

FERMENTACION LACTICA EN CONTÍNUO A PARTIR DE SUERO DULCE DE LECHE DESPROTEINIZADO. ¹

CONTINUOUS LACTIC FERMENTATION OF DEPROTEINIZED SWEET WHEY

Trujillo M², Suarez F, Gallego D³.

RESUMEN

El suero de leche es un gran contaminante de aguas debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO), principalmente causada por la lactosa (azúcar de la leche); en este trabajo se estudia la posibilidad de convertir el lactosuero en un producto útil de gran valor agregado. Para este subproducto han sido desarrollados muchos métodos de aprovechamiento; entre los más importantes se encuentra su deshidratación, producción de refrescos y conversión de su azúcar a ácidos orgánicos. El ácido láctico es un valioso producto en la industria de alimentos y también es materia prima en la industria química, lo mismo que sus sales, como el lactato de sodio, calcio, hierro y antimonio principalmente. Con el objeto de determinar la mejor velocidad de dilución (D), para obtener la máxima producción de ácido láctico posible, se efectúan 8 fermentaciones desde $D=0,102 \text{ h}^{-1}$ hasta que la producción de ácido es cero ($D=3,0 \text{ h}^{-1}$). Se fijaron condiciones de trabajo de: $45 \pm 0,1^\circ\text{C}$, $5,6 \pm 0,2$ de pH y una concentración celular de $30 \pm 4,0 \text{ g/l}$. Se utilizó *Lactobacillus bulgaricus* y como sustrato se preparó una solución de suero dulce de leche desproteínizado. La producción como ácido láctico y lactato de sodio, en solución, está entre 24,37 y 0,51g/l. La estabilidad en la producción se alcanza en promedio a los 2 tiempos de retención. La mayor productividad se encuentra en $D=0,2 \text{ h}^{-1}$ (2,51g/lh), donde sólo se consume el 29,98% de la lactosa del alimento. El mayor consumo de lactosa se presenta en $D=0,102\text{h}^{-1}$ (53,37%) donde la productividad es similar a la máxima (2,486 g/lh) pero la concentración de ácido (26,592 g/l) es mucho mayor que la correspondiente a la velocidad de dilución $D=0,2 \text{ h}^{-1}$ que es de 14,752 g/l.

Palabras claves: Ácido láctico, lactosuero, *Lactobacillus bulgaricus*, Lactosa, Proteínas del suero.

SUMMARY

Whey is a major water contaminant due to its high biochemical oxygen demand (BOD), stemming mainly from its lactose (milk sugar) content. The objective of this research was to investigate the conversion of whey into useful, value-added products. Several methods have been developed already, the most important being dehydration, production of drinks, and conversion of the sugar component into organic acids. Lactic acid including its sodium, calcium, iron and antimony salts, is a valuable product in the alimentary industry and is also a raw material in the chemical industry. To maximize lactic acid production we determined the optimal dilution rate (D) carrying out eight fermentations, with $D = 0.102 \text{ h}^{-1}$, until the acid production was nil ($D = 3.0 \text{ h}^{-1}$). Working conditions were $45 \pm 0.1^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5.6 \pm 0.2$, and a cell concentration of $30 \pm 4.0 \text{ g/L}$, using *Lactobacillus bulgaricus*, and deproteinized sweet whey as a substrate. Production of lactic acid and sodium lactate was between 0.5 and 24.37 g/L. Stability of production was reached in average after two retention times. Highest productivity was at $D=$

¹ Trabajo declarado ganador al premio "Mejor Trabajo Dirigido de Grado, 1996" con el título "Fermentación láctica en continuo a partir del suero de la leche" por el Consejo profesional de Ingeniería Química, agosto de 1997.

² Ing. Q. Dirección postal: Carrera 80 C No. 31 - 31, Medellín, Colombia. email: maurotru@hotmail.com o Apto postal 510-3 cuernavaca 62250, Morelos, Mexico.

³ Ing. Q. Profesor Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Dirección: Cra. 64 Calle. 65. djgalle@perseus.unalmed.edu.co

0.2 h^{-1} (2.5 g/Lh), where only 30% of the lactose was consumed from the substrate. Highest lactose consumption was found at $D= 0.102 \text{ h}^{-1}$ (53.4%), where productivity was nearly maximal (2.49 g/Lh), but acid concentration (26.6%) was considerably higher than at the corresponding dilution rate $D= 0.2 \text{ h}^{-1}$, which was 14.75 g/L .

