

# ASLAMIENTO DE LEVADURAS NATIVAS A PARTIR DE SUEROS LÁCTEOS DE EMPRESAS PYMES DE LA PROVINCIA DE SANTA FE.

A. Massera<sup>i</sup>, M. B. Pirola<sup>ii</sup>, R. Páez<sup>i</sup>.

<sup>i</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) EEA Rafaela,

<sup>ii</sup>Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) Lácteos Rafaela.

[bpirola@inti.gob.ar](mailto:bpirola@inti.gob.ar)

## OBJETIVO

Aislar e identificar genotípicamente cepas nativas de *Kluyveromyces marxianus* y/o *Kluyveromyces lactis* aisladas de ambientes de quesería (objetivo específico de la línea "Levaduras" del Proyecto FONARSEC Agroindustria "Ecosuero con Valor Agregado" N° 03/2010).

## DESCRIPCIÓN

Las cepas de levaduras de las especies *K. marxianus* y *K. lactis* utilizan la lactosa como fuente de carbono. Estos microorganismos pueden estar presentes en ambientes de queserías. Son levaduras de gran interés industrial ya que son capaces de utilizar el suero de quesería y/o sus derivados para producir biomasa o metabolitos de interés industrial como enzimas o etanol (González Siso, 1996).

Para el aislamiento de las levaduras se tomaron asépticamente muestras de suero de queso no pasteurizado de seis PyMES queseras de la provincia de Santa Fe. A estas muestras se les adicionó cloranfenicol 50 µg/mL para inhibir el desarrollo de bacterias. Además se las incubó en agitación a 150 rpm durante 20 h a 28 °C para favorecer la multiplicación de las levaduras. Una alícuota de este cultivo fue sembrada en placas de Petri con el medio de cultivo sintético ML (Medio Lactosa), con lactosa como única fuente de carbono (Lukondeh y col., 2003). Las levaduras capaces de crecer en dicho medio se identificaron empleando los métodos moleculares propuestos por Belloch y colaboradores (1998). Como primer paso, a las colonias aisladas de levaduras se las cultivó en el medio YDP (5 g/L extracto de levadura, 5 g/L peptona de carne, 40 g/L glucosa). A partir de este cultivo se extrajo el ADN utilizando un kit de extracción comercial (Promega). Para la identificación por métodos moleculares se amplificó un fragmento de la región ITS (*internal transcribed spacer*) del ADN ribosomal, el cual fue digerido con enzimas de restricción (*CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*) para obtener

patrones de digestión característicos de cada especie de levadura aislada (Tabla 1).

Fragmentos generados, en pares de bases (bp), luego de digestión con enzimas de restricción.		
<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>
285+185+140+100	655+80	240+185+120+80+65+50

Tabla 1. Tamaño de los fragmentos de restricción obtenidos a partir de la digestión con diferentes enzimas de restricción (*CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*) de la región ITS de *Kluyveromyces marxianus* (Esteve-Zarzoso y col, 1999).

Posteriormente, se utilizó la técnica de amplificación de las secuencias inter-LTR (Sohier y col., 2009), para diferenciar cepas de *K. marxianus*. Todas estas metodologías fueron previamente puestas a punto utilizando levaduras de referencia provistas por la *ARS Culture Collection*.

Las cepas de levaduras identificadas fueron conservadas a -20 °C para futuros estudios de sus características tecnológicas. Dichos estudios implican la determinación de la velocidad de consumo de lactosa y optimizar las condiciones de cultivo para lograr una mayor producción de biomasa microbiana en medios a base de lactosa.

## RESULTADOS

Se han aislado en total 126 levaduras capaces de degradar la lactosa. Del total de las levaduras aisladas, 66 fueron identificadas como *K. marxianus* mediante la amplificación de un fragmento de la región ITS de 740 bp (pares de bases) de longitud (figura 1), con la que se obtuvo el patrón de fragmentos de restricción característico al utilizar las enzimas *CfoI*, *HaeIII* y *HinfI* (figura 2). No se aislaron cepas de *K. lactis* a partir de muestras de suero de queso de la región. Es posible que en los ambientes de las queserías muestreadas no se encuentre esta cepa o que la misma se halle en tan baja cantidad que sea difícil identificarla con el método empleado. De todas formas, a los fines del proyecto, lo importante era obtener cepas de al menos una de las especies mencionadas. Otros autores han descrito el uso de ambas cepas en la producción de biomasa de levaduras (Bekatorou y col., 2006).

