

Composición química y enriquecimiento del lactosuero de leche de caprino para la producción de ácido láctico con *Lactobacillus helveticus*

Chemical composition and viability of goat milk whey for the production of lactic acid with *Lactobacillus helveticus*

Alejandra Plata Pinzón¹, Sandra Milena Ramírez² y Campo Elías Riaño³

^{1,2}Ingeniera de Alimentos. ³Ingeniero Químico, Magister en Ciencias de la Ingeniería, Candidato a Doctor en Educación a Distancia en Nova University.

^{1, 2, 3} Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingenierías. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Bogotá. Colombia.

¹alejandrasilver@gmail.com, ²sanmilramirez@gmail.com, ³campo.riano@unad.edu.co.

Resumen

El lacto suero de leche de caprino es un subproducto de bajo valor económico, concebido en Colombia como un desecho industrial y con impacto ambiental para los ecosistemas-DBO 60,000 ppm y DQO de 80,000 ppm), de allí que en este trabajo se caracterizó el suero, y se evaluó la pertinencia de la cepa *Lactobacillus helveticus* (LH) 0- 0,91 para la producción de ácido láctico a partir de lacto suero de leche de caprino enriquecido con tres nutrientes; variables que se estudiaron siguiendo un diseño greco latino. Para tal efecto, se llevaron a cabo 16 cinéticas en un biofermentador intermitente conteniendo 250 mililitros de lacto suero de leche de caprino en donde la mayor producción de ácido láctico-17.72 gramos por litro se logra después de las 50 horas para el medio que contiene extracto de levadura 2,5 %, riboflavina 0,6 % y sulfato de amonio 0,45 % operando el biofermentador a 42 °C. Se concluyó que además de producir ácido láctico, el LH es una alternativa para evitar la contaminación de ecosistemas puesto que generaría un valor agregado a la agroindustria quesera.

Palabras clave: leche de caprino, lactosuero, *Lactobacillus helveticus*, medio de cultivo, ácido láctico.

Summary

Goat milk whey is a byproduct of low economic value, and is perceived within Colombia as industrial waste with a negative environmental impact on ecosystems (BOD and COD of 60,000 ppm and 80,000 ppm respectively). Therefore this paper seeks to characterize this whey, and evaluate the effectiveness of the *Lactobacillus Helveticus* (LH) strain from 0 to 0.91 for the production of lactic acid from whey goat milk enriched with three nutrients. The variables studied follow a Greco-Latin model. To this effect, 16 kinetics were conducted in an intermittent bio-fermenter containing 250 milliliters of goat milk whey wherein the highest production of lactic acid, 17.72 grams per liter, is achieved after 50 hours for a medium containing 2.5% yeast, 0.6% riboflavin, 0.45% ammonium sulfate, and the bio-fermenter operating at 42 ° C. The study concludes that apart from producing lactic acid, LH is an alternative towards avoiding contamination of ecosystems in as much as it would generate an added value to the cheese industry.

Keywords: goat milk, whey, *Lactobacillus helveticus*, culture medium, lactic acid.

Introducción

El lactosuero de leche de caprino (LSLC) es el líquido resultante de la elaboración de cuajada o queso, al separarse la caseína y la grasa durante la coagulación (alrededor del 85-90 % del volumen de leche utilizada). Está constituido aproximadamente por un 93 % de agua, 5 % de lactosa y menos del 1 % de proteína, de las cuales la mitad son proteínas de alto valor nutricional como son albuminas, globulinas y proteasa-peptona, 0,7 % de minerales, con mayor contenido de sodio, potasio, magnesio, cloruro y fosfato. Contiene también las vitaminas hidrosolubles de la leche, la más importante es la riboflavina, también posee pequeñas cantidades de grasa y ácido láctico (AL) y su pH se encuentra entre 5-6 (Altiok, 2004).

