

7 Obtención de ácido láctico a partir de la fermentación del suero de leche con *Lactobacillus bulgaricus* (Obtaining lactic acid from the fermentation of whey with *Lactobacillus bulgaricus*) MSC. Vicky Alejandra Mendoza

Vicky Alejandra Mendoza-Pico¹, Ernesto Alonso Rosero-Delgado², Julio Amílcar Pineda Insuasti³

¹Universidad de Jaén, Jaén, España

²Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Ecuador

³Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente, Ibarra, Ecuador

Email: eroser@utm.edu.ec

Resumen

El suero de leche es un subproducto de la industria láctea que contamina al medio ambiente cuando es vertido en el suelo. El aprovechamiento del mismo para la producción de ácido láctico utilizando la bacteria *Lactobacillus bulgáricus* como agente biológico en un sistema de fermentación líquida (FEL), fue estudiado en esta investigación. Se optimizaron las variables físicas pH_{inicial} y temperatura de fermentación, siendo 5,2 y 55 °C los valores determinados. La velocidad específica de crecimiento (μ) del microorganismo en esas condiciones fue de 0,024 h⁻¹ con un comportamiento exponencial. El rendimiento de ácido láctico alcanzado fue de 4,64g/L, con coeficientes de $Y_{X/S}= 0,025 \text{ gg}^{-1}$, $Y_{P/S}=0,081 \text{ gg}^{-1}$.

Palabras clave: Ácido láctico, *Lactobacillus bulgaricus*, suero de leche, fermentación

Abstract

Whey is a byproduct of the dairy industry that pollutes the environment when it is dumped into the soil. The use of it for the production of lactic acid using the bacterium *Lactobacillus bulgáricus* as a biological agent in a liquid fermentation system (FEL), was studied in this research. The initial pH and fermentation temperature physical variables were optimized, with 5.2 and 55 ° C being the determined values. The specific growth rate (μ) of the microorganism under these conditions was 0.024 h⁻¹ with an exponential behavior. The yield of lactic acid reached was 4.64g / L, with coefficients of $Y_{X / S} = 0.025 \text{ gg}^{-1}$, $Y_{P / S} = 0.081 \text{ gg}^{-1}$.

Keywords: Lactic acid, *Lactobacillus bulgaricus*, whey, fermentation

Recibido: 18 de agosto de 2019

Aceptado: 18 de septiembre de 2019

Introducción

La producción de lácteos es considerada con una potencial industria de generación de residuos principalmente durante la elaboración de productos como el queso, proceso a partir del cual se generan subproductos como suero de. Tiene una producción mundial de 82 millones de toneladas por año (Winfried 2007). En el Ecuador, el suero simplemente es dado como suplemento alimenticio para los animales o vertido en los campos. El vertimiento directo del lacto suero a fuentes de agua, sin un previo tratamiento, genera un problema de contaminación ambiental; debido a la materia orgánica (García, et. al., 1987).

Según datos del Ministerio de Agricultura, Ganaderías, Acuacultura y Pesca (MAGAP), actualmente en Ecuador se producen 5,4 millones de litros de leche diarios en Ecuador. De este monto, 4 millones de litros son comercializados en los distintos mercados; 2,8 millones de litros son transformados por

industrias formales que procesan derivados y 1,2 millones de litros son vendidos informalmente para elaborar quesos artesanales. A su vez se conoce que unos 1,4 millones de litros quedarían en las haciendas para autoconsumo y para alimentación de terceros (El Telégrafo, 2016). Para obtener un kilogramo de queso, se necesitan aproximadamente 10 litros de leche y se generan 9 litros de lactosuero como subproducto (Hernández y Vélez 2014). La composición nutricional del lactosuero puede variar considerablemente dependiendo de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido y el proceso tecnológico empleado en la elaboración del queso. El suero de leche contiene aproximadamente la mitad de los sólidos que están presentes en la leche, alrededor del 20% de las proteínas, la mayor parte de la lactosa, minerales y vitaminas hidrosolubles (Londoño, 2006).

