

Análisis del efecto de la concentración de proteínas y la aireación sobre el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* en lactosuero

Eluk, D.; Ceruti, R.J.; Nagel, O.G.; Molina, M.P.; Althaus R.L.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L. Kreder 2805 - (3080).

Esperanza, Santa Fe, Argentina. deluk@fcv.unl.edu.ar

PICT-2012-0455: "Diseño de un sistema sustentable para el tratamiento de leche contaminada con antibióticos"

La industria láctea genera lactosuero como subproducto del proceso de elaboración del queso. El lactosuero presenta un elevado contenido en materia orgánica en forma de lactosa, proteínas y otros compuestos procedentes de la leche. Su vertido incontrolado puede ocasionar problemas de contaminación con un grave impacto ambiental. Sin embargo, la recuperación de algunos componentes del lactosuero permite valorizar este subproducto, encontrando aplicación en la industria alimentaria (productos de panadería, barras deportivas, elaboración de ricota, producción de yogurt, preparación de bebidas lácteas, fabricación de plan libre de gluten), en la obtención de lactosa con fines farmacéuticos, en la producción de proteína de suero y de proteínas microbianas, entre otras. Otra alternativa interesante, consiste en utilizar el lactosuero para la obtención de biomasa mediante la fermentación con levaduras³. Entre las diversas levaduras que pueden utilizarse, se destaca *Kluyveromyces marxianus* debido a que posee buena capacidad para asimilar lactosa⁴. Por todo ello, el objetivo de este trabajo ha sido determinar las mejores condiciones de trabajo (concentración de fuente nitrogenada y nivel de aireación) que permitan optimizar la producción de biomasa con menores valores de lactosa residual.

A tal efecto, en el presente trabajo se utilizó suero de leche libre de antibióticos y desproteinizado mediante tratamiento térmico a 120°C durante 20 minutos seguido de una remoción de las proteínas precipitadas mediante filtración². El medio de cultivo se fortificó con 0.5% m/V de extracto de levadura (Merck Millipore, EEUU) y diferentes concentraciones de peptona caseína (Biokar Diagnostics, Francia) estériles. Cada fermentador se inoculó con 20% m/V de suspensión de *K. marxianus* de modo tal obtener uniformidad en la Densidad Óptica inicial ($DO_0 = 0.210 \pm 0.015$). Empleando un diseño de Doehlert se diagramó la experiencia de manera tal de evaluar la influencia de la concentración de fuente nitrogenada (peptona de caseína) y de la aireación sobre el crecimiento de *K. marxianus* (ver Fig. 1). Cada fermentador se incubó a 42°C durante un tiempo de 24 hs, las agitaciones y el ajuste de pH a 7.5, empleando NaOH 1N, se realizaron con una frecuencia de dos horas. El crecimiento celular se determinó mediante lecturas de las Densidades Ópticas (DO) a 620 nm utilizando un espectrofotómetro Boeco Modelo S-20 Vis & S-22 UV/Vis (Hamburg, Germany). Cada muestra se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min. Luego, los sedimentos se re-suspendieron en igual volumen con solución fisiológica estéril y se midieron las absorbancias. Las lecturas de absorbancias se convirtieron en peso seco (g/L) utilizando una recta de calibración previamente construida con suspensiones crecientes de *K. marxianus*. Para ello, se determinaron en forma simultánea los valores de DO y Biomasa (DO) en estufa a 100°C durante 24 h. El modelo de regresión lineal ($B = 0.0005 + 0.243 \cdot DO$) presentó un adecuado coeficiente de regresión ($R^2 = 0.9842$). La concentración de la lactosa (*L*) se evaluó mediante una técnica enzimática colorimétrica basada en la hidrólisis de lactosa a galactosa y glucosa en presencia de β -galactosidasa (G5160 Sigma-Aldrich, EEUU). La glucosa se determinó por oxidación enzimática con glucosa oxidasa (G6125, Sigma-Aldrich, EEUU), seguida por de la reacción entre el peróxido de hidrógeno formado con peroxidasa (P6782, Sigma-Aldrich, EEUU). El compuesto coloreado se leyó a 505 nm con un espectrofotómetro Boeco Modelo S-20 Vis & S-22 UV/Vis (Hamburg, Germany)¹.

