

Aprovechamiento de lactosuero en la elaboración de lactofermentos agrícolas: Caracterización fisicoquímica, microbiológica y toxicológica

BENÍTEZ-DE LA TORRE, Alfonso, PÉREZ-RAMÍREZ, Efraín, MORALES-GARCÍA, Yolanda E., MUÑOZ-ROJAS, Jesús, DÍAZ-RUIZ, Ramón y MORALES-ALMORA, Porfirio

A. Benítez, E. Pérez, Y. Morales, J. Muñoz, R. Díaz y P. Morales

Collegio de Postgraduados Campus Puebla. Km. 12.5 Carretera Federal México-Puebla (s/n) C. P. 72760 Puebla, Puebla
Laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del CICM-ICBUAP. Domicilio conocido, Ciudad Universitaria Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla
eperzr@colpos.mx

F. Pérez, E. Figueroa, L. Godínez, J. Rocha (eds.) Ciencias de la Química y Agronomía. Handbook T-I.-©ECORFAN, Texcoco de Mora, México, 2017.

Abstract

Characterization of biofertilizers made with naturally sweet whey, commercial strains, certified Lactic Acid Bacteria (LAB) and yeasts alone and in consortia in fermentations of 5 and 30 days of ripening was made by evaluating the decrease in pH, production organic acids and increased buffering capacity, content of viable microorganisms and phytotoxicity.

Inoculation favored the physicochemical characteristics lactofermentos 5 days of ripening. Lactofermentos with pH between 4 and 4.3, organic acids to 2.85 g L⁻¹ and buffering capacity of 7.83 meq NaOH mL⁻¹ were obtained. A decrease of 18% phytotoxicity associated with whey fermentation was observed. The best bulk starter was obtained with commercial strains BAL-*S. cerevisiae* at both 5 and 30 days, demonstrating that it is possible obtain lactofermentos with commercial strains in few days of fermentations.

1 Introducción

La fabricación de queso fresco de manera artesanal representa una fuente de ingreso para muchos productores de comunidades rurales del mundo y representa un bien cultural alimentario de importancia económica que puede contribuir al desarrollo regional (Gerrini y Prost, 2003), sin embargo el lactosuero, que es el subproducto que se genera durante su elaboración, ocasiona un grave impacto cuando es vertido sin control al ambiente, además de que se desaprovecha una rica fuente de nutrientes dado su contenido en azúcares, proteínas, vitaminas y minerales (Londoño *et al.*, 2010). Para elaborar un kilogramo de queso se requieren aproximadamente 4 litros de agua en procesos de limpieza y se generan 9 de lactosuero (Carvalho *et al.*, 2013).

A nivel mundial se producen cada año entre 115 y 145 millones de toneladas de lactosuero y más de la mitad se tira directamente a los hábitats acuáticos, lo que ha ocasionado un deterioro ambiental severo (Ghaly y Singh (1989)

Junto con el nitrógeno, fósforo y potasio que provienen de otras agro industrias, la lactosa forma un grupo de contaminantes orgánicos no peligrosos que produce un crecimiento excesivo de algas, bacterias y levaduras en los cuerpos de agua receptores, (Wagner, 1996). Si es descargado en suelos, además de salitrarlos y afectar física y químicamente su estructura, (Aider *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2009) existe el riesgo de contaminarlos con microorganismos patógenos al filtrarse hasta los mantos acuíferos convirtiéndose de esta manera en un riesgo para la salud humana y animal.

Mil litros de lactosuero generan cerca de 35 kilogramos de demanda biológica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 kilogramos de demanda química (DQO) (Carvalho *et al.*, 2013), fuerza contaminante que equivale a la de aguas negras producidas en un día por 450 personas (Inda, 2000). Debido a la cantidad de oxígeno que se requiere para degradarlo, se considera un residuo de riesgo ambiental (Miranda *et al.*, 2010; Araujo *et al.*, 2013), de aquí la necesidad de buscar opciones que permitan su aprovechamiento.

