

## Depuración del suero lácteo con un cultivo mixto de levaduras, utilizando un sistema por lote alimentado y alimentado repetido



*Ocampo Cervantes, Oscar; Cristiani Urbina, Eliseo; Juárez Ramírez, Cleotilde; Ruiz Ordaz, Nora y Galíndez Mayer, Juvencio.*

**Departamento de Ingeniería Bioquímica.  
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,  
I.P.N. Prolongación de Carpio y Plan de  
Ayala. Colonia Plutarco Elías Calles.  
México, D.F. C.P. 11340.  
Fax: 53-96-35-03  
E-mail: ocampo@engineer.com**

### Introducción

En la manufactura de quesos, caseína y mantequilla, se genera suero lácteo, el cual representa del 80 al 90% del volumen de leche transformada (Rapin y col., 1994). La composición química del suero lácteo puede variar, ya que depende de los tratamientos a los que se sujeta la leche (calentamiento, centrifugación, homogeneización, etc.), de las características intrínsecas en el procesamiento de los diferentes tipos de derivados lácteos (tipo de cultivos utilizados, manipulación mecánica, uso de ayudas para el procesamiento, procesos de membrana, etc.) y de los procesos de tratamiento que se le apliquen al suero (pasteurización, concentración, etc.).

El 95% de la producción mundial anual de suero lácteo proviene de la manufactura de quesos. Aproximadamente, se generan 9 L de suero a partir de 10 L de leche, para producir 1 kg de queso.

En México hay aproximadamente 2.500 queserías, donde se producen anualmente unas 146 mil toneladas de queso, por lo que se estima una producción de suero de más de un millón de toneladas al año, las cuales contienen 48 mil toneladas de lactosa y 4.500 toneladas de proteína verdadera. Esto significa el requerimiento calórico de un año de 200 mil personas adultas y el requerimiento proteico de 300 mil personas adultas (García, 1984).

Debido a sus componentes, el suero representa un serio problema de contaminación cuando se vierte al seno de cursos acuíferos, ya que genera una demanda bioquímica de oxígeno (DBO) muy alta, de 40.000 a 60.000 ppm (Ben-Hassan y col., 1994), una demanda química de oxígeno (DQO) de 50.000 a 80.000 ppm (Fournier y col., 1993), y más del 90% de esas demandas se deben a la lactosa (Kisaalita y col., 1990).

Cuando un compuesto con una alta DBO, tal como el suero de leche, se vierte a un sistema ecológico acuático, los microorganismos que lo degradan demandan una gran cantidad de oxígeno disuelto en el agua creándose condiciones anóxicas.

Se estima, además, que la descarga de 2.5 litros de suero al día tiene un poder contaminante equivalente al agua residual producida por un individuo (Ben-Hassan y col., 1994). Esto implica que la manufactura de un kilogramo de queso ocasiona una contaminación semejante a la generada por aproximadamente cuatro personas. En nuestro país, el suero producido anualmente provoca una contaminación similar a la generada, durante todo un año, por 1.400.382 personas.

El suero es un excelente medio de cultivo, cuya principal fuente de carbono es la lactosa, por lo que algunas alternativas biotecnológicas consisten en el uso de este material como un recurso para la producción de metabo-

litos con mayor valor agregado, lo que subsanaría, en parte, los costos de tratamiento.

Por otra parte, la economía y la eficiencia de remoción de contaminantes del suero lácteo dependen del sistema de reacción que se utilice.

Algunos de los estudios encaminados a disminuir el grado de contaminación que ocasiona el suero lácteo procedente de la manufactura de queso cottage reportan reducciones de hasta el 87% de la demanda química de oxígeno, en condiciones aerobias, empleando levaduras.

En algunos procesos de tratamiento de aguas residuales de la industria lechera (cuyos valores iniciales de demanda química de oxígeno oscilaron entre 850 y 9.000 ppm), se obtuvieron reducciones del 28-98% (Jones, 1974).

En el laboratorio de Bioingeniería del Departamento de Ingeniería Bioquímica se han realizado diversos estudios para definir y proponer un proceso de tratamiento del suero lácteo, a fin de reducir su grado de contaminación y con posibilidades de obtener un producto con valor agregado tal como la biomasa de levaduras GRAS (siglas del inglés "generally regarded as safe"), pero que además sea un proceso económico.

De los diversos estudios llevados a cabo en el laboratorio de bioingeniería se seleccionó un cultivo mixto ternario de levaduras, formado por *Kluyveromyces lactis* K594, *Candida utilis* NRRL Y-900 y *Saccharomyces microellipsoides* CDBB-338, el cual presenta una eficiencia alta de remoción de contaminantes (medida como reducción de la DQO) del suero lácteo y su rendimiento celular es adecuado.

### Objetivo

Determinar la eficiencia de remoción de contaminantes del cultivo mixto formado por *Kluyveromyces lactis*, *Candida utilis* y *Saccharomyces microellipsoides*, en dos sistemas de reacción: cultivo por lote alimentado con suministro constante de suero y cultivo por lote alimentado repetido.

### Material y métodos

#### Microorganismos

Se utilizó un cultivo mixto de levaduras GRAS formado por: *Kluyveromyces lactis* K594, *Candida utilis* NRRL Y-900 y *Saccharomyces microellipsoides* CDBB-338, el cual se seleccionó previamente con base en su eficiencia de reducción de la DQO del suero lácteo.

#### Medios de cultivo

**Medio A:** Se utilizó un medio con una concentración de glucosa de 10 g/L, el cual se complementó con sulfato de amonio, 2,5 g/L; extracto de levadura, 1 g/L; fosfato de potasio monobásico, 0,5 g/L; sulfato de magnesio, 0,25 g/L; cloruro de calcio, 0,05 g/L; sulfato de zinc, 2 mg/L; molibdato de sodio, 1 mg/L; sulfato de manganeso 2 mg/L y cloruro férrico, 1 mg/L.

