



## PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA Y BIOMASA PROBIÓTICA DE *Lactobacillus casei* LIOFILIZADAS A PARTIR DE SUERO DE LECHE DE CABRA

## PRODUCTION OF FREEZE DRIED PROTEIN AND *Lactobacillus casei* PROBIOTIC BIOMASS FROM GOAT MILK WHEY

E. J. Aguirre-Ezkauriatza, A. Ramírez-Medrano, J. M. Aguilar-Yáñez y M. M. Álvarez\*

Centro de Biotecnología-FEMSA del Tecnológico de Monterrey  
Av. Eugenio Garza Sada 2501 sur. Col. Tecnológico. Edificio CB, 5to piso. Monterrey, N.L. 64849, México.

Recibido 21 de Noviembre 2008; Aceptado 31 de Marzo 2009

### Resumen

En este trabajo se documenta la factibilidad técnica de obtención de dos productos de valor agregado a partir de suero de leche de cabra: (a) proteína liofilizada y (b) biomasa probiótica liofilizada de *Lactobacillus casei*. Se presentan resultados de experimentos de ultrafiltración de suero de leche de cabra (SLC), del cual se retiene proteína con una alta relación proteína/lactosa. En su forma liofilizada, esta proteína presentó características de solubilidad superiores a productos comerciales similares. El permeado resultante del ultrafiltrado de SLC fue utilizado como medio de cultivo para el crecimiento del microorganismo probiótico *L. casei*. Se reportan resultados de experimentos de fermentación de suero de leche por lote y lote alimentado para la producción de biomasa. La cinética de crecimiento de *L. casei* en SLC desproteinizado no suplementado es analizada a partir de datos de experimentos por lotes. Se observa un marcado efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano asociado a la producción de ácido láctico. Las estrategias por lote alimentado aquí reportadas resultan en productividades superiores, concentraciones de sustrato residual menores y viabilidades más altas del producto respecto a procesos por lote.

**Palabras clave:** *Lactobacillus casei*, por lote alimentado, biorreactores, suero de leche, cabra, probiótico.

### Abstract

In this communication, we document the technical feasibility of elaboration of two added value products from goat whey: (a) freeze-dried protein and (b) freeze-dried probiotic biomass of *Lactobacillus casei*. Results from goat milk whey ultrafiltration experiments are presented, from which high protein/lactose ratio protein is recovered. In its lyophilized form, this protein presents superior solubility characteristics with respect to analogous commercial products. The ultrafiltration permeate was utilized as growth culture medium for the probiotic microorganism *L. casei*. Results from batch and fed-batch fermentation experiments are reported. The growth kinetics of *L. casei* in de-proteinized goat milk whey is analyzed. From batch experiments, a kinetic characterization is conducted. A strong inhibition of biomass growth by lactic acid production is observed. Fed-batch strategies resulted in higher average productivities, lower residual substrate concentrations, and higher product viable counts than batch strategies.

**Keywords:** *Lactobacillus casei*, fed-batch, bioreactors, goat milk, whey, probiotic.

### 1. Introducción

El suero de leche es un subproducto poco aprovechado en México, inclusive considerado como un potencial problema ambiental. Su contenido de proteína, grasa y lactosa lo convierte en un contaminante si se dispone de él inadecuadamente. Por otro lado, los suplementos nutricionales y los probióticos han encontrado nichos importantes en la industria de alimentos y la

industria farmacéutica (Nerlich y Koteiko, 2008; Pham y col., 2008; Rosmini y col., 2004). Resulta entonces atractivo dirigir hacia estos destinos los esfuerzos por conferir valor a los productos derivados del suero de leche.

En este trabajo se analiza la factibilidad técnica de obtención de dos productos de valor agregado a partir de suero de leche de cabra: (a) proteína liofilizada y (b) biomasa probiótica liofilizada de *Lactobacillus casei*. El primero de

\* Autor para la correspondencia. E-mail: mario.alvarez@itesm.mx  
Tel: (81) 83284131, Fax: (81) 83284136

estos, proteína liofilizada, podría comercializarse en el mercado de los deportistas de alto rendimiento (tiene una relación proteína/carbohidrato de 7:1), y como suplemento para bebidas (al poseer mejoradas características de dispersión-solubilización en medios acuosos). El segundo, biomasa liofilizada de *L. casei*, es un probiótico que pudiera utilizarse como suplemento alimentario-funcional (como aditivo o administrado independientemente), o en el mercado farmacéutico (para tratamientos de restablecimiento de flora intestinal benéfica). *L. casei* es un microorganismo anaeróbico, habitante común en el intestino y en la boca de los humanos. Es una bacteria productora de ácido láctico que se emplea también en la industria láctea. Esta especie de lactobacilo es particularmente resistente a rangos amplios de pH (Yuki y col., 1999; Brink y Todorov, 2006). Se ha referido que *Lactobacillus casei* mejora la capacidad de digestión, la tolerancia a la leche y evita la diarrea (Isolauri, 1991). Una larga lista de contribuciones ha documentado propiedades funcionales probióticas de *L. casei*: efecto antimicrobiano (Brink y Todorov, 2006; Nemeth y Fajdiga, 2006); disminución de los niveles de colesterol (Liong y Shah, 2006; Park y Kim, 2008); disminución de diarreas por infecciones gastrointestinales (Isolauri y Kalia, 1993; Srinivasan y Meyer, 2006); coadyuvante en la digestión de la lactosa (Gaon y Doweck, 1995); estimulador del sistema inmune (Matsuzaki y col., 2008; Ortiz-Andrellucchi y Sánchez-Villegas, 2008); regulador de las funciones intestinales (Brink y Todorov, 2006; Kinoshita y col., 2007); competidor o bacteriostático de flora patógena a nivel intestinal (Ingrassia y Leplingard, 2005; Parassol y Freitas, 2005).

La leche de cabra y sus derivados son recursos alimenticios que han recibido en los últimos años mayor atención mundial. En México, la caprinocultura es una actividad económica muy importante en algunos estados. Por ejemplo, el "cabrito" es un ícono culinario de Nuevo León. Recientemente, iniciativas gubernamentales y privadas han detonado un renovado interés por la leche caprina y sus derivados. La industria de quesos finos de leche de cabra tiene ya importante presencia comercial en este estado. Visualizado como una posible materia prima, el SLC, subproducto derivado de la elaboración de quesos de cabra, representa una gran oportunidad dado su contenido de nutrimentos: v.gr. 1000 litros de suero (resultado de la producción de 100 kg de queso) contienen 9 Kg de proteína, 50 Kg de lactosa y 3 Kg de grasa de leche.

