

## **Evaluación de medios de cultivo preparados a partir de suero de leche enriquecido, para la producción de ácido láctico, con *lactobacillus plantarum* y *lactobacillus casei***

Mariana Peñuela\*, Gabriel J. Vargas\*, Ana M. Torres\* y Rigoberto Ríos\*

(Recibido el 16 de febrero de 2001)

### **Resumen**

En este trabajo se evalúan diferentes fuentes de nitrógeno, luego de determinar la mejor concentración de suero de leche, para la producción de ácido láctico en fermentaciones por lote. Se utilizaron tres fuentes de nitrógeno, peptona y extracto de levadura a 5, 10, 15 g/l, y licor de maíz a 10, 20, 30 g/l. La mayor producción de ácido láctico se obtuvo con una concentración de extracto de levadura de 15 g/l y lactosa 61,7 g/l y se alcanzaron valores de 28,8 g/l y 28,5 g/l de ácido láctico, respectivamente, para *L. casei* y *L. plantarum*.

----- Palabras clave: ácido láctico, *lactobacillus plantarum*, *lactobacillus casei*, suero.

## **Evaluation of culture media prepared from whey, for lactic acid production, with *lactobacillus plantarum* and *lactobacillus casei***

### **Abstract**

The aim of this work was to evaluate different nitrogen sources after of to determining the best whey concentration for lactic acid batch fermentation with *lactobacillus casei* and *lactobacillus plantarum*. Three types of nitrogen sources were used; peptone and yeast extract in a concentration of 5, 10, 15 g/l and corn steep liquor in 10, 20, 30 g/l; the higher lactic acid production was 28,8 g/l and 28,5 g/l for *L. casei* and *L. plantarum* respectively, with addition of yeast extract to 15 g/l in the fermentation media.

----- Key words: lactic acid, *lactobacillus plantarum*, *lactobacillus casei*, whey.

---

\* Grupo de Bioprocesos, Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

## Introducción

El suero de leche se produce como desecho por la mayoría de las industrias queseras, en contravía de las severas legislaciones ambientales de algunos países [2]; se caracteriza por el alto contenido de lactosa, la cual genera niveles de demanda biológica de oxígeno (DBO) entre 26.000 mg/l y 48.000 mg/l, lo que imposibilita su tratamiento en plantas residuales [6, 2].

Actualmente, algunas de esas industrias comercializan el suero deshidratado como aditivos para alimentos y refrescos [6], pero, debido a la alta concentración de lactosa, el mayor potencial del suero es la conversión microbiana a ácido láctico; en esa forma es una importante materia prima en la industria de alimentos (preservativo y regulador de pH), la industria del plástico (precursor de polímeros biodegradables a partir del isómero L (+) del ácido) [4], la industria de la química farmacéutica y la industria cosmética [5, 7].

La producción fermentativa de ácido láctico avienta a su síntesis química, ya que utiliza una fuente renovable de carbono y produce selectivamente el isómero L (+) o D (-) del ácido; particularidad ésta que depende del tipo de microorganismo, el medio utilizado y las condiciones que regulan el proceso [1, 4, 5].

Entre las condiciones más apropiadas para la producción fermentativa del ácido láctico se destaca el uso del extracto de levadura como la mejor fuente de nitrógeno; este compuesto representa el 38% del costo total de la producción, valor alto que impide su utilización industrial [3]. Como alternativa se encuentra el licor de maíz, el cual se debe emplear en altas concentraciones; sin embargo, ello genera serios problemas en la separación final del producto [1].

En este trabajo se evalúan diferentes concentraciones del suero de leche como medio fermentativo, y su posterior enriquecimiento con tres fuentes diferentes de nitrógeno, para obtener mayor producción de ácido láctico.

## Materiales y métodos

### Microorganismo

Se evaluaron dos cepas, *Lactobacillus casei* NRRLB 1922, cedida por el Notrand Center for Agricultural Utilization Research del ministerio de agricultura de Estados Unidos, y *Lactobacillus plantarum* LF 41-1, cedida por la Escuela de Bacteriología de la Universidad de Antioquia. Ambas cepas se activaron en caldo selectivo de Man, Rogosa and Sharpe (MRS Merk) [8], y posteriormente se mantuvieron criocongeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  sobre glicerol MRS [9]. Los precultivos se obtuvieron con repiques en caldo MRS, incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  en un tiempo de veinticuatro horas.

