



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE INGENIERÍA
CARRERA DE AGROINDUSTRIA**

Título

**OBTENCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR DE *Kluyveromyces marxianus*
CON EL APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES
(SUERO DE MANTEQUILLA) Y SUS APLICACIONES.**

**Trabajo de Titulación para optar al título de Ingeniera
Agroindustrial**

Autora:

González Rodas Gina Stephanie

Tutora:

Dra. Ana Mejía López

Riobamba, Ecuador. 2022

DECLARATORIA DE AUTORÍA

Yo, **Gina Stephanie González Rodas**, con cédula de ciudadanía 0105129548, autor (a) (s) del trabajo de investigación titulado: **OBTENCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR DE *Kluyveromyces marxianus* CON EL APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES (SUERO DE MANTEQUILLA) Y SUS APLICACIONES**, certifico que la producción, ideas, opiniones, criterios, contenidos y conclusiones expuestas son de mí exclusiva responsabilidad.

Asimismo, cedo a la Universidad Nacional de Chimborazo, en forma no exclusiva, los derechos para su uso, comunicación pública, distribución, divulgación y/o reproducción total o parcial, por medio físico o digital; en esta cesión se entiende que el cesionario no podrá obtener beneficios económicos. La posible reclamación de terceros respecto de los derechos de autor (a) de la obra referida, será de mi entera responsabilidad; librando a la Universidad Nacional de Chimborazo de posibles obligaciones.

En Riobamba, 02 de diciembre de 2022.



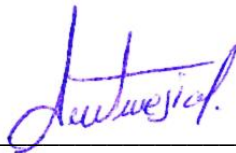
Gina Stephanie González Rodas

C.I: 0105129548

DICTAMEN FAVORABLE DEL PROFESOR TUTOR

Quien suscribe, Dra. Ana Mejía López catedrático adscrito a la Facultad de **Ingeniería**, por medio del presente documento certifico haber asesorado y revisado el desarrollo del trabajo de investigación titulado: **OBTENCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR DE *Kluyveromyces marxianus* CON EL APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES (SUERO DE MANTEQUILLA) Y SUS APLICACIONES**, bajo la autoría de **Gina Stephanie González Rodas**; por lo que se autoriza ejecutar los trámites legales para su sustentación.

Es todo cuanto informar en honor a la verdad; en Riobamba, a los días 02 de diciembre del 2022



Dra. Ana Mejía López

C.I: 0601948813

CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Quienes suscribimos, catedráticos designados Miembros del Tribunal de Grado para la evaluación del trabajo de investigación OBTENCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR DE *Kluyveromyces marxianus* CON EL APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES (SUERO DE MANTEQUILLA) Y SUS APLICACIONES, presentado por Gina Stephanie González Rodas, con cédula de identidad número 0105129548, bajo la tutoría de Dra. Ana Mejía López; certificamos que recomendamos la APROBACIÓN de este con fines de titulación. Previamente se ha evaluado el trabajo de investigación y escuchada la sustentación por parte de su autor; no teniendo más nada que observar.

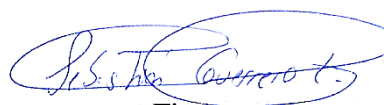
De conformidad a la normativa aplicable firmamos, en Riobamba 02 de diciembre del 2022.

Presidente del Tribunal de Grado
PhD. Sonia Rodas



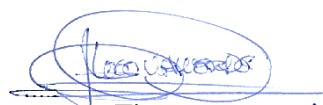
Firma

Miembro del Tribunal de Grado
MsC. Sebastián Guerrero



Firma

Miembro del Tribunal de Grado
MsC. Víctor Valverde



Firma

CERTIFICADO ANTIPLAGIO

Original



Dirección
Académica
VICERRECTORADO ACADÉMICO



CERTIFICACIÓN

Que, **GONZÁLEZ RODAS GINA STEPHANIE** con CC: **0105129548**, estudiante de la Carrera **AGROINDUSTRIA**, Facultad de **INGENIERÍA**; ha trabajado bajo mi tutoría el trabajo de investigación titulado "**OBTENCIÓN DE PROTEÍNA UNICELULAR DE *Kluyveromyces marxianus* CON EL APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES (SUERO DE MANTEQUILLA) Y SUS APLICACIONES**", cumple con el **9 %**, de acuerdo al reporte del sistema Anti plagio **URKUND**, porcentaje aceptado de acuerdo a la reglamentación institucional, por consiguiente, autorizo continuar con el proceso.

Riobamba, 29 de noviembre de 2022

Mgs. Ana Mejía López
TUTORA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia por su apoyo incondicional, paciencia y sacrificio para que pueda cumplir mis metas de estudio, especialmente a mi tía Imelda Rodas que es como una segunda madre para mí.

A mis hermanas Eliana y Diana por estar siempre conmigo en los buenos y malos momentos de la vida.

A mi abuelita Rosa y mi mamá Beatris que por circunstancias de la vida ya no se encuentran conmigo, pero sé que aún me cuidan desde el cielo, sin sus enseñanzas de vida, principios y valores no hubiera logrado ser la persona que soy ahora.

Gina Stephanie González Rodas

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de Chimborazo y a la Escuela de Agroindustria por abrirme las puertas y darme la oportunidad de recibir una educación de calidad.

A todos los docentes que me acompañaron a lo largo de la carrera con sus enseñanzas y formación académica.

A la Ing. Estefanía Peña por apoyarme y guiarme desde el principio de la realización de este proyecto, mis mejores deseos y éxitos en esta nueva etapa de su vida.

A la Dra. Ana Mejía por ser una fuente de inspiración personal, gracias por sus consejos y apoyo para culminar el trabajo de investigación.

A una persona muy especial en mi vida J. que me brindó su amor y me acompañó a lo largo de la realización del proyecto.

A mis amigos Víctor y Mayerling por todo su cariño y amistad siempre los llevaré en mi corazón y a todas las personas que hicieron posible esta investigación.

Gina Stephanie González Rodas

ÍNDICE GENERAL

DECLARATORIA DE AUTORÍA	
DICTAMEN FAVORABLE DEL PROFESOR TUTOR	
CERTIFICADO DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL	
CERTIFICADO ANTIPLAGIO	
DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
RESUMEN	
ABSTRACT	
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. Antecedentes.....	15
1.2. Problema.....	16
1.3. Justificación.....	17
1.4.1. Objetivo general	18
1.4.2. Objetivos específicos.....	18
CAPÍTULO II. ESTADO DEL ARTE Y MARCO TEÓRICO.....	19
2.1. Estado del Arte	19
2.2. Marco teórico.....	20
2.2.1. Suero de mantequilla	20
2.2.1.2. Tipos de suero de mantequilla.....	22
2.2.1.3. Composición del suero de mantequilla.....	22
2.2.1.4. Aplicaciones del suero de mantequilla	23
2.2.1.5. Perspectivas actuales del suero de mantequilla.....	24
2.2.2. Proteína unicelular.....	24
2.2.2.1. Valor nutricional de la proteína unicelular.....	26
2.2.2.2. Producción de proteína unicelular	26
2.2.2.3. Factores que afectan la producción de proteína unicelular.....	30
2.2.2.5. Ventajas y desventajas de la proteína unicelular	32
2.2.2.6. Aplicaciones de la proteína unicelular.....	33
CAPÍTULO III. METODOLOGIA.....	35
3.1. Tipo de Investigación.	35
3.2. Diseño de Investigación.....	35
3.3. Técnica de recolección de datos	36
3.4. Procedimiento.....	37

3.4.1. Descripción de la obtención de la proteína unicelular.....	39
3.4.1.1. Preparación del sustrato.....	39
3.4.1.2. Preparación del inóculo	40
3.4.1.2. Fermentación	40
3.4.1.3. Rendimiento de la biomasa	40
3.5. Métodos de análisis	41
3.5.1. Métodos de análisis para el suero de mantequilla	41
3.5.2. Métodos de análisis para la proteína unicelular.....	42
3.6. Procesamiento de datos.	45
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1. Caracterización del suero de mantequilla.....	46
4.2. Obtención de la proteína unicelular.....	48
4.2.3. Discusión de la obtención de la proteína unicelular	50
4.3. Recolección de la proteína unicelular.....	51
4.4. Caracterización de la biomasa	52
4.4. Aplicaciones de la proteína unicelular.....	55
4.4.1. Aplicaciones de proteína unicelular de <i>K. marxianus</i> en alimentación animal.....	56
4.4.2. Aplicaciones de proteína unicelular de <i>K. marxianus</i> en la alimentación humana ...	57
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	60
5.1. Conclusiones.....	60
5.2. Recomendaciones	61
BIBLIOGRAFÍA	62
ANEXOS	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Composición química de los tipos de suero de mantequilla vs lactosuero.....	23
Tabla 2	Características generales de la biomasa de diferentes microorganismos	25
Tabla 3	Composición promedio de los diferentes microorganismos en base seca.....	26
Tabla 4	Factores que afectan la producción de PUC	31
Tabla 5	Diseño experimental de la investigación	35
Tabla 6	Métodos de análisis para la caracterización del suero de mantequilla	41
Tabla 7	Caracterización fisicoquímica de sueros de mantequilla.....	46
Tabla 8	Rendimiento de la proteína unicelular para cada tratamiento	49
Tabla 9	Composición proximal de las fuentes proteicas.	52
Tabla 10	Caracterización de estudios incluidos en la investigación.....	72
Tabla 11	Aplicaciones de la PUC de <i>K. marxianus</i> en alimentación animal	75
Tabla 12	Aplicaciones de la PUC de <i>K. marxianus</i> en alimentación humana	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Diagrama de la elaboración de mantequilla y tipos de suero.....	21
Figura 2 Pasos básicos de la producción de PUC.....	27
Figura 3 Diagrama de flujo de la obtención de proteína unicelular	38
Figura 4 Gráfico de medias del rendimiento en función de los tratamientos.....	50
Figura 5 Diagrama del proceso sistemático PRISMA.....	55

RESUMEN

La constante preocupación por el manejo de residuos agroindustriales exige la búsqueda de nuevas aplicaciones que aprovechen de manera eficiente estos residuos y reduzcan el impacto ambiental, una alternativa viable es la producción de proteína unicelular (PUC) que, mediante el desarrollo tecnológico convierte los desechos como el suero de mantequilla en productos de alto valor agregado, por tal motivo, el presente proyecto de investigación tuvo como fin obtener proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* a partir de la fermentación con suero de mantequilla y mediante revisión bibliográfica determinar sus posibles aplicaciones en la alimentación humana y animal. Para ello se cultivó la levadura en un sistema por lotes en un medio de cultivo compuesto por suero de mantequilla desproteínizado y suplementado con peptona y glucosa al 2% y 3% como únicas fuentes de energía, a pH de 4,5, temperatura de 30°C a 100 rpm durante 24h. Se aplicó un análisis de varianza ANOVA y prueba Tukey ($p < 0,05$) para determinar significancias estadísticas en función del rendimiento celular y se encontró que el máximo rendimiento de la proteína fue del 27,07% con suero suplementado con glucosa al 3%. La caracterización de la biomasa producida dio como resultado un alto contenido de proteína del 27,73%, grasa 16,98% y cenizas 23,55% que lo convierten en un producto de alto valor nutricional comparable con otras fuentes proteicas tradicionales. Por último, en la determinación de sus posibles aplicaciones se realizó una revisión sistemática mediante la declaración PRISMA, donde fueron seleccionados 11 estudios para su análisis. Los resultados reflejaron que la biomasa de esta levadura puede sustituir las fuentes proteicas convencionales de balanceados y aplicarse directamente como ingrediente proteico para dietas acuícolas (salmón, trucha y tilapia), avícolas e incluso para el ganado bovino, sin embargo, su incorporación para la dieta humana aún se encuentra en desarrollo, por lo que aplicar nuevas técnicas y herramientas para su uso sigue siendo un desafío.

Palabras claves: suero de mantequilla, proteína unicelular, *Kluyveromyces marxianus*, fermentación.

ABSTRACT

The constant concern for managing agro-industrial residues requires the search for new applications that efficiently take advantage of these residues and reduce the environmental impact. A viable alternative is the production of single-cell protein (SCP) that, through technological development, converts waste such as buttermilk into products with high added value. For this reason, the present research project aimed to obtain a single-cell protein of *Kluyveromyces marxianus* from fermentation with buttermilk and, through a bibliographic review, determine its possible applications in human and animal nutrition. For this, the yeast was grown in a batch system in a culture medium composed of deproteinized buttermilk and supplemented with peptone and glucose at 2% and 3% as the only energy sources, at a pH of 4.5, a temperature of 30 °C at 100 rpm for 24h. An analysis of variance ANOVA and the Tukey test ($p < 0.05$) were applied to determine statistical significance based on cell yield. It was found that the maximum protein yield was 27.07% with whey supplemented with 3% glucose. The characterization of the produced biomass resulted in a high protein content of 27.73%, fat 16.98%, and ash 23.55%, which make it a product of high nutritional value compared to other traditional protein sources. Finally, in determining its possible applications, a systematic review was carried out using the PRISMA statement, where 11 studies were selected for analysis. The results showed that the biomass of this yeast could replace conventional balanced protein sources and be applied directly as a protein ingredient for aquaculture diets (salmon, trout, and tilapia), poultry, and cattle. However, its incorporation into the diet is still developing, so applying new techniques and tools remains challenging.

Keywords: buttermilk, single cell protein, *Kluyveromyces marxianus*, fermentation.


KERLY
YESENIA
CABEZAS
LLERENA

Reviewed by:

Mgs. Kerly Cabezas

ENGLISH PROFESSOR

C.C 0604042382

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La proteína es un macronutriente primordial en la dieta de animales y humanos, a partir de ellas se construyen nuevas proteínas estructurales y funcionales (enzimas y hormonas). El valor nutricional de una proteína viene determinado por la composición de aminoácidos, algunos de ellos no pueden ser sintetizados por los humanos o animales, por lo tanto, deben suministrarse a través de los alimentos (Wu, 2009).

Las principales fuentes proteicas disponibles en la dieta incluyen alimentos de origen animal y vegetal, sin embargo, dichas prácticas convencionales no son una alternativa sustentable para satisfacer el continuo crecimiento poblacional y el incremento en la demanda de alimentos y piensos, por lo que es necesario buscar nuevas fuentes proteicas de calidad, combinadas con una producción éticamente sostenible. La obtención de proteína unicelular a partir de residuos agroindustriales mediante la fermentación de microorganismos representa uno de los enfoques más ventajosos y sobre todo una alternativa a las fuentes proteicas convencionales de alimentos y piensos, debido a que el contenido de proteína en los microorganismos oscila alrededor del 30 al 80% en su biomasa seca (Hoffman et al., 2004; Ritala et al., 2017; Nasserri et al., 2011).

Por otro lado, el suero de mantequilla es un potencial residuo de la industria láctea, que se obtiene tras el proceso de la elaboración de mantequilla, posee una cantidad considerable de proteínas, lactosa y fosfolípidos. No obstante, en el país es considerado un desecho, y descargado al medio ambiente sin previo tratamiento. El suero contiene una alta cantidad de materia orgánica, por lo que puede ser aprovechado como sustrato para la producción de proteína unicelular (Bylund, 2003; Corredig et al., 2003; Torrez, 2017).

Así pues, el presente trabajo de investigación trató sobre el aprovechamiento del suero de mantequilla como sustrato para la obtención de proteína unicelular mediante la fermentación con *Kluyveromyces marxianus*, variando las concentraciones de peptona y

glucosa para obtener un mayor rendimiento y eficiencia del proceso. Además, se realizó una revisión bibliográfica para identificar las posibles aplicaciones de la proteína unicelular en la alimentación humana y animal.

1.1. Antecedentes

La producción de proteína unicelular como alimento para los seres humanos y animales, se ha venido desarrollado desde hace ya varios años atrás. De hecho, su producción a gran escala se desarrolló en el siglo XX durante la Primera Guerra Mundial y se enfocó especialmente en los problemas de hambre y desnutrición del mundo en 1960 (Reihani et al., 2019; Khadse et al., 2018).

La proteína unicelular se define como la biomasa de células secas de microorganismos (algas, hongos, levaduras y bacterias), que generalmente se utilizan como suplemento proteico en alimentos para humanos o animales, también se les conoce como concentrado natural de proteína puesto que, la proteína representa la mayor parte de las células microbianas. Los microorganismos son capaces de usar una gran variedad de sustratos como efluentes agrícolas, desechos industriales, desechos agroindustriales y gases naturales como metano, descomponiendo gran parte de los contaminantes presentes en ellos (Nasseri et al., 2011).

El suero de mantequilla o mazada contiene una considerable cantidad de nutrientes (lactosa, proteínas y fosfolípidos) y puede ser aprovechado como materia prima valiosa en una amplia gama de aplicaciones de la industria alimentaria, aun así, la mayor parte es desechado por los desagües y en el mejor de los casos utilizado como alimento para animales (Corredig et al., 2003).

Considerando la amplia variedad de microorganismos existentes, sustratos y la escasez de proteínas en el mundo, la investigación de sus condiciones óptimas para producir una

mayor cantidad y desde el aspecto nutricional, una mejor calidad de proteína unicelular sigue siendo un campo atractivo para la investigación en todo el mundo (Reihani et al., 2019).

1.2. Problema

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO (2009) para el año 2050, la población mundial alcanzará los 9.100 millones de habitantes, por lo que la demanda total de alimentos y piensos requiere un aumento sustancial de la producción de alimentos del 70 %, lo que supondrá una cantidad adicional de casi 1000 millones de toneladas de cereales y 200 millones de toneladas de carne, sin embargo, aumentar la producción agrícola y ganadera para satisfacer la creciente demanda no es una alternativa sostenible (Ritala et al., 2017).

