

BIOPROCESAMIENTO DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA DEL QUESO

Ermilio, Alejo E.

Grupo de Innovación en Ingeniería de Bioprocesos(GiIB)(FBCB-UNL)

Director: Morelli, Matías N.
Codirector: Heinrich, Miguel J.
Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Lactosuero, Bioprocesamiento, *Kluyveromyces marxianus*

INTRODUCCION

Los productos alimenticios derivados de animales ocupan una gran proporción de la dieta habitual de nuestra sociedad. La producción de estos genera una enorme cantidad de productos secundarios, de forma constante y creciente. El lactosuero es un remanente de la precipitación y eliminación de la caseína de la leche durante la elaboración del queso. Este subproducto representa aproximadamente el 85-95% del volumen de leche. A su vez, retiene el 55% de los nutrientes, por lo que puede aprovecharse como fuente de valiosos productos finales(Pendón et al., 2020). Los sólidos totales del lactosuero están formados principalmente por lactosa, la cual representa un 4,8% m/v, además de 0,9% m/v de proteína, 0,8% m/v de minerales y menos de 0,05% m/v de grasa (Jelen, 1983). En su mayoría el lactosuero es desechado, provocando un enorme impacto ambiental. La demanda bioquímica de oxígeno(DBO) del mismo oscila entre los 30.000-60.000 mg O₂/L (Grba et al., 2002).

El cultivo aeróbico de microorganismos en lactosuero propone una alternativa al problema de la disposición del mismo (Beausejour et al.,1981; Ben-Hassan et al., 1995). Dicho proceso permite reducir en un 90-95% su DBO (Grubb et al.,1993) y a la par, generar biomasa y derivados de valor agregado. La levadura *Kluyveromyces marxianus* ha mostrado un gran potencial para su cultivo en lactosuero debido a su capacidad de degradar lactosa (Rech et al.,1999). Además, posee otras características biotecnológicas deseables para su utilización en procesos fermentativos a nivel industrial, como lo es su tasa de crecimiento extremadamente alta, termotolerancia, una alta capacidad secretora de enzimas y crecimiento en un amplio rango de pH(Fonseca et al.,2008). Este trabajo está orientado a estudiar el crecimiento de *K. marxianus* utilizando como medio de cultivo lactosuero crudo de quesería.

OBJETIVOS

- Estudiar el crecimiento de *K. marxianus* utilizando, como medio de cultivo, lactosuero crudo de quesería.
- Determinar condiciones de cultivo que favorezcan la disminución de la DBO.

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 UNL

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: UNL

Director/a: GIORDANO, Pablo César

METODOLOGÍA

Siguiendo un diseño experimental factorial completo (**Tabla 1**) se realizaron cultivos en lactosuero crudo sin acondicionamiento previo (sin esterilizar), donde se evaluaron diferentes condiciones de pH inicial (4; 7) [acidificado con HCl], temperatura (25° C; 35° C; 45° C) y la influencia de cantidad de inóculo de *K. marxianus* (Sin inóculo [0]; Con inóculo: 5×10^8 UFC/ml [1X] y 1×10^9 UFC/ml [2X]). Cada tratamiento se realizó por duplicado. El cultivo se realizó en erlenmeyers de 500ml (100ml de volumen de trabajo), en un agitador orbital a 130 RPM. Se tomaron muestras a las 12, 16 y 20 hs para para la cuantificación de la biomasa seca y la medición del pH. El resto de los análisis fue realizado a las 16h post-inoculación.

Las variables respuesta analizadas con sus respectivos métodos fueron: pH (pHmetro), biomasa seca (Secado en estufa a 80° C por 48 hs), azúcares reductores (Método de DNS), α -aminoácidos (Método de ninhidrina), proteínas totales (Método de Bradford), lactato (Método enzimático-Wiener lab. Group) y etanol (Utilización de sonda de etanol). Para el procesamiento de los datos obtenidos y diseño de gráficos se utilizó el software estadístico "Infostat" y Microsoft Excel, respectivamente.

Tabla 1. Combinaciones posibles para el diseño experimental factorial completo, sin sus duplicados.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Inóculo	pH inicial
1	25	0	4
2	35	0	4
3	45	0	4
4	25	0	7
5	35	0	7
6	45	0	7
7	25	X1	4
8	35	X1	4
9	45	X1	4
10	25	X1	7
11	35	X1	7
12	45	X1	7
13	25	X2	4
14	35	X2	4
15	45	X2	4
16	25	X2	7
17	35	X2	7
18	45	X2	7

RESULTADOS

La mayor generación de biomasa para los casos en los que se inoculo se dio a 25°C, independientemente de la cantidad inicial de los mismos. Mientras que, entre los tratamientos a 35° C y 45° C no se observaron diferencias significativas (**Gráfico 1**). Se observó que, inoculando el lactosuero con levaduras, sin importar la cantidad del mismo, el pH inicial o la temperatura, la concentración de lactosa se redujo en un 97% en comparación a un 71% del sin inocular (**Gráfico 2**). También, a 35° C, independientemente de la presencia de levaduras o del pH, la concentración de proteínas totales y de α -aminoácidos se redujeron un 45.83% y un 74.3%, respectivamente (**Gráficos 3 y 4**).

