

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE β -GALACTOSIDASA PARA LA OBTENCIÓN DE BIOETANOL A PARTIR DE LACTOSUERO

Badino, Matías

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – Universidad Nacional del Litoral

Director/a: Morelli, Matías

Codirector/a: Leonardi, Rodrigo

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Lactosuero, Etanol, β -galactosidasa

INTRODUCCIÓN

Desde el siglo XIX las actividades humanas han sido el principal motivo del cambio climático, debido principalmente a la quema de combustibles fósiles, lo que provoca la emisión de gases de efecto invernadero. La creciente preocupación sobre éste fenómeno ha impulsado a gran parte de la sociedad en la búsqueda de nuevas fuentes sustentables de energía con el fin de satisfacer las necesidades de las generaciones presentes sin comprometer el futuro de las generaciones venideras. Entre estas fuentes de energía se encuentran los biocombustibles, cómo el biodiesel y el bioetanol.

Uno de los principales desafíos que enfrenta la sociedad en torno a esto, es lograr que la producción de biocombustibles no compita significativamente con la producción de alimentos por el uso de tierras cultivables. En lo que a la obtención de bioetanol respecta, numerosas investigaciones se han realizado para sortear dicha problemática, desarrollando técnicas y procesos que permiten eludir el uso de las materias primas más tradicionales para la fermentación alcohólica, como lo son el almidón de maíz o la caña de azúcar, y posibilitar su reemplazo por materiales lignocelulósicos o efluentes de la industria alimentaria como fuentes alternativas de azúcares fermentables (Comelli et al., 2018).

La producción de bioetanol a partir de lactosuero ha cobrado relevancia en los últimos años (Carvalho et al., 2021). El lactosuero es un subproducto líquido de la industria láctea que contiene lactosa y se produce continuamente en grandes volúmenes a nivel mundial, lo que lo convierte en una materia prima de interés para la producción de etanol. A su vez es propicio evitar la disposición de este subproducto en ríos, lagunas y océanos ya que presenta una alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y una alta demanda química de oxígeno (DQO). Sin embargo la especie fermentativa más eficiente y estudiada, *Saccharomyces cerevisiae*, carece del metabolismo necesario para poder metabolizar la lactosa sin ingeniería metabólica adicional (Guimarães et al., 2008), por lo tanto no es capaz de utilizar el lactosuero como fuente de carbono para la fermentación alcohólica. Para superar el desafío que el uso de esta levadura plantea se han propuesto diversas estrategias (Shengping et al., 2017), desde la suplementación del lactosuero con β -galactosidasa comercial (enzima capaz de hidrolizar la lactosa en los azúcares

Título del proyecto: Bioprocesos consolidados “doble propósito”: producción de bioetanol y valorización en origen de residuos agroindustriales

Instrumento: PICT-2020-01170 Serie A-I-A

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: ANPCyT

Director/a: Comelli, Raúl Nicolás



fermentables glucosa y galactosa) hasta el desarrollo de cepas modificadas mediante ingeniería genética.

La suplementación de β -galactosidasa comercial conlleva un costo económico que podría ser trasladado al producto final (etanol) provocando un aumento en su costo, siendo de amplio conocimiento que el precio de las enzimas comerciales es elevado y su disponibilidad no está siempre garantizada. Una alternativa que permite evitar lo anterior, es la producción de un extracto enzimático que posea actividad β -galactosidasa, a partir de una permeabilización (desestabilización de estructuras e incremento de la porosidad de las membranas y de la pared celular) de una suspensión de células de *Kluyveromyces marxianus*.

En este trabajo, se ha realizado un análisis exhaustivo de los factores que influyen en la permeabilización de *Kluyveromyces marxianus* y en la liberación de β -galactosidasa, una enzima crucial para la hidrólisis de lactosa en lactosuero. En estudios futuros, se pretende evaluar cómo los azúcares fermentables resultantes son aprovechados por *S. cerevisiae* para la producción de etanol.

OBJETIVOS

- Optimizar la composición del medio de cultivo y la temperatura para maximizar la actividad enzimática del extracto proveniente de células de *K. marxianus*.
- Analizar el efecto de la concentración de etanol, la temperatura, el pH y el tiempo en el proceso de permeabilización de las células de *K. marxianus*.

METODOLOGÍA

A excepción de casos en que se indique lo contrario, los cultivos se iniciaron con una concentración de inóculo de levadura de 0,9 g/L, y fueron llevados a cabo durante 10 horas en condiciones microaeróbicas y de agitación orbital.