La producción de alimentos es una de las actividades humanas con mayor impacto ecológico, representando el 26% de las emisiones antropogénicas globales de gases de efecto invernadero (GEI). Así, los productos de origen animal utilizan el 83% de las tierras cultivables y son responsables de entre el 56-58% de las emisiones totales de GEI de la producción de alimentos. La cantidad de dióxido de carbono (CO_2) liberado a la atmósfera por este sector es de aproximadamente 7516 millones de toneladas por año, siendo mucho más contaminante que la industria del transporte. Así mismo, las fuentes de proteínas de origen vegetal requieren tierra cultivable y agua, recursos que se volverán limitantes a medida que nos esforzamos por satisfacer la demanda mundial de proteínas (ECODES, 2017; Dopelt et al., 2019; Ritala et al., 2017).

Por otro parte, los subproductos derivados del sector agroindustrial, especialmente de la industria láctea suponen un grave problema para el medio ambiente, por lo que suelen representar cantidades significativas, tal es el caso del suero de mantequilla, un contaminante potencial debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno (DQO), pese a ello por sus características composicionales se considera una materia prima de alto valor biológico y

nutricional, aunque por la falta de conocimiento sobre su caracterización y métodos apropiados para su utilización este residuo aún no ha sido aprovechado eficientemente (Torrez, 2017; Vargas & Pérez, 2018).

1.3. Justificación

La obtención de proteína unicelular (PUC), a través de la fermentación es uno de los enfoques más ventajosos y el proceso de producción es una vía biotecnológica adecuada para el aprovechamiento de desechos agroindustriales con alto valor nutricional tal como el suero de mantequilla. Además, su producción se considera un proceso respetuoso con el medio ambiente y la biomasa microbiana representa una solución creíble para garantizar la seguridad alimentaria futura y minimizar el impacto en la sostenibilidad global (Nasseri et al., 2011; Molfetta et al., 2022).

Del mismo modo, debido a su alto contenido en proteína y bajo costo de producción, la proteína unicelular puede representar una alternativa sustentable de las fuentes proteicas convencionales, presentando una serie de ventajas como; alta eficiencia en la conversión de sustratos, alta productividad derivada de la rápida tasa de crecimiento de los microorganismos e independencia de factores estacionales y climatológicos (Ritala et al., 2017).

Aunque en la actualidad la proteína microbiana corresponde una proporción relativamente pequeña de la nutrición humana y animal, es probable que la creciente demanda mundial de proteína haga que la proteína unicelular sea cada vez más importante (Boland et al., 2013).

De igual forma Reihani et al. (2019) indican que la estructura química y el tipo de sustrato afectan directamente el crecimiento celular y el resultado de la fermentación. En consecuencia, es extremadamente importante optimizar las condiciones y técnicas de fermentación para cada tipo de sustrato utilizado y nutrientes de cultivo para lograr la mayor

ventaja del proceso. Por lo que, el presente proyecto de investigación busca la optimización de las condiciones de cultivo para la obtención de proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* mediante suero de mantequilla e informa sobre sus aplicaciones específicas e incorporación en la alimentación humana y animal.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Obtener proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* con el aprovechamiento de residuos agroindustriales y determinar sus posibles aplicaciones.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar las características fisicoquímicas y composicionales del suero ácido y dulce obtenido de la fabricación de mantequilla.
- Optimizar el proceso a escala laboratorio para la producción de proteína unicelular.
- Separar la proteína unicelular.
- Realizar un análisis proximal de la proteína unicelular.
- Analizar mediante una revisión bibliográfica las aplicaciones de proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* en alimentación animal y humana.

CAPÍTULO II. ESTADO DEL ARTE Y MARCO TEÓRICO

2.1. Estado del Arte

De acuerdo con Nayeem et al. (2017) en su estudio sobre la optimización de sustrato de bajo costo para la producción de proteína unicelular utilizando *Kluyveromyces marxianus* concluye que, el suero es un sustrato adecuado para la producción de proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* y que se puede obtener un rendimiento rentable dentro de las 24h del proceso de fermentación de 36 mg/ml con alto contenido de proteína bruta del 83,33%.

Haghighi et al. (2013) en su estudio de la producción comparativa de proteína unicelular a partir de residuos de aislado de proteínas de pescado y suero de queso ultrafiltrado (UF) determinó que, el suero de queso UF presentó mayor rendimiento de proteína unicelular a partir de la fermentación de *Kluyveromyces marxianus* del 38,34%, bajo condiciones discontinuas y aeróbicas con un pH de 4,5 y una temperatura de incubación de 35°C, reduciendo significativa el DQO y DBO del suero UF.

Según Fonseca et al. (2013) en su investigación sobre el crecimiento de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 en diferentes combinaciones de azúcares como única fuente de carbono y energía, empleó un medio de crecimiento sintético con diferentes mezclas de azúcares y concluyó que *K. marxianus* CBS 6556 no presenta requerimientos nutricionales especiales; crece bien a un rango de temperatura de 30 a 37 °C; es capaz de crecer en mezclas de azúcar en un período de tiempo más corto que *S. cerevisiae* y desvía pequeñas cantidades de carbono hacia la formación de metabolitos, siempre que se mantenga en condiciones aeróbicas.

Bratosin et al. (2021) en su investigación sobre la proteína unicelular como sustituto potencial en la nutrición humana y animal encontraron que la biomasa de levadura se puede utilizar en la nutrición animal como suplemento nutritivo o complemento de balanceados

para animales como perros y peces, incluso se aplica como condimento en dietas vegetarianas y veganas debido a su excelente calidad nutricional y propiedades benéficas. Además, sugieren que la biomasa se puede utilizar en la industria de la acuicultura como sustituto de la harina de pescado, gracias a su perfil de nutrientes superior y producción económicamente rentable a gran escala.

Por otra parte, Karim et al. (2022) en su revisión bibliográfica sobre las aplicaciones específicas las células de la levadura *Kluyveromyces marxianus* señala que esta levadura posee varias características beneficiosas que la hacen adecuada para diferentes aplicaciones biotecnológicas e industriales como la generación de una amplia gama de metabolitos específicos como enzimas, la producción de proteína unicelular y aceite unicelular.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Suero de mantequilla

El suero de mantequilla o también conocido como “mazada” es un subproducto de la industria láctea y corresponde a la fracción líquida que se libera durante el proceso de batido de la crema dulce o ácida de la leche, en la producción de mantequilla. La agitación mecánica que involucra la operación de batido y la presencia de aire provoca una desestabilización de la emulsión inicial de los glóbulos de la grasa de la leche, separando la crema en dos fases; una fase sólida conocida como mantequilla o concentrado de mantequilla y otra líquida, que corresponde al suero (Barukčić et al., 2019a; Conway et al., 2014).

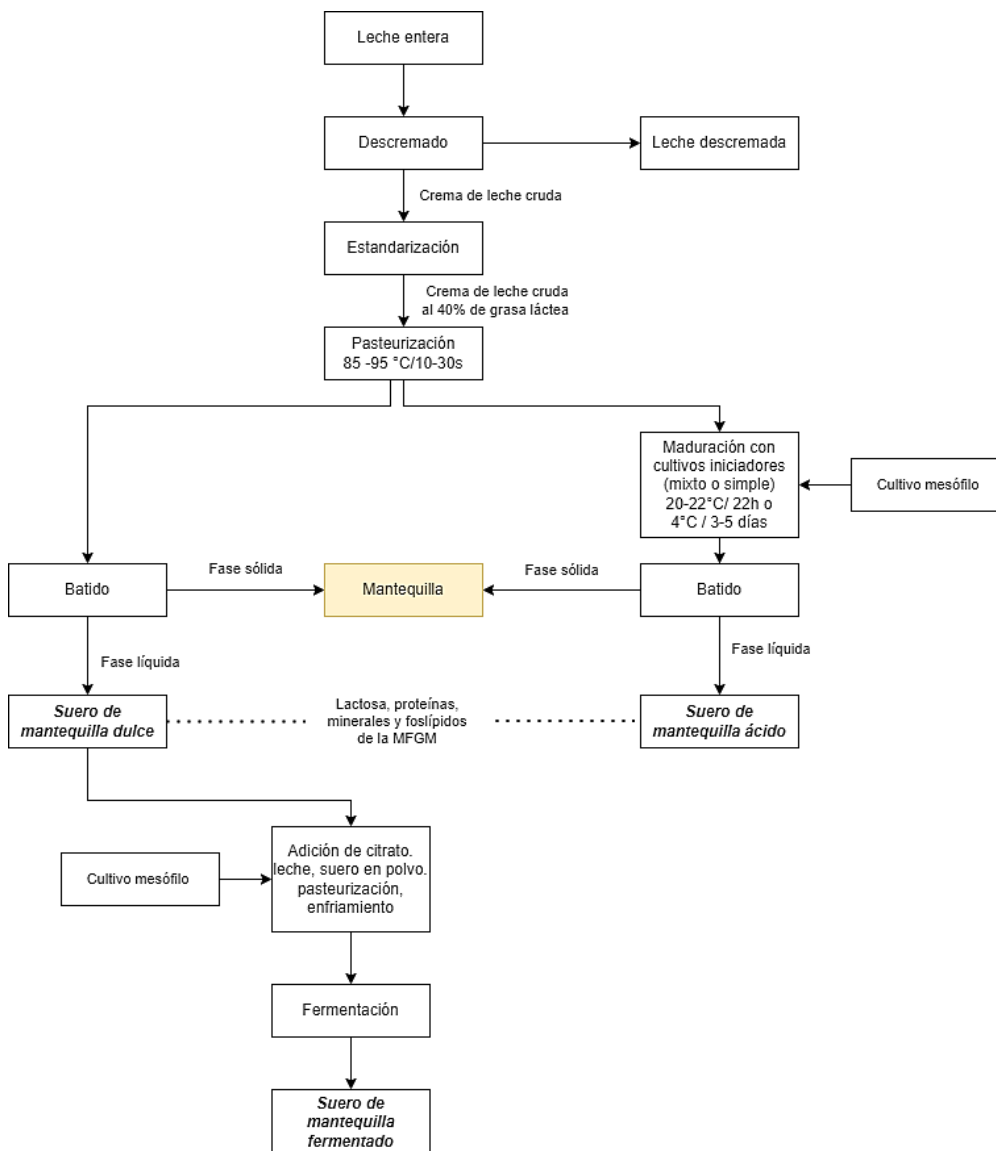
El suero de mantequilla se caracteriza principalmente por su alto contenido de fosfolípidos que se derivan de la membrana del glóbulo de grasa de la leche (MFGM). La concentración de fosfolípidos en el suero es de hasta siete veces mayor (aproximadamente 0,89 mg/g) que la leche entera (Szkolnicka et al. 2020; Barukčić et al., 2019b).

Según Narvhus & Abrahamsen (2022) la mantequilla está hecha de crema con un contenido del 35% a 40% de grasa con crema dulce o fermentada antes del batido y las

características de la mantequilla y el suero de mantequilla producidos en estos dos procesos varían en varios aspectos. El rendimiento de la crema de leche en este proceso es de aproximadamente el 50% esto debido a que, según Boylston (2020) por cada 100 kg de leche cruda se obtienen 91.1 kg de leche descremada y 8.9 kg de crema de leche y a partir de la crema se produce 4,35 kg de mantequilla y 4,55 kg de suero. En la figura 1 se presenta un diagrama que describe el proceso de fabricación de mantequilla hasta la obtención de los diferentes tipos de suero.

Figura 1

Diagrama de la elaboración de mantequilla y tipos de suero



Nota. Adaptado de (Barukčić et al., 2019a; Narvhus & Abrahamsen, 2022)

2.2.1.2. Tipos de suero de mantequilla

De acuerdo con la NTE INEN 718 (2011) según su proceso, el suero de mantequilla se clasifica en:

- Suero de mantequilla (buttermilk) natural: Líquido prácticamente sin materia grasa que queda tras el proceso de elaboración de la mantequilla, y se comercializa en forma concentrada o en polvo (NTE INEN 718, 2011).
- Suero de mantequilla (buttermilk) cultivado: Obtenido por la fermentación de la leche descremada líquida, mediante la acidificación espontánea de las bacterias formadoras del ácido láctico, o por inoculación de cultivos bacterianos puros en la leche caliente (NTE INEN 718, 2011).

Según la crema utilizada:

- Suero de mantequilla ácido: es el líquido residual de la fabricación de mantequilla a partir de la crema ácida fermentada por acción de bacterias ácido lácticas (Barukčić et al., 2019a).
- Suero de mantequilla dulce: se obtiene a partir del batido de la crema de leche fresca pasteurizada y, generalmente la crema no es sometida a un proceso de maduración en este caso (Kumar et al., 2015).

2.2.1.3. Composición del suero de mantequilla

La composición general del suero de mantequilla es muy similar a la leche descremada, compuesta principalmente de lactosa, proteína (caseína y proteínas séricas), minerales y fosfolípidos derivados de la MFGM, sin embargo, según el tipo de tratamiento y procesamiento de la crema, las propiedades nutricionales y composicionales del suero de mantequilla puede variar considerablemente (Szkolnicka et al. 2020; Conway et al., 2014).

En la tabla 1 se presenta la composición química promedio de los diferentes tipos de suero de mantequilla con relación al lactosuero.

Tabla 1

Composición química de los tipos de suero de mantequilla vs suero de quesería.

Tipos de suero	Total Nitrógeno (%)	Lípidos (%)	Fosfolípidos (%)	Cenizas (%)	Lactosa (%)	pH
Suero de quesería	13,3	0,4	ND	7,5	78,8	5,6
Suero de mantequilla dulce	31,5 - 32,9	5,7 - 13,1	1,27 - 1,3	6,7 - 7,6	48,7 - 53,8	6,4 - 6,6
Suero de mantequilla ácido	27,8	22,3	1,2	6,2	43,7	5,4

Nota. Resultados expresados en base seca. ND. Datos no encontrados. Tomado de (Sodini et al., 2006)

2.2.1.4. Aplicaciones del suero de mantequilla

En el Ecuador el suero de mantequilla es un residuo infravalorado que se desecha directamente al ambiente sin previo tratamiento, sin embargo, en países como Rusia, Polonia, República Checa, Finlandia y Alemania, el suero de mantequilla se comercializa como bebida láctea para el consumo humano. Los problemas asociados con el consumo masivo de suero de mantequilla son la dificultad para obtener una calidad uniforme del producto y su corta vida útil aproximadamente de 1 semana a 4-7 ° C. Además, la oxidación de los fosfolípidos de la MFGM le da al suero de mantequilla un sabor desagradable a oxidado, metálico o aceitoso (Sodini et al. 2006; Narvhus &Abrahamsen, 2022).

El suero de mantequilla también puede ser expandido como polvo gracias a la concentración por el método de evaporación y secado. Dicho producto es ampliamente utilizado en la industria alimentaria como ingrediente para productos de panificación (panes, galletas, panqueques, waffles, pasteles o chocolates), en la industria del polvo para preparar mezclas secas y en la industria láctea (Ali, 2019; Sodini et al., 2006; Barukčić, 2019a).

2.2.1.5. Perspectivas actuales del suero de mantequilla

Recientes investigación evalúan alternativas para el uso de este residuo como reemplazo de la leche descremada en la elaboración de ciertos productos lácteos bajos en grasa, tal es el caso del yogur, en el que se ha demostrado su efectividad aumentando la viscosidad y capacidad de retención de agua durante el período de almacenamiento (Zhao et al., 2018). Del mismo modo para helados con un remplazo total de la leche descremada proporcionando al producto final mejores características fisicoquímicas (fusión e incorporación de aire) y sensoriales que un helado convencional, afirmando que el uso de suero de mantequilla puede mejorar el valor nutricional de los postres lácteos congelados (Ramos et al., 2021; Szkolnicka et al., 2020a).

Así mismo, la alta actividad biológica y funcionalidad de los componentes de la membrana del glóbulo de grasa de la leche han contribuido al creciente interés en el procesamiento posterior del suero de mantequilla, probado su validez como material de pared para encapsular aceite de algas, con el objetivo de evitar la oxidación de ciertos componentes (Boylston, 2019; Zhang et al., 2021).

2.2.2. Proteína unicelular

La proteína unicelular (PUC) también conocida como biomasa, bioproteína o proteína microbiana, son células secas de microorganismos (algas, bacterias, levaduras y hongos filamentosos) cultivados en condiciones controladas a partir de sustratos compuestos principalmente de carbono y nitrógeno, se utilizan generalmente como suplemento o componente proteico en la alimentación animal y humana. De igual manera, el término abarca a microorganismos muertos y desecados que se usan directamente sin ningún proceso de purificación de la proteína (Sharif et al., 2021; Forero et al., 2021; Chacón, 2004).

Los microorganismos utilizan una amplia variedad de sustratos y materias primas económicas para su crecimiento, incluidos sustratos como; residuos agrícolas, melazas,

almidón y sustratos no convencionales como el petróleo y derivados, gas natural, etanol, metanol e incluso residuos lignocelulósicos, reduciendo considerablemente el DQO de las corrientes de efluentes que dejan este tipo de plantas. De los microorganismos se puede obtener la biomasa, concentrado de proteínas o aminoácidos (Suman et al., 2015).

En la Tabla 2 se describen algunas de las características generales de la biomasa microbiana procedente de los principales microorganismos empleados en la producción de proteína unicelular.

Tabla 2

Características generales de la biomasa de diferentes microorganismos.

