

PRODUCCIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA A PARTIR DE *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* CULTIVADA EN LACTOSUERO

A. Ermilio¹, A. Trulli², H. Basso², M. Morelli², R.J. Leonardi²

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
(alejoermilio@hotmail.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

Este trabajo propone valorizar biomasa de *Kluyveromyces marxianus* cultivada en lactosuero como materia prima para obtener extractos de levadura ricos en nitrógeno soluble. Se caracterizó la biomasa y se evaluaron estrategias de autólisis e hidrólisis asistida con proteasas. La hidrólisis enzimática fue más efectiva que la autólisis para liberar nitrógeno amínico libre, alcanzando más del 50 % del valor máximo estimado para la biomasa utilizada.

Palabras clave: *Kluyveromyces marxianus*; Lactosuero; Extracto de levadura; Economía circular; Valorización agroindustrial

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento de corrientes agroindustriales para la producción de biomasa microbiana y de derivados con interés biotecnológico constituye una alternativa valiosa para agregar valor a subproductos de bajo costo y, al mismo tiempo, reducir su impacto ambiental. En este contexto, el lactosuero se destaca como una de las corrientes más abundantes de la industria quesera, ya que representa aproximadamente el 85–95 % del volumen de leche procesada durante la fabricación de quesos (Pires et al., 2021). Aunque históricamente fue considerado un residuo, su composición rica en lactosa, proteínas solubles, minerales y otros compuestos orgánicos, evidencia un importante potencial de valorización biotecnológica. No obstante, al disponerse sin tratamiento, su elevada carga orgánica se asocia con altos valores de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO), lo que puede generar impactos ambientales significativos (Pires et al., 2021; Fancello et al., 2024).

En Argentina, esta problemática adquiere especial relevancia debido al peso de la producción quesera dentro de la cadena láctea. En 2025, la producción

nacional alcanzó aproximadamente 11.617 millones de litros de leche, de los cuales una proporción importante se destinó a la elaboración de quesos de distinta humedad (OCLA, 2026). Esta situación implica una generación sostenida de lactosuero y refuerza la necesidad de desarrollar alternativas de aprovechamiento adaptadas a la escala local. Si bien existen tecnologías para su concentración, secado y fraccionamiento, su implementación suele concentrarse en empresas con mayor capacidad de inversión, mientras que muchas pequeñas y medianas empresas lácteas enfrentan limitaciones logísticas, económicas y tecnológicas para procesar esta corriente de manera eficiente (Talamoni et al., 2023). En este sentido, resulta necesario avanzar en procesos biotecnológicos simples, económicos y escalables, capaces de transformar el lactosuero en productos de mayor valor agregado.

Una estrategia promisorio es el cultivo aeróbico de la levadura *Kluyveromyces marxianus* en lactosuero. Esta especie se caracteriza por su elevada velocidad de crecimiento, termotolerancia, capacidad para metabolizar lactosa y tolerancia a distintas condiciones de pH, lo que la convierte en una plataforma robusta para aplicaciones biotecnológicas y de biorrefinería (Reina-Posso y Gonzales-Zubiate,

2025). Además, se han reportado aplicaciones de *K. marxianus* en subproductos lácteos orientadas a la producción de biomasa y a la reducción de la carga orgánica, lo que refuerza su interés para procesos integrados de valorización (Fancello et al., 2024). De este modo, su cultivo permitiría, por un lado, disminuir la carga contaminante del lactosuero y, por otro, obtener biomasa microbiana con potencial aplicación en distintos procesos industriales.

Uno de los posibles destinos de esta biomasa es la producción de extracto de levadura, componente de medio de cultivo microbiano, ampliamente utilizado por su aporte de péptidos, aminoácidos libres, nucleótidos, vitaminas y minerales. Tradicionalmente, estos extractos se obtienen a partir de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de industrias fermentativas, como la cervecera o la producción de bioetanol, donde la levadura residual constituye una corriente abundante y valorizable (Zeko-Pivač et al., 2023). En general, su obtención se basa en procesos de autólisis, en los cuales las enzimas endógenas de la propia célula degradan estructuras internas complejas bajo condiciones controladas de pH, temperatura y tiempo. Este proceso favorece la solubilización de componentes intracelulares y la liberación de compuestos de menor peso molecular, especialmente péptidos y aminoácidos libres derivados de la hidrólisis de proteínas (Tao et al., 2023).

De manera complementaria, el uso de proteasas exógenas durante el procesamiento de biomasa de levadura ha ganado interés como estrategia para intensificar la hidrólisis proteica y mejorar la liberación de compuestos solubles. A diferencia de la autólisis convencional, la incorporación de proteasas comerciales permite orientar el proceso hacia la ruptura de enlaces peptídicos, favoreciendo la generación de péptidos cortos, aminoácidos libres y nitrógeno amínico libre. Este enfoque puede contribuir a reducir los tiempos de proceso, incrementar el grado de hidrólisis y ajustar el perfil nutricional del extracto según la aplicación buscada (Min et al., 2024; Deng et al., 2026).