En esta contribución, se propone un proceso simple, escalable y de bajo costo, para el aprovechamiento integral del SLC que conste de las etapas de (a) separación de la grasa por descremado, (b) retención de la mayor parte de la proteína por ultrafiltración (para después liofilizarla) y (c) utilización del permeado de lactosa (con suficiente proteína residual para aún ser un adecuado medio de

cultivo) para producir biomasa probiótica de *L. casei*. En las diferentes secciones de este trabajo se presenta una caracterización del suero de leche de cabra como materia prima, se demuestra la factibilidad técnica de separación por ultrafiltración y posterior liofilización de proteína de suero de leche de cabra, se compara la solubilidad/dispersibilidad de esta proteína contra productos comerciales análogos, y se demuestra la factibilidad técnica de la fermentación de la fracción filtrada del suero de leche de cabra para producir biomasa de alto valor (*L. casei*). Dada la importancia de la caracterización cuantitativa de rendimientos y productividades en la evaluación de factibilidad de un proceso biológico (Soto-Cruz y Páez-Lerma, 2005), hemos dedicado atención enfática a la caracterización cinética del proceso de fermentación de la fracción filtrada del suero en reactores operados por lote y por lote alimentado. Adicionalmente, se presentan protocolos para validar la identidad molecular del producto liofilizado (determinación de *L. casei* por PCR) y evaluar su potencial probiótico (en términos de cuenta viable de *L. casei* por gramo de biomasa liofilizada).

## 2. Materiales

Se utilizó SLC dulce (derivado de la elaboración de queso panela y de cuajada) amablemente facilitado por la empresa Caprico®. El SLC fue caracterizado bromatológicamente utilizando protocolos estándar para humedad (AOAC925.10), cenizas (AOAC923.03), proteínas (AOAC978.02), fibra cruda (AOAC962.09), grasas (método de Goldfish) y carbohidratos (por diferencia).

## 3. Metodologías

*Estrategia general.* Se plantea la recuperación de proteínas del suero de la leche por un proceso de ultra filtración. La fracción rica en proteína así recuperada, se liofilizará para obtener un primer producto, en forma de polvo liofilizado bajo en lactosa. La fracción filtrada se destinará a la obtención de biomasa probiótica vía fermentación. La biomasa recuperada por centrifugación será liofilizada, siendo este un segundo producto de alto valor del proceso global (Aguirre-Ezkauriatza, 2008). La Fig. 1 ilustra el proceso propuesto.

*Proceso de ultrafiltración.* El suero de leche de cabra fue precalentado a 50 °C y filtrado en un equipo de ultra filtración modelo Flexstand marca Amersham®, Biosciences Corp. USA. Se utilizó una columna Hollow Fiber UFP-10-E-6A de túbulos de polisulfona (Amersham®, Biosciences Corp. USA) de 10 Kilodaltones y de 2800 cm<sup>2</sup>, con un rango de presión de trabajo de 1 a 1.5 bars. Los productos de ultrafiltración serán denominados en este documento como (a) el concentrado de proteína (retenido) y (b) la fracción filtrada de lactosa (permeado).

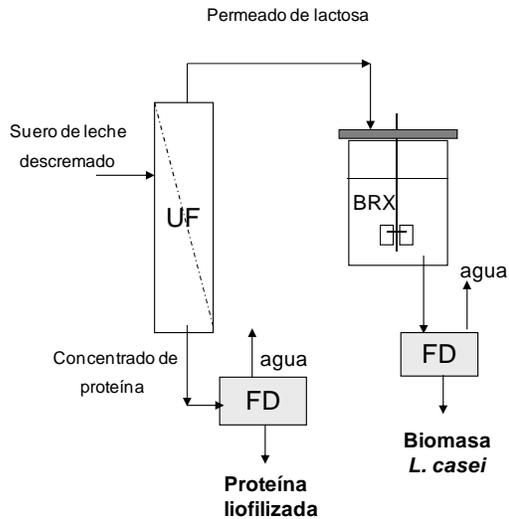


Fig. 1. Esquema global del proceso propuesto y algoritmo de experimentación.

*Evaluación comparativa de la solubilidad y la dispersibilidad de proteína liofilizada.* Se realizó un estudio comparativo de dispersión-solubilización entre el producto comercial Mega Whey® de GNCTM (concentrado proteico de suero de leche con relación proteína/carbohidratos de 8:1) y la proteína liofilizada recuperada de SLC (relación proteína/carbohidratos de 7:1). Para estas pruebas, 1.42 g de muestra de cada producto fueron vertidos en 100 ml de agua bidestilada. Estas suspensiones se agitaron a 200 rpm por 5 minutos (tiempo suficiente para alcanzar una distribución estable de tamaño de partícula en ambos productos) en un vaso de precipitados de 250 ml. Un equipo analizador de distribución de tamaño de partícula FBRM (Focus Beam Refractance Measurement) de Mettler Toledo® USA, fue utilizado para caracterizar cada suspensión (Aguirre-Ezkauriatza, 2008).

*Cultivo en biorreactores.* Los experimentos de fermentación de permeado de lactosa aquí reportados fueron conducidos en un biorreactor instrumentado Applikon® modelo ez-Control, USA, de 3 L (volumen efectivo (V) de 2 L). Los experimentos fueron realizados utilizando suero de leche desproteínizado y no suplementado. Se utilizaron condiciones operacionales de  $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH de 5.5 (Altiok y col., 2006) y agitación de 300 rpm (Aguirre-Ezkauriatza, 2008). En todos los experimentos, se tomaron muestras de 25 ml de líquido del biorreactor para cuantificar la concentración de biomasa y sustrato. Se realizaron experimentos de cultivo por lote y lote alimentado (Alvarez y Aguirre-Ezkauriatza, 2008). Tres experimentos de cultivo por lote fueron efectuados. En ellos, distintas condiciones de concentración de inóculo (en el rango de 0.5 a 1.0 g/L) y de sustrato inicial (en el rango de 33 a 50 g/L) fueron utilizadas. Tres experimentos de cultivo por lote alimentado fueron efectuados como continuación de un

