

GENERACIÓN DE EXTRACTOS DE *Kluyveromyces marxianus* MEDIANTE HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA: EFECTO DE DIFERENTES ESTRATEGIAS ENZIMÁTICAS Y CONDICIONES OPERATIVAS.

H. Basso¹, D. Battaggi², M.N. Morelli², R.J. Leonardi², A. Ermilio²

¹Grupo 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
(homerobasso@hotmail.com).

²Grupo 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.

Los extractos de levadura son una fuente de compuestos nitrogenados de interés biotecnológico. En este trabajo se evaluó el efecto de distintas enzimas y condiciones operativas sobre la obtención de extractos a partir de biomasa de *K. marxianus*. La eficiencia del proceso se determinó mediante nitrógeno alfa-amino libre (FAN). Los resultados mostraron que la proteasa neutra comercial fue la más efectiva y que la accesibilidad del sustrato y la carga de biomasa influyeron en la producción de FAN.

Palabras clave: Hidrólisis enzimática, Extractos, *Kluyveromyces marxianus*

INTRODUCCIÓN

Los extractos de levadura constituyen productos de amplio interés biotecnológico debido a su elevado contenido de aminoácidos, péptidos, vitaminas y otros compuestos solubles con valor nutricional y funcional. Estos extractos son utilizados en diversas aplicaciones industriales, incluyendo la formulación de medios de cultivo microbiológicos, suplementos nutricionales, ingredientes para la industria alimentaria y fuentes de nutrientes para procesos fermentativos (Leonardi et al., 2025).

Entre sus aplicaciones más relevantes se destaca su utilización como fuente de nitrógeno orgánico en medios de cultivo. La presencia de aminoácidos libres, péptidos de bajo peso molecular y otros compuestos nitrogenados favorece el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, permitiendo reemplazar o complementar fuentes comerciales de nitrógeno de mayor costo. En consecuencia, el desarrollo de procesos eficientes para la obtención de extractos de levadura representa una alternativa de interés para la producción de insumos biotecnológicos de bajo costo.

La levadura *Kluyveromyces marxianus* ha despertado un creciente interés industrial debido a su rápida

velocidad de crecimiento, capacidad para utilizar diversas fuentes de carbono y potencial para ser cultivada sobre corrientes residuales de la industria agroalimentaria. Estas características la convierten en una fuente atractiva de biomasa para la obtención de extractos ricos en compuestos nitrogenados (Karim et al., 2020).

La producción de extractos de levadura generalmente involucra procesos de autólisis o hidrólisis enzimática destinados a promover la ruptura de las estructuras celulares y la liberación de componentes intracelulares. Entre estas estrategias, la hidrólisis enzimática presenta ventajas asociadas a una mayor selectividad del proceso y a la posibilidad de controlar las condiciones de operación mediante la utilización de diferentes actividades enzimáticas (Tao et al., 2023).

Sin embargo, la eficiencia de la hidrólisis depende de diversos factores, incluyendo el tipo de enzima utilizada, las condiciones de pH y temperatura. En particular, la pared celular de las levaduras constituye una barrera estructural que puede limitar el acceso de las enzimas a los componentes intracelulares, reduciendo la liberación de nitrógeno alfa-amino libre (FAN) y otros compuestos de interés. Por este motivo, la aplicación de estrategias de hidrólisis de precisión

resulta fundamental para optimizar la ruptura celular y maximizar la recuperación de dichos compuestos; (Deng et al., 2026).

En este contexto, el presente trabajo evaluó el efecto de distintas estrategias enzimáticas sobre la generación de extractos de *K. marxianus*. Se estudiaron diferentes actividades enzimáticas y condiciones operativas con el objetivo de determinar su influencia sobre la liberación de FAN y analizar el papel de la accesibilidad del sustrato durante el proceso de hidrólisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Biomasa de levadura

Se trabajó con la cepa *K. marxianus* UP810, perteneciente al cepario de la Universidad Nacional del Litoral. El inóculo se preparó mediante escalados sucesivos a partir de un criotubo conservado a -80 °C. La reactivación inicial se realizó en Erlenmeyers de 100 mL con 20 mL de medio de cultivo, seguida de un escalado a Erlenmeyers de 1 L con 200 mL de medio y, finalmente, a frascos Schott de 2 L con aireación mediante difusor de burbuja fina a 1 vvm. Cada etapa tuvo una duración de 24 h.

