

Subproductos de valor agregado a partir del tratamiento de suero de leche mediante un esquema de biorefinería

Sebastián-Nicolás J.L.^{a*}, Ayala-Niño A.^b, Pérez-Escalante E.^b, García-Mora C.^b, González-Olivares L.G.^b
Jaímez-Ordaz J.^b

a* Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México

b Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carr. Pachuca-Tulancingo km. 4.5, Pachuca, Hgo., C.P. 42067, México

* nlizqa@gmail.com

RESUMEN:

Durante la fabricación de quesos se generan grandes volúmenes de suero lácteo donde en lugares con insuficiente tecnología es considerado un residuo por la gran cantidad generada y que no es recuperada para ningún fin. Este residuo al contener una alta carga orgánica lo hace un contaminante potencial para suelos y cuerpos de agua. El suero lácteo al ser arrojado al medio ambiente sin ningún tratamiento ejerce demanda química de oxígeno (DQO) y demanda biológica de oxígeno (DBO), desaprovechando cada uno de sus compuestos con valor agregado. En el suero lácteo se pueden encontrar proteínas, carbohidratos y minerales, cuya importancia radica en las actividades biológicas y productos que se pueden obtener a partir de este sustrato. Es por ello que el objetivo de este trabajo es obtener lactoferrina (Lf) a partir de suero dulce mediante un proceso de cromatografía por afinidad con Cu²⁺-imidazol. El residuo que se obtiene de esta separación se fermentó con *Lactobacillus casei* Shirota para la obtención de ácido láctico y proteínas hidrolizadas. El residuo final, después de haber separado el ácido láctico y las proteínas hidrolizadas del caldo de fermentación, será caracterizado fisicoquímicamente y con ayuda de un software biodigestor Pro se evaluará como posible biofertilizante líquido..

ABSTRACT:

Process of cheeses derives large volumes of whey, and it is generated in places without technology or resources for its treatment. Whey is considered a waste due to amount generated during cheese processing and that is not recovered for any purpose. This waste, due its organic charge, makes it a potential contaminant for soils and water. When the whey is thrown into the environment without any treatment, exerts both effects: chemical and biological oxygen demand (COD and BOD, respectively). Whey organic and inorganic compounds (proteins, carbohydrates and minerals, mainly) have added value and they are not use for any proposal. Compounds have importance in biological activities and other way they could be used as a material to another industries. That is why the aim of this work is to separate lactoferrin (Lf) from sweet whey through an affinity chromatography process with Cu²⁺-imidazole. The residue obtained from this separation was fermented with *Lactobacillus casei* Shirota to obtain lactic acid and hydrolysed proteins. A perspective to the final residue, after having separated the lactic acid and hydrolysed proteins from the fermentation broth, will be characterized it physicochemically and make an evaluation as a possible liquid biofertilizer with the help of a biodigester Pro software..

Palabras clave:

Proteínas de suero lácteo, Lactoferrina, ácido láctico y péptidos bioactivos.

KeyWords: Whey proteins, Lactoferrin, lactic acid and bioactive peptides

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

El suero lácteo representa el 85-90% de la leche que entra a producción para la elaboración de queso. Este subproducto tiene una composición rica en nutrientes como proteínas (6-10 gL⁻¹), lactosa (46-52 gL⁻¹), grasa (5 gL⁻¹), minerales (5-8 gL⁻¹), fosfatos (1-3 gL⁻¹), calcio (0.4-0.6 gL⁻¹) y lactato (2 gL⁻¹) (Jelen *et al.*, 2003; Kosseva *et al.*, 2009). Es por ello que actualmente, el suero lácteo se ha considerado una problemática ambiental debido al mal manejo antes de ser vertido al medio ambiente, lo cual ocasiona el abatimiento de oxígeno en los cuerpos de agua. La demanda biológica de oxígeno (DBO₅) y la demanda química de oxígeno (DQO) que ejerce el suero lácteo en el medio ambiente, oscila entre 27-60 kg/m³ y 50-102 kg/m³ respectivamente. Del mismo modo dicho problema se atribuye a la presencia de sales minerales como NaCl, KCl y Ca₂PO₄ (Prazeres *et al.*, 2012).

