



Valorización de permeado de suero de leche para la producción de lactasa

Puebla, Nicolás Alejandro¹

¹Laboratorio de Fermentaciones UNL

²Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas UNL

Director: Giordano, Pablo César

Codirectora: Micheloud, Gabriela

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

En los procesos de producción de quesos se genera suero como subproducto y su disposición final constituye un problema. El suero no puede desecharse sin un tratamiento previo ya que su descomposición es tóxica para el medio ambiente. Por ejemplo, si se desecha en el suelo, afecta sus características fisicoquímicas, disminuyendo el rendimiento de los cultivos; y si es descargado en cuerpos de agua, reduce el oxígeno disuelto, causando un alto riesgo a la vida acuática, el ambiente y la salud humana (Ghaly y col., 2007). Por tanto, es necesario encontrar procesos viables que permitan una disposición final adecuada de estos efluentes.

Las industrias lácteas más importantes utilizan equipamientos costosos para procesar el suero y generar productos de valor, pero aun así queda como remanente el permeado de suero, que contiene lactosa y minerales, componentes que pueden ser aprovechados (González Siso, 1996). Otro inconveniente es que los equipamientos costosos no están al alcance de industrias lácteas más pequeñas, dejando el problema de la disposición de los efluentes lácteos parcialmente sin resolver.

Ante este panorama, una alternativa es emplear los efluentes lácteos como sustratos para procesos biológicos (Panesar y col., 2013). Existen microorganismos que pueden fermentar la lactosa y generar diversos productos de interés como etanol, probióticos, enzimas y bioplásticos, entre otros (Panesar y col., 2013).

Entre las enzimas que se pueden producir, se encuentra la beta-galactosidasa o lactasa, que cataliza la hidrólisis de galactopiranosidos como la lactosa, generando dos monosacáridos: glucosa y galactosa, los cuales pueden ser utilizados como fuentes de carbono para microorganismos de interés industrial y/o comercial (Matioli y col., 2003).

Es una enzima muy interesante para la industria ya que posee resistencia química y alta actividad a bajo pH y altas temperaturas, reduciendo la posibilidad de contaminaciones (Haider y Husain, 2009). En particular, las fuentes microbianas son las preferidas ya que son de fácil manejo y alto rendimiento, prefiriéndose ciertos microorganismos no patógenos como los géneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Aspergillus* y *Bacillus* (Husain, 2010).

Título del proyecto: Puesta a punto de bioprocesos y valorización de subproductos industriales mediante el desarrollo y la aplicación de herramientas quimiométricas

Instrumento: Proyecto CAI+D Joven

Año convocatoria: 2017

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Director: Pablo César Giordano

Dado que el costo del medio de cultivo es el factor más importante que determina la economía del proceso; es necesario idear un proceso eficiente y económicamente factible de producción de lactasa. Esto se puede lograr desarrollando medios de cultivo a partir de recursos de nulo o bajo valor agregado, como los efluentes de las industrias lácteas, lo cual se puede alcanzar aplicando herramientas quimiométricas.

Las herramientas quimiométricas permiten elegir la estrategia experimental óptima para obtener la información buscada con el costo mínimo, y evaluar los resultados experimentales (Araujo y Brereton, 1996).

OBJETIVOS

- Desarrollar un proceso de producción de lactasa mediante el aprovechamiento de efluentes de industrias lácteas y la aplicación de herramientas quimiométricas
- Determinar la capacidad hidrolítica del sobrenadante sobre el permeado de suero lácteo.

METODOLOGÍA

Se empleó una cepa de *A. niger*, conservada en agar extracto de malta a 4°C. Todos los medios de cultivo estuvieron compuestos de extracto de malta (EM), tripteína bacteriológica (TB) y permeado de suero de leche (PS) en las concentraciones definidas por los diseños experimentales empleados. Todas las soluciones de estos reactivos fueron preparadas en agua destilada.

Para identificar a los factores influyentes en el proceso, se construyó un diseño de Plackett-Burman (PB) y los datos se analizaron aplicando algoritmos genéticos, y luego, para obtener las concentraciones óptimas de los componentes del medio de cultivo, se construyó un diseño central compuesto (DCC). Las combinaciones sugeridas por los diseños se obtuvieron combinando volúmenes de las soluciones madres y luego adicionando agua destilada hasta completar un volumen total de 50 mL, previamente ajustando el pH a 5. Luego, se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos.