La concentración celular fue determinada por espectrofotometría midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm, utilizando una curva de calibrado de absorbancia a 660 nm vs concentración de biomasa previamente obtenida.

La actividad enzimática de la β -galactosidasa se evaluó midiendo la cantidad de glucosa resultante de la hidrólisis de una concentración conocida de lactosa, a 37 °C durante 30 minutos. La glucosa fue medida mediante un kit de glucemia (Wiener Lab). Una unidad de actividad enzimática (U) refiere a la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de glucosa por minuto.

Los análisis estadísticos fueron efectuados con el software Design-Expert 13.

Caracterización del permeado de suero

Se utilizó un permeado de suero en polvo proveído por una empresa láctea regional. Para la cuantificación de azúcares reductores y α -amino nitrógeno se utilizó HPLC y el “método de la ninhidrina”, respectivamente. La medición de la humedad y de cenizas se realizó mediante estufas colocando cantidades conocidas de permeado a 110 °C por 48 horas y 540 °C por 20 minutos, respectivamente.

Optimización de la producción de un extracto con actividad β -galactosidasa

El efecto de la composición del medio de cultivo y de la temperatura sobre la producción de β -galactosidasa por parte de la levadura fueron evaluadas mediante herramientas de

diseño experimental. Primeramente, se aplicó un diseño factorial completo 2^k que involucró 16 ensayos, para identificar factores significativos. Posteriormente, dicho diseño fue ampliado, involucrando 26 ensayos en total, y transformado en un diseño D-optimal. Los factores tenidos en cuenta fueron: temperatura del cultivo (T) [30-35 °C], concentración de lactosa [20-50 g/L], de extracto de levadura [10-30 g/L] y de sulfato de amonio [0-10 g/L].

La β -galactosidasa es una enzima intracelular, por lo que para efectuar la medición de su actividad es necesario previamente lisar o permeabilizar la célula de forma alguna en la cual no se desnaturalice la enzima. Para ello se recurrió a la disrupción mecánica con bolitas de vidrio, realizada en microtubos sujetos mediante un soporte a un vortex. Se realizaron dos ciclos de 5 min de agitación, intercalados por un minuto de baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento por fricción.

La urea es una fuente de nitrógeno menos costosa que el extracto de levadura, por lo que fue de interés evaluar su reemplazo en el medio de cultivo a optimizar. Para ello se utilizó un diseño de experimentos de tipo D-Optimal considerando como factores a la concentración de extracto de levadura [5 niveles en el rango entre 5-30 g/L] y de úrea [0; 7,5 y 15 g/L]; manteniendo constantes la de lactosa y de sulfato de amonio en 60 g/L y 10 g/L, respectivamente.

Optimización de la permeabilización con etanol

Dado que la ruptura celular con bolitas de vidrio podría no ser viable económicamente a mayores escalas, se ha estudiado la permeabilización de las células de *K. marxianus* con etanol. Se realizó un diseño de experimentos D-optimal, considerando como factores a la concentración de etanol (Et), el pH, la Temperatura (T) y el tiempo (t) de tratamiento, es decir el tiempo de contacto de las células con el etanol. En la **Tabla 1** pueden observarse los niveles de cada factor. Los 24 cultivos celulares para tal fin se han realizado utilizando el medio de cultivo con urea previamente optimizado.

Tabla 1: Factores y Niveles

T	t	Et	pH
30 °C	1 hs	5 %v/v	4
40 °C	3,5 hs	12,5 %v/v	6
50 °C	6 hs	20 %v/v	8

RESULTADOS

El permeado de suero en polvo utilizado está compuesto por 80% m/m de lactosa, 16% m/m de agua, 4% de cenizas y contiene trazas de α -amino nitrógeno.

Estadísticamente, se ha concluido que el medio de cultivo más adecuado para la producción de β -galactosidasa con *K. marxianus* está compuesto por 50 g/L de lactosa; 6,5 g/L de sulfato de amonio y 10 g/L de extracto de levadura, y el cultivo debe efectuarse a 30 °C. En dichas condiciones el modelo generado predice una actividad enzimática de 1,982 U/ml. En la **Figura 1** puede visualizarse la predicción del modelo obtenido, en cuanto al efecto de la concentración de lactosa y la temperatura en la actividad enzimática.