La fermentación láctica a partir del suero de leche podría ser una de las soluciones para este subproducto de la industria láctea que es considerado como un contaminante, por lo cual, estudios demuestran que se puede obtener ácido láctico de la fermentación de este residuo, pero para que esto sea posible se debe establecer un sistema de control del proceso, el cual es llevado a cabo en equipos denominados biorreactores, que son diseñados mediante estudios rigurosos, para su posterior construcción y operación, con la finalidad de obtener la máxima producción de proceso.

El ácido láctico es un compuesto orgánico, cuya fórmula es $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$, posee un grupo hidroxilo adyacente al grupo carboxilo, el ácido láctico se clasifica como un ácido alfa-hidroxi (AHA). De acuerdo con Díaz (2010), el ácido láctico en la forma de su base conjugada llamada lactato, desempeña un papel fundamental en varios procesos bioquímicos, como la fermentación láctica.

La producción mundial de ácido láctico es de 100.000 toneladas por año, con un crecimiento en la demanda del 8,6% anual, debido al potencial que tiene este monómero de producir ácido poliláctico, un polímero biodegradable con aplicaciones industriales y médicas. En Ecuador (Cámara industrial de Guayaquil, 2012) se importan cerca de 286 toneladas anuales de ácido láctico y sus derivados como sales y ésteres. Es así que el uso del suero de leche, para la producción de ácido láctico, podría disminuir las importaciones de este producto y generar una fuente de trabajo a la sociedad.

El ácido láctico puede ser obtenido mediante dos métodos; por síntesis química o por vía biotecnológica. En el caso de la síntesis química, se tiene resultado una mezcla racémica de los ácidos lácticos que consta de tres etapas, La primera etapa se produce a través de la reacción del ácido cianhídrico con acetaldehído en un medio básico, a modo de catalizador, para producir lactonitrilo. La segunda etapa del proceso se basa en la hidrólisis del lactonitrilo en medio ácido, produciendo ácido láctico y sal amónica. La tercera y última etapa es la cristalización y purificación del ácido láctico. Se tienen como condiciones de operación, presión atmosférica y temperatura de 100 °C. El rendimiento total de esta etapa es del 60 % (Pozo García 2010).

La obtención de ácido láctico por la vía biotecnológica o fermentativa, es un proceso celular anaeróbico donde se utiliza glucosa para obtener energía y donde el producto de desecho es el ácido láctico. El proceso de fermentación láctica lo realizan las bacterias ácido láctica (BAL), algunos hongos, algunos protozoos y en los tejidos animales. Las bacterias de ácido láctico son un grupo de bacterias gram positivas que fermentan hidratos de carbono convirtiéndolos en ácido láctico casi en su totalidad (homofermentativa) o a una mezcla de ácido láctico, dióxido de carbono y ácido acético y/o etanol (heterofermentativo), también se producen otros compuestos tales como diacetilo, acetaldehído y peróxido de hidrógeno. Estos compuestos contribuyen al sabor y la textura de los alimentos fermentados y también pueden contribuir a la inhibición de bacterias de ácido láctico (Abdel-Rahman 2011).

El interés por el ácido láctico está relacionado con muchos aspectos, entre los cuales se encuentra su valor agregado relativamente alto. Además, dicho producto químico ha sido reconocido como inofensivo, tiene un mercado con gran potencial de crecimiento, puede producirse alternativamente por fermentación o síntesis química y puede emplear una gran cantidad de diferentes materiales de desecho como sustratos. Su existencia en forma de dos estereoisómeros hace de hecho la aplicación

de uno de ellos o de la mezcla racémica de gran preocupación en diferentes campos. En particular, las industrias alimentaria y farmacéutica tienen preferencia por el isómero L(+), el único que puede ser metabolizado por el cuerpo humano; Sin embargo, la industria química requiere uno de los isómeros puros o una mezcla de ambos, de acuerdo con la aplicación (Martínez 2013). El objetivo de esta investigación fue el aprovechamiento del lactosuero proveniente de los procesos de obtención del queso, para la producción de ácido láctico utilizando la bacteria *Lactobacillus bulgáricus* como agente biológico en un sistema de fermentación líquida (FEL).