PUC	Microorganismos	Ventajas	Desventajas
Algas	<i>Spirulina,</i> <i>Chlorella</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Alto contenido de proteínas. • Aportan grasas, vitaminas A, B, C y E, sales minerales y clorofila. • Contenido relativamente bajo de ácidos nucleicos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Paredes celulares celulósicas, no digeribles para el ser humano. • Algunas especies pueden concentrar metales pesados.
Hongos	<i>Richoderma,</i> <i>Fusarium,</i> <i>Rhizopus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Poseen paredes celulares ricas en glucanos, que proporcionan fibra a la dieta. • Fácil recolección. 	<ul style="list-style-type: none"> • Tasas de crecimiento bajas. • Menor contenido de proteína.
Levaduras	<i>Candida,</i> <i>Saccharomyces,</i> <i>Kluyveromyces</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Alto contenido de lisina y capacidad de crecer a pH ácido. • Fácil recolección. • Menor contenido de ácidos nucleicos que las bacterias. 	<ul style="list-style-type: none"> • Contenido de proteína más bajo que en las bacterias
Bacterias	<i>Cellulomonas,</i> <i>Alcaligenes,</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Alto contenido de proteínas • Tasa de crecimiento rápida. 	<ul style="list-style-type: none"> • Difícil y costosa recolección por su menor tamaño y baja densidad. • Tienen un alto contenido de ácidos nucleicos.

Nota. Adaptado de (Nasseri et al., 2011)

2.2.2.1. Valor nutricional de la proteína unicelular

El principal valor de la PUC está reflejado en su contenido de proteína, sin embargo, la biomasa microbiana está provista de otros componentes valiosos como carbohidratos, grasas, minerales y ácidos nucleicos. A continuación, en la siguiente tabla se presenta la composición química de los diferentes tipos de microorganismos empleados en la producción de PUC.

Tabla 3

Composición promedio de los diferentes microorganismos en base seca.

Componente	Hongos	Algas	Levaduras	Bacterias
Proteína (%)	30-50	40-63	45 -56	50-83
Grasa (%)	2-8	7-20	2-6	1,5-3
Ceniza (%)	9-14	8-10	5-9,5	3-7
Ácidos nucleicos (%)	7-10	3-8	6-12	8-16

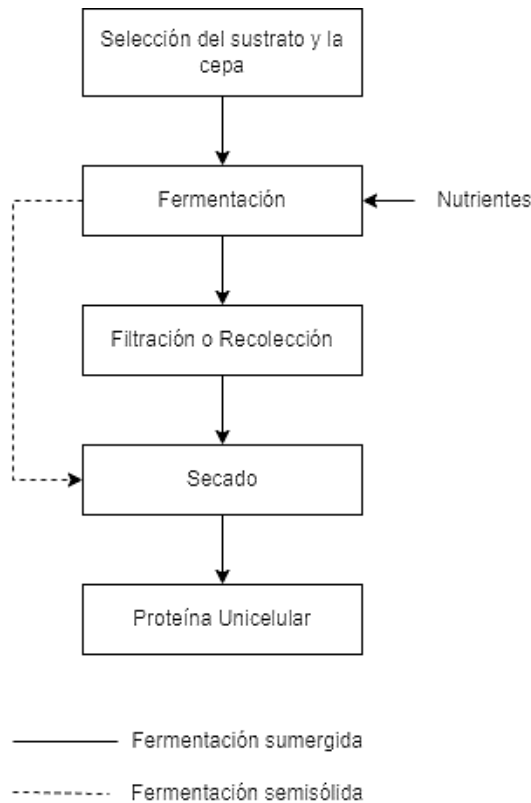
Nota. Tomado de (Forero et al., 2021)

2.2.2.2. Producción de proteína unicelular

Según Suman et al. (2015) la producción de proteína unicelular se realiza mediante el proceso de fermentación donde, cepas seleccionadas de microorganismos se multiplican sobre materias primas adecuadas en un proceso de cultivo técnico dirigido al crecimiento y la masa celular seguido de un proceso de separación y recuperación de la biomasa. En el siguiente diagrama se resume el proceso de la obtención de proteína unicelular;

Figura 2

Pasos básicos de la producción de PUC



Nota. Adaptado de (Khadse et al., 2018)

Sustratos potenciales para la producción de PUC

Para reducir el costo de producción de la PUC, lo más importante es la elección de sustratos o subproductos agroindustriales biodegradables, adecuados como fuente de nutrientes para el crecimiento de los microorganismos. Los sustratos se seleccionan sobre la base de su abundancia y proximidad del área de producción. El diseño y la estrategia del proceso de producción también dependen de la naturaleza del sustrato (Sharif et al., 2021).

Para que los desechos sean un sustrato útil deben cumplir con los siguientes criterios; deben ser abundantes, totalmente renovables, no tóxicos, no exóticos y baratos, capaces de soportar un rápido crecimiento y multiplicación de los microorganismos (Ukaegbu, 2016).

De acuerdo con Bogale (2020) los sustratos potenciales que cumplen con estos criterios son; melazas, residuos de frutas, fuentes ricas en almidón, salvados y desechos lácteos como el suero que representa una rica fuente de monosacáridos y disacáridos además de proteínas y lípidos. Si los desechos lácteos tienen un alto contenido de lactosa se pueden usar como sustrato adecuado para la producción de PUC utilizando microorganismos capaces de fermentar lactosa.

Es importante que el sustrato seleccionado pase por ciertos procesos de esterilización y/o desinfección para evitar la contaminación del medio en el proceso de fermentación (Forero et al, 2021).

Selección del microorganismo

De acuerdo con Nangul & Bhatia (2013) los microorganismos seleccionados deben tener las siguientes características:

- No deben producir ningún producto tóxico para el consumidor.
- Deben tener una alta tasa de crecimiento, productividad y rendimiento.
- Deben ser tolerante al pH y a la temperatura.
- El contenido de proteínas en peso de las células secas debe ser alto y proporcionar un equilibrado contenido de aminoácidos.
- Deben ser fácil de cultivar en una amplia gama de sustratos.
- Deben ser genéticamente estables.
- Deben tener un ciclo de vida corto para que se pueda producir una gran cantidad de PUC en poco tiempo.
- Fácil de modificar genéticamente para que se pueda realizar cualquier mejora deseada.

Nasser et al. (2011) refiere que, las levaduras son los microorganismos más adecuados para la producción de proteína unicelular debido a su calidad nutricional superior, familiaridad y aceptabilidad de varios sustratos por su larga historia y uso en las fermentaciones tradicionales.

El contenido proteico de las levaduras oscila entre el 45 y el 55 % de su peso seco y tienen una excelente calidad en función de su perfil de aminoácidos esenciales. Las especies de levaduras más estudiadas en el mundo son: *S. cerevisiae*, *C. utilis* y *K. marxianus*. Estas especies tienen reconocimiento GRAS (siglas en inglés de Generally Recognized As Safe) y son consideradas aptas para el consumo humano (Suárez et al., 2016; Nasser et al., 2011).

Kluyveromyces marxianus. Anteriormente conocida también como *Saccharomyces fragilis* o *Kluyveromyces fragilis*, es un tipo de levadura que ha sido extensamente aislada de varios alimentos (frutas, queso, leche y leches fermentadas), crece a temperaturas de 20 a 30°C a un rango de pH de 4,5 a 5. Es una de las pocas levaduras que tiene la capacidad de fermentar azúcares eficientemente e hidrolizar la molécula de lactosa (Padín & Díaz, 2009). Presenta una amplia variedad de características que la hacen conveniente para la aplicación industrial y biotecnológica como diversidad metabólica, gran capacidad para asimilar una extensa gama de sustratos, rápida velocidad de crecimiento y termotolerancia. Así mismo se han explorado sus aplicaciones en la producción de enzimas (β -galactosidasas o lactasa, poligalacturonasas, inulasas, pectinasas, lipasas, entre otras), compuestos aromáticos, alcoholes como etanol y proteína unicelular (Barbosa, 2017; Nuñez, 2015).

Fermentación

Este proceso se puede realizar utilizando tres métodos diferentes: Fermentación sumergida o líquida, semisólida y sólida.

En la fermentación sumergida se utiliza un sustrato líquido que contenga todos los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano. El proceso se lleva a cabo en un fermentador que funciona de manera continua y se recolecta la biomasa resultante. Este método es ideal para cultivar microorganismos como bacterias y levaduras. La aireación también es importante durante toda la operación de cultivo (Sharif et al., 2021).

Recuperación de la proteína unicelular

Los microorganismos requieren de diferentes métodos para su recolección. Los microorganismos como bacterias y levaduras se recuperan fácilmente mediante el proceso de centrifugación, mientras que los hongos filamentosos se recuperan mediante filtración. Es importante que la recuperación se realice en condiciones limpias e higiénicas y que la biomasa sea recuperada con una considerable cantidad de agua ya que contiene importantes sustancias solubles y nutrientes que quedan disponibles después del secado (Bogale, 2020; Nasser et al., 2011).

Tratamiento postcosecha

La biomasa obtenida es lavada y/o secada. Dependiendo de la aplicación de la proteína unicelular (alimento / pienso) se requieren varios pasos de procesamiento antes de la formulación final del producto. Algunas preparaciones requieren células completas de los microorganismos, mientras que en otras se necesita la descomposición de la pared celular para la liberación de proteínas. Este proceso se puede realizar mediante fuerzas mecánicas (aplastamiento, desmenuzamiento, trituración, homogeneización de presión o ultrasonidos), enzimas hidrolíticas (endógenas o exógenas), disrupción química con detergentes o combinaciones de estos métodos (Nasser et al., 2011; Ritala et al., 2017).

2.2.2.3. Factores que afectan la producción de proteína unicelular

Los principales factores que se deben considerar en el proceso de fermentación y obtención de proteína unicelular son:

Tabla 4

Factores que afectan la producción de PUC.

Variables	Descripción
<ul style="list-style-type: none">• Fuente de carbono	<p>El uso del sustrato correcto es uno de los factores más importantes en el proceso de producción. Por lo tanto, es extremadamente importante optimizar las técnicas de fermentación para cada tipo de sustrato utilizado y nutrientes de cultivo para lograr la mayor ventaja del proceso.</p>
<ul style="list-style-type: none">• Fuente de nitrógeno	<p>La utilización de diferentes fuentes de nitrógeno podría conducir a un rendimiento diferente de la producción de PUC. Las fuentes de nitrógeno incluyen amoníaco, sales de amonio, urea, nitrato y nitrógeno orgánico.</p>
<ul style="list-style-type: none">• pH y temperatura	<p>La temperatura y el pH son los factores que más influye en el crecimiento de microorganismos, rendimiento y productividad en la producción de PUC. La temperatura más comúnmente utilizada para la incubación de diferentes microorganismos es la temperatura ambiente, sin embargo, para algunos hongos y levaduras una temperatura entre 33 y 35°C se considera óptima.</p>
<ul style="list-style-type: none">• Aireación	<p>En la fermentación sumergida la aireación es una fundamental para que los microorganismos absorban oxígeno. En general, cuanto más reducido es el sustrato, mayor es el rendimiento celular y más oxígeno se requiere para la oxidación del sustrato.</p>
<ul style="list-style-type: none">• Tamaño y edad del inóculo	<p>El crecimiento óptimo en la producción podría depender también de la edad del inóculo y el tamaño afectando directamente el rendimiento general de producción y el costo. Las diferencias en el rendimiento de la PUC dependen también de los microorganismos, sustratos y técnicas de fermentación.</p>

Nota. Adaptado de (Reihani et al., 2019)

2.2.2.5. Ventajas y desventajas de la proteína unicelular

Ventajas

De acuerdo con Ukaegbu (2016) las ventajas de utilizar microorganismos para la producción a gran escala de proteínas unicelulares son:

- Proteína unicelular de alto contenido proteico (hasta un 85% en peso seco), bajo contenido de grasas.
- Menor tiempo de generación de los microorganismos. Las bacterias pueden doblar su masa celular de 20 min a 2h, las levaduras en 1 a 3h y las algas en 3 a 6h.
- Se puede producir durante todo el año ya que no depende de las condiciones climáticas ni estacionales.
- Durante la producción de biomasa proteica unicelular, ciertos microorganismos producen metabolitos útiles como enzimas o ácidos orgánicos.
- Los desechos agroindustriales se pueden utilizar como fuente de carbono reduciendo significativamente el impacto ambiental que estos residuos generan.
- No requiere una configuración de laboratorio sofisticada.
- Conversión de sustrato de alta eficiencia.

Desventajas

A pesar de las muchas ventajas que tiene la proteína de unicelular, esta puede presentar algunos inconvenientes, según Obaida (2021) estos son;

- Los microorganismos pueden producir compuestos tóxicos que tienen un grave impacto en la salud animal y humana.
- La biomasa microbiana puede provocar reacciones alérgicas.
- El proceso de producción requiere condiciones de esterilización de alto estándar.
- Gran cantidad de ácidos nucleicos.

Este último punto es trascendental para la aplicación en la dieta humana. Una ingesta de ácidos nucleicos superior a 2 g/día conduce a la acumulación de ácido úrico en el cuerpo humano debido a la ausencia de una enzima llamada ureasa y en consecuencia puede ser responsable de serios problemas de salud como síntomas de gota o formación de cálculos renales. Es por ello que la proteína unicelular destinada al consumo humano requiere un

tratamiento adicional para reducir el contenido de ácidos nucleicos. Esto se puede lograr mediante tratamientos térmicos, químicos (NaCl, HCl o NaOH) o enzimáticos con ribonucleasas y endonucleasas. La PUC con alto contenido de ácido nucleico solo es recomendada para la dieta animal en la alimentación de animales con una corta vida útil (Saeed et al., 2016; Molfetta et al., 2022; Ritala et al., 2017).

2.2.2.6. Aplicaciones de la proteína unicelular

La principal aplicación de la proteína unicelular está en la elaboración de balanceados o concentrados para el ganado avícola, porcino y vacuno. Es el proceso más inmediato y menos tecnificado de todos e implica el secado de la biomasa previamente a la ingesta. Se ha demostrado que el empleo de microorganismos como probióticos en producción pecuaria, contribuye al equilibrio microbiano intestinal de los animales (Chacón, 2004; Forero et al., 2021).

Además, la proteína unicelular se está convirtiendo en un ingrediente viable a medida que la industria acuícola, busca conservar y complementar los recursos marinos naturales como la harina y el aceite de pescado. Empresas como KnipBio ha desarrollado un ingrediente a partir de la bacteria *Methylobacterium extorquens* cultivada en metanol, con alto contenido proteico, que sirve para alimentar a especies como salmónidos (salmón, trucha) y otras especies de peces carnívoros. Otro ingrediente de proteína unicelular es ProTyton que reduce la mortalidad en los camarones cuando son atacados por las bacterias patógenas. Este ingrediente ayudó a enfrentar uno de los principales problemas que presenta la industria del cultivo del camarón, combatiendo enfermedades virales, bacterianas y fúngicas (Wright, 2019; Jackson, 2018).

En la alimentación humana, el proceso de PUC es más tecnificado, implicando no sólo la remoción de riesgos nutricionales como los ácidos nucleicos, sino también el garantizar la calidad y seguridad del producto. Quorn™ es el único producto de proteína

unicelular utilizado exclusivamente para la nutrición humana. La marca fue lanzada en 1985 por Marlow Foods (Reino Unido) y sus productos contienen micoproteína del hongo filamentoso *Fusarium venenatum*, producida a partir de glucosa derivada del almidón, la biomasa fúngica proporciona una textura que se asemeja a los productos cárnicos (Chacón, 2004; Ritala et al., 2017).

La producción de proteína unicelular como extractos de levadura de *S. cerevisiae*, *C. utilis* y *K. marxianus*, se emplean como potenciadores de sabor y saborizantes en productos como salsa, cereales, sopas, entre otros. Aún se sigue investigando la producción de aislados proteicos a partir de microorganismos, que cumplan con el propósito de proveer un alto valor nutricional y que tengan propiedades funcionales (Forero et al., 2021).

CAPÍTULO III. METODOLOGIA.

3.1. Tipo de Investigación.

El proyecto de investigación cumple con las condiciones metodológicas de una investigación cuantitativa. En la que se determinó las mejores condiciones de operación para la obtención de un mayor rendimiento de la proteína unicelular a escala laboratorio a partir del suero de mantequilla.

Además, corresponde a una investigación bibliográfica en donde se estableció las posibles aplicaciones de la proteína unicelular de *K. marxianus* en la alimentación humana y animal a través de una revisión sistemática.

3.2. Diseño de Investigación

El diseño de investigación es un diseño cuantitativo experimental, donde se observó el efecto de la suplementación del suero de mantequilla con peptona y glucosa como únicas fuentes de energía a través de 4 tratamientos experimentales sobre la variable dependiente que fue el porcentaje de rendimiento de biomasa seca de levadura con respecto a un tratamiento control que consistió en suero de mantequilla desproteínizado sin suplementación.

Tabla 5

Diseño experimental de la investigación.

Fuente de energía	Tratamientos experimentales	Codificación
Control	Tratamiento control	C
Fuente de nitrógeno	Tratamiento 1 (2% de peptona)	TP1
	Tratamiento 2 (3% de peptona)	TP2
Fuente de carbono	Tratamiento 3 (2% de glucosa)	TG1
	Tratamiento 4 (3% de glucosa)	TG2

Para la revisión bibliográfica, se buscó en bases de datos científicas de; Sciencedirect, ProQuest y Google Académico, con las siguientes palabras clave y operadores boléanos: “aplicaciones” AND “proteína unicelular” AND “*K. marxianus*” AND “alimentación” AND “humana” AND “animal”; “applications” AND “single cell protein” AND “*K. marxianus*” AND “human” AND “animal” AND “nutrition”.

3.3. Técnica de recolección de datos

3.3.1. Obtención del suero de mantequilla

El suero de mantequilla fue abastecido por la empresa Productos Alimenticios “San Salvador” de la ciudad de Riobamba, se recolectó en botellas plásticas previamente esterilizadas y transportadas hasta el laboratorio de procesos de la carrera de Agroindustria en una hielera portátil a 4°C y almacenados en refrigeración hasta su uso.

