

EFFECTO DE LA RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA DE *Kluyveromyces marxianus* EN CULTIVOS BATCH

A. Alustiza¹, M. N. Morelli², R. J. Leonardi², A.E. Ermilio²

¹ Grupo de Ingeniería de Bioprocesos (GiiB), Laboratorio de Operaciones y Procesos Biotecnológicos (OPB), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina (alustizaalex@gmail.com)

² Grupo de Ingeniería de Bioprocesos (GiiB), Laboratorio de Operaciones y Procesos Biotecnológicos (OPB), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral (UNL), Santa Fe, Argentina

La producción de biomasa microbiana depende de la disponibilidad relativa de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo. En este trabajo se evaluó el efecto de distintas relaciones C/N sobre el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* mediante el seguimiento de biomasa, azúcares reductores, etanol y pH. Las relaciones C/N 15:1 y 20:1 presentaron los mayores rendimientos y productividades, siendo 15:1 la condición más favorable para la producción de biomasa.

Palabras clave: K. marxianus, relación C/N; producción de biomasa

INTRODUCCIÓN

Las levaduras constituyen uno de los grupos microbianos de mayor relevancia en la biotecnología industrial debido a su capacidad para transformar materias primas renovables en una amplia variedad de productos de interés comercial. Tradicionalmente, especies como *Saccharomyces cerevisiae* han sido ampliamente utilizadas en procesos fermentativos destinados a la producción de alimentos, bebidas, bioetanol y compuestos de valor agregado (Gombert et al., 2016). Sin embargo, la creciente demanda de procesos más eficientes, sostenibles y capaces de aprovechar sustratos alternativos ha impulsado el interés por levaduras no convencionales con características fisiológicas y metabólicas diferenciadas.

En este contexto, *Kluyveromyces marxianus* ha emergido como una de las especies prometedoras para aplicaciones biotecnológicas. Esta levadura presenta una elevada velocidad específica de crecimiento, tolerancia a temperaturas superiores a las requeridas por otras levaduras industriales, metabolismo Crabtree-negativo y una notable versatilidad metabólica que le permite utilizar una amplia gama de fuentes de carbono (Fonseca et al., 2008). Debido a que esta levadura produce la enzima

betagalactosidasa, es posible aprovechar medios provenientes de la industria láctea tales como el permeado y el suero de queso, contribuyendo al desarrollo de procesos alineados con los principios de la bioeconomía y la economía circular (Gombert et al., 2016, Karim et al., 2020)

La capacidad de *K. marxianus* para producir biomasa de manera eficiente sobre sustratos de bajo costo ha despertado un creciente interés en su utilización para la obtención de inoculantes industriales, proteínas unicelulares, enzimas, extractos y otros bioproductos (Karim et al., 2020, Bilal et al., 2022). No obstante, el aprovechamiento de su potencial biotecnológico requiere la optimización de las condiciones de cultivo que gobiernan el crecimiento celular y la conversión de nutrientes en biomasa (Bilal et al., 2022).

Entre los factores nutricionales más relevantes se encuentra la relación carbono/nitrógeno (C/N) del medio de cultivo. Este parámetro ejerce una influencia directa sobre la disponibilidad de nutrientes, la velocidad de crecimiento y la distribución de los flujos metabólicos celulares. Mientras que relaciones C/N elevadas suelen favorecer condiciones de limitación de nitrógeno, relaciones más bajas promueven la síntesis de

componentes celulares asociados al crecimiento y la proliferación microbiana. Por lo tanto, la determinación de una relación C/N adecuada constituye una estrategia fundamental para maximizar la producción de biomasa y mejorar la eficiencia de los bioprocesos.

En este trabajo se evaluó el efecto de diferentes relaciones C/N sobre el crecimiento de *K. marxianus* UP810, utilizando lactosa como fuente de carbono y peptona como fuente de nitrógeno. El objetivo fue identificar las condiciones nutricionales que permitan maximizar la producción de biomasa, valiéndonos de antecedentes del grupo de investigación sobre cultivos a escala laboratorio y piloto de esta misma levadura, utilizando lactosuero industrial o lactosuero reconstituido a partir de lactosuero en polvo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la cepa *K. marxianus* UP810, proveniente del cepario de la Universidad Nacional del Litoral (UNL).