### Medio de cultivo

Como medio para la producción de ácido láctico se utilizó suero de leche descremada, proveniente de la planta de lácteos de Colanta, ubicada en el municipio de San Pedro de los Milagros. El suero es desproteínizado, inicialmente, mediante un tratamiento térmico; luego se lleva a un pH de 6,2 y se calienta hasta la ebullición para coagular la mayor parte de las proteínas [10]; el sobrenadante obtenido se separa por centrifugación a 3.500 rpm, durante quince minutos (centrífuga Hettich EBA85) [7]. El suero obtenido tiene una concentración de 61,7 g de lactosa por cada litro y se utiliza para evaluar cultivos con diferentes concentraciones de lactosa (61,7; 30,8 y 15,4 g/l), obtenidas a partir de una dilución apropiada, y previamente esterilizados durante quince minutos a 103,393 KPa.

Luego de seleccionar la mejor concentración de lactosa para cada microorganismo se evaluaron tres fuentes de nitrógeno, con tres niveles cada uno, peptona universal (Merck) y extracto de levadura (Oxoid) a 5,10 y 15 g/l, y licor de maíz (Sigma) a 10, 20 y 30 g/l. [1, 2, 7, 9].

### Condiciones de fermentación

Las fermentaciones se realizaron utilizando un volumen de trabajo de 75 ml en un erlenmeyer de 100 ml, con el objeto de conservar una cabe-

za de aire mínima y reducir, así, la oxigenación del medio. La neutralización del cultivo durante el proceso de síntesis de ácido láctico se hizo al adicionar NaOH en solución concentrada, controlando el pH entre valores de 4 y 6. La temperatura en los cultivos fue 30 °C para *l. plantarum* y 37 °C para *l. casei*, con una agitación de 150 rpm durante un período de 72 horas [1, 3].

### Métodos analíticos

El ácido láctico se determinó indirectamente por titulación al final del cultivo, teniendo en cuenta la cantidad de NaOH adicionada al medio para su control [6]; la fuente de carbono, lactosa, fue determinada por el método colorimétrico modificado DNS (ácido dinitrosalisílico) y lectura de absorbancia en un espectrofotómetro (Spectronic 20) a 540 nm [11]; para el crecimiento celular se utilizó el método de densidad óptica, con lecturas de absorbancia a longitudes de onda de 600 y 620 nm para *l. plantarum* y *l. casei* respectivamente [1, 3, 7].

### Resultados

La cantidad de ácido láctico producido es proporcional a la concentración inicial de lactosa en el medio, para ambas especies de *lactobacillus*.

Así, la concentración más alta de lactosa en el medio (61,7 g/l) corresponde a los valores de mayor producción de ácido láctico, 24,2 g/l para *l. casei* y 19 g/l para *l. plantarum*, con factores de conversión de sustrato de 50 y 48%, respectivamente, después de setenta y dos horas de cultivo. En la figura 1 se observa el aumento proporcional en la concentración de ácido láctico al incrementar la concentración de la fuente de carbono, además se evidencia mayor síntesis de ácido láctico a partir del cultivo de *l. casei*, que con el de *l. plantarum*.

El enriquecimiento del medio con una fuente de nitrógeno propicia un aumento considerable en la concentración final de ácido láctico; aumento que depende del tipo de microorganismo y de la fuente utilizada.

La concentración más baja de ácido láctico en el estudio de la fuente de nitrógeno, 23,3 g/l y 23,6 g/l para *l. casei* y *l. plantarum*, respectivamente, se obtuvo cuando se usó peptona; estos valores superan los alcanzados en un medio carente de fuente de nitrógeno. La figura 2 muestra la poca incidencia que tiene la peptona, a partir de 10 g/l, sobre la producción de ácido láctico, y permite observar similitud en el comportamiento de ambos microorganismos.