experimento por lotes. Para controlar flujos de entrada y salida al biorreactor se utilizaron dos bombas peristálticas Masterflex®, USA. Dos tipos de estrategias por lote alimentado fueron probadas. En la primera de ellas, la agitación de un cultivo por lote de 20 horas (14 horas en fase exponencial) fue interrumpida, permitiendo la sedimentación natural de la biomasa presente por un periodo de cuatro horas. Al término del reposo, 1 L de sobrenadante ( $V/2$ ) fue retirado del biorreactor, para ser inmediatamente substituido por 1 L de medio de cultivo fresco ( $V/2$ ). Una segunda estrategia de lote alimentado fue implementada a partir de un cultivo en fase exponencial donde la concentración de biomasa en el tanque era de  $[X]=2.8\text{ g/L}$ . Una cuarta parte del volumen ( $V/4$ ) del biorreactor (equivalente a 500 ml) fue retirada del tanque (en condiciones de agitación), para posteriormente ser suplida por medio de cultivo fresco.

*Determinación de la concentración de biomasa en reactores.* Para todos los experimentos aquí reportados, la concentración de biomasa se evaluó por medición de absorbancia a 560 nm. Las lecturas de absorbancia se tradujeron a peso seco (g biomasa/L) utilizando una curva de calibración basada en mediciones gravimétricas de muestras liofilizadas de *L. casei* cultivado en el mismo medio y condiciones.

*Análisis cinético.* Los datos derivados de los experimentos de fermentación por lotes fueron analizados a fin de caracterizar cinéticamente el proceso y proponer estrategias para mejorar su desempeño. Para efecto del análisis cinético, se supone válido el modelo general de crecimiento de primer orden (Altiok y col., 2006), que propone que la velocidad de crecimiento de biomasa ( $r_x$ ) es proporcional a la cantidad de biomasa ( $[X]$ ), a través de la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ):

$$r_x = \frac{d[X]}{dt} = \mu[X] \quad (1)$$

A partir de la forma integrada y linealizada de este modelo (Ec. (2)), gráficamente puede obtenerse el valor de  $\mu$  para las primeras horas de la etapa exponencial de crecimiento, aquellas donde en efecto, el comportamiento es descrito por una línea recta cuya pendiente es  $\mu$ .

$$\ln[X] = \mu t + \ln[X]_0 \quad (2)$$

Adicionalmente, en las regiones donde  $\mu$  no exhibió comportamiento constante, ecuaciones polinomiales de tercer orden fueron ajustadas a los perfiles de biomasa en el tiempo para cada uno de los experimentos por lote.

$$[X] = \alpha + \beta t + \chi t^2 + \delta t^3 \quad (3)$$

A su vez, estas funciones polinomiales tienen derivadas exactas que son equivalentes, por definición, a la velocidad de producción de biomasa,  $r_x = d[X]/dt$ :

$$r_x = \frac{d[X]}{dt} = \beta + 2\chi t + 3\delta t^2 \quad (4)$$

Utilizando el modelo general de crecimiento propuesto (Ec. (1)), y a partir de estas derivadas exactas, se calculó la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) para cada punto en el tiempo:

$$\mu = \frac{r_x}{[X]} = \frac{1}{[X]} \frac{d[X]}{dt} = \frac{\beta + 2\chi t + 3\delta t^2}{[X]} \quad (5)$$

*Evaluación de viabilidad e identidad de la biomasa.* La viabilidad de muestras de biomasa seca fue evaluada por el método de siembra y cuenta en placa en medio MRS de Fluka®, USA (DeMan y col., 1960). Diluciones seriadas en el rango  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  fueron obtenidas a partir de un ml de resuspensión. Un ml de cada dilución fue sembrado en placas de agar MRS. Las placas fueron incubadas en atmósfera de  $\text{CO}_2$  por espacio de 48 hrs. La identidad de la biomasa producida fue validada por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Tres muestras del presunto *L. casei* fueron tomadas de cultivos en placa por punción de colonia, practicándose sobre cada una de ellas un análisis de PCR directo de colonia (sin extracción previa de ADN). Se utilizaron sondas específicas para *L. casei*: F\_case\_IS 5' CTA TAA GTA AGC TTT GAT CCG GAG ATT T 3' y R\_case\_IS 5' CTT CCT GCG GGT ACT GAG ATG T 3' (Haarman y Knol, 2006). Cada reacción se efectuó en un volumen de 50  $\mu\text{L}$ , utilizando el Kit Advantage™ 2 PCR kit, Clontech, USA, en un termociclador Px2 Thermal Cycler de Thermo Scientific, USA. El producto de PCR se analizó por la técnica de electroforesis de agarosa al 4% (peso/volumen) en TAE (Tris-ácido acético EDTA) (Sanbrook y Russell, 2001) con SYBR Safe® de Invitrogen, USA. Como control positivo se utilizó *L. casei* var. *rhamnosus* (producto comercial Liolactil®, de IVAX, Francia).

*Evaluaciones analíticas.* La concentración de ácido láctico, lactosa, glucosa y galactosa fue evaluada mediante una técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando un cromatógrafo Waters® modelo W1515 y un detector de índice de refracción Waters® W2414. Se utilizó una columna Aminex HPX 87H (Biorad®), una fase móvil de ácido sulfúrico 5mM a un flujo de 0.6 ml/min y una temperatura de 50 °C en el detector y 60 °C en el horno.

Alternativamente, la concentración de lactosa se evaluó por un método enzimático. Tabletas de 9000 FCC unidades de lactasa, (Lactaid®, USA) fueron utilizadas para hidrolizar la lactosa del medio de cultivo. Para cada determinación, un volumen de 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante fue mezclado con 900  $\mu\text{L}$  de la solución stock de lactasa e incubado en agitación continua por 15 minutos a 30 °C. Estas condiciones de incubación fueron determinadas por experimentos previos que demostraron hidrólisis total de la lactosa presente (en el rango de 0 a 70 g/L) después de 10

minutos. La glucosa resultante de la hidrólisis fue cuantificada utilizando un equipo de medición de glucosa en sangre de la marca Optium®, USA.