Los cultivos se iniciaron a partir de crioviales conservados a -80°C . El contenido del criotubo fue vertido en un Erlenmeyer de 100 mL conteniendo 20 mL de medio de cultivo, e incubado bajo condiciones de agitación constante a 30°C . Al día siguiente, el cultivo se transfirió a un Erlenmeyer de 500 mL con un volumen de 100 mL en iguales condiciones de agitación y temperatura. Al próximo día, se transfirieron los cultivos a frascos Schott de 2L de volumen total, con agitación mediante buzos magnéticos y aireación con difusores. Durante los 3 días de escalado se utilizó el mismo medio de cultivo, YM modificado con lactosa.

Una vez alcanzada la concentración celular deseada, los cultivos fueron centrifugados para separar la biomasa del medio de cultivo. El pellet celular recuperado se utilizó para la preparación de los inóculos empleados en los cultivos experimentales correspondientes a diferentes relaciones C/N.

Medios de cultivo

Los cultivos se realizaron en un medio formulado tomando como referencia la composición nutricional del lactosuero dulce reportada en bibliografía, considerando el aporte de macro y micronutrientes. La concentración de lactosa se mantuvo constante en todos los tratamientos (50 g/L), utilizándose como única fuente de carbono. La

relación C/N fue modificada mediante variaciones en la concentración de peptona incorporada al medio. Para el cálculo de la relación C/N se consideró exclusivamente el carbono aportado por la lactosa y el nitrógeno aportado por la peptona.

Con el objetivo de aportar vitaminas y factores de crecimiento, se adicionó extracto de levadura a una concentración constante de 3 g/L en todos los tratamientos. La suplementación mineral se ajustó para reproducir la concentración de sales presente en el lactosuero dulce. Para ello, las cantidades de sales añadidas se calcularon como la diferencia entre las concentraciones reportadas para el lactosuero dulce y el aporte mineral proporcionado por el extracto de levadura. La composición final del medio incluyó (g/L): NaH_2PO_4 , 2,43; K_2SO_4 , 1,40; CaCl_2 , 1,09; MgSO_4 , 0,27; y NaCl , 0,95.

Diseño experimental

Se evaluaron cuatro tratamientos manteniendo constante la concentración de lactosa (50 g/L) y variando la concentración de peptona para obtener relaciones C/N de 20:1, 15:1, 10:1 y 5:1 (Tabla 1).

Los cultivos se llevaron a cabo en frascos Schott de 1 L bajo condiciones aeróbicas. La aireación se mantuvo en 1 VVM mediante inyección de aire a través de un difusor de burbuja fina, controlando el caudal mediante un caudalímetro externo. Se adicionó antiespumante cuando fue necesario para controlar la formación de espuma durante el proceso.

La concentración inicial de biomasa fue ajustada a 3,5 g/L, expresada en base seca. Todos los cultivos se incubaron a 30°C .

El crecimiento y desempeño fisiológico de los cultivos fueron monitoreados mediante determinaciones periódicas de densidad óptica a 660 nm, recuento celular en cámara de Neubauer, biomasa seca, concentración de azúcares reductores, etanol y pH.

Las muestras fueron recolectadas cada 1 hora durante las primeras 6 h de cultivo, cada 2 h hasta las 12 h y, finalmente, a las 24 y 48 h de proceso.

La relación C/N óptima se determinó a partir de la comparación de los perfiles de crecimiento y de la producción máxima de biomasa obtenida en cada tratamiento.

Determinaciones analíticas

La concentración de azúcares reductores fue cuantificada mediante el método colorimétrico del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). El reactivo DNS se preparó con ácido dinitrosalicílico al 1% (p/v) y NaOH al 1% (p/v) en agua destilada. Para la cuantificación se construyó una curva de calibración utilizando lactosa como estándar, y la medida de absorbancia fue realizada a 540 nm.

La concentración de etanol se determinó utilizando un sistema basado en un sensor de SnO₂ (TGS Figaro 2620; Figaro Engineering Inc., Osaka, Japan), el cual otorga una lectura de voltaje a través de un multímetro. Las muestras fueron previamente diluidas según fuera necesario y acondicionadas a 30 °C durante 10 min antes de la lectura. La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración preparada a partir de una solución patrón de etanol. Las concentraciones de etanol de las muestras se determinaron por interpolación en la curva de calibración correspondiente.

horas de proceso, caracterizado por un rápido consumo de azúcares y acompañado de una elevada producción de etanol. Sin embargo, diferencias relevantes comenzaron a manifestarse en las etapas posteriores del cultivo, particularmente en la acumulación de biomasa.

La concentración inicial de azúcares fue cercana a 50 g/L en todos los tratamientos y disminuyó rápidamente durante las primeras horas de cultivo (Figura 1B). A las 4 h, las concentraciones remanentes oscilaron entre 14 y 27 g/L, mientras que a las 8 h no se detectaron azúcares residuales en ninguna de las condiciones evaluadas. Este comportamiento indica que el agotamiento de la fuente principal de carbono ocurrió en un intervalo temporal similar independientemente de la relación C/N empleada.