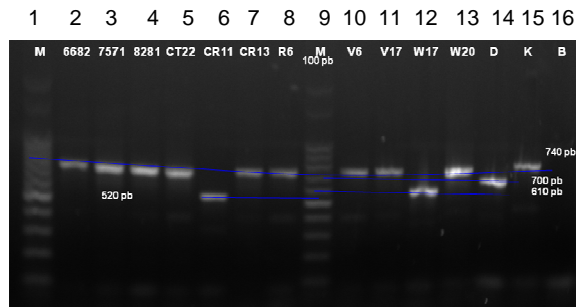


Figura 1. Fragmentos de la región ITS obtenidos a partir de levaduras aisladas de suero de quesería M: marcador de peso molecular 100 pb.

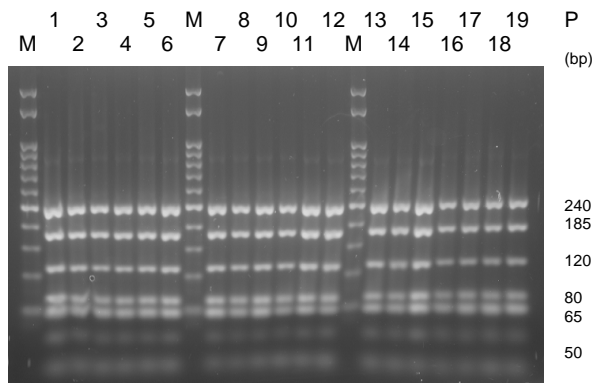


Figura 2. Patrón de restricción obtenido a partir de la digestión del fragmento ITS de 740 pb (calle 1 a 19) con la enzima de restricción *Hinf*I. M: marcador de peso molecular 100 pb. P: peso molecular de los fragmentos obtenidos.

La amplificación de las secuencias inter-LTR nos permitió identificar 30 cepas diferentes dentro de la especie *K. marxianus* (figura 3).

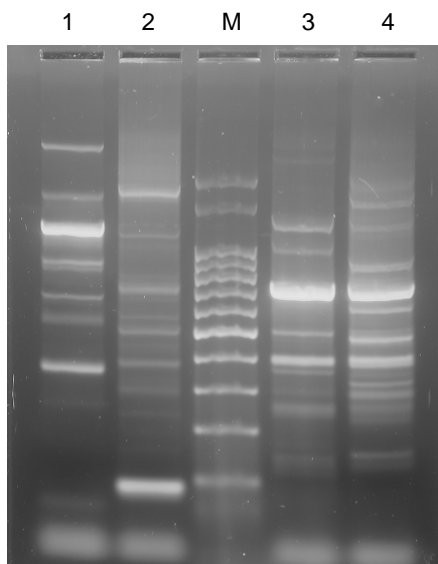


Figura 3: patrón molecular de amplificación de las secuencias inter-LTR de *K. marxianus*. Cepas nativas: calles 1, 2, 3 y 5; M: marcador de peso molecular 100 pb.

Las cepas identificadas fueron conservadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y conforman un cepario de interés biotecnológico que será evaluado para la

producción de biomasa de levadura y/o la obtención de productos metabólicos de interés industrial.

## CONCLUSIONES

Se ha cumplido con el objetivo específico del proyecto FONARSEC Ecosuero con Valor Agregado. Hemos obtenido cepas nativas de ambientes de quesería de la zona. A partir de las cepas obtenidas y luego de seleccionar aquellas que presentan mejores características tecnológicas, se procederá a estudiar la obtención de biomasa utilizando como medio de cultivo suero de quesería. Por este método se espera bioconvertir la lactosa de este subproducto en proteína microbiana, que puede ser utilizada como alimentación animal. De este modo, se daría valor al lactosuero generado en las industrias y se reduciría el problema de contaminación que ocasiona el mismo al ser volcado al ambiente.

## BIBLIOGRAFIA

Bekatorou, A., Psarianos, C., Koutinas, A. (2006). Food grade yeasts. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (3), 407-415.

Belloch, C., Barrio, E., García, M.D., Querol, A. (1998). Phylogenetic reconstruction of the yeast genus *Kluyveromyces*: restriction map analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Systematic and Applied Microbiology*, 21, 266-278.

Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. (1999) Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329-337.

González Siso, M.I. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 57, 1-11.

Lukondeh, T., Ashbolt, N.J., Rogers, P.L. (2003). Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 grown on a lactose-based medium as a source of a natural bioemulsifier. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30, 715-720.

Sohier, D., Le Dizes, A.M., Thuault, D., Neuveglise, C., Cotton, E., Casaregola, S. (2009). Important genetic diversity revealed by inter-LTR PCR fingerprinting of *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii* strains from French traditional cheeses. *Dairy Science Technology*, 89, 569-581.