El medio utilizado estuvo compuesto por 20 g/L de lactosa y 10 g/L de extracto de levadura. Las etapas en Erlenmeyer se incubaron en agitador orbital termostatzado, mientras que los cultivos en frascos Schott se realizaron a 30 °C en estufa con agitación magnética. Cuando fue necesario, se adicionó antiespumante para controlar la formación de espuma. La biomasa fue recuperada por centrifugación y utilizada en su estado húmedo como en polvo luego de su secado y molienda.

La biomasa cosechada fue caracterizada mediante la determinación de humedad por método gravimétrico, a partir del secado de una alícuota en estufa hasta peso constante.

Ensayos de hidrólisis enzimática

Las hidrólisis se realizaron en tubos Hach por duplicado utilizando un volumen final de reacción de 8 mL. Los ensayos fueron incubados en condiciones controladas de temperatura mediante estufa o cámara de cultivo con agitación orbital a 150 rpm durante períodos de hasta 96 h, dependiendo del diseño experimental.

Una vez finalizado el tiempo de reacción, el sistema se inactivó térmicamente a 80°C por 10 min y se centrifugó a 15000 rpm durante 5 min.

Posteriormente, se recolectó la fracción sobrenadante para la determinación de nitrógeno alfa-amino libre (FAN).

Evaluación de diferentes actividades enzimáticas

En una primera etapa se evaluó la capacidad de distintas enzimas comerciales para promover la liberación de nitrógeno alfa-amino libre (FAN) a partir de biomasa de *K. marxianus*.

Se evaluaron distintas proteasas de uso industrial, clasificadas como ácida, neutra y alcalina, comercializadas por un proveedor nacional (Química Ecológica, Buenos Aires, Argentina) y en concentraciones de 0.5% p/v respecto al mezclado. Estas proteasas se ensayaron en los pH 4.5, 7 y 9.5, junto a temperaturas de 45 y 55°C con el objetivo de identificar las condiciones más favorables para la liberación de FAN. Los controles de cada tratamiento se realizaron a partir de la autólisis de la propia levadura sin el agregado de enzimas.

Los resultados se utilizaron para elegir las estrategias más prometedoras para incrementar la liberación de FAN en los ensayos posteriores.

Evaluación de condiciones operativas de hidrólisis

Se buscaron estrategias para poder mejorar la accesibilidad de las proteasas a las proteínas intracelulares. Por este motivo se realizó un ensayo en donde se agregaron enzimas y agentes desestabilizantes de membrana previo al hidrolizado con proteasas.

Se compararon diferentes actividades hidrolíticas aplicadas, entre estas, se incluyeron: proteasa neutra (P), 0.5% p/v de lipasa (LP), 0.5% p/v de β -glucanasa (β) y combinaciones de estas actividades. Además, se evaluó el efecto de agentes auxiliares capaces de desestabilizar la pared y membrana celular como Tween 80 (TW) y etanol (Et) en concentraciones de 0.5 % v/v cada una. Luego de 48 h de incubación se agregó 0.5% p/v de proteasa neutra (P) a todos los tratamientos que no tuvieran proteasa desde el inicio.

Aquellos tratamientos sin proteasa inicial no tuvieron mejores resultados en comparación a los tratamientos que sí tenían. Por este motivo se decidió seguir solo con la proteasa neutra para ensayos posteriores sin el agregado de enzimas y agentes auxiliares.

Evaluación de accesibilidad del sustrato y carga de biomasa

En una tercera etapa se investigó la influencia de la accesibilidad del sustrato sobre la generación de extractos de levadura, así como determinar si era posible incrementar la cantidad de biomasa procesada sin afectar la eficiencia de hidrólisis.