Actualmente el suero tiene poca aplicabilidad industrial, los excedentes se convierten en un producto contaminante- (DBO) muy alto, de 40000 a 60000 ppm y una demanda química de oxígeno (DQO) de 50000 a 80000 ppm (Jin *et al.*, 2005). Más del 90 % de esas demandas se deben a la transformación de la lactosa (Ocampo *et al.*, 2000). De allí que la búsqueda de alternativas para el aprovechamiento de este efluente se convierte en necesidad nacional. Una de las alternativas es la obtención de ácido láctico (AL) (Rojan *et al.*, 2006). El AL es de amplio uso en la industria; debido a sus características se utiliza en la industria alimentaria (en bebidas y como conservante), en farmacia, medicina, textiles, en la industria del cuero y para la producción de plásticos biodegradables (Lederberg, 1992).

El Food Chemical Codex en 1996 especifica el uso del AL en alimentos con una pureza del 88 %. El AL se puede obtener por síntesis química o por vía fermentativa (Goksungur *et al.*, 1999).

Una de las principales dificultades en la producción a gran escala del AL es el costo de las materias primas, siendo de interés encontrar nuevos medios de bajo costo para mejorar la economía del proceso (Rojan *et al.*, 2006). Los microorganismos productores de AL pertenecen a las familias *Streptococcaceae* (géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerobacter* y *Gemella*) y *Lactobacillaceae* (género *Lactobacillus*), (Ben Amor *et al.*, 2007, Foo *et al.*, 1993, citados en Estela *et al.*, 2007). La familia *Lactobacillaceae* y, en especial, los del género *Lactobacillus* (*L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. delbruekii* L.), son anaerobias facultativas (no presentan crecimiento superficial o este es escaso), no poseen catalasa, no reducen el nitrato. Su metabolismo es fermentativo, cerca del 50 % de su producto final es ácido láctico, su temperatura óptima de crecimiento está entre 30-40 °C, en un rango aceptable entre 26 y 46 °C, a un pH de 4.5-7.2 y es un microorganismo no patógeno (Alais, 1970), razón por la cual fueron seleccionadas para este trabajo.

Trabajos pioneros reportan la obtención de 40,78 g/L ácido láctico en 48 horas de fermentación (Fu & Mathews, 1999). Akerberg *v*(1998) utilizando como sustrato harina integral hidrolizada adicionada de glucosa pura reporta concentraciones de ácido láctico de 50 g/L con *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus casei*. Boonme *et al.* (2003), lograron producir (uniformizar el tiempo en todo el trabajo) ácido láctico en un medio comercial M17 modificado con lactosa pura y obtuvo concentraciones de 80 g/L de ácido láctico y rendimientos de producto de 0,93 g/g. Sin embargo, la principal desventaja de la producción por la vía fermentativa es el alto costo que ocasionan su aislamiento y purificación

(Estela *et al.*, 2007). Por esta razón, las investigaciones se han enfocado en la disminución del costo de producción de AL con células libres y/o inmovilizadas (Betancur *et al.*, 2003), incrementar la pureza óptica del ácido láctico y en la búsqueda de mezclas que faciliten su producción.

De lo anteriormente expuesto, el presente investigación tuvo como objetivo demostrar que la viabilidad del *Lactobacillus helveticus* para producir ácido láctico a partir de suero de leche de caprino puede ser substancialmente incrementada por la adición de nutrientes.

Materiales y métodos

Materiales: Lacto suero de leche de caprino desproteinizado, esterilizado y enfriado a 121°C y 4°C respectivamente además el suero de leche de caprino se filtró al vacío.

Microorganismo: *Lactobacillus helveticus* 0-0.91, cepa liofilizada, producida por la Technical Sheet, activada en tubos de vidrio con 10 ml de leche UHT a una temperatura de 42 °C durante 48 horas en un medio microaerófilico-recipiente cerrado sin oxígeno presente.

Nutrientes: extracto de levadura, sulfato de amonio y vitamina B, combinación de estos corresponden a los tratamientos: T₁ a T₁₆, respectivamente.