En este marco, la biomasa de *K. marxianus* obtenida a partir de lactosuero representa una alternativa de interés para la producción de extractos de levadura. Estudios recientes demostraron la factibilidad de producir y caracterizar extractos a partir de esta especie, destacando su potencial como fuente de compuestos nutricionales y funcionales (Demirgöl et al., 2022). Por lo tanto, este trabajo se centra en la evaluación de estrategias de autólisis e hidrólisis asistida por proteasas sobre biomasa de *K. marxianus*, con el objetivo de favorecer la liberación de aminoácidos libres y de obtener extractos con potencial aplicación como componentes de medios de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepa y preparación del inóculo

Se trabajó con la cepa *Kluyveromyces 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 Erlenmeyer de 100 mL con 20 mL de medio de cultivo. Luego, el cultivo se escaló a Erlenmeyer 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, calculado en función del volumen de cultivo. Cada etapa tuvo una duración de 24 h. El medio de cultivo utilizado estuvo compuesto por lactosa 20 g/L y extracto de levadura 10 g/L. Las etapas realizadas en Erlenmeyer se incubaron en agitador orbital termostatzado, mientras que los cultivos en frascos Schott se llevaron a cabo a 30 °C en estufa con agitación magnética. Cuando fue necesario, se adicionó antiespumante para controlar la formación de espuma.

Cultivo en lactosuero y recuperación de biomasa

Para la producción de biomasa se utilizó lactosuero recién generado, proveniente de una planta láctea y conservado en frío hasta su utilización. El cultivo se realizó en un fermentador de 50 L a 30 °C, con aireación mediante difusor de burbuja fina a 1 vvm, calculado en función del volumen de cultivo. Tanto el lactosuero como el fermentador se utilizaron sin esterilización ni pretratamiento previo. El fermentador se inoculó con biomasa de *K. marxianus* hasta alcanzar una concentración inicial de 5 g/L de biomasa seca. La fermentación se llevó a cabo durante 24 h, adicionando antiespumante cuando fue necesario para controlar la formación de espuma. Finalizado el cultivo, la biomasa se concentró por sedimentación en frío durante 24 h a 5 °C y posteriormente se centrifugó para separar el sobrenadante correspondiente al lactosuero fermentado. La biomasa recuperada se lavó mediante resuspensión en agua destilada y posterior centrifugación, con el objetivo de reducir los componentes solubles remanentes del medio. Finalmente, la biomasa húmeda lavada se conservó en refrigeración hasta su utilización.

Caracterización de la biomasa

La biomasa cosechada se caracterizó mediante la determinación de humedad, sólidos totales y contenido de proteína cruda. La humedad se

determinó por método gravimétrico, mediante el secado de una alícuota en estufa hasta peso constante. A partir de esta determinación se calculó el contenido de sólidos totales de la biomasa. El contenido de proteína cruda se estimó de manera indirecta a partir del nitrógeno total determinado por el método de Kjeldahl, aplicando el factor convencional de conversión $N \times 6,25$. Los resultados se expresaron como proteína cruda, dado que esta estimación puede incluir contribuciones de nitrógeno no proteico presente en la biomasa.

Ensayos de autólisis e hidrólisis asistida por proteasas

Los ensayos de obtención de extractos se realizaron a partir de suspensiones de biomasa de *K. marxianus* con una concentración final de 10 % de sólidos, expresada en base seca. En todos los casos se trabajó en tubos tipo Hach, utilizando un volumen de reacción de 8 mL por tubo, y los tratamientos se realizaron por duplicado. Para evaluar la autólisis, se analizaron combinaciones de dos temperaturas, 45 y 55 °C, y tres valores iniciales de pH: 4,5; 7,0 y 9,5. Los tubos se incubaron durante 48 h en agitador orbital termostatzado. En los ensayos de hidrólisis asistida por proteasas se mantuvieron las mismas condiciones experimentales de temperatura, pH, tiempo de incubación y concentración de sólidos. Se evaluaron tres preparaciones enzimáticas comerciales: una proteasa alcalina líquida, una proteasa neutra líquida de origen fúngico y una proteasa ácida en polvo. Las enzimas se incorporaron a una concentración final de 0,5 %, expresada como v/v para las preparaciones líquidas y como p/v para la enzima en polvo. Finalizado el periodo de incubación, las muestras fueron sometidas a inactivación térmica a 80 °C durante 15 min. Posteriormente, se centrifugaron y se recuperaron los sobrenadantes para la determinación de nitrógeno amínico libre (FAN).

Evaluación del tiempo de hidrólisis enzimática

Se realizó un nuevo ensayo utilizando proteasa neutra, a 55 °C y pH inicial 7,0, con el objetivo de evaluar la evolución temporal de la liberación de FAN. El ensayo se llevó a cabo en Erlenmeyer de 250 mL cerrados, utilizando 150 mL de suspensión a hidrolizar, y se incubó en shaker termostatzado con una velocidad de agitación superior a la utilizada en los ensayos previos. Las alícuotas se tomaron a 0, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h. Como tratamiento comparativo se utilizó una suspensión al 10 % de levadura de *S. cerevisiae* en polvo, adicionando la misma concentración de proteasa y manteniendo las mismas

condiciones de incubación. En los hidrolizados obtenidos se determinó el contenido de nitrógeno total y nitrógeno no proteico en la fracción soluble. Además, se analizó el perfil de aminoácidos en los sobrenadantes de ambos hidrolizados. Los resultados se expresaron como aporte porcentual de cada aminoácido respecto de la suma total de aminoácidos detectados. Ambas determinaciones fueron realizadas por tercetos.