Considerando los problemas ambientales derivados de la disposición inadecuada de lactosuero, se ha planteado la posibilidad de aprovechar integralmente sus componentes, así como los metabolitos que se producen cuando se fermentan con microorganismos eficientes: Se les conoce como lactofermentos o biopreparados de suero de leche, y han encontrado diversos beneficios en nutrición vegetal y control biológico (Obregón, 2000; Pacheco, 2003).

Estudios previos demuestran la efectividad del uso de consorcios de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras de la leche en comparación con cepas solas para la fermentación de lactosuero (Plesias *et al.*, 2008), pero no hay estudios previos sobre el aprovechamiento de dicha sinergia con posible aplicación en la elaboración de biopreparados e inoculantes para uso agrícola. Por otra parte el tiempo propuesto por Pacheco (2003) de 30 días para fermentar el lactosuero resulta poco práctico en condiciones de campo considerando la cantidad de suero que se produce diariamente, por lo que el objetivo de este trabajo fue comparar el método tradicional para la elaboración de lactofermentos utilizando cepas comerciales (solas y en consorcio) en fermentaciones de 30 días contra un lactofermento elaborado con cepas certificadas (solas y en consorcio) en un tiempo de 5 días, con la hipótesis de que se puede obtener un producto con características similares en menor tiempo utilizando cepas certificadas.

1.1 Metodología

El trabajo se realizó en los laboratorios de Micología del Colegio de Postgraduados *campus* Puebla y en el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) en la ciudad de Puebla, México. Lactosuero: Se recolectaron 2 litros de suero fresco salado generado en una quesería de la localidad de Chipilo Puebla el cual se calentó a 100 °C con vapor directo, se enfrió y analizó con un equipo Lactoscan SLP60 para determinar el contenido de lactosa la cual se ajustó al 4% con agua destilada estéril a pH 7 y se agregó sacarosa al 10% (p/v) como fuente adicional de carbono. El lactosuero se almacenó en botellas Shoot en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Cepas y fermentaciones: Se trabajó con las cepas: *Lactobacillus acidophilus* (CDBB-B-1026), *Streptococcus thermophilus* (CDBB-B-1931) y *Kluyveromyces marxianus* (CDBB-L-836) suministradas y certificadas por el Bioterio del Instituto Politécnico Nacional. Conforme a los objetivos de este trabajo, también se utilizaron cepas comerciales de bacterias ácido lácticas (Choozit[®]) y Levadura de panificación *Saccharomyces cerevisiae* (Tradipan[®]). Las cepas se cultivaron en cajas Petri en medios LB (levaduras) y MRS (bacterias) en estriado diluido incubándose 70 horas a 30 °C. La activación antes de inocular los sueros se hizo seleccionando colonias aisladas y creciéndolas en medio líquido LB a 20 °C y 200 rpm por 24 horas. Posteriormente el paquete celular se recuperó por centrifugación a 3,500 rpm por 10 minutos y se ajustó la densidad óptica a 0.4-0.6 en espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm. Las cepas se refrigeraron a 4 °C y antes de ser inoculadas se activaron 4 horas en 50 mL de lactosuero estándar en matraz de 125 mL en agitación orbital. Las fermentaciones se hicieron por triplicado en tubos Pyrex de 50 mL con tapón rosca y empaque de teflón con 45 mL de suero y 1 mL de inoculante (al 100% cepas puras y en proporciones iguales cuando se utilizaron dos y tres cepas) a 20 °C en obscuridad, agitación y desfogue de gases ocasional.

Variables: Por triplicado se evaluó el cambio de pH (NMX-F-266-SCFI (2012), la producción de ácidos orgánicos por titulación potenciométrica expresada como ácido láctico (NOM-155-SCFI-2003) y capacidad de intercambio catiónico expresada como capacidad amortiguadora en miliequivalentes de NaOH mL⁻¹ (Jasaitis *et al.*, 1987) con un potenciómetro PH120 Conductronic calibrado con estándares pH 4, y 7. Al final de cada fermentación se determinó el contenido de microorganismos viables expresado en Log₁₀ UFC mL⁻¹ por el método de goteo en placa por diluciones seriadas (Herigstad *et al.*, 2001). La fitotoxicidad se determinó en semillas de alfalfa comparando la inhibición de germinación y desarrollo de germinado comparando los lactofermentos diluidos al 10% en comparación con un control de agua potable estéril conforme al método descrito por Tiquia (2000) pero evaluando el incremento de biomasa calculada como peso seco en lugar de la elongación de la radícula. Se consideró como indicador de disminución de toxicidad cuando el promedio del incremento de germinación y ganancia de biomasa del germinado fue mayor al 5%.