Diseño experimental: se planteó un diseño de cuadro greco latino 4x4 (los factores tienen el mismo número de niveles y no se presentan interacciones entre ellos). El diseño consistió en agrupar las unidades experimentales en dos direcciones (filas y columnas) y asignar los trata-

mientos al azar en las unidades, en una forma tal que en cada fila y en cada columna estén todos los tratamientos (Montgomery *et al.*, 2008). El total de unidades experimentales es igual al cuadrado del número de tratamientos. Para 4 tratamientos se requiere 16 unidades. Cuatro temperaturas de fermentación 37 °C, 42 °C, 48 °C y 53 °C y cuatro concentraciones de cada uno de los cuatro nutrientes.

Análisis a realizar: pH del medio y concentración de ácido láctico (determinación de acidez titulable bajo la NTC 4978 de 2001).

VARIABLES DE RESPUESTA: Concentración en ácido láctico (g/L)-absorbancia.

Los coeficientes de rendimiento y la productividad volumétrica fueron determinados en el estado de equilibrio, este último se estableció cuando los valores evaluados (concentración de ácido láctico, pH) no se modificaron significativamente al realizar dos determinaciones consecutivas.

Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y análisis de comparación múltiple (Test de Tukey), para comparar la incidencia de los medios sobre el crecimiento del *L. helveticus* y la producción de AL.

Metodología

Se siguieron las siguientes etapas:

- Caracterización bromatológica de la leche de caprino y el suero de caprino: (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización bromatológica de la leche caprina y el suero de caprino

Análisis realizado	Leche caprina nacional	Suero de leche caprina-nacional	Suero de leche caprina-nacional Juárez y col.,1991
Cenizas (%)	0,94	0,45	0,69 - 0,89
Sólidos totales (%)	16,3	7,47	11,70 - 15,21
Gravedad específica (g/cc)	1,033	1,026	
Densidad (g/cc)	1,034	1,003	
Índice de acidez (°D)	16°D	18°D	
Contenido de caseína (%)	2,85	0,89	
pH	6,72	6,38	6,41 - 6,70
Contenido de grasa (%)	4,7	0,51	3,00 - 6,63
Proteína (%)	4,61	1,18	2,90 - 4,60
Lactosa (%)			3,80 - 5,12

b. Filtrado del suero al vacío.

c. Preparación del inóculo y multiplicación del *Lactobacillus helveticus*. Este se multiplicó en cajas de Petri con PDA a una temperatura controlada de 42 °C y durante 5 días. De las cajas se tomó una colonia, se sembró en tubos inclinados con PDA (estando el sistema a una temperatura controlada de 42 °C) y por 15 minutos acorde con los Laboratorios Merck S. A).

d. Siembra bajo condiciones de esterilidad por el método de agotamiento o estría, para lo cual las cajas de Petri se introdujeron en un recipiente-medio anaerobio, se incubó el conjunto durante 48 horas a una temperatura de 42 °C.

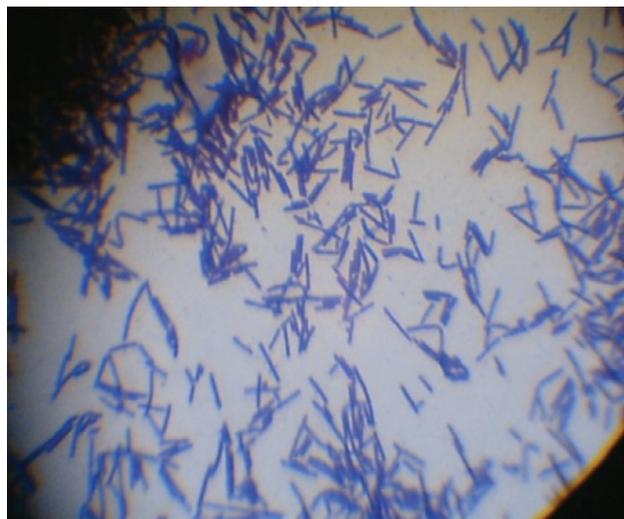


Figura 1. Colonias de *Lactobacillus helveticus*.
Fuente: Plata et al. (2008).

Para realizar una evaluación visual, se sembró el microorganismo activo en agar Man Rogosa Sharpe (MRS), medio selectivo para *Lactobacillus* que posee todos los minerales y compuestos requeridos por esta especie: Figura 1.