Determinación de nitrógeno amínico libre

La concentración de FAN se determinó en los sobrenadantes mediante el método colorimétrico de la ninhidrina. Para ello, las muestras se hicieron reaccionar con el reactivo de ninhidrina y se incubaron térmicamente para permitir el desarrollo de color. Posteriormente, se enfriaron, se adicionó la solución de dilución con yodato de potasio y se midió la absorbancia a 570 nm. La concentración de FAN se estimó a partir de una curva de calibración preparada con glicina como aminoácido patrón. Los resultados se expresaron como concentración de FAN en la fracción soluble del extracto. Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada muestra.

Análisis de datos

El procesamiento de los datos, el análisis estadístico y la elaboración de gráficos se realizaron en RStudio, mediante el lenguaje R y herramientas específicas para importación, organización, análisis y visualización de datos. Las comparaciones entre tratamientos se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA), incluyendo modelos factoriales cuando correspondió. Cuando se detectaron diferencias significativas, se realizaron comparaciones múltiples entre tratamientos. Los resultados se expresaron como promedio $\pm$ desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo de *Kluyveromyces marxianus* en lactosuero y recuperación de biomasa

Se cultivó *K. marxianus* en lactosuero sin esterilizar, bajo condiciones aeróbicas y temperatura controlada. Si bien no se realizó el seguimiento cinético del cultivo específico utilizado para recuperar la biomasa destinada a los ensayos de hidrólisis, en la Figura 1 se presenta un cultivo representativo desarrollado bajo condiciones equivalentes, en el cual se evaluó la

evolución de la biomasa, los azúcares reductores, el etanol y el pH.

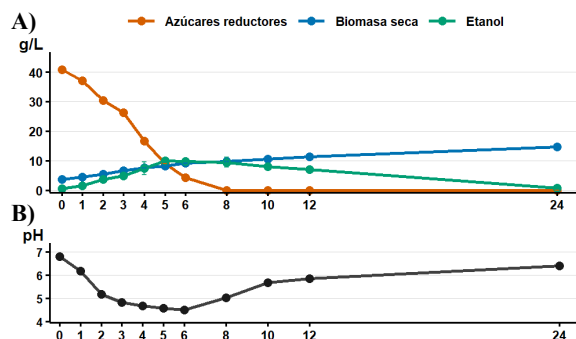


Figura 1. Cultivo de *K. marxianus* UP810 en lactosuero dulce. A) Evolución de la concentración de biomasa seca, azúcares reductores y etanol en el tiempo. B) Evolución del pH en el tiempo.

El comportamiento del cultivo puede dividirse en dos etapas. La primera etapa, de crecimiento rápido, se caracterizó por una marcada disminución de la concentración de azúcares reductores, acompañada por el incremento de la biomasa y la producción de etanol. En esta etapa también se observó una disminución del pH, compatible con la formación de metabolitos ácidos durante el crecimiento. En una segunda etapa, de crecimiento más lento, se observó una disminución de la concentración de etanol y un aumento progresivo del pH. Este comportamiento podría asociarse al consumo de compuestos orgánicos previamente generados, una vez reducida la disponibilidad de azúcares fermentables.

Caracterización de la biomasa de levadura

La biomasa recuperada fue caracterizada en términos de humedad, sólidos totales y contenido de proteína cruda. La determinación de sólidos totales permitió estimar la proporción de materia seca presente en la biomasa húmeda y, a partir de ello, calcular la cantidad necesaria para formular las suspensiones utilizadas en los ensayos posteriores. La biomasa húmeda de *K. marxianus* presentó un contenido de sólidos totales de $20,3 \pm 0,6$ % p/p, equivalente a una humedad de $79,7 \pm 0,6$ %.

El contenido de proteína cruda fue de 40 % en base seca. Este parámetro resulta relevante debido a que las proteínas constituyen el principal sustrato para la liberación de péptidos y aminoácidos libres durante los procesos de autólisis e hidrólisis proteolítica. En este sentido, la biomasa obtenida a partir de lactosuero presentó un contenido de proteína cruda adecuado para su evaluación como materia prima en la producción de extractos de levadura.

Evaluación de la autólisis de biomasa de *K. marxianus*

En una primera etapa se evaluó la capacidad de autólisis de la biomasa de *K. marxianus* UP810 cultivada en lactosuero y conservada en refrigeración. Para ello, se cuantificó la liberación de FAN bajo diferentes condiciones de pH y temperatura, sin incorporación de enzimas exógenas.

Los resultados mostraron que la liberación de FAN dependió de la combinación entre ambas variables de proceso.