Para algunos experimentos, la concentración de ácido láctico también se evaluó utilizando la técnica de FTIR (Fourier Transform Infra Red) en línea, con un instrumento React IR de Metler Toledo® (Fairbrother y col., 1991). Específicamente, la concentración del ácido láctico disociado se correlacionó con la altura del pico de absorbancia ocuriente a 1575  $\text{cm}^{-1}$ . La concentración del ácido láctico no disociado se correlacionó con la altura del pico de absorbancia ocuriente a 1725  $\text{cm}^{-1}$  (Fairbrother y col., 1991; Hayakawa y col., 2000).

#### 4. Resultados y Discusión

*Caracterización del suero de leche de cabra entero y descremado.* La Tabla 1 presenta resultados de la caracterización bromatológica del suero de leche de cabra utilizado. Los valores observados se encuentran en los rangos típicos de calidad del suero de leche de vaca, según la Norma Mexicana NMX-F-721-COFOCALEC-2006. De acuerdo a estos resultados, el SLC 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 SLC, relaciones mínimas de proteína/carbohidratos del orden de 0.2. Siendo que aproximadamente el 25% de los sólidos del SLC son proteínas, idealmente pudiera recuperarse hasta un máximo de 15 kg de proteína/ $\text{m}^3$  de SLC entero (este valor no considera las pérdidas que ocurrirán en el proceso de separación por ultrafiltración). Posterior a la operación de descremado, el SLC fue caracterizado bromatológicamente (Tabla 1). Interesantemente, un proceso simple de descremado puede generar un producto adicional de valor agregado, en este caso grasa de leche caprina. La fracción de grasa en base seca disminuye de 3.5 g/100 g a prácticamente 0. En consecuencia, pueden recuperarse hasta 35 gramos de grasa por cada kg de materia seca originalmente presente, una potencial recuperación del orden de 2.11 kg de grasa de leche caprina/ $\text{m}^3$  de SLC.

*Recuperación de proteína por ultrafiltración.* En promedio, de cada 100 ml de SLC descremado alimentado a la columna de ultrafiltración se recuperó una fracción de 76 ml de permeado de lactosa y 20 ml de concentrado de proteína. La pérdida típica de volumen, retenido en membranas y mangueras, fue de 4% con respecto al volumen alimentado. Este número tenderá a reducirse en escalas superiores, donde la relación volumen/área superficial del filtro será menor. En general, es posible recuperar 1 g de proteína liofilizada/73g de concentrado de proteína. La Fig. 2 presenta resultados de un experimento comparativo de dispersión-solubilización entre el producto comercial Mega Whey® de GNC™ y la proteína liofilizada

Tabla 1. Análisis bromatológico del SLC entero y descremado. Se muestran valores en base seca y base húmeda. Estos análisis fueron realizados de acuerdo a protocolos AOAC.

| Parámetro     | Suero de leche entero |                       | Suero de leche descremado |                       |
|---------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|
|               | Valor (% base seca)   | Valor (% base húmeda) | Valor (% base seca)       | Valor (% base húmeda) |
| Humedad       | NA                    | 93.68                 | NA                        | 94.4                  |
| Cenizas       | 7.15                  | 0.45                  | 3.91                      | 0.22                  |
| Proteínas     | 25.97                 | 1.64                  | 41.01                     | 2.3                   |
| Grasas        | 3.48                  | 0.22                  | 0.05                      | 0.00                  |
| Fibra Cruda   | NA                    | 93.68                 | 5.59                      | 0.31                  |
| Carbohidratos | 7.15                  | 0.45                  | 49.44                     | 2.77                  |

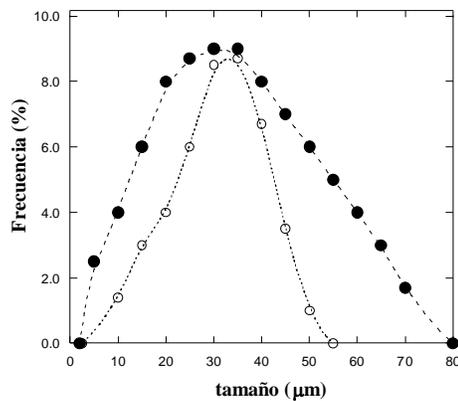


Fig. 2. Resultado comparativo de ensayos de solubilización de proteína. Se muestran las curvas de distribución de tamaño de partícula en el rango de 0 a 80 mm para un producto comercial de referencia (●) y la proteína liofilizada producida a partir de suero de leche de cabra (○).

recuperada. Se observa que la curva de distribuciones de tamaño de partícula para una muestra típica de proteína liofilizada de SLC es más homogénea que la correspondiente al producto de referencia. El experimento también demuestra que la proteína liofilizada es más soluble que la proteína comercial. El área bajo curva en el estado estable (proporcional a la cantidad de proteína no solubilizada) es 30% menor para la proteína de SLC liofilizada.

*Fermentación de suero desproteínizado en reactores por lote.* El ultrafiltrado del proceso de recuperación de proteína fue sometido a fermentación sin adición suplementaria de fuente alguna de carbono o nitrógeno. Esta estrategia intenta validar, si con solamente los nutrientes propios (lactosa como fuente de carbono primordial y proteínas de suero de leche permeadas), es posible lograr un crecimiento apropiado de biomasa. Adicionalmente, con el propósito de minimizar fases operativas al máximo, se ensayó un proceso anaeróbico. La Fig. 3 presenta

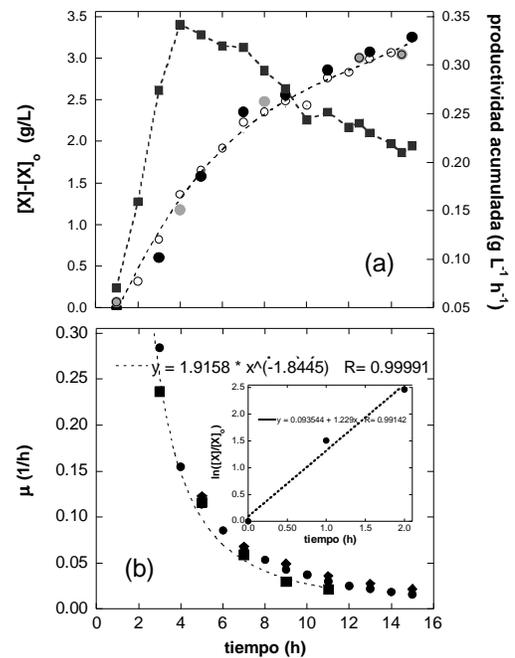


Fig. 3. Resultados de experimentos de fermentación. En (a) se presentan perfiles de concentración de biomasa en el tiempo correspondientes a experimentos donde  $[X]_0=0.50$  g/L y  $[S]_0=41.0$  g/L (●);  $[X]_0=1.00$  g/L y  $[S]_0=35.0$  g/L (●);  $[X]_0=0.50$  g/L y  $[S]_0=50.0$  g/L (○); y el perfil de productividad acumulada con respecto al tiempo para un experimento por lotes (■). En (b) se presenta la evolución de los valores de la constante específica de crecimiento ( $\mu$ ) respecto a tiempo para los experimentos por lote antes citados. El inserto presenta el cálculo de  $\mu$  para las primeras horas de la etapa de crecimiento exponencial de un experimento por lotes.