El aprovechamiento de los nutrientes del suero lácteo permite que se le de un valor agregado recuperando los compuestos presentes en él, y que sean útiles para diferentes industrias como la alimentaria, farmacéutica y biotecnológica (Mollea *et al.*, 2013). Dentro de los nutrientes del suero, se destacan las proteínas cuyo valor reside en las propiedades biológicas que poseen (Korhonen *et al.*, 2013) por ejemplo la lactoferrina. Esta, es una proteína presente en el suero lácteo que tiene un peso molecular de 80 kDa y pertenece al grupo de las transferrinas, contiene iones Fe³⁺ y su actividad biológica como anticancerígeno y antimicrobiano ha sido estudiada (Berlutti *et al.*, 2011; Embleton *et al.*, 2013). Por otro lado, debido a la disponibilidad de la lactosa y a la concentración de proteínas del suero lácteo, el suero de leche se ha empleado como matriz idónea para el crecimiento de bacterias ácido lácticas. Durante el proceso de fermentación se obtiene ácido láctico y proteínas hidrolizadas. Sin embargo, solo un cierto volumen es empleado para estos fines (Yao *et al.*, 2013; Yadav *et al.*, 2015).

Actualmente, para el aprovechamiento de los residuos con alta carga orgánica se han implementado procesos que involucran técnicas químicas, físicas y biológicas, estos procesos reciben el nombre de biorefinerías (Ergüder *et al.*, 2001; Bastidas-Oyanedel *et al.*, 2016). Este tipo de procesos dependen en gran parte de los compuestos que se desean recuperar del residuo (Hudman, 2016)

Es por ello, que el objetivo de este trabajo fue obtener productos de valor comercial a partir del suero lácteo, para darle un valor agregado a este residuo bajo un esquema de biorefinería. Bajo este esquema, se obtiene lactoferrina mediante el uso de una columna cromatográfica por afinidad funcionalizada Cu²⁺ e imidazol, posteriormente el residuo obtenido de esta separación es empleado para la obtención de ácido láctico y proteínas hidrolizadas mediante una fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de suero lácteo

El suero lácteo empleado en esta investigación se obtuvo de la elaboración de queso por vía enzimática. Se filtró y se pasteurizó a 90 °C por 10 minutos y se congeló hasta su análisis.

Preparación de la columna cromatográfica de afinidad Cu²⁺-imidazol

Para la obtención de la columna cromatográfica, se utilizó una matriz de poliacrilamida al 6%T, una vez polimerizado fue secado a 60°C, se pulverizó y se tamizó en una malla de 250 µm. Se pesaron 4.5g del polímero tamizado y se adicionaron 100 mL de agua desionizada. Finalmente se colocó en la columna de vidrio la cual fue activada según Carvalho *et al.* (2014)

Separación de lactoferrina

Para la separación de lactoferrina se hizo pasar por la columna cromatográfica previamente funcionalizada, 200 mL de suero lácteo recolectándose el residuo sin lactoferrina (R1). Posteriormente, se eluyó la proteína retenida con 100 mL de buffer imidazol 100 mM en 20 mM Tris y 0.2M NaCl.

Preparación del cultivo de *Lactobacillus casei* Shirota

En este estudio se utilizó la cepa de *Lactobacillus casei* Shirota la cual fue obtenida del aislamiento de una leche comercial y que pertenece al cepario del Laboratorio de Biotecnología Alimentaria de la UAM-Iztapalapa. La cepa

fue propagada en caldo MRS previamente esterilizado y se incubó a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se realizó una tinción de Gram para la identificación de la cepa. La cepa se almacenó, con glicerol, en congelación. Se realizó un conteo UFC para poder inocular los matraces de fermentación en una concentración aproximada de 1×10^7 UFC de la cepa.

Fermentación

El sistema de fermentación se preparó con 180 mL del residuo recolectado de la separación de lactoferrina. Se colocó en matraces Erlenmeyer con tapa de rosca previamente estériles y se pasteurizó a 90 °C por 10 minutos. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se inoculó con 1×10^7 UFC de *Lactobacillus casei* Shirota. La fermentación se llevó a cabo a 37 °C y se tomaron muestras cada 3 horas para la determinación de pH, cuenta viable UFC, hidrólisis proteica por el método de TNBS y electroforesis SDS-PAGE-Tris-HCl. Para determinar la fase de desaceleración, se realizó un estudio gráfico por medio de la técnica de Talmage y Fitch modificada según González-Olivares, 2014. Se realizaron los cálculos de los parámetros cinéticos usando las siguientes fórmulas (Stanier, 1996)

$$\text{Ec. 1} \quad N - Ln N_0 = \mu (t-t_0)$$

Donde:

