



Encuentro  
de JÓVENES  
INVESTIGADORES

## OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE $\beta$ -GALACTOSIDASA EN PERMEADO DE LACTOSUERO APLICANDO METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

**Duarte, Sofía**

Cátedra de Operaciones y Procesos Biotecnológicos – FCB, UNL

Director: Morelli, Matías

Codirector: Comelli, Raúl

Área: Ciencias Biológicas

Palabras clave:  $\beta$ -galactosidasa, Lactosuero, Optimización

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe una creciente demanda de fuentes de energía renovables y sostenibles, y la producción de bioetanol a partir de desechos agroindustriales se destaca como un campo de investigación relevante. En Argentina, el permeado de lactosuero, un subproducto de la industria láctea con gran impacto ambiental, se presenta como una materia prima ideal para la producción de biocombustibles. No obstante, *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura más utilizada en fermentaciones para la producción de etanol (Albergaria & Arneborg, 2016), no posee la capacidad de asimilar y degradar lactosa, el principal componente del lactosuero. Por lo tanto, se han comenzado a estudiar alternativas para sobreponerse a dicha limitación. Particularmente, *Kluyveromyces marxianus* puede metabolizar lactosa, pero su baja tolerancia a altas concentraciones de etanol puede inhibir su crecimiento (Diniz et al., 2017). Han surgido novedosos avances destinados a emplear la  $\beta$ -galactosidasa intracelular para la generación de biocatalizadores de célula completa (*whole cell biocatalyst*), mediante la permeabilización de la pared celular de la levadura, con el fin de hidrolizar la lactosa presente en el permeado (de Pádua Alves et al., 2022).

En este estudio, proponemos optimizar el medio de cultivo de *K. marxianus* para la producción de  $\beta$ -galactosidasa, enzima necesaria para descomponer la lactosa en azúcares simples, para posteriormente emplear el extracto enzimático en una fermentación empleando *S. cerevisiae*. Para lograr dicho objetivo, se plantea la realización de un diseño de experimentos y la metodología de superficie de respuesta, técnicas comúnmente empleadas para analizar múltiples variables al mismo tiempo y encontrar las condiciones óptimas de cultivo (Ibrahim & Elkhidir, 2011). Este trabajo presenta una propuesta para explorar nuevas posibilidades en la producción sostenible de bioetanol y en el aprovechamiento eficiente de los subproductos agroindustriales.

### OBJETIVO

- Optimizar el medio de cultivo de *Kluyveromyces marxianus* en permeado de lactosuero para maximizar la producción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

### METODOLOGÍA

La influencia de la composición del medio de cultivo de *K. marxianus* sobre la producción de  $\beta$ -galactosidasa se analizó a través de un diseño experimental. Los factores evaluados incluyeron la concentración de lactosa en forma de permeado de lactosuero en polvo (LAC), extracto de levadura (YE), sulfato de amonio (AS) y la temperatura de la fermentación (T), cuyos niveles se exponen en la **Tabla 1**. Inicialmente, se aplicó un diseño factorial completo  $2^k$ , a fin de realizar un screening para determinar los factores

*Título del proyecto:* Desarrollo de bioprocesos para la valorización de subproductos industriales mediante la generación y la aplicación de técnicas quimiométricas y de modelado matemático de procesos.

*Instrumento:* CAI+D

*Organismo financiador:* UNL

*Año convocatoria:* 2020

*Director:* Giordano, Pablo César

influyentes en el sistema. Este diseño inicial se amplió posteriormente mediante la inclusión de puntos estratégicamente ubicados en la región experimental, siguiendo un enfoque de diseño *D-optimal*. En total, el estudio involucró la realización de 26 cultivos.

Los ensayos se llevaron adelante en Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 200 mL de medio. Los cultivos se realizaron en condiciones de microaerofilia en modo batch, y se colocaron en un agitador orbital a 125 rpm, manteniendo una temperatura constante. La concentración inicial de células en cada ensayo fue de 0,9 g/L de levadura, equivalente a  $8 \times 10^7$  UFC/mL. La toma de muestras se realizó luego de 10 horas del inicio del cultivo.