los resultados de un análisis cinético de los experimentos por lote realizados. En la Fig. 3(a) se muestran los perfiles de biomasa producida contra tiempo para tres experimentos de fermentación

independientes. En estos experimentos se varió la concentración inicial de inóculo (en el rango de 0.5 a 1.0 g/L) y la concentración de sustrato inicial (en el rango de 35 a 50 g/L). En estos experimentos se recuperaron valores finales de concentración de biomasa liofilizada (producto de la fermentación) en el rango de 3.7 a 4.4 g/L, dependiendo de la concentración inicial de inóculo y la concentración inicial de sustrato del experimento.

Sin embargo, independientemente de las condiciones iniciales de biomasa y sustrato, la evolución de la ganancia en biomasa durante la fase de crecimiento exponencial fue prácticamente equivalente en nuestros experimentos (Fig. 3(a)). Cuando se grafica la diferencia en concentración de biomasa respecto a la condición de inoculación ( $[X] - [X]_0$ ) contra el tiempo, los perfiles de los tres experimentos colapsan en un mismo comportamiento. Se infiere entonces que, en los rangos experimentales de sustrato analizados, típicos de suero de leche no diluido ni suplementado, no existen efectos significativos de la concentración de sustrato sobre los perfiles globales de crecimiento.

El valor global promedio de rendimiento de biomasa por sustrato,  $Y_{x/s}$  global aparente, se sitúa en 0.0990 g de biomasa/g de sustrato. Algunos estudios (Ha y Kim, 2003) reportan concentraciones más altas de biomasa de *L. casei* al final de la fermentación y rendimientos superiores. En estos trabajos, a diferencia del presente, se suplementó el suero de leche con fuentes adicionales de carbono o nitrógeno (tabla 2). Mondragón-Parada y Nájera-Martínez (2006) reportan rendimientos de 0.165 g biomasa/g lactosa, aproximadamente 65% superior al valor aquí reportado, utilizando suero de leche diluido y suplementado con extracto de levadura (0.25 g/L) para una cepa aislada de un fermentado lácteo. Sin embargo, en el mismo trabajo se documentan resultados de rendimiento de 0.064 y 0.066 (inferiores a los aquí reportados) para otras dos cepas de *L. casei* cultivadas por los autores en iguales condiciones. También en la Fig. 3(a), se describe el comportamiento típico de la productividad acumulada (g de biomasa/(L h)) observado durante los experimentos de fermentación por lotes. Durante las primeras dos horas de la fase exponencial de crecimiento, las productividades aumentaron hasta alcanzar máximos cercanos a 0.35 g/(L h). Posteriormente, la productividad acumulada decayó progresivamente hasta un valor final aproximado de 0.21 g/(L h). Este comportamiento del perfil de productividad se explica en términos de los valores de la tasa específica de crecimiento de biomasa ( $\mu$ ).

El inserto de la Fig. 3(b) muestra que durante las primeras horas de la fase de crecimiento exponencial, la tasa de crecimiento específico de *L. casei* es constante, con un valor de 1.229/h. Posteriormente, el valor de  $\mu$  decae progresiva y rápidamente. La Fig. 3(b) presenta el comportamien-

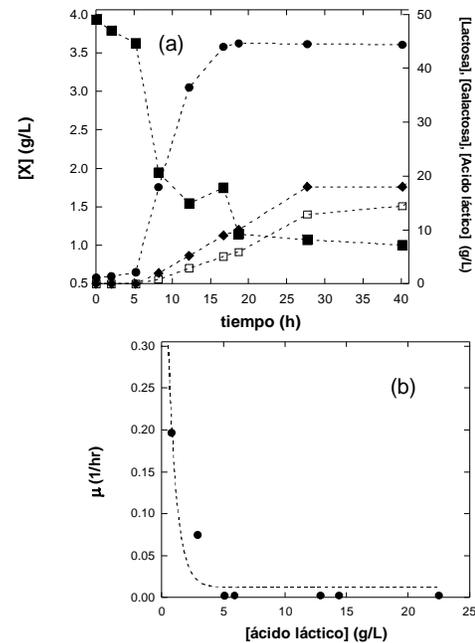


Fig. 4. (a) Evolución de los perfiles de concentración de biomasa (●), lactosa (■), galactosa (◆) y ácido láctico (□) en el tiempo para un experimento de fermentación por lotes. (b) Dependencia de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) con respecto a la concentración de ácido láctico.

to de la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) en el tiempo para cada uno de los experimentos por lote realizados. Nuevamente, como en el caso de los perfiles de biomasa producida, las tres curvas aproximadamente colapsan en una sola, toda vez que se hacen coincidir las fases exponenciales de crecimiento. De hecho, el valor de la tasa específica de crecimiento decae exponencialmente en el tiempo, temprano en la fermentación. La drástica caída exponencial en el valor de  $\mu$  con respecto al tiempo (y por tanto con respecto a la producción de ácido láctico), denota un proceso de inhibición muy significativo. La Fig. 4(a) presenta un perfil típico de evolución de biomasa (*L. casei*), sustrato (lactosa) y producto (ácido láctico) de nuestros experimentos de fermentación por lote. En este caso particular, el experimento se documentó por espacio de 40 horas, incluyendo una fase lag de adaptación celular de aproximadamente 5 horas. *L. casei* desdobla lactosa en glucosa y galactosa. El lector podrá observar que la galactosa producida se acumula en el medio de cultivo, utilizándose la glucosa tanto para el crecimiento celular como para la producción de ácido láctico. Es conocido que el ácido láctico inhibe el crecimiento de las bacterias lácticas. Para el caso de *L. casei*, este efecto ha sido documentado (Altiok y col., 2006; Youssef y Goma, 2005). La Fig. 4(b) ilustra la magnitud del efecto inhibitorio. El ácido láctico inhibe exponencialmente la tasa de crecimiento específica aún a concentraciones