En paralelo al consumo de azúcares, la concentración de etanol aumentó rápidamente en todos los tratamientos (Figura 1C), alcanzando valores máximos entre las 6 y 8 h de cultivo. Las concentraciones máximas registradas fueron de

Tabla 1. Descripción resumida de cada tratamiento.

Tratamiento	Lactosa (g/L)	Peptona (g/L)	Extracto de levadura (g/L)	Relación C/N
T1	50	5,1	3	20:1
T2	50	7,3	3	15:1
T3	50	11,7	3	10:1
T4	50	24,8	3	5:1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La relación carbono/nitrógeno (C/N) es uno de los factores más importantes en la regulación del metabolismo microbiano, ya que determina la disponibilidad relativa de los principales elementos requeridos para la síntesis de biomasa y la producción de metabolitos. En el presente estudio, las diferentes relaciones C/N evaluadas produjeron respuestas fisiológicas diferenciadas en términos de acumulación de biomasa, a pesar de presentar patrones similares de consumo de azúcares y producción inicial de etanol.

La evolución temporal de la biomasa, los azúcares reductores, el etanol y el pH para las diferentes relaciones C/N evaluadas se presenta en la Figura 1. En términos generales, todos los cultivos mostraron un comportamiento similar durante las primeras

aproximadamente 21; 21; 20 y 17 g/L para las relaciones C/N 20:1, 15:1, 10:1 y 5:1, respectivamente.

Aunque *K. marxianus* es considerada una levadura Crabtree negativa, la producción temprana de etanol desde el inicio del cultivo batch indica que, bajo las condiciones ensayadas, la cepa no sostuvo un metabolismo estrictamente respiratorio. Esta respuesta fue semejante a la observada en levaduras Crabtree positivas, donde altas concentraciones de azúcares fermentables pueden inducir la formación de etanol aun en condiciones aerobias. En este caso, la aparición temprana de etanol, incluso bajo aireación forzada, podría explicarse por una limitación en la disponibilidad efectiva de oxígeno durante las primeras etapas del proceso, asociada a

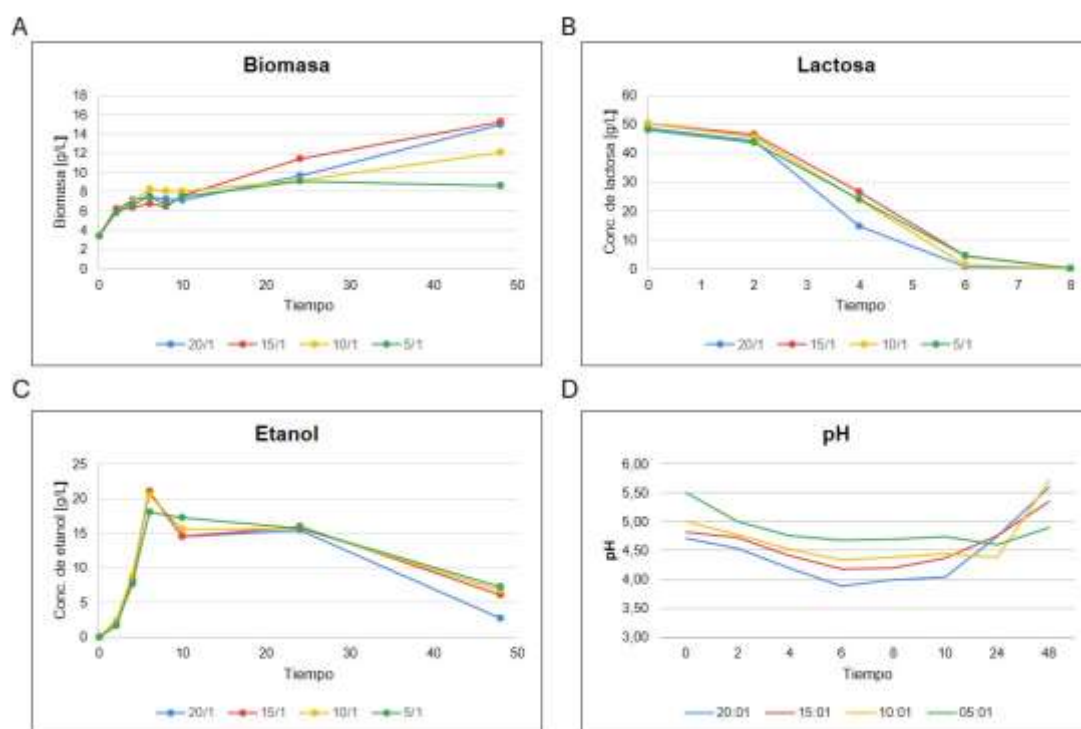


Figura 1. Evolución de la concentración de: biomasa seca (A), lactosa (B), etanol (C) y pH (D) durante el cultivo de la levadura bajo diferentes relaciones carbono/nitrógeno (C/N). Las concentraciones se expresan en g/L y se determinaron a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 y 48 h de fermentación.

