

Crecimiento y Características Fermentativas de *Kluyveromyces marxianus* en Matrices Derivadas de Lactosuero

Gomez GA¹, Nagel OG², Althaus RL², Ceruti RJ¹.

¹Instituto de Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santiago del Estero 2829 – (3000) Santa Fe, Santa Fe, Argentina

²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L. Kreder 2805 - (3080). Esperanza, Santa Fe, Argentina. gagomez11@gmail.com

La industria láctea genera grandes cantidades de lactosuero, principalmente como subproducto de la elaboración de quesos. El lactosuero presenta un elevado contenido en materia orgánica, fundamentalmente lactosa y proteínas del lactosuero, por lo que su vertido incontrolado puede ocasionar problemas ambientales. Sin embargo, la recuperación de componentes del lactosuero a través de estrategias de separación y concentración permite valorizar este subproducto para uso en la industria alimentaria. El permeado de suero o leche es un subproducto de la aplicación de tecnologías de ultrafiltración por membranas para concentrar proteínas lácteas, que por su elevado contenido de lactosa retiene gran parte del potencial contaminante del lactosuero. Una alternativa interesante para la utilización de estas matrices es el empleo de la levadura facultativa *Kluyveromyces marxianus*, debido a su capacidad para utilizar lactosa como fuente de carbono¹. Entre las diversas aplicaciones investigadas anteriormente, se ha propuesto el uso de esta levadura para la producción de etanol como biocombustible². Sin embargo, el carácter GRAS de la levadura¹ permite también evaluar su uso para la producción de bebidas alcohólicas fermentadas. En el presente trabajo, se propone explorar las características básicas de crecimiento y fermentación de la levadura *Kluyveromyces marxianus* en lactosuero y diferentes medios derivados, así como evaluar su potencialidad para la producción de bebidas alcohólicas fermentadas.

Se utilizó la levadura *Kluyveromyces marxianus* LFIQ K1, aislada a partir de Kefir (FIQ-UNL). Para la preparación de los medios de cultivo se emplearon lactosuero y lactosuero parcialmente desmineralizado en polvo (La Cristina, S.A.) y permeado de leche obtenido de leche entera por ultrafiltración (membrana Koch HFK-131). Para los repiques se utilizó medio lactosado (4% lactosa, 1% peptona de carne y 0,5% extracto de levadura). Se prepararon 4 medios de cultivo diferentes, por agregado de agua destilada estéril a suero y suero desmineralizado en polvo en una proporción 65 g/L (medios SP y SPD, respectivamente); medio SP Cal, preparado de igual manera a SP, pero esterilizado en autoclave (121°C, 15 min) y centrifugado para remover proteínas; y medio PER (permeado de leche). La cepa fue reactivada en medio lactosado a partir de estría MEA (30°C, 24 h) y un segundo repique (30°C, 24 h) al 25% en medio lactosado. Para el inóculo, se centrifugaron 40 mL del segundo repique, se resuspendió en 5 mL de solución fisiológica estéril y se agregó a cada medio. Los cultivos se realizaron por duplicado en frascos de borosilicato de 500 mL tapados con trampa de agua para permitir la salida de gas, agregando 400 mL de medio a cada frasco. Las fermentaciones fueron a 30°C y 24 h sin agitación. Se tomaron muestras cada 8 horas y se midió pH (pH-metro Horiba Laqua twin). La biomasa fue estimada por peso seco (g peso seco/L medio de cultivo) secado en estufa (80°C, 24 h). La concentración de lactosa se evaluó por hidrólisis con la enzima β -galactosidasa (Lactozym 3000 L HP G, Novozymes) y posterior cuantificación de glucosa por técnica enzimática colorimétrica (Wiener lab). La concentración de etanol se determinó por método enzimático UV (Roche Cobas). El análisis estadístico se efectuó por ANOVA y comparación múltiple de medias (test LSD) utilizando el software Statgraphics.

Se observó crecimiento similar de *K. marxianus* (Fig. 1A) para SP, SPD y SP Cal, con valores finales de biomasa entre 2 y 3 g/L, y significativamente menor ($P < 0.05$) para PER. Se observaron (Fig. 1B)