La producción de ácido láctico es llevada a cabo por las bacterias ácido lácticas presentes en el propio lactosuero, como las del género *Lactobacillus*. Las mismas producen un marcado descenso del pH. En algunos casos, cuando las condiciones son las adecuadas, *K. marxianus* tiene la capacidad de utilizar el ácido láctico como fuente de carbono, por lo que, su consumo permite que el pH suba nuevamente (**Gráfico 5**). La menor concentración de lactato se dio a pH 4, indistintamente de la presencia de levaduras o la temperatura. A pH 7, la menor concentración se dio en presencia de inóculo, independientemente de la cantidad del mismo. La mayor concentración de lactato se obtuvo para los tratamientos a pH 7, sin inóculo y a 45° C (datos no mostrados). La producción de etanol se debe a la presencia de levaduras fermentativas en el medio, como lo es *K. marxianus*. La cantidad de etanol resulto siempre mayor cuando se trabajó a pH ácido. Independientemente del pH, la menor producción de etanol siempre se obtuvo cuando se trabajó a 35°C. (**Gráfico 6**).

Los mayores rendimientos en biomasa ($Y_{X/S}$) se obtuvieron trabajando a 25° en presencia de inóculo (X1 o X2), tanto a pH 4 como a pH 7. En estas condiciones el rendimiento en biomasa alcanzo los 0.09 ± 0.01 g biomasa seca/ g de lactosa. El tratamiento con menor rendimiento gramos de etanol /gramos de lactosa ($Y_{P/S} = 0.10 \pm 0.02$), fue el realizado a 35° C, con inóculo y a pH inicial 7.

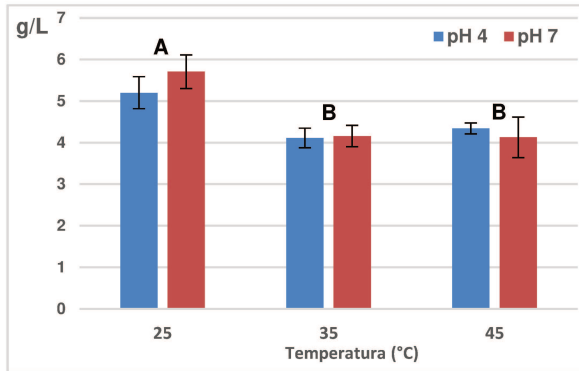


Gráfico 1. Biomasa seca de los cultivos con inóculo a tiempo final (16h), a las diferentes temperaturas y pH iniciales.

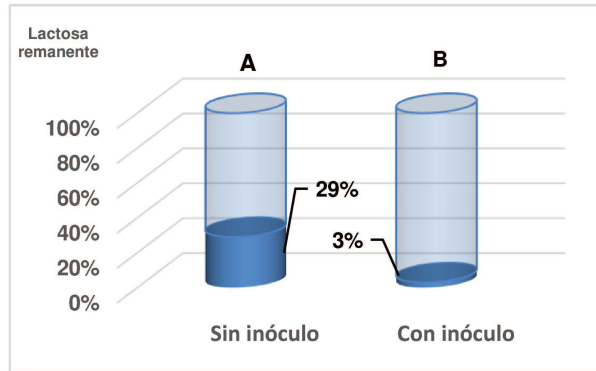


Gráfico 2. Porcentajes de azúcares reductores remanentes en cultivos con y sin inóculo, a tiempo final (16h).

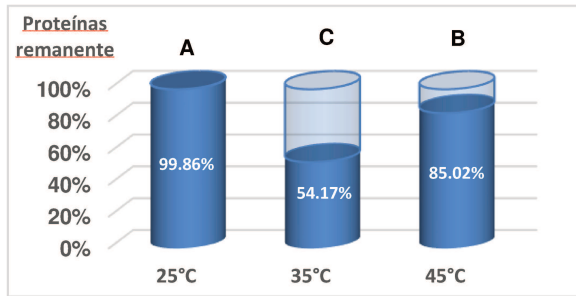


Gráfico 3. Porcentaje de proteínas remanentes a diferentes temperaturas, a tiempo final (16h).

