

VII JORNADAS DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN – FCV-UNL

RESUMEN EXTENDIDO

OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASAS DE *Kluyveromyces marxianus* EN LACTOSUERO

Eluk D¹, Nagel OG¹, Althaus RL¹

¹ Cátedra de Física, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral.

* Correspondencia: Eluk D. E-mail: deluk@fcv.unl.edu.ar

Editado por: R. Sobrero, V. Matiller, C. Baravalle.

OPTIMIZATION OF THE BIOMASS PRODUCTION OF *Kluyveromyces marxianus* IN WHEY.

SUMMARY.

Whey is a by-product of cheese making and represents a danger of environmental contamination when discarded without prior treatment. However, due to its high content of lactose, vitamins and proteins, whey should not be considered a waste, but rather a raw material for obtaining value-added products. Among the alternatives for its use, biomass production stands out through fermentation with *Kluyveromyces marxianus*. Therefore, this work determines the best operating conditions for biomass production, minimizing residual lactose. To this end, a Doehlert Experimental Matrix Design was used to optimize the effects of aeration and nitrogen source concentration on the growth of *K. marxianus* by a minimum number of experiments. The results obtained allow maximizing the biomass production, the consumption of lactose and protein by *K. marxianus*, thus achieving a more effective treatment of whey prior to its discard.

Palabras clave: lactosuero, biomasa, *Kluyveromyces marxianus*

Keywords: whey, biomass, *Kluyveromyces marxianus*

El lactosuero es el principal subproducto de la industria láctea, y se obtiene como subproducto del proceso de fabricación de quesos (De Jesus et al., 2015). El descarte de lactosuero, sin tratamiento previo, constituye una fuente importante de contaminación ambiental debido a que contiene un 50% de los nutrientes de la leche, tales como vitaminas, sales, lactosa y proteínas (Das et al., 2016). Debido a este alto contenido en nutrientes, este material no debería considerarse como un desecho sino un co-producto de la industria láctea, que puede ser aprovechado para la obtención de productos con valor agregado (Macwan et al., 2016).

Una alternativa interesante es utilizar el lactosuero para la producción de biomasa mediante la fermentación con levaduras, debido a ser económica y fácil de

implementar. Entre las diversas levaduras que se utilizan, destacan aquellas que pertenecen al género *Kluyveromyces*, en particular *Kluyveromyces marxianus*, Van der Walt, 1965 (Saccharomycetales: Saccharomycetaceae), debido a su elevada tasa de crecimiento y capacidad de asimilar lactosa (Löser et al., 2018.).

Sin embargo, diferentes parámetros afectan el crecimiento de *K. marxianus*. Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue determinar las mejores condiciones operativas (concentración de fuente nitrogenada y nivel de aireación) 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). 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 (ver Figura 1).

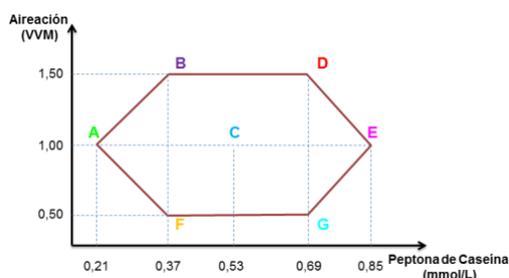


Figura 1: Diseño Doehlert

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 filtración (Eluk et al., 2019). Luego se fortificó con 0,5 g/100 mL de extracto de levadura y diferentes concentraciones de PC estériles, según Figura 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= 0,210 ± 0,015). Cada fermentador se incubó a 42°C durante un tiempo de 24 horas, las agitaciones y ajustes de pH a 7,5 con NaOH 1M 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.DO; R2= 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:

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

dónde: Yijkl= Modelo de Regresión Lineal General; β0: Ordenada al origen; β0, β1, β2, β3, β11, β22, β33, β12, β13, β23: Coeficientes estimados por el modelo; ti: Efecto del tiempo (i=12); VVMj: Efecto del nivel de aireación (j=3); PCk: Efecto de la concentración de proteína (k=5); tii2: Efecto cuadrático del tiempo; VVMj2: Efecto cuadrático del nivel de aireación; PCk2: Efecto cuadrático de la concentración de proteína y εijkl: Error residual del modelo.

En la Tabla 1 se 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 (Raj2) 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. Donde Raj2: 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)

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

A partir de dichas ecuaciones se construyeron gráficas (Figura 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 (Figura 2a), acompañado de disminuciones en los contenidos residuales de lactosa (Figura 2b) y proteína (Figura 2c).