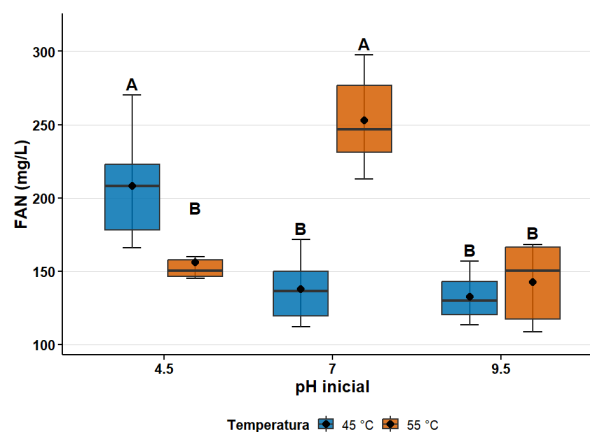


Figura 2. Efecto del pH inicial y la temperatura sobre la liberación de FAN por autólisis de *K. marxianus*. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$).

En la Figura 2 se observa que, a 45 °C, la mayor liberación de FAN se registró a pH 4,5, mientras que a pH 7,0 y 9,5 los valores fueron menores. En cambio, a 55 °C, la condición que presentó la mayor liberación de FAN fue pH 7,0. Estos resultados evidencian que la respuesta no siguió una tendencia lineal respecto del pH o de la temperatura por separado, sino que estuvo condicionada por la interacción entre ambos factores.

El ANOVA confirmó este comportamiento, ya que se detectaron efectos significativos de la temperatura, del pH y de la interacción temperatura $\times$ pH sobre la liberación de FAN. A partir de la comparación múltiple de medias mediante la prueba de Tukey, se observó que la condición 55 °C–pH 7,0 presentó el mayor valor medio de FAN, con 252,80 mg FAN/L. Sin embargo, este tratamiento no mostró diferencias significativas respecto de la condición 45 °C–pH 4,5, que alcanzó un valor medio de 207,98 mg FAN/L. Ambas condiciones conformaron el grupo de mayor liberación de FAN y se diferenciaron estadísticamente del resto de los tratamientos, los cuales presentaron valores menores.

A pesar de haberse identificado condiciones que favorecieron la autólisis, las concentraciones de FAN

obtenidas resultaron bajas en relación con el valor máximo estimado para la biomasa utilizada, correspondiente a aproximadamente 6400 mg FAN/L para una suspensión con 10 % de sólidos en base seca y 40 % de proteína. En este contexto, el máximo valor obtenido, 252,80 mg FAN/L, representó aproximadamente el 3,9 % de dicho valor, lo que indica que la autólisis permitió liberar sólo una fracción limitada del nitrógeno potencialmente disponible como FAN.

Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones evaluadas, la biomasa de *K. marxianus* presentó una capacidad autolítica limitada. La baja liberación de FAN podría estar asociada no sólo a la especie utilizada, sino también al historial de la biomasa, incluyendo el cultivo en lactosuero, la cosecha y la conservación en refrigeración hasta el inicio de la autólisis. Estos factores podrían haber afectado la viabilidad celular, la actividad enzimática endógena o la susceptibilidad de las células al proceso autolítico. Por lo tanto, si bien fue posible detectar diferencias entre tratamientos, los resultados indican que sería necesario evaluar estrategias complementarias de ruptura o hidrólisis para incrementar la recuperación de nitrógeno soluble.

Hidrólisis enzimática de biomasa de *K. marxianus*

En un segundo ensayo se evaluó el efecto de la incorporación de proteasas exógenas sobre la liberación de FAN a partir de biomasa de levadura. Para ello, se trabajó bajo las mismas condiciones de

pH y temperatura utilizadas en el ensayo de autólisis. Se evaluaron tres preparaciones enzimáticas comerciales, clasificadas como proteasa ácida, proteasa alcalina y proteasa neutra.

Los resultados mostraron que la liberación de FAN dependió tanto del tipo de proteasa utilizada como de la condición de pH y temperatura evaluada. En la Figura 3 se observa que las proteasas alcalina y neutra presentaron, en general, los mayores valores de FAN, especialmente bajo condiciones de pH neutro o alcalino. En cambio, la proteasa ácida mostró una menor capacidad de liberación de FAN dentro de cada combinación de pH y temperatura. Estos resultados evidencian que la respuesta no estuvo determinada únicamente por el tipo de enzima incorporada, sino también por su interacción con las condiciones de hidrólisis.

El ANOVA confirmó este comportamiento, ya que se detectaron efectos significativos del tipo de proteasa y del pH sobre la liberación de FAN. En cambio, la temperatura, considerada como efecto principal, no presentó un efecto significativo. No obstante, se observaron interacciones significativas entre proteasa y temperatura, proteasa y pH, y temperatura y pH, lo que indica que el efecto de cada variable dependió de la combinación de condiciones empleadas. La interacción triple entre proteasa, temperatura y pH no resultó significativa, sugiriendo que el patrón general de respuesta de las proteasas se mantuvo relativamente constante entre las condiciones evaluadas. A partir de la comparación múltiple de

