



Agroindustrial Science

Agroind Sci 2 (2011)

Escuela de Ingeniería
Agroindustrial

Universidad Nacional de Trujillo

Efecto de la concentración de agar y relación células inmovilizadas/sustrato en la hidrólisis de lactosuero desproteínizado en un biorreactor de lecho fluidizado con *Kluyveromyces* sp.

Effect of agar concentration and relation immobilized cells / substrate in the hydrolysis of deproteinized whey in a fluidized bed bioreactor *Kluyveromyces* sp.

Juan Román, Guillermo Linares *

Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Trujillo, Av. Juan Pablo II s/n, Ciudad Universitaria, Trujillo, Perú.

Recibido 29 agosto 2011; aceptado 26 setiembre 2011

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto de la concentración de agar (3% - 5%) y relación células inmovilizadas/sustrato (5% - 15% v/v) en la hidrólisis de lactosuero desproteínizado en un biorreactor de lecho fluidizado con *Kluyveromyces* sp.), empleando la metodología de superficie de respuesta. Se utilizó un diseño compuesto central rotacional (DCCR) sin repetición, con dos factores: concentración de agar y relación células inmovilizadas/sustrato como variable independiente, y como variable dependiente el porcentaje de lactosa hidrolizada. El biorreactor de vidrio cilíndrico tuvo una altura de 36,5 cm y un diámetro de 2,4 cm con 2 cribas con orificios de 2,0 mm de diámetro y un volumen de 175 mL. Las células inmovilizadas en el biorreactor, fueron evaluadas cada 2,5 horas y dentro de ese tiempo se tomaron muestras de lactosuero desproteínizado cada 30 minutos respectivamente, por último se utilizó un espectrofotómetro para observar los valores de absorbancia de la muestra y con éstos obtener el contenido de glucosa en dicho lactosuero. Los resultados óptimos obtenidos estadísticamente determinaron que la concentración más adecuada de agar es de 4%, relación células inmovilizadas/sustrato de 12,6% y el porcentaje de lactosa hidrolizada de 98,33%.

Palabras clave: Lactosuero, hidrólisis, células inmovilizadas, biorreactor

ABSTRACT

In the present investigation was the effect of the concentration of agar (3% - 5%) and relation immobilized cells / substrate (5% - 15% v / v) in the hydrolysis of deproteinized whey in a continuous fluidized bioreactor with *Kluyveromyces* sp.), using response surface methodology. We used a central composite rotational design (DCCR) without repetition, with two factors: concentration and relation agar immobilized cells / substrate like an independent variable and dependent variable was the percentage of lactose hydrolyzed. The cylindrical glass bioreactor had a height of 36,5 cm and a diameter of 2,4 cm with two sieves with holes of 2,0 mm in diameter and volume of 175 mL. Immobilized cells in the bioreactor were evaluated every 2,5 hours at the same time took samples of deproteinized whey respectively every 30 minutes, finally used a spectrophotometer to observe the values of absorbance of the sample and with these to obtain the content of glucose in this whey. The optimal results obtained statistically determined the most appropriate concentration is 4% agar, relationship immobilized cells / substrate of 12,6% and the percentage of hydrolyzed lactose 98,33%.

Keywords: Whey, hydrolysis, immobilized cells, bioreactor

* Autor para correspondencia.

E-mail: galinares@hotmail.com (G. Linares)

1. Introducción

El lactosuero es la fase acuosa separada de la cuajada en el proceso de elaboración del queso y representa el 80 – 90 % del volumen total de la leche que entra en el proceso y contiene alrededor de 50 % de los nutrientes de la leche original: proteínas solubles, lactosa, grasa, vitaminas y sales minerales. El contenido de la lactosa está entre 42 – 52 g/L, representando éste el 70% del contenido total del conjunto de sólidos presentes. El lactosuero, es uno de los desechos más contaminantes de la industria de alimentos ya que por cada kilogramo de queso elaborado se crean 9 litros de suero, estimando que anualmente a nivel mundial se generan cerca de 35 kilogramos de demanda biológica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 kilogramos de demanda química de oxígeno (DQO). Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas negras producidas en un día por 450 personas (Tetrapack Processing Systems, 2003).