Las variables estudiadas para la cepa fueron: temperatura de incubación, medios de cultivo y pH inicial del medio de cultivo. Para el estudio de la temperatura de incubación se ensayaron diferentes valores (37, 42, 48 y 53 °C) dentro del intervalo óptimo de crecimiento de *Lactobacillus helveticus*

según se describe en la literatura (Ocampo *et al.*, 2000, Urribarrí, 2004) y para el pH los siguientes valores iniciales: 5; 5,6; 7; 8; 9 y 10.

Preparados los sustratos se envasaron en erlenmeyers de 500 mL, con un volumen de trabajo de 250 mL y se sometieron a esterilización por 10 min a 121 °C. Cuando los sustratos se encontraban a temperatura de 30 °C aproximadamente, se inocularon con la cepa de *Lactobacillus helveticus*, la cual antes de la inoculación se adaptó a los diferentes sustratos por tres generaciones en un volumen de 10 mL; en todos los casos se utilizó 10% de inóculo respecto con el volumen de trabajo (Serna *et al.*, 2007).

Los tratamientos consistieron en un sustrato básico-lacto suero caprino, más un suplemento de vitaminas y minerales-extracto de levadura, riboflavina y sulfato de amonio, respectivamente. Se elaboraron dieciséis medios de cultivo con diferente composición (Tabla 2). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza para tres factores con efectos fijos. Las diferencias entre los pares de medias de las variables que mostraron diferencias significativas se analizaron mediante la prueba de diferencia significativa de Tukey. El diseño se analizó con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 2. Condiciones experimentales del proceso para la obtención de AL

Corrida experimental	Temperatura °C	Riboflavina %	Extracto de levadura %	Sulfato de amonio %
1	37	0	0	0
2	42	0,2	0	0,15
3	48	0,4	0	0,3
4	53	0,6	0	0,45
5	37	0	1,5	0
6	42	0,2	1,5	0,15
7	48	0,4	1,5	0,3
8	53	0,6	1,5	0,45
9	37	0	2,5	0
10	42	0,2	2,5	0,15
11	48	0,4	2,5	0,3
12	53	0,6	2,5	0,45
13	37	0	3,5	0
14	42	0,2	3,5	0,15
15	48	0,4	3,5	0,3
16	53	0,6	3,5	0,45

Resultados y Discusión

Caracterización del suero de leche de cabra entero y descremado.

Se presentan los resultados de la caracterización bromatológica del suero de leche de cabra utilizado (Tabla 1).

Los valores observados se encontraron en los rangos típicos de calidad del suero de leche de vaca, según la Juaiez, *et al.* (1991). De acuerdo con estos resultados, el suero de leche de cabra entero tiene una relación proteína/carbohidratos ligeramente menor a 0.5. Esta es una relación comparativamente alta. La norma mencionada acepta, para el caso de suero de leche de cabra, relaciones mínimas de proteína/carbohidratos del orden de 0.2.

Propagación del inóculo de *Lactobacillus helveticus*

La tinción de Gram y la observación en el microscopio electrónico permitió observar la morfología, confirmar la pureza del cultivo y la evaluación vi-

sual de las colonias de *Lactobacillus helveticus* las cuales son redondas, lisas y de color blanco cremoso (Figura 1).

Producción de AL

Durante el proceso fermentativo, en las primeras doce horas se produjo el 35 % de la cantidad total de AL, después de este tiempo la producción se vio afectada por el crecimiento del microorganismo y el bajo consumo del sustrato, logrando estabilizarse a las 48 horas de fermentación a una producción total de (18 g/L). (Figura 2).

El medio 1-solo LSLC tardó 8 horas más que los medios enriquecidos para lograr el máximo valor AL, y no hubo diferencia estadísticamente significativa entre los análisis de ambos medios (Figura 2).

El análisis de varianza para las tres variables independientes, concentración de extracto de levadura (A), concentración de riboflavina (B) y concentración de sulfato de aluminio (C), no mostraron significancia $P < 0,05$ para la producción de AL-(Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de varianza para las variables intervinientes en la producción de AL a partir de LSLC.