Materiales y Métodos

Proceso Fermentativo

a. Preparación del inóculo

En un matraz 250 ml se mezclaron 55 gramos del medio de cultivo MRS marca *CRITERION* y se disolvieron en 200 mL de agua destilada, esta mezcla se sometió a esterilización a 121 °C a 103,7 kPa durante un tiempo de 15 minutos. Se dejó enfriar el medio de cultivo hasta temperatura ambiente y se inocularon 0,2 gramos de la cepa liofilizada de *Lactobacillus bulgáricus* marca CHR – Hansen YC XII. El matraz se colocó en una incubadora de marca *MEMMERT- CLN53ECO S/N CN5ED 11007* a una temperatura de 42,5 °C por un tiempo de 24 horas.

La concentración de células en el medio fue determinada mediante la metodología seguida por (XC 1993) mediante una cámara de Neubauer marca *MARIENFELD*.

b. Estandarización del suero de leche

Se utilizó 3 matraces de 1000 mL en donde se colocó 700 mL de suero de leche. Se ajustó el pH inicial a 4, 5 y 6 y se sometió a esterilización a una temperatura de 121 °C y 103,7 kPa por un tiempo de 15 minutos. Se dejó enfriar hasta una temperatura entre 30-35 °C y se filtró por medio de una bomba al vacío, utilizando papel filtro de 1 µm. Una vez filtrado el suero de leche se procedió a centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos, para las partículas en suspensión.

c. Inoculación del medio y fermentación

Se tomaron 10 ml del microorganismo en caldo MRS para inocular cada uno de los matraces con el suero de leche esterilizado, dando un total de 200 ml de medio en fermentación en cada matraz.

Una vez inoculados los matraces se llevaron a la incubadora *MEMMERT- CLN53ECO S/N CN5ED 11007*,

d. Determinación de las condiciones óptimas de fermentación

Se establecieron 27 corridas experimentales en un diseño multifactorial según lo expresado en la tabla 1. Las variables de respuesta fueron la producción de ácido láctico (g/mL) y la concentración de biomasa generada (cel/mL)

Tabla 1. Diseño factorial multinivel 3² utilizado para evaluar la influencia del pH inicial y la temperatura de fermentación sobre la producción de ácido láctico y crecimiento de la biomasa

Factor	Bajo	Intermedio	Alto
pH inicial	4	5	6
Temperatura	35 °C	45 °C	55 °C

e. Determinación de la producción ácido láctico.

La concentración de ácido láctico fue determinada por el método colorímetro con cloruro férrico (Cristina 2015), el cual en contacto con el ácido láctico forman el lactato ferroso el cual ocasiona un cambio de color que se detecta por medio espectrofotometría a una longitud de onda de 460nm.

f. Determinación de la dinámica del pH

Se utilizó un potenciómetro de marca *ACUMENT AB-150* para conocer las variaciones que tenía el pH durante el tiempo de fermentación, esta medición se realizó cada 30 minutos desde el inicio de la fermentación.

Resultados y Discusión

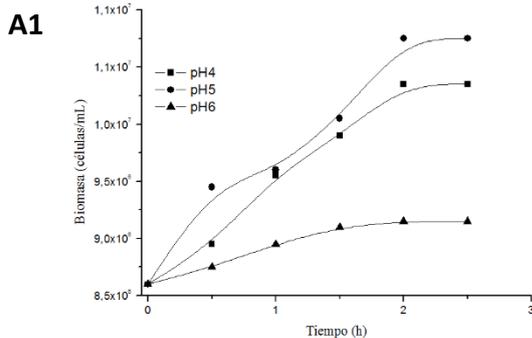
Optimización de los parámetros de fermentación

En la primera columna de la figura 1, se observan el crecimiento de la biomasa a diferentes valores de pH inicial y temperaturas de fermentación (A1, A2 y A3). Los valores de crecimiento de biomasa más bajos observados, se obtuvieron con valores de pH inicial de 4 y 6 y temperaturas de fermentación de 35 y 45 °C (A1 y A2), comportamiento similar al observado por (Waldir Estela 2007) quienes mencionan que los valores más bajos de crecimiento de la biomasa se obtienen con un valor pH inicial igual a 6 y una temperatura de fermentación de 38 °C, similar es el informe de (Venkatesh, Okos et al. 1993) quienes mencionan que valores mínimos de crecimiento celular se obtienen con un pH inicial de 4,5 y una temperatura de fermentación de 45 °C, por lo que se podría mencionar que estas condiciones de pH inicial y temperatura de fermentación el crecimiento celular es limitado.