Diseño experimental y análisis estadístico: Se hizo un arreglo factorial 2x11 con un diseño en bloques completamente al azar evaluando dos tiempos de fermentación (5 y 30 días) con cepas certificadas y comerciales, solas y en consorcio. La comparación de tratamientos se hizo por análisis de varianza (ANOVA) aplicando la dócima de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$). Para comparar tiempos de fermentación se aplicó la prueba t-Student. En caso de no cumplirse con las condiciones de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Lavene) se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney utilizando el paquete estadístico SAS (2004).

1.2 Resultados y discusión

A continuación se presentan los resultados de los análisis realizados a los lactosueros sin inocular, lactosuero inoculado con cepas las certificadas *S. Termophilus*, *L. acidophilus*, *K. marxianus* solas y en consorcio, lactosuero inoculado con cepas comerciales de bacterias ácido lácticas BAL y la levadura *S. cerevisiae* solas y en consorcio en fermentaciones de 5 días (tabla 1) y fermentaciones de 30 días (tabla 1.1).

Tabla 1 Características fisicoquímicas, microbiológicas y toxicológicas lactofermentos de 5 días de maduración

	pH				Acides (% Ac. Láctico)			Capacidad amortiguadora (meq NaOH mL ⁻¹)			Biomasa (log ₁₀ UFC mL ⁻¹)	Δ Germinación (%)	Δ Peso seco (%)
		±				±			±				
Lactosuero s/i	4.3400	± 0.05	d	1.8450	± 0.04	bc	5.2667	± 0.06	bcd	4	4.00	-3.21	
<i>S. termophilus</i>	4.2167	± 0.03	abc	2.1000	± 0.05	a	5.8000	± 0.20	a	5			
<i>L. acidophilus</i>	4.2300	± 0.04	abc	1.8300	± 0.11	bc	5.0667	± 0.40	cd	5	18.01	14.09	
<i>K. marxianus</i>	4.1633	± 0.02	ab	1.8900	± 0.05	bc	5.1000	± 0.10	cd	4	-7.73	18.44	
Str-Lact	4.1700	± 0.02	abc	2.1000	± 0.07	a	5.8000	± 0.20	a	4	-6.40	12.53	
Str-Kluy	4.1800	± 0.03	abc	1.9200	± 0.03	bc	5.2333	± 0.06	cd	5			
Lac-Kluy	4.2200	± 0.02	abc	1.9050	± 0.05	bc	5.2333	± 0.06	cd	4			
Str-Lac-Kluy	4.2233	± 0.01	abc	1.9050	± 0.05	bc	5.2000	± 0.10	cd	4	14.82	5.52	
BAL	4.2333	± 0.01	bc	1.7550	± 0.00	c	4.8000	± 0.00	d	4	6.14	6.15	
<i>S. cerevisiae</i>	4.2367	± 0.03	c	1.9800	± 0.08	ab	5.5333	± 0.25	abc	4	1.61	5.59	
BAL-Sac	4.1600	± 0.01	a	2.1150	± 0.04	a	5.7667	± 0.06	ab	4	1.45	12.00	

s/i: sin inocular
 Str: *S. termophilus*; Lact: *L. acidophilus*; Kluy: *K. marxianus*; Sac: *S. cerevisiae*; BAL: Bacterias ácido lácticas.
 Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Tabla 1.1 Características fisicoquímicas, microbiológicas y toxicológicas lactofermentos de 30 días de maduración