3.3.2. Caracterización del suero de mantequilla

Posteriormente, para la caracterización de las propiedades fisicoquímicas y composicionales del suero de mantequilla se siguió los métodos de ensayo especificados en la NTE INEN 718 (2011) que corresponde a los requisitos generales del suero de mantequilla (Buttermilk), mismos que se especifican en la tabla 6. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los datos obtenidos se reportaron como media y desviación estándar.

3.3.3. Producción y caracterización de PUC

La obtención de la proteína unicelular se realizó mediante el sistema de cultivo en lotes o batch según los tratamientos especificados en la tabla 5 y al final del proceso se determinó por gravimetría el peso húmedo y peso seco para establecer la relación del porcentaje de rendimiento de la biomasa. Finalmente, la calidad de la biomasa producida fue evaluada a través de un análisis proximal por triplicado, mismo que incluye los análisis de humedad, cenizas, proteína, grasas, fibra y elementos libres de nitrógeno.

3.3.4. Revisión bibliográfica

Para la parte bibliográfica de la investigación, se trabajó con la declaración PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) (2009), misma que consta de 4 etapas: identificación, cribado, elegibilidad e inclusión.

Identificación

Se identificó todos los estudios dentro de un intervalo no mayor a 10 años de publicación, desde el año 2012 al 2022, con la finalidad de obtener información actualizada, con importancia y relevancia para el tema de investigación, en los idiomas inglés y español.

Cribado

Para esta etapa se excluyó todos aquellos estudios que no aporten de manera significativa con el objetivo de la investigación, para lo cual se dio lectura del título y resumen de los estudios identificados y a partir de ello se filtró.

Elección

Los estudios fueron evaluados para su elección mediante la lectura completa del documento. Los criterios de exclusión en esta etapa fueron: 1) Estudios que hablen únicamente de la obtención de proteína unicelular y no incluyan sus aplicaciones. 2) Aplicaciones de la biomasa en forma general sin especificación de la especie de levadura. 3) Estudios que trabajen con un microorganismo diferente a *K. marxianus*.

Inclusión

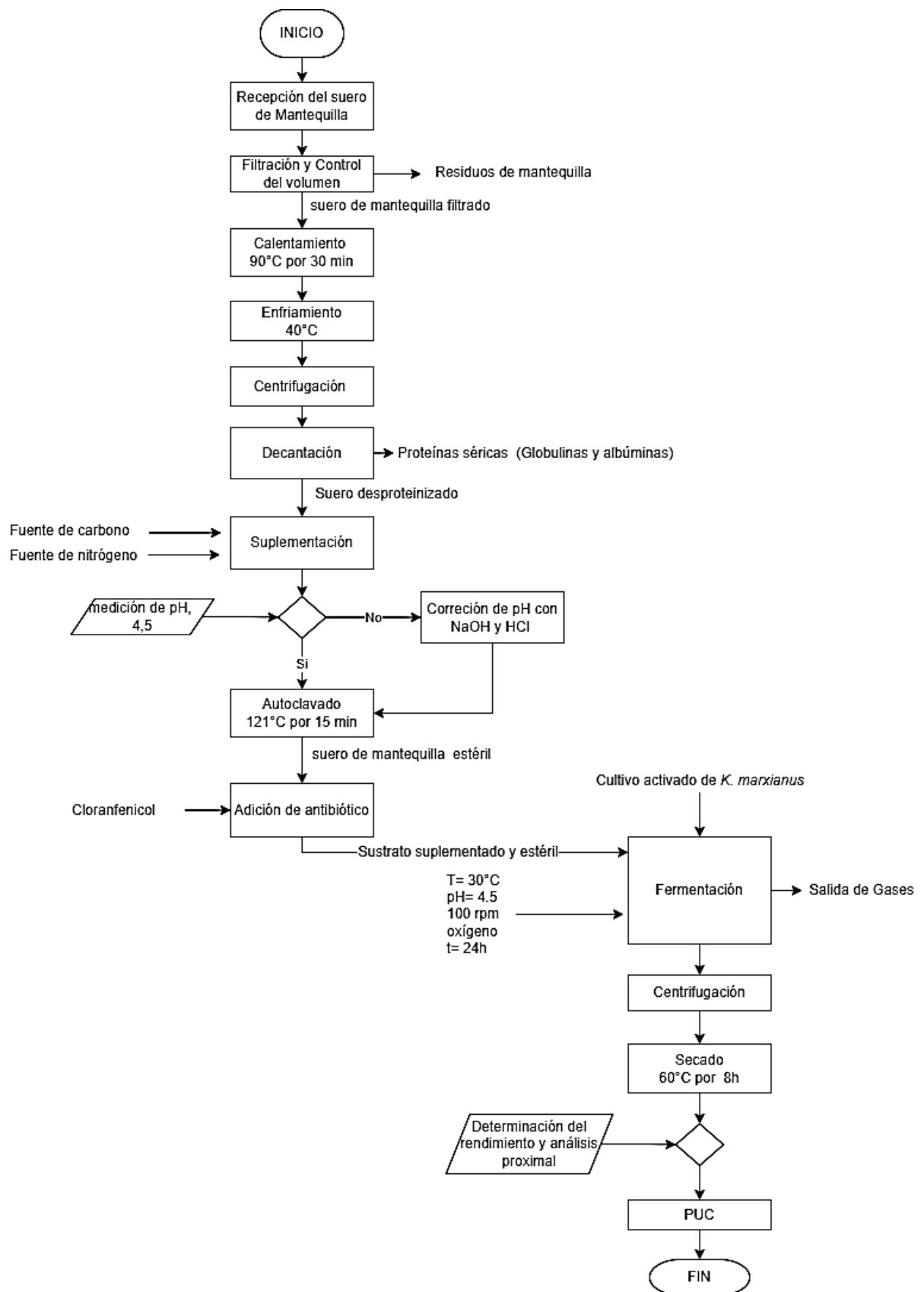
Los criterios de inclusión para esta última etapa fueron: 1) Aplicaciones de la proteína unicelular de *K. marxianus* en la alimentación humana. 2) Aplicaciones de la proteína unicelular de *K. marxianus* en la alimentación animal.

3.4. Procedimiento

En la figura 3 se presenta el diagrama de flujo que resume los procesos llevados a cabo en la experimentación para la obtención de proteína unicelular.

Figura 3

Diagrama de flujo de la obtención de proteína unicelular.



3.4.1. Descripción de la obtención de la proteína unicelular

3.4.1.1.Preparación del sustrato

Para la preparación del sustrato se siguieron las siguientes etapas:

1. **Recepción de la materia prima:** Se recolectó el suero de mantequilla provisto por la empresa “San Salvador” en recipientes de 10 litros previamente esterilizados.
2. **Filtración y control del volumen:** A continuación, se procedió con el filtrado a través de un colador para eliminar impurezas o residuos de mantequilla que pudieran estar presentes en el suero.
3. **Tratamiento térmico:** Se debe precipitar toda la proteína contenida en el sustrato, para lo cual se calentó el suero de mantequilla a una temperatura de 90°C por 30 min hasta lograr la precipitación total de la proteína.
4. **Enfriamiento:** Se dejó reposar por aproximadamente 15 min hasta que alcance una temperatura de 40°C para continuar con la siguiente operación.
5. **Centrifugación:** Una vez enfriado la solución de suero de mantequilla se llevó a centrifugar por 10 min a 4000 rpm, logrando así la separación de las proteínas del suero de mantequilla.
6. **Decantación:** Rápidamente, se procedió a separar el precipitado del suero de mantequilla mediante el proceso de decantación garantizando así una desproteinización eficiente.
7. **Formulación:** El suero de mantequilla desproteinizado se suplementó con peptona y glucosa, según los tratamientos descritos en el diseño de la investigación. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Una vez suplementado el sustrato se debe medir el pH y ajustar a 4,5 de acuerdo con las condiciones óptimas de crecimiento de la ficha técnica del microorganismo (Anexo 1), con una solución de NaOH al 10% o HCl concentrado. Posteriormente se procedió a vaciar el suero desproteinizado en matraces kitasatos, cada uno con un volumen de trabajo de 250ml.
8. **Autoclavado:** Los matraces con el suero suplementado fueron esterilizados en una autoclave de la marca Tuttnauer modelo 2540EK a 121°C por 15 min.
9. **Adición del antibiótico:** Una vez autoclavados y enfriados a 40°C, a los matraces con suero de mantequilla se le adicionó una cápsula de cloranfenicol para inhibir el crecimiento de bacterias no deseadas.

3.4.1.2. Preparación del inóculo

La cepa de *Kluyveromyces marxianus* CCAB 131 fue adquirida de la colección Algae Bank, proveedor de cultivos biotecnológicos y mantenida en tubos de cultivo con PDA Agar de la marca comercial TM MEDIA. Los tubos fueron incubados a 32°C por 24h y luego almacenados a 4°C hasta su uso.

Además, para prolongar y preservar la levadura por largos períodos de tiempo se utilizó el método de crioconservación o conservación por congelación, en donde las células de *K. marxianus* fueron almacenadas con glicerol y posteriormente congeladas a -80°C en un freezer de la marca TEST modelo V606.

3.4.1.2.Fermentación

En cada matraz con el sustrato estéril se inoculó un asa de cultivo activado de *K. marxianus* y cuidadosamente se homogeneizó. Los matraces se montaron en un agitador de la marca VEVOR® a 100rpm y una temperatura de 30°C±1 durante 24h. Inmediatamente después de terminado el proceso de fermentación, los matraces fueron colocados en baño maría a 100°C durante 10 min para inactivar las levaduras e impedir que siguieran con el proceso de fermentación. Finalmente, las muestras se transfirieron a la unidad de centrifugación para recuperar la biomasa de levadura del medio.

El sedimento producido se separó y pesó (peso húmedo), posteriormente se colocó en la estufa a 60 °C durante 8 h y se pesó nuevamente (peso seco). Finalmente, para determinar la calidad de la proteína unicelular se realizó un análisis proximal.

3.4.1.3.Rendimiento de la biomasa

El rendimiento de la proteína unicelular representa la cantidad de biomasa producida por la cantidad de sustrato consumido. Es por ello que el porcentaje de rendimiento de la proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* se calculó según la metodología descrita por Quintero et al. (2021) que utilizó la siguiente expresión:

$$\text{Ecu 1. } Y_c = g \text{ de biomasa producida} / g \text{ de lactosa consumida}$$

3.5. Métodos de análisis

3.5.1. Métodos de análisis para el suero de mantequilla

Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos y composicionales del suero de mantequilla se siguió los siguientes protocolos:

Tabla 6

Métodos de análisis para la caracterización del suero de mantequilla.

Parámetro	Método de Ensayo	Descripción
Sólidos totales	NTE INEN 14	Se determinó el contenido de sólidos totales por el método gravimétrico, mediante diferencia de pesos de la muestra húmeda y seca, debido a la evaporación del agua contenida en el suero (NTE INEN 14, 1973).
Cenizas	NTE INEN 14	Método gravimétrico. El contenido de cenizas es la materia inorgánica de la muestra, se obtuvo por diferencia de pesos de la incineración de los sólidos totales resultantes de la muestra (NTE INEN 14, 1973).
Grasa	NTE INEN 12	Método de Gerber. Consiste en la remoción de la materia grasa contenida en la muestra, a través de la acidificación y centrifugación. (NTE INEN 12, 1973).
Proteína	NTE INEN 16	Determinación del contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl. Este método se basa en la digestión de la materia orgánica de la muestra con H_2SO_4 para su posterior destilación y titulación con una solución de HCL 0,1N (NTE INEN 16, 2015).
Lactosa	AOAC 984.15.	Se determinó el contenido de lactosa mediante el contenido de azúcares reductores del suero. Los azúcares reductores en soluciones alcalinas tienen la propiedad de oxidarse, reduciendo el cobre. Este método calcula el volumen que se requiere para precipitar todo el cobre presente en una solución de Fehling de concentración conocida.
pH	AOAC 973.41	La determinación del pH se realizó mediante potenciometría con el uso del pH-metro el cual determina la acidez o alcalinidad de la muestra por la actividad de los iones de hidrógeno.
Acidez	NTE INEN 13	La acidez en el suero se expresó en porcentaje de ácido láctico y se determinó mediante la valoración con una solución estandarizada de NaOH 0,1N y fenolftaleína como indicador (NTE INEN 13, 1984).

3.5.2. Métodos de análisis para la proteína unicelular

Para el análisis proximal se siguió los protocolos especificados en la FAO (1993);

a) Humedad

El método se basa en el secado de la muestra en la estufa y se determina por diferencias de peso entre la muestra seca y húmeda. Para lo cual se pesó aproximadamente 5g de la proteína unicelular (m_1) y se colocó en un crisol seco y limpio, previamente tarado y pesado (m). Se llevó a la estufa a 105°C por 12h o hasta obtener peso constante. Se dejó enfriar en el desecador y se pesó (m_2) cuidando que la muestra seca no esté expuesta al medio ambiente ya que podría absorber humedad.

$$\text{Ecu 2. Contenido de humedad (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} * 100$$

Donde:

m = peso del crisol vacío (g)

m_1 = peso del crisol y la muestra antes del calentamiento (g)

m_2 = peso del crisol y la muestra después del calentamiento (g)

b) Cenizas

Se usó la muestra seca del análisis de humedad y se colocó en la mufla a 550°C hasta obtener cenizas de un color gris claro. A continuación, con ayuda de unas pinzas se extrajo el crisol con las cenizas y se dejó enfriar en el desecador para finalmente pesarlo (m_3).

$$\text{Ecu 3. Contenido de cenizas (\%)} = \frac{m_3 - m}{m_2 - m_1} * 100$$

Donde:

m = peso del crisol vacío (g)

m_2 = peso del crisol y la muestra seca (g)

m_3 = peso del crisol con las cenizas (g)

c) Lípidos crudos

El material graso de la muestra es extraído con hexano y evaluado como porcentaje del peso después de la evaporación del solvente.

Para ello se colocó en la estufa los matraces de extracción, se dejó enfriar en el desecador y se pesó. Por otro lado, en un dedal se pesó 1g de la muestra seca, misma que fue colocada en la unidad de extracción. Se conectó al extractor el matraz con hexano a 2/3 del volumen total. Y se llevó a ebullición por aproximadamente 3h. Al finalizar, se evaporó el hexano por destilación y se colocó los matraces en la estufa durante 1h, se enfrió en un desecador y se pesó.

$$\text{Ecu 4. Contenido de lípidos crudos (\%)} = \frac{B - A}{C} \times 100$$

Donde:

A = Peso del matraz limpio y seco (g)

B = Peso del matraz con grasa (g)

C = Peso de la muestra (g)

d) Fibra cruda

El contenido de fibra se determina mediante la digestión por H_2SO_4 , NaOH y la calcinación del residuo. La diferencia de pesos indica la cantidad de fibra presente en la muestra. Para ello se pesó aproximadamente 1g de la muestra seca y desengrasada y se colocó en un vaso de precipitación en el que se añadió 200ml de H_2SO_4 al 1,25%. Se colocó en el sistema de reflujo y se llevó a ebullición por 30 min, manteniendo constante el volumen con agua destilada. Seguidamente se retiró el matraz y se filtró. El residuo obtenido se transfirió nuevamente a un vaso y se adicionó 200ml de NaOH al 1,25%, se dejó hervir por 30 min como en el paso anterior y se filtró. Se lavó el residuo con agua caliente. Finalmente, el residuo se colocó en un crisol y fue llevado a la estufa 105°C por 12h, se dejó enfriar en el desecador para luego pesarlo, posteriormente se colocó el crisol en la mufla a 550°C por 3 h y se tomó el peso de las cenizas.

$$\text{Ecu 5. Contenido de fibra cruda (\%)} = \frac{A - B}{C} * 100$$

Donde:

A = peso del crisol con el residuo seco (g)
B = peso del crisol con la ceniza (g)
C = peso de la muestra (g)

e) Proteína cruda:

Se calcula por el método de Kjeldahl, que estima el contenido de nitrógeno total en la muestra. Para ello se pesó aproximadamente 0,1g de muestra y se colocó en el tubo Kjeldahl, junto con una pastilla de catalizador Kjeldahl y 20 ml de ácido sulfúrico concentrado. Los tubos se colocaron en el digestor (Velp) y se llevó a ebullición por aproximadamente 3h. Se dejó enfriar y se agregó 10 ml de agua destilada. Rápidamente el tubo se transfirió a la unidad de destilación y se destiló con NaOH al 40%. El destilado se recogió en 50ml de una solución de ácido bórico al 4%, Finalmente se tituló con una solución de HCl 0.1N estandarizada y una solución indicadora (Indicador de tashiro). Es importante trabajar con un blanco, mismo que debe ser sometido a las mismas condiciones de análisis.

$$\text{Ecu 6. Nitrógeno en la muestra (\%)} = \frac{(V_t - V_b) * N_{HCl} * 14 * 100}{C}$$

$$\text{Ecu 7. Proteína cruda (\%)} = \text{Nitrógeno en la muestra} * 6.25$$

Donde:

V_t = volumen de HCl gastados en la muestra (ml)

V_b = volumen de HCl gastados en el blanco (ml)

N_{HCl} = Concentración del titulante

C = Peso de la muestra (g)

f) Extracto libre de Nitrógeno (ELN)

Está compuesto principalmente por carbohidratos, vitaminas y demás compuestos orgánicos no nitrogenados; Para su determinación se debe restar a 100 (unidad) los porcentajes calculados en los anteriores análisis.

$$\text{Ecu 8. Extracto Libre de Nitrógeno (\%)} = 100 - (A + B + C + D + E)$$

Donde:

A = Contenido de humedad (%)

B = Contenido de ceniza (%)

C = Contenido de proteína cruda (%)
D = Contenido de lípidos crudos (%)
E = Contenido de fibra cruda (%)

3.6. Procesamiento de datos.

Los datos obtenidos en la experimentación fueron evaluados mediante el software estadístico SPSS a través de técnicas estadísticas. Con los resultados obtenidos del porcentaje de rendimiento de la biomasa microbiana seca de *K. marxianus*, se realizó un análisis exploratorio de datos para determinar las tendencias clave del experimento y posteriormente se diseñó un modelo completo al azar (DCA) para la fuente de nitrógeno y otro para la fuente de carbono tomando como prueba estadística al análisis de varianza ANOVA con un nivel de significancia de $P < 0,05$ y para la validación de los modelos estadístico se comprobaron los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia. Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos propuestos y especificados en la tabla 5, se aplicó el test de Tukey con un nivel de significancia de $P < 0,05$. Finalmente, con los valores medios de cada tratamiento se construyó un gráfico de medias.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización del suero de mantequilla

En la tabla 7 se presenta los resultados de la caracterización de algunas de las propiedades fisicoquímicas y composicionales del suero de mantequilla dulce, suero de mantequilla ácido y suero de mantequilla ácido desproteínizado empleados en esta investigación.