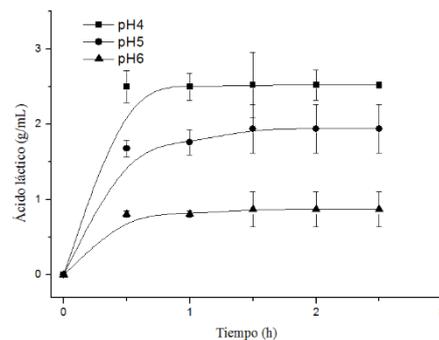
La producción máxima de ácido láctico (figura 1) fue de 4,64 g/L con condiciones de pH inicial igual 5,2 y una temperatura de fermentación de 55 °C (B3) durante las 2 primeras horas de fermentación convirtiéndose constante a partir de ese momento. Estudios realizados por (Roy, 1986) reportan producciones de ácido láctico de 2,7 g/L a las 24 horas de fermentación, por otro lado en otro estudio los mismos autores (Roy, 1987) obtienen como máximos resultados de producción de ácido láctico 9,7 g/L a una temperatura de fermentación 42 °C, mientras que los autores (Venkatesh KV 1993) obtuvieron como máxima producción de ácido láctico 2 g/L a una temperatura de fermentación 42 °C en 8 horas y (Jakymec, 2001) reportó un máximo valor de ácido láctico de 6,2 g/L con una temperatura de fermentación 45 °C en 12 horas. Los valores de máximos producción de ácido láctico obtenidos por los distintos autores están entre 2 g/L y 9,7 g/L, intervalo dentro del cual se encuentra el valor máximo obtenido en la presente investigación.

Se observa un valor máximo de 1,91 E7 células/mL de crecimiento de la biomasa, con un valor de pH inicial igual a 5 y a una temperatura de fermentación de 55 °C hasta las 2 horas de fermentación, periodo después del cual el crecimiento se mantiene constante; estos valores son menores con los reportados por (Zayed G 1995) quienes informan un valor máximo de crecimiento celular con 40 E6 células/mL a las 20 horas de fermentación con una temperatura de 30 °C, sin embargo, cabe mencionar que los autores usados como referencia utilizaron otra especie de *Lactobacillus*, siendo esta una de las posibles razones por las que se obtiene una diferencia marcada en los resultados comparados con la presente investigación.