menores de 5 g/L. En la ventana de 5 a 10 g/L (señalada en la Fig. 4),  $\mu$  prácticamente se estabiliza en valores menores a 0.01/h, prácticamente frenando el crecimiento de la biomasa, aún cuando exista sustrato disponible. Otros autores, por ejemplo Mondragón-Parada y Nájera-Martínez (2006), reportan tasas específicas de crecimiento en el rango de 0.013 a 0.037/h, consistentes con los rangos por nosotros observados, sin proveer detalle de variaciones de este valor en el tiempo. Nuestros resultados sugieren que es precisamente esta inhibición por ácido láctico el factor dominante que limita el desempeño de crecimiento y fermentativo de *L. casei*. Esta observación tiene gran relevancia en las decisiones a tomar sobre el diseño ideal de proceso. Un proceso por lote, donde progresivamente se produce más inhibidor, y con ello se reduce drásticamente el valor observable de tasa específica de crecimiento, pudiera no ser el proceso de producción de biomasa más eficiente.

**Producción de biomasa en cultivo por lote alimentado.** La Fig. 5 muestra las curvas de concentración de biomasa y sustrato en el tiempo, para un experimento por lote continuado por múltiples etapas de lote alimentado. Durante las primeras 20 horas de operación por lote, se alcanzó una concentración celular  $[X]=4.4$  g/L, con prácticamente un agotamiento en la concentración de sustrato. En un primer escenario por lote alimentado, el contenido del reactor se sedimentó en reposo por 4 horas. Al término de este periodo, un volumen equivalente al 50% del contenido del reactor (900 ml) fue evacuado y reemplazado por el mismo volumen de nuevo medio de cultivo a una concentración  $[S]_0=34$  g lactosa/L. De esta forma, el reactor reactivó su operación normal con una concentración  $[X]_0=2.7$  g/L y  $[S]_0=12$  g lactosa/L. En un lapso de 5 horas, y siguiendo una pendiente de consumo de sustrato similar a la del periodo por lote, el sustrato se agotó completamente. La pendiente de producción de biomasa en este experimento por lote alimentado resultó muy similar a la observada en la parte final del experimento por lote, a alta concentración de biomasa ( $r_{x \text{ por lote}} | [X]_{\text{alta}} = r_{x \text{ por lote alimentado}}$ ). En un segundo experimento por lote alimentado, ahora sin periodo de sedimentación, se recambió solamente la cuarta parte del volumen efectivo del reactor (450 ml). Las condiciones de inicio de este experimento por lote alimentado fueron  $[X]_0=2.75$  g/L y  $[S]_0=7.5$  g de lactosa/L. En un periodo de 5 horas, y con valores de  $r_x$  y  $r_s$  similares a los observados en el experimento por lote alimentado 1, el sustrato se agotó completamente. El mismo protocolo por lote alimentado se repitió en el experimento por lote alimentado 3. Se reprodujo exactamente el comportamiento observado en el experimento por lote alimentado 2. Nuestros resultados indican una productividad de 0.46 g/(L.h), valor superior a otros reportados en literatura para *L. casei* en suero de leche suplementado (Mondragón-

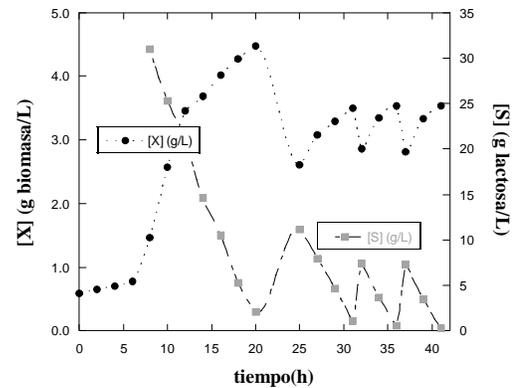


Fig. 5. Resultados del sistema tipo lote alimentado, donde se muestra los perfiles de concentración de biomasa [X] (●) y sustrato [S] (■) para (a) una etapa de cultivo por lote con duración de 20 h, y (b, c, d) tres ciclos de fermentación por lote alimentado.

Parada y Nájera-Martínez (2006) y Altioik y col.(2006)) y con un agotamiento total en la cantidad de sustrato.

**Comparación de estrategias de cultivo por lote y por lote alimentado.** La Tabla 2 presenta una comparativa de las variantes de cultivo estudiadas (por lote y por lote alimentado). Se presentan valores observados durante los experimentos, que resultan cruciales para contrastar los procesos de cultivo (productividad, producción de biomasa y sustrato consumido).

Para el caso por lote, la productividad es una función del tiempo. En la Tabla 2 se reporta el promedio integrado no incluyendo la “improductiva” etapa lag. Si esta se considerara, el valor de productividad acumulativa disminuiría a 0.099 g/(L.h) (ver Fig. 3(a)). Aún considerando solamente la etapa menos inhibida por ácido láctico (primeras horas de fermentación), las productividades máximas observadas para un proceso por lotes a baja densidad celular fueron de 0.34 g/(L.h). Estas productividades podrían verse aumentadas si se utilizaran concentraciones de inóculo más altas. Esto es conceptualmente lo que sucede en un proceso por lote alimentado como el aquí planteado, donde al retener biomasa de un ciclo a otro, se induce un efecto de alta densidad celular. Si bien su implementación es relativamente más compleja que la de un sistema por lote, el proceso por lote alimentado propuesto resulta una opción recomendable: es más productivo (0.46 g/(L.h)), asegura el consumo total de sustrato y reporta el beneficio adicional de limitar los periodos lag a las etapas de arranque por lote de cada campaña.