Tabla 7

Caracterización fisicoquímica de sueros de mantequilla.

Parámetros	Suero de Mantequilla dulce	Suero de Mantequilla ácido	Suero de Mantequilla desproteínizado
Sólidos totales (%)	8,82± 0,03	8,83± 0,20	7,94± 0,04
Cenizas (%)	0,67± 0,02	0,61± 0,02	0,53± 0,01
Grasa (%)	0,37± 0,03	0,9± 0,02	0,67± 0,03
Proteína (%)	2,67± 0,17	2,81± 0,08	0,53± 0,00
Lactosa (%)	6,17*± 0,08	3,95*± 0,01	4,06* ± 0,08
pH	6,77± 0,01	4,40 ± 0,04	4,38± 0,04
Acidez (% ácido láctico)	0,14± 0,01	0,74± 0,05	0,77± 0,04

Nota. Media ± desviación estándar de los análisis fisicoquímicos en tres muestras repetidas de suero de mantequilla dulce, ácido y suero de mantequilla desproteínizado.

* Total de porcentaje de azúcares reductores como lactosa, glucosa, galactosa, entre otros.

De acuerdo con Conway et al. (2014) dependiendo del procesamiento de la crema de leche, las propiedades nutricionales y funcionales del suero de mantequilla pueden variar

considerablemente. En este caso los resultados expuestos en la tabla 7 mostraron que el contenido de sólidos totales entre el suero dulce y ácido fue similar.

La clasificación de las muestras de suero de mantequilla se basó principalmente en los valores de pH, mismos que se compararon con los resultados reportados por Sodini et al. (2006) puesto que en la NTE INEN 718 (2011) los requisitos para cada tipo de suero se describen sin distinción.

En el suero de mantequilla dulce los valores de sólidos totales, cenizas y acidez variaron entre 8.82%, 0,67% y 0,14% respectivamente, mismos que coincide con los reportados por Rojas (2017), mientras que los valores de proteína y grasa son inferiores, esto se debe a que la crema o leche usada para la fabricación de mantequilla pudo contener en menor proporción dichos componentes ya que, Narvhus & Abrahamsen (2021) señalan que los niveles de proteína y grasa del suero están directamente relacionados con el contenido original en la crema o leche cruda usada para la elaboración de mantequilla, asimismo explican que el contenido de grasa también se puede ver afectado por la tecnología utilizada para batir la crema, temperatura de batido y la eficacia del procedimiento. Además, los resultados de la caracterización demuestran que la composición general del suero de mantequilla dulce es muy similar a la leche descremada afirmando lo mencionado por Szkolnicka et al. (2020).

En cuanto a los resultados de la caracterización del suero de mantequilla ácido, los valores de proteína, grasa, cenizas y acidez se encuentran dentro de los rangos establecidos por la NTE INEN 718 (2011). El contenido de lactosa del suero ácido fue de 3,95% menor que en el suero dulce que fue de 6,17%, puesto que el suero ácido resulta de una crema madurada sometida a un proceso de fermentación. El alto contenido de lactosa permite que ambos tipos de suero se puedan utilizar como sustrato para diversos procesos biológicos.

Para la obtención de la proteína unicelular se utilizó el suero de mantequilla ácido porque es el que generalmente mayor se produce en el país y el valor del pH es muy similar al requerido por *K. marxianus*, por lo que no se necesita de un mayor acondicionamiento del medio y a una escala de producción mayor representa menor costo de producción. De acuerdo con Haghghi et al. (2013) el pH óptimo para el crecimiento y supervivencia de esta levadura es de 4,5 y mantener el pH del medio en ese valor elimina el riesgo de contaminación por bacterias letales que crecen a un pH superior a 6.

El considerable contenido de proteínas en el suero ácido hizo que este fuese sometido a un proceso previo de desproteínización para evitar la precipitación de la proteína durante la operación de autoclavado, el resultante también fue caracterizado. En el suero de mantequilla desproteínizado se observó una mayor concentración de acidez, posiblemente causada por el calor al efectuar la desproteínización (Cury et al., 2014), al igual que un leve incremento en la concentración de lactosa, mientras que la cantidad de proteínas y nitrógeno se redujo considerablemente indicando la eficiencia del método de desproteínización empleado (Páez et al., 2008).

4.2. Obtención de la proteína unicelular

A continuación, se presentan los resultados de las medias del porcentaje de rendimiento de la proteína unicelular seca de *K. marxianus* para cada uno de los tratamientos según la fuente de nitrógeno y fuente de carbono con relación a un tratamiento control, que consistió en un medio compuesto únicamente por suero de mantequilla desproteínizado sin suplementación.

Tabla 8*Rendimiento de la proteína unicelular para cada tratamiento*

Parámetro	Niveles	% Rendimiento
Fuente de energía Nitrógeno	C	18,98 ± 0,25 ^a
	TP1	20,70 ± 0,27 ^b
	TP2	20,86 ± 0,32 ^b
Fuente de energía Carbono	C	18,98 ± 0,25 ^a
	TG1	20,33 ± 0,57 ^b
	TG2	26,48 ± 0,53 ^c

Nota. Media ± desviación estándar del porcentaje de rendimiento de la PUC
a-c Medias en la misma fila con diferente letra difieren estadísticamente (P<0,05)

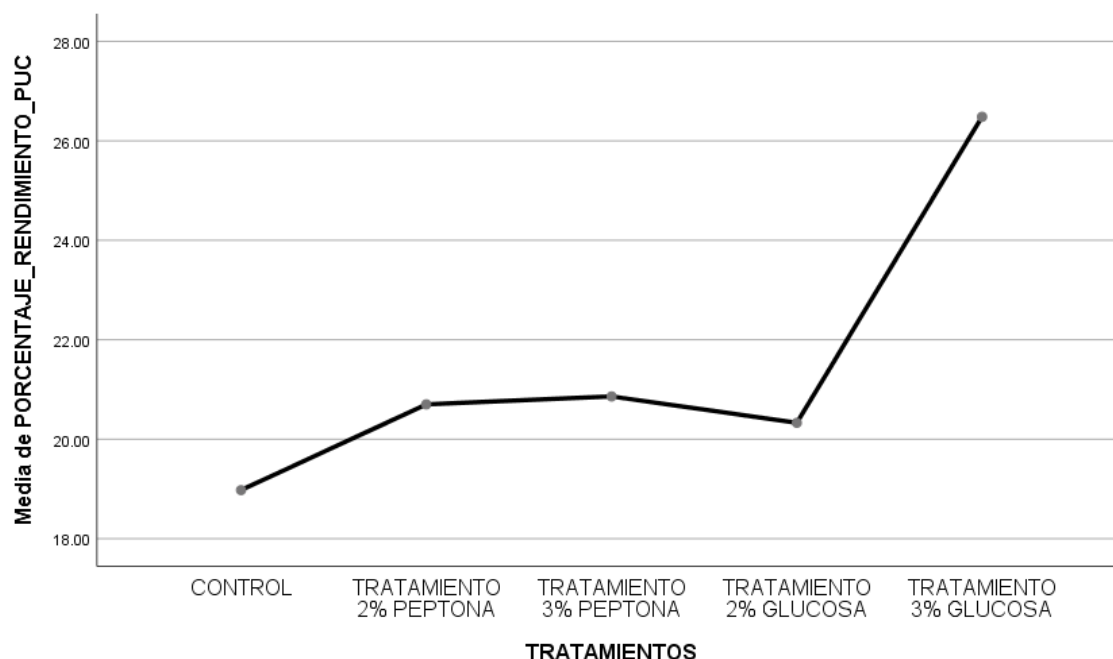
De acuerdo con los resultados obtenidos del rendimiento de la proteína unicelular según la fuente de nitrógeno, se observó que el tratamiento 1 con peptona al 2% presentó una media del 20,70% y el tratamiento 2 con peptona al 3% estimó una media del 20,86%, difiriendo estadísticamente con respecto al tratamiento control que presentó una media del 18,98%, sin embargo, ambos tratamientos no difieren significativamente entre sí.

Por otro lado, los valores medios del rendimiento de la proteína unicelular utilizando una fuente de carbono dió como resultado un valor medio del 20,33% al tratamiento 1 con glucosa al 2% y del 26,48% al tratamiento 2 con glucosa al 3%, siendo estadísticamente diferentes entre sí y también con respecto al tratamiento control, lo que significa que la suplementación del suero de mantequilla con peptona y glucosa mejora significativamente el rendimiento de la proteína unicelular de *K. marxianus*.

A partir de los resultados obtenidos de la media de los tratamientos se construyó un gráfico de medias que se observa en la figura 4.

Figura 4

Gráfico de medias del rendimiento de la PUC en función de los tratamientos.



Según el gráfico de medias, se puede afirmar que se obtuvo mejores porcentajes de rendimiento de la proteína con el uso de glucosa como fuente de energía y que el tratamiento que corresponde a la suplementación del suero de mantequilla con glucosa concentrada al 3% es el que mejores resultados presentó con una media del porcentaje de rendimiento de la biomasa seca del 26,48%.

4.2.3. Discusión de la obtención de la proteína unicelular

El mayor rendimiento de *K. marxianus* cultivada en suero de mantequilla ácido se logró con la suplementación del 3% de glucosa con una media del 26,48% y un valor máximo de hasta 27,07%, superando al registrado por Marcatoma et al. (2020) que fue de 10,4% en su estudio sobre el análisis estadístico en la producción de proteína unicelular con *K. marxianus* a partir de la fermentación del suero ácido de quesería. Jach et al. (2022) mencionan que el rendimiento de la biomasa microbiana y productividad dependen en gran medida de la composición del medio de crecimiento y las condiciones de cultivo, por lo que

la obtención de proteína unicelular mediante el aprovechamiento del suero de mantequilla puede representar una gran oportunidad para abordar la escasez de proteína en un futuro.

Otro hallazgo importante de la experimentación se refleja en la fuente de nitrógeno pues, se encontró que el rendimiento de la proteína unicelular con la suplementación del suero de mantequilla con peptona al 2 y 3% no difieren significativamente entre sí, esto se debe a que no siempre una mayor concentración de la fuente de nitrógeno (peptona) va a representar un mayor rendimiento de la proteína unicelular, tal como lo menciona Ouedraogo et al. (2017) quienes trabajaron con la levadura *C. utilis* en un medio compuesto por peptona al 0,25%, 0,5%, 0,75% y 1%; y encontraron que el crecimiento óptimo de *C. utilis* fue a una concentración del 0,75% de peptona, sin embargo, después de la concentración óptima, se encontró que la fuente de nitrógeno tenía un efecto adverso y resultó en un menor crecimiento de la levadura, por lo que es crucial encontrar las condiciones más adecuadas para obtener un máximo beneficio de rendimiento.

4.3. Recolección de la proteína unicelular

Debido a las características de las células suspendidas en el medio, este se volvió de una consistencia demasiado espesa, lo que dificultó un proceso de filtración, por lo que la recuperación de la biomasa de la levadura *K. marxianus* para este experimento se realizó mediante el método de centrifugación tal como lo sugieren Yadav et al. (2014) en su estudio sobre la producción simultánea de proteínas unicelulares y eliminación de DQO con caracterización de proteínas residuales y metabolitos intermedios durante la fermentación del suero por *K. marxianus*. De la misma manera Nasser et al. (2011) mencionan que el mejor método de recolección para la biomasa de levadura es la centrifugación.

4.4. Caracterización de la biomasa

Una vez obtenida la proteína unicelular de *K marxianus* se determinó su calidad mediante un análisis proximal y se comparó con otras fuentes proteicas tradicionales de la dieta animal y humana mismas que se detallan en la tabla 9.

Tabla 9.

Composición proximal de las fuentes proteicas.

Fuente proteica	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Fibra (%)	ELN (%)	Fuente
PUC <i>Kluyveromyces marxianus</i>	8,21	23,55	27,73	16,98	0,24	23,29	Este estudio
PUC Bacterias	2,8	3-7	50-83	1,5-3	-	-	(Chacón, 2004)
PUC hongos filamentosos	13	9-14	30-50	2-8	-	-	(Chacón, 2004)
PUC Algas <i>S. plantensis</i>	12,5	9,3	44,08	11,97	0,9	21,25	(Dhahri et al., 2018)
Huevos	26	0,5	12,4	12	-	1,1	(Quitral et al., 2009)
Harina de trigo	12	0,4	8,6	1,4	2,1	-	(FAO, 2002)
Harina de soja	8	6	38,2	25	4	18,8	(Akubor y Ukwuru, 2003)
Harina de pescado	10,2	12,5	44,19	5,5	3,1	24,51	(Dhahri et al., 2018)

Nota. Comparación de la composición química de *K. marxianus* vs otras fuentes proteicas convencionales expresadas en base seca.

La PUC obtenida de la fermentación del suero de mantequilla con la levadura *K. marxianus* dió como resultado un contenido de humedad del 8,21% menor al registrado por Paéz et al. (2008) que fue del 25%, sin embargo, Jach et al. (2022) refiere que el nivel de humedad de alimentos en polvo suele estar aproximadamente entre el 2% y el 8%. A este nivel, la biomasa de levadura es estable con una vida útil promedio de hasta 2 años, de igual manera menciona que la operación de secado mejora significativamente la calidad, digestibilidad y biodisponibilidad de la biomasa de levadura.

Por otra parte, se encontró que el contenido de cenizas fue de 23,55% superior al descrito por Anvari & Khayati (2011) que también reporta un alto valor de cenizas del

14,05%. Jach et al. (2022) indicó que la biomasa de levadura contiene una mayor cantidad de cenizas que bacterias, hongos y algas tal como se muestra en la tabla 12 y comenta que este parámetro depende de la composición del sustrato, por lo que una de las razones del alto contenido de cenizas en la biomasa se debió a una mayor concentración de minerales en el suero de mantequilla. Agboola et al. (2021) afirma que las levaduras tienen la capacidad de incorporar eficientemente los minerales de medios de cultivo, por tanto, levaduras cultivadas en medios como el suero poseen un considerable contenido de calcio. Así pues, un alto contenido de minerales en la PUC puede ser beneficioso para la alimentación de algunos animales o aplicación en alimentos para humanos dependiendo de las características nutricionales de la dieta y requisitos de sabor (Paul et al., 2002).

El contenido de proteína fue de 27,73%, valor menor que los reportados por la literatura en la proteína unicelular de *K. marxianus* obtenida a partir del suero de quesería (Anvari & Khayati, 2011; Paéz et al., 2008) y cercano al reportado por Paul et al. (2002) del 28,1%. Adicionalmente, en la tabla 17 se aprecia que el contenido de proteína en bacterias, hongos y algunos tipos de algas es relativamente alto en comparación con la PUC de *K. marxianus* esto debido a que la composición química de la biomasa microbiana varía según la cepa utilizada y el tipo de sustrato. No obstante, *K. marxianus* ha logrado el estatus de Presunción Cualificada de Seguridad (QPS) y GRAS debido a su largo uso en productos lácteos; lo que la hace particularmente adecuada para producir proteínas de grado alimenticio (Lane & Morrissey, 2010).

De la misma manera, se muestra que el contenido proteico de *K. marxianus* es superior a ciertas fuentes proteicas convencionales como el huevo y la harina de trigo, aun así, es importante considerar que el valor nutricional de una proteína está determinado por la composición de aminoácidos. Paéz et al. (2008) determinó que el perfil de aminoácidos que presenta *K. marxianus* posee una distribución equilibrada comparable con los patrones

de referencia internacionales (FAO) y demostró que el contenido de lisina es similar al huevo entero y superior al trigo, por lo que se sugiere su uso como fuente proteica de buena calidad para la alimentación humana. Así mismo, es crucial que la biomasa producida para consumo humano sea sometida a un proceso previo de eliminación de ácidos nucleicos o reducción a niveles permitidos antes de ser consumida (Jach et al., 2022).

Desde otro punto de vista, la PUC de *K. marxianus* puede ser utilizada directamente como ingrediente en la formulación de alimentos para animales, si bien no supera el contenido de proteína de la harina de pescado y la harina de soja, componentes proteicos básicos en la formulación de piensos, muestran una composición comparativamente similar de aminoácidos con dichos ingredientes según lo informado por Agboola et al. (2021) a excepción de la metionina y la cisteína que contienen azufre y son característicamente bajos en la levadura. De esta forma, la biomasa obtenida puede ser utilizada para complementar y enriquecer dietas animales constituyendo un reemplazo factible para la harina de pescado y soja.