En cuanto al reemplazo del extracto de levadura por úrea en el medio de cultivo, se ha comprobado que es posible disminuir el extracto de levadura hasta una concentración de 5 g/L, incorporando úrea en una concentración de 15 g/L, sin afectar significativamente la actividad enzimática β -galactosidasa. El medio que se seleccionó se compone de 5 g/L de extracto de levadura, 15 g/L de úrea, 10 g/L de sulfato de amonio, y 60 g/L de lactosa. En lo que respecta a la permeabilización con etanol, es posible concluir que el incremento en la concentración de etanol causa un incremento significativo en la actividad β -

galactosidasa del extracto. Se evaluaron concentraciones de etanol menores al 20 % v/v para evitar posibles inhibiciones metabólicas. En la **Figura 2** se representa la predicción del modelo obtenido, en cuanto al efecto del pH y la concentración de etanol en la actividad enzimática obtenida en la permeabilización. Consideramos que para evidenciar los efectos del pH, la T y el tiempo de permeabilización, nuevos estudios deberían ser efectuados. Una vez optimizado este proceso, se avanzará con los estudios del extracto obtenido como plataforma para la producción de etanol utilizando *S. cerevisiae*.

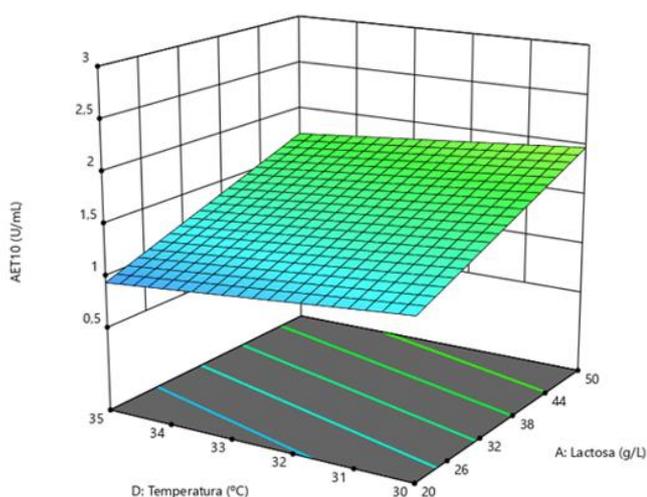


Figura 1: Efecto de la concentración de lactosa y la temperatura en la actividad enzimática

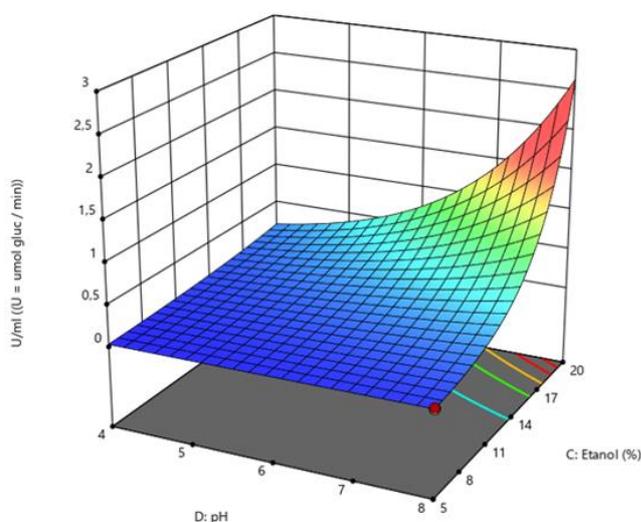


Figura 2: Efecto del Etanol y el pH en la permeabilización

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Carvalho, P., Costa, C., Baptista, S., Domingues, L.** 2021. Yeast cell factories for sustainable whey-to-ethanol valorisation towards a circular economy. *Biofuel Research Journal*, 8(4), 1529-1549.
- Comelli, R., Seluy, L., Benzzo, M., Isla, M.** 2018. Combined Utilization of Agro-Industrial Wastewaters for Non-lignocellulosic Second-Generation Bioethanol Production. *Waste and Biomass Valorization*, 11(1), 265-275.
- Guimarães, P., Teixeira, J., Domingues, L.** 2008. Fermentation of high concentrations of lactose to ethanol by engineered flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 30(11), 1953-1958.
- Shengping, Y., Hongxing Chang, Qingdian Yin, Wei Qi, Mengfan Wang, Rongxin Su, & Zhimin He.** 2017. Utilization of whey powder as substrate for low-cost preparation of B-galactosidase as main product, and ethanol as by-product, by a litre-scale integrated process. *Bioresource Technology*, 245, 1271-1276.