Los medios de cultivo B y C se prepararon de la siguiente manera: 70 gramos de suero dulce en polvo (Land O' Lakes, WI., U.S.A.) se disolvieron en 1 litro de agua destilada. La solución obtenida tiene una concentración de lactosa similar a la del suero generado por la industria quesera (aproximadamente 45 g/L). Las proteínas del suero fueron separadas por filtración, después de ser precipitadas mediante tratamiento térmico a 92°C, durante 10 minutos.

**Medio B:** El suero desproteinado se diluyó con agua destilada para obtener una concentración de 10 g de lactosa/L.

**Medio C:** Se utilizó suero lácteo desproteinado con una concentración de lactosa de 45 g/L.

Los medios de cultivo B y C se complementaron con sulfato de amonio y con fosfato de potasio monobásico, a una relación lactosa/sulfato de amonio de 12 y de lactosa/fosfato de potasio de 20. Previamente se había determinado que a estas relaciones se consiguen niveles elevados de remoción de contaminantes del suero lácteo.

#### Preparación del inóculo

En forma separada se propagaron las levaduras *C. utilis* y *S. microellipsoides* en el medio A y la cepa de *K. lactis* en suero lácteo diluido, complementado con sulfato de amonio y fosfato de potasio monobásico (medio B).

Después de 24 horas de incubación, en agitación a 28°C, las células de *Candida utilis* y de *Saccharomyces microellipsoides* se cosecharon por centrifugación y se adicionaron en proporción equivalente, medida como absorbencia a 600 nm, al cultivo de *K. lactis*, de tal forma que la proporción de la mezcla fue 1:1:1.

#### Sistemas de fermentación

Una vez ajustada la concentración celular inicial ( $X_i$ ), en el biorreactor, se inició la alimentación del medio con suero lácteo (medio C). La bomba peristáltica se ajustó para proporcionar el flujo de suministro deseado, el cual se mantuvo constante durante el proceso.

La temperatura, el pH y la aireación se mantuvieron en 23 - 28°C, 4,5 - 5,5 y 0,6 - 1 vvm, respectivamente.

Se tomaron muestras cada dos horas y se les determinó lo siguiente:

- Concentración de lactosa.
- Demanda química de oxígeno.
- Concentración celular ( $x$ ).

En algunos experimentos, al final del proceso, se descargó parcialmente el biorreactor y se inició la alimentación con otro flujo de suministro. A esta forma de operación se la denomina cultivo por lote alimentado repetido.

La información obtenida se procesó para estimar la eficiencia de remoción de lactosa y de remoción de contaminantes, medida esta última como eficiencia de reducción de la demanda química de oxígeno.

**Métodos analíticos**

Los métodos analíticos empleados fueron:

**a) Concentración celular.**

Se evaluó mediante la determinación del peso seco de la biomasa, empleando membranas de fibra de vidrio (Whatman GF/C), con un tamaño de poro de 1.2  $\mu\text{m}$ .

**b) Concentración de lactosa.**

La determinación se llevó a cabo mediante un método enzimático, empleando a la  $\beta$ -galactosidasa y a la mezcla glucosa oxidasa-peroxidasa, con adición de o-dianisidina.

**c) Demanda química de oxígeno.**

El análisis se llevó a cabo de acuerdo con el método de reflujo cerrado, aprobado por la EPA (Hach water analysis handbook, 1997).

**Resultados y discusión**

Inicialmente, se determinó el efecto del flujo de alimentación de suero lácteo sobre las eficiencias de consumo de lactosa y de reducción de la demanda química de oxígeno del cultivo mixto de levaduras (*Kluyveromyces lactis* K594 – *Candida utilis* NRRL Y-900 – *Saccharomyces microellipsodes* CDBB-338), cuando se utilizó un cultivo por lote alimentado en forma lineal, con una concentración celular inicial ( $X_i$ ) de aproximadamente 2.26 g/L.

En las Figuras 1 y 2 se presentan las curvas de crecimiento celular ( $x$ ), de consumo de lactosa y de masa celular total ( $X$ ) en función de la edad del cultivo, cuando se utilizaron flujos de alimentación de suero de 0.025 y de 0.068 L/h, respectivamente. La mayor concentración ce-

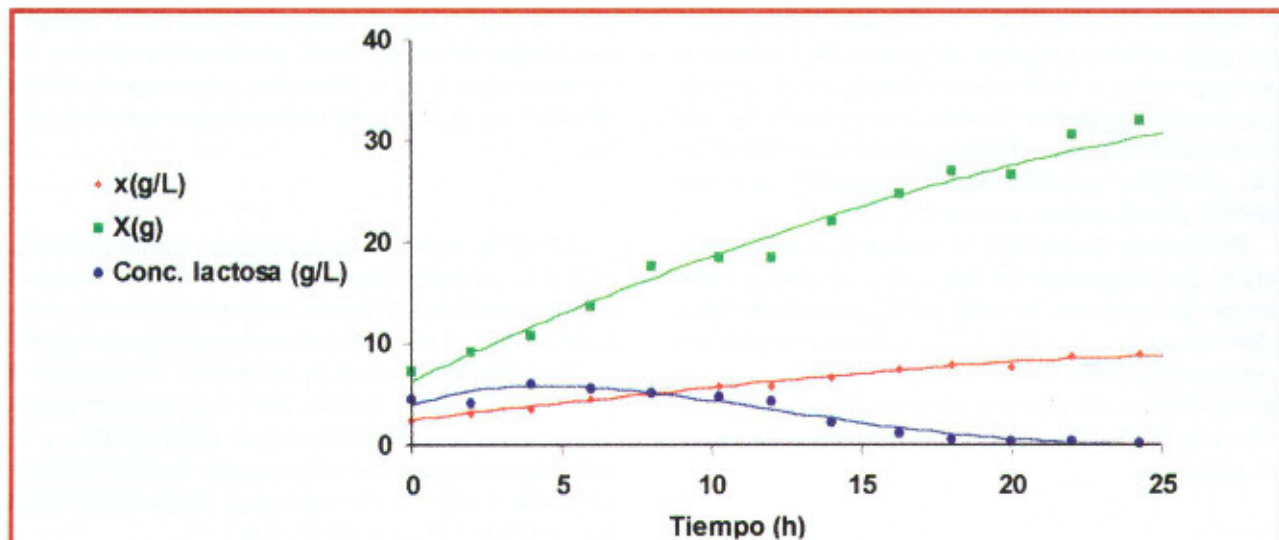


Figura 1: Curva de masa celular total ( $X$ ), concentración celular ( $x$ ) y de lactosa residual en función del tiempo, en el cultivo por lote alimentado en forma lineal con un flujo de alimentación ( $F$ ) de 0.025 L/h, y con una concentración celular inicial ( $X_i$ ) de aproximadamente 2.26 g/L.