μ = Constante específica de velocidad de crecimiento

N= Crecimiento exponencial del microorganismo

t= Tiempo

$$\text{Ec. 2} \quad g = 0.693/\mu$$

Donde:

g= tiempo que tarda en duplicarse una generación

$$\text{Ec. 3} \quad k = 1/g$$

Donde:

k= velocidad de crecimiento

Determinación de actividad proteolítica por el método del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS)

Se realizó una curva patrón de Glicina 3mM. Se realizaron diferentes diluciones (0.05, 0.1, 0.15, 0.20 y 0.25mg/mL). Se colocaron en tubos de ensayo forrados con aluminio, 1mL de una solución amortiguadora de fosfatos 0.2125 M a pH 8.2. Se agregaron 125 μ L de una muestra a cada tubo y 125 μ L de agua desionizada para el blanco. A cada tubo se agregaron 0.5 mL de la solución de TNBS al 0.10%. Los tubos que contenían la reacción se incubaron durante 1 hora a una temperatura de 50°C, para detener la reacción se adicionó a cada tubo 4 mL de HCl 0.1N. Se leyó espectrofotométricamente a 340 nm.

Determinación de fracciones proteicas mediante electroforesis (SDS-PAGE-Tris-HCl)

La electroforesis se llevó a cabo según Laemmli, 1970 con algunas modificaciones. Los geles se prepararon con una solución de acrilamida/bis-acrilamida 37.5:1% de Bio-Rad con una T=12.5%. Los geles se tiñeron en azul de Comassie 250 de Bio-Rad y se realizó un análisis de imagen en el equipo Gel Doc con el software Image Lab versión 5.2 build 14 Bio-Rad

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante la cromatografía por afinidad con Cu^{2+} -imidazol se logró la separación de lactoferrina (Lf) del suero lácteo (Fig. 1). Sin embargo, la interferencia de proteínas presentes en el suero generan interacción con la columna,

y esto se debe a que el grupo imidazol se intercambia por las histidinas expuestas de las proteínas (Carvalho *et al.* 2014).

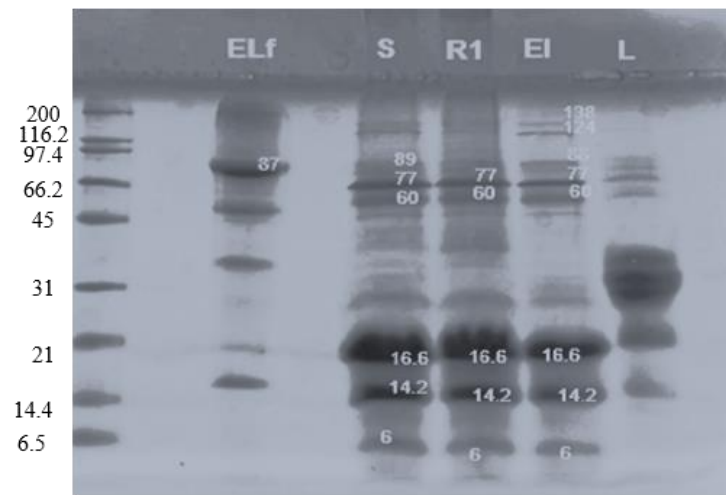


Figura 1. Gel de electroforesis al 12.5% T; E: estándar de proteínas de amplio rango, Elf: estándar de lactoferrina, S: suero, R1: residuo sin Lactoferrina, El: Eluato de a columna y L: leche 0.5%

En los resultados obtenidos de la cinética microbiana se puede observar (Fig. 2), que se alcanzó la fase estacionaria al tiempo 11.6 horas de acuerdo a los análisis de Talmage y Fitch realizados. Además, el pH disminuyó de manera constante hasta alcanzar un pH de 3.5, esto debido a la generación de ácido láctico por *Lactobacillus casei* Shirota. La estabilización del pH está relacionada con la fase estacionaria determinada. Esto ha sido estudiado por Turner *et al.*, 2017 donde se ha observado también que la fase lag es dependiente de la calidad del inóculo y de su pre-adaptación (Hofvendahl *et al.*, 2000).

$$\mu = 0.1034 \text{ h}^{-1} \quad g = 6.70 \text{ h}^{-1} \quad k = 0.1492 \text{ generaciones h}^{-1}$$