Keywords: Lactic acid, sweet whey, *Lactobacillus bulgaricus*, permeate whey, lactose, whey proteins

INTRODUCCION.

Los orígenes de la producción de ácido láctico fueron iniciados en procesos Batch y con cultivos lácticos mezclados e impuros obteniéndose a bajas productividades (Rotgers, et al 1931). La investigación en años recientes ha producido numerosos estudios en la conversión de azúcares a ácido láctico con cultivos puros y mejorados de bacterias y han alcanzado altos valores de productividad que han mostrado este proceso rentable (Cheryan, Mehaia 1995). Con el uso de fermentadores continuos, algunos procesos se desarrollaron para alcanzar la mejor productividad volumétrica. Una posibilidad grande es el uso de un reactor con reciclo externo de microorganismo para mantener la concentración celular del reactor constante (Cheryan, Mehaia 1986).

GENERALIDADES.

El ácido láctico fue encontrado en 1780 por Scheele en la leche agria y por eso recibió el nombre que lleva. Durante largo tiempo se creyó que la caseína era la que promovía la formación de este ácido, hasta que Pasteur en 1857 descubrió que la fermentación se debía a las bacterias.

El ácido láctico como producto de fermentación puede ser el resultado de un proceso biológico de varias materias primas; no sólo de la lactosa proveniente del suero se puede obtener este ácido, sino también de otros hidratos de carbono, tales como la xilosa (azúcar de maíz), utilizado en Estados Unidos, y el almidón (normalmente de la papa), esta producción precede al desdoblamiento enzimático en biosa del correspondiente polisacárido, es decir, el almidón en maltosa y de otros carbohidratos en sacarosa o lactosa, los cuales se desdoblan a su vez en monosas (glucosa) (Bolívar y López 1994, Trujillo y Suárez 1996).

El ácido láctico de las fermentaciones es de color amarillento y tiene impurezas como: ácidos orgánicos (acético, butírico, tartárico, cítrico, entre otros), sales minerales, azúcares y glicerina (Trujillo y Suarez 1996). Este ácido se encuentra en el jugo gástrico, en la leche

ácida y en gran variedad de alimentos fermentados.

El microorganismo usado (*Lactobacillus bulgaricus*) es una bacteria perteneciente a la familia Lactobacillaceae; en la clasificación de Orla-Jensen se denomina *Thermobacterium bulgaricum*. Es un bacilo que mide de 2 a 5 mm de largo, que se encuentra aislado o en cadenas. Es una típica bacteria de la leche, es la especie que se encuentra con más frecuencia en las leches fermentadas. Tiene la capacidad de utilizar como fuentes de carbono la manosa, la glucosa, la galactosa, la levulosa y tiene limitaciones para fermentar sacarosa, maltosa y arabinosa entre otras. La tolerancia del *Lactobacillus bulgaricus* a pequeñas cantidades de oxígeno, omite la necesidad de adicionar nitrógeno gaseoso o gas carbónico al sistema para mantener una atmósfera anaerobia.

La materia prima del proceso es el suero (casi único) desecho de la industria del queso, que resulta al separar la caseína y la materia grasa de la leche, por un proceso de cuajado y desnatado; se presenta como un gran contaminante por su alto consumo de oxígeno biológicamente disponible (DBO = 4000 - 4800 mg/l).

El suero contiene una buena cantidad de proteínas (que pueden separarse); y lactosa que puede ser fermentada por bacterias lácticas para producir ácido láctico, utilizable en otros procesos y así disminuir el impacto ambiental que éste residuo produce (Gallego y Cuenca 1988).

La lactosa (Disacarido de glucosa y galactosa), además de ser el único glúcido libre que existe en cantidad importante en la leche, es también el más abundante, más simple y más constante en proporción. Éste es un azúcar muy raro en la naturaleza, excepto en la leche. En la leche de vaca, el contenido de lactosa varía poco (entre 48 y 50 g/l), lo que determina una confiabilidad grande de lactosa en el suero.

La producción de ácido láctico antiguamente se daba por la adición de queso en descomposición y óxido de zinc (o carbonato de zinc) a soluciones azucaradas, o adicionando estos mismos reactivos al suero. La fermentación ocurría entre 25°C y 35°C , pero con bajo rendimiento y, además se presentaba producción de otros ácidos que en ningún momento eran los esperados (ácidos butírico y acético casi siempre).