La proteína del suero de leche es una colección de proteínas globulares que pueden ser aisladas químicamente del suero de leche, de productos lácteos como el queso o manufacturados directamente de la leche de vaca. Desde el punto de vista químico es una mezcla de proteínas como la beta-lactoglobulina (65%), la alfa-lactoglobulina (25%), y la sérum albúmina (8%), todas ellas solubles en agua en sus formas nativas independiente del pH de la solución. El suero de leche posee el mayor valor biológico de cualquier proteína conocida, es decir que se transforma un alto porcentaje en proteína muscular durante las actividades metabólicas. Hoy en día se comercializa esta proteína en un polvo soluble de bajo coste procedente de los restos de la industria del queso (Mattingly, 1974).

En el Perú, actualmente, en el campo de las industrias productoras de queso, se tiene un problema latente sin resolver, el cual se genera debido a la gran producción de suero compuesto que se desecha a través del alcantarillado municipal generando problemas

de contaminación ambiental. Para tener una idea de la cantidad de suero que se produce sólo en la Universidad Agraria La Molina (UNALAM), se sabe que la Planta Piloto de Leche destina entre 270 - 750 L de leche para la producción de quesos, por lo que se obtiene entre 235,17 – 653,25 litros de suero diariamente.

En la actualidad el consumo de bebidas lácteas a partir de suero, está muy difundida por su valor nutritivo y menor costo (Kriel, 1980; Sabaa-Srur *et al.*, 1995). Industrialmente el suero sirve como ingrediente en la elaboración de kefir (Garibay y Quintero, 1993) y bebidas lácteas con frutas (Fresnel y Moore, 1978). Otra línea de producción creciente son las bebidas lácteas fermentadas con bacterias o mezclas de éstas con levaduras, las cuales generalmente se mezclan con jugos u hortalizas u otros saborizantes (Garibay y Quintero, 1993). La producción de β – galactosidasa o lactasa (EC.3.2.1.23), a partir de microorganismos como hongos, bacterias o levaduras utilizando suero lácteo como medio de fermentación, ha despertado gran interés, así como también el uso de esta enzima en la industria de alimentos. La enzima β – galactosidasa, es ampliamente utilizada en la industria láctea para la hidrólisis de la molécula de lactosa en sus correspondientes monosacáridos, glucosa y galactosa. Ésto permite la preparación de diversos productos lácteos, especialmente para el consumo por individuos intolerantes al disacárido. La hidrólisis de la lactosa modifica sus propiedades funcionales y previene la cristalización, aumentando la vida útil de los productos lácteos así como la disponibilidad de azúcares fácilmente fermentables (Barberis, 2002).

La hidrólisis enzimática de la lactosa del suero, es una técnica sencilla que permite el aprovechamiento de este subproducto de la industria láctea, el cual se ha convertido en un grave problema de contaminación ambiental, debido a que generalmente se descarga en ríos y desagües.

La bioconversión de la lactosa del suero de leche en proteína unicelular, etanol o enzimas reduce en más del 75% la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) que exhibe el suero de leche (González, 1996).

La búsqueda de las posibilidades de obtención de productos ricos en vitaminas, aminoácidos y microelementos para uso humano y animal es una preocupación actual. Una opción que se puede implementar para este fin, es el cultivo de microorganismos, por ejemplo, utilizando el suero lácteo desproteinizado como medio de cultivo. De esta manera se aprovecha la composición del suero que es rico en elementos básicos necesarios para la fermentación y a su vez se ayuda a solucionar el problema ecológico que generan sus componentes debido a su alta demanda de oxígeno.

Para obtener este producto es necesario elegir un microorganismo que utilice la lactosa (componente principal del suero) como fuente de carbono para su crecimiento (Zalashko, 2001).

El lactosuero desproteinizado puede utilizarse como medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos capaces de generar productos de utilidad. La enzima β – galactosidasa de *Kluyveromyces* sp. Es una enzima intracelular inducible por carbohidratos como la lactosa.

El pH, la temperatura, las condiciones de crecimiento, la calidad y la cantidad de sustrato influyen significativamente sobre la tasa específica de crecimiento de la levadura y en la actividad enzimática de la β – galactosidasa.

2. Materiales y métodos

Para el presente trabajo de investigación se utilizó como materia prima lactosuero desproteinizado. Para lograr separar las proteínas del suero lácteo, se aplicó un tratamiento termoácido, el cual consistió en ajustar el pH a 4,5 con ácido acético glacial y

posteriormente se pasteurizó a 90 °C por 30 minutos, luego se dejó en reposo para así precipitar las proteínas. Luego se realizó una filtración y se conservó en congelación (Arellano, 1993), para finalmente ser llevado al biorreactor de lecho fluidizado junto con las perlas de agar que contienen células inmovilizadas.