A partir de los datos obtenidos se construyeron gráficas del crecimiento celular y concentración de lactosa remanente para las diferentes concentraciones de proteína y niveles de aireación. En la Fig. 2 se observa un elevado consumo de lactosa (85-90%) acompañado de un incremento celular de *K. marxianus* (3.8-4.0 g/L) para elevados niveles de proteínas (1.66-2.00 % m/V) y oxigenación (1.0-1.5 VVm) (reactores D y E). Mientras que, cuando *K. marxianus* se desarrolla en baja concentración de proteínas (0.5-0.88 % m/V) y bajo nivel de oxigenación (0.5-1.0 VVm) hay un consumo aceptable de lactosa (53-55%) que no se ve acompañado de un crecimiento celular (0.5-0.6 g/L) similar (reactores A y F). A modo de síntesis se puede establecer que la incorporación de 1.66 % m/V de peptona de caseína al lactosuero desproteínizado y una oxigenación de 1.5 VVm resulta adecuada para consumir el 90 % de la lactosa presente en el suero (reactor D). No obstante, determinaciones de etanol y amonio deberían realizarse a fin de evaluar el posible impacto negativo de estos subproductos de la fermentación.

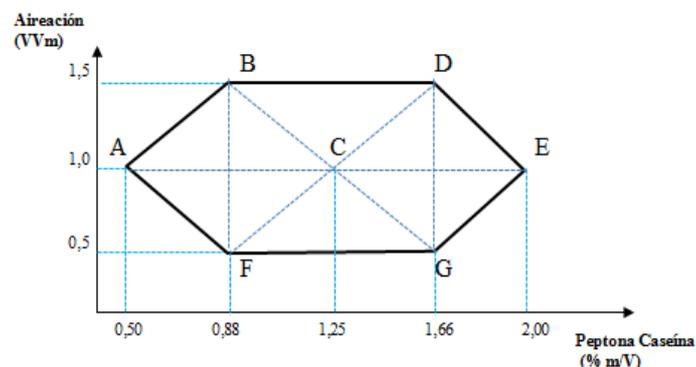


Fig. 1: Diseño en matriz Doehlert empleado para la selección de condiciones de trabajo

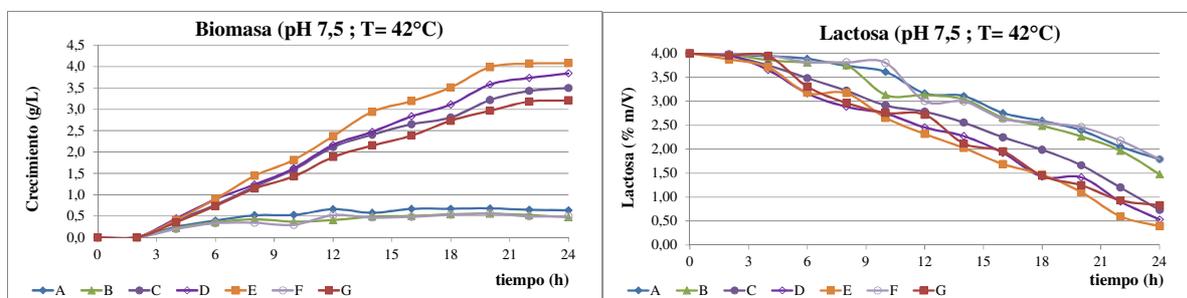


Fig. 2: Curvas de crecimiento de *K. marxianus* y de lactosa residual en función del tiempo.

Bibliografía

- 1- Aktaş N, Boyacı İH, Mutlu M y Tanyolaç A (2006) Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). *Bioresource Technology*, 97(18), 2252-2259.
- 2- Quintero H, Marval MR, Páez G, Ferrer J, Mármol Z y Rincón M (2001) Producción continua de proteína microbiana (*K. fragilis*) a partir de suero de leche. *Revista Científica*, 11(2), 87-94.
- 3- Koutinas, AA; Papapostolou, H; Dimitrellou, D; Kopsahelis, N; Katechaki, E; Bekatorou, A y Bosnea, LA (2009) Whey valorisation: A complete and novel technology development for dairy industry starter culture production. *Bioresource Technology*, 100(15), 3734-3739.
- 4- Tabanelli G, Verardo V, Pasini F, Cavina P, Lanciotti R, Caboni MF, Gardini F y Montanari C (2016) Survival of the functional yeast *Kluyveromyces marxianus* B0399 in fermented milk with added sorbic acid. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 120-129.