Para ello se compararon tratamientos utilizando biomasa húmeda y biomasa seca que fue molida tras secado en mufla por 24 h, así como diferentes cargas de biomasa incorporadas al sistema. Adicionalmente, se incluyó un tratamiento utilizando biomasa de *Saccharomyces* sp. en forma de polvo como referencia comparativa.

Los tratamientos con biomasa húmeda incluyeron concentraciones equivalentes al 50% m/v, mientras que los tratamientos con biomasa seca fueron cargas comprendidas entre 10 y 30% m/v. Durante la incubación se observó que los tratamientos con mayores cargas de biomasa seca desarrollaban una consistencia cada vez más viscosa, llegando en algunos casos a adquirir una apariencia semisólida. Esta situación dificultó considerablemente el mezclado y la homogeneización de las muestras.

Determinación de nitrógeno alfa-amino libre (FAN)

La eficiencia de hidrólisis fue evaluada mediante la cuantificación de nitrógeno alfa-amino libre (FAN) siguiendo la metodología descrita por West (1977). Esta metodología se basa en la liberación de aminoácidos y péptidos de bajo peso molecular durante el proceso de hidrólisis para formar, junto con el reactivo ninhidrina, un complejo púrpura para su posterior cuantificación espectrofotométrica a 570 nm. La cuantificación se realizó mediante una curva de calibración construida con glicina como patrón de referencia utilizando un espectrofotómetro VIS BOECO S-20.

Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada réplica experimental y los resultados de la misma fueron expresados como nitrógeno alfa-amino libre (FAN) específico (mg FAN/g de levadura). Estos datos ajustados por el porcentaje de sólidos fueron luego comparados con la cantidad de nitrógeno teórica de *K. marxianus* reportada en Löser et al. (2015) que ronda los 80-83 mg de nitrógeno por gramo de biomasa seca de levadura en condiciones de crecimiento con suficiente nitrógeno disponible.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividades hidrolíticas enzimáticas

La comparación entre las distintas actividades proteolíticas evaluadas mostró que las proteasas de uso industrial neutras y alcalinas produjeron mayores niveles de FAN específico con respecto al control de autólisis sin enzima y a los tratamientos con proteasa ácida como se puede observar en la Figura 1. Mientras que la proteasa ácida alcanzó valores cercanos a 18,6 mg FAN/g de levadura, las proteasas neutras y alcalinas superaron los 25 mg FAN/g de levadura bajo las condiciones más favorables.

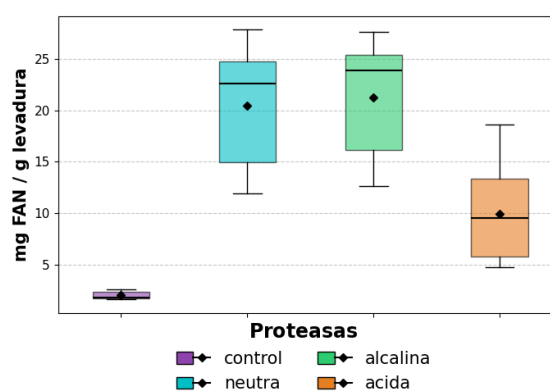


Figura 1. Efecto de las diferentes proteasas industriales sobre los hidrolizados.

Aunque no se observaron diferencias significativas entre la proteasa neutra y la alcalina, se optó por emplear la proteasa neutra en los ensayos posteriores de hidrólisis.

Determinación de mejores condiciones enzimáticas

Tanto el pH como la temperatura fueron evaluados como influencia en la generación de FAN específico para los ensayos con estas proteasas (Figura 2). El pH fue el único factor que presentó un efecto realmente significativo, observándose los mayores rendimientos en el rango comprendido entre 7 y 9.5, mientras que las condiciones ácidas con pH 4.5 resultaron menos favorables para la liberación de compuestos nitrogenados. Si bien a 55 °C se observaron, en general, valores de FAN específico ligeramente superiores a los obtenidos a 45 °C, estas diferencias no fueron significativas.