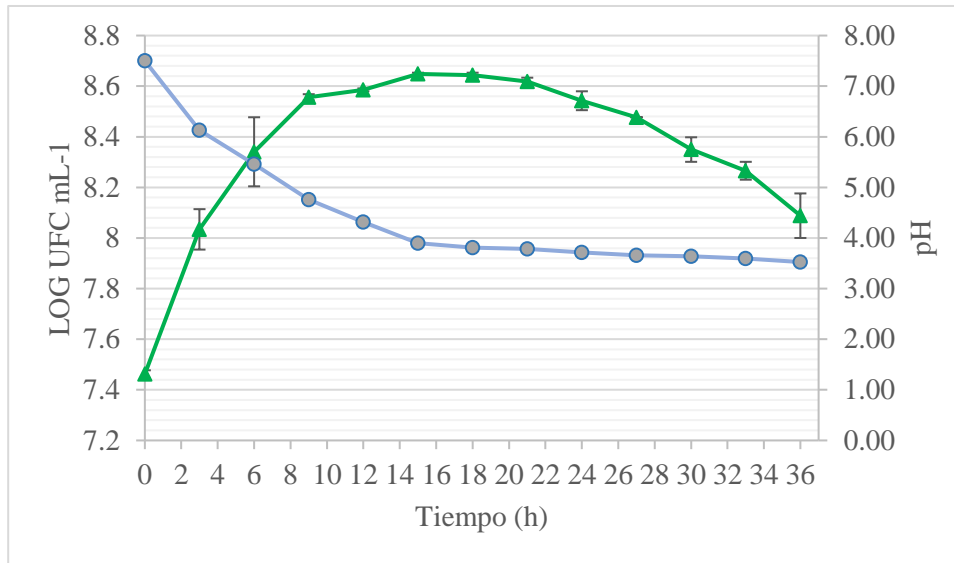


Figura 2. Cinética microbiana de *Lactobacillus casei* Shirota durante la fermentación láctica y seguimiento de pH

Utilizar cepas adaptadas y frescas, mejoran un proceso en continuo como es la biorefinería, mejorando la eficiencia de obtención de productos a partir del sustrato inicial. Sin embargo, como se puede observar la cantidad de biomasa generada en este proceso fermentativo fue de una unidad logarítmica. Esto marca una desventaja cuando la biomasa es un producto de interés, como es el caso en este estudio. Los resultados de concentración de biomasa son menores comparado con otros estudios donde se realiza una fermentación con suero lácteo enriquecido con fuente de nitrógeno externa (Nath *et al.*, 2016; Masotti *et al.*, 2017).

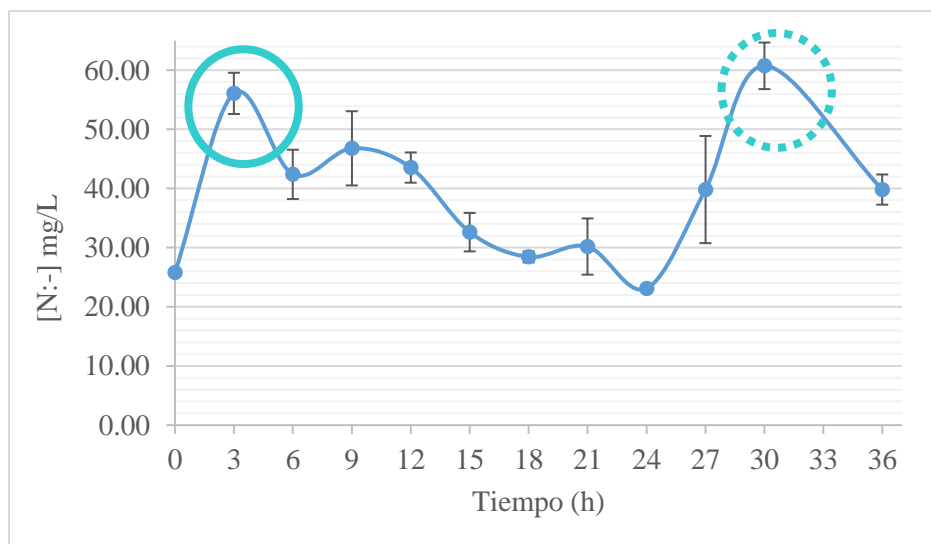


Figura 3. Determinación de [N:-] en la fermentación láctica con *Lactobacillus casei* Shirota