**Validación de identidad y viabilidad del producto.** Los resultados de validación de identidad molecular del producto fermentado por la técnica de PCR se muestran en la Fig. 6. En los primeros 3 pozos de la placa electroforética, se observan bandas de 132 pares de bases que pertenecen al *L. casei* var. *rhamnosus* (Liolactil® Ivax® Francia), utilizado

Tabla 2. Comparación de resultados obtenidos en sistemas de cultivo por lote y por lote alimentado.

| Indicador  | Este reporte                    |  | Otros reportes                  |                                 |
|--|---------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|
|  | Cultivo por lote <sup>(1)</sup> | Cultivo por lote alimentado <sup>(2)</sup> | Cultivo por lote <sup>(3)</sup> | Cultivo por lote <sup>(4)</sup> |
| <b>Tiempo de residencia (hr)</b>                                       | 15                              | Ciclos de 6 hr                             | 14                              | 45                              |
| <b>Productividad promedio (g biomasa/(L.hr))</b>                       | 0.21<br>+/-0.02                 | 0.46<br>+/- 0.01                           | 0.42                            | 0.067                           |
| <b>Producción de biomasa [X]<sub>final</sub>-[X]<sub>o</sub> (g/L)</b> | 3.25<br>+/- 0.3                 | 3.5<br>+/- 0.2                             | 6.0                             | 2.5                             |
| <b>Substrato consumido (g/L)</b>                                       | 28.36<br>+/- 1.7                | 33.0                                       | 45                              | 10.0                            |
| <b>Rendimiento Y<sub>x/s</sub> (g biomasa/g substrato)</b>             | 0.0990<br>+/- 0.021             | 0.1060<br>+/-0.01                          | 0.13                            | 0.16                            |
| <b>Cuenta viable<sup>(5)</sup> (UFC/g)</b>                             | 5.17X10 <sup>9</sup>            | 2.43X10 <sup>10</sup>                      | ND                              | ND                              |

(1) Valores correspondientes al promedio de tres experimentos por lote.

(2) Valores correspondientes a dos ciclos de lote alimentado equivalentes.

(3) Valores calculados con base al reporte de Altiok *et al.*, (2006) en suero suplementado (10 g/L de extracto de levadura).

(4) Valores calculados con base al reporte de Mondragón-Parada y Nájera-Martínez (2006) en suero suplementado (2.5 g/L de extracto de levadura).

(5) Valores estimados a partir de muestras consolidadas del producto final liofilizado de los experimentos por lote y lote alimentado (dos repeticiones de cada uno).

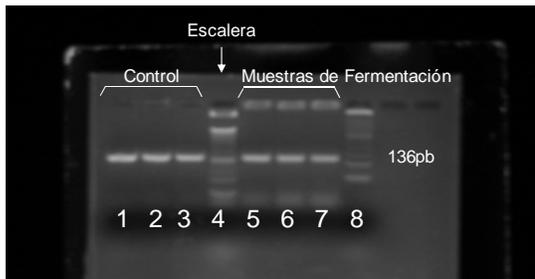


Fig. 6. Validación molecular de la identidad del producto liofilizado por la técnica de PCR. En los carriles 1, 2 y 3 del gel electroforético se presentan las bandas del producto de PCR del control positivo (*L. casei* var *Rhamnosus* comercial Liolactil® de IVAX®, Francia). Los carriles 5, 6 y 7 presentan el producto de PCR de biomasa liofilizada obtenida por cultivo por lote. Los carriles 4 y 8 presentan escaleras que indican la longitud aproximada de las bandas (132 pb).

como control positivo. En los carriles 5, 6 y 7 se observan 3 bandas de igual número de pares de bases, correspondientes al producto de la fermentación (*L. casei*). En cuanto a la viabilidad del producto, el resultado del análisis realizado a las muestras liofilizadas obtenidas a partir de los diferentes sistemas de cultivo implementados se muestra en la tabla 2. Para el cultivo por lote, la estimación correspondiente fue de  $5.17 \times 10^9$  UFC/g y para el proceso por lote alimentado de  $2.43 \times 10^{10}$  UFC/g. Según la definición aceptada de un producto probiótico, este deberá poseer una viabilidad mínima

de  $1.0 \times 10^8$  UFC/g. En consecuencia, los productos de fermentación obtenidos, después de estabilizarse por liofilización, exceden este criterio, independientemente de la estrategia de cultivo seleccionada. Interesantemente, si el destino comercial del material liofilizado evaluado fuese la producción de cápsulas de polvo probiótico (análogo del producto comercial Liolactil® de Ivax, Francia; título mínimo de *L. casei rhamnosus* de  $8.0 \times 10^8$  UFC/g), el producto desarrollado en cultivo por lote alimentado tendría un poder probiótico 30X. Un gramo de este producto podría utilizarse para generar 30 cápsulas equivalentes del producto comercial o 243 cápsulas con el mínimo valor aceptable para un producto probiótico ( $10^7$  microorganismos/g). El valor de venta al público del producto comercial Liolactil® es de aproximadamente \$1.0 dls/cápsula de 250 mg. Normalizando por el poder probiótico y considerando los resultados de rendimiento y concentración final del proceso por lote alimentado aquí descrito, el producto liofilizado impartiría un valor comercial de aproximadamente \$420,000 dls/m<sup>3</sup> de SLC, de valor comercial original prácticamente nulo.

## Conclusiones

El SLC es un subproducto de muy bajo valor económico, concebido en general en México como un desecho industrial (inclusive con un alto potencial de impacto ambiental negativo). Los resultados presentados documentan la factibilidad

técnica de producción de dos de posibles productos de alto valor agregado a partir de SLC: (a) proteína liofilizada de alta solubilidad y (b) biomasa probiótica de *L. casei* liofilizada. El proceso global propuesto es muy simple y muy robusto. En general, no requiere materias primas adicionales al SLC, lo que le confiere un atractivo en costos operativos muy destacable. A partir de suero de leche de cabra descremado, por ultrafiltración, se recupera como retenido una fracción rica en proteína (relación proteína/carbohidratos=7:1) y como permeado, una fracción rica en lactosa. La proteína liofilizada producida a partir del retenido presenta un comportamiento de disolución-dispersión superior a un producto comercial análogo. Adicionalmente, el SLC desproteinizado por ultrafiltración es un sustrato adecuado (sin necesidad de suplementación con fuentes adicionales de carbono o nitrógeno) para obtener concentraciones en el orden de 3 a 4 g/L de biomasa probiótica de *L. casei*. Una vez liofilizada, esta biomasa tiene una viabilidad en el orden de  $10^{10}$  UFC/g de biomasa. El proceso de fermentación propuesto es sumamente simple, requiriendo exclusivamente control de temperatura ( $T=37^{\circ}\text{C}$ ) y pH (5.5). Dado que el producto principal del metabolismo de *L. casei*, el ácido láctico, inhibe el desarrollo de biomasa, la estrategia de cultivo por lote alimentado se recomienda como la que preferentemente debe utilizarse (productividad de 0.46 g/(L.h)).