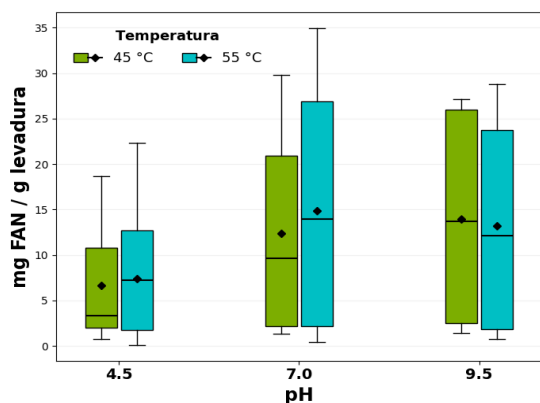


Figura 2. Efecto del pH y la temperatura sobre los hidrolizados.

Los máximos rendimientos se obtuvieron a pH 7 con temperatura de incubación a 55 °C y pH 7 con temperatura de incubación de 45°C, donde se alcanzaron valores de 34.94 y 29.82 mg FAN/g de levadura, respectivamente.

Desestabilización de membrana previa al hidrolizado

Los resultados de la Figura 3 mostraron que las combinaciones que incluyeron proteasa neutra (P) al inicio fueron las que alcanzaron los mayores niveles de FAN específico. En particular, la combinación de proteasa neutra al inicio y etanol (Et) presentó el valor más elevado, alcanzando 28,33 mg FAN/g de levadura, y superando a la mayoría de los tratamientos que incorporaron β -glucanasa (β), lipasa (LP) o Tween 80 (TW). Si bien algunas de estas combinaciones produjeron incrementos en la cantidad absoluta de FAN liberado, la normalización de los resultados respecto de la biomasa utilizada evidenció que dichos aumentos no se tradujeron necesariamente en una mayor eficiencia de hidrólisis. En conjunto, estos resultados indican que la actividad proteolítica de las proteasas fue el principal factor responsable de la liberación de compuestos nitrogenados, mientras que la incorporación de enzimas complementarias o agentes tensioactivos aportó beneficios limitados en términos de rendimiento específico del proceso.

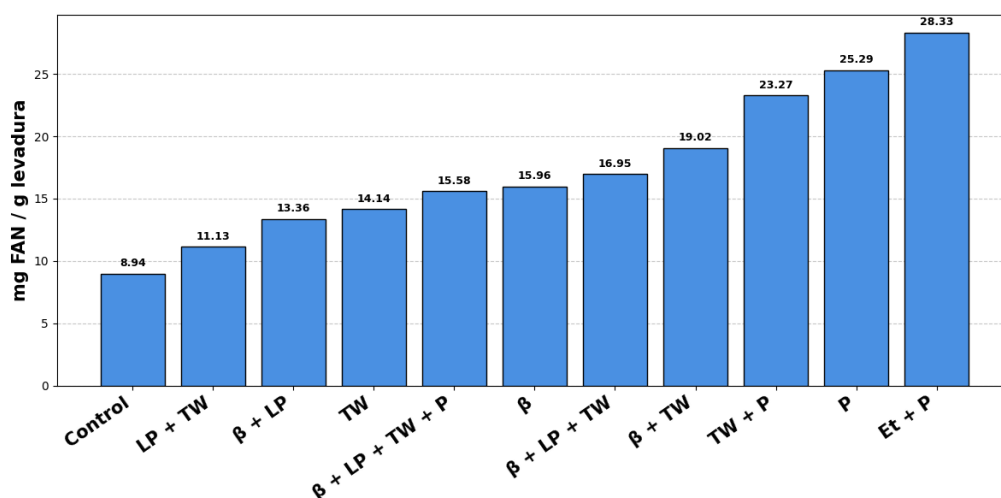


Figura 3. Gráfico de barras de diferentes combinaciones de agentes auxiliares para desestabilizar la membrana celular.

Limitaciones de la hidrólisis

Los ensayos realizados con biomasa húmeda (BH) y biomasa seca (BS) permitieron analizar simultáneamente la accesibilidad del sustrato y las limitaciones operativas asociadas a elevadas concentraciones de sólidos (Figura 4).