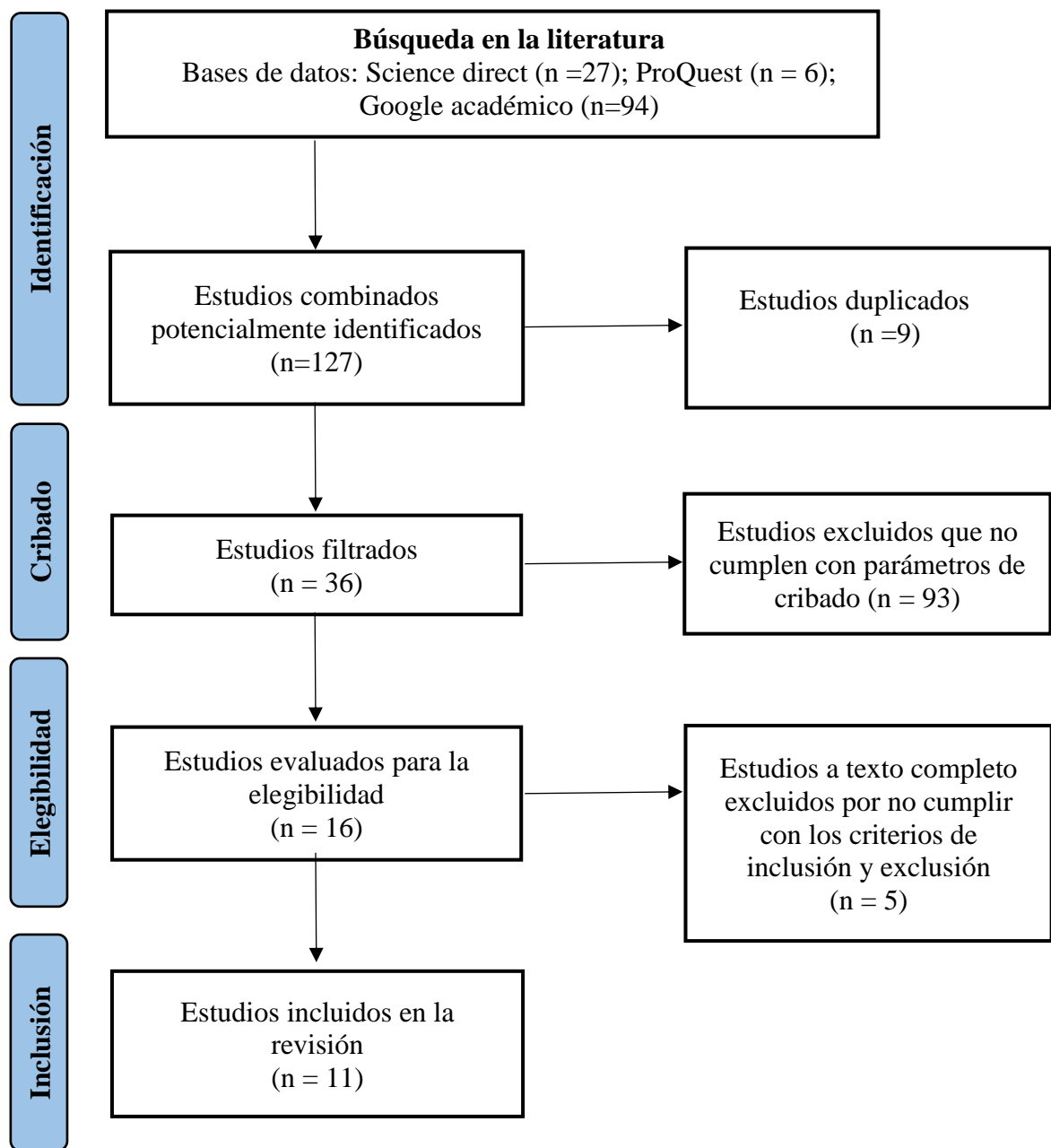
Finalmente, la biomasa presentó un alto contenido de grasa del 16,98% mayor que las otras fuentes proteicas. Agboola et al. (2021) añade que la composición de ácidos grasos de las levaduras se caracteriza principalmente por ácidos grasos insaturados, por lo que su uso podría estar enfocado en la elaboración de dietas que requieran una equilibrada composición de proteína y energía. *K. marxianus*, además es una fuente valiosa de otros componentes como enzimas.

4.4. Aplicaciones de la proteína unicelular

En la figura 5, se muestra el diagrama de los resultados de la búsqueda bibliográfica de estudios que discuten las aplicaciones específicas de la proteína unicelular de *K. marxianus* y la selección mediante el método PRISMA.

Figura 5

Diagrama del proceso sistemático PRISMA.



Nota. Adaptado de (Prisma, 2009)

Inicialmente en las bases de datos, se identificaron 127 estudios con relevancia antes de proceder con la selección de los estudios, de los cuales 9 de ellos se encontraban duplicados. Una vez definidos los criterios de cribado y tras una lectura completa de todo el documento, 11 estudios cumplieron con los criterios de inclusión y la lista de verificación de la declaración PRISMA (Anexo 2) y fueron seleccionados para la revisión sistemática.

La mayoría de los estudios identificados corresponden un 91% artículos científicos y un 9% tesis. Según la base de datos se encontraron 55% en Google académico (5 artículos y 1 tesis), el 27% en Science Direct (3 artículos científicos), y el 18% en ProQuest (2 artículos científicos). De igual manera, del total de los estudios analizados la mayoría de información se encontró en el idioma inglés con un 91% y un 9% en el idioma español.

Noruega es el principal país en el que se desarrollaron los estudios seleccionados con 3 publicaciones, seguido de China que participó con 2 publicaciones, finalmente, los países que participaron con la publicación de un estudio fueron: Canadá, Grecia, India, Reino Unido, Brasil, Alemania, Italia y México. De la totalidad de las revistas un 20% pertenecen a la revista PLoS one, como se evidencia en la matriz de la caracterización de los estudios (Anexo 3).

4.4.1. Aplicaciones de proteína unicelular de *K. marxianus* en alimentación animal

Según el Anexo 4 de las aplicaciones de la PUC de *K. marxianus* en alimentación animal se puede indicar que, en la última década, el potencial de la proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* para la alimentación animal, está enfocada mayoritariamente en el sector acuícola.

Øverland & Skrede (2017) mencionan que, esto se debe principalmente a que la industria experimenta un rápido crecimiento a nivel mundial y una escasez de insumos de alimentos marinos proteicos, por lo que ha sido necesaria la búsqueda de nuevos ingredientes sostenibles para la formulación de balanceados. Afirman también que la levadura es una fuente de proteínas adecuada para la alimentación de peces, en especial *K. marxianus* que posee un buen perfil de aminoácidos y excelentes propiedades como fuente de proteínas en dietas para peces, incluidas especies carnívoras como el salmón atlántico y la trucha arcoíris.

Øverland et al. (2013), Grammes et al. (2013) y Ribeiro et al. (2014) han estudiado el uso de la levadura *K. marxianus* como fuente proteica en la alimentación del salmón atlántico y la tilapia roja, reemplazando parcial y totalmente la harina de pescado, fuente proteica principal de dietas acuícolas, obteniendo resultados prometedores como crecimiento, tasa de conversión alimenticia y retención de nitrógeno similares a la dieta

control (harina de pescado) para el salmón atlántico, además de la disminución del colesterol plasmático. Como ingrediente funcional la levadura también ayudó a contrarrestar la enteritis que provoca una inflamación en la parte distal del intestino de peces inducida por el uso de harina de soja (SBMIE), demostrando que la PUC de *K. marxianus* es una opción favorable para sustituir la harina de pescado y soja sin efectos perjudiciales para el salmón. Asimismo, se encontró que su implementación en la alimentación de tilapias resultó en mayores concentraciones de proteína en el filete.

Aggelopoulos et al. (2014) en su investigación determinó que el medio con la levadura *K. marxianus* contenía un 25,5% de grasa y un 33,7 % de proteína proponiendo que *K. marxianus*, puede ser aplicada en la suplementación y enriquecimiento de la alimentación para el ganado o para la extracción de grasa.

Wang et al. (2017) estudiaron el efecto de la suplementación de dietas con *K. marxianus* para pollos de engorde a concentraciones de 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2 y 2,5 g/kg, se encontró que *K. marxianus* a concentraciones altas de 2,5g/kg fue la más eficaz para la eficiencia alimenticia y mejora de la estructura microbiana de los pollos de engorde aumentando la abundancia de *Firmicutes*. Los *Firmicutes* juegan un papel importante en la descomposición de los polisacáridos y, en consecuencia, contribuyen a la utilización de la energía dietética y la salud intestinal, mientras que la inmunidad innata se optimizó a dosis de 1,0 g/kg.

Adicionalmente Wang et al. (2018) en un estudio continuo sobre la metabolómica y cambios metabólicos asociados con el consumo de alimentos demostró que, la suplementación con *K. marxianus* alteró las concentraciones de una variedad de metabolitos en el serum de los pollos. Estos metabolitos estaban principalmente involucrados en la regulación de los aminoácidos y el metabolismo de los carbohidratos. Un análisis posterior de la vía metabólica reveló que el metabolismo de la glutamina y el glutamato era la vía más relevante y crítica identificada de estos dos grupos. La glutamina y el glutamato sirven como base de nutrientes del cuerpo y son los precursores de muchos metabolitos conectándose con abundantes procesos bioquímicos, lo que destaca el papel de *K. marxianus* como alimento probiótico para la dieta de animales.

4.4.2. Aplicaciones de proteína unicelular de *K. marxianus* en la alimentación humana

La literatura disponible sobre la aplicación de la PUC de *K. marxianus* en la alimentación humana es reducida como se muestra en el Anexo 5, la mayoría de estudios encontrados se centran en la caracterización de la levadura y la descripción de sus

propiedades específicas, por lo que el desarrollo de nuevos métodos para su implementación en productos de consumo humano sigue siendo un desafío.

No obstante, Karim et al. (2020) plantea que la proteína unicelular derivada de levaduras puede utilizarse como alimentos ricos en proteína, ingredientes alimentarios o suplementos dietéticos para consumo humano. Por lo tanto, la producción de *K. marxianus* a gran escala podría ser ventajosa para sustituir proteínas de origen agrícola (vegetales y animales).

Así también, Karim et al. (2020), Nurcholis et al. (2020), Maccaferri et al. (2012) y Mendoza (2013) sugieren el uso potencial de *Kluyveromyces marxianus* como alimento probiótico en la dieta humana. Mendoza (2013) en su estudio in vitro señaló que *K. marxianus* es capaz de sobrevivir el tracto digestivo y colonizar el intestino, demostrando que puede resistir concentraciones de sales biliares de 0,05% a 0,30%, sobrevivir a valores de pH ácido desde 1,5 hasta 7,0, y tolerar el jugo gástrico hasta por 24 h, así mismo, esta cepa fue capaz de establecerse en el intestino en un modelo de ratones, inhibiendo el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*.

Del mismo modo, Maccaferri et al. (2012) mostró que *K. marxianus* aumentó la concentración de bifidobacterias en un sistema modelo del colon, impactando la microbiota colónica de manera positiva. Además, reveló que la levadura es altamente adhesiva a células Caco-2 similares a los enterocitos humanos pudiendo modular así la respuesta inmune. Toda esta serie de propiedades beneficiosas y específicas demuestran que la biomasa de *K. marxianus* puede ser considerada para su aplicación como probiótico.

Por otro parte, dentro de la revisión sistemática de Karim et al. (2020) se menciona que esta levadura puede ser aprovechada en productos de panificación y explica que la adición de la levadura como cultivo iniciador logró mejorar el aroma de los panes y plantean que el uso de cultivos mixtos que contengan *K. marxianus* como cultivos iniciadores podría conducir a tener una vida útil más larga y mejores cualidades sensoriales en productos de masa fermentada. Por lo que este criterio representa una gran oportunidad para su aplicación en la alimentación humana.

Desde un enfoque biotecnológico *K. marxianus* puede ser utilizado como fábrica celular efectiva para producir metabolitos valiosos, debido a la creciente demanda de aditivos alimentarios naturales y otros productos de origen biológico. *K. marxianus* posee un alto potencial para sintetizar cantidades significativas de compuestos aromáticos como 2-feniletanol (2-PE), alcoholes, ésteres de frutas, ácidos carboxílicos, entre otros. El alcohol

(2-PE) y el acetato de 2-feniletilo (2-PEA), tienen un olor característico a rosa y se usa ampliamente en las industrias alimentaria y cosmética (Karim et al., 2020).

Finalmente, este microorganismo puede ser aprovechado por su capacidad natural de secretar enzimas como; inulasas, pectinasas, lipasas y β -galactosidasas. Esta última también conocida como lactasa tienen aplicaciones importantes en las industrias alimentaria y farmacéutica, ya que se utiliza para reducción del contenido de lactosa en leche y productos lácteos. Se ha encontrado que las enzimas de *K. marxianus* tienen una buena estabilidad térmica (Karim et al., 2020).

Nurcholis et al. (2020) afirma que *Kluyveromyces marxianus* es una levadura adecuada para aplicaciones industriales y la producción de compuestos ligados a la biomasa, el análisis de genoma y transcriptoma junto con el desarrollo de herramientas biotecnológicas de la ingeniería genética puede conducir a la mejora de la productividad y síntesis de nuevos productos que contengan *K. marxianus*.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El suero de mantequilla dulce y suero de mantequilla ácido derivados de la elaboración de mantequilla poseen un contenido de lactosa (6,17-3,95%), proteínas (2,67-2,81%) y cenizas (0,67-0,61%) que se consideran altos y pueden ser aprovechados por la industria alimentaria para la elaboración de varios productos o como ingrediente de alto valor nutricional.
- El suero de mantequilla ácido por su composición es un sustrato adecuado para la producción de proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* en las condiciones de fermentación proporcionadas por este estudio.
- La suplementación del suero de mantequilla con glucosa y peptona pudo mejorar el porcentaje de rendimiento de la biomasa microbiana logrando así optimizar el proceso de la producción de proteína unicelular de *K. marxianus* a escala laboratorio.
- El mejor método para la recuperación de las células de *K. marxianus* fue la centrifugación puesto que el proceso de filtrado representó mayor tiempo de cosecha y menor cantidad de biomasa recolectada.
- La proteína unicelular de *K. marxianus* obtenida a partir de la fermentación con suero de mantequilla contiene un contenido de proteína, grasas y cenizas comparables con fuentes proteicas convencionales como el huevo, harina de trigo y harina de soja, por lo que puede ser incluida como ingrediente proteico en dietas para animales.
- La revisión bibliográfica sobre las aplicaciones potenciales de la PUC de *K. marxianus* demostró que la biomasa de esta levadura puede ser implementada como una adecuada fuente proteica en alimentos para animales como peces (salmón, trucha y tilapia), aves y ganado vacuno sin la presencia de efectos secundarios y proporcionando a los animales una serie de beneficios para su salud.
- La PUC de *K. marxianus* para la alimentación humana aún se encuentra en desarrollo debido al contenido de ácidos nucleicos que limita su consumo, sin embargo, se ha demostrado su potencial como alimento probiótico en ensayos in vitro.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda trabajar con suero de mantequilla ácido debido a que es el que mayormente se produce en el Ecuador y el bajo pH inhibe el crecimiento de bacterias patógenas del medio de cultivo.
- Optimizar los parámetros de producción a una escala piloto.
- Si se requiere aumentar el rendimiento de la biomasa y el contenido de proteína se recomienda trabajar con cultivos mixtos de microorganismos.
- Realizar un análisis del perfil de la proteína unicelular de *K. marxianus*.
- Formular nuevos productos a partir de la biomasa obtenida.
- Se recomienda realizar más estudios para investigar el contenido de ácidos nucleicos que presenta este microorganismo y encontrar formas de reducirlo a niveles permitidos para su implementación en la dieta humana.