Figura 1. Flujograma para la obtención de lactosuero desproteinizado
Inmovilización de la *Kluyveromyces* sp.

El método que se utilizó para la inmovilización celular, es el de atrapamiento en gel de agar; para lo cual se tomo como referencia el procedimiento (Ludeña, 2000).

Se preparó agar a diferentes concentraciones y se mantuvo entre 45 y 50 °C durante todo el tiempo que duró el proceso de inmovilización para evitar solidificación. Posteriormente se adicionó diferentes cantidades en mL de una suspensión de cultivo de *Kluyveromyces* sp. se mezclaron y homogenizaron, esta solución se dejó caer gota a gota, utilizando una micropipeta con el agar contenido, las células de levaduras sobre aceite refrigerado a 6°C contenida en una probeta, se procuró que las perlas obtenidas sean del mismo tamaño. Finalmente se trasladó a una solución de cloruro de sodio 0.025M donde se almacenó hasta su uso en refrigeración.

Tratamiento de las perlas

Se colocaron las perlas sobre papel de filtro estéril. Luego las perlas conteniendo las levaduras inmovilizadas fueron lavadas varias veces con agua destilada helada antes de ser utilizadas con el fin de eliminar los restos de aceite.

Después del último lavado, se colocaron las perlas en un beacker estéril y se lavaron una última vez con agua destilada.

Se adicionaron las perlas, contenidas en el beacker 50 mL del medio de fermentación, se mantuvieron en condiciones asépticas hasta acondicionarlo al biorreactor.

Monitoreo y control de la operación

El biorreactor de lecho fluidizado estéril se lleno en condiciones asépticas. Se adicionaron al biorreactor 175 mL de suero desproteínizado y posteriormente se agregaron las perlas que contienen las células inmovilizadas/sustrato.

Una vez puesto en funcionamiento el biorreactor, se procedió a realizar 12 ensayos, en cada ensayo se hizo 6 lecturas de 30 minutos cada una.

Para el control del proceso se determinaron los valores más adecuados transcurridos durante

las primeras 2,5 horas de hidrólisis; se controló la temperatura a 30 °C, pH a 4,5 y el tiempo de fermentación que fue de 2,5 horas.

Las concentraciones de agar en la presente investigación son de 3%; 3,3%; 4%; 4,7% y 5% que corresponde a cada relación de células inmovilizadas/sustrato de 5%; 6,4%; 10%; 13,5% y 15% v/v respectivamente.

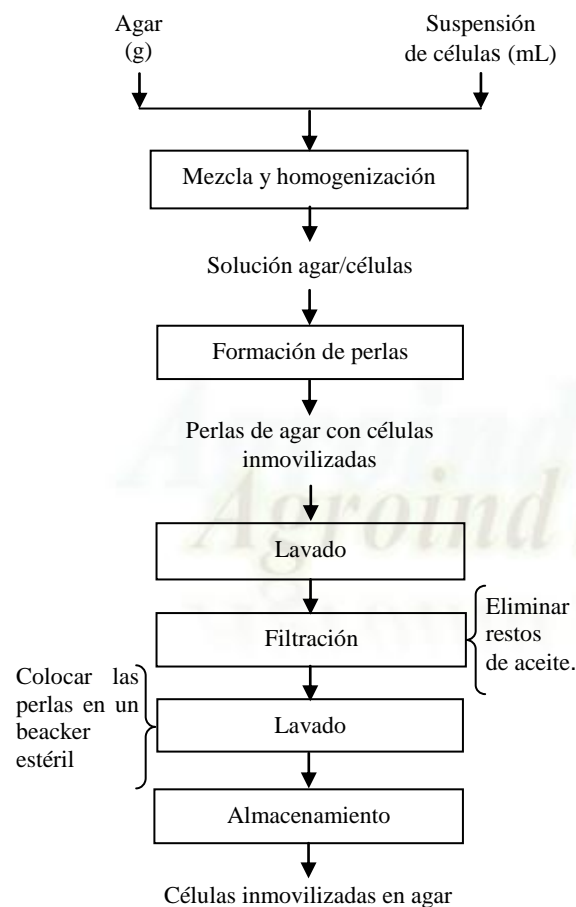


Figura 2. Flujograma para la inmovilización de las células en agar.

Preparación del inóculo

La levadura se sembró en placas petri por estrías, se dejó por 24 horas a 30 °C para luego observar el crecimiento celular. Luego se le agregó a un volumen de trabajo de 3 L (caldo de cultivo).