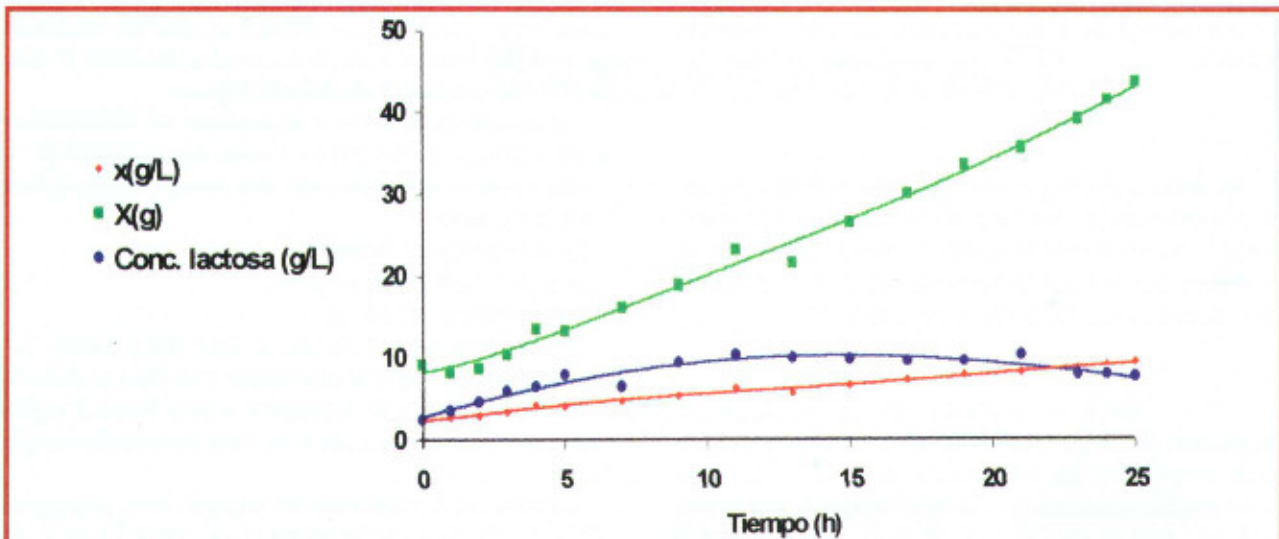


Figura 2: Curva de masa celular total ( $X$ ), concentración celular ( $x$ ) y de lactosa residual en función del tiempo, en el cultivo por lote alimentado en forma lineal con un flujo de alimentación ( $F$ ) de 0.068 L/h, y con una concentración celular inicial ( $X_i$ ) de aproximadamente 2.26 g/L.

lular final se obtuvo con el flujo (F) de 0.068 L de suero/h; sin embargo, la concentración de lactosa residual obtenida con este caudal fue superior a la encontrada con el otro flujo (F = 0.025 L/h).

En la Figura 3 se presentan los resultados de eficiencia de consumo de lactosa, conseguidos a los dos diferentes flujos de alimentación, cuando la concentración celular inicial fue constante y con un valor aproximado de 2.26 g/L. A medida que se incrementó el flujo del sustrato de alimentación, la eficiencia de consumo de lactosa disminuyó.

En las Figuras 4 y 5 se presentan los resultados de demanda química de oxígeno del suero lácteo suministrado al reactor y del filtrado del medio de cultivo, para los dos flujos de alimentación antes mencionados. Las

eficiencias de reducción de la demanda química de oxígeno se muestran en la Figura 6. En ella se aprecia que la mayor eficiencia se obtuvo con el flujo más bajo de alimentación de suero.

Posteriormente, se ensayó un cultivo por lote alimentado en forma lineal, en donde se utilizó un flujo intermedio a los anteriormente empleados (F = 0.040 L/h) y con una concentración celular inicial más baja, de aproximadamente 1.7 g/L, la cual representa el 75% de la concentración inicial utilizada previamente. Los resultados de concentración celular, de lactosa residual y de masa celular total se presentan en la Figura 7 y la de las demandas químicas de oxígeno del suero alimentado y del filtrado del medio de cultivo se muestran en la Figura 8.

Si la concentración celular inicial de los cultivos no tu-

viera algún efecto sobre las eficiencias de consumo de lactosa y de reducción de la demanda química de oxígeno, se esperaría que al utilizar un flujo intermedio entre 0.025 y 0.068 L/h, las eficiencias (a un flujo de 0.040 L/h) quedarían comprendidas entre las obtenidas con esos flujos.

Sin embargo, en las Figuras 9 y 10 se puede observar que la eficiencia de consumo de lactosa y de reducción de la demanda química de

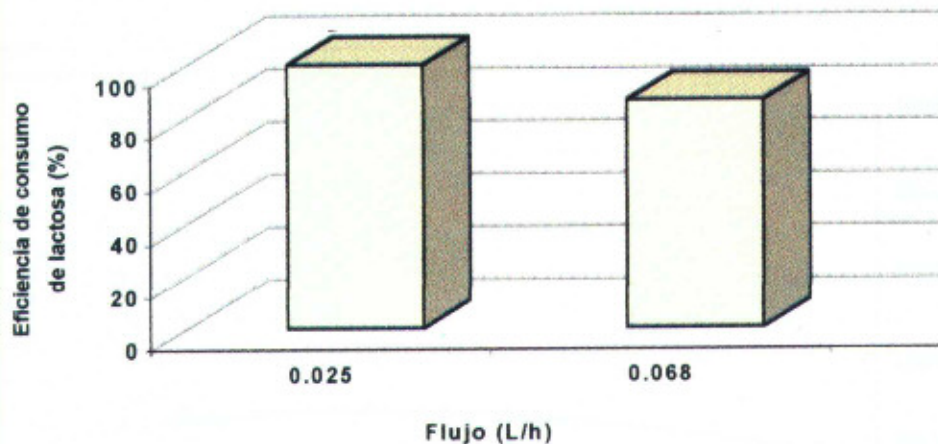


Figura 3: Eficiencia de consumo de lactosa en función del flujo de alimentación. Concentración celular inicial de 2.26 g/L.