A finales del siglo XIX e inicios del presente, se comenzó a estudiar las bacterias lácticas, ya que la producción en gran escala del ácido necesitaba de cultivos puros para poder aprovechar esta empresa; es así, como Lafar (1893), Leichmann (1896), Whemer (1895) y Kownatzki (1902), estudiaron y emplearon estas bacterias. Whittier y Rogers (1931), plantearon un método de fermentación láctica en continuo tanto a escala de laboratorio como de planta piloto, aunque con demasiados inconvenientes, además de que el cultivo era una mezcla de *Lactobacillus*. La producción en continuo ha sido muy estudiada desde

entonces con trabajos de glucosa con *L. Delbruecki* (Vick Roy y Ohleyer, mencionados por Mehaia 1986). Luego con trabajos sobre suero desarrollados con cultivos mixtos (Lund 1992), además de cultivos de *L. Helveticus* (Lund 1992, Boyabal 1987 1988), *L. Lactis* (Lund 1992, Krichke 1991), *S. Termophilus* (Lund 1992, Boyabal 1987), y *L. bulgaricus* (Lund 1992, Mehaia y Cheryan 1986).

La mayoría de las investigaciones han sido desarrolladas en los últimos 20 años, y algunas de ellas están ahora como proyecto industrial; es así como Cheryan y Tejayadi (1988), tratan en su artículo la economía de una planta que trata 300x106 L de suero desproteínizado por año, con una producción de 12 x 106 L de ácido láctico (obtenido como lactato de amonio) con un rendimiento del 89%, donde el costo de producción del lactato es de U.S.\$0.98/kg siendo el precio en el mercado de U.S.\$1.60/kg. a U.S.\$2.20/kg dependiendo de la forma del lactato (ácido o sal) y la pureza.

La mayor parte de la investigación aquí presentada es un sobre el bioreactor en continuo y sobre las primeras etapas del proceso, el manejo y la búsqueda de la mejor productividad en la etapa fermentativa.



Figura 1. Esquema de proceso para la conversión de suero de leche en ácido láctico, en un reactor continuo de tanque agitado.

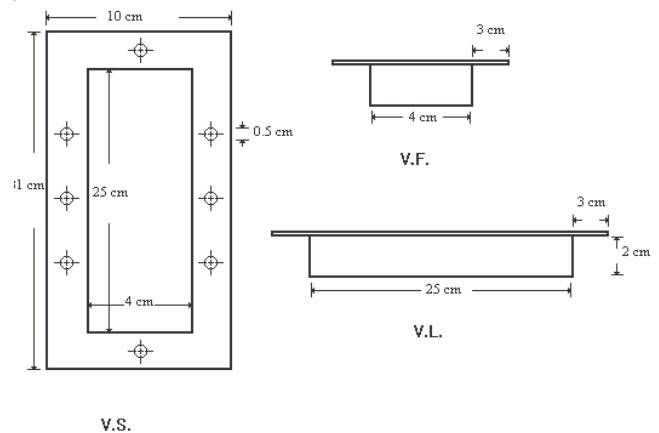
MATERIALES Y MÉTODOS.

Organismo.El microorganismo utilizado es el *Lactobacillus bulgaricus* (NRRL B-548). Éste es inicialmente cultivado en un medio MRS (Merk), por tres días a 35°C, y transferido a un medio de leche en polvo descremada al 12,6% p/v en a volúmenes de 1,0 L.

Sustrato.Se empleo una solución de suero desproteínizado que contiene 4,6% de lactosa y 0,2% de proteína con agua potable de grifo sin esterilización, y es guardado en condiciones atmosféricas para suplir la demanda del reactor.

Bioreactor. Se utiliza un reactor de 2,0 L de capacidad, provisto de un filtro-sedimentador de 0,2 L externo que se diseño para acoplarse como sistema de separación, de las fases sólido (microorganismo) y líquido (solución-producto). Al reactor se acoplan un termostato que mantiene la temperatura constante en 45±0,1°C, un medidor y controlador de pH (5,6±0,2), agitador a 63 r.p.m. y una bomba peristáltica para la alimentación de sustrato y retiro del producto . El control de biomasa se realiza manteniendo en el reactor una concentración constante (30±4,0 g/l); para esto, se hace recircular microorganismo desde el filtro cuando es necesario.

