



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE *Lactobacillus casei*
ATCC 393 EMPLEANDO SUERO DE LECHE COMO FUENTE DE CARBONO
PARA LA PRODUCCIÓN DE LACTASA.

Autora

Miguel Ernesto Rueda Acosta

Año
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO DE *Lactobacillus casei*
ATCC 393 EMPLEANDO SUERO DE LECHE COMO FUENTE DE CARBONO
PARA LA PRODUCCIÓN DE LACTASA.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología

Profesor guía

MSc. María Alejandra Cruz Salazar

Autor

Miguel Ernesto Rueda Acosta

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo, Optimización de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus casei* ATCC 393 empleando suero de leche como fuente de carbono para la producción de lactasa, a través de reuniones periódicas con el estudiante Miguel Ernesto Rueda Acosta, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

María Alejandra Cruz Salazar
Máster en Ingeniería en Bioprocesos y Biotecnología
CI: 1719928572

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Optimización de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus casei* ATCC 393 empleando suero de leche como fuente de carbono para la producción de lactasa, de Miguel Ernesto Rueda Acosta, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Wilson David Tapia López
Máster en Gestión y Planificación Ambiental
CI: 1714205281

DECLARACION DE AUTORIA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Miguel Ernesto Rueda Acosta

C.I. 1718455239

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a la MsC. María Alejandra Cruz por ser mi guía durante el desarrollo de este estudio. Al Ing. Diego Valdospinos por transmitirme su experiencia en el área de bioprocesos. A mi familia y mis amigos por su apoyo incondicional en el trayecto de mi carrera.

DEDICATORIA

A mis padres Ernesto y Elizabeth por siempre confiar en mí, por sus valores, por su amor y siempre hacerme sentir la persona más capaz y especial. A mi hermana Andrea, por enseñarme y hacerme vivir el significado de *Ohana*. A mis abuelos, José, Guillermo, Elsa y Pilar por su sabiduría, por estar conmigo y por ser un ejemplo que seguir. A mi tía Mónica por ser mi segunda madre. A María Luisa por ser esa persona que me ayuda a ser mejor cada día, por su paciencia y su inmenso amor.

RESUMEN

Las enzimas provenientes de microorganismos han sido una herramienta fundamental para el desarrollo de la industria alimenticia y farmacéutica, por lo cual se ha visto la necesidad de optimizar los bioprocesos que forman parte de la producción de las mismas. La lactasa es una enzima hidrolítica de suma importancia en varios campos de investigación científica, producción alimenticia e inclusive farmacéutica. Principalmente se la utiliza para la producción de alimentos deslactosados, enzimas digestivas, producción de galacto-oligosacáridos y suplementos alimenticios que incluyen β -galactosidasa de origen bacteriano o fúngico. La demanda de enzimas como la lactasa se refleja en la optimización de los bioprocesos para aumentar la producción, en conjunto, con la utilización de fuentes alternativas de sustratos. El suero de leche es considerado un producto residual de la industria lechera el cual presenta un elevado impacto al medio ambiente en caso de no ser tratado con las medidas necesarias. Sin embargo, el alto contenido de carbohidratos y proteínas lo hacen un sustrato ideal para el desarrollo de bacterias ácido-lácticas como el *Lactobacillus casei*. Este microorganismo es utilizado gracias a sus características probióticas, pertenece a los organismos reconocidos generalmente como seguros. Se ha visto que varias especies de *Lactobacillus* son productores eficientes de β -galactosidasa, por lo cual se realizó una optimización del medio de cultivo para la producción de dicha enzima a partir de la cepa de *L. casei* ATCC393. A partir de un modelo estadístico Plackett-Burman se seleccionó las variables significativas; suero de leche, sulfato de magnesio y sulfato de manganeso. Posteriormente se optimizó las concentraciones de estas variables mediante un diseño central compuesto seguido de un método de superficie de respuesta en la cual se observó que las condiciones óptimas de suero de leche para la producción de lactasa es 4.68 g L^{-1} , de sulfato de magnesio 7.6 \% p v^{-1} y de sulfato de manganeso $0.027 \text{ \% p v}^{-1}$. Este proceso permitió alcanzar una concentración máxima de biomasa de 3.026 g L^{-1} y una actividad enzimática de 0.534 U mL^{-1} .

Palabras Clave: *Lactobacillus casei*, Plackett-Burman, suero de leche, diseño central compuesto, método de superficie de respuesta, optimización.

ABSTRACT

Enzymes from microorganisms have been a fundamental tool for the development of the food and pharmaceutical industry, which has seen the need to optimize the bioprocesses that are part of the production of them. Lactase is a hydrolytic enzyme of great importance in several fields of scientific research, food production and even pharmaceutical. It is mainly used to produce lactose-free foods, digestive enzymes, production of galacto-oligosaccharides and food supplements that include β -galactosidase of bacterial or fungal origin. The demand for enzymes such as lactase is reflected in the optimization of bioprocesses to increase the production, as a whole, the use of alternative sources of substrates. Whey is considered a residual product of the dairy industry which has a high impact on the environment if not treated with the necessary measures. However, the high content of carbohydrates and proteins make it an ideal substrate for the development of lactic acid bacteria such as *Lactobacillus casei*. This microorganism is used thanks to its probiotic characteristics and belongs to microorganisms generally recognized as safe. It has been seen that several species of *Lactobacillus* are efficient producers of β -galactosidase, for which an optimization of the culture medium for the production of said enzyme was carried out from the strain of *L. casei* ATCC393. From a statistical model Plackett-Burman, the significant variables were selected; whey, magnesium sulfate and manganese sulfate. Subsequently, the concentrations of these variables were optimized by means of a composite central design followed by a response surface method in which it was observed that the optimum conditions of Whey Serum are 4.68 g L⁻¹, magnesium sulphate 7.6% w/v and manganese sulphate 0.027% w/v. This process allowed reaching a maximum biomass concentration of 3,026 g L⁻¹ and an enzymatic activity of 0.534 U / mL.

Key Words: *Lactobacillus casei*, Plackett-Burman, Cheese Whey, composite central design, response surface method, optimization.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Antecedentes..... | 1 |
| 1.2 Planteamiento del problema | 2 |
| 1.3 Objetivos..... | 4 |
| 1.3.1 Objetivo General | 4 |
| 1.3.2 Objetivos específicos | 4 |
| 1.4 Justificación del trabajo..... | 5 |
| 2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO | 7 |
| 2.1 Microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS) | 7 |
| 2.2 Cultivos microbianos de alimentos..... | 8 |
| 2.2.1 Hongos..... | 8 |
| 2.2.2 Bacterias | 8 |
| 2.3 <i>Lactobacillus</i> | 10 |
| 2.3.1 Propiedades de <i>Lactobacillus casei</i> | 11 |
| 2.3.2 <i>L. casei</i> en la producción alimenticia | 12 |
| 2.4 Enzimas | 13 |
| 2.5 Enzimas en la Industria Alimenticia | 15 |
| 2.5.1 Proteasas..... | 16 |
| 2.5.2 Lipasas..... | 16 |
| 2.5.3 Lactasas..... | 17 |
| 2.6 β – galactosidasa..... | 17 |
| 2.7 Aplicaciones:..... | 19 |
| 2.7.1 Galacto-oligosacaridos | 19 |
| 2.7.2 Leche Deslactosada | 20 |
| 2.7.3 Suero de leche..... | 20 |
| 2.7.4 Caracterización del Suero de Leche | 21 |
| 2.7.5 Impacto Ambiental. | 21 |

| | |
|--|----|
| 3. CAPITULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL | 22 |
| 3.1 Diseño Experimental Plackett-Burman..... | 22 |
| 3.2 Diseño Central Compuesto | 24 |
| 4. CAPITULO IV. PROCEDIMIENTOS | 26 |
| 4.2 Preparación del Inóculo Inicial | 26 |
| 4.3 Selección de Cepa | 26 |
| 4.4 Curva de Calibrado de ONPG (Orto-nitrofenil- β -galactósido) | 28 |
| 4.5 Curva de Calibrado de Proteínas Totales | 28 |
| 4.6 Curva de Calibrado de Biomasa..... | 29 |
| 4.7 Curva de Crecimiento, Curva de Producto y Curva de proteínas totales..... | 30 |
| 4.8 Selección de las variables influyentes mediante el análisis del Plackett-Burman | 31 |
| 4.9 Desarrollo de Diseño Central Compuesto | 31 |
| 4.10 Escalamiento a etapa banco | 32 |
| 4.11 Evaluación estadística de los resultados..... | 33 |
| 5. CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 33 |
| 5.1 Selección de Cepa | 33 |
| 5.1.2 Comparación de la concentración de Biomasa entre las diferentes cepas. | 34 |
| 5.1.3. Proteínas totales de los microorganismos estudiados..... | 35 |
| 5.2 Curvas de Calibrado..... | 36 |
| 5.2.1 Curva de calibrado de <i>L. casei</i> | 36 |
| 5.2.2 Curva de Calibrado de Proteínas..... | 37 |
| 5.2.3 Curva de Calibrado de ONP | 38 |
| 5.3. Cinética de fermentación en lote | 39 |
| 5.3.1 Cinética de crecimiento de <i>L. casei</i> escala laboratorio | 39 |
| 5.3.2 Curva de proteínas totales sintetizadas a partir de <i>Lactobacillus casei</i> ATCC393 a escala de Laboratorio..... | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 5.4.2 Optimización del medio de cultivo a partir del método de superficie de respuesta | 46 |
| 5.5 Cinética de fermentación escala banco | 57 |
| 5.6. Parámetros Cinéticos | 60 |
| 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 64 |
| 6.1 Conclusiones | 64 |
| 6.2 Recomendaciones | 65 |
| REFERENCIAS | 66 |

1. CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Una de las principales fuentes alimenticias de los mamíferos en sus primeros años de vida es la leche, por lo cual, la expresión de la enzima lactasa (β - galactosidasa) es indispensable. La lactasa es una enzima de gran importancia biotecnológica, esta incluye aplicaciones en varios campos como: investigación, producción alimenticia e inclusive farmacéutica; como ejemplo están los productos deslactosados, enzimas digestivas y los suplementos alimenticios que incluyen β - galactosidasa de origen bacteriano o fúngico (Akolkar, Sajgure & Lele, 2005). Además, es utilizada en la producción de galacto-oligosacaridos prebióticos debido a su actividad de transgalactosilación. Esta enzima permite catalizar la reacción hidrolítica de la lactosa, con el fin de obtener glúcidos aprovechables para el organismo.

La lactasa ha sido sintetizada a partir de varios microorganismos a lo largo de los años, tradicionalmente ha sido obtenida a partir de hongos como *Aspergillus* sp. y *Klyveromyces* sp. debido a su rendimiento aceptable; en los últimos años, *Klyveromyces lactis* se ha convertido en uno de los organismos modelo mejor estudiados entre las levaduras no convencionales (Venkateswarulu, Prabhakar & Kumar, 2017; Wellenbeck, Mampel, Naumer, Knepper & Neubauer, 2017). Uno de los organismos de alto interés industrial para la producción de lactasa es la levadura *Klyveromyces marxianus*. Este microorganismo ha sido muy valioso en el campo biotecnológico por su gran capacidad para asimilar la lactosa e inulina, su corto tiempo de generación, su alta capacidad de secreción, tolerancia a temperaturas elevadas y su rápido crecimiento. Además de estas propiedades tan importantes, *K. marxianus*, es considerado un microorganismo aceptablemente seguro (Perini, Souza & Kelbert, 2013)

En cuanto a bacterias, se han utilizado aquellas pertenecientes al género *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Bifidobacterium*, ya que clasifican dentro de los organismos GRAS (generalmente reconocidos como seguros), de esta manera, los productos provenientes de estos microorganismos pueden ser consumidos sin una purificación intensiva. Existen vías alternas para la obtención de productos deslactosados mediante procesos biológicos, químicos, mecánicos y físicos. Dentro del campo de la biotecnología se han realizado varios ensayos para la optimización y la producción de β – galactosidasa. Uno de los estudios más recientes ha permitido realizar un modelamiento y optimización de variables para mejorar la producción de lactasa a partir de *Bacillus subtilis*, usando redes neuronales artificiales y metodología de superficie de respuesta (Venkateswarulu, Prabhakar, Kumar & Krupanidhi, 2017). De igual forma, estudios previos han demostrado que *Lactobacillus acidophilus* es un gran productor de lactasa, obteniendo una máxima actividad enzimática de 918 U mL^{-1} a partir de un medio basado en una bebida típica hindú. La lactasa producida dentro del experimento mencionado ha mostrado un resultado superior frente a la enzima comercial producida por *Kluyveromyces*. La lactasa aislada de *L. casei* ATCC393 entrega una conversión total de la lactosa a glucosa y galactosa en 80 min, mientras la enzima comercial realiza la misma catálisis en 100 min. Por otro lado, la lactasa de *L. casei* ATCC393 puede ser usada durante 25 ciclos en comparación a la comercial que dura únicamente 21 ciclos (Akolkar et al., 2005). Las investigaciones de Dagbagli & Goksungur (2008) han permitido conocer los parámetros claves como la temperatura, agitación, pH y dilución de oxígeno; para la síntesis óptima de lactasa en un biorreactor STR a partir de *Kluyveromyces lactis*. Tossavaien & Sahlstein (2005) han propuesto un mecanismo mediante ultrafiltraciones, nano filtraciones, sin embargo, al final es necesario el uso de lactasa debido a su actividad hidrolítica única.

1.2 Planteamiento del problema

El desarrollo de productos lácteos y la domesticación de algunos mamíferos, conlleva un cambio en el metabolismo de los seres humanos, asimilando la lactosa en su adultez, atribuyéndole el nombre de lactasa persistentes (LP). La condición LP es común en comunidades pertenecientes al Norte de Europa (>90%), sin embargo, mestizos, afroecuatorianos e indígenas nativos del Ecuador presentan una prevalencia menor de LP, haciéndolos vulnerables a trastornos estomacales como intolerancia a la lactosa (Paz-y-Miño, 2016). Según el censo ecuatoriano de 2011 los afroecuatorianos representan el 7.2% de la población ecuatoriana y los mestizos rodea el 71.9% (INEC, 2016). Consecuentemente, el mercado pertinente a productos deslactosados es más afín a ciertos grupos étnicos que a otros, existe un mercado sumamente importante que se puede explotar debido al gran porcentaje de personas propensas a sufrir intolerancia a la lactosa dentro del país. Con tal potencial en el mercado, reducir los costos de la leche deslactosada podría incrementar su consumo.

Es importante destacar que la leche deslactosada alterada por enzimas hidrolíticas está disponible para cualquier persona, sin embargo, el precio costoso de estos productos lácteos ha reducido el interés y el consumo en varios grupos de la población. Horner, Dunn, Eggett & Ogden (2011) han reportado que las familias con mayores ingresos monetarios son los mayores consumidores de la leche deslactosada. Los factores más relevantes que ocasionan la disminución en la tendencia del consumo de leche en el Ecuador están vinculados directamente a la economía actual del país. Además, la población en general no tiene claridad, en lo referente a los problemas digestivos que causa el consumo de leche entera, no obstante, muchas personas sufren de problemas de salud como intolerancia a la lactosa, por lo cual han cambiado sus hábitos de consumo (Torres, 2016).

Los costos elevados de la leche deslactosada que alcanzan hasta el 20% más de la leche común se debe, en parte, al costo de los sustratos implicados en el crecimiento de los microorganismos, condiciones de cultivo y procesos de hidrólisis

utilizados por los manufactureros. Dentro de la industria moderna, uno de los mayores problemas ambientales y económicos recae en la reutilización de los componentes residuales. En el caso de la industria quesera, el suero de la leche es considerado como un componente secundario el cual, en la mayoría de casos, es desechado. Sin embargo, el suero de la leche es un sustrato rico, aplicado en el medio de cultivo para el crecimiento de levaduras y bacterias. Consecuentemente, poseer un medio de cultivo de alta calidad, a bajo precio, y condiciones óptimas de cultivo, podría disminuir los precios y aumentar la calidad de la β - galactosidasa (Aguirre-Ezkauriatza, Aguilar-Yáñez, Ramírez-Medrano & Alvarez, 2010).

En actualidad, la producción de proteínas forma parte de una alta gama de productos en la industria biotecnológica, farmacéutica, cosmética de alimentos. La demanda de estas proteínas da a lugar la necesidad de crear métodos de purificación más efectivos y baratos. Sin embargo, actualmente, los costos de purificación siguen teniendo precios extremadamente altos, esto se debe a la gran cantidad de energía que consumen y los múltiples procesos necesarios para evitar reacciones alérgicas en seres humanos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Optimizar las condiciones de cultivo a escala de laboratorio, empleando suero de leche como fuente de carbono para la producción de lactasa parcialmente purificada a partir de *Lactobacillus casei* ATCC393.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar las condiciones óptimas del medio de cultivo para la producción de lactasa, a partir de *Lactobacillus casei* ATCC393, mediante dos diseños estadísticos, Plackett Burman y Diseño Central Compuesto
- Determinar la actividad enzimática y específica de enzimas a partir de la fermentación de *Lactobacillus casei* ATCC393 bajo condiciones óptimas de cultivo.
- Validar el proceso de optimización en biorreactor, mediante la determinación de parámetros cinéticos de crecimiento celular, consumo de sustrato y obtención de lactasa.

1.4 Justificación del trabajo

Para el 2030, se espera que 1/3 de la industria global se base en procesos biotecnológicos, por lo tanto, invertir en proyectos referentes a la biotecnología industrial es de suma importancia para el país. La producción óptima de los bienes y servicios biotecnológicos industriales está estrechamente relacionada con el costo-beneficio que los caracteriza. Consecuentemente, los bioprocesos son la clave para convertir los protocolos de laboratorio en aplicaciones comerciales (Wellenbeck et al., 2017). Los bioprocesos, en conjunto con la utilización de microorganismos, son una herramienta clave para producir metabolitos primarios y secundarios de interés en áreas como la farmacéutica, producción de alimentos, tratamientos ambientales, entre otros.

La lactasa es una enzima de gran importancia industrial que puede ser utilizada para evitar la cristalización de la lactosa en varios procesos de la agroindustria, como: la condensación, el endulzado y la producción de lácteos helados. En este sentido, esta enzima es utilizada para tratar problemas de intolerancia a la lactosa en individuos que presentan una deficiencia de lactasa en el intestino. Además, se han descubierto nuevas aplicaciones de la β - galactosidasa, como la producción de galacto-oligosacaridos biológicamente activos (Dagbagli & Goksungur, 2008).

A medida que la población asociada a la intolerancia a la lactosa va tomando conciencia de los riesgos y los síntomas que presentan por el consumo de leche entera y otros lácteos, incrementa la demanda por productos libres de lactosa y suplementos enzimáticos. Actualmente, grandes empresas como Nestlé, Alpina y Parmalat tienen la necesidad de importar lactasa de fábricas extranjeras como Proenzimas S.A. para generar leche deslactosada y otros productos libres de lactosa. Así mismo, Ecuador cuenta únicamente con una empresa productora de comprimidos a base de lactasas, la planta Farmacéutica INDUREC S.A es la encargada de producir tabletas de lactasa 9000 FCC. para contrarrestar los síntomas estomacales producidos por la intolerancia a la lactosa (FARMAYALA S.A., 2015). Conociendo que el mercado es mínimamente explotado en el país, es necesario considerar invertir en la biotecnología industrial para generar procesos eficientes y de bajo costo para la producción de β -galactosidasa.