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios = Scuadrados/Grados de Libertad	FC=Cuadrados med/Cuadrados medios del error	F _{0,05}	F _{0,0025}
Temperatura (°C)	3	90,2722688	30,0907563	20,2460082	9,28	15,44
Extracto de Levadura-A (%)	3	19,3515188	6,45050625	4,3401037		
Riboflavina-B (%)	3	29,1255188	9,70850625	6,53218868		
Sulfato de amonio-C (%)	3	29,1255188	9,70850625	6,53218868		
Error	3	4,45876875	1,48625625			
Total	15	172,333594	57,4445313			

El LSLC es un subproducto de muy bajo valor económico, concebido en general en Colombia como un desecho industrial (inclusive con un alto potencial de impacto ambiental). Los resultados presentados documentan la factibilidad para la producción de AL.

Para la temperatura de proceso la $F_{0,25} > F_{0,05}$, 9,28, entonces se acepta la hipótesis alterna,

la temperatura es fuente de variación para la respuesta, comprobada experimentalmente pues la concentración de ácido láctico obtenida en los ensayos realizados a 48 °C es menor que la concentración obtenida en los ensayos realizados a 38 °C y 42 °C respectivamente, entonces, la temperatura óptima como se comprobó en este trabajo- es de 42 °C, acorde con lo reportado por Ocampo *et al.*, 2000 y Urribarrí, 2004 (Tabla 3).

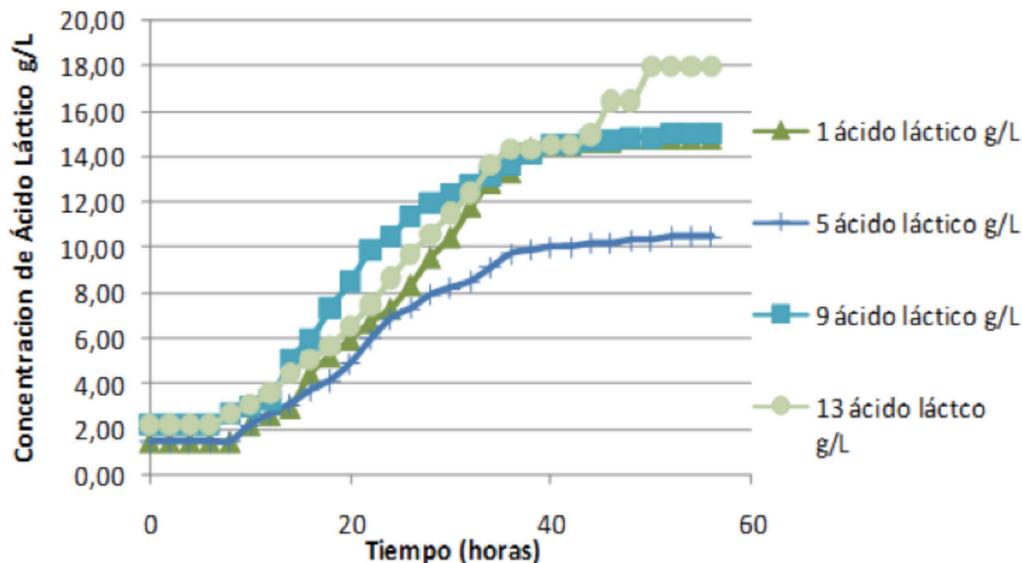


Figura 2. Evolución de los perfiles de concentración de ácido láctico en las condiciones experimentales 1, 5, 9 y 13 detalladas en la Tabla 2 para este proceso por lotes. Fuente: Plata *et al.* (2008).

Como la $F_{0,34}$ menor que $F_{0,05}$, 9,28, entonces se acepta H_0 , el extracto de levadura no es fuente de variación para la respuesta (Tabla 3).

Los ensayos que contienen un mayor porcentaje de extracto de levadura son los que generan una mayor producción de AL, lo que permite concluir que dicho componente tiene

mayor incidencia que el sulfato de amonio y la riboflavina, sin desmeritar la función de estos últimos para enriquecer el medio para la producción de AL.

Para la riboflavina la $F_{0,53}$ menor que $F_{0,05}$, 9,28, entonces se acepta H_0 , la riboflavina no es fuente de variación para la respuesta (Tabla 3).