Levadura	<i>Kluyveromyces</i> sp.
MgSO ₄	2 g

Agar	2,00%
Casamino ácidos	20 g
Queso	300 g
Amoxicilina	100 mg
Agua destilada estéril	100 ml
Suero desproteínizado	3,5 L

Se inició la preparación del inoculo con un pH de 4,5 a temperatura ambiente, a 150 rpm por 24 horas, esto se hizo con la finalidad de obtener la mayor cantidad de biomasa. Luego se hizo el conteo celular utilizando la Cámara de Neubauer.

Escalamiento

Se inició la etapa de escalamiento (fermentación) en un volumen de trabajo de 3 L, con la levadura en un agitador con un pH de 4,5 a temperatura ambiente y a 150 rpm por 24 horas, ésto con la finalidad de obtener la mayor cantidad de biomasa. Seguidamente se detuvo la agitación hasta terminar el proceso de fermentación por 30 horas. Luego se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos, se elimina el precipitado y se lavó con agua destilada helada para luego hacer el conteo celular utilizando la Cámara de Neubauer encontrando una concentración celular de $1,1 \times 10^9$ células /mL, el sedimento celular fue suspendido en una solución Buffer Fosfato 0.1 molar.

Medición de la actividad de la célula inmovilizada

Se utilizó una solución de suero desproteínizado como sustrato. La hidrólisis enzimática se llevó a temperatura ambiente a 2,5 horas, en una columna de vidrio como soporte para los inmovilizados con una relación de 1 es a 7 células inmovilizadas/sustrato. El contenido de lactosa se cuantificó mediante el método de glucosa oxidasa.

Diseño del biorreactor de lecho fluidizado

Se diseñó el biorreactor de lecho fluidizado con recirculación, con un volumen de 175 mL, una bomba centrífuga de 0,25 hp de potencia,

y con un diámetro de tubería de succión de 0.8 cm de diámetro; se instaló una reducción de 0,3 cm de diámetro para la expulsión del líquido. La velocidad de flujo fue de 105 mL/min. El biorreactor fue de tubo de vidrio cilíndrico con una altura de 36,5 cm y con un diámetro de 2,4 cm. Además se le colocó dentro 2 cribas con orificios de 2,0 mm de diámetro.

Análisis estadístico

Fue utilizado un Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR) de segundo orden con resultados en Superficie de Respuesta. Este diseño, incluye 2^k factoriales (+1, -1), $2 \cdot k$ puntos axiales (+1,41, -1,41), y cuatro puntos centrales (0, 0) para evaluar el error experimental ($k = 2$ variables independientes: concentración de agar y la relación células inmovilizadas/sustrato), totalizando 12 tratamientos (tabla 3). En la tabla 1, se muestran los niveles de las variables independientes (x_1 : concentración de agar ; x_2 : relación células inmovilizadas/sustrato)

Tabla 1. Niveles utilizados en el DCCR para las dos variables seleccionadas.

Variables	1,41	1	0	1	1,41
x_1	3	3,3	4	4,7	5
x_2	5	6,4	10	13,5	15

Se construyeron modelos del tipo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

(Donde β_0 , β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} , y β_{12} : Coeficientes de regresión; Y : Respuesta), en función de los coeficientes significativos para la respuesta (lactosa hidrolizada). Luego, se realizó un ANVA para los modelos y el cálculo de los coeficientes de determinación (R_2), pruebas que permiten validar estadísticamente los modelos. Finalmente, se generó la superficie de respuesta, en donde se buscó la región de interés.

3. Resultados y discusión

La inmovilización permitió obtener esferas de diámetro igual a 2,6 mm. Este tamaño no presenta mucha variación al obtenido por Linares (2006) en esferas de agar de 2,77 mm. Las células inmovilizadas fueron almacenadas en refrigeración antes de ser utilizadas. Esto contribuyó a estabilizar la formación del gel de agar notándose una mayor dureza de las esferas del gel.

La tabla 2 muestra los valores reales y codificados en el DCCR, con su respectiva respuesta de lactosa hidrolizada (%).

En los tratamientos del 1 al 4, se observa que a la misma concentración de células inmovilizadas/sustrato y menor concentración de agar, se incrementa el porcentaje de lactosa hidrolizada. Mientras que en los tratamientos 7 y 8 a mayor concentración de células inmovilizadas/sustrato e igual concentración de agar, el porcentaje de lactosa hidrolizada es mayor.