Todos los medios fueron inoculados con esporangios de *A. niger* de manera de obtener un recuento inicial 1×10^5 esporangios/mL, se incubaron a 150 rpm y (30 ± 1) °C. Una vez que los cultivos alcanzaron el tiempo de incubación previsto, la biomasa (X) se separó por filtración en vacío, se secó hasta pesada constante y se cuantificó gravimétricamente. En el sobrenadante se determinaron las concentraciones de glucosa (G) (kit comercial GOD/POD) y azúcares reductores (AR) (ácido dinitrosalicílico) y la actividad enzimática (AE). Los datos obtenidos fueron introducidos en los softwares empleados (MatLab y Design-Expert) para ser analizados y obtener conclusiones.

RESULTADOS

Se construyó un PB para evaluar el efecto de los factores sobre las respuestas: AE, G, X y AR. Los factores evaluados fueron concentraciones de EM (5 o 30 gL⁻¹), TB (1 o 10 gL⁻¹) y fuente de carbono extra (CE) (5 o 30 gL⁻¹), tiempo de cultivo (T) (3 o 5 días), volumen nominal de Erlenmeyer (V) (250 o 500 mL) y tipo de fuente de carbono extra (TFC) (lactosa o permeado). El PB implicó de 12 experimentos y los resultados se muestran en la Tabla 1.

La interacción EM/CE tuvo efectos significativos sobre G y X; mientras que EM, TB y CE

fueron significativos para AR, y las interacciones EM/T y EM/V fueron significativas para AE.

Tabla 1: Valores de probabilidad (p) para cada efecto ejercido por los factores y/o sus interacciones sobre cada respuesta

Factor o interacción	Valor de p ^a y efecto ^b			
	G	AR	AE	X
EM	0,047 (+)	0,016 (+)	-	0,001 (+)
P	-	0,013 (-)	-	0,004 (-)
T	0,042 (-)	-	-	-
CE	-	2 x 10 ⁻⁵ (+)	-	-
V	-	-	-	-
TFC	-	-	-	-
EM/T		-	0,050 (+)	-
EM/C	0,033 (-)	-	-	0,036 (-)
EM/V	-	-	0,011 (-)	-
R ²	0,683	0,959	0,809	0,811
^a Valores de p menores o iguales a 0,05 indican un efecto significativo.				
^b (+): efecto positivo; (-) : efecto negativo.				

En consecuencia, se construyó un DCC, el cual consistió en 30 experimentos. Los factores fueron EM (0 a 35 gL⁻¹), TB (0 a 12 gL⁻¹), T (2 a 7 días) y concentración de lactosa contenida en permeado de suero de leche (LP) (0 a 35 gL⁻¹); mientras que los factores que se mantuvieron constantes fueron V = 250 mL y TFC = permeado. Finalmente, en base a los resultados obtenidos con el DCC, se realizó una optimización empleando la función deseabilidad. Los criterios fueron minimizar EM y TB, mantener T y LP en el rango, minimizar AR, maximizar AE, y G, y X en el rango. Las condiciones óptimas predichas fueron EM = 0 g L⁻¹, TB = 7,35 g L⁻¹, T = 7 días y LP = 15,52 gL⁻¹, y AE = 0,10 UI mL⁻¹, AR = 0,04 g L⁻¹, G = 0,21 gL⁻¹ y X = 6,24 gL⁻¹. La comprobación experimental consistió en cultivos por triplicado y los valores obtenidos fueron AE = (0,11 +/- 0,01) UI mL⁻¹, AR = (0,61 +/- 0,05) gL⁻¹, G = (0,06 +/- 0,01) gL⁻¹ y X = (6,48 +/- 0,34) gL⁻¹.