La concentración de células se determinó a través de espectrofotometría, midiendo la densidad óptica a 660 nm. Estos valores se expresaron como gramos de biomasa presente en la solución utilizando una curva de calibrado construida previamente, que vincula la densidad óptica y la concentración de biomasa seca.

La disrupción mecánica de la levadura se efectuó utilizando bolitas de vidrio, siguiendo un protocolo basado en la metodología propuesta por Texeira de Carvalho et al. (2020). Se realizaron dos ciclos de disrupción de 5 minutos en un soporte para microtubos adaptado a un vórtex, intercalados con un baño de hielo. La suspensión obtenida se centrifugó, y el sobrenadante se empleó para la determinación de actividad enzimática.

La actividad de la  $\beta$ -galactosidasa se evaluó por un método espectrofotométrico indirecto, midiendo la cantidad de glucosa producida como resultado de la hidrólisis de una concentración conocida lactosa, empleando el extracto celular. Se realizó la incubación durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo introduciendo los tubos en un baño de agua hirviendo. Se utilizó un kit enzimático (Glicemia enzimática – Wiener Lab) para la determinación de glucosa en la solución final. Una unidad de actividad enzimática (*U*), se define como la cantidad de enzima que libera 1  $\mu$ mol de glucosa por minuto en las condiciones del ensayo.

Para el tratamiento estadístico de los datos, se utilizó el software *R 4.2.1*. El análisis se llevó a cabo con la función *lmer* (librería *lme4*), implementando modelos de regresión lineal mixto de segundo orden, que considera la variabilidad introducida por las distintas etapas de ensayos (*screening* y posterior optimización) en forma de bloques. La selección de los factores estadísticamente significativos se realizó a través de un proceso *stepwise* ( $\alpha = 0,05$ ). Los residuos de los modelos se analizaron para verificar la homocedasticidad y normalidad, a través de la inspección visual del gráfico de residuos frente a los valores predichos y la prueba de Shapiro-Wilks, respectivamente.

## RESULTADOS

Se llevó a cabo la evaluación de la concentración de biomasa de *K. marxianus* obtenida al variar la composición del medio de cultivo. Los factores significativos del modelo generado fueron, en orden descendente de magnitud, la lactosa, el sulfato de amonio y el extracto de levadura (**Tabla 2**).

Se ajustó un modelo lineal mixto de segundo orden para la variable respuesta actividad enzimática total de  $\beta$ -galactosidasa (AET), expresada en *U/mL*. Los factores identificados como significativos fueron la lactosa, el sulfato de amonio, la temperatura, y el término cuadrático  $SA^2$ . La **Ecuación 1** describe el modelo obtenido en términos de los factores codificados, mientras que los estadísticos correspondientes al ANOVA se encuentran en la **Tabla 3**.

**Tabla 1.** Factores y niveles del diseño experimental planteado.

Factor	Nivel -1	Nivel +1
LAC	20 g/L	50 g/L
YE	10 g/L	30 g/L
AS	0 g/L	10 g/L
T	30 °C	35 °C

**Tabla 2.** Coeficientes de regresión codificados estimados por el modelo correspondientes a la variable biomasa, junto con los resultados del ANOVA.