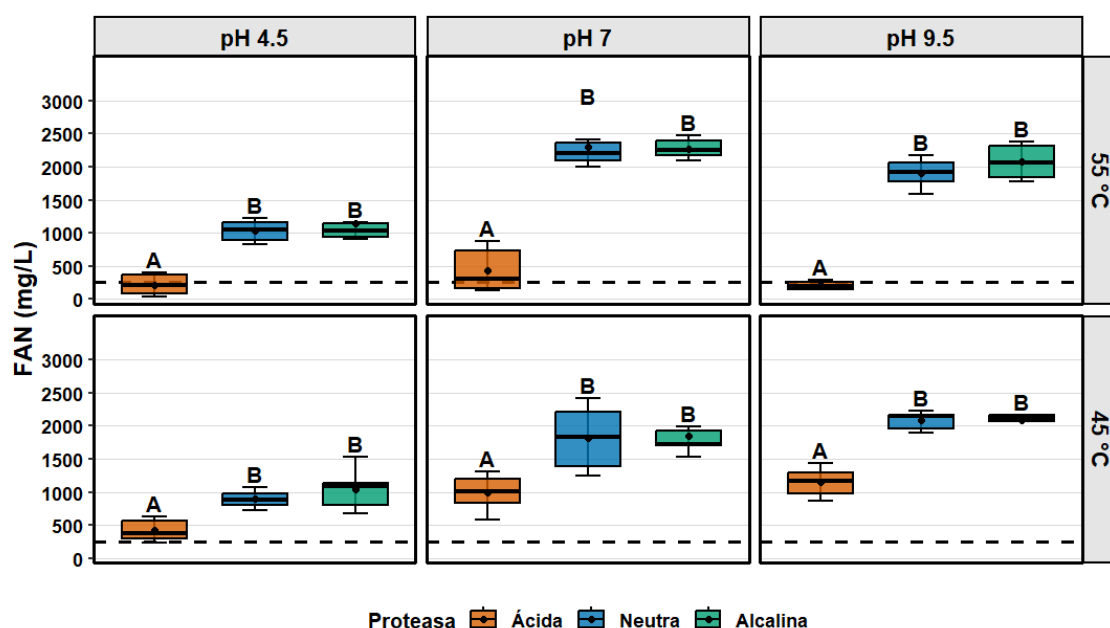


Figura 3. Liberación de FAN por hidrólisis enzimática de biomasa de *K. marxianus* bajo distintas condiciones de pH, temperatura y proteasa. La línea punteada indica el mejor valor de autólisis. Letras diferentes indican diferencias significativas según Tukey ($p < 0,05$).

medias mediante la prueba de Tukey, se observó que, dentro de cada combinación de pH y temperatura, la proteasa ácida presentó valores significativamente menores de FAN que las proteasas alcalina y neutra. En cambio, estas últimas no mostraron diferencias significativas entre sí en ninguna de las condiciones evaluadas.

El tratamiento con mayor valor promedio de FAN correspondió a la proteasa neutra a 55 °C y pH 7,0, alcanzando 2292,9 mg FAN/L. Sin embargo, este valor no difirió significativamente del obtenido con la proteasa alcalina bajo la misma condición, que alcanzó 2273,0 mg FAN/L. Ambas proteasas conformaron el grupo de mayor liberación de FAN para esta condición experimental. También se registraron valores elevados con las proteasas alcalina y neutra a 55 °C y pH 9,5, así como a 45 °C en pH 7,0 y 9,5, con concentraciones comprendidas aproximadamente entre 1819,9 y 2092,8 mg FAN/L.

A pesar de que la proteasa ácida presentó un desempeño significativamente menor dentro de cada condición evaluada, la magnitud absoluta de FAN también dependió del pH y de la temperatura de trabajo. Por ejemplo, esta proteasa alcanzó valores cercanos a 1000–1150 mg FAN/L a 45 °C y pH 7,0–9,5, comparables en términos absolutos con los obtenidos por las proteasas alcalina o neutra bajo condiciones menos favorables, como pH 4,5. Esto indica que el rendimiento del proceso no dependió exclusivamente del tipo de proteasa, sino de la combinación entre la preparación enzimática y las condiciones de hidrólisis.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en la etapa de autólisis, se observó una mejora sustancial en la liberación de FAN. El mejor tratamiento enzimático, correspondiente a la proteasa neutra a 55 °C y pH 7,0, alcanzó 2292,9 mg FAN/L, lo que representó un incremento aproximado del 807 % respecto del mayor valor medio obtenido por autólisis, de 252,8 mg FAN/L. A su vez, este valor correspondió aproximadamente al 35,8 % del valor máximo estimado para la biomasa utilizada, lo que indica que la incorporación de proteasas exógenas permitió aumentar marcadamente la recuperación de nitrógeno soluble como FAN.

Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones evaluadas, la incorporación de proteasas externas fue una estrategia efectiva para incrementar la hidrólisis de la biomasa de *K. marxianus*.

Optimización del tiempo de hidrólisis enzimática

Se reprodujo la condición de hidrólisis enzimática previamente seleccionada, correspondiente al uso de proteasa neutra a 55 °C y pH inicial 7,0, trabajando a una mayor escala y con una velocidad de agitación superior a la utilizada en los ensayos previos. El seguimiento temporal de la concentración de FAN

permitió analizar la cinética de liberación durante el proceso de hidrólisis.

En la Figura 4 se observa que la hidrólisis de la biomasa de *K. marxianus* presentó una fase inicial rápida, caracterizada por un marcado incremento de FAN durante las primeras horas de reacción. A las 6 h de iniciada la hidrólisis, la concentración de FAN ya superó el valor correspondiente al mejor tratamiento obtenido en el ensayo previo de hidrólisis enzimática, lo que evidencia una mejora en el desempeño del proceso bajo las nuevas condiciones de operación.