DISCUSIÓN

En la etapa de selección de factores, en la Tabla 1 puede verse que V no ejerció efectos significativos, lo cual puede deberse a que el volumen de cultivo empleado permite obtener no sólo un buen mezclado sino también un área de contacto líquido-gas lo suficientemente grande como para que no ocurra una limitación de oxígeno. TFC tampoco tuvo efectos significativos, lo que indica que el reemplazo de lactosa pura por el permeado de suero de leche es factible. En la etapa de optimización, al analizar la Figura 1, se concluyó que es posible obtener una elevada AE con valores elevados de LP y casi nulos de EM, lo cual repercute positivamente en la economía del proceso, ya que el extracto de malta implica una erogación económica mientras que el permeado no .

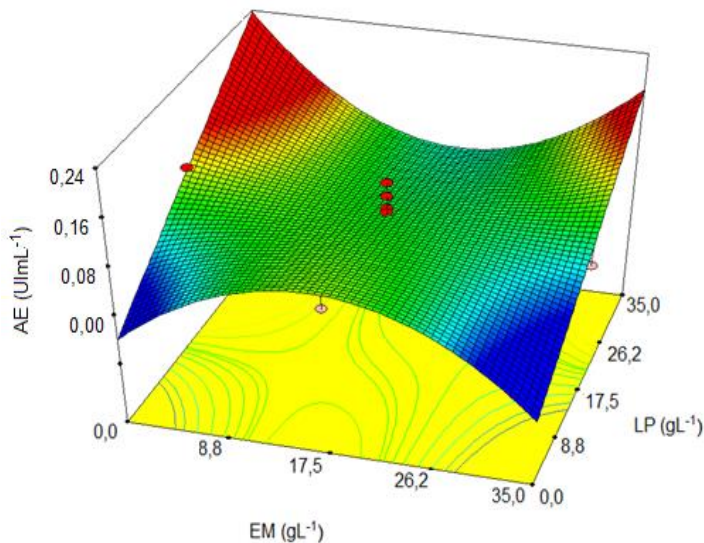


Figura 1: Superficie de respuesta que representa a AE en función de EM y LP.

Por eso se buscó minimizar la concentración de EM, un insumo que implica un gasto económico, prefiriéndose el PS, que es un desecho, y que además activa la producción de la enzima de interés. La minimización de la concentración de AR se buscó para que en el medio de cultivo quede la menor cantidad de azúcares remanentes, que son los principales responsables de las altas DQO/DBO presentes en el permeado, por lo cual se estaría logrando un saneamiento de este efluente.

CONCLUSIONES

Con la aplicación de herramientas quimiométricas se desarrolló un medio de cultivo a base de permeado de suero de leche para la producción de lactasa por *A. niger*. La actividad enzimática obtenida fue baja, por lo cual, a futuro se propone identificar las causas y solucionarlas. Por otro lado, la concentración de azúcares reductores se redujo a valores casi nulos, lo cual indica que se logró aprovechar ampliamente un subproducto de mínimo valor agregado de las industrias lácteas, evitando su volcado directo en el ambiente.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Araujo, P.W.; Brereton, R.G.**, 1996. Experimental Design: III. Quantification. Trends Anal. Chem., 15, 156-163.
- Ghaly, A.E., Mahmoud, N., Rushton, D., Arab, F.**, 2007. Potential environmental and health impacts of high land applications of cheese whey. Am. J. Agr. Biol. Sci., 2, 106-117.
- González Siso M.I.**, 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. Bioresour. Technol., 57, 1-11.
- Haider, T.; Husain, Q.**, 2009. Immobilization of β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* via immunoaffinity support. Biochem. Eng. J., 43, 307-314.
- Husain, Q.**, 2010. Beta galactosidases and their potential applications: a review. Crit. Rev. Biotechnol., 30, 41-62.
- Matioli, G.; Moraes, F.F.; Zanin, G.M.**, 2003. Operational stability and kinetics of lactose hydrolysis by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. Acta Scien. Health Sci., 25, 7-12.
- Oberoi, H.S.; Bansal, S.; Dhillon, G.S.**, 2008. Enhanced β -galactosidase production by supplementing whey with cauliflower waste. Int. J. Food Sci. Technol., 43, 1499-1504.
- Panesar, P.S.; Kumari, S.; Panesar, R.**, 2013. Biotechnological approaches for the production of prebiotics and their potential applications. Crit. Rev. Biotechnol., 33, 345-364.