Como se mencionó previamente el uso de la maquinaria celular de los microorganismos es una herramienta clave para la producción óptima de lactasa. La naturaleza probiótica de la bacteria *Lactobacillus casei* promueve la capacidad digestiva de la lactosa en pacientes que presentan un déficit en la síntesis de β -galactosidasa, consecuentemente se ha demostrado que estas bacterias sintetizan lactasas estables que presentan una elevada actividad enzimática (Venkateswarulu, Prabhakar, Kumar, et al., 2017). En este sentido, las bacterias son utilizadas especialmente para la producción de metabolitos a grandes escalas debido a su rápido crecimiento y su diversidad metabólica. Para concluir, es preciso mencionar la importancia de utilizar un medio de cultivo de bajo costo, para obtener una lactasa de alta calidad, sin aumentar los precios del resultado final. Utilizando una fuente de azúcares como el suero de leche, controlando la temperatura, el pH, la agitación, el tiempo de incubación, la concentración de la fuente de nitrógeno y la concentración molar de iones como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{+} , NH_4^{+} y K^{+} ; se pueden obtener las condiciones óptimas para el crecimiento de la bacteria propuesta y una enzima de actividad elevada (Venkateswarulu, Prabhakar & Kumar, 2017).

2. CAPITULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS)

La Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos (FDCA) en conjunto con el cumplimiento normativo de EE.UU. han generado el concepto actual de Generalmente Reconocidos como Seguros (GRAS). Por lo tanto, esta normativa recae sobre cualquier sustancia que sea parte o sea algún componente de los alimentos o afecte a las características de los mismos. La determinación GRAS se basa en la seguridad que el componente muestre, a través de procedimientos científicos sistematizados y vinculados a la experiencia común en el uso de los alimentos (Sewalt, Shanahan, Gregg, La Marta & Carrillo, 2016). “El reconocimiento general de la seguridad mediante procedimientos científicos se basa en la aplicación de datos, información o métodos científicos generalmente disponibles y aceptados, que ordinariamente se publican, así como en la aplicación de principios científicos, y puede corroborarse mediante la aplicación de datos científicos no publicados, información o métodos” (FDA, 2018).

El concepto generado por la FDA (*Food and Drug Administration*), generalmente como seguro, se acopla de manera correcta a la producción de enzimas, en conjunto de su síntesis a partir de microorganismos. Como se mencionó con anterioridad, las enzimas y microorganismos han sido usados hace muchos años atrás para la fabricación de alimentos. La evaluación continua de estas enzimas y su organismo productor condujeron al establecimiento de la estandarización de linajes conocidos generalmente como seguros. Para reconocer un microorganismo como GRAS es preciso realizar estudios sistematizados de toxicidad (Sewalt et al., 2016).

Cuando los microorganismos con un historial seguro en los alimentos se emplean para un uso diferente o en una dosis significativamente más alta, se necesita una

determinación de GRAS para estos nuevos usos. Consecuentemente, existen listas de microorganismos e ingredientes derivados de microbios utilizados en los alimentos que se pueden encontrar en el sitio web de la FDA (Bourdichon et al., 2012).

2.2 Cultivos microbianos de alimentos

Los cultivos microbianos de alimentos (MFC, por sus siglas en inglés) son bacterias y hongos utilizados en la producción de alimentos. Los MFC pueden ser una o más cepas vinculadas a los componentes dentro de las fermentaciones y todos los procesos finales para la producción de un alimento; se han enumerado 195 especies bacterianas y 69 especies de levaduras y mohos que se consideran MFC (Bourdichon et al., 2012).

2.2.1 Hongos

El número de especies pertenecientes al reino fungi utilizadas en la industria alimenticia ha crecido considerablemente. Algunas contribuciones para la expansión de los organismos vienen por los cambios taxonómicos y descubrimientos claves en las fermentaciones para la producción de alimentos. En los últimos años se han añadido 24 hongos a los MFCs: *Aspergillus*, *Cyberlindnera*, *Cystofilobasidium*, *Dekkera*, *Guehomyces*, *Hanseniaspora*, *Kazachstania*, *Lachancea*, *Lecanicillium*, *Metschnikowia*, *Mucor*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Scopulariopsis*, *Sporendonema*, *Starmerella*, *Torulaspora*, *Trigonopsis*, *Wickerhamomyces*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces*, y *Zygotorulaspora* (Bourdichon et al., 2012).

2.2.2 Bacterias

Entre múltiples variedades de microorganismos que intervienen en la industria alimentaria, las bacterias son parte clave de los MFCs, tanto por su variedad como por la mayor frecuencia de sus operaciones. Bajo condiciones favorables, son idóneos para duplicarse rápidamente a costa de los nutrientes de los alimentos, alterándolos o estrictamente persistiendo en ellos y, a veces, causando toxiinfecciones (In Food Quality, 2011).

El género *Lactobacillus* ya estaba ampliamente presente en el inventario inicial. Debido a su amplio uso en otras matrices de alimentos y el nuevo alcance del inventario, este es el género con el mayor número de cambios y ahora está representado por 82 especies las cuales se muestran en la Tabla 1 (Bourdichon et al., 2012).

Tabla 1.

Microorganismos pertenecientes a la industria alimentaria

| Phylum | Family | Genus | Species | |
|-------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|-----|
| Actinobacteria | <i>Bifidobacteriaceae</i> | <i>Bifidobacterium</i> | 8 | |
| | <i>Brevibacteriaceae</i> | <i>Brevibacterium</i> | 3 | |
| | <i>Corynebacteriaceae</i> | <i>Corynebacterium</i> | 4 | |
| | <i>Dermabacteraceae</i> | <i>Brachybacterium</i> | 2 | |
| | <i>Microbacteriaceae</i> | <i>Microbacterium</i> | 1 | |
| | <i>Micrococcaceae</i> | <i>Arthrobacter</i> | 4 | |
| | | <i>Kocuria</i> | 2 | |
| | | <i>Micrococcus</i> | 2 | |
| | | <i>Propionibacteriaceae</i> | <i>Propionibacterium</i> | 5 |
| | | <i>Streptomycetaceae</i> | <i>Streptomyces</i> | 1 |
| Actinobacteria—species | | | 32 | |
| Firmicutes | <i>Bacillaceae</i> | <i>Bacillus</i> | 3 | |
| | <i>Carnobacteriaceae</i> | <i>Carnobacterium</i> | 3 | |
| | | <i>Enterococcaceae</i> | <i>Enterococcus</i> | 3 |
| | | <i>Tetragenococcus</i> | 2 | |
| | <i>Lactobacillaceae</i> | <i>Lactobacillus</i> | 84 | |
| | | <i>Pediococcus</i> | 3 | |
| | <i>Leuconostocaceae</i> | <i>Leuconostoc</i> | 12 | |
| | | <i>Oenococcus</i> | 1 | |
| | | <i>Weissella</i> | 9 | |
| | <i>Staphylococcaceae</i> | <i>Macrococcus</i> | 1 | |
| | | <i>Staphylococcus</i> | 15 | |
| | <i>Streptococcaceae</i> | <i>Lactococcus</i> | 3 | |
| | | <i>Streptococcus</i> | 3 | |
| | Firmicutes—species | | | 142 |
| Proteobacteria | <i>Acetobacteraceae</i> | <i>Acetobacter</i> | 9 | |
| | | <i>Gluconacetobacter</i> | 9 | |
| | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Hafnia</i> | 1 | |
| | | <i>Halomonas</i> | 1 | |
| | <i>Sphingomonadaceae</i> | <i>Zymomonas</i> | 1 | |
| Proteobacteria—species | | | 21 | |
| Total number of species | | | 195 | |

Tomada de: Bourdichon et al., 2012

2.3 *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* se encuentra en dos principales ambientes, en el tracto gastrointestinal y en los productos lácteos. Estos microorganismos generalmente son Gram positivos, no motiles, no esporuladores y presentan una forma ovalada o redondeada, además son gran productoras de ácido láctico como producto final de un metabolismo fermentativo anaerobio (Anjum, Maqsood, Ahmad & Momin, 2014). Estas bacterias ácido-lácticas (LAB) son fermentadoras de azúcares que producen ácido láctico como producto final de la vía metabólica Embden Meyerhof Parnas (EMP). Existen dos tipos de LAB, las bacterias heterofermentativas son las que

producen finalmente ácido láctico, en conjunto de CO₂, peróxido de hidrógeno, ácido acético y alcohol. En contraste a esto, las bacterias homofermentativas producen ácido láctico como único producto final. Las LAB son divididas en tres grupos definidos por Kandler & Weiss en 1986 (Anjum et al., 2014):

- Grupo A: Especies homofermentativas estrictas las cuales no fermentan pentosas e incluyen 15 especies, como, *Thermobacterium*, *Lactobacillus delbrüeckii* y *Lactobacillus acidophilus*.
- Grupo B: Son bacterias heterofermentativas facultativas que tienen la capacidad metabólica de fermentar glucosa y sintetizar etanol, ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico. Dentro de este grupo se encuentran especies como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus sakei*.
- Grupo C: Especies heterofermentativas estrictas que producen ácido láctico y ácido acético como productos finales. Algunos ejemplos son *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, y *Lactobacillus reuteri*.

2.3.1 Propiedades de *Lactobacillus casei*

En la etapa inicial del descubrimiento de *L. casei* se lo clasificó en cuatro sub especies distintas: *L. casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *pseudopplantarum* (actualmente conocida como *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*), *L. casei* subsp. *rhamnosas* (ahora conocido como *L. rhamnosus*) y *L. casei* subsp. *toleons* (ahora conocido como *L. paracasei* subsp. *tolerans*) (Xuedong & Li, 2015). *L. casei* posee una naturaleza heterofermentativa facultativa, es Gram-positiva y anaerobia facultativa, además, es comúnmente conocida por su gran capacidad para producir ácido láctico (Zhao & Liu, 2007).

La cepa ATCC393 (*L. casei* subsp. *casei*) contiene de 45% a 47% de guaninas y citocinas en su ADN genómico. Esta bacteria coloniza principalmente el intestino, la boca y la vagina de los seres humanos, así mismo, se encuentra presente en los productos lácteos. *L. casei* es característico por formar colonias blancas y lisas de 1 mm de diámetro (Xuedong & Li, 2015).

L. casei presenta un elevado valor comercial debido a su amplio espectro en la industria alimenticia y farmacéutica. Este microorganismo ha sido de gran interés debido a su naturaleza probiótica en relación con sus propiedades antimicrobianas. Inclusive se ha demostrado que presentan efectos anti-mutagénicos, presentan una relación con los niveles de colesterol, el sistema inmunológico y los niveles de azúcar en la sangre (Aguirre-Ezkauriatza, Aguilar-Yáñez, Ramírez-Medrano, & Alvarez, 2010).

2.3.2 *L. casei* en la producción alimenticia

Existe una tendencia en cuanto a la salud alimenticia, la población tiende a consumir alimentos que provean beneficios frente a distintos desordenes relacionados a la salud. La mayoría de estudios apuntan a organismos benéficos a la salud, como se mencionaron previamente, bacterias ácido-lácticas de naturaleza probiótica como es el *L. casei*. Estos microorganismos optimizan el potencial nutritivo de los alimentos y las ventajas alimenticias, consecuentemente, incrementan su mercado (Anjum et al., 2014)

2.3.3 Productos lácteos producidos por *L. casei*

Varias cepas ácido-lácticas pertenecientes a esta especie son añadidas intencionalmente a los productos lácteos y sus derivados; estos microorganismos son introducidos por intereses tecnológicos y probióticos. Como se mencionó anteriormente, las matrices iniciales para el mantenimiento y la reproducción de *L.*

casei han sido leches fermentadas y yogurt, así, confiriendo propiedades probióticas a dichos alimentos.

Por consiguiente, se han buscado nuevos alimentos en los cuales puedan desarrollarse estos microorganismos. Actualmente el queso es una de las matrices mayormente utilizadas debido a su acidez limitada, su capacidad de buffering y el bajo nivel de oxígeno requerido. El queso es una fuente ideal de grasa y la proteína que permite la supervivencia de los probióticos durante la producción, el almacenamiento y durante el contacto con los ácidos gástricos al momento del consumo (Di Lena, Quero, Santovito, Verran, De Angelis & Fusco, 2015).

2.4 Enzimas

Según la Unión Internacional de la Bioquímica (IUB, por sus siglas en ingles), y basado en sus reacciones, las enzimas están clasificadas en seis divisiones: oxidorreductasas, transferasas, liasas, isomerasas y ligasas. El uso de enzimas en procesos industriales han sido herramientas claves en los procesos industriales, debido a su actividad catalítica para eliminar el uso de temperaturas elevadas, regular condiciones de acidez y alcalinidad, suprimir el uso de solventes orgánicos. A partir de estos procesos catalíticos ha permitido a la industria ofrecer productos y residuos con una menor toxicidad, una alta especificidad a los sustratos, productos de alta pureza y reducción en el impacto ambiental (Liu & Kokare, 2016).

Los microorganismos son el mayor referente frente a la producción de enzima, aproximadamente se han reportado 50 microorganismos GRAS utilizados para la síntesis enzimática. La gran ventaja que presentan los microorganismos frente a otras vías de producción enzimática es el crecimiento acelerado de estos en un período de tiempo mínimo. La producción enzimática microbiana resulta un proceso económico debido a la síntesis en gran escala, sustratos económicos y ciclos de fermentación cortos. Frente a la gran importancia de la síntesis de enzimas en la

industria se ha identificado más de 3000 enzimas, sin embargo, únicamente el 5% son usadas comercialmente (Sánchez & Demain, 2016).

Bacterias, Actinomicetos y hongos sintetizan una vasta variedad de enzimas intracelulares y extracelulares que son atractivas para fines comerciales e industriales, entre estas enzimas microbianas se encuentran amilasas, pectinasas, celulasas, lipasas, lacasas, inulasas, lactasas, entre otras. Estas moléculas biocatalíticas tienen una alta especificidad y resultan en la formación de reacciones estereoquímicas y regio-químicas con una aceleración de 10^5 a 10^8 . Entre las enzimas industriales 15% de aquellas son producidas a partir de plantas, 35% a partir de bacterias y los hongos acarrean el 50% del mercado. Los microorganismos llevan varias ventajas, comparándolas con enzimas producidas por plantas y animales. En primer lugar, las enzimas microbianas son mucho más estables, presentan una actividad enzimática elevada y su producción es mucho más económica (Fernandes & Carvalho, 2016).

Si bien, los beneficios de la producción industrial de enzimas es clave para el desarrollo de una economía sustentable y un medio ambiente sostenible, solo 20 enzimas son verdaderamente producidas en una escala industrial, inclusive, el 75% de las enzimas producidas a nivel mundial son producidas por tres compañías internacionales Novozymes, DuPont y Roche. El mercado es altamente competitivo, especialmente para países menos desarrollados, ya que se han desarrollado varias herramientas de edición genómica, herramientas enfocadas en la metabólica, proteómica y procesos avanzados de recuperación para optimizar la producción enzimática y la eficiencia de los bioprocesos (Liu & Kokare, 2016; Wan & Xia, 2015). Las aplicaciones industriales para enzimas microbianas han crecido enormemente en los últimos años. Por ejemplo, el valor estimado de las ventas mundiales de enzimas industriales para los años 2012, 2013 y 2015 es de \$ 1 millón, \$ 3 mil millones y \$ 3.74 mil millones, respectivamente (Liu & Kokare, 2016). Cabe recalcar que la industria alimenticia representa el mercado más amplio para el uso de

enzimas industriales; algunos ejemplos se pueden observar en la Figura 2 (Liu & Kokare, 2016).

Tabla 2.

Enzimas y su uso industrial

| | | | |
|----------------|-----------------------------------|---|--|
| Dairy | Acid proteinase | Milk coagulation | <i>Aspergillus</i> sp. |
| | Neutral proteinase | Faster cheese ripening, debittering | <i>Bacillus subtilis</i> , <i>A. oryzae</i> |
| | Lipase | Faster cheese ripening, flavor customized cheese, | <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> |
| | Lactase (β -galactosidase) | Lactose reduced milk and whey products | <i>Escherichia coli</i> , <i>Kluyveromyces</i> sp. |
| | Aminopeptidase | Faster cheese ripening | <i>Lactobacillus</i> sp. |
| Baking | catalase | Cheese processing | <i>Aspergillus niger</i> |
| | Transglutaminase | Protein cross linking | <i>Streptomyces</i> sp. |
| | Amylase | Flour adjustment, bread softness | <i>Aspergillus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. |
| | Maltogenic α -Amylase | Enhance shelf life of breads | <i>Bacillus stearothermophilus</i> |
| | Xylanase | Dough conditioning | <i>Aspergillus niger</i> |
| Beverage | Lipase | Dough stability and conditioning | <i>Aspergillus niger</i> |
| | Glucose oxidase | Dough strengthening | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> |
| | Transglutaminase | Laminated dough strength | <i>Streptoverticillium</i> sp., <i>streptomyces</i> sp. |
| | Pectinase | Depectinization | <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> |
| | Glucose oxidase | Oxygen removal from beer | <i>Aspergillus niger</i> |
| Animal feed | Cellulase | Fruit liquefaction | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> |
| | α -Amylase | Starch hydrolysis | <i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> |
| | β -Amylase | Starch hydrolysis | <i>Bacillus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Rhizopus</i> |
| | β -Glucanase | Restrict haze formation | <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus</i> spp. |
| | protease | Restrict haze formation | <i>Aspergillus niger</i> |
| | Pullulanase | Starch saccharification | <i>Bacillus</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp. |
| | Naringinase | Debittering | <i>Aspergillus niger</i> |
| | limoninase | Debittering | <i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> |
| | Aminopeptidases | Protein breakdown during mashing | <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. plantarum</i> |
| | Phytase | Hydrolyze phytic acid to release phosphorous | <i>Aspergillus niger</i> |
| Pulp and paper | Xylanase | Enhanced digestibility of starch | <i>Aspergillus</i> sp., <i>Bacillus</i> sp. |
| | β -glucanase | Digestive aid | <i>Aspergillus niger</i> |
| | Lipase | Pitch control | <i>Candida Antarctica</i> |
| | Protease | Biofilm removal | <i>Bacillus subtilis</i> |
| | Amylase | Deinking, drainage improvement | <i>Bacillus licheniformis</i> |
| Polymer | Xylanase | Bleach boosting | <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Thermomyces lanuginosus</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> |
| | Laccase | Non-chlorine bleaching, delignification | <i>Bacillus subtilis</i> |
| | Cellulase | Deinking, drainage improvement | <i>Bacillus</i> sp., <i>Aspergillus niger</i> |
| | Lipase | Polycondensation, ring-opening polymerization of lactones, carbonates | <i>Candida Antarctica</i> |
| | Laccase | Polymerization of bisphenol A | <i>Trametes hirsuta</i> |
| Detergent | Glucose oxidase | Polymerization of anilines | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> |
| | Transglutaminase | Crosslinking of protein | <i>Streptomyces mobaraensis</i> |
| | Tyrosinase | Polymerization of lignin and chitosan | <i>Trichoderma reesei</i> |
| | Amylase | Carbohydrate stain removal | <i>Aspergillus</i> sp., <i>Bacillus subtilis</i> |
| | Lipase | Fat stain elimination | <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus subtilis</i> |
| Detergent | Protease | Protein stain removal | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus</i> sp. |
| | Cellulase | Color clarification | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus</i> sp. |
| | Cutinase | Triglyceride removal | <i>Fusarium solani f. pisi</i> |

Tomada de: Singh, Kumar, Mittal & Mehta, 2016

2.5 Enzimas en la Industria Alimenticia

El Departamento de Asuntos Económicos y Sociales de las Naciones Unidas (UNDESA) estima que la población mundial crezca de 6900 millones a 9100 millones y que la demanda de alimentos aumente en un 70% para el 2050. El conocimiento avanzado sobre las enzimas y su papel en el desarrollo de alimentos

ha permitido optimizar la manufactura de los mismos y desarrollar un mercado más sostenible con alimentos de alta calidad y seguros para el consumo humano (Singh et al., 2016).