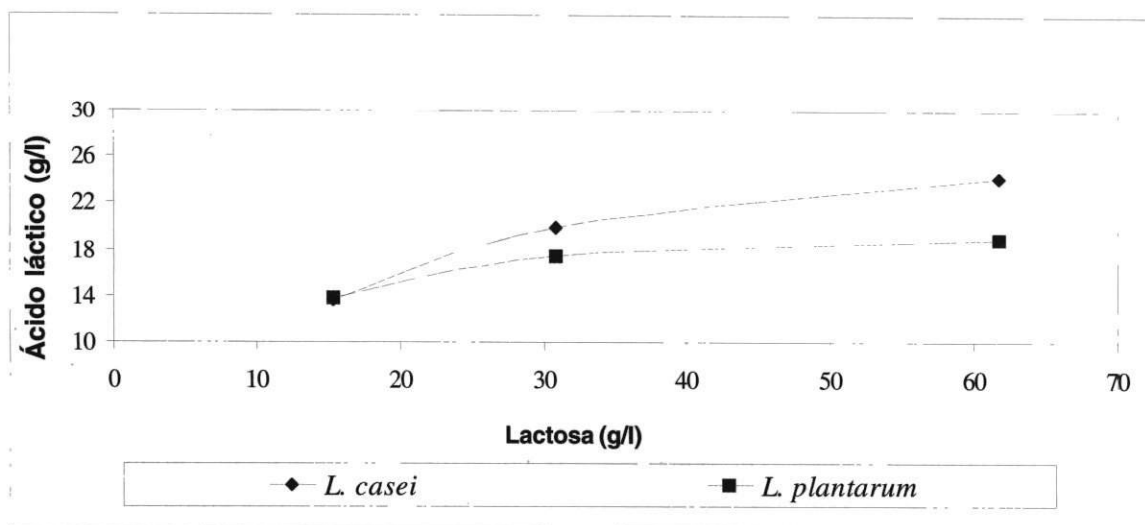
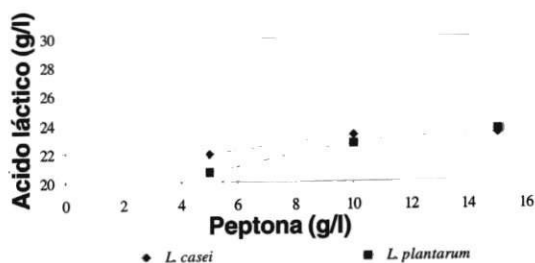
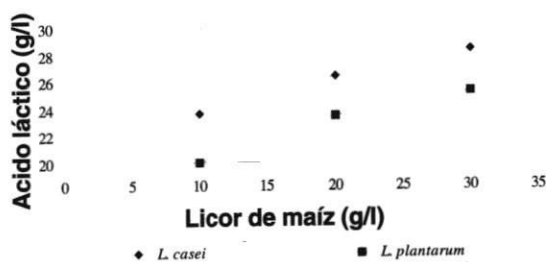


Figura 1 Efecto de la concentración de suero de leche sobre la síntesis de ácido láctico



**Figura 2** Efecto de la concentración de peptona sobre la síntesis de ácido láctico

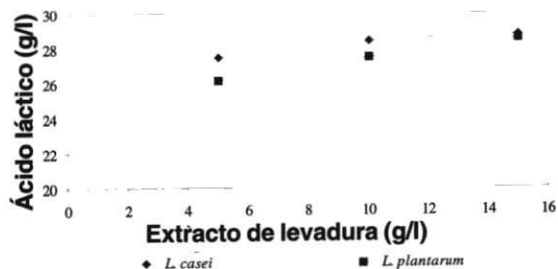
En la figura 3 se muestra el perfil de concentración del producto, dependiente de la concentración del licor de maíz, en la que los mayores valores son de 28,4 g/l para el *L. casei* y 25,2 g/l para *L. plantarum*.



**Figura 3** Efecto de la concentración de licor de maíz sobre la síntesis de ácido láctico

Para los niveles estudiados, un incremento en la concentración de licor de maíz induce mayor producción de ácido láctico, y se obtienen valores muy altos en el cultivo con *L. casei*.

El extracto de levadura se presenta como la fuente de nitrógeno más adecuada para la producción de ácido láctico en ambos microorganismos, con la que se alcanzan concentraciones de 28,8 g/l y 28,5 g/l para el *L. casei* y el *L. plantarum*, respectivamente. En la figura 4 se observa el comportamiento en la producción de ácido láctico con respecto a la concentración inicial de extracto de levadura.



**Figura 4** Efecto de la concentración de extracto de levadura sobre la síntesis de ácido láctico

Las figuras 2, 3 y 4 muestran tendencia similar: aumento gradual de la concentración de ácido láctico, como resultado del incremento de la concentración de la fuente de nitrógeno, pero la concentración del producto sólo alcanza aumentos del orden de 3 g/l cuando se duplica la cantidad de nitrógeno en el medio. La adición de estas fuentes de nitrógeno va acompañada con aumento en la conversión del sustrato, que alcanza porcentajes hasta del 66%.