En el filtro, las partículas tienen un tiempo de retención similar al tiempo de sedimentación en condiciones estables. La tela filtrante fue una tela no tejida, escogida por experimentación entre varias de diferentes tamaños de orificio. La capacidad de formación de flocs del *Lactobacillus bulgaricus* (con tamaños que varían entre 0,1 y 2,0 mm.) es esencial para un buen funcionamiento de la separación de fases sólido-líquido en el filtro-sedimentador.



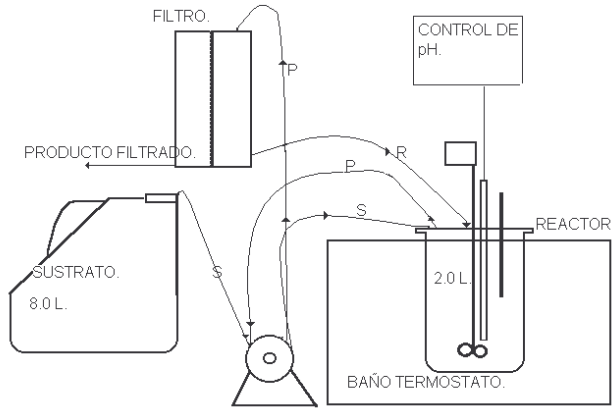
en donde: V.F - vista frontal, V.L - vista lateral, V.S - vista superior.

Figura 2. Esquema del diseño del filtro sedimentador, 1 cara que acopla con otra igual y al centro la tela filtrante.

MÉTODOS ANALÍTICOS.

El ácido láctico es medido con el método colorimétrico del Cloruro Férrico (Hernandez y Guzman, 1990). La lactosa se mide por el método suministrado por NIRO ATOMIZER (método de Fehling, modificado para medir lactosa) (Niro Atomizer Co. S.A. 1978) y la

concentración celular es expresada en peso seco por unidad de volumen (g/l), donde las células son centrifugadas, en una dilución en agua destilada, secadas a 60-70°C por 24 h. La concentración celular se lee ópticamente a 525 nm y es convertida a g/l usando una curva de calibración (Cheryan y Mehaia 1986, 1987).



S: SUSTRATO, P: PRODUCTO, R: RECICLO.

Figura 3. Esquema del sistema de fermentación láctica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Luego de un período discontinuo (de 3-4 horas) se lleva a cabo los estudios de estabilidad para 8 velocidades de dilución ($D = 0,102; 0,20; 0,39; 0,51; 0,69; 0,99; 2,04$ y $3,0 \text{ h}^{-1}$), y el sistema de fermentación no se detiene en todo el período de experimentación. Se da un lapso de 5 tiempos de retención a cada velocidad de dilución para que se obtenga la estabilidad. El tiempo de operación se cuenta a partir del momento en que se inicia el flujo de alimento al reactor.

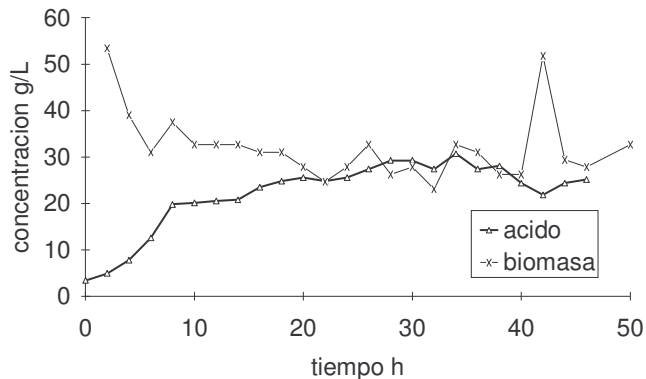


Figura 4. Curvas de estabilidad de la fermentación en continuo con $D=0.102\text{h}^{-1}$

La estabilidad para $D=0.102 \text{ h}^{-1}$ (fig. 4) se aprecia desde las 18 h. La perturbación del sistema al iniciar el suministro de sustrato en forma continua se da en un

período de 8 h. Posteriormente se presenta un estado transiente de 10 h. donde el sistema adquiere la condición de estado estacionario.

En las velocidades de dilución mayores la estabilidad se alcanza en tiempos mas cortos por sus flujos mayores (en general cuando se alcanzan los 2 tiempos de residencia), y la perturbación del sistema debido al aumento del flujo se observa en la disminución de la concentración del ácido. En las figuras 5 y 6 se observan algunas curvas de estabilidad de las fermentaciones anteriormente descritas.