La producción de alimentos a partir de reacciones enzimáticas se ha realizado por miles de años, los ejemplares más antiguos y típicos son: la elaboración de cerveza, queso, pan y vino, incluso, cuando no se conocía que es lo que producían dichas fermentaciones. Actualmente las enzimas microbianas son usadas para el procesamiento de alimentos para mejorar o conferir distintas características organolépticas. Distintas clases de enzimas son aplicadas en la industria de alimentos, pero las hidrolasas son las más destacadas (Fernandes & Carvalho, 2016). Actualmente, el mercado de alimentos y bebidas se encuentra dominado por la industria biotecnológica, en conjunto de la producción de enzimas microbianas y se proyecta que tendrá un valor de 2.3 billones de dólares para el 2020. La producción de enzimas se encuentra sub-segmentada en diferentes áreas de producción; horneado, lácteos, jugos, fermentaciones, nutracéuticos, entre otros (Singh et al., 2016).

2.5.1 Proteasas

El procesamiento de la leche ha sido una tradición muy antigua desde que se elaboró el queso, uno de los procesos más significativos es el uso de cuajo. El cuajo es una preparación llena de proteasas el cual produce la separación de proteínas produciendo una especie de coagulación de la leche, así, formándose el queso. Específicamente, el cuajo hidroliza k-caseína y libera de su región hidrófila terminal, caseinomacropeptido (CMP) (Fernandes & Carvalho, 2016).

2.5.2 Lipasas

Las lipasas se usan para acelerar la maduración del queso y modificar las propiedades organolépticas, como resultado de su acción lipolítica que libera ácidos grasos. Sin embargo, una acción lipolítica excesiva puede conducir a olores no deseados. Las lipasas también afectan la estructura del queso, permitiendo eventualmente un producto con una textura más suave (Madeira et al., 2016). Las enzimas lácteas se utilizan para la producción de queso, yogurt y otros productos lácteos.

2.5.3 Lactasas

La lactasa es otra enzima relevante en la industria láctea, esta promueve la hidrólisis de la lactosa en la leche, rompiendo los enlaces glucosídicos para obtener monosacáridos. En consecuencia, permite el desarrollo del mercado lácteo teniendo un alcance en ciertas poblaciones que presentan trastornos intestinales como la intolerancia a la lactosa. Por otra parte, la hidrólisis de la lactosa resulta en el incremento de la dulzura de la leche debido a las características de los monosacáridos resultantes, esto permite la reducción de costos en la producción de leches azucaradas ya que no se necesita endulzantes adicionales. Además, la lactasa es utilizada para procesar el suero de leche, este inicialmente se utilizado para alimentar animales, como fertilizante o simplemente ser desechado en las alcantarillas, generando un alto impacto ambiental. La capacidad hidrolítica de la lactosa en el suero de leche permite la producción de jarabes endulzantes, usados en postres lácteos, helados como también alimento para animales.

Actualmente se utiliza este residuo como sustrato en bioprocesos justamente para la producción de enzimas (Fernandes & Carvalho, 2016).

2.6 β – galactosidasa

La β – galactosidasa o lactasa es un tetrámero con cuatro cadenas polipeptídicas idénticas, como se muestra en la Figura No. 1, compuesto de 1023 aminoácidos. Dentro de cada monómero se encuentran cinco dominios estructurales bien definidos. El dominio central (residuos de 334-627) es llamado isomerasa fosfato (TIM) o barril $\alpha_3\beta_8$. La galactosa tiene tres actividades enzimáticas principales. En primer lugar, tiene una actividad hidrolítica en la cual rompe los enlaces glucosídicos de la lactosa, resultando en dos monosacáridos, glucosa y galactosa. En segundo lugar, la enzima puede catalizar la transgalactosilación de lactosa a alolactosa y, en tercer lugar, la alolactosa se puede escindir a los monosacáridos. Así, la alolactosa que se une al represor lacZ y crea el ciclo de retroalimentación positiva que regula la cantidad de β -galactosidasa en la célula (Juers, Matthews, & Huber, 2012).

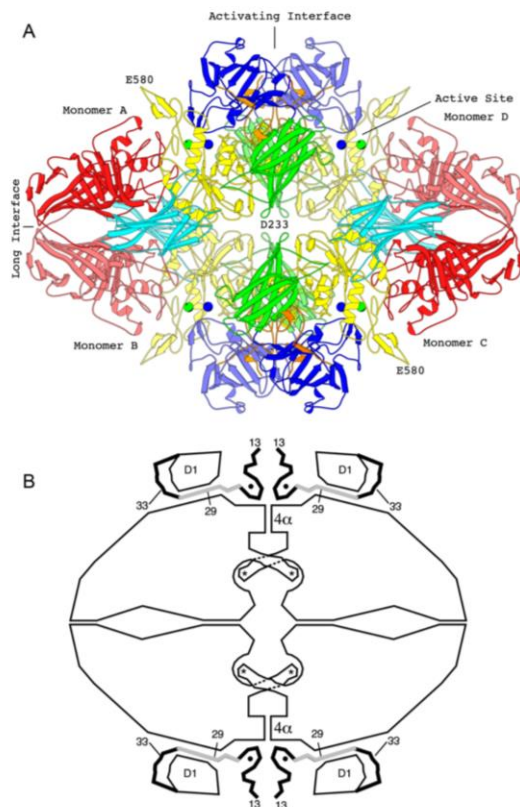


Figura 1. La estructura tetrámera de b-galactosidasa.

Tomada de: Juers et al., 2012

2.7 Aplicaciones:

2.7.1 Galacto-oligosacáridos

A parte de la hidrólisis mediada por la lactasa, estas juegan un papel fundamental en la síntesis de oligosacáridos no digeribles compuestos de 2 a 10 residuos de galactosa con un residuo terminal de glucosa, denominados, galacto-oligosacáridos (GOS). Estos azúcares son de suma importancia en la producción de suplementos infantiles, ya que estas imitan los oligosacáridos provenientes de la leche humana. Varios estudios sugieren que GOS, en conjunto con fructooligosacáridos (FOS), poseen una actividad prebiótica estimulando la flora intestinal de infantes alimentados con fórmula. Según la FAO las fórmulas que contienen mezclas de GOS y FOS presentan grandes beneficios digestivos para infantes desde 5 meses (Ackerberg, Labuschagne, & Lombard, 2012). Los GOS son sintetizados a partir de una reacción de transgalactosilación (Figura 2), donde la lactosa sirve como un receptor. Dentro de la síntesis de GOS se utiliza principalmente suero de leche como materia prima, donde la concentración de lactosa puede ajustarse adecuadamente, en lugar de leche, debido a la concentración relativamente baja de lactosa en este último, 5% (p / v) (Del, 2016).

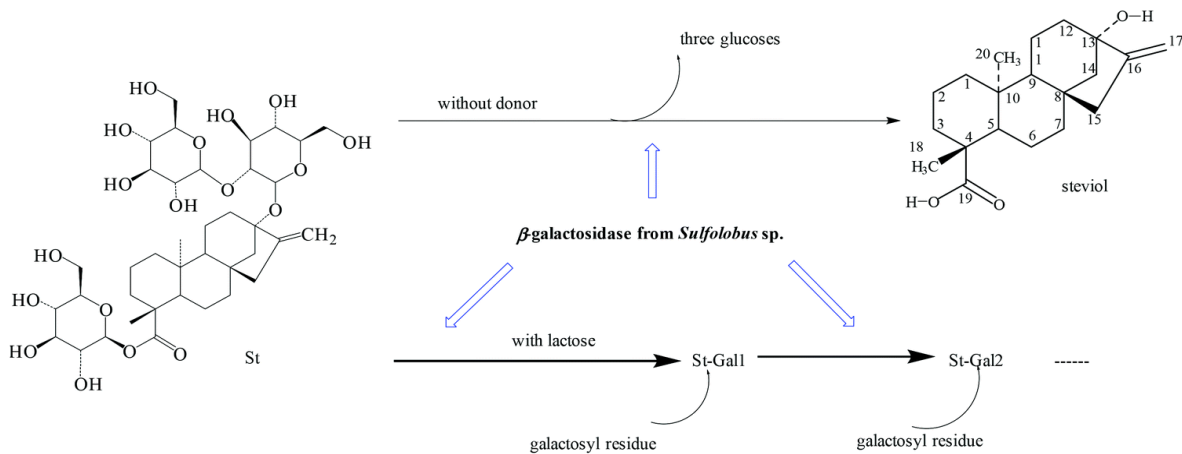


Figura 2. Transgalactosilación

Tomada de Wan & Xia, 2015

2.7.2 Leche Deslactosada

La leche juega un papel importante en la dieta humana ya que representa un porcentaje significativo de minerales, vitaminas, lípidos, azúcares y proteínas. Su contribución en la ingesta de calcio es de gran importancia en el desarrollo de huesos en niños y adultos. La leche de vaca generalmente contiene 5% de lactosa, un disacárido compuesto por glucosa y galactosa. Este disacárido puede ser descompuesto mediante la hidrólisis mencionada con anterioridad obteniendo azúcares simples para la digestión óptima de las mismas. En años recientes, el uso de leche deslactosada ha incrementado debido a la concientización de condiciones intestinales como la intolerancia a la lactosa. Dependiendo del proceso, ya sea, remoción de lactasa mediante un proceso físico o enzimático pueden diferir de la composición de los carbohidratos (Ohlsson et al., 2017).

2.7.3 Suero de leche

Las plantas industriales de productos lácteos generan volúmenes elevados de un líquido residual denominado “suero de leche”. Este suero es la porción líquida

excretada al momento de la elaboración del queso o durante la coagulación de la caseína. Se estima que se producen aproximadamente 190 millones de toneladas por año a nivel mundial (Yadav et al., 2015).

2.7.4 Caracterización del Suero de Leche

Como se mencionó previamente el suero de leche es un líquido amarillento que resulta de la precipitación de la caseína, específicamente, el color amarillo es causado por la presencia de riboflavina o vitamina B2. Una característica clave del suero es que alrededor del 90% de la lactosa de la leche forma parte del suero después del procesamiento del queso, confiriéndole propiedades importantes para su uso como sustrato. Se estima que el suero de leche contiene alrededor de 39 – 60 kg/m³ de lactosa. El contenido de lípidos y proteínas son relativamente altos, contienen valores de 0.99 – 10.58 kg/m³ y 1.4 - 8.0 kg/m³, respectivamente. La presencia de sales minerales en el suero de leche corresponde a 0.46 - 10%, (principalmente NaCl y KCl y sales de calcio) (Prazeres, Carvalho, & Rivas, 2012)

2.7.5 Impacto Ambiental.

El suero de leche es considerado un producto residual con un gran impacto ambiental en caso de no ser tratado correctamente. El parámetro que caracteriza a este residuo es la alta cantidad de materia orgánica que contiene, estos efluentes lácteos son monitoreados mediante la demanda biológica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO) (Prazeres et al., 2012). La DBO y la DQO se valúa entre 27000 - 60000 ppm y 50000 -120000 ppm, respectivamente (Yadav et al., 2015). El alto contenido orgánico se debe a la presencia de carbohidratos provenientes de la leche como lactosa y glucosa, y proteínas como la caseína; adicionalmente contiene un lípido y otros nutrientes como nitrógeno y fósforo (Prazeres et al., 2012).

El desecho del suero de leche en alcantarillas ha sido prohibido por muchos gobiernos ya que interrumpe el tratamiento de desechos biológicos en las plantas de tratamientos de agua. Al momento de desechar el suero de leche en el suelo afecta a las características fisiológicas y químicas del mismo, resultando en la disminución del rendimiento de cultivos. Además, al descargar en cuerpos de agua, produce una reducción del oxígeno disuelto, obstaculiza la biodegradabilidad y ocasiona riesgo para las especies acuáticas y la salud humana. La biodegradabilidad del suero de leche y sus componentes son arduos de degradar y crean una dificultad significativa a las plantas de tratamiento de aguas residuales en el tratamiento de otros efluentes. Por lo tanto, se requiere una gestión adecuada de suero de leche, que sería económico y *ecológico*, antes de su eliminación (Yadav et al., 2015).

3. CAPITULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

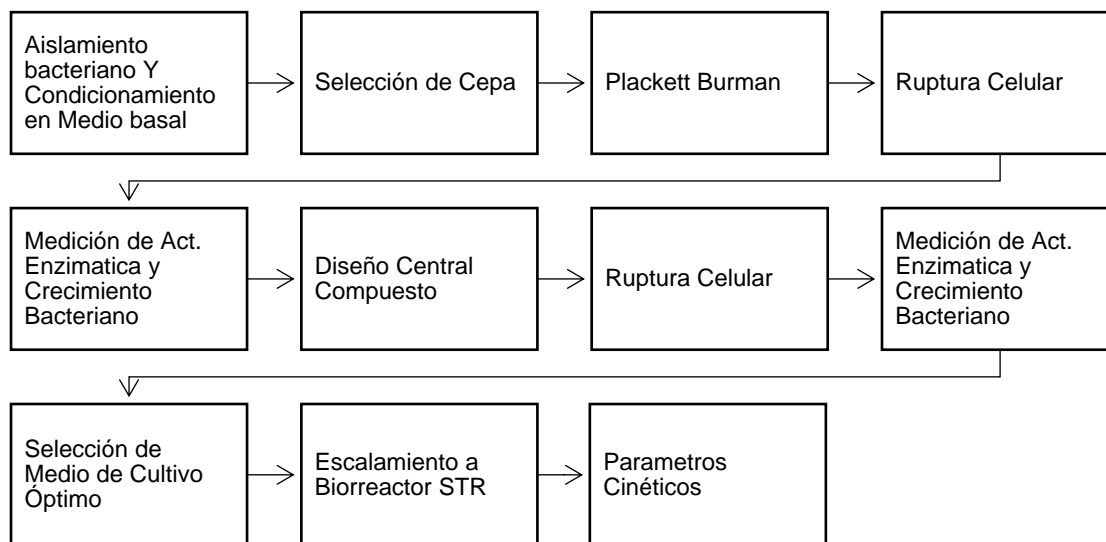


Figura 3. Diagrama de flujo de producción de lactasa

3.1 Diseño Experimental Plackett-Burman

En la primera etapa, se implementó un Plackett Burman con el fin de obtener las variables significativas que condicionan el crecimiento celular y la actividad

enzimática. Para esto se varió la concentración de sulfato de magnesio ($MgSO_4$), sulfato de manganeso ($MnSO_4$), Zn, Triptófano, Glicina, Sulfato de amonio y la concentración de suero de leche para cada tratamiento.

Se utilizó el software Statistica™ para realizar un modelo Plackett-Burman 7^*12 , de esta manera se experimenta con 7 variables ($MgSO_4$, $MnSO_4$, Zn, Glicina, Triptófano, Extracto de Levadura y Lactasa) como se muestra en la Tabla No. 3. Posteriormente se procedió a optimizar las condiciones de cultivo, mediante el software Statistica™, evaluando las variables más significativas del análisis previo. Se utilizan las variables de bajo (-1) a alto (+1) para estudiar el efecto de las variables independientes en la producción.

Para este procedimiento se mantuvo una temperatura estable de $35\text{ }^\circ\text{C}$ y un pH de 6.5, en conjunto de una agitación continua. Dentro de esta etapa inicial se realizaron tres repeticiones correspondientes a cada uno de los tratamientos.

Tabla 3.

Matriz del diseño experimental Plackett-Burman

| Tratamientos/Factores | X1 | X2 | X3 | X4 | X5 | X6 | X7 |
|------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| T1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 |
| T2 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 |
| T3 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 | -1 |
| T4 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | -1 |
| T5 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| T6 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 |
| T7 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 |
| T8 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 |
| T9 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 |
| T10 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 | 1 |

| | | | | | | | |
|------------|----|----|----|----|----|----|----|
| T11 | -1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 |
| T12 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 |

NOTA: X1: Suero de Leche; X2: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; X3: MgSO_4 ; X4: MnSO_4 ; X5: Glicina; X6: Triptófano; X7: Sulfato de Zinc

A continuación, se muestran los valores decodificados del Plackett-Burman expuesto con anterioridad.

Tabla 4.

Factores experimentales para el diseño Plackett-Burman

| | Valor Máximo (+) | Valor Mínimo (-) |
|--|-------------------------|-------------------------|
| Suero de Leche | 4% | 2% |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 11.99 g L ⁻¹ | 5 g L ⁻¹ |
| MgSO_4 | 2 g L ⁻¹ | 0.6 g L ⁻¹ |
| MnSO_4 | 0.08 g L ⁻¹ | 0.025 g L ⁻¹ |
| ZnSO_4 | 7.5 g L ⁻¹ | 3 g L ⁻¹ |
| Glicina | 0.06% | 0.02% |
| Triptófano | 0.06% | 0.02% |

3.2 Diseño Central Compuesto

Para la optimización del crecimiento microbiano y la producción de lactasa se realiza un modelamiento estadístico denominado diseño central compuesto, en el cual las variables independientes del estudio utilizadas fueron las concentraciones de suero de leche, MnSO_4 y MnSO_4 . En contraste, las variables dependientes fueron: la actividad enzimática y la concentración de biomasa.

Cabe recalcar que los valores de +1 y -1 de los iones metálicos, Mg^{+2} y Mg^{+2} fueron tomados un diseño propuesto por Venkateswarulu, Prabhakar & Kumar (2017). Además, el valor central del suero de leche fue tomado de un estudio realizado por Panesar, Kennedy, Knill & Kosseva (2010).

Utilizando el software STATISTICA se obtuvo la matriz propuesta en la Tabla No.5, consecuentemente, el resultado de los tratamientos se obtiene gracias a los análisis estadísticos y el gráfico de superficie de respuesta que genera el software (Vasiljevic & Jelen, 2001).

Tabla 5.