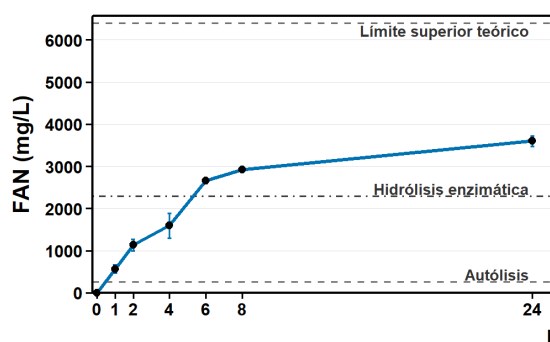


Figura 4. Evolución temporal de la concentración FAN durante la hidrólisis enzimática de biomasa de *K. marxianus*.

Posteriormente, la liberación de FAN continuó aumentando, aunque a menor velocidad, alcanzando 2926,47 mg FAN/L a las 8 h y 3601,89 mg FAN/L a las 24 h. Estos valores representaron aproximadamente el 45,7 % y el 56,3 % del valor máximo estimado para la biomasa utilizada, respectivamente.

El perfil obtenido sugiere que la mayor parte de la liberación de FAN ocurrió durante las primeras 6–8 h, asociada principalmente a la acción de la proteasa sobre proteínas solubles y componentes intracelulares liberados durante el proceso. Si bien la prolongación de la hidrólisis hasta 24 h permitió incrementar la concentración final de FAN, la ganancia relativa fue menor luego de las primeras horas. Por lo tanto, no puede descartarse que concentraciones similares se alcancen en tiempos intermedios no evaluados. Este comportamiento resulta relevante para definir el tiempo de proceso, ya que permite balancear el rendimiento alcanzado con la duración total de la hidrólisis.

Asimismo, el ensayo permitió evidenciar la importancia de una agitación adecuada durante la hidrólisis de biomasa de *K. marxianus*. Debido a la carga de sólidos y a la viscosidad del sistema, una mezcla insuficiente podría limitar el contacto entre la enzima y el sustrato, reduciendo el avance de la reacción. En este sentido, una agitación adecuada y

homogénea resulta clave para favorecer la distribución uniforme de la biomasa, mejorar la transferencia de masa y asegurar un proceso de hidrólisis más controlado y reproducible.

Caracterización del extracto de levadura

Se compararon dos extractos de levadura producidos a partir de biomasa de diferente origen: uno correspondiente a *K. marxianus* UP810 (LK) y otro obtenido a partir de biomasa en polvo de *S. cerevisiae* (LS).

Como se muestra en la Tabla 1, el contenido de nitrógeno total de los hidrolizados completos, es decir, antes de la separación de los sólidos suspendidos, fue similar entre ambas muestras, con valores de $649,6 \pm 1,0$ mg N/100 mL para LK y $660,3 \pm 1,7$ mg N/100 mL para LS. Considerando una concentración de 10 g de sólidos/100 mL, estos valores equivalen a contenidos proteicos aproximados de 40,6 % y 41,3 % en base seca, respectivamente.

Tabla 1. Contenido de nitrógeno total y nitrógeno no proteico en hidrolizados

Muestra	N total (mg N/100 mL)	NNP (mg N/100 mL)
LK	$649,6 \pm 1,0$	—
LK-S	$646,7 \pm 0,8$	$642,5 \pm 0,6$
LS	$660,3 \pm 1,7$	—
LS-S	$662,7 \pm 1,2$	$636,0 \pm 1,8$

Estos resultados se encuentran dentro del rango esperado para biomasa de levadura. En particular, se ha reportado que *K. marxianus* cultivada en

lactosuero puede presentar contenidos de proteína cruda cercanos al 42 %, mientras que la levadura residual cervecera suele presentar contenidos proteicos elevados, generalmente en el rango de 40–60 % de la materia seca (Páez et al., 2008; Zeko-Pivač et al., 2023).

Luego de la centrifugación, la concentración de nitrógeno total en los sobrenadantes también fue similar a la observada en los hidrolizados completos. Para LK-S, el sobrenadante presentó $646,7 \pm 0,8$ mg N/100 mL, mientras que para LS-S se obtuvo $662,7 \pm 1,2$ mg N/100 mL. Esto indica que la mayor parte del nitrógeno presente en ambas suspensiones se encontró en la fase soluble luego del proceso de hidrólisis. Además, el nitrógeno no proteico representó el 99,4 % del nitrógeno soluble en LK-S y el 96,0 % en LS-S, lo que evidencia una hidrólisis extensa de la fracción nitrogenada. En este sentido, ambos extractos pueden considerarse fuentes altamente solubles de nitrógeno orgánico, principalmente en forma de péptidos de bajo peso molecular, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados no proteicos.