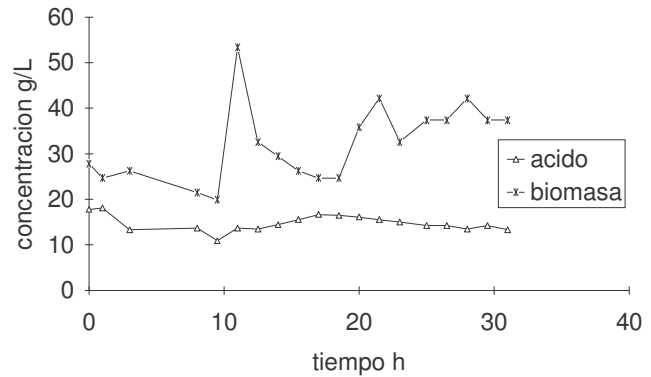


Figura 5. Curvas de estabilidad de la fermentación en continuo con $D = 0.20 \text{ h}^{-1}$

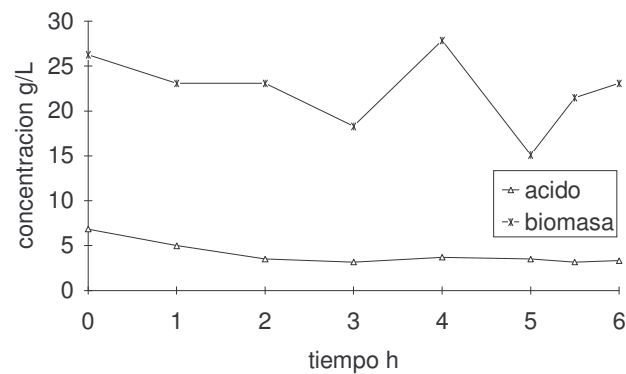


Figura 6. Curvas de estabilidad de la fermentación en continuo con $D = 0.990\text{h}^{-1}$

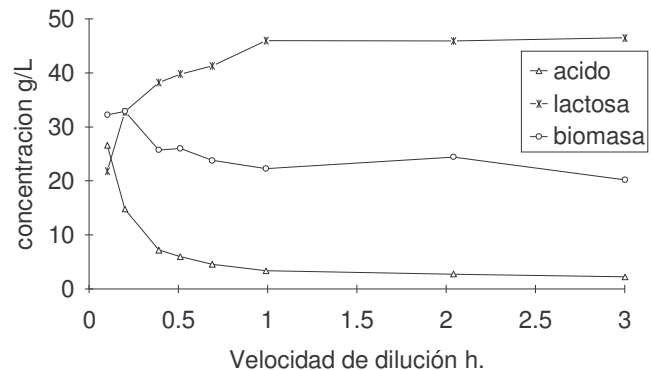


Figura 7. Curvas de cinética de la fermentación en continuo.

La figura 7 muestra el comportamiento de la concentración de lactosa con respecto a la velocidad de dilución (D), esta representa que a medida que se incrementa la velocidad de dilución la concentración de lactosa aumenta. El porcentaje de utilización de sustrato en la primera velocidad de dilución es un poco mayor del 50%; a medida que crece la velocidad espacial el porcentaje de utilización disminuye, hasta alcanzar 0,76% en $D = 3,0 \text{ h}^{-1}$.

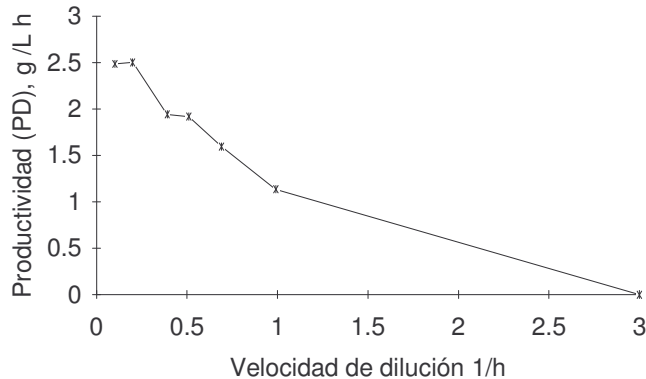


Figura 8. Curva de productividad de la fermentación en continuo.