Matriz del Diseño Central Compuesto

| N. Experimento | Suero de Leche ($p v^{-1}$) | | $MgSO_4$ ($g L^{-1}$) | | $MnSO_4(g L^{-1})$ | |
|----------------|-------------------------------|--------------|-------------------------|--------------|--------------------|--------------|
| | Codificado | Decodificado | Codificado | Decodificado | Codificado | Decodificado |
| 1 | -1.00 | 2.00 | -1.00 | 2.00 | -1.00 | 0.025 |
| 2 | -1.00 | 2.00 | -1.00 | 2.00 | 1.00 | 0.080 |
| 3 | -1.00 | 2.00 | 1.00 | 6.00 | -1.00 | 0.025 |
| 4 | -1.00 | 2.00 | 1.00 | 6.00 | 1.00 | 0.080 |
| 5 | 1.00 | 4.00 | -1.00 | 2.00 | -1.00 | 0.025 |
| 6 | 1.00 | 4.00 | -1.00 | 2.00 | 1.00 | 0.080 |
| 7 | 1.00 | 4.00 | 1.00 | 6.00 | -1.00 | 0.025 |
| 8 | 1.00 | 4.00 | 1.00 | 6.00 | 1.00 | 0.080 |
| 9 | -1.68 | 1.32 | 0.00 | 4.00 | 0.00 | 0.050 |
| 10 | 1.68 | 4.68 | 0.00 | 4.00 | 0.00 | 0.050 |
| 11 | 0.00 | 3.00 | -1.68 | 0.64 | 0.00 | 0.050 |
| 12 | 0.00 | 3.00 | 1.68 | 7.36 | 0.00 | 0.050 |
| 13 | 0.00 | 3.00 | 0.00 | 4.00 | -1.68 | 0.008 |
| 14 | 0.00 | 3.00 | 0.00 | 4.00 | 1.68 | 0.092 |
| 15 | 0.00 | 3.00 | 0.00 | 4.00 | 0.00 | 0.050 |

| | | | | | | |
|----|------|------|------|------|------|-------|
| 16 | 0.00 | 3.00 | 0.00 | 4.00 | 0.00 | 0.050 |
| 17 | 0.00 | 3.00 | 0.00 | 4.00 | 0.00 | 0.050 |
| 18 | 0.00 | 3.00 | 0.00 | 4.00 | 0.00 | 0.050 |

4. CAPITULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1 Población y muestra

Se utilizó una cepa inicial de *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* proporcionadas por el laboratorio de biotecnología industrial de la Universidad de las Américas.

4.2 Preparación del Inóculo Inicial

Inicialmente se preparó medios de 150 mL de medio MRS para conservar poblaciones representativas de las bacterias mencionadas anteriormente. El pH del medio se ajustó a 6.5 antes de la esterilización y se inoculó agregando 10 mL de una solución salina que tiene una densidad óptica de 1 a 600 nm.

Posteriormente se acondicionó a los microorganismos a un medio modificado en referencia a las condiciones de cultivo propuestas por Hsu, Yu & Chou (2005) con las siguientes características: Lactosa 10 g L⁻¹, Extracto de Levadura 20 g L⁻¹, Peptona 10 g L⁻¹, K₂HPO₄ 3 g L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g L⁻¹, MgSO₄ 0.5 g L⁻¹. Se realizó este proceso con el fin de acondicionar al *L. casei*, *L. acidophilus* y *B. subtilis* a un medio donde su única fuente de carbono sea lactosa.

4.3 Selección de Cepa

Se preparó 150 mL del medio modificado propuesto por Hsu et al. (2005) para cada bacteria propuesta. Posteriormente se inoculó con el 20% del medio desarrollado

para la conservación de cepas. A continuación, se incubó (Shaking Incubator BJPX-2012 BioBase) las diferentes bacterias por 24 h a 37 °C y 140 rpm.

Una vez culminadas las 24 h de incubación se midió la densidad óptica de los distintos cultivos agregando 1 mL del cultivo a una celda espectrofotométrica y se analizó en el espectrofotómetro (Thermo Scientific Evolution 201) a 600 nm.

Además, se calculó la actividad enzimática de la lactasa sintetizada por *L. casei*, *L. acidophilus* y *B. subtilis*. Se conoce por fuentes bibliográficas que la β -galactosidasa sintetizada por estos microorganismos es intracelular por lo tanto es necesario un método de ruptura celular para extraer las enzimas (Akolkar, Sajgure & Lele, 2005; Vasiljevic, 2001). Consecuentemente, se realizó una disrupción celular mediante ultrasonido con un sonicador (Thermo Scientific). Inicialmente se realizaron dos lavados con un buffer fosfato (0.1 M, pH 7.2), a continuación, se resuspendió el pellet para el proceso de sonicación. Dicho proceso se realizó con una amplitud de 40 % por 4 min (Bury, Jelen & Kaláb, 2001). Cabe recalcar que el proceso se llevó a cabo en un baño de hielo y se realizó pausas de 1 min para evitar la desnaturalización de las enzimas. Posteriormente se centrifugó (SIGMA ® 3-18KS) la muestra a 10 000 rpm por 10 min a 4 °C para eliminar los restos celulares. Para concluir se añadió 0.8 mL de la muestra y 0.2 mL de ONPG (4 mg mL^{-1}) a la celda y se midió la absorbancia a 420 nm en el espectrofotómetro.

Finalmente, se complementa la selección de cepa con un análisis de proteínas totales por medio de la reacción de Biuret. Para la obtención de las proteínas totales se realizó el mismo proceso de sonicación mencionado anteriormente exceptuando la eliminación de los restos celulares. Para la medición de las proteínas se utilizó un *Micro-plate reader* (BioTek®), se añadió 40 μL de la muestra, a la cual se adicionó 160 μL del reactivo de Biuret. Seguidamente, se cuantificó las proteínas a 540 nm.

4.4 Curva de Calibrado de ONPG (Orto-nitrofenil- β -galactósido)

Para la determinación de la actividad enzimática es necesario conocer la concentración del ONPG hidrolizado, por lo tanto, se preparó una solución inicial de 4 mg mL^{-1} y se añadió β - galactosidasa para la hidrolisis total del compuesto. Se dejó reaccionar completamente durante 24 h para obtener una concentración conocida de ONP (Orto-nitrofenil). Consecuentemente se realizó una curva de calibrado que relaciona la absorbancia (nm) frente a la concentración de ONP (mg mL^{-1}). Se realizaron las diluciones que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6.

Diluciones para la curva de calibrado de ONP

| Dilución | ONP (mg mL^{-1}) |
|-----------------|---|
| 1 | 4 |
| 2 | 3.6 |
| 3 | 3.2 |
| 4 | 2.8 |
| 5 | 2.4 |
| 6 | 2 |
| 7 | 1.6 |
| 8 | 1.2 |
| 9 | 0.8 |
| 10 | 0.4 |

4.5 Curva de Calibrado de Proteínas Totales

De igual manera se realizó una curva de calibrado que corresponde a la absorbancia (nm) y su relación con la concentración de proteínas totales (mg mL^{-1}). Se realizaron diluciones que se observan en la Tabla No. 7.

Tabla 7.

Diluciones para la curva de calibrado de proteínas totales.

| Diluciones | Agua (mL) | BSA (mg) | Biuret (mL) |
|-------------------|------------------|-----------------|--------------------|
| 1 | 66.6 | 0 | 133.33 |
| 2 | 60 | 6.6 | 133.33 |
| 3 | 53.3 | 13.3 | 133.33 |
| 4 | 46.6 | 20 | 133.33 |
| 5 | 40 | 26.6 | 133.33 |
| 6 | 33.3 | 33.3 | 133.33 |

4.6 Curva de Calibrado de Biomasa

Se elaboró una curva de calibrado la cual relaciona la concentración de la biomasa (mg mL^{-1}) con la absorbancia (nm) medida en el espectrofotómetro. Inicialmente se incubó el medio durante 72 h para obtener una concentración de biomasa significativa. Se realizaron las diluciones expuestas en la Tabla No. 7, a continuación, se toman 2 alícuotas de cada punto. Se tomó 1 mL de la muestra y se mide la absorbancia en el espectrofotómetro (Thermo Scientific) a 600 nm. Posteriormente la segunda alícuota de 5 mL se centrifuga y se realizan tres lavados con agua destilada. La muestra se resuspende en agua destilada y se seca a 80°C por 72 h dentro de la estufa; las muestras deben ser pesadas posteriormente en los capuchones.

Tabla 8.

Diluciones para la curva de calibrado de biomasa.

| Medio Inoculado (mL) | Agua Destilada (mL) |
|---------------------------------|----------------------------|
| 1 | 9 |
| 2 | 8 |
| 3 | 7 |
| 4 | 6 |
| 5 | 5 |
| 6 | 4 |
| 7 | 3 |
| 8 | 2 |
| 9 | 1 |

4.7 Curva de Crecimiento, Curva de Producto y Curva de proteínas totales.

Se preparó un medio de cultivo con las concentraciones positivas expuestas en la Tabla No.3. Se inoculó el 20% con un medio madre modificado propuesto por Hsu et al. (2005) y se incubó (Shaking Incubator BJPX-2012 BioBase) en un período de 72 h a 37 °C con una rotación de 140 rpm.

Cada 2 h se midió la absorbancia del medio a 600 nm para obtener la concentración celular a medida que transcurre el tiempo. Para este proceso se toma 1 mL del medio y se mide en el espectrofotómetro (Thermo Scientific Evolution 201).

Adicionalmente se mide la actividad enzimática de la β -galactosidasa cada 4 h en un lapso de 72 h. Para la medición de la actividad enzimática se sigue el proceso

mencionado en el punto 4.3., se realiza una sonicación a 40% de amplitud durante 4 min con intervalos de 1 min de descanso.

Finalmente se realiza un análisis de proteínas totales por medio de la reacción de Biuret. Para la obtención de las proteínas totales se realizó el mismo proceso de sonicación mencionado anteriormente exceptuando la eliminación del debris celular. Para la medición de las proteínas se utilizó un *Micro-plate reader* (BioTek®), se añadió 40 μ L de la muestra, a la cual se adicionó 160 μ L del reactivo de Biuret. Seguidamente, se cuantificó las proteínas a 540 nm

4.8 Selección de las variables influyentes mediante el análisis del Plackett-Burman

Para generar la matriz del Plackett-Burman se hizo uso del software STATISTICA, en consecuencia, se introdujeron las 7 variables para generar la matriz expuesta en la Tabla No. 3. Se prepararon 50 mL de los tratamientos expuestos en la matriz por triplicado, posteriormente, se inocularon con el 20 % de un inóculo madre y se incubó los tratamientos por 36 h. A continuación, se realizó una cuantificación de proteínas por el método de Biuret y se midió en un Microplate reader (BioTek®) a 540 nm. Además, se realizó la medición de la actividad enzimática de la lactasa con el protocolo de disrupción celular mencionado previamente. Se midió la hidrólisis del ONPG a 420 nm en el espectrofotómetro. Adicionalmente se midió la absorbancia del cultivo celular a 600 nm en el espectrofotómetro. Finalmente se obtuvo las concentraciones y la actividad enzimática gracias a las curvas de calibrado pertinentes, en consecuencia, se analizaron los resultados en el software STATISTICA mediante diagramas de Pareto y un ANOVA.

4.9 Desarrollo de Diseño Central Compuesto

Se eligen los datos más significativos provenientes el diseño Plackett-Burman para la producción de biomasa y la obtención de la enzima lactasa. Se generó un diseño

central compuesto para la optimización del medio de cultivo como se presenta en la Tabla No. 5, en el cual, se exponen distintos tratamientos donde varían las concentraciones del Suero de Leche, $MgSO_4$, $MnSO_4$. Cabe recalcar que los tratamientos fueron suplementados con concentraciones estables de nitrato de amonio y sulfato de zinc. De esta manera los tratamientos se prepararon por triplicado y se inoculó con un 20 % del volumen del medio madre en cada uno de los tratamientos.

Inicialmente se realizó una centrifugación de 1 mL de la muestra tomada a la hora 36. Se centrifugó a 10000 rpm, a 4 °C durante 10 min en una centrífuga refrigerada (Sigma, E.E.U.U). Posteriormente se desechó el sobrenadante y se diluyó el pelet en 1 mL de buffer fosfato. A continuación, se centrifugó con las condiciones previas y se realizaron dos lavados con buffer fosfato.

Para la ruptura celular se realizó con la ayuda de un sonicador Fischer Scientific, E.E.U.U. La muestra se colocó en un baño de hielo con etanol 99% para mantener la temperatura de la muestra. La sonicación se realizó durante 4 min con una amplitud de 40 % como se menciona previamente.

La actividad de lactasa se determina con el uso de ONPG como sustrato. La solución ONPG se preparó con un tampón de fosfato (7.2 pH, 0.1 M) necesario para el ensayo. Posteriormente se añadieron 0.8 mL de la enzima y 2 mL de sustrato y se incubó durante 10 min a 37 °C. Esta reacción se detuvo con la adición de 0.5 mL de Na_2CO_3 1 M y se registra la absorbancia a 420 nm. La actividad de la lactasa se determinó a partir del gráfico estándar ONP. Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que liberó 1 μ mol de ONP del sustrato por minuto en condiciones de ensayo (Venkateswarulu, Prabhakar & Kumar, 2017).

4.10 Escalamiento a etapa banco

A partir del medio de cultivo optimizado se realizó un escalamiento a un volumen total de fermentación de 2 L. Se partió de un inoculó del 20% del volumen total y se estableció una temperatura constante de 37°C y una agitación de 140 rpm. Posteriormente se efectuó una curva de crecimiento del microorganismo, una medición de proteínas totales y se determinó la actividad de la β – galactosidasa en un lapso de 72 h. Para la determinación de estos parámetros se siguió los protocolos mencionados previamente.

4.11 Evaluación estadística de los resultados

El análisis del Plackett-Burman y el Diseño Central compuesto se realizó con la ayuda de los algoritmos estadísticos procesados por el software Statistica®. Esta herramienta permitió la extrapolación de datos influyentes en los diversos medios de cultivo, dicho proceso se pudo examinar a través de cuadros de Pareto y tablas de ANOVA. Conjuntamente, el software permitió generar diagramas de superficie de respuesta gracias una vez obtenidos los datos pertinentes al diseño central compuesto.

5. CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Selección de Cepa

Se ha realizado una selección de un microorganismo para la producción óptima de β – galactosidasa, en conjunto, del crecimiento de biomasa. Como se mencionó previamente los microorganismos seleccionados para el estudio fueron: *L. casei*, *L. acidophilus* y *B. subtilis*. Los resultados obtenidos para la selección del microorganismo fueron obtenidos una vez culminado un período de 24 h.

5.1.2 Comparación de la concentración de Biomasa entre las diferentes cepas

Después de realizar un ANOVA con de la concentración de biomasa se encontró que no existen diferencias significativas en los resultados de los distintos microorganismos ya que el valor P (0.689) supera el Alpha propuesto de 0.05. Sin embargo, en la Figura 4, se observa que la concentración del *L. casei* tiene una concentración de biomasa ligeramente mayor en relación con los otros microorganismos. Para *L. casei* se obtuvo una concentración de 0.88 g L^{-1} , para *L. acidophilus* una concentración de 0.80 g L^{-1} y para *B. subtilis* una concentración de 0.82 g L^{-1} .

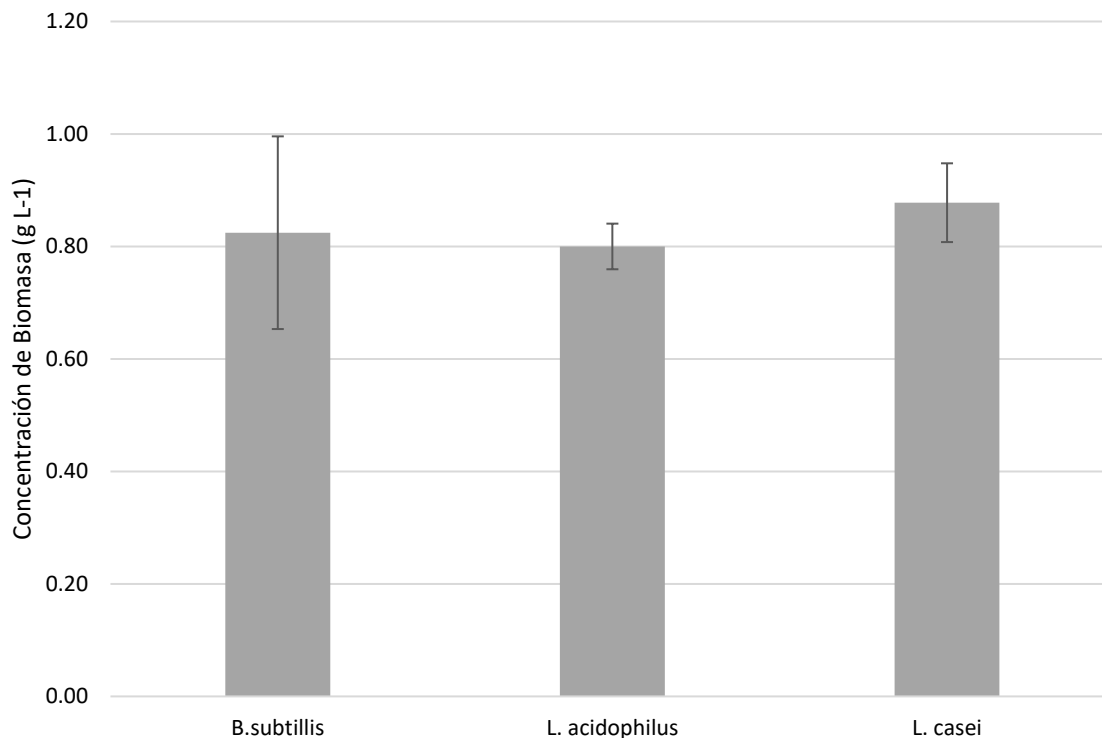


Figura 4. Contraste de la concentración de biomasa entre los diferentes microorganismos

5.1.3. Proteínas totales de los microorganismos estudiados.

Dentro del análisis de varianza en referencia a las proteínas totales de los microorganismos estudiados se obtuvo un valor p (0.038) menor a 0.05, el cual indica que existe una diferencia significativa en dicha variable entre los tres microorganismos. En la Figura No. 5, se presenta las concentraciones de proteína total de cada microorganismo donde se aprecia la superioridad de *L. casei* con una concentración de 13.61 mg mL⁻¹.

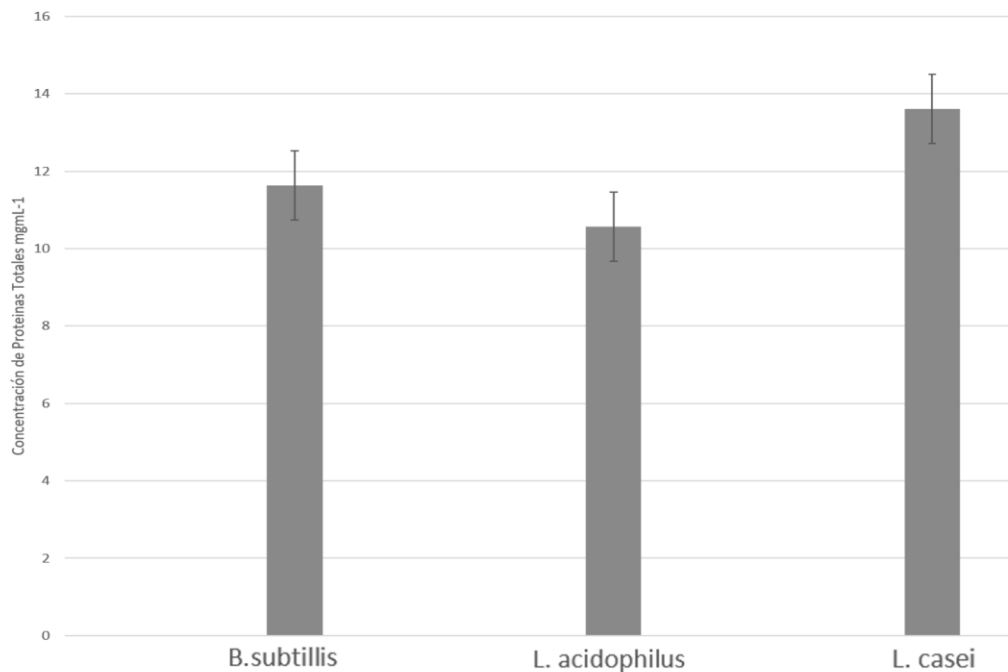


Figura 5. *Proteínas totales de los microorganismos estudiados*

5.1.4 Actividad Enzimática de la β - galactosidasa de las bacterias estudiadas.

Se determinó la actividad enzimática de los microorganismos después de 24 h de fermentación, consecuentemente, se observó que *L. casei* presenta una mayor producción de lactasa como se muestra en la Figura 6. Este microorganismo

alcanzó una actividad enzimática total de 0.021 U mL^{-1} . A través de los resultados del ANOVA se apreció una diferencia significativa en la actividad enzimática de los distintos microorganismos donde el valor P fue de 0.035, menor a el α de 0.05. Este parámetro demuestra que *L. casei* es un organismo cuya producción de lactasa es superior comparada con los otros estudiados en este trabajo. Adicionalmente, otros factores como su fácil adaptación a un medio de cultivo alternativo, consumo de lactosa del suero de leche como única fuente de carbono y alta producción de proteínas totales son razones suficientes para seleccionar a *L. casei* como organismo modelo para la optimización de los parámetros de un medio de cultivo alternativo.