En la Figura 5 se observa que el aumento excesivo de la concentración de biomasa da lugar a la formación de suspensiones con una viscosidad considerablemente elevada, lo que dificulta el

mezclado homogéneo del sistema de reacción. Como consecuencia, se redujo el contacto efectivo entre la proteasa y la biomasa.

Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

- A: *S. cerevisiae* en polvo al 10% p/v + proteasa neutra al 0.5% p/v.
- B: *K. marxianus* molido al 10% p/v + proteasa neutra al 0.5% p/v.

- C: *K. marxianus* molido al 10% p/v + proteasa neutra al 1% p/v.
- D: *K. marxianus* molido al 20% p/v + proteasa neutra al 1% p/v + *K. marxianus* molido al 5% p/v luego de 24 h.
- E: *K. marxianus* molido al 20% p/v + proteasa neutra al 1% p/v.
- F: *K. marxianus* molido al 30% p/v + proteasa neutra al 1% p/v.
- G: *K. marxianus* molido al 30% p/v + proteasa neutra al 1% p/v + *K. marxianus* molido al 5% p/v luego de 24 h.

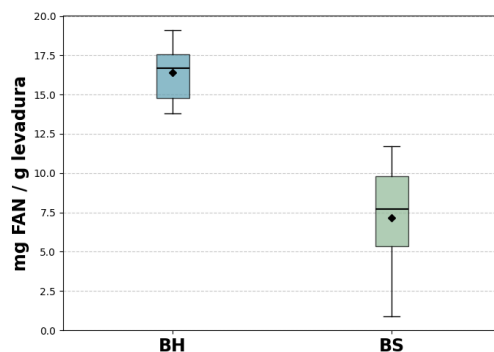


Figura 4. Efecto del estado físico de la biomasa sobre los hidrolizados.

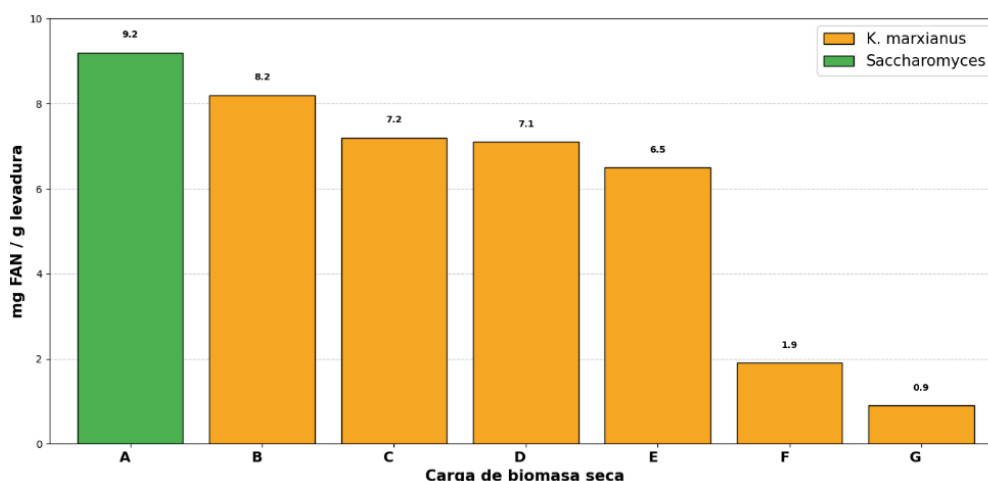


Figura 5. Efecto de las diferentes cargas de biomasa seca sobre los hidrolizados.

CONCLUSIONES

Dentro de las proteasas comerciales evaluadas, las proteasas neutra y alcalina presentaron un desempeño superior al de la proteasa ácida, alcanzando los mayores valores de FAN específico bajo las condiciones estudiadas. Los resultados obtenidos indicaron que, dentro del rango evaluado, las condiciones de pH neutro a alcalino favorecieron la generación de extractos de *K. marxianus* mediante hidrólisis enzimática.

Por el contrario, las temperaturas de incubación evaluadas mostraron comportamientos muy similares en términos de la generación de FAN específico, sin observarse diferencias marcadas entre las condiciones ensayadas.