Durante la fermentación láctica la generación de grupos aminos libres se observa en las primeras tres horas (Fig. 3), esto se debe al sistema proteolítico de *Lactobacillus casei* Shirota (Panesar *et al.*, 2007). Se ha observado que las diferencias entre los sistemas proteolíticos de bacterias lácticas, se deben principalmente a la proteólisis inicial

(Chang et al., 2014). En la etapa inicial del proceso de fermentación las proteínas presentes en el residuo sirven como fuente de nitrógeno esencial para su desarrollo en el medio (Gao et al., 2011). Por otro lado, el aumento de grupos amino libres que se observa en las últimas horas de la fermentación puede deberse principalmente a la biomasa viable que aún sigue transformando la lactosa a ácido láctico antes de entrar en fase de muerte (Prazeres et al., 2012; Ramos et al., 2015; Abdel-Rahman et al., 2013)

Adicionalmente se observa en la Fig. 4 la baja concentración de las proteínas presentes en el residuo durante la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota por lo que puede existir la presencia de fracciones peptídicas de bajo peso molecular. Estas fracciones son de gran relevancia, ya que la actividad biológica derivada de péptidos liberados de proteínas de suero hidrolizadas, como lo es la antihipertensiva, está relacionada con el peso molecular de los péptidos además de su estructura primaria (Aimutis, 2004)

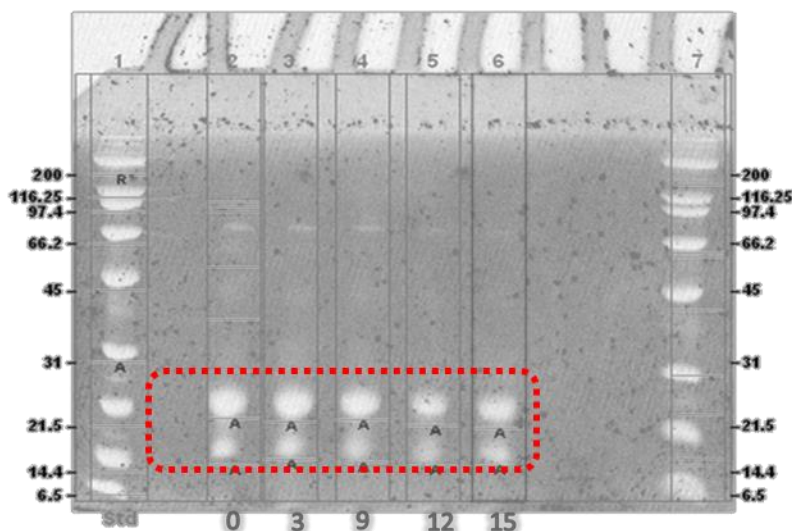


Figura 4. Gel de electroforesis al 12.5% T; Estándar de amplio rango (1 y 7), muestra de fermentación 0 horas (MF0) (2), MF3 (3), MF9 (4), MF12 (5), MF15 (6).

Los procesos de biorefinería tienen consigo la recuperación de productos con valor comercial de residuos agroindustriales. De esta manera, se reduce la contaminación que estos emiten al no tener un tratamiento idóneo. Es por ello, que en la actualidad las biorefinerías representan un avance en el tratamiento y manejo de los residuos.

CONCLUSIÓN

La separación de lactoferrina del suero lácteo permite que el residuo recuperado sea un sustrato apto para el crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota, donde no se observa que exista un efecto negativo en su crecimiento en el medio de fermentación.

Durante la fermentación con *Lactobacillus casei* Shirota se obtienen proteínas hidrolizadas cuyo valor e impacto radica en la generación de péptidos con actividad biológica, por otro lado la presencia de ácido láctico en el medio no afecta la producción de péptidos ni de biomasa por lo que, la recuperación de estos productos se puede lograr con el uso de tecnologías con membranas.