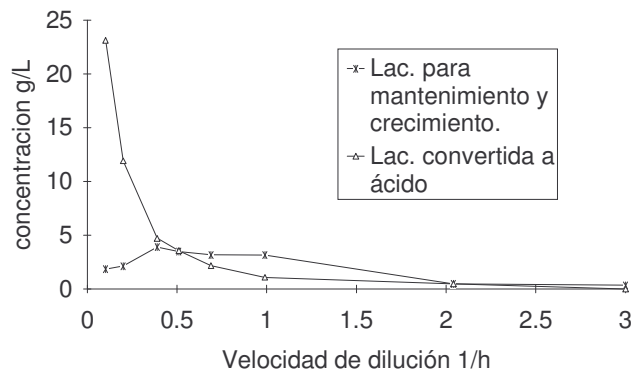


Figura 9. Curvas de los balances de materia para la fermentación en continuo.

La disminución de la concentración de ácido láctico está relacionada con el aumento en la concentración de lactosa, de una manera similar, ya que en el mismo intervalo de las curvas de lactosa y ácido láctico ($D = 0,102$ a $0,99 \text{ h}^{-1}$), las pendientes son muy pronunciadas y en el otro intervalo las pendientes decrecen. (fig. 7). La máxima producción (fig. 8) se obtiene en una velocidad de dilución de $0,20 \text{ h}^{-1}$, con un valor de $2,5062 \text{ g/lh}$.

La figura 9, representa la cantidad de lactosa que se convierte a ácido láctico ésta concentración es menor a la lactosa alimentada y, continua con la misma tendencia de lactosa consumida total de la figura 5. La curva de lactosa desaparecida (posiblemente para crecimiento y mantenimiento del *L. bulgaricus*) adquiere un máximo en $D = 0,390 \text{ h}^{-1}$, estos valores son apreciables comparados con la cantidad consumida total de lactosa. En las dos últimas velocidades espaciales el consumo de lactosa es casi todo de lactosa perdida.

CONCLUSIONES

Basados en el trabajo experimental se llevaron a cabo ocho fermentaciones en continuo, con diferentes velocidades de dilución, desde $D = 0,102 \text{ h}^{-1}$ hasta $D = 3,00 \text{ h}^{-1}$ y se obtuvo ácido láctico como único producto de las fermentaciones.

La capacidad de formación de flocs de *Lactobacillus bulgaricus* (con tamaños que varían entre 0,1 y 2,0 mm) fue esencial para un buen funcionamiento de la separación de fases sólido-líquido en el filtro - sedimentador. El nivel de pH en el caldo de fermentación además de ser un factor primordial en la productividad, influye también en la preservación de los flocs durante el proceso, es decir, en incrementos inesperados de pH subiendo a valores básicos, el floc se destruye.

El estado transiente de las fermentaciones que se presenta en los cambios de velocidad de dilución, no fueron mayores a tres tiempos de retención (por lo general solo dos fueron suficientes para alcanzar la estabilidad), valor mucho menor al reportado por la literatura (5 tiempos de retención).

Aunque los porcentajes de utilización de lactosa no son muy altos (53,33 % para el valor más alto), permite este proceso la disminución de la demanda bioquímica de oxígeno, además de un producto útil como lo es el ácido láctico.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Munir Cheryan, De la universidad de Illinois, por su asesoría y gran aporte documental.

Al Dr. Patrick Boyabal del INRA Francia, por su aporte documental.

Al personal del Laboratorio de ingeniería sanitaria de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

Al Departamento Técnico de Proleche S.A.

BIBLIOGRAFIA

- Bolivar, Fernando y Lopez, Alejandro.** 1994. Producción de ácido láctico a partir de vinazas de destilería. Santiago de Cali, Universidad del Valle.
- Boyabal, P.** 1987. Continuous lactic acid fermentation with concentrated product recovery by ultrafiltration and electro dialysis. *Biotechnology Letters*. Vol 9. No. 3. pp 207-212.
- Boyabal, P.** 1989. Production D'acide Lactique Á Partir De Perméat

De Lactoérum Par Fermentation Continue en réacteur á membrane. *Le Lait*. vol 68. No. 1. pp 65-84.

Boyabal, P Y 1989. Lactose continuous fermentation with cells recycled by ultrafiltration and lactate separation by electro dialysis: modelling and simulation. *Appl Microbiol Biotechnol*. No. 30. pp 521-527.

Boyabal, P 1989. Lactose continuous fermentation with cells recycled by ultrafiltration and lactate separation by electro dialysis: model identification.

Appl Microbiol Biotechnol. No. 30 pp 528-534.