Cuajo líquido y polvo

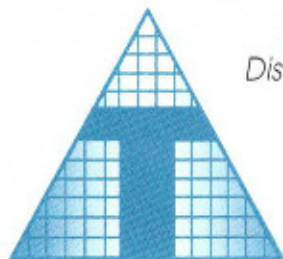
**CORTAFOR-T** (origen bovino)

Fermentos lácticos seleccionados

**SACCO**

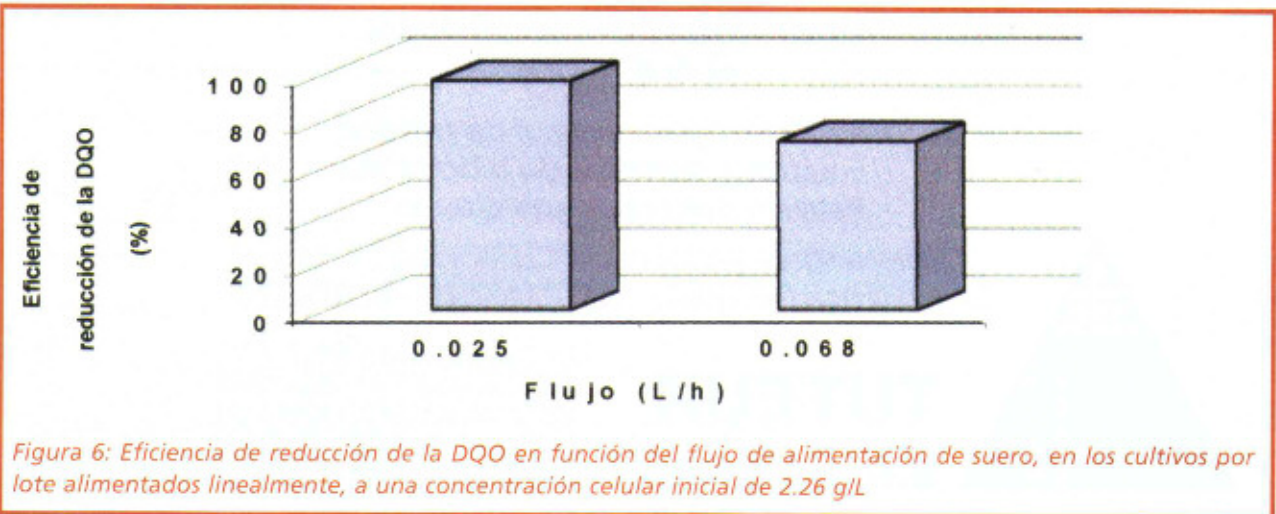
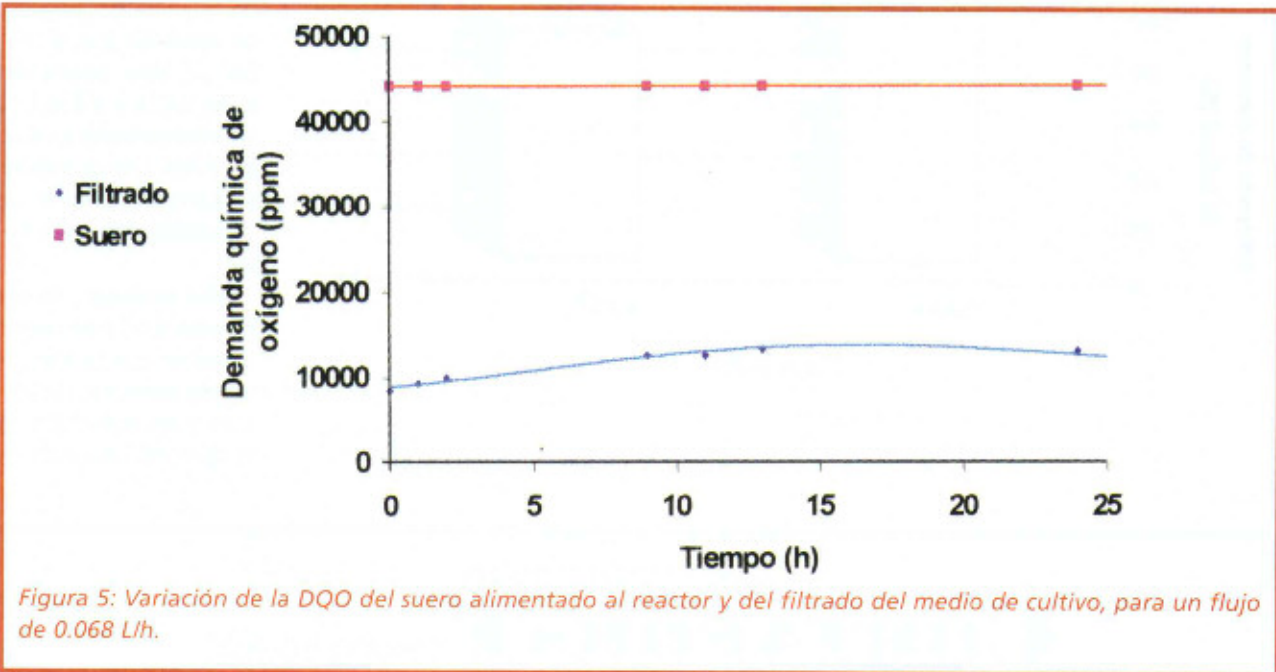
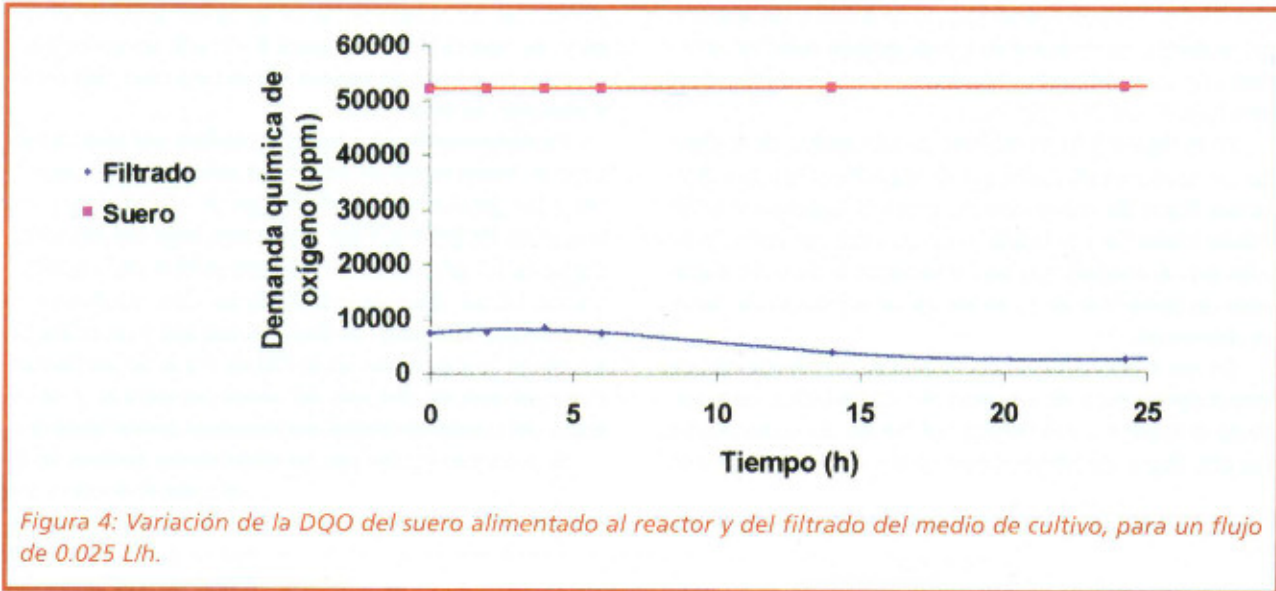
- Reactivos para control de calidad
- Equipos y aparatos de laboratorio
- Petrifilm para recuento directo