TEMPERATURA 35°C



B1



TEMPERATURA 45°C

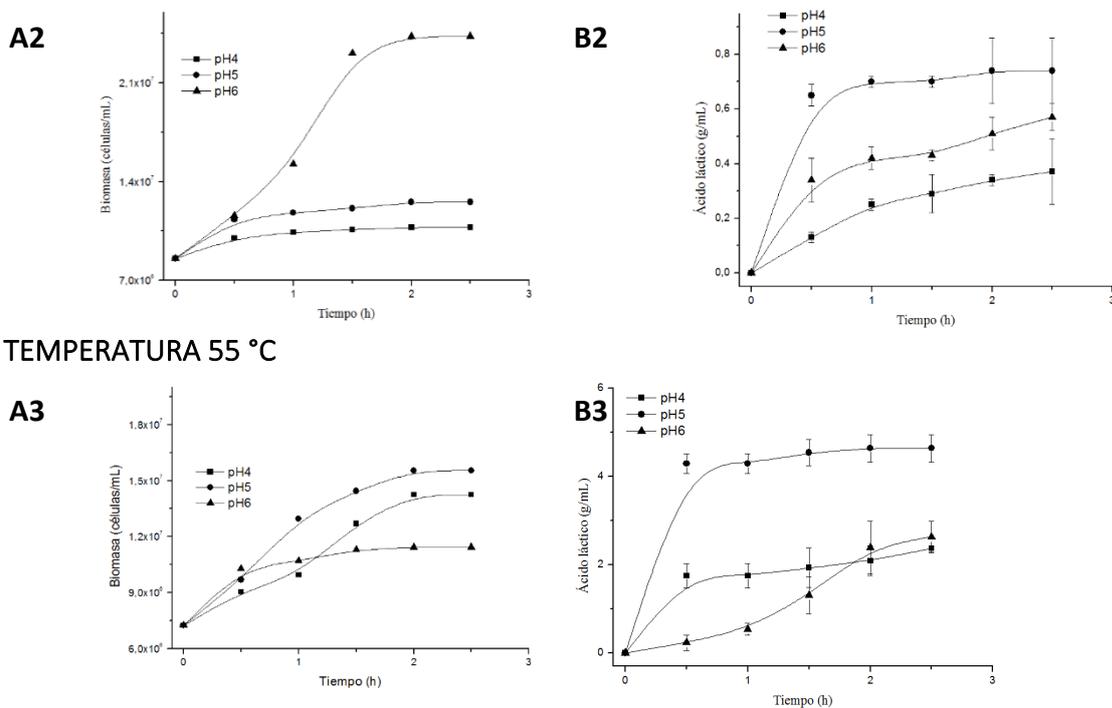


Figura 1 Crecimiento celular (A) y producción de ácido láctico (B) bajo condiciones específicas de pH inicial y temperatura de fermentación del suero de leche con *Lactobacillus bulgaricus*.

Análisis Estadísticos

En la tabla 2. Se observa la combinación de los niveles de los factores óptimos predichos, con los cuales se obtiene el máximo crecimiento de biomasa y la mayor producción de ácido láctico, obtenidos por el método de superficie de respuesta.

Valores óptimos predichos:

Biomasa= 1,58 E7 células/mL

Ácido Láctico= 3,71 g/L

Tabla 2. Valores óptimos de pH inicial y temperatura de fermentación obtenidos mediante análisis estadísticos

Factor	Bajo	Intermedio	Alto	Óptimo
pH inicial	4	5	6	5,2
Temperatura	35 °C	45 °C	55 °C	55 °C

Los resultados de la fermentación del suero de leche con *Lactobacillus bulgaricus* utilizando los niveles de los parámetros predichos con la metodología de superficie de respuesta que permiten obtener condiciones óptimas de crecimiento y producción determinados estadísticamente se observan en la Figura 2., con las cuales se alcanza un valor de crecimiento de la biomasa con una concentración máxima de 1,57 E7 células/mL, y una producción máxima de ácido láctico de 3,78 g/L, comparados con los valores óptimos obtenidos predichos, existe un error relativo de 0,006 % para el crecimiento de la biomasa y 0,018 % para la producción de ácido láctico, es decir los valores obtenidos experimentalmente son iguales o similares a los predichos en la optimización.