Para analizar el perfil aminoacídico relativo, se calculó el aporte porcentual de cada aminoácido respecto de la suma total de aminoácidos detectados en cada muestra. Como se observa en la Figura 5, ambos extractos presentaron perfiles claramente diferenciados. En LK, correspondiente al hidrolizado de *K. marxianus*, predominaron leucina e isoleucina, con aportes relativos de aproximadamente 18,1 % y 17,0 %, respectivamente. También se observaron contribuciones relevantes de lisina, fenilalanina, treonina, tirosina y ornitina. Este perfil coincide parcialmente con lo reportado para biomasa de *K. marxianus* cultivada en lactosuero, especialmente por la presencia de lisina y treonina. Además, el

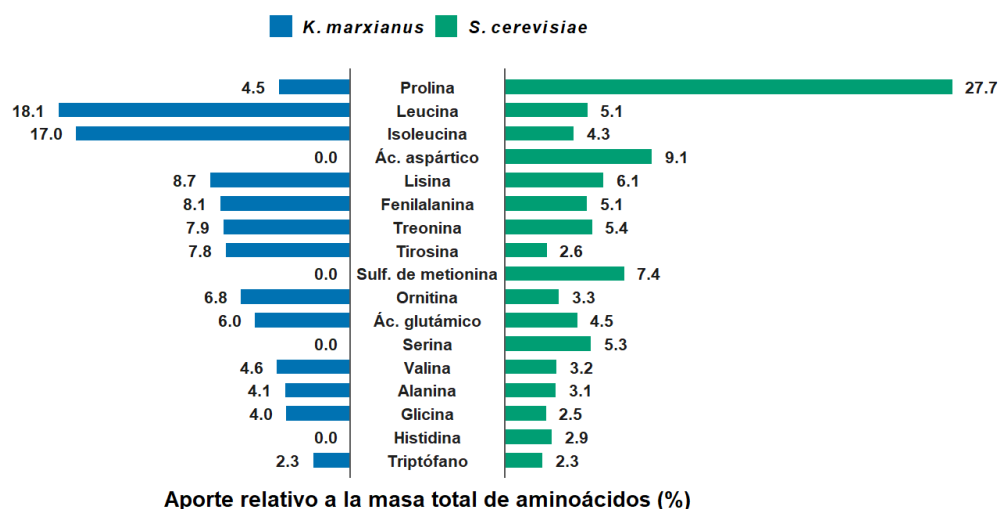


Figura 5. Perfil aminoacídico relativo de los extractos obtenidos a partir de *K. marxianus* y *S. cerevisiae*.

predominio relativo de aminoácidos ramificados podría estar asociado, al menos en parte, al origen de la biomasa, ya que productos derivados de la fracción proteica del lactosuero presentan contenidos relevantes de aminoácidos esenciales y ramificados, incluyendo leucina, isoleucina y valina (Gilmour et al., 2024). Sin embargo, debe considerarse que el análisis realizado corresponde a la fracción soluble del hidrolizado y no al perfil aminoacídico total de la biomasa, por lo que el resultado también puede estar condicionado por la hidrólisis enzimática y la solubilización diferencial de los compuestos nitrogenados.

En LS, correspondiente al hidrolizado de *S. cerevisiae*, el perfil estuvo fuertemente dominado por prolina, que representó aproximadamente el 27,7 % del total de aminoácidos detectados. También se destacaron ácido aspártico, sulfóxido de metionina, lisina, treonina, serina, leucina y fenilalanina. La elevada proporción de prolina diferenció claramente a LS de LK y no debería atribuirse únicamente a la especie de levadura, ya que el perfil aminoacídico de un extracto puede estar condicionado por el origen de la biomasa, el sustrato fermentativo previo y la fracción soluble recuperada luego de la hidrólisis. En este sentido, la elevada proporción de prolina observada en LS podría ser compatible con biomasa de *S. cerevisiae* proveniente de procesos cerveceros. El mosto cervecero, derivado principalmente de malta de cebada, presenta un perfil de aminoácidos libres en el que la prolina se encuentra entre los compuestos predominantes, junto con alanina, arginina y tirosina (Ferreira et al., 2018). Además, la prolina es una fuente de nitrógeno poco utilizada por *S. cerevisiae* bajo condiciones típicas de fermentación cervecera, debido a que su metabolismo requiere condiciones más oxidativas que las presentes durante la fermentación alcohólica (Hill y Stewart, 2019; Koller et al., 2022). Por lo tanto, el perfil observado en LS podría reflejar no sólo características propias de la biomasa de *S. cerevisiae*, sino también el historial del sustrato, del proceso fermentativo previo y de las condiciones de procesamiento de la biomasa.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que la biomasa de *K. marxianus* cultivada en lactosuero constituye una materia prima adecuada para la obtención de extractos nitrogenados mediante hidrólisis enzimática. La autólisis por sí sola presentó una capacidad limitada para liberar FAN, mientras que la incorporación de proteasas exógenas permitió incrementar significativamente la concentración de