Representante exclusivo de: CLERICI Spa (Italia)  
Distribuciones: GERBER - 3M - HANNA - BERTUZZI



**TUTEUR**  
**S.A.C.I.F.I.A.**

Av. Juan de Garay 848  
(1153) Buenos Aires - Argentina  
Teléfonos: (011) 4307-8085 (L.R.)  
Ventas: Int. 224 - Fax: Int. 232  
E-mail: oaz@tuteur.com.ar



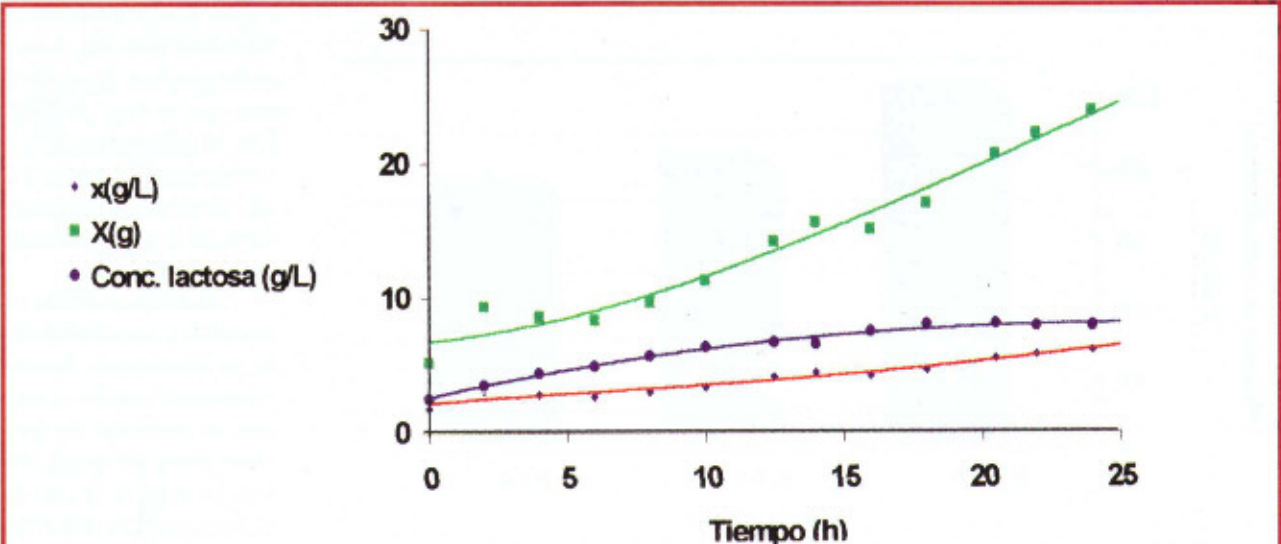


Figura 7: Curva de masa celular total (X), concentración celular (x) y de lactosa residual en función del tiempo, en el cultivo por lote alimentado en forma lineal con un flujo de alimentación (F) de 0.040 L/h, y con una concentración celular inicial (Xi) de aproximadamente 1.70 g/L.