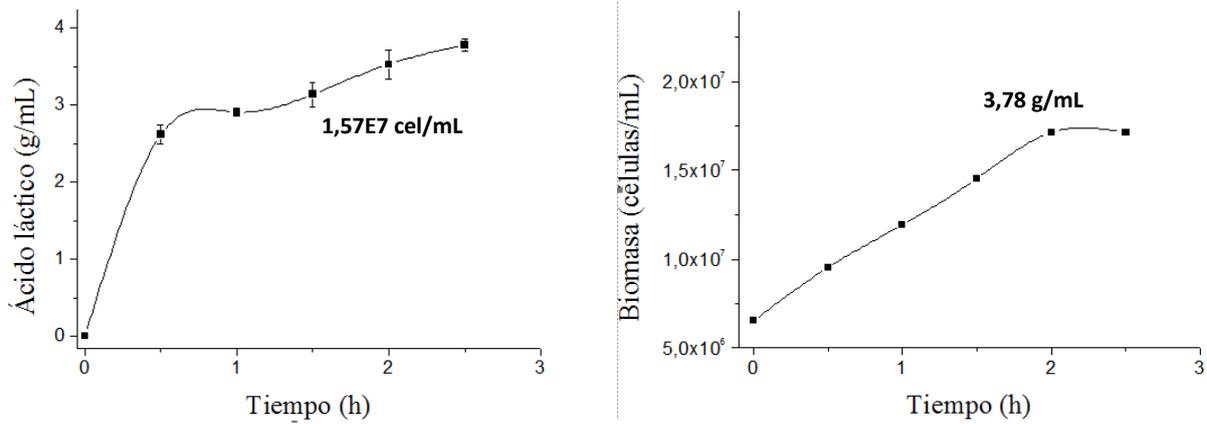


Figura 2. Crecimiento de la biomasa y producción de ácido láctico a las condiciones óptimas de fermentación (pH inicial 5,2 y temperatura de fermentación 55 °C) del suero de leche estandarizado utilizando *Lactobacillus bulgaricus*.

Rendimientos de biomasa y ácido láctico

Tabla 2. Coeficientes de rendimiento del proceso de producción de ácido láctico a partir del lactosuero

Coeficiente de rendimiento producto sustrato*	Coeficiente de rendimiento biomasa sustrato**
$Y_{P/S} = \frac{0,076 \text{ g Ácido láctico}}{9,2 \text{ g de Lactosa}} = 0,082 \text{ gg}^{-1}$	$Y_{P/S} = \frac{0,23 \text{ g Biomasa}}{9,2 \text{ g de Lactosa}} = 0,025 \text{ gg}^{-1}$

*Determinado experimentalmente **Determinado por balance estequiométrico

A partir de los cálculos estequiométricos, se determinó que a partir de una mol de lactosa se obtienen 0,31 moles de ácido láctico y 0,37 moles de *Lactobacillus bulgaricus*, con una producción de 10,7 moles de dióxido de carbono. Estos valores son más altos que los reportados por (Roy, 1986) y (Paternina, 2013) quienes obtuvieron 0,09 y 0,22 moles de ácido láctico por cada mol de lactosa respectivamente.

Sin embargo, los autores (Zayed, 1995) y (Panesar, 2010) reportan 0,79 y 1,69 moles de ácido láctico por cada mol de lactosa respectivamente, valores más altos que los encontrados en la presente investigación, cabe mencionar que estos autores utilizaron glucosa y trabajaron con una concentración mayor de lactosa en el suero de leche, por lo cual se asume que el enriquecimiento del medio (suero de leche) tiene influencia positiva sobre la producción de ácido láctico y crecimiento de la biomasa, variable que no fue estudiada en la presente investigación

Balance de Materia

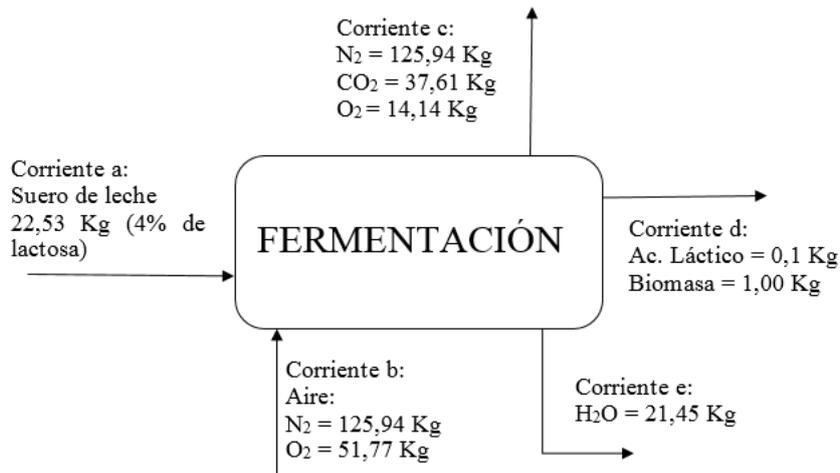


Figura 3. Diagrama de proceso del balance de materia del proceso de fermentación del suero de leche estandarizado con *Lactobacillus bulgaricus*

En el balance de materia de la figura 3. se observa las distintas entradas y salidas en el proceso de fermentación del suero de leche.