FAN en la fracción soluble. Entre las condiciones evaluadas, el tratamiento con proteasa neutra a 55 °C y pH inicial 7,0 presentó el mayor valor promedio de FAN y fue seleccionado para el ensayo temporal, aunque no difirió significativamente de la proteasa alcalina bajo la misma condición. La evaluación temporal del proceso mostró una liberación rápida de FAN durante las primeras horas de reacción, seguida por una etapa de menor incremento hacia tiempos prolongados. El mayor valor se alcanzó a las 24 h, con 3601,9 mg FAN/L, equivalente al 56,3 % del valor potencial estimado para la biomasa utilizada. Sin embargo, a las 8 h ya se había alcanzado el 45,7 % de dicho valor, lo que sugiere que futuros ensayos deberían evaluar tiempos intermedios entre 8 y 24 h para optimizar la duración del proceso y mejorar la relación entre rendimiento y tiempo de hidrólisis. Los análisis complementarios de nitrógeno y perfil aminoacídico confirmaron la obtención de una fracción soluble rica en compuestos nitrogenados, con presencia de aminoácidos de interés nutricional y tecnológico. En conjunto, el trabajo permitió definir una estrategia simple y efectiva para valorizar biomasa de *K. marxianus* obtenida a partir de lactosuero, generando un extracto con potencial aplicación como fuente de nitrógeno orgánico en medios de cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Cátedra de Operaciones y Procesos Biotecnológicos, como así también a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

REFERENCIAS

- DEMIRGÜL, Furkan; ŞİMŞEK, Ömer; BOZKURT, Fatih; DERTLI, Enes; SAĞDIÇ, Osman. Production and characterization of yeast extracts produced by *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* and *Kluyveromyces marxianus*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, [S. l.], v. 52, n. 6, p. 657-667, 2022.
- DENG, Jieying; LI, Zhendong; LV, Xueqin; CHEN, Jian; LIU, Long. Precision hydrolysis: tailored yeast processing enzymes for yeast-based products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [S. l.], v. 110, artículo 5, 2026.
- FANCELLO, Francesco; ZARA, Giacomo; HATAMI, Forough; SCANO, Efisio Antonio; MANNAZZU, Ilaria. Unlocking the potential of second cheese whey: a comprehensive review on valorisation strategies. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, [S. l.], v. 23, n. 2, p. 411-441, 2024.

FERREIRA, Inês M.; GUIDO, Luís F. Impact of wort amino acids on beer flavour: a review. *Fermentation*, Basel, v. 4, n. 2, artigo 23, 2018.

GILMOUR, Stephanie R.; HOLROYD, Suzanne E.; FUAD, Muhammad D.; ELGAR, David; FANNING, Ann C. Amino acid composition of dried bovine dairy powders from a range of product streams. *Foods*, Basel, v. 13, n. 23, artigo 3901, 2024.

HILL, Annie E.; STEWART, Graham G. Free amino nitrogen in brewing. *Fermentation*, Basel, v. 5, n. 1, artigo 22, 2019. DOI: 10.3390/fermentation5010022.

KOLLER, Hayden; PERKINS, Lewis B. Brewing and the chemical composition of amine-containing compounds in beer: a review. *Foods*, Basel, v. 11, n. 3, artigo 257, 2022.

MIN, Ju Hyun; LEE, Yeon Ju; KANG, Hye Jee; MOON, Na Rae; PARK, Yong Kuk; JOO, Seon-Tea; JUNG, Young Hoon. Characterization of yeast protein hydrolysate for potential application as a feed additive. *Food Science of Animal Resources*, Seoul, v. 44, n. 3, p. 723-737, 2024.

OBSERVATORIO DE LA CADENA LÁCTEA ARGENTINA. Datos clave de la lechería argentina: año 2025. [S. l.]: OCLA, 2026. <https://www.ocla.org.ar/noticias/35415387-datos-clave-de-la-lecheria-argentina-ano-2025>.

PÁEZ, Gisela; JIMÉNEZ, Eduardo; MÁRMOL, Zulay; FERRER, José; SULBARÁN, Betzabé; OJEDA, Graciela; ARAUJO, Karelen; RINCÓN, Marisela. Perfil de aminoácidos de la proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. *Interciencia*, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 297-300, 2008.

PIRES, Arona Figueroa; MARNOTES, Natalí García; RUBIO, Olga Díaz; GARCIA, Angel Cobos; PEREIRA, Carlos Dias. Dairy By-Products: A Review on the Valorization of Whey and Second Cheese Whey. *Foods*, Basel, v. 10, n. 5, artigo 1067, 2021.

REINA-POSSO, Diana; GONZALES-ZUBIATE, Fernando A. Expanding Horizons: The Untapped Potential of *Kluyveromyces marxianus* in Biotechnological Applications. *Fermentation*, Basel, v. 11, n. 2, artigo 98, 2025.

TALAMONI, Silvina; CASTELLS, María Laura; GONZÁLEZ, Marcelo Ariel; KARLEN, Josefina. El aprovechamiento del lactosuero en Argentina: situación de mercado y los desafíos para su desarrollo. San Martín: Instituto Nacional de Tecnología Industrial, 2023. https://www.inti.gob.ar/assets/uploads/files/economia-industrial/02-2023/lactosuero_argentina_final_v2.pdf.

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*, Seoul, v. 33, n. 2, p. 151-166, 2023.

ZEKO-PIVAČ, Anđela; HABSCHIED, Kristina; KULISIC, Biljana; BARKOW, Ingo; TIŠMA, Marina. Valorization of Spent Brewer's Yeast for the Production of High-Value Products, Materials, and Biofuels and Environmental Application. *Fermentation*, Basel, v. 9, n. 3, artigo 208, 2023.