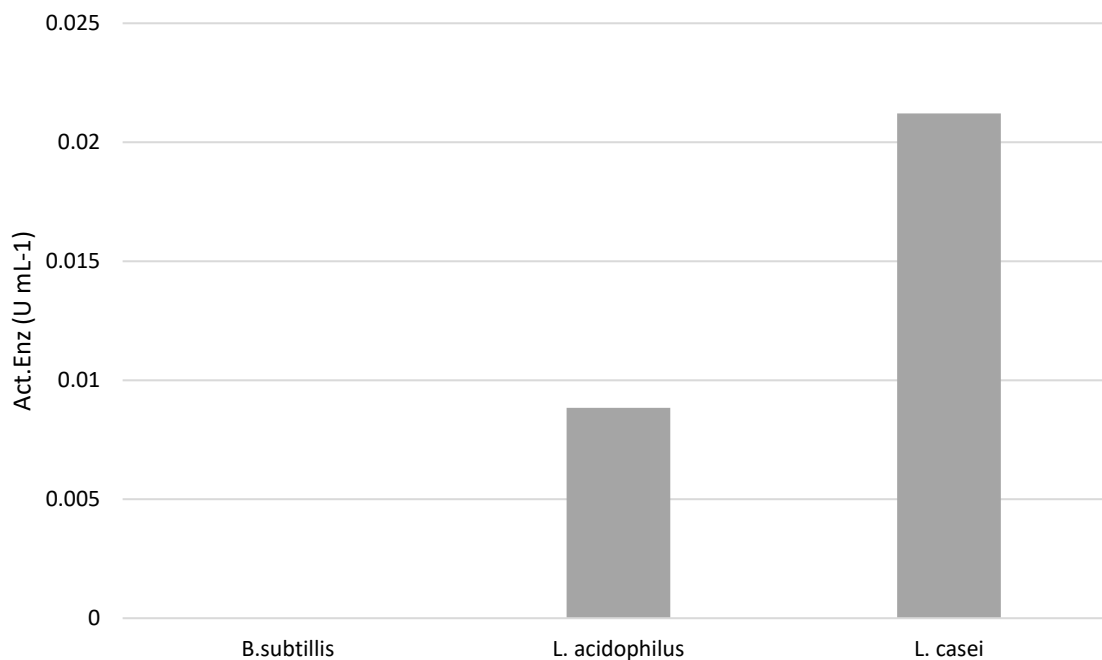


Figura 6. Actividad enzimática de la lactasa de los microorganismos estudiados

5.2 Curvas de Calibrado.

5.2.1 Curva de calibrado de *L. casei*

Se realizó una curva de calibrado de *L. casei* ATCC 393 como se observa en la Figura No. 7., la cual relaciona la concentración celular (g L^{-1}) y la absorbancia medida a 600 nm. Se obtuvo una ecuación de la recta: $y = 0.6992x - 0.139$. Según Glantz (2006) el coeficiente de determinación (R^2) constituye una descripción muy clara de la relación entre dos variables y su comportamiento lineal, tal como se muestra en el R^2 obtenido a partir de la curva de calibrado (0.9791) lo cual nos indica la precisión para pronosticar la variable dependiente (concentración de biomasa) a partir de la variable independiente (Absorbancia). Según Glantz (2006) las correlaciones mayores a 0.9 son aceptables dentro de la investigación de sistemas biológicos, por lo tanto es confiable decir que nuestros datos se ajustan a una regresión lineal.

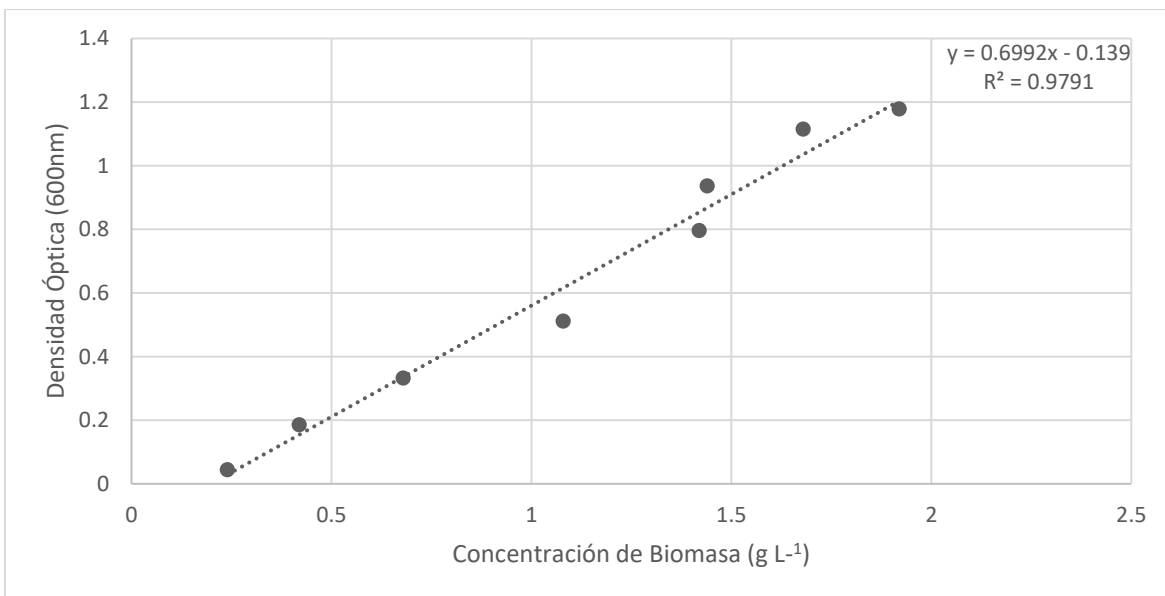


Figura 7. Curva de calibrado de biomasa de *L. casei*

5.2.2 Curva de Calibrado de Proteínas

La curva de calibrado de proteínas totales fue realizada a partir de albumina sérica bovina (BSA), por medio de la reacción del reactivo de Biuret. Esto nos permitió conocer la concentración (mg mL^{-1}) de las proteínas extraídas de la célula en

referencia a la absorbancia determinada a 540 nm. Se obtuvo la ecuación de la recta: $y = 0.0059x + 0.055$. El coeficiente de determinación se ajusta a un comportamiento lineal como se muestra en la Figura no. 8, además se puede observar que el $R^2 = 0.9968$ se acerca a 1, corroborando la relación lineal entre las dos variables.

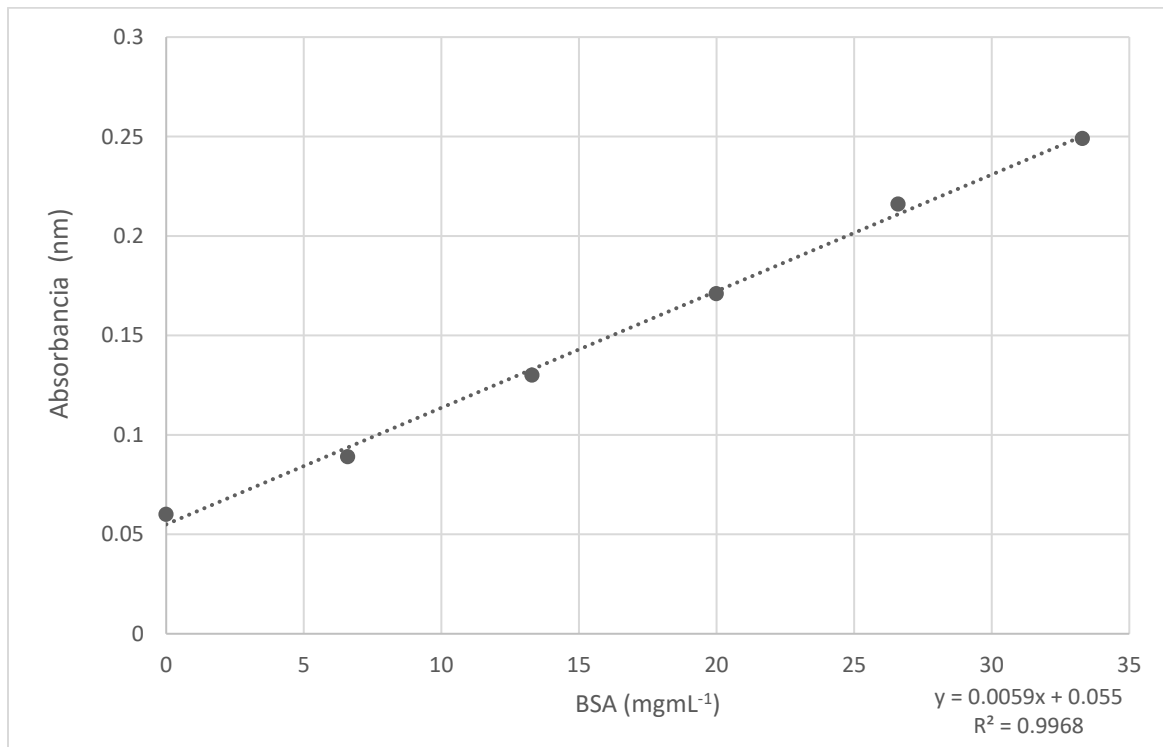


Figura 8. Curva de calibrado de proteínas totales

5.2.3 Curva de Calibrado de ONP

Se realizó una curva de calibrado para obtener la actividad enzimática de la lactasa intracelular obtenida a partir de *L. casei*. Se utilizaron concentraciones conocidas de ONP para relacionarlo con una absorbancia del mismo a 420 nm (Figura No.10). Se obtuvo la ecuación de la recta $y = 0.7275x + 0.0589$ y un coeficiente de determinación de 0.9926. El R^2 mencionado y la Figura no. 9 indican el comportamiento lineal de la relación entre la actividad enzimática y la absorbancia.

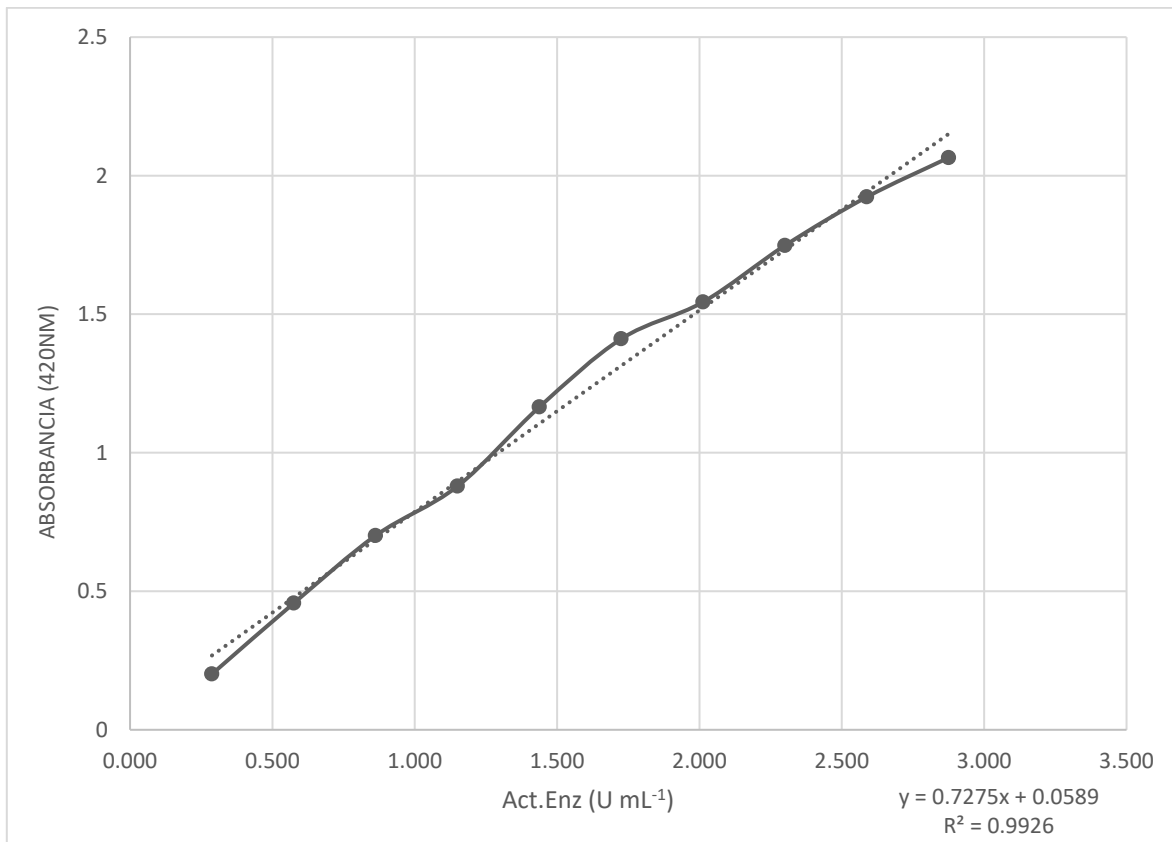


Figura 9. Curva de calibrado de actividad enzimática de ONP

5.3. Cinética de fermentación en lote

5.3.1 Cinética de crecimiento de *L. casei* escala laboratorio

En la Figura No. 10 se presenta la curva de crecimiento celular referente a *Lactobacillus casei* ATCC393 en un medio con las concentraciones positivas (+1) que se muestran en la Tabla No.3. El proceso fermentativo se dio durante 72 h en un matraz de 1000 mL cuyo volumen de trabajo fue de 80% a 130 rpm, donde se observa la cinética de crecimiento bacteriano a través de sus distintas fases de crecimiento. En la curva de crecimiento celular, la fase de adaptación es relativamente larga puesto que duro 6 h. Según Aguirre-Ezkauriatza et al. (2010) esta fase en condiciones de lote se encuentra en un rango de 6 a 10 h, esto se

debería a que no se produjo crecimiento por utilización directa de lactosa, lo que se corrobora en el presente estudio. En contraste al crecimiento observado, otros microorganismos ácido lácticos como *L. acidophilus* y *L. plantarum* tienen una fase *lag* de 5 h (Akolkar et al., 2005; Fu & Mathews, 1999).

Según Aguirre-Ezkauriatza et al. (2010) el inicio de la producción de galactosa y glucosa coincide con el punto de partida del crecimiento exponencial de la biomasa. Consecuentemente, dentro del estudio a partir de la hora 6, inicia la fase exponencial durando un total de 64 h, indicando una fase exponencial muy larga y en donde se puede aprovechar la extracción de metabolitos primarios como la β -galactosidasa. Según Bury et al. (2001) cepas de *Lactobacillus delbrückii subsp. bulgaricus* ATCC 11842 la fase exponencial dura únicamente 6 h, demostrando su baja productividad en contraste a la fase exponencial notoriamente más larga de *Lactobacillus casei* ATCC393 del presente estudio. Además, existen microorganismos con fases exponenciales largas como *L. plantarum* que tienen un lapso de 18 h (Daniela, Guti & Concepci, 2013) valor que se aproxima al lapso de tiempo obtenido en este estudio. Se ha demostrado que la galactosa se acumula en el medio de cultivo, lo que sugiere que especialmente se utilizó glucosa para respaldar el crecimiento de biomasa, consecuentemente, al realizar un balance de masa en lactosa, glucosa y galactosa indica que la glucosa actúa el sustrato primordial para el crecimiento celular (Aguirre-Ezkauriatza et al., 2010).

Existen ciertas anomalías dentro del comportamiento del crecimiento celular, se puede observar en la fase exponencial que existen períodos más rápidos de crecimiento y etapas más pausadas al momento de la división celular (en las h 48 – 50). Estos errores relativos pueden estar sujetos a parámetros inherentes del laboratorio y los equipos de incubación ya que son compartidos con otras investigaciones. De esta manera se interrumpen parámetros que deberían mantenerse continuos como la agitación, la oxigenación del medio de cultivo y la temperatura, así, limitando así el crecimiento (Doran, 1998).

A partir de la hora 60 se observa el inicio de la fase estacionaria, sin embargo, no se observa la continuación de la misma ya que se midió únicamente hasta las 72 h.

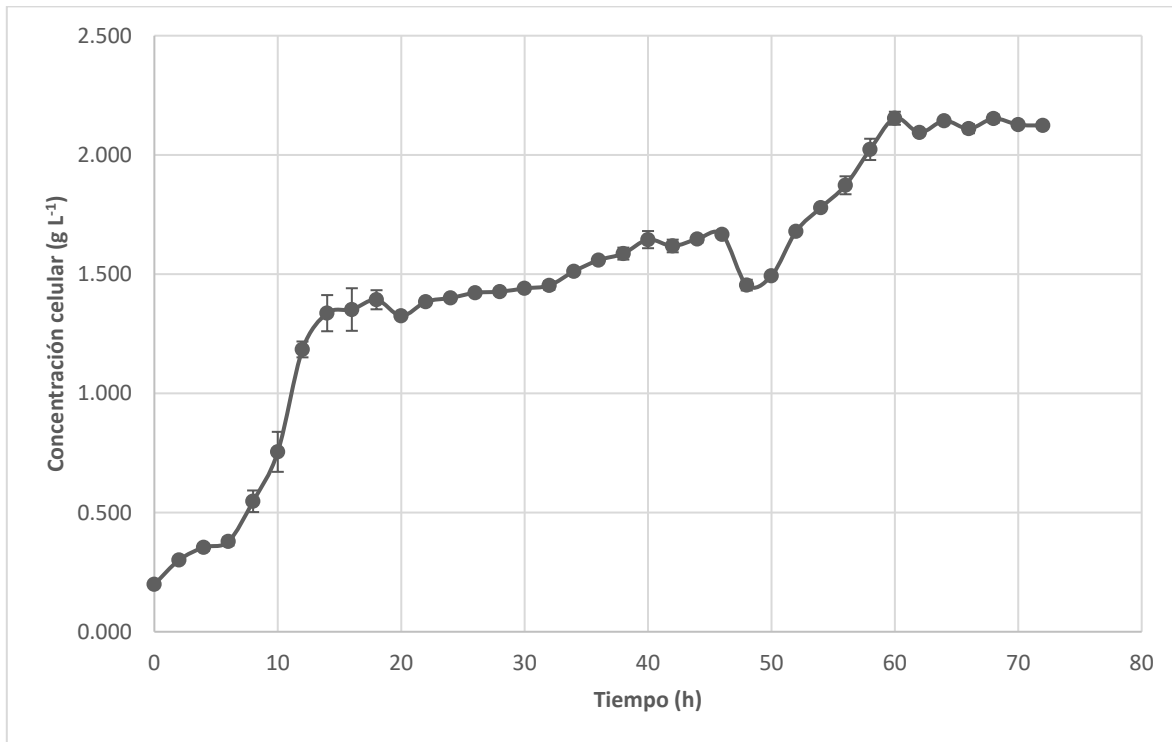


Figura 10. Curva de crecimiento celular de *L. casei* escala laboratorio

5.3.2 Curva de proteínas totales sintetizadas a partir de *Lactobacillus casei* ATCC393 a escala de Laboratorio.

La curva de proteínas totales se obtuvo a partir de una fermentación de 72 h con un volumen de trabajo de 800 mL a 130 rpm. La Figura No. 11 indica la mayor concentración de proteínas en (39.49 mg mL⁻¹) producida por *L. casei* a las 36 h de fermentación en lote. La concentración de proteínas obtenida a las 36 h se tomó como referencia para los posteriores estudios en cuanto a los modelos estadísticos de Plackett - Burman y Diseño Central Compuesto.