BIBLIOGRÁFIA

- Agboola, J. O., Øverland, M., Skrede, A., & Hansen, J. Ø. (2021). Yeast as major protein-rich ingredient in aquafeeds: a review of the implications for aquaculture production. In *Reviews in Aquaculture* (Vol. 13, Issue 2, pp. 949–970). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/raq.12507>
- Aggelopoulos, T., Katsieris, K., Bekatorou, A., Pandey, A., Banat, I. M., & Koutinas, A. A. (2014). Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production. *Food Chemistry*, 145, 710–716. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.105>
- Ali, A. H. (2019). Current knowledge of buttermilk: Composition, applications in the food industry, nutritional and beneficial health characteristics. In *International Journal of Dairy Technology* (Vol. 72, Issue 2, pp. 169–182). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12572>
- Anvari, M., & Khayati, G. (2011). Submerged yeast fermentation of cheese whey for protein production and nutritional profile analysis Curdlan View project Protease View project Submerged Yeast Fermentation of Cheese Whey for Protein Production and Nutritional Profile Analysis. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(2), 122–126. <https://www.researchgate.net/publication/285696573>
- AOAC. (1985). Lactose in milk. Enzymatic method. (AOAC 973.41) Official Methods of Analysis of AOAC International.
- AOAC. (1998). pH of water. (AOAC 973.41) Official Methods of Analysis of AOAC International.
- Barukčić, I., Jakopović, K. L., & Božanić, R. (2019a). Whey and Buttermilk—Neglected Sources of Valuable Beverages. *Natural Beverages*, 209–242. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816689-5.00008-0>
- Barukčić, I., Jakopović, K. L., & Božanić, R. (2019b). Valorisation of whey and buttermilk for production of functional beverages - An overview of current possibilities. In *Food Technology and Biotechnology* (Vol. 57, Issue 4, pp. 448–460). University of Zagreb. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.04.19.6460>
- Bogale, T. T. (2020). Microbial Protein Production from Agro-industrial Wastes as Food and Feed. *American Journal of Life Sciences*, 8(5), 121-126. <https://doi.org/10.11648/j.ajls.20200805.16>
- Boland, M. J., Rae, A. N., Vereijken, J. M., Meuwissen, M. P. M., Fischer, A. R. H., van Boekel, M. A. J. S., Rutherfurd, S. M., Gruppen, H., Moughan, P. J., & Hendriks, W. H. (2013). The future supply of animal-derived protein for human consumption. *Trends in Food Science & Technology*, 29(1), 62–73. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2012.07.002>
- Boylston, T. D. (2020). 5 Byproducts from Butter and Cheese Processing. Byproducts from agriculture and fisheries: Adding value for food, feed, pharma, and fuels, 107-121.
- Bratosin, B. C., Darjan, S., & Vodnar, D. C. (2021). Single cell protein: A potential substitute in human and animal nutrition. In *Sustainability (Switzerland)* (Vol. 13, Issue 16). MDPI. <https://doi.org/10.3390/su13169284>

- Bylund, G. (2003). *Manual de Industrias lácteas*. Madrid, España: Mundi Prensa.
- Chacón, A. (2004). Perspectivas actuales de la proteína unicelular (SCP) en la agricultura y la industria. *Agronomy Mesoamerican*, 15(1), 93-106.
- Conway, V., Gauthier, S. F., & Pouliot, Y. (2014). Buttermilk: Much more than a source of milk phospholipids. *Animal Frontiers*, 4(2), 44–51. <https://doi.org/10.2527/af.2014-014>
- Corredig, M., Roesch, R., & Dalgleish, D. (2003). Production of a novel ingredient of buttermilk. *Journal of Dairy Science*.
- Cury, K., Márquez, M. A., Flórez, G. M., Rhenals, D. L., & Villadiego, A. D. (2014). Evaluación de la fermentación del lactosuero ácido (entero y desproteínizado) utilizando *Lactobacillus casei*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 137-145. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v16n1.44281>
- Dopelt, K., Radon, P., & Davidovitch, N. (2019). Environmental effects of the livestock industry: The relationship between knowledge, attitudes, and behavior among students in Israel. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(8). <https://doi.org/10.3390/ijerph16081359>
- ECODES. (2017). Alimentación y emisiones de CO₂, análisis de impactos climáticos. <https://ecodes.org/hacemos/cambio-climatico/mitigacion/alimentacion-y-emisiones-de-co2-analisis-de-impactos-climaticos>
- FAO. (1993). Análisis proximales. Obtenido de <https://www.fao.org/3/ab489s/ab489s03.htm>
- FAO. (2009). How to Feed the World in 2050. Obtenido de https://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
- Fonseca, G. G., de Carvalho, N. M. B., & Gombert, A. K. (2013). Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(11), 5055–5067. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4748-6>
- Forero, V., Gómez, S., Penagos, N., & Porras, L. F. (2021). Producción industrial de proteína unicelular a partir de microorganismos: Una perspectiva actual. <http://revistareciteia.es.tl/>
- Grammes, F., Reveno, F. E., Romarheim, O. H., Landsverk, T., Mydland, L. T., & Øverland, M. (2013). *Candida utilis* and *Chlorella vulgaris* counteract intestinal inflammation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083213>
- Haghighi, S., Moosavi, M., & Farhoodi, S. (2013). Comparative production of single cell protein from fish protein isolate wastage and ultra filtered cheese whey. In *Journal of Microbiology, Biotechnology (Issue 2)*.
- Hoffman, J. R., & Falvo, M. J. (2004). PROTEIN-WHICH IS BEST? ©*Journal of Sports Science and Medicine*, 3. <http://www.jssm.org>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (1973). Leche. Determinación del contenido de grasa. (NTE INEN 12). <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/12.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (1983). Leche. Determinación de la acidez titulable. (NTE INEN 13). <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/13.pdf>

- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (1983). Leche. Determinación de sólidos totales y cenizas. (NTE INEN 14). <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/14.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2015). Leche y productos lácteos. Determinación del contenido de nitrógeno. Método Kjeldahl. (NTE INEN 16). <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte-inen-16-2.pdf>
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2011). Suero de mantequilla (buttermilk). (NTE INEN 718). <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/718.pdf>
- Jach, M., Serefko, A., Ziaja, M., & Kieliszek, M. (2022). Yeast Protein as an Easily Accessible Food Source. <https://doi.org/10.3390/metabo12010063>
- Jackson, L. (2018). Firma estadounidense de biotecnología apunta al camarón con ingrediente SCP. Global Seafood Alliance. Recuperado de <https://www.globalseafood.org/advocate/ingrediente-scp/>
- Kadim, I. T., Mahgoub, O., Baqir, S., Faye, B., & Purchas, R. (2015). Cultured meat from muscle stem cells: A review of challenges and prospects. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(2), 222–233. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60881-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60881-9)
- Karim, A., Gerliani, N., & Aïder, M. (2020). *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 333). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818>
- Khadse, J. J., Hatkar, R. B., & Jamdhade, V. C. (2018). A Review on “Biotechnological Production of Single Cell Protein from Microorganisms.” *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* (Issue 6), 467-470. <http://www.ijcmas.com>
- Krebs, L., Bérubé, A., Iung, J., Marciniak, A., Turgeon, S. L., & Brisson, G. (2021). Impact of ultra-high-pressure homogenization of buttermilk for the production of yogurt. *Foods*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/foods10081757>
- Kumar, R., Garsa, A. K., Shrivastava, B., & Tyagi, A. (2015). Natural and Cultured Buttermilk. <https://www.researchgate.net/publication/280136366>
- Lane, M. M., & Morrissey, J. P. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister’s shadow. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 24, Issues 1–2, pp. 17–26). <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2010.01.001>
- Paul, D., Mukhopadhyay, R., Chatterjee, B. P., & Guha, A. K. (2002). Nutritional Profile of Food Yeast *Kluyveromyces fragilis* Biomass Grown on Whey. In *Nutritive Value of K. fragilis* 209 *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 97).
- Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P., & Costabile, A. (2012). Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(4), 956–964. <https://doi.org/10.1128/AEM.06385-11>
- Marcatoma, J. A., Rodas, S. L., Mármol, L. H., & Galán, P. A. (2020). Análisis estadístico en la producción de proteína unicelular a partir de la fermentación del suero ácido de quesería. *Conciencia Digital*, 3(4.1), 34–45. <https://doi.org/10.33262/concienciadigital.v3i4.1.1468>

- Mendoza, A. (2013). Caracterización de la levadura *Kluyveromyces marxianus* como microorganismo probiótico. (Tesis de maestría, Universidad autónoma del Estado de Hidalgo). Repositorio Digital UAEH. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/1862/TESIS%20SEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Molfetta, M., Morais, E. G., Barreira, L., Bruno, G. L., Porcelli, F., Dugat-Bony, E., Bonnarme, P., & Minervini, F. (2022). Protein Sources Alternative to Meat: State of the Art and Involvement of Fermentation. *Foods* 11(14). <https://doi.org/10.3390/foods11142065>
- Nangul, A., & Bhatia, R. (2013). Microorganisms: a marvelous source of single cell proteins. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*, 3(1), 15-18.
- Narvhus, J. A., & Abrahamsen, R. K. (2022). Buttermilk Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 409–416. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818766-1.00228-2>
- Nasseri, A. T., Rasoul-Amini, S., Morowvat, M. H., & Ghasemi, Y. (2011). Single cell protein: Production and process. *American Journal of Food Technology*, 6(2), 103–116. <https://doi.org/10.3923/AJFT.2011.103.116>
- Nayeem, M., Chauhan, K., Khan, S., Rattu, G., Kumar Dhaka, R., Siddiqui, H., & Komal Chauhan, C. (2017). Optimization of low-cost substrate for the production of single cell protein using *Kluyveromyces marxianus*. *The Pharma Innovation. Journal*, 6(8), 22–25. www.thepharmajournal.com
- Nurcholis, M., Lertwattanasakul, N., Rodrussamee, N., Kosaka, T., Murata, M., & Yamada, M. (2020). Integration of comprehensive data and biotechnological tools for industrial applications of *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 104, Issue 2, pp. 475–488). <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10224-3>
- Obaida, B. A. (2021). Yeasts as a source of single cell production: A Review. *Plant archives*, 21(1), 324–328. <https://doi.org/10.51470/plantarchives.2021.v21.s1.051>
- Ogrodowczyk, A. M., Kalicki, B., & Wróblewska, B. (2021). The effect of lactic acid fermentation with different bacterial strains on the chemical composition, immunoreactive properties, and sensory quality of sweet buttermilk. *Food Chemistry*, 353. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129512>
- Ouedraogo, N., Savadogo, A., Somda, M. K., Zongo, C., & Traore, A. S. (2017). Effect of mineral salts and nitrogen source on yeast (*Candida utilis* NOY1) biomass production using tubers wastes. *African journal of Biotechnology*, 16(8), 359-365.
- Øverland, M., Karlsson, A., Mydland, L. T., Romarheim, O. H., & Skrede, A. (2013). Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 402–403, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.016>
- Øverland, M., & Skrede, A. (2017). Yeast derived from lignocellulosic biomass as a sustainable feed resource for use in aquaculture. In *Journal of the Science of Food and Agriculture* (Vol. 97, Issue 3, pp. 733–742). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8007>
- PRISMA. (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses. Obtenido de Transparent reporting of systematic reviews and meta-analyses: <http://www.prisma-statement.org/>

- Páez, G., Jiménez, E., Mármol, Z., Ferrer, J., Sulbarán, B., Ojeda, G., Araujo, K., & Rincón, M. (2008). Perfil de aminoácidos de la proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus*. *Interciencia*, 33(4), 297-300.
- Quintero, H., Rodríguez, M., Páez, G., Ferrer, J., Mármol, Z., & Rincón, Z. (2001). Producción de proteína unicelular (*Kluyveromyces fragilis*) a partir del suero de leche. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 9(2), 87-94.
- Ramos, I., Silva, M., Antunes, V., Praxedes, C., & Oliveira, M. (2021). Development of ice cream with added buttermilk. *Brazilian Journal of Food Technology*, 24. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.23720>
- Reihani, S. F. S., & Khosravi-Darani, K. (2019). Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, 37, 34–40. <https://doi.org/10.1016/J.EJBT.2018.11.005>
- Ritala, A., Häkkinen, S. T., Toivari, M., & Wiebe, M. G. (2020). Single Cell Protein—State-of-the-Art, Industrial Landscape and Patents 2001–2016. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02009>
- Ribeiro, C. S., Moreira, R. G., Cantelmo, O. A., & Esposito, E. (2014). The use of *Kluyveromyces marxianus* in the diet of Red-Stirling tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus) exposed to natural climatic variation: Effects on growth performance, fatty acids, and protein deposition. *Aquaculture Research*, 45(5), 812–827. <https://doi.org/10.1111/are.12023>
- Rojas, A. (2017). Determinación de las características fisicoquímicas del suero obtenido de la fabricación de mantequilla de leche de vaca. (Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Trujillo). Repositorio Digital UNITRU. <https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/10008/ALAYO%20ROJAS%20ALFONSO.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Saeed, M., Yasmin, I., Anjum Murtaza, M., Fatima, I., & Saeed, S. (2016). Single cell proteins: A novel value-added food product. *Pakistan Journal of Food Sciences* (Vol. 26, Issue 4).
- Sharif, M., Zafar, M. H., Aqib, A. I., Saeed, M., Farag, M. R., & Alagawany, M. (2021). Single cell protein: Sources, mechanism of production, nutritional value and its uses in aquaculture nutrition. In *Aquaculture* (Vol. 531). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735885>
- Sodini, I., Morin, P., Olabi, A., & Jiménez-Flores, R. (2006). Compositional and functional properties of buttermilk: A comparison between sweet, sour, and whey buttermilk. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 525–536. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72115-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72115-4)
- Suman, G., Nupur, M., Anuradha, S., & Pradeep, B. (2015). Single Cell Protein Production: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(9), 251-262. <http://www.ijcmas.com>
- Szkolnicka, K., Dmytrów, I., & Mituniewicz-Małek, A. (2020). Buttermilk ice cream—New method for buttermilk utilization. *Food Science and Nutrition*, 8(3), 1461–1470. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1429>
- Torrez, C. (2017). Obtención de una bebida láctea a base del suero de mantequilla. (Tesis de pregrado, Universidad Mayor de San Andrés). Repositorio Digital UMSA.

- <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/18219/PG310.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ukaegbu-Obi, K. M. (2016). Citation: Single Cell Protein: A Resort to Global Protein Challenge and Waste Management. *Journal Microbiology & Microbial Technology*, 1(1), 5.
- Vargas, Y. A., & Pérez, L. I. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 59-72. <https://doi.org/10.18359/rfcb.xxxx>
- Wright, J. (2019). El ingrediente de proteína unicelular de alimentos acuícolas es el primero en obtener la designación GRAS. Global Seafood Alliance. Recuperado de <https://www.globalseafood.org/advocate/el-ingrediente-de-proteina-unicelular-de-alimentos-acuicolas-es-el-primero-en-obtener-la-designacion-gras/>
- Wang, W., Li, Z., Gan, L., Fan, H., & Guo, Y. (2018). Dietary supplemental *Kluyveromyces marxianus* alters the serum metabolite profile in broiler chickens. *Food and Function*, 9(7), 3776–3787. <https://doi.org/10.1039/c8fo00268a>
- Wang, W., Li, Z., Lv, Z., Zhang, B., Lv, H., & Guo, Y. (2017). Effects of *Kluyveromyces marxianus* supplementation on immune responses, intestinal structure and microbiota in broiler chickens. *PLoS ONE*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180884>
- Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>
- Yadav, J. S. S., Bezawada, J., Elharche, S., Yan, S., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2014). Simultaneous single-cell protein production and COD removal with characterization of residual protein and intermediate metabolites during whey fermentation by *K. marxianus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(6), 1017–1029. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1072-6>
- Zhang, Y., Pang, X., Zhang, S., Liu, L., Ma, C., Lu, J., & Lyu, J. (2020). Buttermilk as a wall material for microencapsulation of omega-3 oils by spray drying. *LWT*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109320>
- Zhao, L., Feng, R., Ren, F., & Mao, X. (2018). Addition of buttermilk improves the flavor and volatile compound profiles of low-fat yogurt. *LWT*, 98, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.029>

ANEXOS

Anexo 1. Ficha Técnica de *Kluyveromyces marxianus*



Ficha Técnica

KLUYVEROMYCES MARXIANUS

Levadura de cultivo, viva

Cultivo purificado en placa petri, siembra por estría cruzada

Usos: Fermentación alimentaria.

Bioseguridad: Nivel I. Uso seguro, no se requieren medidas especiales para su manejo.

1. IDENTIFICACIÓN

Especie: *Kluyveromyces marxianus* KMU-3

Código identificador en la colección: CCAB 131

Morfología: Levadura de gemación

Estado: Axénico, libre de contaminantes

2. PRESENTACIÓN

Peso: 50 g

Empaque primario: Placa de Petri

Empaque secundario: Papel burbuja

Empaque terciario: Caja de cartón sellada.

3. LECTURA

3.1. Identificación primaria

Células subglobosas cilíndricas, de color blanco y diámetro 5 μm . Núcleo notorio, reproducción por gemación.

Anexo 1 (continuación)



Ficha Técnica

KLUYVEROMYCES MARXIANUS

3.2. Identificación bioquímica: asimilación de azúcares

PRUEBA	RESULTADO
Glucosa	+/+ ✓
Galactosa	+/+
Sacarosa	+/+
Maltosa	-/-
Treonina	-/-
Lactosa	-/+ ✓
Inulina	+/+
D-xilosa	/+
L-arabinosa	/+
D-ribosa	/+
L-ramnosa	/-

4. COMPOSICIÓN

Agua 91.00%

Medio 8.00%

Microorganismos inocuos 1.00%

5. CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

pH 6.8

Densidad 200 mg/mL

Fabricado por ©2021 Algae Bank. Todos los derechos reservados
contacto@algae-bank.com

Anexo 1 (continuación)



Ficha Técnica

KLUYVEROMYCES MARXIANUS

6. MEDIO DE CULTIVO

6.1. Agar YPD, composición

INGREDIENTE	COMPOSICIÓN [g/L]
Extracto de levadura	10
Peptona de caseína	20
Dextrosa (glucosa)	20
Agar agar	20

6.2. Condiciones óptimas de crecimiento

Fuente de carbono preferida (Glucosa) = 20 g/L

Temperatura óptima = 30 °C

pH 4.5

Agitación = 500 rpm

Aireación = 1 vvm

Tasa específica de crecimiento = 0.05 h⁻¹

7. CLASIFICACIÓN ARANCELARIA (ECUADOR)

PARTIDA S.A.