Cheryan, Munir Y Mehaia, Mohamed. 1986. Membrane bioreactors: A new approach to fermentation of agricultural and food processing wastes. Perspectives in biotechnology and applied microbiology. Elsevier applied science publishers. London and New York.

Cheryan, Munir Y Mehaia Mehaia. 1986. Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor. Enzyme Microbiology Technology. Vol 8. pp 289-292.

Cheryan, Munir Y Mehaia, Mohamed. 1987. Immobilization of Lactobacillus Bulgaricus in a hollow-fiber bioreactor for production of lactic acid from acid whey permeate. Applied biochemistry and Biotechnology. Vol 14. pp21-27.

Cheryan, Munir Y Mehaia Mohamed. 1987. Production of lactic acid from sweet whey permeate concentrates. Process Biochemistry. pp 185 - 188.

Cheryan, Munir Y Schlicher, Laura. 1990. Reverse osmosis of lactic acid fermentation broth. Journal Chem. Tech. Biotechnology. No. 49. pp 129-140.

Cheryan Munir Y Tejayadi Susy. 1988. Downstream processing of lactic acid-whey permeate fermentation broths by hollow fiber ultrafiltration. Applied Biochemistry and Biotechnology. vol 19. pp 61-70.

Cheryan, Munir Y Tejayadi, Susy. 1995. Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. notas a publicar en el Appl. microbiol. biotechnology.

Cheryan, Munir Y Yen, Yung Ho. 1991. Separation of lactic acid from whey permeate fermentation broth by electrodialysis. Trans IChemE. Vol 69. Part C.

Cheryan, Munir Y Zhang, David. 1991. Direct fermentation of starch to lactic acid by Lactobacillus amylovorus. Biotechnology letters. vol 13. No. 10. pp 733-738.

Cheryan, Munir Y Zhang, David. 1994. Starch to lactic acid in a continuous membrane bioreactor. process biochemistry. England, No. 29. pp 145-150.

Gallego, Dario Y Cuenca, Jairo. 1988. Análisis de tres alternativas para la separación de las proteínas del suero lácteo proveniente de queserías. Medellín, Universidad Nacional de Colombia. 142 p.

Gerhardt, P. Y Stieber, R. 1979. Continuous Process for the ammonium lactate fermentation of desproteinized whey. Journal of Dairy Science. No. 62. pp 1558-1566.

Hernández, Martha Y Guzman, Rosmery. 1990. Fermentación anaerobia del suero láctico dulce desproteínizado. Medellín, Universidad Nacional sede Medellín. 68p.

Keller Y Gerhart, P. 1975. Continuous lactic acid fermentation of whey to produce a ruminant fed suplement high in crude protein. Biotechnology and Bioengineering. No 17. pp 997.

Krischke, W. 1991. Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized Lactobacillus casei subs. casei. Appl. Microbiol. Biotechnol. No. 34. pp 573-578.

Lund, B. 1992. Production of lactic acid from whey using hidroyzed whey protein as nitrogen source. Biotechnology letters. vol 14. No. 9. pp 851-856. sep.

Niro Atomizer Co. S.A. 1978. Métodos de análisis para productos lácteos en polvo. cuarta edición. Copenhagen, Dinamarca.

Rotgers, L. Y Whittier, E. Continuous fermentation in the production of lactic acid. Industrial and Engineering Chemistry. Vol 23. No. 5. pp 532-534. May. 1931.

Stieber, R. 1977. Dialysis continuous process for ammonium lactate fermentation of whey: mathematical model and computer simulation. Applied and Environmental Microbiology. vol 34. No. 6. pp 725-732. Dec.

Stieber, R. 1977. Dialysis continuous process for ammonium lactate fermentation of whey: experimnetal tests. Applied and Environmental Microbiology. vol 34. No. 6. pp 733-739. Dec.

Stieber, R. 1979. Dialysis continuous process for ammonium lactate fermentation of whey: improved mathematical model and use of deproteinized whey. Applied and Environmental Microbiology. vol 37. No.3. pp 487-495. Mar.

Stieber, R. 1981. Dialysis continuous process for ammonium lactate fermentation: simulated prefermentor and cell-recycling systems. Biotechnology and Bioengineering. Virginia, U.S.A. Vol. 23. pp 523-534.

Trujillo M. Y Suarez F. 1996. Fermentación láctica en contínuo a partir del suero de leche. Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Medellín, 101 p.