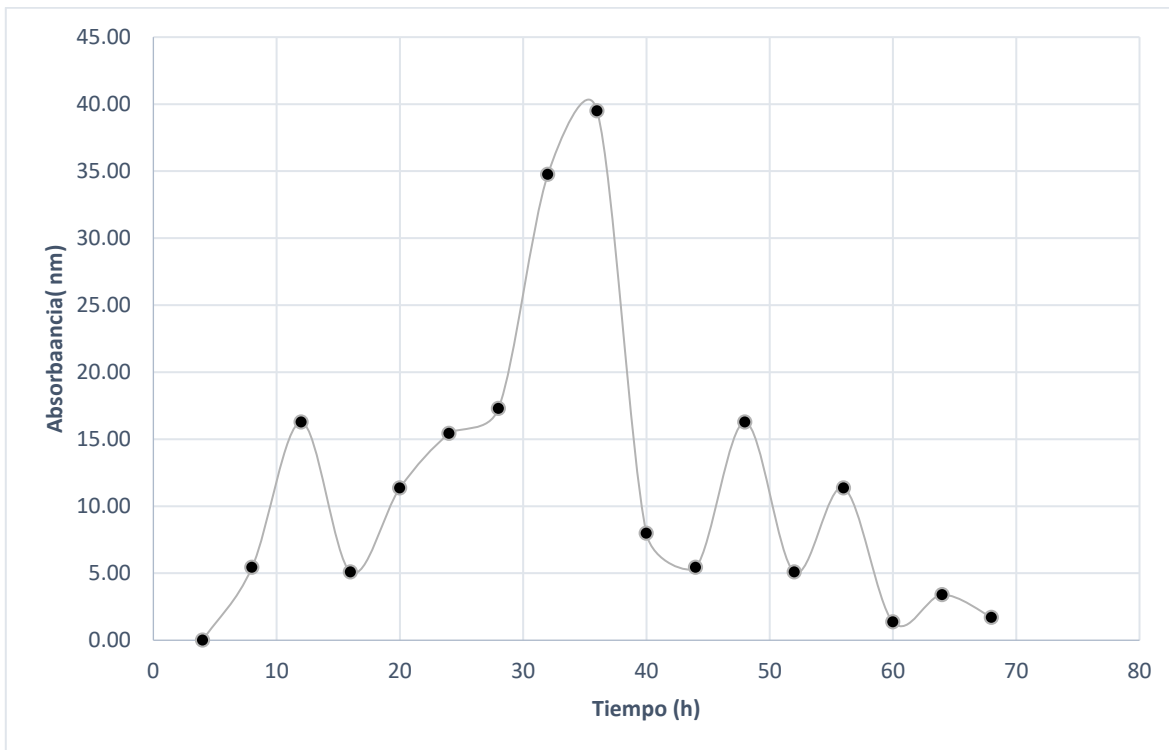


Figura 11. Curva de proteínas totales producida por *L. casei* escala laboratorio

5.3.3 Curva de Actividad enzimática de β - galactosidasa sintetizada a partir de *Lactobacillus casei* ATCC393

A partir de una fermentación de 72 h como se indica en la Figura no. 12, con las condiciones mencionadas previamente, se obtuvo una actividad enzimática máxima de 0.377 mg mL^{-1} . Esta concentración se obtuvo transcurridas las 36 h de fermentación en lote y se puede observar que es significativamente mayor a otros puntos en el lapso de crecimiento. Se puede apreciar que la concentración total de proteínas concuerda con el punto máximo de la actividad enzimática dentro de este estudio, por lo tanto, el punto de las 36 h fue considerado como referente para los estudios posteriores.

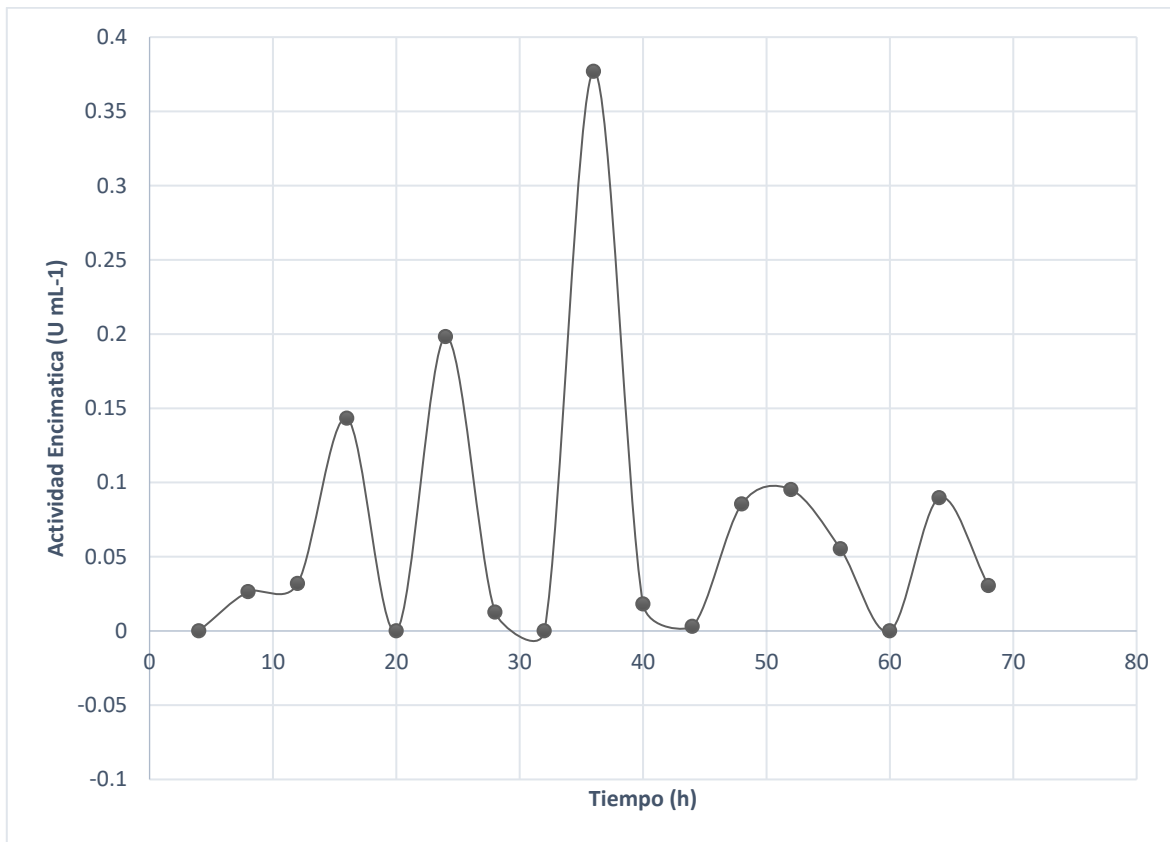


Figura 12. Cinética Enzimática de β -galactosidasa escala laboratorio

5.4 Diseños Experimentales

5.4.1 Determinación de factores influyentes a partir del diseño Plackett – Burman

Una vez establecidos los factores y los niveles, se seleccionó un diseño estadístico Plackett – Burman. Esto permitió generar una matriz (Tabla 4) de 7 variables de la cual se generaron 12 tratamientos a los cuales se los sometió a una fermentación durante 36 h a 130 rpm. Para la selección de las variables significativas se tomó en cuenta la concentración de Biomasa (g L^{-1}) en conjunto de la actividad enzimática (U mL^{-1}). La Figura No. 13 indica que el suero de leche es sumamente influyente para la actividad enzimática de la β – galactosidasa producida por *L. casei*. En

cuanto a las variables restantes presentan un valor P mayor a 0.05 por lo cual no se consideran significativas para la producción de lactasa en el microorganismo estudiado. Además, Bandhu et al. (2014) sugiere que los valores positivos (+) para el componente efectivo indican la posibilidad de una optimización adicional donde los factores pueden ser reemplazados por un valor similar o superior al indicado, y viceversa; de esta manera se alteran los resultados del cuadro de Pareto expuesto. En contraste, los valores negativos fueron excluidos de los experimentos posteriores ya que no aportan a la fermentación en lote y la síntesis de lactasa (Naveena, Altaf, Bhadriah & Reddy, 2005).

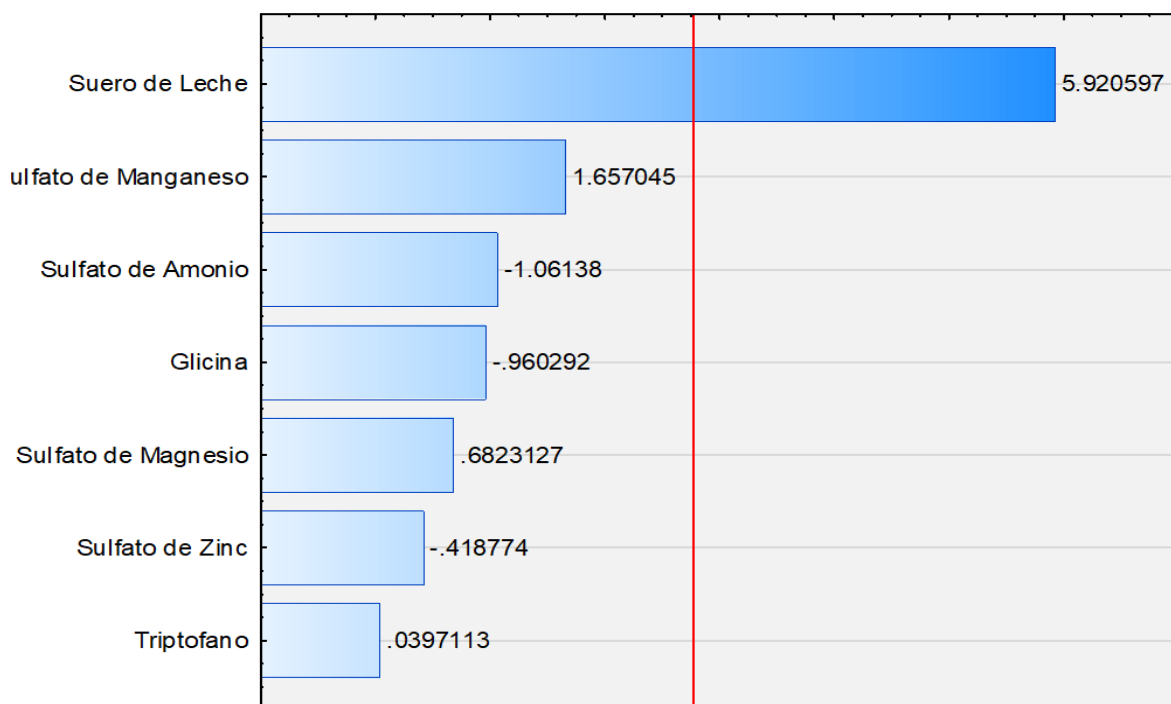


Figura 13. Tabla de Pareto de Efectos Estandarizados de la Actividad Enzimática (U mL^{-1}) de β - galactosidasa

La Figura No. 15 nos indica un diagrama de Pareto en el cual no se observa ninguna variable significativa en cuanto al crecimiento celular. El $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es el componente que más se ajusta a una variable influyente sin embargo no cumple un valor p menor al alfa propuesto de 0.05.

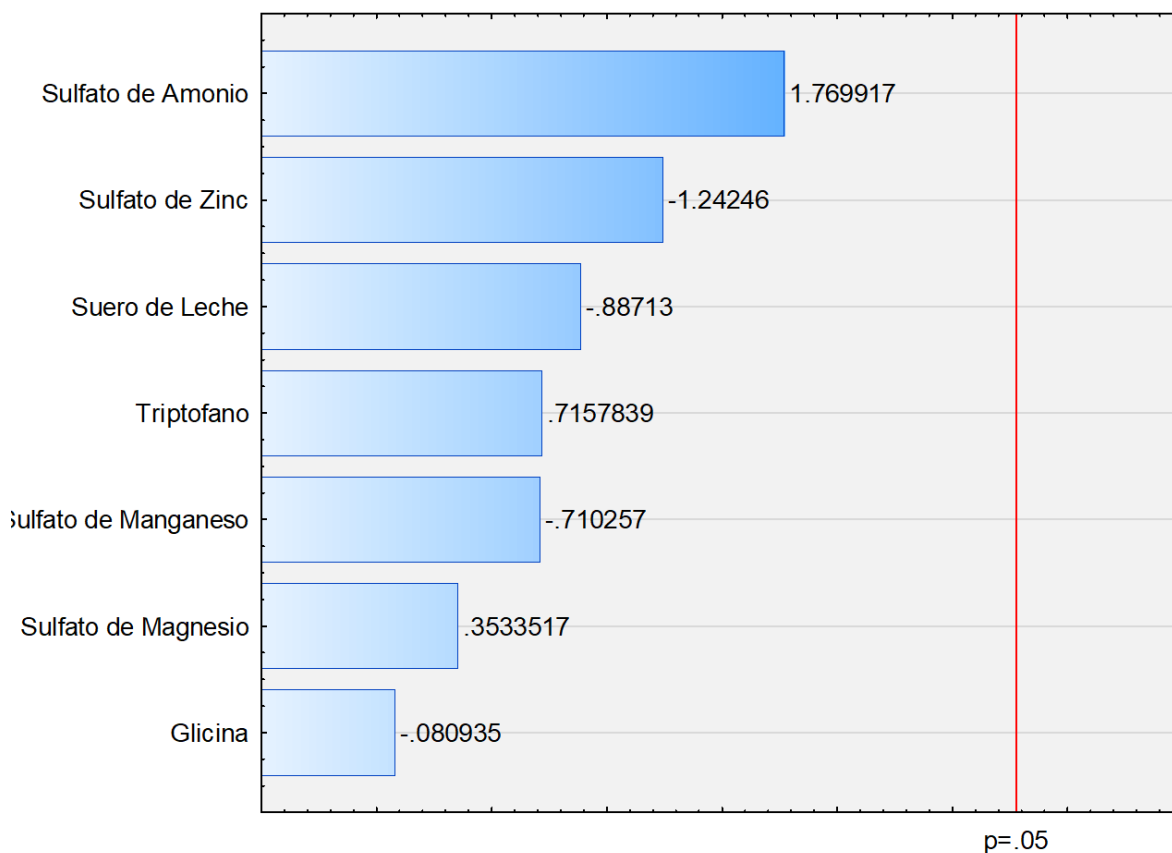


Figura 14. Tabla de Pareto de concentración de biomasa (g L⁻¹)

La significancia del suero de leche vinculada con la actividad enzimática de la lactasa es consistente con varias referencias que apuntan al extraordinario desempeño de esta fuente de carbono residual (Prazeres et al., 2012). La biotransformación del suero de leche en proteína es una de las mejores opciones para microorganismos productores de lactasa que utilizan lactosa para su crecimiento celular, esto se debe a las alta concentración de carbono orgánico, aminoácidos de alta calidad, vitaminas y minerales (Yadav et al., 2015).

Varios iones divalentes (Zn^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+2} y Ni^{+2}) han sido reportados como activadores de la lactasa, sin embargo, ha sido muy discutido ya que las enzimas presentan sitios de activación muy específicos. Según Al, (1979) se realizaron diálisis de equilibrio para conocer la unión y la activación de la β -

galactosidasa mediante el ion Zn^{+2} , y se concluyó que el mismo causa una activación completa de la enzima, sin embargo no se considera un activador específico. Dentro del diagrama de Pareto (Figura No.14) se puede observar un valor P positivo por lo cual se mantuvo una concentración constante en los posteriores experimentos.

Los iones divalentes más estudiados en cuanto a la activación de la β - galactosidasa son Mn^{+2} y Mg^{+2} , ya que han reportado optimizar la producción de esta enzima. Además se ha mostrado que varias especies de *Lactobacillus* incrementan su producción celular después de agregar estos iones metálicos. Se realizó un estudio en el cual se suplementaron medios de cultivo con Mn^{+2} y Mg^{+2} para la optimización del crecimiento y producción de lactasa de *Lactobacillus reuteri*; por lo tanto se concluyó que el Mn y el Mg juegan un papel importante en las actividades metabólicas de las bacterias ácido-láticas (Ibrahim et al., 2010).

Según Venkateswarulu et al. (2017) la actividad enzimática de la lactasa producida por *B. subtilis* VUVD001 es optimizada al agregar $MgSO_4$ al medio de cultivo y registra una actividad de 27 U mL^{-1} agregando 0.4%. Kim & Rajagopal (2000) establecen que el $MnSO_4$ tiene un efecto considerable sobre el incremento de la actividad enzimática de la beta-galactosidasa, sin embargo, el $MgSO_4$ es mucho menos eficiente para *Lactobacillus crispatus*. En contraste a esto, Ibrahim et al. (2010) expresa que el Mn^{+2} presenta una mayor relevancia en la actividad enzimática de la enzima en estudio. Por lo tanto, se concluyó que ambos iones presentan una importancia relevante para la actividad enzimática de la lactasa, por lo cual se implementó en el diseño central compuesto (DCC).

5.4.2 Optimización del medio de cultivo a partir del método de superficie de respuesta

5.4.2.1 Superficie de respuesta de actividad enzimática

Una vez concluidas las 36 h de incubación de los tratamientos se realizó el proceso de disrupción celular mencionado anteriormente para medir la actividad enzimática de la β - galactosidasa agregando ONPG y midiendo a 420 nm en el espectrofotómetro

A partir del diseño central compuesto se extrapoló una superficie de respuesta que se ajusta a un modelo cuadrático como se muestra en la Figura 16. Aquí se muestra la relación existente entre las concentraciones óptimas de suero de leche y MnSO_4 para obtener una actividad enzimática elevada de β - galactosidasa

En la Figura 15 se puede observar una actividad enzimática máxima que oscila entre 0.25 a 0.3 U mL⁻¹, este es interpretado por el color rojo oscuro de la gráfica. Para obtener la actividad enzimática óptima de lactasa es preciso agregar la concentración óptima de suero de leche y MnSO_4 , valores que se presentan en la figura. Por lo tanto, la figura muestra que la concentración óptima para suero de leche es 4 % p v⁻¹) y para MgSO_4 (≥ 0.026 gL⁻¹).