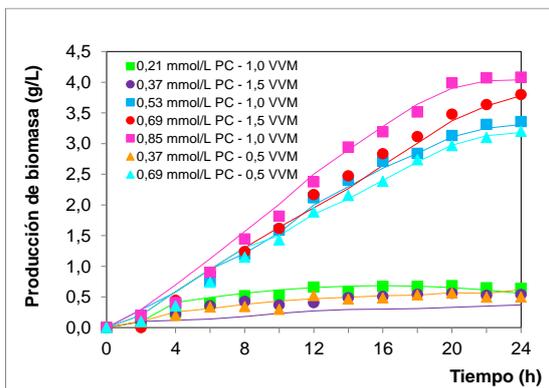


Figura 2a: Efecto del nivel de aireación y la concentración de fuente nitrogenada sobre crecimiento de biomasa en cultivos de *K. marxianus*.

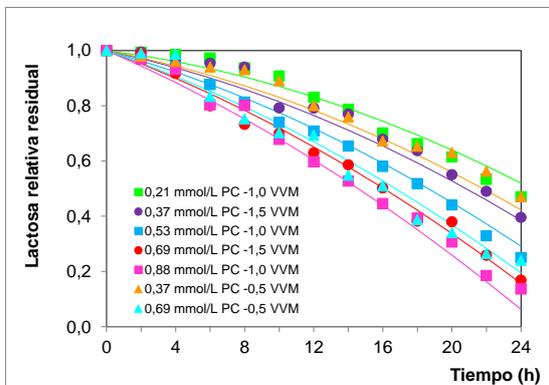


Figura 2b: Efecto del nivel de aireación y la concentración de fuente nitrogenada sobre lactosa residual en cultivos de *K. marxianus*.

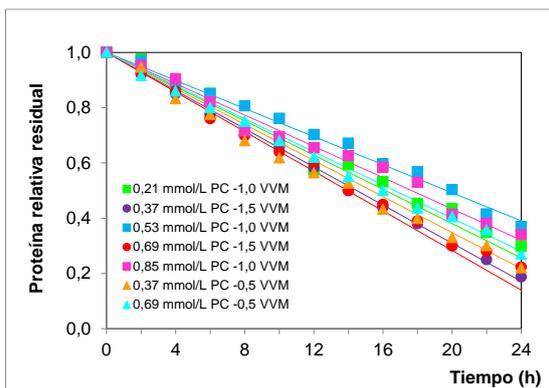


Figura 2c: Efecto del nivel de aireación y la concentración de fuente nitrogenada sobre proteína residual en cultivos de *K. marxianus*.

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.

Como es de esperar, en las figuras se aprecia que cuando las fermentaciones se producen con elevados niveles de proteínas (0,69-0,85 mmol/L) y oxigenación (1,0-1,5 VVM) (reactores D y E), se obtiene un incremento en la producción de biomasa de *K. marxianus* (3,8-4,0 g/L) que trae aparejado bajos valores de lactosa residual (10-15%). Mientras que cuando *K. marxianus* se desarrolla con baja concentración de proteínas (0,21-0,37 mmol/L) y bajo nivel de oxigenación (0,5-1,0 VVM) (reactores A y F), el contenido de la lactosa residual es mayor (45-47%) y la producción de biomasa es baja (0,5-0,6 g/L).

Con la intención optimizar los factores de diseño que permitan maximizar la producción de biomasa y el minimizar el contenido residual de lactosa y proteína, es decir, disminuir los niveles de lactosa y proteína residual se aplicó la función deseabilidad. La mejor deseabilidad (valor óptimo de 0,79) se obtuvo para un tiempo de 24 horas, una aireación de 1,5 VVM y una concentración inicial de PC de 0,85 mmol/L. En estas condiciones, la producción de biomasa fue de 3,8 g/L, la concentración de lactosa residual de 15% y la de proteína residual 21%. En estas condiciones se logra una 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.

Este trabajo fue realizado como parte de los proyectos PICT 455-2012 y PICT 2017-2841 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina (ANPCyT).

Bibliografía

Das B, Sarkar S, Maiti S, Bhattacharjee S. 2016. Studies on production of ethanol from cheese whey using *Kluyveromyces marxianus*. *Mater. Today*. 3: 3253-3257.

De Jesus CSA, Ruth VGE, Daniel SFR, Sharma A. 2015. Biotechnological alternatives for the utilization of dairy industry waste products. *Adv Biosci Biotechnol*. 6: 223-235.

Eluk D, Ceruti R, Nagel O, Althaus R. 2019. Effect of thermal treatment of whey contaminated with antibiotics on the growth of *Kluyveromyces marxianus*. *J. Dairy Res*. 86: 102-107.

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. *Eng. Life Sci*. 18: 459-474.

Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Parmar, S. C., & Aparnathi, K. D. 2016. Whey and its utilization. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 5: 134-155.

Van der Walt JP. 1956. *Kluyveromyces*-a new yeast genus of the Endomycetales. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 22: 265-272.