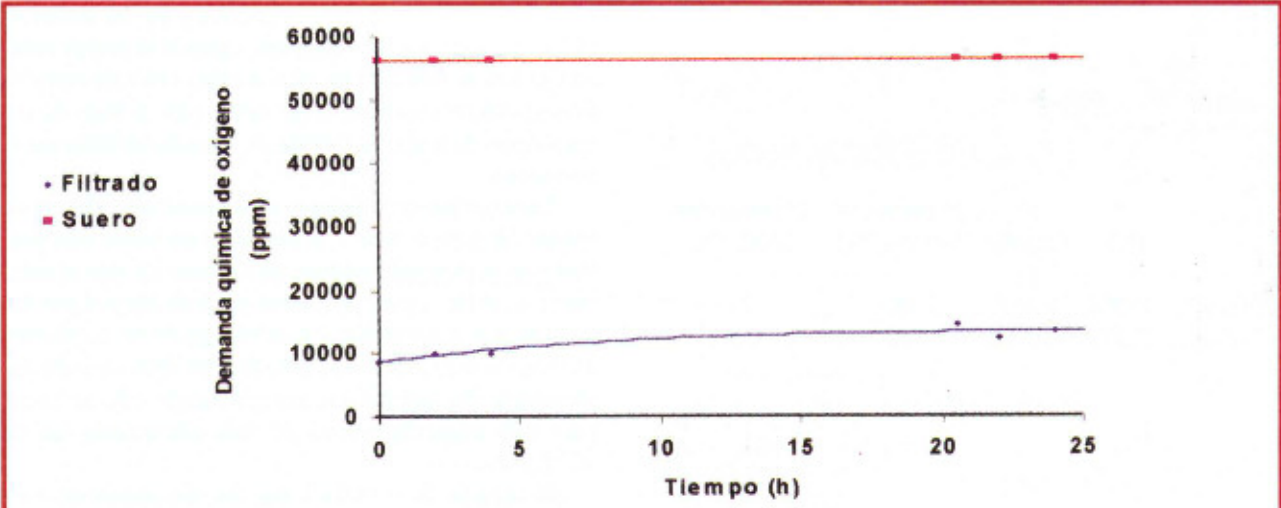


Figura 8: Variación de la DQO del suero alimentado al reactor y del filtrado del medio de cultivo, para un flujo de suero de 0.040 g/L.

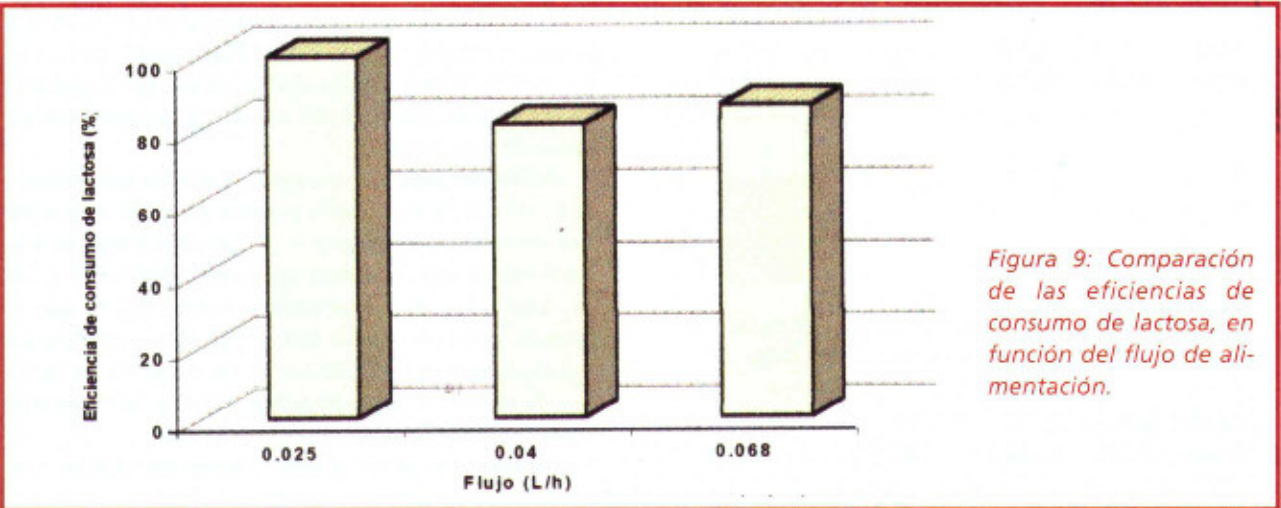
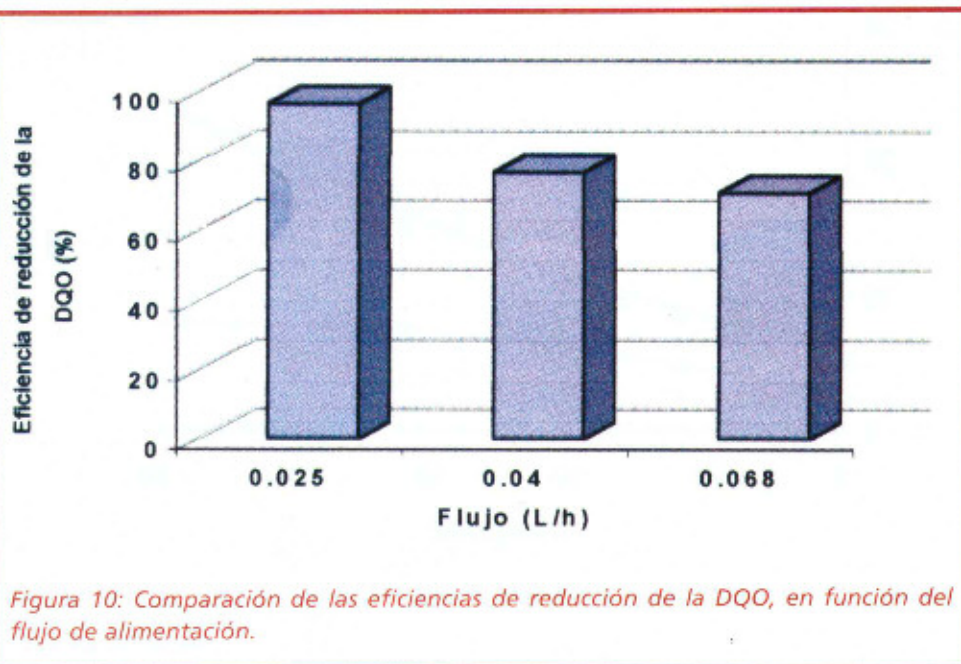


Figura 9: Comparación de las eficiencias de consumo de lactosa, en función del flujo de alimentación.



oxígeno, obtenidas con el flujo de 0.040 L/h, fueron semejantes a las obtenidas con el flujo de 0.068 L/h, lo que indica que la concentración celular inicial tiene un papel importante en la depuración del suero lácteo.