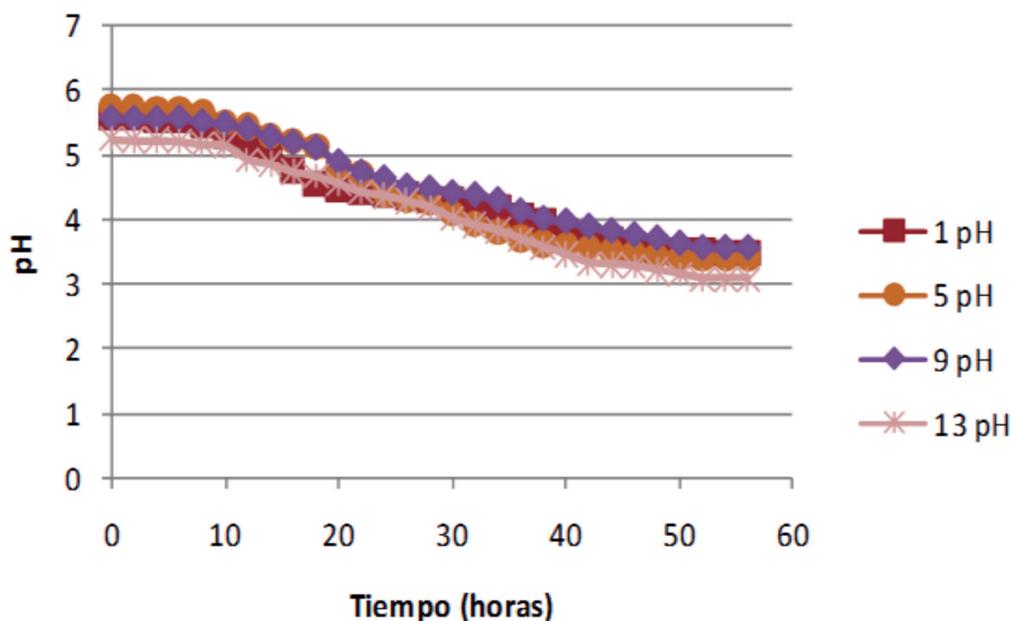


Figura 3. Evolución de los perfiles de concentración de AL en las condiciones de experimentales 1, 5, 9 y 13 detalladas en la tabla 2 para este proceso por lotes.

Como la F_o (6.53) menor que $F_{0.05}$, 9.28, entonces se acepta H_0 , el sulfato de amonio no es fuente de variación para la respuesta (Tabla 3).

Del análisis estadístico de los datos experimentales se concluye que las fuentes de carbono y de sales evaluadas no tuvieron efecto significativo ($p > 0.05$) sobre el crecimiento de la cepa LH 0-0.91; por lo tanto, en los trabajos de optimización-posteriores se utilizará el nivel inferior de cada una de las fuentes.

Conclusiones y discusión

EL LSLC es un sustrato con muy buen potencial para ser utilizado en la producción de AL, aún sin la adición de extracto de levadura.

Durante 40 horas la producción de AL es exponencial para todas las condiciones de proceso; la condición 13 con solo extracto de levadura continúa con la tendencia exponencial hasta las 45 horas. Condición que genera las más altas conversiones de sustrato y los mayores rendimientos

(18 g/L de AL). (Figura 2). Siendo esta concentración alta si la comparamos con los 13,02 g/L alcanzados por Urribarrí (2004) utilizando *L. helveticus* en suero de leche desproteínizado, suplementado y en reactor continuo.

El uso de este sustrato podría disminuir los costos operacionales en más del 50 %, comparado con el uso de sustratos puros, y daría además un valor agregado al LSLC, residuo con poca aplicabilidad industrial y generador de contaminación ambiental.