Los estudios de Bury, Geciova & Jelen (2001) sugieren una producción relativamente alta de β - galactosidasa a partir de *L. delbrueckii subsp. bulgaricus 11842*, implementado una concentración de suero de leche de 3% p v⁻¹. Este resultado disintió del presente estudio al momento de escalar la fermentación a una escala de lote, donde la concentración optima del medio de cultivo fue de 4.68 p v⁻¹. Según Perini et al. (2013) la concentración óptima de lactosa final en un suero de leche debe ser de 2% para la producción de lactasa en un cultivo de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. Por lo tanto, estos estudios difieren de la concentración óptima del suero de leche que se obtuvo a partir del método de superficie de respuesta ya que el estudio sugiere que la concentración debe ser superior a 4 % p v⁻¹. La diferencia de concentraciones optimas va a diferir entre microorganismos por

sus rutas metabólicas, su tiempo de duplicación y su tiempo de adaptación al medio. Además, estas diferencias se pueden atribuir a la capacidad de los organismos por sintetizar lactasa con el fin de romper las azúcares complejas en glucosa y galactosa para utilizarlo en sus ciclos metabólicos (Doran, Pauline, 1998).

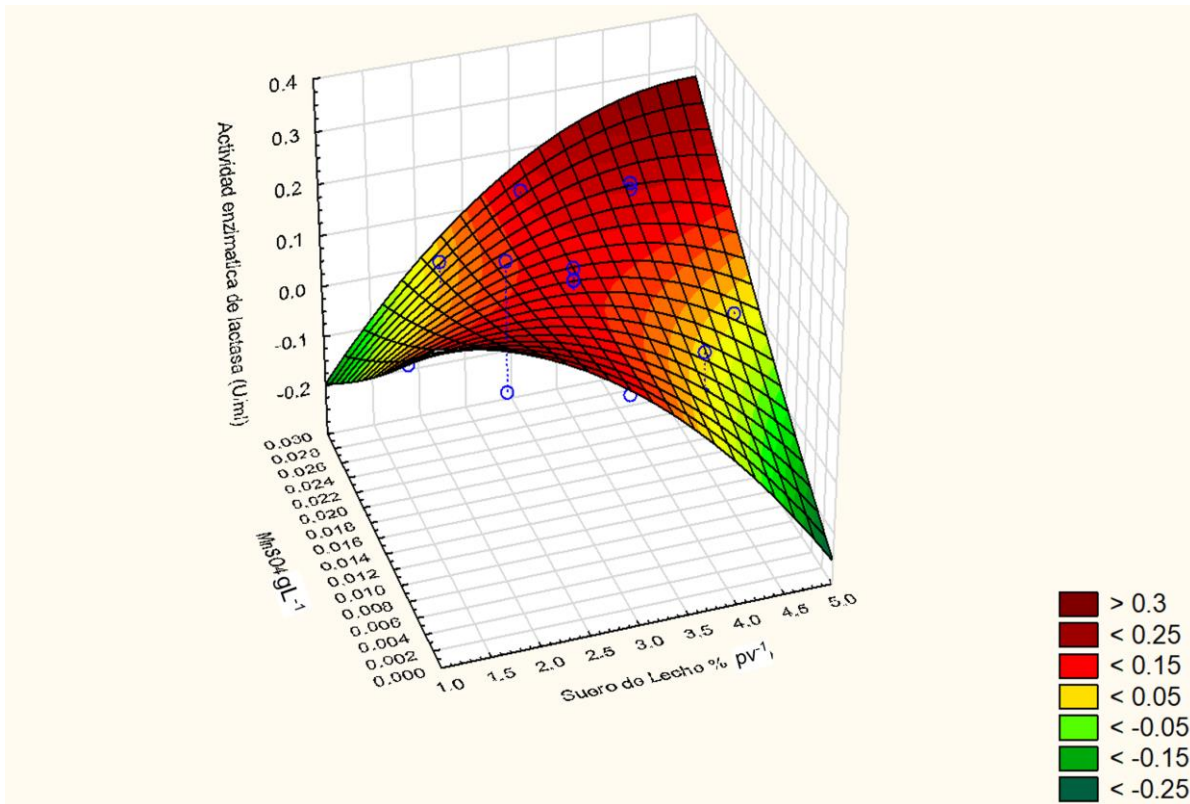


Figura 15. Diagrama de superficie 3D de Actividad enzimática de lactasa ($U mL^{-1}$) contra suero de leche y sulfato de manganeso

En la Figura No. 16 se observa una actividad enzimática máxima en un rango de 0.175 a 0.2 $g L^{-1}$. Los valores de las variables independientes son: $\geq 4.0 \% p v^{-1}$ para suero de leche y $\geq 6 g L^{-1}$ para $MgSO_4$.

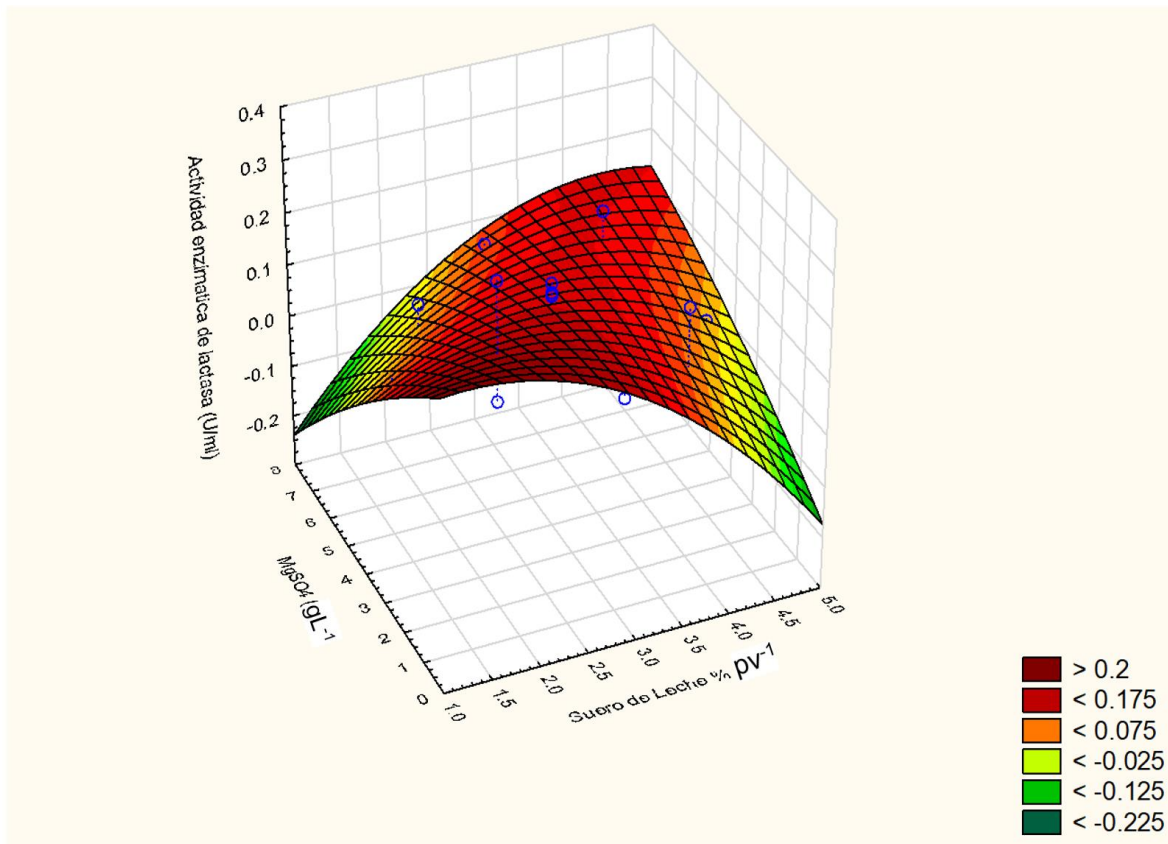


Figura 16. Diagrama de superficie 3D de actividad enzimática de lactasa contra sulfato de magnesio y suero de leche

La Figura 17 muestra un antagonismo entre las 2 variables independientes, la concentración máxima de biomasa es superior a 0.2 g L^{-1} cuando las concentraciones de las dos sales son nulas. Sin embargo, se obtiene una concentración cercana a la óptima cuando la concentración de MnSO_4 es superior a 0.03 . Este antagonismo que se muestra en la figura se puede deber a la naturaleza divalente que presentan estas dos sales, por lo tanto pueden ser cofactores competitivos (Kim & Rajagopal, 2000). Por contrario, los resultados expuestos, según Lavari, Páez, Cuatrin, Reinheimer & Vinderola (2014) indican que los valores óptimos para el crecimiento de la biomasa son 0.05 g L^{-1} y 0.2 g L^{-1} de MnSO_4 y MgSO_4 , respectivamente, sin embargo en la Figura 18 se puede observar un valor

óptimo cuando no existe dichas sales o cuando la concentración de MnSO_4 es de 0.036 g L^{-1} .

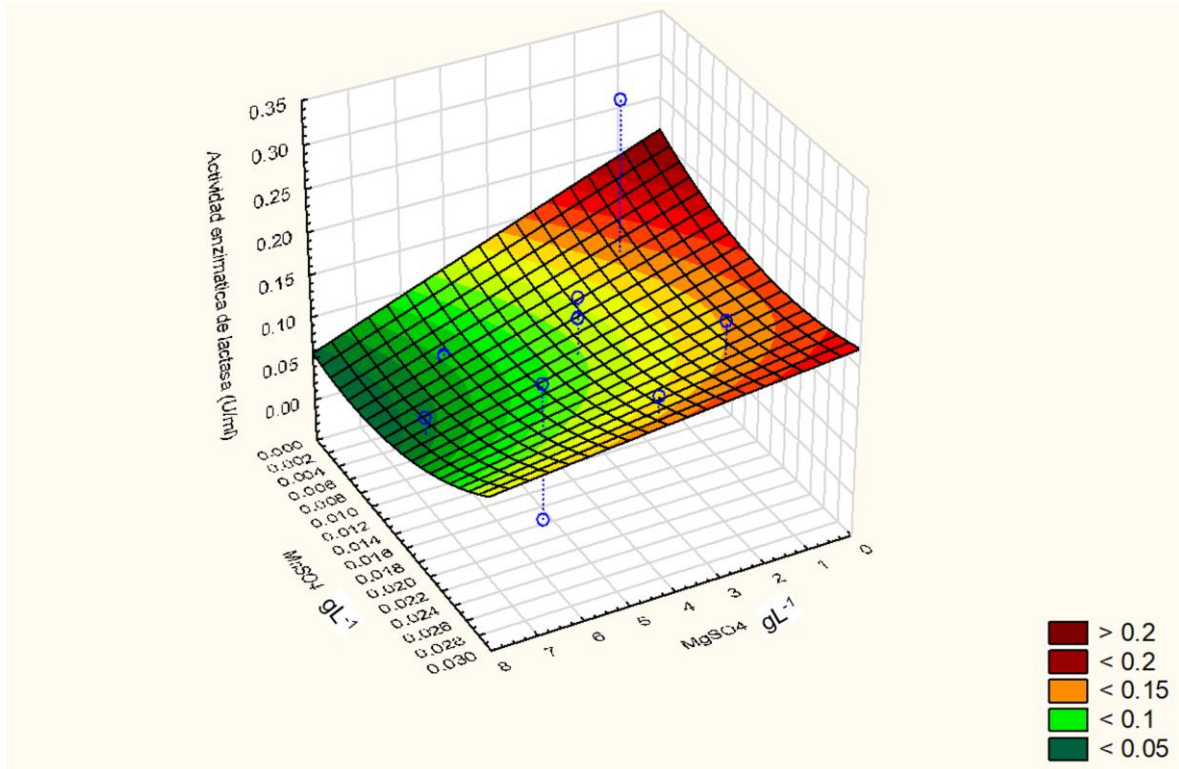


Figura 17. Diagrama de superficie 3D de actividad enzimática de lactasa contra sulfato de magnesio y sulfato de manganeso

5.4.2.2 Superficie de respuesta de concentración de biomasa

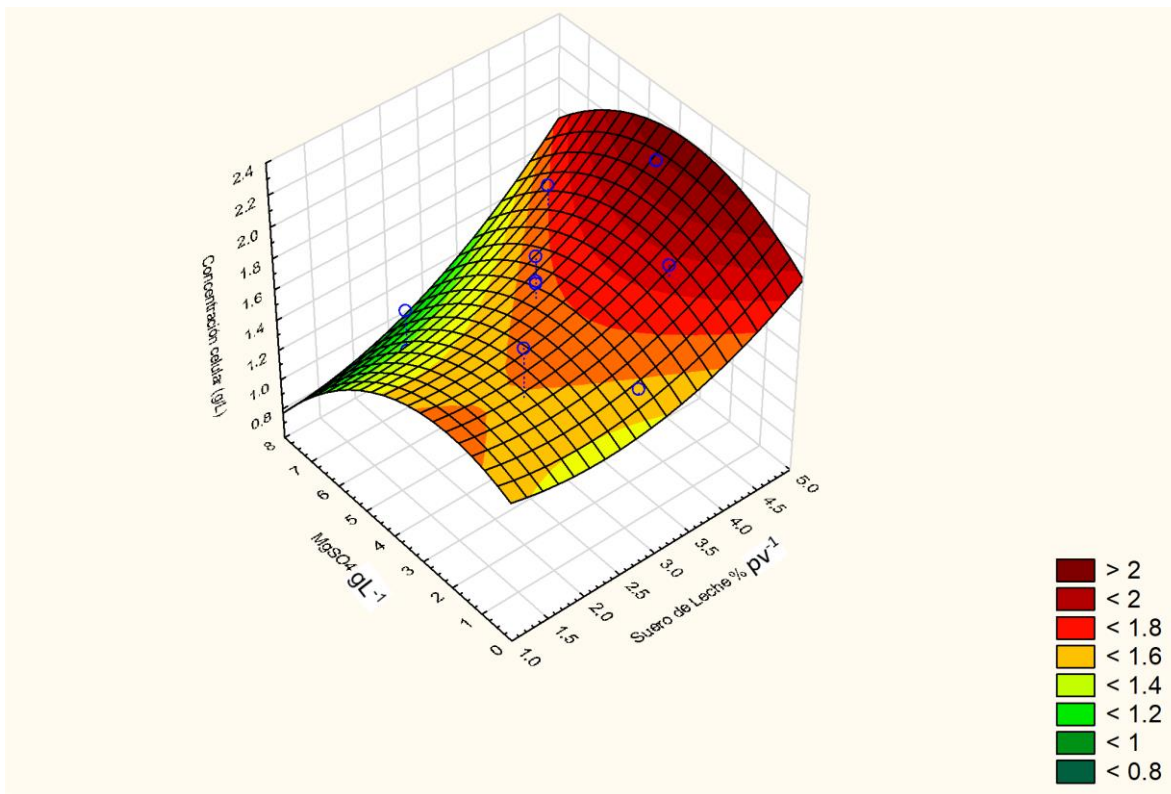


Figura 18. Diagrama de superficie 3D de concentración celular contra suero de leche y sulfato de magnesio

En la Figura 18 se puede observar que la concentración de biomasa es superior a 2 g L^{-1} cuando se añade suero de leche en un rango de 4.5 a 5 % p v⁻¹, esto puede ser observado en la zona roja más oscura. Además, se puede observar un rango óptimo de MgSO_4 entre 3 y 6 g L^{-1} .

La concentración óptima de suero de leche difiere ligeramente de los estudios realizados por Hujanen, Linko, Linko & Leisola (2001) ya que estos indican que la concentración óptima de suero de leche para un cultivo de *L. casei* es de 4 % , sin embargo la superficie de respuesta del presente estudio nos indica que es mayor.

En la Figura 19 se observa la relación entre el suero de leche y el MgSO_4 para la optimización del crecimiento celular. Una vez más se puede observar que el rango óptimo del suero de leche va a ser superior a 4.5 g L^{-1} , sin embargo, la concentración clave del MnSO_4 se encuentra entre 0 y 0.04 g L^{-1} .

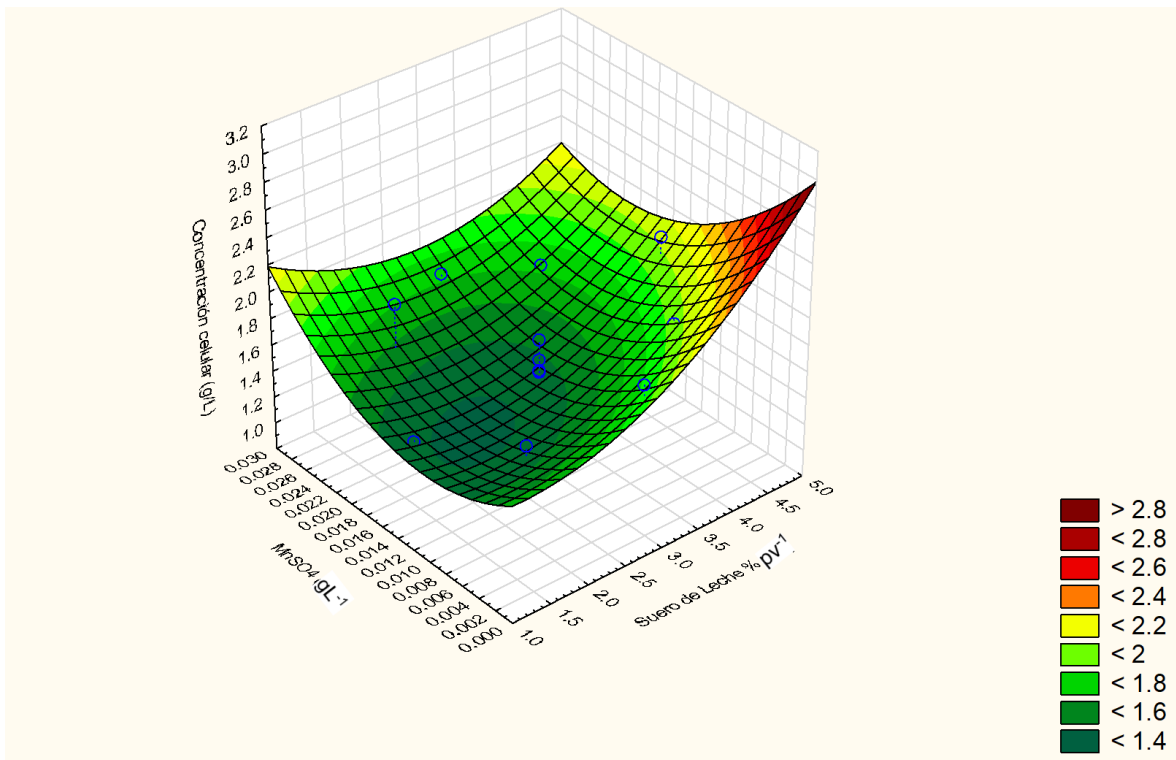


Figura 19. Diagrama de superficie 3D del crecimiento celular

La Figura 20 presenta la relación existente entre los dos iones divalentes para la optimización del crecimiento celular. Como se mencionó previamente puede existir un antagonismo entre estos dos cofactores y se vuelve a mostrar dentro de esta superficie de respuesta. Cuando el contenido de MgSO_4 es nulo y el MnSO_4 presenta una concentración de 0.030 g L^{-1} , el crecimiento celular alcanza un valor superior a 2 g L^{-1} . Por el contrario, cuando el MnSO_4 tiene una concentración de cero y el MgSO_4 tiene una concentración de 8 g L^{-1} , la concentración celular va a ser superior a 2 g L^{-1} .