Perspectiva

El residuo final puede ser utilizado como biofertilizante para la recuperación de suelos agrícolas (Ergüder et al., 2001; Rico et al., 2015)

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology advances*, 31(6), 877-902.
- Aimutis, W. R. (2004). Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticancerogenesis. *Journal of Nutrition*, (134), S989-s995
- Bastidas-Oyanedel, J. R., Fang, C., Almardeai, S., Javid, U., Yousuf, A., & Schmidt, J. E. (2016). Waste biorefinery in arid/semi-arid regions. *Bioresource technology*, 215, 21-28.
- Berlutti, F., Pantanella, F., Natalizi, T., Frioni, A., Paesano, R., Polimeni, A., & Valenti, P. (2011). Antiviral properties of lactoferrin—a natural immunity molecule. *Molecules*, 16(8), 6992-7018.
- Carvalho, B. M. A., Carvalho, L. M., Silva Jr, W. F., Minim, L. A., Soares, A. M., Carvalho, G. G. P., & Da Silva, S. L. (2014). Direct capture of lactoferrin from cheese whey on supermacroporous column of polyacrylamide cryogel with copper ions. *Food chemistry*, 154, 308-314.
- Chang, O. K., roux, E., Awussi, A.A., Miclo, L., Jullin., Dary, A., Humbert, G. y Perrin, C. (2014). Use of a free form of the *Streptococcus thermophilus* cell envelope protease PrtS as a tool to produce bioactive peptides. *International Dairy Journal*, (38), 104-115
- Embleton, N. D., Berrington, J. E., McGuire, W., Stewart, C. J., & Cummings, S. P. (2013). Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 18(3);143-149
- Ergüder, T. H., Tezel, U., Güven, E., & Demirer, G. N. (2001). Anaerobic biotransformation and methane generation potential of cheese whey in batch and UASB reactors. *Waste management*, 21(7), 643-650.
- Gao, C., Ma, C., & Xu, P. (2011). Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology advances*, 29(6), 930-939.
- González-Olivares, L. G., Añorve-Morga, J., Castañeda-Ovando, A., Contreras-López, E., & Jaimez-Ordaz, J. (2014). Peptide separation of commercial fermented milk during refrigerated storage. *Food Science and Technology*, 34(4), 674-679.
- Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. *Enzyme and microbial technology*, 26(2-4), 87-107.
- Hudman, P. (2016). Energy from waste: Valorising the biorefinery concept. *Renewable Energy Focus*, 17(4), 150-152.
- Jelen, P., Roginski, H., Fuquay, J., Fox, P. (2003). Whey processing: utilization and products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2739–2745.
- Korhonen, H., Marnila, P. (2013). Milk bioactive proteins and peptides. *Milk and Dairy Products in Human Nutrition: Production, Composition and Health*. 148-171
- Kosseva, M. R., Panesar, P. S., Kaur, G., Kennedy, J. F. (2009). Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45:437–447
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknytė, M., & De Noni, I. (2017). Technological tools to include whey proteins in cheese: Current status and perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 102-114.
- Mollea, C., Marmo, L., Bosco, F. (2013). Valorisation of Cheese Whey, a By-product from the Dairy Industry, Food Industry. In: *Muzzalupo, Dr Innocenzo*.

- Nath, A., Verasztó, B., Basak, S., Koris, A., Kovács, Z., & Vatai, G. (2016). Synthesis of lactose-derived nutraceuticals from dairy waste whey—a review. *Food and bioprocess technology*, 9(1), 16-48.
- Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food chemistry*, 105(1), 1-14.
- Patel, S. R., & Murthy, Z. P. (2011). Waste valorization: Recovery of lactose from partially deproteinated whey by using acetone as anti-solvent. *Dairy science & technology*, 91(1), 53-63.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal Environmental Management*; 110: 48-68
- Ramos, O. L., Pereira, R.N, Rodrigues, R. M. M., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Malcata, F. X. (2015). Whey and Whey Powders: Production and Uses. In Benjamin Caballero, Paul M. Finglas and Fidel Toldrá, *The Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier. 498-505
- Rico, C., Muñoz, N., & Rico, J. L. (2015). Anaerobic co-digestion of cheese whey and the screened liquid fraction of dairy manure in a single continuously stirred tank reactor process: Limits in co-substrate ratios and organic loading rate. *Bioresource technology*, 189, 327-333.
- Stanier, R. Y. (1996). *Microbiología*. Reverté.
- Turner, T. L., Kim, E., Hwang, C., Zhang, G. C., Liu, J. J., & Jin, Y. S. (2017). Conversion of lactose and whey into lactic acid by engineered yeast. *Journal of dairy science*, 100(1), 124-128.
- Yadav, J. S. S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese Whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology advances*, 33(6), 756-774.
- Yao, X., Bunt, C., Cornish, J., Quek, S. Y., & Wen, J. (2013). Oral delivery of lactoferrin: a review. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 19(2), 125-134.