Con base en estos resultados y con el propósito de incrementar la concentración celular y, con ello, la remoción de contaminantes del suero lácteo, se sugiere el uso de cultivos por lote alimentados repetidos.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de eficiencia de consumo de lactosa y de reducción de

**Tabla 1. Eficiencias de consumo de lactosa y de reducción de la DQO para el primer cultivo por lote alimentado repetido.**

	F (L/h)	Xi (gcel/L)	Ef consumo lactosa (%)	Ef reducción DQO (%)
1ª etapa	0.068	2.167	86	71
2ª etapa	0.033	10.150	70	56

**Tabla 2. Eficiencias de consumo de lactosa y de reducción de la DQO para el segundo cultivo por lote alimentado repetido.**

	F (L/h)	Xi (gcel/L)	Ef consumo lactosa (%)	Ef reducción DQO (%)
1ª etapa	0.025	2.350	99	96
2ª etapa	0.040	8.900	99	86

**Tabla 3. Eficiencias de consumo de lactosa y de reducción de la DQO para el tercer cultivo por lote alimentado repetido.**

	F (L/h)	Xi (gcel/L)	Ef consumo lactosa (%)	Ef reducción DQO (%)
1ª etapa	0.040	1.700	81	77
2ª etapa	0.061	7.133	87	77

la demanda química de oxígeno, cuando el primer cultivo por lote alimentado se llevó a cabo con una concentración celular inicial de 2.167 g/L y con un flujo de alimentación de suero de 0.068 L/h, durante un determinado tiempo.

Transcurrido este tiempo, se removió un volumen de medio de cultivo igual a la cantidad de suero suministrado en el período anterior, de manera tal que el volumen inicial del siguiente cultivo por lote alimentado fue igual al que le precedió, y a continuación se suministró un flujo de suero de 0.033 L/h, durante otro período determinado de tiempo. La concentración celular inicial para este segundo cultivo por lote alimentado fue de 10.150 g/L.

Se aprecia en la Tabla 1 que las eficiencias de consumo de lactosa y de reducción de la demanda química de oxígeno fueron superiores en el primer cultivo por lote alimentado, comparadas con el segundo. Esto podría indicar que el flujo de alimentación suministrado durante el segundo cultivo por lote alimentado fue insuficiente para mantener viables a las células (dado que se tenía una alta concentración celular inicial), por lo que probablemente se presentó lisis celular de las levaduras y/o limitación por oxígeno.

Posteriormente, se ensayó un flujo de alimentación de 0.025 L/h de suero en la primera parte del cultivo por lote alimentado repetido y en la segunda etapa se proporcionó un flujo superior, de aproximadamente 0.040 L/h. Los datos de concentración celular con la que se iniciaron cada una de las etapas del cultivo por lote alimentado repetido, las eficiencias de consumo de lactosa y de reducción de la demanda química de oxígeno se muestran en la Tabla 2.

En este caso se obtuvieron eficiencias altas de con-

sumo de lactosa y de reducción de la demanda química de oxígeno, en cada una de las etapas del cultivo por lote alimentado repetido. Esto indica que es conveniente iniciar un cultivo por lote alimentado con un flujo relativamente bajo y que al término de este, cuando ya se incrementó significativamente la masa celular reactiva, se suministre un flujo de suero superior al empleado en la primera parte del cultivo.

Posteriormente se incrementaron los flujos de suministro de suero en ambas etapas del cultivo por lote alimentado repetido. En la Tabla 3 se presentan los flujos y concentraciones celulares iniciales de cada una de las etapas del cultivo por lote alimentado y las eficiencias de consumo de lactosa y de reducción de la demanda química de oxígeno. En ambas etapas se obtuvieron eficiencias muy similares, aunque inferiores a las obtenidas en el anterior cultivo por lote alimentado repetido.

En la Tabla 4 se presentan los resultados de eficiencia de consumo de lactosa y de reducción de la demanda química de oxígeno, para los tres cultivos por lote alimentados repetidos que se han ensayado. Con base en estos resultados se deduce que existe una funcionalidad entre la velocidad específica de suministro de lactosa y la eficiencia de reducción de contaminantes.

En la Figura 11 se presenta la relación entre las eficiencias de consumo de lactosa y de reducción de la demanda química de oxígeno, con respecto a la velocidad

específica de suministro de lactosa, de la segunda etapa de los cultivos por lote alimentados repetidos.

Aun cuando se tienen pocos valores ensayados de velocidad específica de suministro de lactosa, la tendencia obtenida sugiere que existe un valor óptimo de velocidad específica en la que se obtienen los niveles más elevados de consumo de lactosa y de remoción de contaminantes. En el intervalo ensayado, los niveles máximos de reducción de la demanda química de oxígeno y de consumo de lactosa se obtuvieron a una velocidad específica de 0.197 g de lactosa/ g de biomasa.h.