### Nomenclatura

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| $d[X]/dt$                     | derivada de la concentración de biomasa con respecto al tiempo ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) |
| $r_x$                         | velocidad de producción de biomasa ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )                             |
| SLC                           | suero de leche de cabra  |
| [S]                           | concentración de sustrato (g/L)  |
| [S] <sub>0</sub>              | concentración de sustrato inicial (g/L)  |
| t                             | tiempo (h)   |
| UFC                           | unidades formadoras de colonias  |
| V                             | volumen efectivo del reactor (L)   |
| [X]                           | concentración de biomasa celular (g/L)   |
| [X] <sub>0</sub>              | concentración de biomasa celular inicial (g/L)   |
| $Y_{x/s}$                     | rendimiento celular (g biomasa/g sustrato)   |
| $\alpha, \beta, \chi, \gamma$ | coeficientes de polinomios de ajuste   |
| $\mu$                         | velocidad específica de crecimiento ( $\text{h}^{-1}$ )  |

### Agradecimientos

Agradecemos a la empresa Caprico® por suministrar el suero de leche utilizado en los experimentos aquí reportados. Agradecemos el financiamiento provisto por el Tecnológico de Monterrey, a través del fondo de Investigación CAT122.

### Referencias

- Alvarez, M.M. y Aguirre-Ezkauriatza, J.E. (2008). Proceso de alto rendimiento para la producción de biomasa probiótica de bacterias lácticas a partir de suero de leche no suplementado. Patente mexicana en trámite. MX/a/2008/016564.
- Aguirre-Ezkauriatza, J.E. (2008). Producción de proteína liofilizada y biomasa de *Lactobacillus casei* BPG4 liofilizada, a partir de suero de leche de cabra. Tesis de Maestría. Tecnológico de Monterrey, México.
- Altiok, D., Tokatli, F. y Harsa, S. (2006). Kinetic modeling of lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81,1190-1197.
- Brink, M. y Todorov, S.D. (2006). The effect of probiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. *Journal of Applied Microbiology* 100(4), 813-820.
- De Man, J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Microbiology* 23(1),130-135.
- Fairbrother, P., George, W.O. y Williams, J.M. (1991). Whey fermentation: on-line analysis of lactose and lactic acid by FTIR spectroscopy. *Applied Microbiology & Biotechnology* 35,301-305.
- Gaon, D. y Doweck, Y. (1995). Lactose digestion by milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human origin. *Medicina (B Aires)* 55(3),237-42.
- Ha, M.Y. y Kim, S.W. (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.
- Haarman, M. y Knol, J.(2006). Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied Environmental Microbiology* 72(4), 2359-2365.
- Hayakawa, K., Harada, K., Takeuchi, S., Shibata, S. y Miyagi, A. (2000). "Method for controlling culture of lactic bacteria." US Patent 6054262. Issued April 25, 2000.
- Ingrassia, I. y Leplingard, A. (2005). *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Applied Environmental Microbiology* 71(6), 2880-2887.
- Isolauri, E. (1991). A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp. strain GG) promotes

- recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 88(1), 90-97.
- Isolauri, E. y Kaila, M. (1993). Diet during rotavirus enteritis affects jejunal permeability to macromolecules in suckling rats. *Pediatric Research* 33(6), 548-553.
- Liong, M.T. y Shah, N.P. (2006). Effects of a *Lactobacillus casei* synbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acids in rats. *Journal of Dairy Science* 89(5), 1390-1399.
- Mondragón-Parada, M.E. y Nájera-Martínez, M. (2006). Lactic acid bacteria production from whey. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 134(3), 223-32.
- Nemeth, E. y Fajdiga, S. (2006). Inhibition of *Salmonella*-induced IL-8 synthesis and expression of Hsp70 in enterocyte-like Caco-2 cells after exposure to non-starter lactobacilli. *International Journal of Food Microbiology* 112(3), 266-274.
- Nerlich, B. y Koteyko, N. (2008). Balancing food risks and food benefits: the coverage of probiotics in the UK national press. *Sociological Research Online* 13(3).
- Ortiz-Andrellucchi, A. y Sánchez-Villegas, A. (2008). Immunomodulatory effects of the intake of fermented milk with *Lactobacillus casei* DN114001 in lactating mothers and their children. *British Journal of Nutrition* 1,1-12.
- Pham, M., Lemberg, D.A. y Day, A.S. (2008). Probiotics: sorting the evidence from the myths. *Medical Journal of Australia* 188(5), 304-308.
- Parassol, N. y Freitas, M. (2005). *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli* infected T84 cells. *Research in Microbiology* 156(2), 256-62.
- Park, Y.H. y Kim, J.G. (2008). Effects of *Lactobacillus acidophilus* 43121 and a mixture of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* on the serum cholesterol level and fecal sterol excretion in hypercholesterolemia-induced pigs. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72(2), 595-600.
- Soto-Cruz, O. y Páez-Lerma, J. (2005). Balances en procesos de fermentación: análisis de consistencia y de flujos metabólicos (Fermentation process balances: consistency and metabolic flux analysis). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 4, 59-74.
- Srinivasan, R. y Meyer, R. (2006). Clinical safety of *Lactobacillus casei* strain *shirota* as a probiotic in critically ill children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 42(2), 171-173.
- Rosmini, M.R., Sequeira, G. J., Guerrero-Legarreta, I., Martí, L. E., Dalla-Santina, R., Frizzo, L. y Bonazza J.C. (2004). Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena (Probiotic production for meat animals: importance of using indigenous intestinal microbiota). *Revista mexicana de ingeniería química* 3, 181-191.
- Youssef, C.B. y Goma, G. (2005). Kinetic modeling of *Lactobacillus casei* ssp. *rhannosus* growth and lactic acid production in batch cultures under various medium conditions. *Biotechnology Letters* 27(22), 1785-1789.
- Yuki, N., Watanabe, K., Mike, A., Tagami, Y., Tanaka, R., Ohwaki, M. y Morotomi, M. (1999). Survival of a probiotic, *Lactobaillus casei* strain *Shirota* in the gastrointestinal tract: selective isolation from feces and identification using monoclonal antibodies. *International Journal of Food Microbiology* 48(1), 51-57.