidrólisis de lactosa mediante β -galactosidasa, seguida de la reacción enzimática de glucosa con glucosa oxidasa y peroxidasa. Las lecturas fotométricas se realizaron a 505 nm. La concentración de proteínas residual (mmol glicina/L) se analizó mediante la reacción colorimétrica de los α -aminoácidos con ninhidrina para formar un compuesto violáceo (púrpura de Ruhemann), que se cuantificó fotométricamente a 570 nm.

Los resultados se analizaron utilizando la opción stepwise del Modelo de Regresión Lineal Múltiple de segundo orden con interacción del paquete estadístico StatGraphics Centurion XVI (Statgraphics®, 2009), de acuerdo con el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \beta_0 + \beta_1 \cdot t_i + \beta_2 \cdot VVM_j + \beta_3 \cdot PC_k + \beta_{11} \cdot t_i^2 + \beta_{22} \cdot VVM_j^2 + \beta_{33} \cdot PC_k^2 + \beta_{12} \cdot t_i \cdot VVM_j + \beta_{13} \cdot t_i \cdot PC_k + \beta_{23} \cdot VVM_j \cdot PC_k + \varepsilon_{ijkl}$$

dónde: Y_{ijkl} = Modelo de Regresión Lineal General; β_0 : Ordenada al origen; $\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}, \beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$: Coeficientes estimados por el modelo; t_i : Efecto del tiempo ($i=12$); VVM_j : Efecto del nivel de aireación ($j=3$); PC_k : Efecto de la concentración de proteína ($k=5$); t_i^2 : Efecto cuadrático del tiempo; VVM_j^2 : Efecto cuadrático del nivel de aireación; PC_k^2 : Efecto cuadrático de la concentración de proteína

y ε_{ijkl} : Error residual del modelo. Tabla 1 muestran las ecuaciones que relacionan la producción de biomasa y las concentraciones residuales de lactosa y proteína, en términos de sus factores significativos ($p < 0,05$). Como puede apreciarse, los coeficientes porcentuales de regresión ajustados (R_{aj}^2) resultaron en todos los casos mayores a 88%, indicando un adecuado ajuste del modelo utilizado.

Tabla 1: Ecuaciones que relacionan el crecimiento de *K. marxianus*, las concentraciones de lactosa residual y proteína residual con el nivel de aireación y la concentración de fuente nitrogenada

Variable	$Y = \beta_0 + \beta_1.t + \beta_2.VVM + \beta_3.PC + \beta_{11}.t^2 + \beta_{22}.VVM^2 + \beta_{33}.PC^2 + \beta_{12}.t.VVM + \beta_{13}.t.PC + \beta_{23}.VVM.PC$	R_{aj}^2
Biomasa	$Y = -0,184 - 0,002.t^2 + 0,292.t.PC$	88,9
Lactosa	$Y = 118 - 0,059.t^2 - 0,186.t.VVM - 3,529.t.PC$	97,6
Proteína	$Y = -1622 + 2346.VVM + 4686.PC - 1070.VVM^2 - 1656.PC^2 - 68.t.PC - 477.VVM.PC$	96,8

R_{aj}^2 : Coeficiente porcentual de regresión ajustado; t: Tiempo; VVM: Nivel de aireación; PC: Concentración de peptona de caseína; Y: Variable dependiente (Producción de biomasa, Lactosa residual o Proteína residual)

A partir de dichas ecuaciones se construyeron gráficas (Fig. 2) que representan las variaciones en la producción de biomasa, concentraciones de lactosa y proteína en el tiempo, para diferentes niveles de aireación y concentración de fuente nitrogenada. Para todas las condiciones ensayadas se observó el crecimiento de *K. marxianus* a lo largo de la experiencia (Fig. 2a) acompañado de disminuciones en los consumos de lactosa (Fig. 2b) y proteína (Fig. 2c).

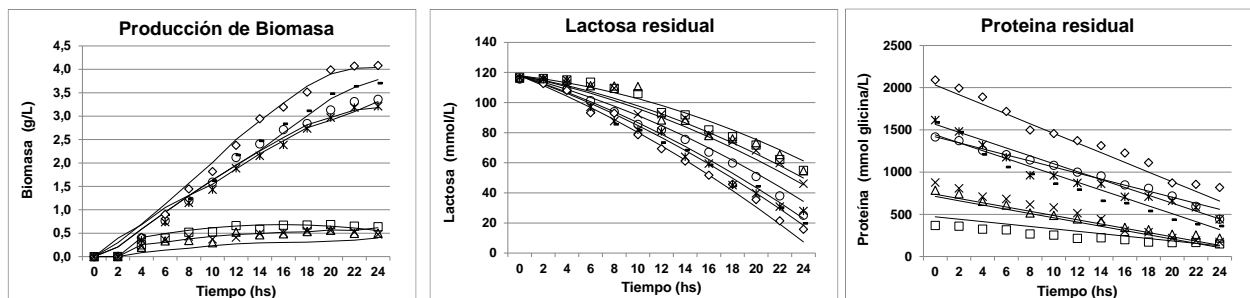


Fig. 2: Efecto del nivel de aireación y la concentración de fuente nitrogenada sobre: **a)** Crecimiento de biomasa, **b)** Lactosa residual y **c)** Proteína residual, en cultivos de *K. marxianus* (\square : A; \times : B; \circ : C; \blacksquare : D; \diamond : E; \triangle : F; \ast : G)

Posteriormente, se aplicó la función deseabilidad (StatGraphics Centurion XVI) con el propósito de determinar las mejores condiciones de trabajo para aumentar la producción de Biomasa y disminuir el impacto ambiental, es decir, disminuir los niveles de lactosa y nitrógeno residual. La mejor deseabilidad (valor óptimo de 0,79) se obtuvo para un tiempo de 24 hs, una aireación de 1,5 VVM y una concentración inicial de PC de 0,85 mmol/L. En estas condiciones, la producción de biomasa de 3,8 g/L, con un adecuado consumo de lactosa (85%) y proteína (80%). De este modo es posible maximizar la producción de biomasa y minimizar los niveles de lactosa y proteínas mediante el tratamiento del lactosuero con *K. marxianus*, logrando así un tratamiento simple y económico previo a su descarte.

Bibliografía

- 1- Eluk D., Ceruti R., Nagel O., Althaus, R. 2019. Effect of thermal treatment of whey contaminated with antibiotics on the growth of *Kluyveromyces marxianus*. Journal Dairy Research, 1-6. doi:10.1017/S0022029919000098.
- 2- Löser C, Haas C, Liu W, Grahl S, Bley T. 2018. Uptake of iron by *Kluyveromyces marxianus* DSM 5422 cultivated in a whey-based medium. Engineering in Life Sciences, 18(7), 459-474.
- 3- Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Parmar, S. C., & Aparnathi, K. D. (2016). Whey and its utilization. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 5(8), 134-155.