21.02 - LEVADURAS(VIVAS O MUERTAS)

Subpartida NACIONAL(ARIAN)

2102.10.10.00 - LEVADURA DE CULTIVO

Anexo 2. Lista de verificación PRISMA

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review.	
ABSTRACT			
Abstract	2	See the PRISMA 2020 for Abstracts checklist.	
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of existing knowledge.	
Objectives	4	Provide an explicit statement of the objective(s) or question(s) the review addresses.	
METHODS			
Eligibility criteria	5	Specify the inclusion and exclusion criteria for the review and how studies were grouped for the syntheses.	
Information sources	6	Specify all databases, registers, websites, organisations, reference lists and other sources searched or consulted to identify studies. Specify the date when each source was last searched or consulted.	
Search strategy	7	Present the full search strategies for all databases, registers and websites, including any filters and limits used.	
Selection process	8	Specify the methods used to decide whether a study met the inclusion criteria of the review, including how many reviewers screened each record and each report retrieved, whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Data collection process	9	Specify the methods used to collect data from reports, including how many reviewers collected data from each report, whether they worked independently, any processes for obtaining or confirming data from study investigators, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Data items	10a	List and define all outcomes for which data were sought. Specify whether all results that were compatible with each outcome domain in each study were sought (e.g. for all measures, time points, analyses), and if not, the methods used to decide which results to collect.	
	10b	List and define all other variables for which data were sought (e.g. participant and intervention characteristics, funding sources). Describe any assumptions made about any missing or unclear information.	
Study risk of bias assessment	11	Specify the methods used to assess risk of bias in the included studies, including details of the tool(s) used, how many reviewers assessed each study and whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	
Effect measures	12	Specify for each outcome the effect measure(s) (e.g. risk ratio, mean difference) used in the synthesis or presentation of results.	
Synthesis methods	13a	Describe the processes used to decide which studies were eligible for each synthesis (e.g. tabulating the study intervention characteristics and comparing against the planned groups for each synthesis (item #5)).	
	13b	Describe any methods required to prepare the data for presentation or synthesis, such as handling of missing summary statistics, or data conversions.	
	13c	Describe any methods used to tabulate or visually display results of individual studies and syntheses.	
	13d	Describe any methods used to synthesize results and provide a rationale for the choice(s). If meta-analysis was performed, describe the model(s), method(s) to identify the presence and extent of statistical heterogeneity, and software package(s) used.	
	13e	Describe any methods used to explore possible causes of heterogeneity among study results (e.g. subgroup analysis, meta-regression).	
	13f	Describe any sensitivity analyses conducted to assess robustness of the synthesized results.	
Reporting bias assessment	14	Describe any methods used to assess risk of bias due to missing results in a synthesis (arising from reporting biases).	
Certainty assessment	15	Describe any methods used to assess certainty (or confidence) in the body of evidence for an outcome.	
RESULTS			
Study selection	16a	Describe the results of the search and selection process, from the number of records identified in the search to the number of studies included in the review, ideally using a flow diagram.	
	16b	Cite studies that might appear to meet the inclusion criteria, but which were excluded, and explain why they were excluded.	
Study characteristics	17	Cite each included study and present its characteristics.	
Risk of bias in studies	18	Present assessments of risk of bias for each included study.	
Results of individual studies	19	For all outcomes, present, for each study: (a) summary statistics for each group (where appropriate) and (b) an effect estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval), ideally using structured tables or plots.	
Results of syntheses	20a	For each synthesis, briefly summarise the characteristics and risk of bias among contributing studies.	
	20b	Present results of all statistical syntheses conducted. If meta-analysis was done, present for each the summary estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval) and measures of statistical heterogeneity. If comparing groups, describe the direction of the effect.	
	20c	Present results of all investigations of possible causes of heterogeneity among study results.	
	20d	Present results of all sensitivity analyses conducted to assess the robustness of the synthesized results.	
Reporting biases	21	Present assessments of risk of bias due to missing results (arising from reporting biases) for each synthesis assessed.	
Certainty of evidence	22	Present assessments of certainty (or confidence) in the body of evidence for each outcome assessed.	
DISCUSSION			
Discussion	23a	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence.	
	23b	Discuss any limitations of the evidence included in the review.	
	23c	Discuss any limitations of the review processes used.	
	23d	Discuss implications of the results for practice, policy, and future research.	
OTHER INFORMATION			
Registration and protocol	24a	Provide registration information for the review, including register name and registration number, or state that the review was not registered.	
	24b	Indicate where the review protocol can be accessed, or state that a protocol was not prepared.	
	24c	Describe and explain any amendments to information provided at registration or in the protocol.	
Support	25	Describe sources of financial or non-financial support for the review, and the role of the funders or sponsors in the review.	
Competing interests	26	Declare any competing interests of review authors.	
Availability of data, code and other materials	27	Report which of the following are publicly available and where they can be found: template data collection forms; data extracted from included studies; data used for all analyses; analytic code; any other materials used in the review.	

Anexo 3. Matriz de caracterización de los resultados de la búsqueda bibliográfica

Tabla 10

Caracterización de estudios incluidos en la investigación.

Autor(es)	Título	Año	Base de Datos	Revista/Universidad	País	Idioma	Tipo de documento
Karim et al.	<i>Kluyveromyces marxianus</i> : An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology	2020	Science Direct	International Journal of Food Microbiology	Canadá	Inglés	Artículo
Øverland et al.	Evaluation of <i>Candida utilis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (<i>Salmo salar</i>)	2013	Science Direct	Aquaculture	Noruega	Inglés	Artículo
Aggelopoulos et al.	Solid state fermentation of food waste mixtures for single cell protein, aroma volatiles and fat production	2014	Science Direct	Food Chemistry	Grecia - India - Reino Unido	Inglés	Artículo
Grammes et al.	<i>Candida utilis</i> and <i>Chlorella vulgaris</i> Counteract Intestinal Inflammation in Atlantic Salmon (<i>Salmo salar</i> L.)	2013	ProQuest	PLoS one	Noruega	Inglés	Artículo

Tabla 10 (continuación)

Autor(es)	Título	Año	Base de Datos	Revista/Universidad	País	Idioma	Tipo de documento
Ribeiro et al.	The use of <i>Kluyveromyces marxianus</i> in the diet of Red-Stirling tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i> , Linnaeus) exposed to natural climatic variation: effects on growth performance, fatty acids, and protein deposition	2014	ProQuest	Aquaculture Research	Brasil	Inglés	Artículo
Nurcholis et al.	Integration of comprehensive data and biotechnological tools for industrial applications of <i>Kluyveromyces marxianus</i>	2020	Google Académico	Applied Microbiology and Biotechnology	Alemania	Inglés	Artículo
Maccaferri et al.	Potential probiotic <i>Kluyveromyces marxianus</i> B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system	2012	Google Académico	Applied and Environmental Microbiology	Italia	Inglés	Artículo
Wang et al.	Effects of <i>Kluyveromyces marxianus</i> supplementation on immune responses, intestinal structure and microbiota in broiler chickens	2017	Google Académico	PLoS one	China	Inglés	Artículo

Tabla 10 (continuación)

Autor(es)	Título	Año	Base de Datos	Revista/Universidad	País	Idioma	Tipo de documento
Wang et al.	Dietary supplemental <i>Kluyveromyces marxianus</i> alters the serum metabolite profile in broiler chickens	2018	Google Académico	Food & Function	China	Inglés	Artículo
Mendoza	Caracterización de la levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> como microorganismo probiótico	2013	Google Académico	Universidad Autónoma de Hidalgo	México	Español	Tesis Doctoral
Øverland & Skrede	Yeast derived from lignocellulosic biomass as a sustainable feed resource for use in aquaculture	2017	Google Académico	Journal of the Science of Food and Agriculture	Noruega	Inglés	Artículo

Anexo 4. Aplicaciones de la Proteína unicelular de *K. marxianus* en la alimentación animal

Tabla 11

Aplicaciones de la PUC de K. marxianus en alimentación animal.

Autor	Microorganismo	Tipo de alimento	Animal	Metodología	Resultados
(Øverland et al., 2013)	<i>K. marxianus</i>	Balanceado	Salmón del Atlántico (Salmón salar)	Sustitución parcial de la harina de pescado por el 40% de <i>K. marxianus</i>	La dieta con <i>K. marxianus</i> no afectó el rendimiento del crecimiento del salmón ni la digestibilidad, pero si presentó una disminución significativa del colesterol plasmático.
(Grammes et al., 2013)	<i>K. marxianus</i>	Balanceado	Salmón del Atlántico (Salmón salar)	Cuatro dietas experimentales que combinaban 20% de harina de pescado con <i>C. utilis</i> (CU), <i>K. marxianus</i> (KM), <i>S. cerevisiae</i> (SC) y la microalga <i>C. vulgaris</i> (CV).	Las dietas con CU, CV y KM fueron efectivas para contrarrestar la inflamación intestinal inducida por el uso de harina de soja (SBMIE) en el salmón atlántico, mientras que SC no tuvo efectos funcionales.
(Ribeiro et al., 2014)	<i>K. marxianus</i> CBS 6565	Balanceado	Tilapia roja (<i>Oreochromis niloticus</i> , Linnaeus)	Reemplazó total de la harina de pescado con <i>K. marxianus</i> CBS 6565	Las tilapias alimentadas con PUC de <i>K. marxianus</i> tenían una mayor concentración de proteína en el filete que las tilapias alimentadas con harina de pescado.

Tabla 11 (continuación)

Autor	Microorganismo	Tipo de alimento	Animal	Metodología	Resultados
(Øverland & Skrede, 2017)	<i>K. marxianus</i>	Balanceado	Salmón del Atlántico y trucha arcoíris	Revisión bibliográfica	<i>K. marxianus</i> tienen una favorable composición de aminoácidos y excelentes propiedades como fuente de proteínas en dietas para peces.
(Aggelopoulos et al., 2014)	<i>K. marxianus</i> IMB3	Balanceado	Ganado	Biomasa cultivada en 28 sustratos mixtos de residuos de la industria alimentaria.	Por su considerable contenido de grasa y proteína <i>K. marxianus</i> puede ser utilizado en el enriquecimiento de la alimentación para el ganado.
(Wang et al., 2017)	<i>K. marxianus</i>	Balanceado	Pollos de Engorde	Pollos de engorde de 1 día de edad alimentados con dietas basales con 0,25, 0,50, 1,0, 1,5, 2,0 y 2,5 g/kg de <i>K. marxianus</i> .	La dosis de 2,5 g/kg fue la más eficaz para la eficiencia alimenticia y la mejora de la estructura microbiana de los pollos de engorde, mientras que la inmunidad innata se optimizó a dosis media 1,0 g/kg.
(Wang et al., 2018)	<i>K. marxianus</i>	Balanceado tipo puré	Pollos de Engorde	Pollos de engorde de 1 día de edad alimentados con dietas basales con <i>K. marxianus</i> y sin suplementos.	La suplementación con <i>K. marxianus</i> alteró las concentraciones de una variedad de metabolitos en el suero de los pollos. Estos metabolitos estaban principalmente involucrados en la regulación de los aminoácidos y el metabolismo de los carbohidratos.

Anexo 5. Aplicaciones de proteína unicelular de *K. marxianus* en la alimentación humana

Tabla 12

Aplicaciones de la PUC de K. marxianus en alimentación humana

Autor	Microorganismo	Tipo de alimento	Metodología	Resultados
(Karim et al., 2020)	<i>K. marxianus</i>	Aditivo alimentario Probiótico	Revisión bibliográfica	<i>K. marxianus</i> puede ser aprovechada como biomasa para la producción de pan, probiótico y para la producción de enzimas y compuestos aromáticos.
(Nurcholis et al., 2020)	<i>K. marxianus</i>	Aditivo alimentario	Revisión bibliográfica	Producción de enzimas, proteínas heterólogas, compuestos aromáticos y bioingredientes, reducción de lactosa contenido en productos alimenticios, producción de etanol o proteínas unicelular.
(Maccaferri et al., 2012)	<i>K. marxianus</i> B0399	Probiótico	Ensayos in vitro sobre la composición y la actividad metabólica de la microbiota intestinal humana en un sistema de cultivo continuo de tres etapas que simulaba el colon humano.	<i>K. marxianus</i> era altamente adhesiva a las células Caco-2 similares a los enterocitos humanos, induciendo citocinas proinflamatorias en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Además, impactó la microbiota colónica, aumentando la concentración de bifidobacterias en el sistema modelo de colon. Los efectos de <i>K. marxianus</i> B0399 demuestran que esta cepa posee una serie de propiedades beneficiosas y específicas deseables para su aplicación como probiótico.

Tabla 12 (continuación)

Autor	Microorganismo	Tipo de alimento	Metodología	Resultados
(Mendoza, 2013)	<i>K. marxianus</i>	Probiótico	<p>Ensayos in vitro de la exposición de <i>K. marxianus</i> a diferentes concentraciones de sales biliares (0,05, 0.10, 0,15, 0,20, 0.25, 0.30 %), pH ácido y tolerancia al jugo gástrico. Además de ensayos sobre la inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> y determinación de la capacidad probiótica en un modelo de intestino de ratones CD-1.</p>	<p>La levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i> puede ser considerada como un microorganismo probiótico ya que mostró ser resistente a concentraciones de sales biliares de 0.05% a 0.30%, fue capaz de sobrevivir a valores de pH ácido, y mostró tolerancia al jugo gástrico hasta por 24 h, de igual manera, fue capaz de establecerse en el intestino en un modelo de ratones CD.1 y colonizarlo, logrando inhibir el crecimiento de la bacteria patógena <i>Klebsiella pneumoniae</i>.</p>

Anexo 6. Evidencias fotográficas de la experimentación

Caracterización del suero de mantequilla



Ilustración 1. Determinación de pH

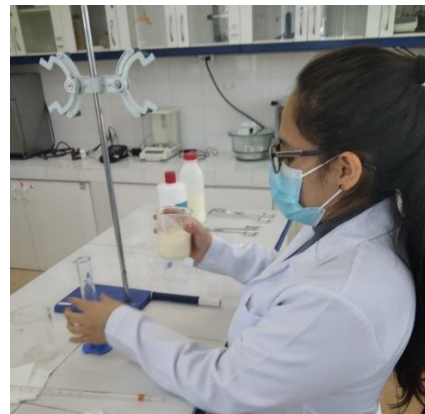


Ilustración 2. Determinación de acidez



Ilustración 3. Determinación de Proteína



Ilustración 4. Determinación de grasa



Ilustración 5. Determinación de humedad



Ilustración 6. Determinación de cenizas

Identificación y conservación del microorganismo

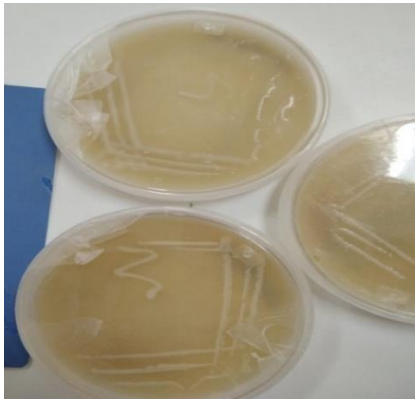


Ilustración 7. Cepa de K. marxianus adquirida de Algaebank

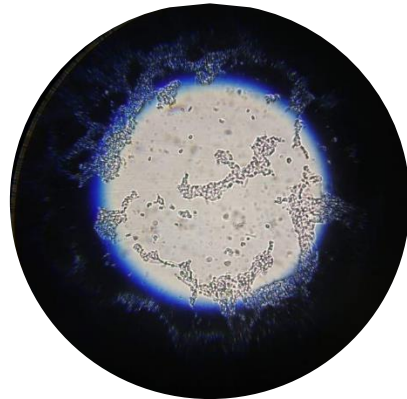


Ilustración 8. Identificación de la levadura por tinción simple vista en el microscópico 20X

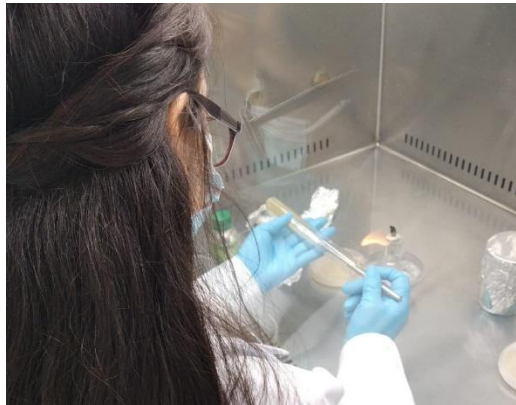


Ilustración 9. Siembra del microorganismo en tubos con PDA Agar

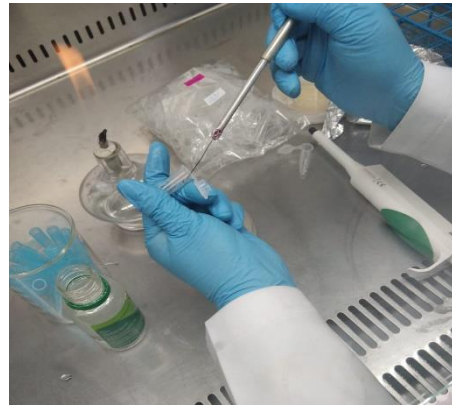


Ilustración 10. Crioconservación del microorganismo en tubos eppendorf

Preparación del sustrato



Ilustración 11. Desproteinización del suero



Ilustración 12. Suplementación del suero

Proceso de Fermentación

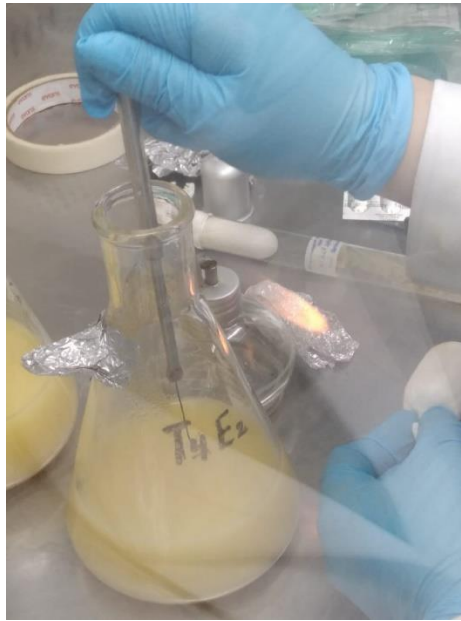


Ilustración 13. Inoculación



Ilustración 14. Montaje del biorreactor

Obtención de la Proteína Unicelular



Ilustración 15. *Obtención de la Proteína unicelular.*



Ilustración 16. *Secado de la biomasa*



Ilustración 17. *Proteína unicelular de K. marxianus*