Los ensayos orientados a desestabilizar la membrana celular de la levadura mediante el uso de diferentes enzimas o agentes desestabilizantes, además de las

proteasas, no evidenciaron una mejora en la eficiencia del hidrolizado respecto de los tratamientos que no los incluían. En este sentido, la adición de proteasa neutra al inicio del ensayo permitió alcanzar mayores valores de FAN específico en comparación con aquellos tratamientos en los que la proteasa fue incorporada a las 48 h. Adicionalmente, el mayor valor de FAN específico se obtuvo en el tratamiento que incluyó etanol como agente desestabilizante de membrana celular. Este resultado sugiere la posibilidad de explorar, en futuros ensayos, el uso de otros agentes desestabilizantes de membrana, incluso sin la incorporación de enzimas específicas.

Por otra parte, los resultados obtenidos indican que la generación de extractos de *K. marxianus* depende no sólo del tipo de enzima empleada, sino también de factores asociados a la accesibilidad del sustrato y a las condiciones físicas del sistema de reacción. El aumento de la carga de biomasa y la incorporación de biomasa seca a la mezcla generaron limitaciones

operativas que afectaron el desempeño del proceso. En particular, las mayores concentraciones de biomasa favorecieron la formación de suspensiones altamente viscosas, dificultando el mezclado y reduciendo la liberación de compuestos nitrogenados.

Considerando que la biomasa de *K. marxianus* presenta un contenido de nitrógeno total de aproximadamente 80–83 mg N/g de biomasa seca en condiciones de crecimiento no limitantes de nitrógeno, los mejores tratamientos evaluados en este estudio liberaron hasta 34,94 mg FAN/g de levadura que representa aproximadamente el 44% del contenido teórico total de nitrógeno de *K. marxianus* contra los controles de autólisis sin proteasas que liberaron hasta 3,47 mg FAN/g de levadura, es decir aproximadamente el 4% del nitrógeno teórico.

Este resultado indica que las proteasas utilizadas sirvieron de gran ayuda para poder hidrolizar gran parte de las proteínas presentes de la célula y convertirlas en nitrógeno amino libre, mientras que el resto probablemente permaneció formando parte de péptidos, proteínas parcialmente hidrolizadas u otros compuestos nitrogenados no detectados por el método de FAN.

En conjunto, los resultados indican que la optimización de la producción de extractos de *K. marxianus* requiere no sólo la selección adecuada de la actividad enzimática y de las condiciones de operación, sino también el control de variables físicas relacionadas con la accesibilidad del sustrato y la transferencia de materia dentro del sistema de reacción.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) a través del servicio de actualización y perfeccionamiento para graduados (CD N° 245).

REFERENCIAS

LEONARDI, Rodrigo J.; RACCA, Sofía; COMELLI, Raúl N.; SELUY, Lisandro G. Liquid extract with high amino nitrogen obtained by autolysis of brewing yeast can be used as supplement for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 15, p. 15141–15159, 2025.

KARIM, Ahasanul; GERLIANI, Natela; AİDER, Mohammed. *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *International Journal of Food Microbiology*, v. 333, p. 108818, 2020.

TAO, Zekun; YUAN, Haibo; LIU, Meng; LIU, Qian; ZHANG, Siyi; LIU, Hongling; JIANG, Yi; HUANG, Di;

WANG, Tengfei. Yeast extract: characteristics, production, applications and future perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 33, n. 2, p. 151–166, 2023.

DENG, Jieying; LI, Zhendong; LV, Xueqin; CHEN, Jian; LIU, Long. Precision hydrolysis: tailored yeast processing enzymes for yeast-based products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 110, n. 1, p. 5, 2026.

WEST, Dwight B. Methods for determining free amino nitrogen in wort and beer and viscosity of wort and beer. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, v. 60, n. 4, p. 805–806, 1977.

LÖSER, Christian; URIT, Thomas; GRUNER, Eric; BIBERGER, Thomas; SPRENGER, Gerd A. Efficient growth of *Kluyveromyces marxianus* biomass used as a biocatalyst in the sustainable production of ethyl acetate. *Energy, Sustainability and Society*, v. 5, n. 1, p. 2, 2015.