Literatura citada

1. Altioik, D. (2004). Kinetic Modelling of Lactic Acid Production from Whey. Master of Science, Izmir Institute of Technology, Food Engineering, Izmir, Turkey.
2. Akeberg, C., K. Hofvendahl, G. Zacchi & Hahn, H. (1998). Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. ATCC 19435 in whole _ wheat flour. Applied Microbiology and Biotechnology, 49, 682- 690.
3. Aguirre-Eskauriatza, J. (2008). Producción de proteína liofilizada y biomasa de *Lactobacillus casei* BPG4 liofilizada, a partir de suero de leche de cabra. (Tesis de Maestría). México: Tecnológico de Monterrey.

4. Alais, C. (1970). Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. México: CECSA.
5. Altioik, D., Tokatli, F. & Harsa, S. (2006). Kinetic modeling of lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 81, 1190–1197.
6. Association Of Official Agricultural Chemists. *Official Methods Of Analysis*. (1980). 13th ed. Washington, D.C.
7. Betancur, J., Abad, P., Arias, M. & Restrepo, B. (2003). Inmovilización de *lactobacillus helveticus* en soportes vítreos obtenidos por tecnología sol-gel. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, Vol. 42 (2),79-83.
8. Boonmee, M., Leksawasdi, N., Bridge, W. & Rogers, P. (2003). Batch and Continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: experimental data and model development. *Biochemical Engineering Journal*, Vol.14, no. 2, 127-135.
9. Estela, W., Rychtera, M. & Melzoch, K. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Rev. peru biol.*, vol.14, no.2, 271-276. ISSN 1727-9933.
10. Institute of Medicine. (2006). Food Chemical Codex. 7thed. The United States Pharmacopeial Convention.
11. Foo, E. L., H. G. Griffin, R. Mollby & C. G. Hedén. (Editors). (1993). *The Lactic Acid Bacteria*. Horizon Scientific Press. United Kingdom, 89 – 91.
12. Fu, W. & Mathews, A. (1999). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Science Direct. Biochem Eng J*. 1999; 3, 163- 170.
13. Goksungur, Y. & Guvenc, U. (1999). Production of lactic acid from beet molasses by calcium alginate immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74, 131-136.
14. Ha, M. & Kim, S. (2003). Kinetics analysis of growth and lactic acid production in pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 using yeast extract/corn steep liquor/glucose medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2),134-140.
15. Jin, B., Yin, P., Ma, Y. & Zhao L. (2005). Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus fungi* from food processing waste streams. *Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 678.
16. Lederberg, J. (Editor). (1992). *Encyklopedia of Microbiology* (2nd edition), The Rockefeller University New York, NY, Vol.3, 1 - 17.
17. *Microbiología industrial*. (s.f). Disponible en: www.unavarra.es/genmic/micind-2-2.htm. (23 de junio de 2007).
18. Montgomery D. & Runger G. (2000). *Probabilidad y Estadística. 2da Ed.*) México: Mc Graw Hill. Interamericana Editores.
19. Ocampo, O., Urbina C.E., Juárez, C., Ruiz, N. & Galíndez, J. (2000). Depuración del suero común cultivo mixto de levaduras, utilizando un sistema por lote alimentado y alimentado repetido. *Tecnología Láctea Latinoamericana, México*, 20, 44-52.
20. Ocampo, O., Urbina, C., Juárez, C., Ruiz, N. & Galíndez, J. (2000). Depuración del suero común cultivo mixto de levaduras, utilizando un sistema por lote alimentado y alimentado repetido. *Tecnología Láctea Latinoamericana, México*, 20, 44-52.
21. Plata, A. & Ramírez, S. (2008). Obtencion de ácido láctico a partir del suero de la leche de caprinos por fermentación de *lactobacillus helveticus*. Ingeniería de alimentos. UNAD.
22. Prescott, S. & Duna, C. (2000). *Microbiología Industrial*. (2da Ed. En Español) Madrid, España: Aguilar, S. A. de Ediciones;
23. Rojan, P., Madhavan, N., and Pandey, A. (2006). Solid-state fermentation of L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41, 759-763.
24. Serna, L., & A. Rodríguez. (2006). Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis subsp. lactis* isolated from sugar cane plants. *Elect. J. Biotechnol.* 9, 40-45.
25. Urribarrí, L. (2004). Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo. *Revista Científica. Universidad del Zulia*. 14, 4.