Factor	Estimador	F	p-valor
LAC	1,018	255,9	<0,001
YE	-0,129	4,4	0,049
AS	-0,190	9,6	0,006

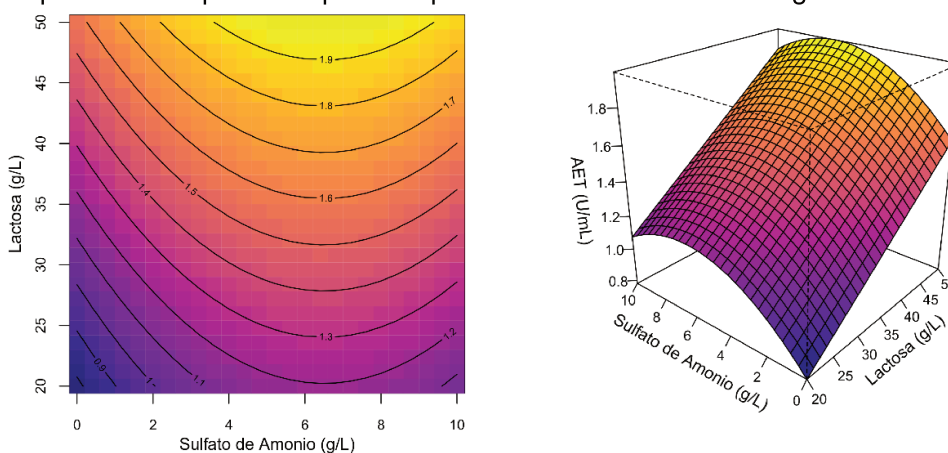
$$AET_{pred}(U/mL) = 1,436 + 0,393LAC + 0,147SA - 0,128T - 0,234 SA^2 \quad (1)$$

El modelo posee un valor del coeficiente de determinación de  $R^2 = 0,959$ , lo cual sugiere una adecuada representación del comportamiento de la actividad enzimática dentro de la región experimental. Por lo tanto, la expresión obtenida permitió la construcción de superficies de respuesta, a fin de comprender la influencia de los componentes en el medio de cultivo.

La **Figura 1** ilustra la variación de actividad enzimática respecto a las concentraciones de lactosa y de sulfato de amonio. Se observa un aumento de la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa a medida que se incrementa la cantidad de lactosa. Sin embargo, para el sulfato de amonio, la actividad enzimática se incrementa hasta un cierto punto, después del cual comienza a disminuir. Este comportamiento puede explicarse por el término cuadrático negativo en el modelo.

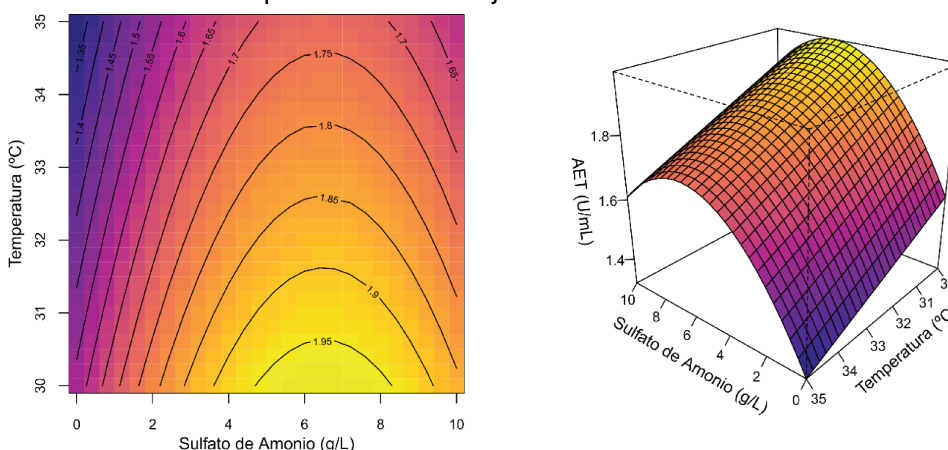
**Tabla 3.** Tabla de ANOVA de los coeficientes de regresión del modelo correspondientes a la variable AET.

Factor	F	p-valor
LAC	123,2	<0,001
AS	18,9	<0,001
T	11,4	0,003
AS <sup>2</sup>	5,9	0,029



**Figura 1.** Diagrama de contorno y superficie de respuesta de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, en función de la concentración de lactosa y sulfato de amonio del medio de cultivo. Los factores restantes se mantienen en un nivel fijo ( $T = 30\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $YE = 30\text{ g/L}$ ).