Esto último es de importancia ya que permite manipular el flujo de alimentación que se suministra a la se-

**Tabla 4. Eficiencias de consumo de lactosa y reducción de DQO para los cultivos por lote alimentados repetidos.**

	F (L/h)	Xi (gcel/L)	Ef consumo lactosa (%)	Ef reducción DQO (%)
1ª etapa	0.068	2.167	86	71
2ª etapa	0.033	10.150	70	56
1ª etapa	0.025	2.350	99	96
2ª etapa	0.040	8.900	99	86
1ª etapa	0.040	1.700	81	77
2ª etapa	0.061	7.133	87	77

## SCALETRON

Equipos catalíticos para evitar y eliminar incrustaciones de origen calcáreo

### Beneficios en Tambos:

- Economía en la utilización de detergentes
- Mejora el pulido sanitario
- Evita la incrustación en equipos de ordeño, equipos de frío, termos, cañerías y equipos en general
- Progresivamente limpia las ya existentes
- Previene la formación de algas en bebederos e instalaciones
- Ideales para proteger calderas y torres de enfriamiento



Método NO QUIMICO, 100% ECOLOGICO, libres de mantenimiento, no requieren fuentes de energía

Aptos para tratar todo tipo de dureza, de fácil instalación, 10 años de garantía y una vida útil superior a los 20 años. Fabricados en Inglaterra bajo patente mundial.

**RIZOMEDIC S.A.** distribuidor exclusivo para el mercado lácteo  
E. Zeballos 1011 Piso 3º "B" (2000) Rosario - Santa Fe  
Telefax: (54-341) 4853301 Celular: 0341-156151047

**AERSA S.A.** representante exclusivo para Latinoamérica  
Esmeralda 961 Piso 6º (1007) Buenos Aires - Argentina  
Tel.: (54-11) 4315-0841 Fax: (54-11) 4311-2172 E-mail: aersa@movi.com.ar



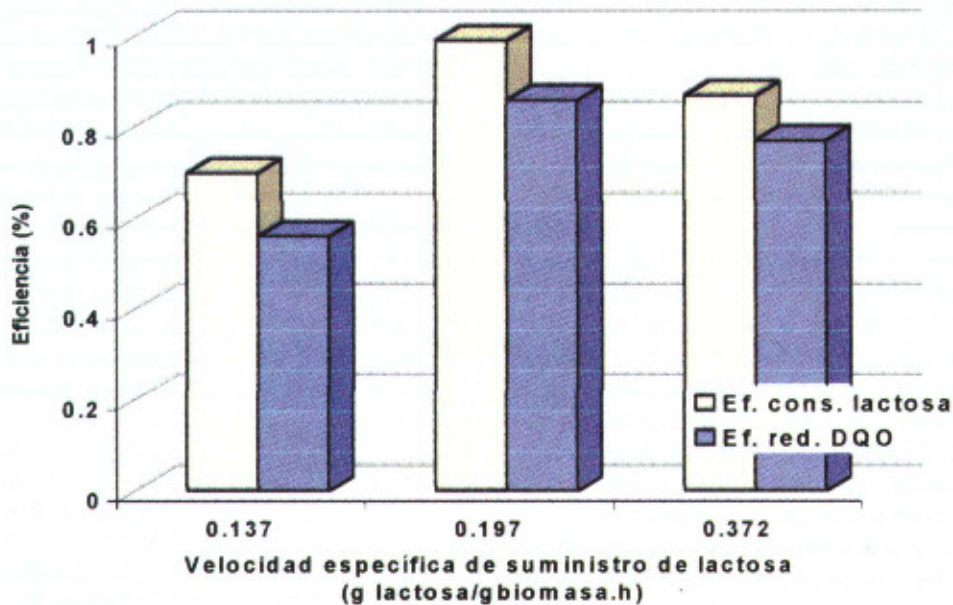


Figura 11: Eficiencia de consumo de lactosa y de reducción de la DQO en función de la velocidad específica de suministro de lactosa, para los cultivos alimentados repetidos.

gunda etapa de un cultivo por lote alimentado, con base en la concentración celular que se alcance en la primera etapa, para obtener niveles elevados de remoción de contaminantes.

**Conclusiones**

1) A una concentración celular inicial dada, las eficiencias de consumo de lactosa y de reducción de la demanda química de oxígeno disminuyen a medida que se incrementa el flujo de alimentación de suero lácteo, en los cul-

tivos por lote alimentados.

2) Las eficiencias de consumo de lactosa y de reducción de la demanda química de oxígeno dependen significativamente de la concentración celular inicial que se utilice en los cultivos por lote alimentados.

3) Existe una funcionalidad entre las eficiencias de consumo de lactosa y de reducción de contaminantes y la velocidad específica de suministro de lactosa.

**Bibliografía**

**Ben-Hassan, R. M. & Ghaly, A.E.** 1994. Continuous propagation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey for pollution potential reduction. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47: 89-105.

**Fournier, D.; Schwitzguebel, J.P. & Peringer, P.** 1993. Effect of different heterogeneous inocula in acidogenic fermentation of whey permeate. *Biotechnol. Lett.* 15: 627-632.

**García, G.M.** 1984. Alternativas de utilización del suero de leche. *Información Científica y Tecnológica.* 6: 35-39.

**Hach water analysis handbook.** 1992. Oxygen demand, chemical. Reactor digestion method. Hach company. 2nd edition. Colorado, USA. pp. 494-495. Aprobado por la EPA, Reg. federal 45(78): 26811-26812, april 21, 1980).

**Jones, H.R.** 1974. Pollution control in the dairy industry. Noyes Date Corporation. pp.1-277. New Jersey, USA.


**Kisaalita, W.S.; Lo, K.V. & Pinder, K.L.** 1990. Influence of whey protein continuous acidogenic degradation of lactose. *Biotechnol. Bioeng.* 36: 642-646.

**Rapin, J.D.; Marison, Y.W.; Stockar, U. & Reilly, P.J.** 1994. Glycerol production by yeast fermentation of whey permeate. *Enzyme Microb. Technol.* 6: 143-150. ☺

**Roberto Miguel Vigna**

IMPORTADOR-EXPORTADOR Reg. N° 26.155/63

FÁBRICA DE  
MOLDES PLÁSTICOS  
PARA LA  
ELABORACIÓN  
DE QUESOS



MATRICERÍA SIN CARGO

Modelos y Registros Industriales N° 57.994  
Patente de Invención N° 249.778

ADMINISTRACIÓN Riobamba 1535	FÁBRICA Bv. Seguí 4050
---------------------------------	---------------------------

(2000) Rosario - Argentina  
Teléfax: (0341) 481-1815