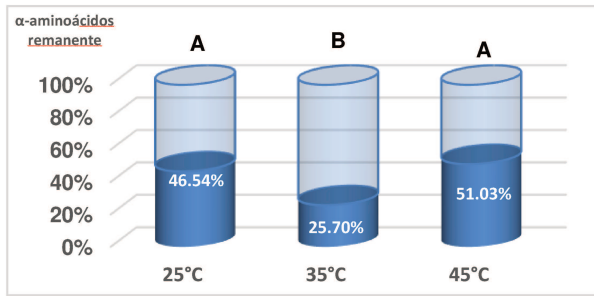


Gráfico 4. Porcentaje de α-aminoácidos remanentes a diferentes temperaturas, a tiempo final (16h).

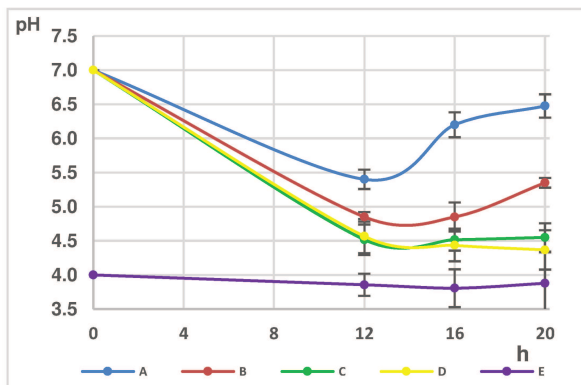


Gráfico 5. Seguimiento del pH a lo largo del tiempo. Cada curva representa una agrupación teniendo en cuenta su pH inicial: (A) Cultivos con inóculo a 35° C, (B) Cultivos con inóculo a 25° C, (C) Cultivos con inóculo a 45° C, (D) Cultivos sin inóculo a todas las temperaturas. (E) Cultivos con y sin inóculo a todas las temperaturas.

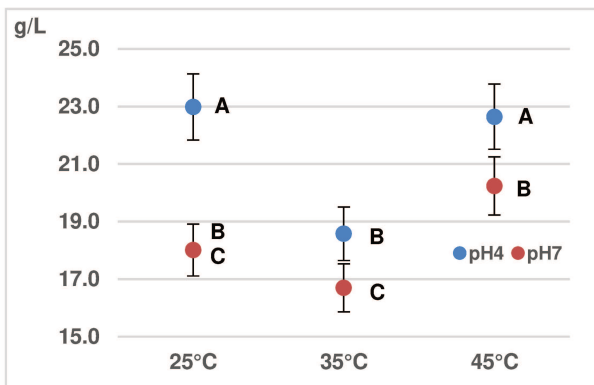


Gráfico 6. Concentración de etanol en cultivos con inóculo a diferentes temperaturas, a tiempo final (16h).

*Comparación de resultados con prueba de Tukey. Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (p-valor > 0.05)

CONCLUSIONES y DISCUSIÓN

Este experimento factorial completo permitió dilucidar el comportamiento de *K. marxianus* en diferentes condiciones de cultivo y reconocer aquellas que permitan su aplicación a una mayor escala. Si bien el mayor rendimiento biomasa seca/ lactosa se logra a 25° C, siguiendo el objetivo principal de lograr reducir la DBO, es conveniente trabajar a 35° C donde posee una mayor actividad metabólica, visualizada en el consumo de los sustratos, como así también la menor producción de etanol. Es necesario realizar más experiencias enfocadas en minimizar la producción de etanol, teniendo en cuenta los requerimientos de oxígeno a lo largo del cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

Beausejour, D., Leduy, A., & Ramalho, R. S. (1981). Batch cultivation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 59(4), 522-526.

Ben-Hassan, R. M., & Ghaly, A. E. (1995). Continuous production of single cell protein from cheese whey lactose using *Kluyveromyces fragilis*. Transactions of the ASAE, 38(4), 1121-1127.

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.

Grba, S., Stehlik-Tomas, V., Stanzer, D., Vahcic, N., & Skrlin, A. (2002). Selection of yeast strain *Kluyveromyces marxianus* for alcohol and biomass production on whey. Chemical and biochemical engineering quarterly, 16(1), 13-16.

Grubb, C. F., & Mawson, A. J. (1993). Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113. Biotechnology letters, 15(6), 621-626.

Jelen, P. (1983). Reprocessing of whey and other dairy wastes for use as food ingredients. Food Technology, 37(2), 81-84.

Pendón, M. D., Madeira, J. V., Romanin, D. E., Rumbo, M., Gombert, A., & Garrote, G. L. (2020). A biorefinery concept for the production of fuel ethanol, probiotic yeast and whey protein from a by-product of the cheese industry. bioRxiv.

Rech, R.; Cassini, C. F.; Secchi, A. and Ayub, M. A. Z. (1999), Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of b -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 23, 91-96.