El *L. casei* es mejor productor de ácido láctico que el *L. plantarum*, tanto en fermentaciones suplementadas con fuente de nitrógeno como en las fermentaciones no suplementadas, excepto en el medio suplementado con peptona, en el cual se observan concentraciones de producto muy similares.

## Conclusiones

Los diferentes resultados obtenidos sugieren que el suero de leche, proveniente del proceso de queso fresco, es un medio apropiado para la producción de ácido láctico por vía fermentativa, ya que se obtienen concentraciones finales de producto muy cercanas a las obtenidas en medios enriquecidos con fuentes de nitrógeno.

La adición de una fuente de nitrógeno, en los niveles analizados, favorece la producción de ácido láctico a partir de *L. casei* y *L. plantarum*; sin embargo, no se alcanzan aumentos significativos

en la producción que, desde el punto de vista económico, justifiquen su utilización.

Las tres fuentes de nitrógeno: peptona, licor de maíz y extracto de levadura, se utilizaron de manera proporcional para adicionar al medio cantidades similares de nitrógeno; en consecuencia, el extracto de levadura resultó ser la fuente más apropiada para la producción de ácido bajo las condiciones evaluadas.

La especie *L. casei* presenta los más altos rendimientos de ácido láctico en fermentaciones en suero de leche, suplementadas o no, con fuente de nitrógeno. Para esta especie, las fermentaciones donde se usó licor de maíz o extracto de levadura alcanzaron la mayor concentración de producto, independientemente de la fuente utilizada.

De otra parte, para *L. plantarum*, la fuente de nitrógeno con la cual se obtuvo la más alta concentración de producto fue el extracto de levadura, en el nivel más alto evaluado.

### Agradecimientos

Al Notrand Center for Agricultural Utilization Research y a la Escuela de Bacteriología de la Universidad de Antioquia por ceder las cepas con las que fue realizado este trabajo; a la entidad financiadora Codi y a la planta de lácteos de Colanta, del municipio de San Pedro de los Milagros, que facilitó el suero utilizado en la fase experimental del trabajo.

### Referencias bibliográficas

1. Ali, D. *et al.* "Media Evaluation of lactic acid repeated-Batch Fermentation with *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* Subsp. *Rhamnosus*". En: *Journal Agric. Food Chem.* No. 46. 1998. pp. 4.771-4.774.
2. Chakraborty, P. *et al.* "Kinetics of Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus bulgaricus* in Glucose and Whey Media". En: *Journal Food Sci. Technol.* Vol. 36. No. 3. 1999. pp. 210-216.
3. Ik-Keun, Y. *et al.* "Effect of B vitamin Supplementation on Lactic Acid Production by *Lactobacillus casei*". En: *Journal of fermentation and Bioengineering.* Vol. 84. No. 2. 1997. pp. 172-175.
4. Kirsi, S. *et al.* "Molecular Genetic Characterization of the L-Lactate Dehydrogenase Gene (*ldhL*) of *Lactobacillus helveticus* and Biochemical Characterization of the Enzyme". En: *Applied and Environmental Microbiology.* July, 1997. pp. 2.850-2.856.
5. Akerberg, A. *et al.* "Modeling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour". En: *Applied Microbiology Biotechnol.* No. 49. 1998. pp. 682-690.
6. Trujillo, M. *et al.* "Fermentación láctica en continuo con *Lactobacillus bulgaricus*". En: *Alimentación, Equipos y Tecnología.* Julio-agosto, 1997.
7. Senthuran, A. *et al.* "Lactic Acid Fermentation in a Recycle Batch Reactor Using Immobilized *Lactobacillus casei*". En: *Biotechnology and Bioengineering.* Vol. 55. No. 6. 1997. pp. 841-853.
8. Zayed, G. *et al.* "Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of lactobacilli". En: *Applied Microbiology Biotechnol.* No. 44, 1995. pp. 362-366.
9. González-Vara, A. *et al.* "Enhanced Production of L-(+)- Lactic Acid in Chemostat by *Lactobacillus casei* DSM 20011 Using Ion-Exchange Resins and Cross-Flow Filtration in a Fully Automated Pilot Plant Controlled via NIR". En: *Biotechnology and Bioengineering.* Vol. 67. No. 2. 2000. pp. 147-156.
10. Kirk, R. E. *Enciclopedia de tecnología química.* UTHEA, México, 1962. tomo 8. pp. 66-71.
11. Miller, G. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar". En: *Ana. Chem.* Vol. 31. 1959. pp. 426-430.