descensos moderados de pH (entre 1.3 y 1.8) en todos los medios, con valores finales 4.7 ± 0.1 , 5.0 ± 0.1 , 4.8 ± 0.1 y 5.4 ± 0.0 para SP, SPD y SP Cal y PER, respectivamente. La cepa de *K. marxianus* utilizada presentó buena fermentación de lactosa (Fig. 1C). En todos los casos, el mayor porcentaje fue consumido en las primeras 16 h, particularmente entre las 8 y 16 h de experiencia. Si bien las concentraciones iniciales de lactosa entre los distintos medios eran diferentes ($P < 0.05$), no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las concentraciones finales (11-13 g/L). El consumo máximo de lactosa se observó en SPD (75% de remoción). El mayor porcentaje de alcohol (75 % o más) se produjo entre las 8 y las 24 h, con pico entre las 8 y las 16 h para SP y PER, y las últimas 8 h para SPD y SP Cal. Los valores finales de etanol fueron similares ($P > 0.05$) para los medios SP, SPD y PER, con concentraciones de 17.0 ± 0.7 , 17.6 ± 0.5 , 16.3 ± 0.2 g/L, respectivamente, mientras que fueron menores ($P < 0.05$) para SP Cal. Se observó un rendimiento muy cercano al 100 % del valor teórico máximo (0.538 g de etanol/g de lactosa consumida) en SP y rendimientos menores en los restantes, posiblemente debido a la remoción parcial de proteínas (SP cal y PER) o sales (SPD). Además, el valor de rendimiento encontrado en SP es superior al informado previamente con lactosuero y otras cepas de *K. marxianus*^{3,2}. En vistas a la obtención de una bebida alcohólica fermentada, los niveles de etanol final resultan satisfactorios en todos los casos. Los resultados obtenidos resultan alentadores en cuanto al uso de la levadura *K. marxianus* para la producción de bebidas alcohólicas fermentadas a partir de las matrices ensayadas, solas o en combinación con jugos de frutas fermentados.

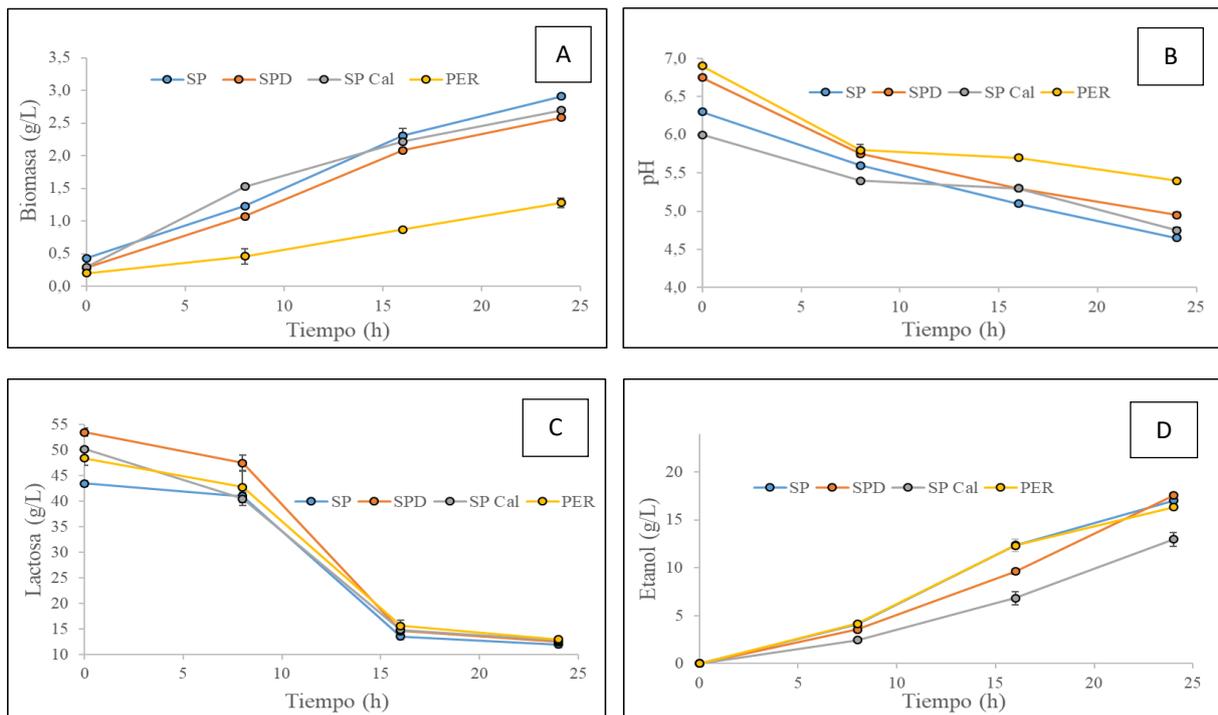


Fig. 1: Biomasa (A), pH (B), concentración de lactosa (C) y etanol (D) en matrices de origen lácteo fermentadas con *Kluyveromyces marxianus*.

Bibliografía

- 1- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 79(3), 339-354.
- 2- Sansonetti, S., Curcio, S., Calabrò, V., & Iorio, G. (2009). Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. *Biomass and bioenergy*, 33(12), 1687-1692.
- 3- Zoppellari, F., & Bardi, L. (2013). Production of bioethanol from effluents of the dairy industry by *Kluyveromyces marxianus*. *New biotechnology*, 30(6), 607-613.