La **Figura 2**, que representa la actividad enzimática en función de la temperatura y la concentración de sulfato de amonio, revela que se alcanzan mayores niveles de actividad enzimática a temperaturas más bajas.



**Figura 2.** Diagrama de contorno y superficie de respuesta de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, en función de la temperatura y la concentración de sulfato de amonio del medio de cultivo. Los factores restantes se mantienen en un nivel fijo ( $LAC = 50\text{ g/L}$ ,  $YE = 30\text{ g/L}$ ).

Por lo tanto, en base al modelo obtenido, se concluye que las condiciones óptimas de cultivo son 50 g/L de lactosa, 6,5 g/L de sulfato de amonio, 10 g/L de extracto de

levadura y una temperatura de 30 °C. En estas condiciones, se predice una actividad enzimática de 1,98 U/mL.

## CONCLUSIONES

La investigación desarrollada logró la optimización del medio de cultivo de la levadura *Kluyveromyces marxianus* para maximizar la producción de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, empleando la metodología de superficie de respuesta. Es importante señalar que, aunque se han identificado las condiciones óptimas, es esencial corroborar estos resultados experimentalmente en ensayos futuros para confirmar su validez.

En base a las características del permeado de lactosuero, el cual puede presentar concentraciones de lactosa de hasta 150 g/L, y de acuerdo con estimaciones teóricas, se requeriría una actividad enzimática de 1,73 U/mL para lograr la hidrólisis completa del disacárido presente en dicho medio en un periodo de 4 horas. Los resultados obtenidos sugieren que, a partir de las condiciones óptimas identificadas en el trabajo, sería viable la realización de dicho proceso de hidrólisis.

Estos hallazgos representan un avance importante hacia la producción eficiente y sostenible de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales, como el permeado de lactosuero, contribuyendo a disminuir la dependencia de los combustibles fósiles y a reducir el impacto ambiental. A su vez, establecen una sólida base para futuras investigaciones centradas en la utilización de la enzima  $\beta$ -galactosidasa presente en extractos enzimáticos crudos de *K. marxianus*, con el fin de facilitar la hidrólisis de la lactosa presente en el lactosuero, para su posterior fermentación por parte la levadura *S. cerevisiae*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Albergaria, H., & Arneborg, N.** 2016. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(5), 2035-2046. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7255-0>
- de Pádua Alves, É., Bosso, A., Morioka, L. R. I., & Suguimoto, H. H.** 2022. Cell permeabilization of *Kluyveromyces* and *Saccharomyces* species to obtain potential biocatalysts for lactose hydrolysis. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 44, 1-7. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v44i1.60336>
- Diniz, R. H. S., Villada, J. C., Alvim, M. C. T., Vidigal, P. M. P., Vieira, N. M., Lamas-Maceiras, M., Cerdán, M. E., González-Siso, M. I., Lahtvee, P. J., & da Silveira, W. B.** 2017. Transcriptome analysis of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 under ethanol stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(18), 6969-6980. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8432-0>
- Ibrahim, H. M., & Elkhidir, E. E.** 2011. Response Surface Method as an Efficient Tool for Medium Optimisation. *Trends in Applied Sciences Research*, 6(2), 121-129. <https://doi.org/10.3923/tasr.2011.121.129>
- Texeira de Carvalho, C., Dantas de Oliveira Júnior, S., de Brito Lima, W. B., Gonçalves Macêdo de Medeiros, F., Oliveira de Sá Leitão, A. L., dos Santos, E. S., Ribeiro de Macedo, G., & Caninde de Sousa Júnior, F.** 2020. Potential of "coalho" cheese whey as lactose source for  $\beta$ -galactosidase and ethanol co-production by *Kluyveromyces* spp. yeasts. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 50(9), 925-934. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1771731>