	pH				Acides (% Ac. Láctico)			Capacidad amortiguadora (meq NaOH mL ⁻¹)			Biomasa (log ₁₀ UFC mL ⁻¹)	Δ Germinación (%)	Δ Peso seco (%)
		±				±			±				
Lactosuero s/i	4.2100	± 0.02	bcd	2.5350	± 0.13	abc	6.9667	± 0.32	a	2	15.68	9.12	
<i>S. termophilus</i>	4.2000	± 0.01	bc	2.5950	± 0.14	abc	7.2000	± 0.35	a	2			
<i>L. acidophilus</i>	4.2567	± 0.01	cde	2.4000	± 0.07	abc	6.9000	± 0.30	a	2	17.15	5.52	
<i>K. marxianus</i>	4.2933	± 0.02	e	2.3850	± 0.08	c	6.8000	± 0.10	a	2	10.40	5.03	
Str-Lact	4.2300	± 0.03	bcd	2.4317	± 0.16	bc	6.7667	± 0.45	a	2	-2.12	2.45	
Str-Kluy	4.2700	± 0.01	de	2.5350	± 0.18	abc	7.2333	± 0.47	a	2			
Lac-Kluy	4.2467	± 0.01	bcde	2.6250	± 0.07	abc	7.3333	± 0.25	a	2			
Str-Lac-Kluy	4.2500	± 0.01	bcde	2.6700	± 0.19	abc	7.6000	± 0.61	a	2	-3.11	14.53	
BAL	4.1933	± 0.02	b	2.8500	± 0.19	ab	7.8333	± 0.76	a	2	18.60	16.30	
<i>S. cerevisiae</i>	4.3067	± 0.05	e	2.3850	± 0.23	c	6.7667	± 0.35	a	2	1.89	5.03	
BAL-Sac	4.0367	± 0.02	a	2.8650	± 0.03	a	7.3000	± 0.00	a	2	11.54	3.04	

s/i: sin inocular
 Str: *S. termophilus*; Lact: *L. acidophilus*; Kluy: *K. marxianus*; Sac: *S. cerevisiae*; BAL: Bacterias ácido lácticas.
 Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Se observa un efecto benéfico en la disminución de pH en los sueros inoculados en comparación con el suero sin inocular ($p < 0.05$), así como en la disminución de fitotoxicidad (incremento de peso seco) con los fermentos de 5 días de añejamiento.

El contenido de microorganismos viables fue mayor utilizando las cepas certificadas de BAL tanto de forma individual como con el consorcio *L. acidophilus-S. thermophilus*. La menor fitotoxicidad se obtuvo con los fermentos inoculados con BAL certificadas solas y en consorcio con *K. marxianus*, así como con las BAL comerciales y el consorcio de BAL-*S. cerevisiae*, comportamiento similar al obtenido con las fermentaciones de 30 días. Ya en trabajos previos, Botes *et al.* (2007), Paramithioti *et al.* (2006) y Plessas *et al.* (2008) habían demostrado la importancia y ventajas de utilizar consorcios microbianos para aumentar los rendimientos en la fermentación de lactosa así como para la obtención de metabolitos que no se podrían obtener con cepas puras.

En este trabajo se pudo observar además, que los lactofermentos elaborados con consorcios microbianos utilizando diferentes especies no resultan fitotóxicos.

En las fermentaciones de 30 días nuevamente se observan mejores características fisicoquímicas de pH y producción de ácidos orgánicos con el uso del consorcio BAL-*S. cerevisiae*, es decir, con cepas lácticas comerciales. Ya no se observaron mejoras en comparación con el lactosuero sin inocular, y la homogeneidad de sus características fisicoquímicas y microbiológicas indica que con el tiempo los fermentos se llegan a estabilizar.

No se observaron diferencias significativas en el pH de los lactofermentos de 5 y 30 días pero sí en el contenido de ácidos orgánicos y capacidad amortiguadora, aumentando ambos parámetros con el añejamiento, y disminuyendo de manera significativa el contenido de microorganismos viables ($p < 0.05$). La fitotoxicidad disminuyó ligeramente con la maduración.