Se inició el experimento con 204,86 gramos de suero de leche estandarizados ($\rho = 1,024 \text{ g/mL}$) el cual contenía 9,2 gramos de lactosa, al proceso de fermentación ingresaron 1616,02 gramos de aire que contiene 470,8 gramos de oxígeno y 1145,22 gramos de nitrógeno. En nitrógeno del aire no reacciona en la fermentación por lo cual la entrada es igual a la salida. En el caso del oxígeno, 128,78 gramos fueron dosificados en exceso como se observa en la corriente de salida "c", junto a 342,02 gramos de dióxido de carbono. Al finalizar el proceso de fermentación se obtuvieron 0,76 gramos de ácido láctico (disueltos en 195,14 g de agua), crecieron 9,10 gramos de biomasa (*Lactobacillus bulgaricus*). Obteniendo un rendimiento del 8,3 % de ácido láctico a partir de la lactosa inicial.

Conclusiones

El proceso de producción de ácido láctico requiere un pre-tratamiento inicial donde se eliminen los sólidos que interfieren con el proceso fermentativo. La máxima producción de ácido láctico alcanzada en el proceso fermentativo fue de 3,78 g/L que se obtuvo utilizando lactosuero estandarizado y con *Lactobacillus bulgaricus* como agente biológico, las condiciones de fermentación fueron de 55 °C y un $\text{pH}_{\text{inicial}}$ de 5,2. El rendimiento de ácido láctico está muy ligado a la composición inicial del suero por lo que un estudio de la composición nutricional puede mejorar el proceso y sobre todo el rendimiento del producto.

Referencias Bibliográficas

1. Abdel-Rahman, M. A., Tashiro Yukihiro & Sonomoto Kenji (2011). "Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits." *Journal of biotechnology* 156(4): 286-301.
2. El Telégrafo (02 de Abril 2016). Condiciones Ambientales de Ecuador Favorecen la Producción de Leche Curda. Ecuador.
3. Garcia Garibay, M., Gómez Ruiz, L., & Bárzana, E. (1987). "Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*." *Biotechnology letters*, 9(6), 411-416.

4. Hernández Rojas M. & Vélez Ruiz J. (2014). "Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales." Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental. Universidad de las Américas Puebla. México.
5. Londoño, M. (2006). "Aprovechamiento del Suero Acido de Queso Doble Crema para la Elaboración de Quesillo utilizando tres Métodos de Complementación de Acidez con tres Ácidos Orgánicos."
6. Paternina, G. A., Garcia, C., & Villalba, M. (2013). Producción de ácido láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei*. *INGRESAR A LA REVISTA*, 11(1), 136-143. *Perspectivas en Nutrición Humana*. No 16. Pág. 11—20.
7. Martínez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., González, J. M. D., Converti, A., & de Souza Oliveira, R. P. (2013). Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends in food science & technology*, 30(1), 70-83.
8. Jakymec, M., Morán, H., Páez, G., Ferrer, J. R., Mármol, Z., & Ramones, E. (2001). "Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato." *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 11(1), 53-60
9. Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Knill, C. J., & Kosseva, M. (2010). Production of L (+) lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. *Brazilian archives of Biology and Technology*, 53(1), 219-226.
10. Pozo García, M. D., Díaz Llorens, F. K., Fernández Procas, S., San José Marquino, A., Tellado del Pozo, A., & Vila Torrent, A. (2010). Planta de producción de ácido láctico.
11. Roy Denis, G. J., Le Duy Anh (1987). "Continuous production of lactic acid from whey permeate by free and calcium alginate entrapped *Lactobacillus helveticus*." *Journal of Dairy Science* 70(3): 506-513.
12. Venkatesh KV, O. M., Wankat PC (1993). "Kinetic model of growth and lactic acid production from lactose by *Lactobacillus bulgaricus*." *Process biochemistry* 28(4): 231-241.
13. Waldir, E., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E., & Egoavil, E. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista Peruana de Biología*, 14(2), 271-276.
14. Winfried, O. V. R. (2007). *Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry*, Springer.
15. Zayed G, W. J. (1995). "Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of *Lactobacilli*." *Applied microbiology and biotechnology* 44(3): 362-366.