la elevada demanda respiratoria generada por la concentración inicial de biomasa. En consecuencia, la transferencia de oxígeno habría limitado parcialmente el crecimiento respiratorio y favorecido el desvío del metabolismo hacia la fermentación alcohólica.

Dado que el consumo de lactosa fue prácticamente completo en todas las condiciones dentro del mismo intervalo temporal, las diferencias observadas en la producción final de biomasa no pueden atribuirse a una mayor disponibilidad de carbono, sino a diferencias en la eficiencia de utilización de los nutrientes y en la distribución del metabolismo celular.

Durante una primera etapa (0–10 h), el incremento de biomasa fue relativamente moderado en todas las condiciones (Figura 1A), alcanzándose concentraciones comprendidas entre 7 y 8 g/L. Los valores de velocidad específica de crecimiento calculados para este periodo (μ_{x1}) fueron mayores para las relaciones 10:1 y 5:1, con valores de 0,085 y 0,078 h^{-1} , respectivamente, mientras que las relaciones 20:1 y 15:1 presentaron valores ligeramente inferiores (Tabla 2). Estos resultados indican que las diferencias finales observadas entre

tratamientos no se originaron durante la etapa fermentativa inicial.

Una vez agotados los azúcares, el comportamiento de los cultivos comenzó a divergir significativamente. A partir de las 10 h se observó una disminución progresiva de la concentración de etanol acompañada por un incremento sostenido de la biomasa, especialmente en las relaciones C/N 15:1 y 20:1. Este fenómeno sugiere una transición metabólica hacia una segunda etapa de crecimiento, en la cual el etanol acumulado previamente podría ser utilizado como fuente de carbono y energía para sostener la síntesis celular. La evidencia de esta segunda etapa puede observarse en los incrementos de biomasa registrados entre las 10 y las 48 h. Mientras que la relación 15:1 presentó un incremento de biomasa de cerca de 9 g/L y la relación 20:1 de 8 g/L, las condiciones 10:1 y 5:1 mostraron incrementos significativamente menores, de aproximadamente 4 y 1 g/L, respectivamente. De manera consistente, las velocidades específicas de crecimiento correspondientes a esta etapa (μ_{x2}) fueron mayores para las relaciones 15:1 (0,025 h^{-1}) y 20:1 (0,020 h^{-1}), superando ampliamente a los valores de las relaciones 10:1 y 5:1 (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros cinéticos y de producción de biomasa obtenidos para las diferentes relaciones C/N evaluadas. La etapa 1 corresponde al período de consumo de azúcares y acumulación de etanol (0–10 h), mientras que la etapa 2 corresponde al período posterior al agotamiento del sustrato principal (10–48 h).

Relación C/N	$X_{\text{máx}}$ (g/L)	ΔX total (g/L)	$Y_{x/s}$ (g/g)	μ_{x1} (h ⁻¹)	μ_{x2} (h ⁻¹)	P_x total (g/L·h)
20:1	14,99	11,58	0,23	0,074	0,020	0,24
15:1	15,25	11,84	0,24	0,056	0,025	0,24
10:1	12,08	8,67	0,17	0,085	0,011	0,18
5:1	8,61	5,20	0,10	0,078	0,004	0,10

$X_{\text{máx}}$: concentración máxima de biomasa alcanzada durante el cultivo; **ΔX total:** incremento total de biomasa respecto de la concentración inicial; **$Y_{x/s}$:** rendimiento biomasa/sustrato calculado como gramos de biomasa producida por gramo de azúcar consumido; **μ_{x1} :** velocidad específica de crecimiento promedio durante la etapa 1 (0–10 h); **μ_{x2} :** velocidad específica de crecimiento promedio durante la etapa 2 (10–48 h); **P_x total:** productividad global de biomasa calculada a las 48 h.

Como consecuencia de este comportamiento diferencial, las mayores concentraciones finales de biomasa se obtuvieron en las relaciones C/N de 15:1 y 20:1, alcanzando valores cercanos a 15 g/L. Por el contrario, las relaciones 10:1 y 5:1 alcanzaron concentraciones finales de aproximadamente 12 y 9 g/L, respectivamente.