En los puntos centrales (tratamientos del 10 al 12), las respuestas no presentan ninguna variación, indicando una buena repetibilidad del proceso.

Tabla 2. Efecto de concentración de agar y relación de células inmovilizadas/sustrato en la hidrólisis de lactosuero desproteinizado.

Nº	Concentración agar %		Relación catalizador/sustrato %		Lactosa Hidrolizada %
	Código	Real	Código	Real	
1	-1	3,3	-1	6,4	30,09
2	1	4,7	-1	6,4	28,88
3	-1	3,3	1	13,5	84,25
4	1	4,7	1	13,5	69,80
5	1,41	3	0	10	50,55
6	1,41	5	0	10	81,84
7	0	4	1,41	5	24,07
8	0	4	1,41	15	98,69
9	0	4	0	10	90,27
10	0	4	0	10	89,06
11	0	4	0	10	89,06
12	0	4	0	10	89,06

En la tabla 2, los valores mostrados de lactosa hidrolizada son todos a los 30 minutos de iniciado el trabajo. Se establecieron todos a la misma hora para homogenizar dichos valores, ya que a partir del ensayo 8 el resultado final se da a los 30 minutos con 98,69% de lactosa hidrolizada y los demás finalizan entre 1 a 2,5 horas. Para el rendimiento de lactosa hidrolizada, todos los coeficientes de regresión resultan ser significativos ($p < 0.05$) para el modelo, (tabla 3).

Tabla 3. Coeficientes de regresión para el rendimiento de lactosa hidrolizada.

Item	Rendimiento	
	Coefficiente	p
Intercepto	-636,531	7,00E-06
X ₁ (L)	243,589	1,00E-05
X ₁ (Q)	-28,199	1,10E-05
X ₂ (L)	38,671	9,00E-06
X ₂ (Q)	-1,325	7,00E-06
X ₁ (L)*X ₂ (L)	-1,289	1,80E-03

x₁: concentración de agar; x₂: relación catalizador/sustrato

Los coeficientes de regresión para el rendimiento de lactosa hidrolizada (Y), permitieron elaborar un modelo matemático de segundo orden, donde fueron considerados todos los factores.

$$Y = -636,53 + 243,58x_1 - 28,19x_1^2 + 38,67x_2 - 1,32x_2^2 - 1,28x_1x_2$$

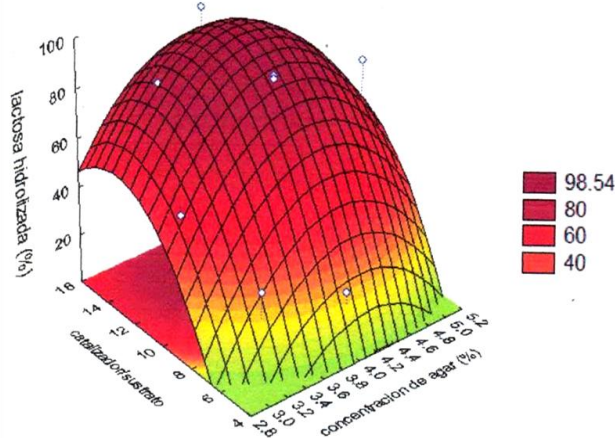
La tabla 4, muestra el análisis de varianza para el modelo de regresión, para el rendimiento. Se puede observar que ambos modelos resultan ser significativos ($F_{tabla} < F_{calculado}$), aunque el modelo para el rendimiento resulta levemente significativo ($4,39 < 13,58$). Así, para determinar si el modelo es adecuado, se tuvo que analizar, además de la significancia, el coeficiente de determinación (R^2), alcanzando para el rendimiento un R^2 de 91,80% (R^2 ajustado: 85%), indicando un buen ajuste del modelo, es decir, casi el 92% de la variabilidad del rendimiento es explicado por el modelo (con las variables estudiadas y en los niveles establecidos).

Tabla 4. ANVA para el rendimiento.