1.3 Conclusión

Se demuestra que es posible aprovechar el lactosuero generado por la industria quesera para la producción de biopreparados con fermentaciones de 5 días y utilizando cepas comerciales en consorcio. Estos resultados son de interés en el diseño de biofertilizantes de bajo costo aprovechando subproductos agroindustriales.

1.4 Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con recursos CONACYT.

1.5 Referencias

Aider, M., D. Halleux y Melnikova, I. (2009). Skim acidic milk whey cryoconcentration and assesment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10(3): 334-341.

Araujo, G., Monsalve, L.M. y Quintero, A.L. (2013). Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de la contaminación ambiental. 4 (2):55-65.

Botes, A., Svetoslav ,D., Johan, W., Mollendorff, V., Botha, A., Dicks, L. (2007). Identification of lactic acid bacteria and yeast from Boza. *Process. Biochem.* 42

- Carvalho, F., Prazeres, A., Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of the total environment* 445-446.
- Fernandes, M., Fornari, R., Mazutti, R., Oliveira, D., Ferreira, F., Cichoski, A., Cansian, R., Luccio, M. y Treichel. R. (2009). Production and characterization of xanthan gum by *Xanthomonas campestris* using cheese whey as sole carbon source. *Journal of Food Engineering* 90(1): 119-123.
- Ghaly, A. y Singh, R., (1989). Pollution potential reduction of cheese whey through yeast fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 22(2) 181-203.
- Gerrini, P. y Prost, A. (2003). Conjuguer l'Elaboration, Techniques, et Enjeux Socioeconomiques. Construction de L'AO Broccio Corse. En Seminaire INRA- INAO. Systemes d' Elevage et Tipicité des Produits Laitieres.
- Herigstad, B., Hamilton, M., Heersink, J. (2001). How optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. 44 (2): 121-129
- Inda, C. (2000). Optimización del Rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la Industria de Quesería. Organización de los Estados Americanos OEA, pp. 87-93.
- Jasaitis, D., Wohlt J. y Evans, J. (1989). Influence of feed ion content in buffering capacity of ruminant feedstuffs in vitro. Cook college Rutgers. N.J.
- Londoño, M., Sepúlveda, J. y Hernández, A. (2010). Utilización del suero de queso fresco en la elaboración de bebida fermentada con cultivos probióticos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 20 (2):53-57.
- Miranda, M., Fonseca, P., Ponce, I.; Cedeño, C., Sam, R. y Martí V. (2007). Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de queso: Características distintivas y control de calidad. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.* 17(2):103-108.
- NMX-F-266-SCFI-2012. Norma Mexicana (2012). Determinación del pH en muestras de jugos de caña de azúcar, meladura y mieles.
- NOM-155-SCFI-2003. Norma Oficial Mexicana (2003). Determinación de acidez en leche.
- Obregón, M. (2000). Estudios preliminares para evaluar las posibles aplicaciones del lactosuero en la agricultura. *Revista Técnica* vol. 1 Instituto Nacional de Aprendizaje (INA). Costa Rica.
- Pacheco, F. (2003). Lactofermentos: Una alternativa en la producción de abonos orgánicos líquidos fermentados. Costa Rica. Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica. Organización de Estudios Tropicales, Instituto Nacional de Aprendizaje (AVINA).
- Paramithiotis, S.; Gioulatos, E., Tsakalidou, G., Kalantzopoulos, Paramithiotis S; S. Gioulatos ; E. Tsakalidou; G. Kalantzopoulos (2006) Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria in sourdough. *Process Biochem.* 41.

Plessas, S.; Bosnea, L; Psarianos, C.; Koutinas, A .A.; Marchant, R. y Banat, M. (2008). Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. *Bioresource Technology* 99:5951-5955.

Statistical Analysis System Institute Inc. (2004). SAS/STAT 9.0 User guide. Cary, NC:SAS,.

Tiquia, S. y Tam, N. (2000). Co-composting of spent pig litter and sludge with forced aeration. *Biores. Technol.* 72(1): 1-7.

Wagner, T.,(1996). Contaminación, causas y efectos. Ediciones Gemika, 423 p. México