Los mayores rendimientos biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$) fueron obtenidos para las relaciones 15:1 (0,24 g/g) y 20:1 (0,23 g/g), mientras que la condición 5:1 presentó el menor valor (0,10 g/g). Del mismo modo, las productividades globales de biomasa fueron superiores para las relaciones 15:1 y 20:1, con un valor de 0,24 g/L·h. La condición 5:1 mostró el peor desempeño global, alcanzando aproximadamente la mitad de la biomasa obtenida con las relaciones 15:1 y 20:1. Este comportamiento se evidencia en los menores valores de rendimiento y productividad, indicando que una reducción excesiva de la relación C/N afecta negativamente la acumulación celular.

La evolución del pH acompañó los cambios metabólicos observados durante el cultivo (Figura 1D). En todos los tratamientos se registró una disminución inicial durante las primeras horas, alcanzándose los valores mínimos entre las 6 y 8 h. Posteriormente, el pH aumentó gradualmente hasta alcanzar valores finales comprendidos entre 4,9 y 5,7. Esta recuperación coincidió temporalmente con la disminución de la concentración de etanol y el incremento de biomasa observado durante la segunda etapa de crecimiento, reforzando la

hipótesis de un cambio fisiológico luego del agotamiento de los azúcares.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la relación C/N tuvo una influencia significativa sobre la acumulación final de biomasa. Aunque todas las condiciones presentaron patrones similares de consumo de azúcares y producción inicial de etanol, las diferencias observadas durante la etapa posterior al agotamiento del sustrato determinaron el desempeño global del cultivo. Bajo las condiciones estudiadas, las relaciones C/N de 15:1 y 20:1 constituyeron las alternativas más favorables para la producción de biomasa, combinando mayores concentraciones celulares finales, mejores rendimientos de conversión del sustrato y mayores productividades.

Sin embargo, si bien las relaciones C/N de 15:1 y 20:1 presentaron los mejores desempeños dentro de las condiciones evaluadas, los rendimientos de biomasa-sustrato $Y_{x/s}$ obtenidos resultaron inferiores a los obtenidos previamente por el grupo de investigación para este mismo microorganismo bajo condiciones de cultivo comparables. Una posible explicación de esta diferencia podría estar asociada a limitaciones en la transferencia de oxígeno durante el proceso, ya que la aireación se realizó mediante difusores de burbuja fina acoplados a bombas de baja potencia.

Considerando que el crecimiento celular y la posterior asimilación del etanol dependen de una adecuada disponibilidad de oxígeno, es posible que restricciones en la aireación hayan afectado el desempeño global de los cultivos. En futuros

estudios se prevé optimizar el sistema de suministro de aire con el objetivo de mejorar las condiciones de transferencia de oxígeno y evaluar su impacto sobre la producción de biomasa

CONCLUSIÓN

La relación carbono/nitrógeno influyó significativamente en la producción de biomasa de la levadura evaluada. Si bien todas las condiciones presentaron un rápido consumo de lactosa y una fase fermentativa inicial caracterizada por la producción de etanol, las diferencias en la acumulación final de biomasa se manifestaron principalmente durante la etapa posterior al agotamiento del sustrato. Las relaciones C/N de 15:1 y 20:1 mostraron el mejor desempeño, alcanzando las mayores concentraciones celulares, rendimientos biomasa/sustrato y productividades. En las condiciones ensayadas, la relación C/N 15:1 se identificó como la alternativa más favorable para la producción de biomasa, constituyendo una base para futuras optimizaciones del proceso.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Nacional del Litoral (UNL) y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) por brindar el espacio, la infraestructura y los recursos necesarios para la realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

- BILAL, M.; JI, L.; XU, Y.; XU, S.; LIN, Y.; IQBAL, H. M. N.; CHENG, H. Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a Robust Host for Industrial Biotechnology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 10, p. 851768, 2022. DOI: 10.3389/fbioe.2022.851768
- FONSECA, G. G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A. K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 79, p. 339-354, 2008. DOI: 10.1007/s00253-008-1458-6.
- GOMBERT, A. K.; MADEIRA JR., J. V.; CERDÁN, M.-E.; GONZÁLEZ-SISO, M.-I. *Kluyveromyces marxianus* as a host for heterologous protein synthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, p. 6193-6208, 2016. DOI: 10.1007/s00253-016-7645-y.
- KARIM, A.; GERLIANI, N.; AÍDER, M. *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, v. 333, p. 108818, 2020. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818.