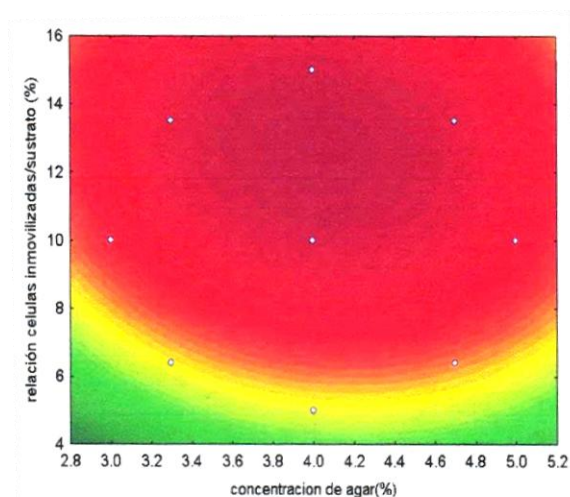
Variable respuesta	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F _{calculado}	p-valor	F _{tabla}	R ²	R ² ajust.
	Regresión	77737,58	5	11547,52	13,58	< 0,05	4,39	91,80%	85%
Rendimiento	Residuos	683,84	6	113,97					
	Total	8421,43	11						

Como se pudo observar en el análisis anterior, el modelo es altamente significativo ($p < 0,05$) para la respuesta rendimiento, siendo posible construir la superficie de respuesta y definir las regiones de interés (figura 3).

Se puede observar, que al aumentar la concentración de agar y manteniendo constante la relación células inmobilizadas/sustrato, el porcentaje de lactosa hidrolizada es menor.



(a)



(b)

Figura 3. (a) Superficie de respuesta, (b) Curvas de contornos para el rendimiento en función de concentración de agar (%) y relación células inmobilizadas/sustrato (%)

El análisis de la superficie de respuesta y curva de contornos permite definir las condiciones más adecuadas que maximizan el rendimiento. Así en la figura 3 (a) y (b) se verifica que cuando los valores de agar (4%) y relación células inmobilizadas/sustrato (12,6%), el rendimiento alcanza el valor de 98,33%.

4. Conclusiones

A través de la metodología de superficie de respuesta, se obtuvieron niveles óptimos de concentración de agar (4%); relación células inmobilizadas/sustrato (12,6%); con un rendimiento final de 98,33% en lactosa hidrolizada. Asimismo se obtuvo un modelo que define el comportamiento de las variables en el rendimiento, siendo altamente significativo ($p > 0,05$).

5. Referencias bibliográficas

- Arellano, J. (1993). Inmovilización de β -galactosidasa (E.C.3.2.1.23) de *Kluyveromyces* sp. En cáscara de arroz. Universidad Nacional de Trujillo.
- Barberis, S.; Segovia, R. (2002). Maximun volumetric production of β -galactosidase by *Kluyveromyces fragilis*. *J. Chem. Tech. Biotech.* Vol. 77: 706-710.
- Fresnel, J., Moore K.(1978). Swiss Scientists develop soft drink from whey. *Dairy Sci. Abstrs.* 41(1):87
- Garibay, M.; Quintero, R. (1993). *Biología alimentaria*. Limusa. Noriega Editores. México, D.F., 152-233.
- González, S. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technol.* Vol. 57.
- Kriel, J. (1980). Una bebida de chocolate a partir de suero de leche dulce. *Dairy Sci.. Abst.* 42 (6).
- Linares, G. (2006). Efecto de la variación del caudal de entrada de leche en un biorreactor enzimático continuo de lecho fluidizado con β -galactosidasa (E.C.3.2.1.23) inmovilizada en el rendimiento productivo de lactosa hidrolizada y caracterización de parámetros cinéticos y difusionales. Universidad Nacional de Trujillo. Escuela de Post-Grado. Mención en Biotecnología y Bioingeniería.
- Ludeña, F. (2000). Recuperación de suero de quesería para La producción de una bebida alcohólica en un sistema en lote. *Bioresource Technol.* Vol. 60.
- Mattingly, D.J. (1990). Paiting presses and perfume production at pompeii. *Oxford journal of archaeology* 9 71-90
- Sabaa-Srur, A.; M. Koblitz; L. Freiman; V. Oliveira y E. González. (1995). Uso integral do soro de queijo minas frescal elaboração de bebida fermentada e sua aceitabilidade. 17 (1-2): 57-62.
- Santiago, P. (2002). Contribucao ao estudo da producao de β -galactosidase por fermentacao de soro de queijo con *Kluyveromyces marxianus*. Dissertacao (Maestre em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Quimica. Universidad Federal de Uberlandia (UFU)
- TETRAPACK PROCESSING SYSTEMS AB. (2003). Manual de industrias lácteas. Cap. 15. Editorial AMV.
- Zalashko, M.; Grushhenko, M. (2001). Utilización del suero lácteo en la industria. Vol. 3. 25-28