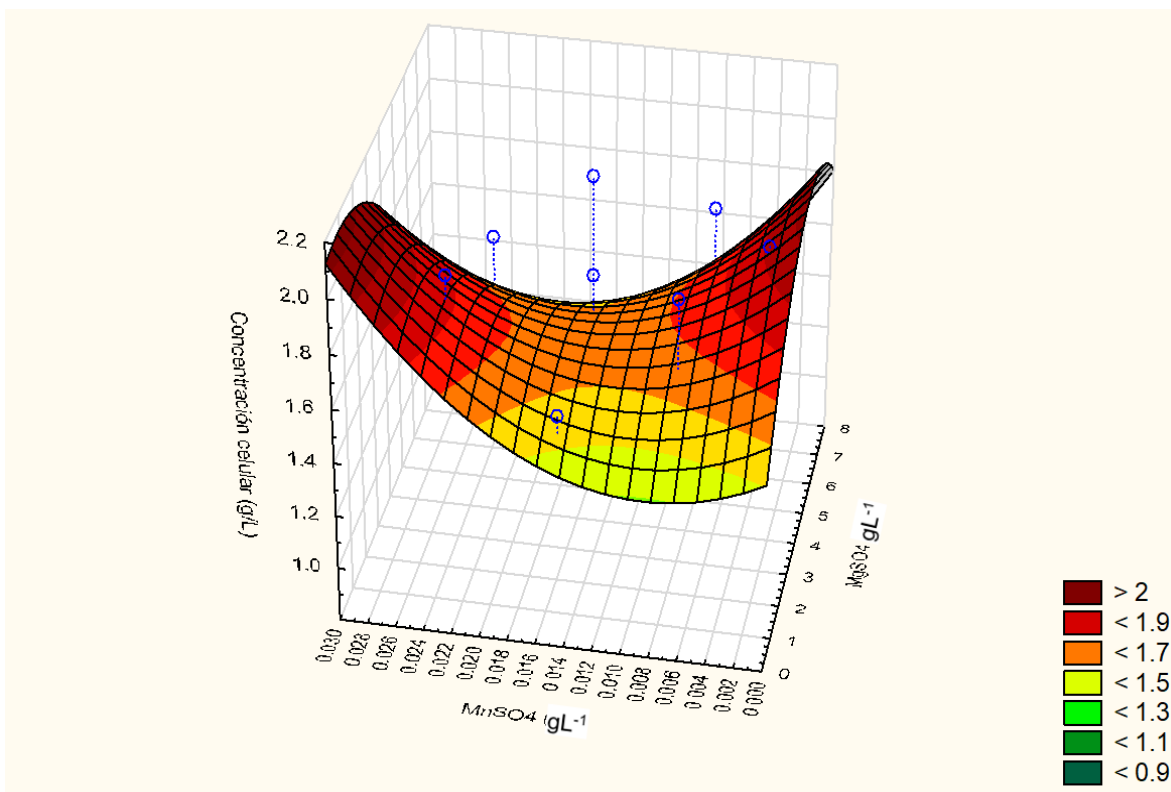


Figura 20. Diagrama de superficie 3D de concentración celular (g L^{-1})

5.2.2.3 Ecuaciones para determinación de valores óptimos de actividad enzimática de β - galactosidasa

Los tres polinomios generados exhiben un segundo orden y van a seguir un comportamiento cuadrático por la curvatura de los sistemas. Después del análisis de superficie de respuesta se ajusta dicha ecuación a una aproximación adecuada de la función verdadera, por lo tanto será un equivalente aproximado a un sistema real (Montgomery, 2013). Las ecuaciones expuestas en la Tabla No. 9 son extraídas de las figuras de superficie de respuesta para la optimización de la actividad enzimática de la β – galactosidasa.

Tabla 9.

Ecuaciones para determinación de valores óptimos de actividad enzimática de β -galactosidasa

| Superficie de respuesta | Polinomio de segundo orden |
|-------------------------|--|
| Figura 5.11 | Act. Enzimática (U mL ⁻¹) = 0.2915+0.0398*x-27.463*y 0.0298*x*x+8.5977*x*y+76.4898*y*y |
| Figura 5.12 | Act. Enzimática (U mL ⁻¹) = 0.206+0.0814*x-0.0733*y-0.0315*x*x+0.0248*x*y-0.0017*y*y |
| Figura 5.13 | Act. Enzimática (U mL ⁻¹) = 0.2115-0.0191*x-5.8143*y-3.6914E-5*x*x+0.4708*x*y+148.6239*y*y |

Para obtener los valores óptimos se derivó la ecuación con respecto a las variables independientes y se reemplazó en la ecuación siguiente.

$$Nivel = \frac{\text{Valor no codificado} - \text{Valor central}}{\text{Salto}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

De esta manera se obtuvo los valores óptimos que se muestran en la Tabla No. 10.

Tabla 10.

Variables independientes optimizadas

| Factor | Valor óptimo | Unidades |
|-------------------|--------------|---------------------|
| Suero de Leche | 4.681793 | % p v ⁻¹ |
| MgSO ₄ | 7.360000 | g L ⁻¹ |
| MnSO ₄ | 0.027229 | g L ⁻¹ |

5.2.2.4 Análisis estadísticos de los diseños centrales compuestos

En la Figura 21 se puede observar que tres variables son significativas en el DCC estudiado para optimizar la actividad enzimática de la β - galactosidasa sintetizada a partir de *Lactobacillus casei* ATCC393. Según la figura expuesta se concluye que existe una producción óptima de lactasa cuando se varía la concentración del suero de leche en conjunto del $MgSO_4$. De la misma manera interactúan la concentración del suero de leche y el $MnSO_4$ para incrementar la actividad enzimática. Es clave denotar la significancia del suero de leche en la producción enzimática ya que esta fuente de carbono residual es indispensable para la reducción de costos del bioproceso. Yadav et al. (2015) ha mencionado la importancia de este subproducto de la producción de queso como una fuente alternativa barata de carbono para la producción de bioproteínas de alta calidad. Consecuentemente dentro de este estudio se observó una optimización del proceso que será detallado posteriormente, con un sustrato residual de suero de leche de bajo costo; el cual tuvo un precio de 4 centavos por litro.

De la misma manera se observa la importancia de los iones divalentes para el aumento de la actividad enzimática en el cultivo de *L. casei*. La importancia de estos cofactores es manifestada en varios estudios, como la significancia del $MgSO_4$ en un cultivo de *Bacillus subtilis* detallada por Venkateswarulu et al. (2017). Por otro lado, Kim & Rajagopal (2000) indican la importancia de Mn^{+2} en la actividad enzimática de la lactasa sintetizada a partir de *L. crispatus* ATCC 33820.

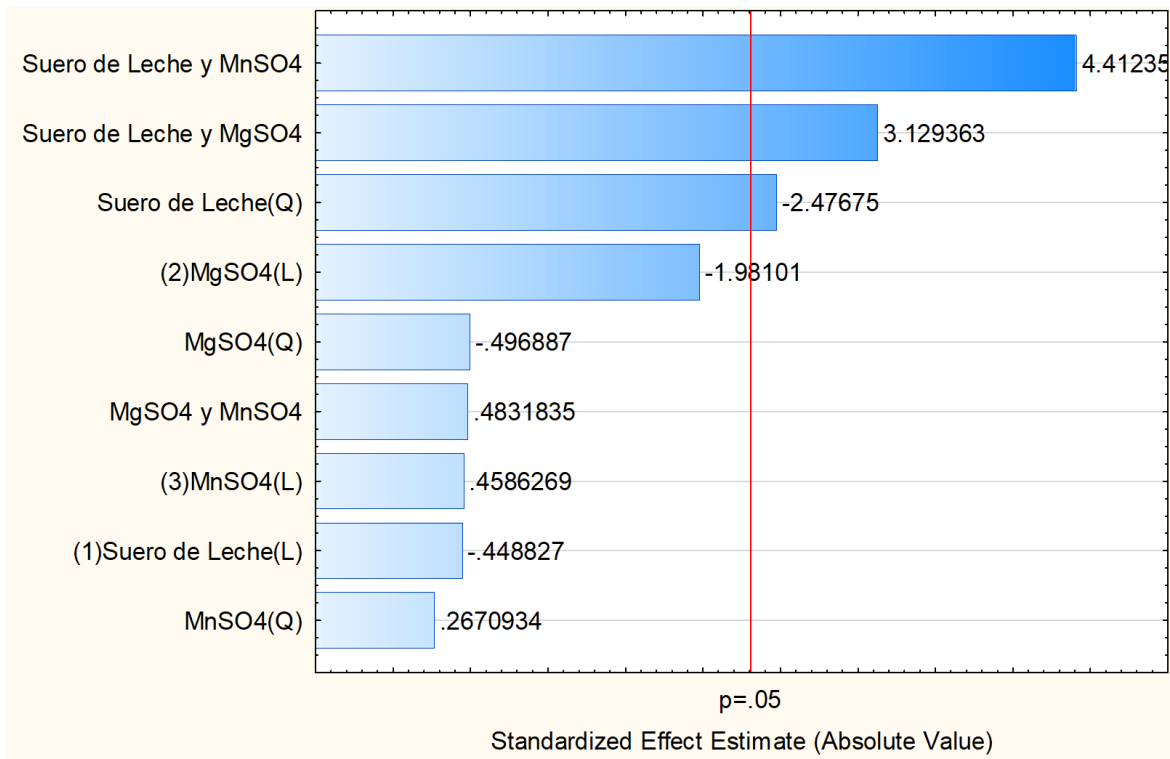


Figura 21. Diagrama de Pareto de la actividad enzimática U mL⁻¹

Uno de los factores más importantes en un bioproceso es la optimización de la producción de la biomasa para obtener un crecimiento más rápido y una producción óptima del producto del interés. Por lo tanto, es imprescindible observar las variables significativas para el crecimiento celular dentro del estudio, como se puede observar en la Figura No. 22 las variables que se ajustan a un modelo lineal son el suero de leche y el MgSO₄. Montgomery (2013) expone que una superficie de respuesta se debe ajustar a un modelo cuadrático con el fin de exponer la precisión del experimento, lo cual se muestra en la optimización del crecimiento celular por medio del ion divalente Mn²⁺.

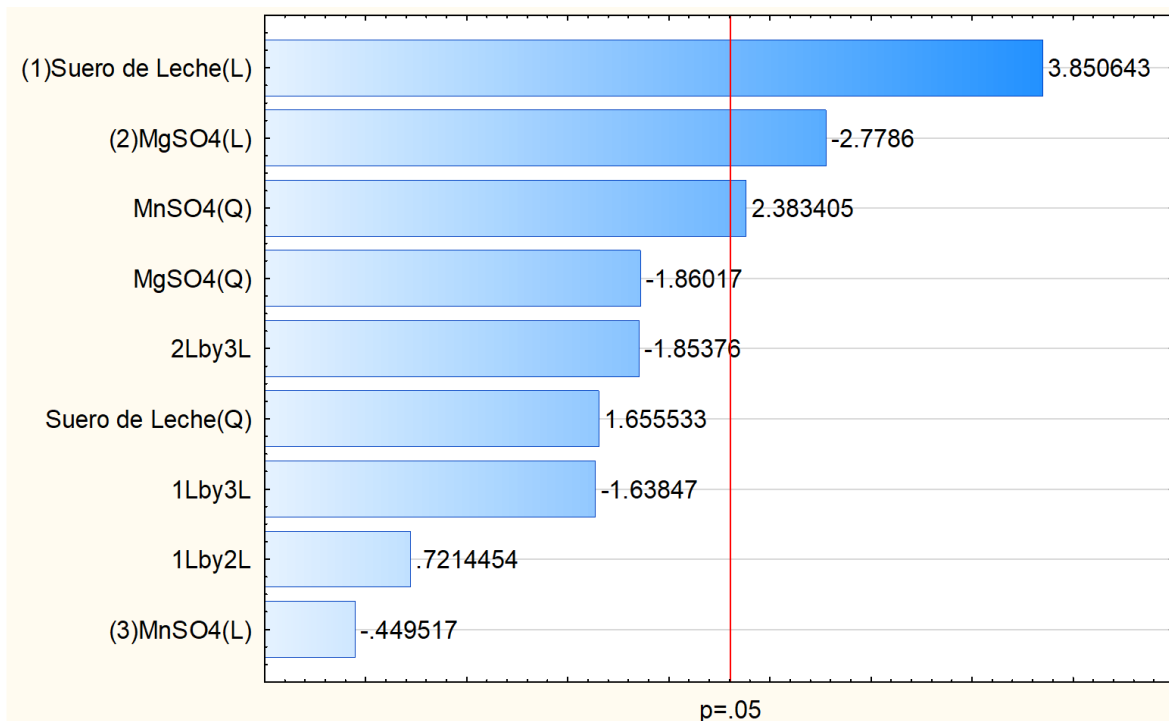


Figura 22. Diagrama de Pareto de la concentración de biomasa g L⁻¹

5.5 Cinética de fermentación escala banco

En la Figura No. 23 se observa el crecimiento celular del *L. casei* con las condiciones optimizadas del medio. Se puede observar que la fase de adaptación es nula, ya que desde la hora cero se observa un crecimiento exponencial. Dicha fase duró un período de 22 h, a diferencia de la fermentación a escala laboratorio que duro un total de 64 h. Según Avonts, Uytven & Vuyst (2004) se presenta un crecimiento mucho más acelerado al cultivar *L. casei* en caldo MRS, donde, se alcanzó un total de 3 g L⁻¹ en 10 h. Sin embargo, dentro del estudio realizado en la hora 22 se alcanza una concentración celular máxima de 3.026 g L⁻¹. Por lo tanto dentro del estudio se alcanza una concentración mayor en más tiempo a la propuesta por Avonts et al. (2004). Además, se muestra un incremento del contenido de la biomasa en referencia a la concentración de 2.154 g L⁻¹ obtenida en la escala laboratorio en menor tiempo. Se puede observar un incremento en la rapidez del proceso ya que se alcanzó una mayor concentración celular en aproximadamente la mitad del

tiempo. En cuanto a la concentración máxima alcanzada en el estudio realizado por Velásquez, Giraldo & Padillas (2012) indican que *L. casei* puede alcanzar una concentración celular máxima de 13 g L^{-1} en una fermentación discontinua en 72 h, así superando la concentración máxima alcanzada dentro de este estudio (3.026 g L^{-1}). El alto desempeño de la fermentación realizada por Velásquez et al.(2012), se debe a los procesos controlados bajo un biorreactor de agitación continua de 5 L, el cual permite controlar continuamente factores como el pH, la agitación, la temperatura y la toma de muestras más precisas. Además, las concentraciones de sales y suero de leche clarificado difieren del estudio actual.

Una vez concluida la etapa estacionaria que duro aproximadamente 10 h, se observa el descenso de la concentración celular debido a la muerte del microorganismo.

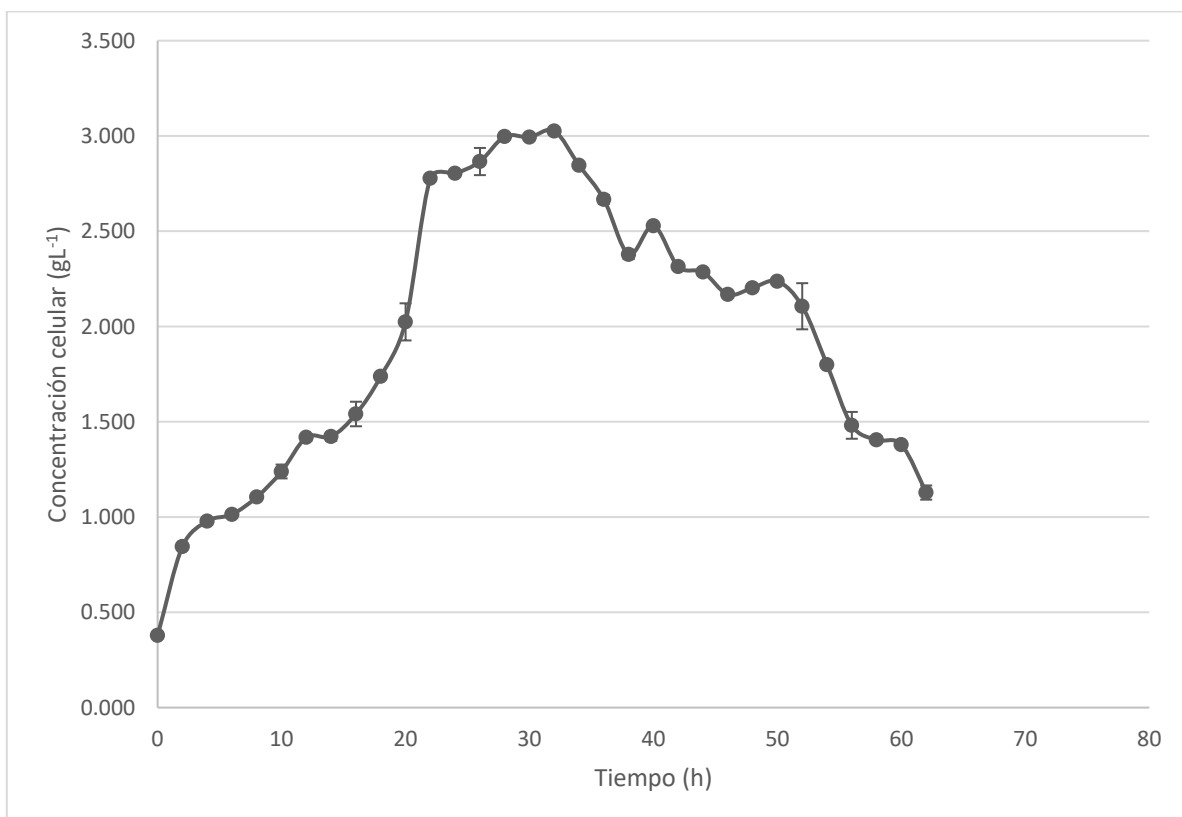


Figura 23. Curva de crecimiento celular de *L. casei* escala banco

En la Figura No. 24 se observa que el mayor crecimiento exponencial de la actividad enzimática se produce a las 24 h. Tal como lo detalla Venkateswarulu et al. (2017) una cepa de *Bacillus subtilis* VUVD001 alcanzó su mayor actividad enzimática a las 24 h, lo que se obtuvo en el presente estudio también. Por el contrario, Hsu et al. (2005) indica que la actividad máxima de la β -galactosidasa alcanzada por *Bifidobacterium longum* puede ser alcanzada a las 16 h, sin embargo el crecimiento obtenido dentro del estudio con *L. casei* fue ligeramente más demorado al alcanzar su máxima actividad enzimática a las 24 h.

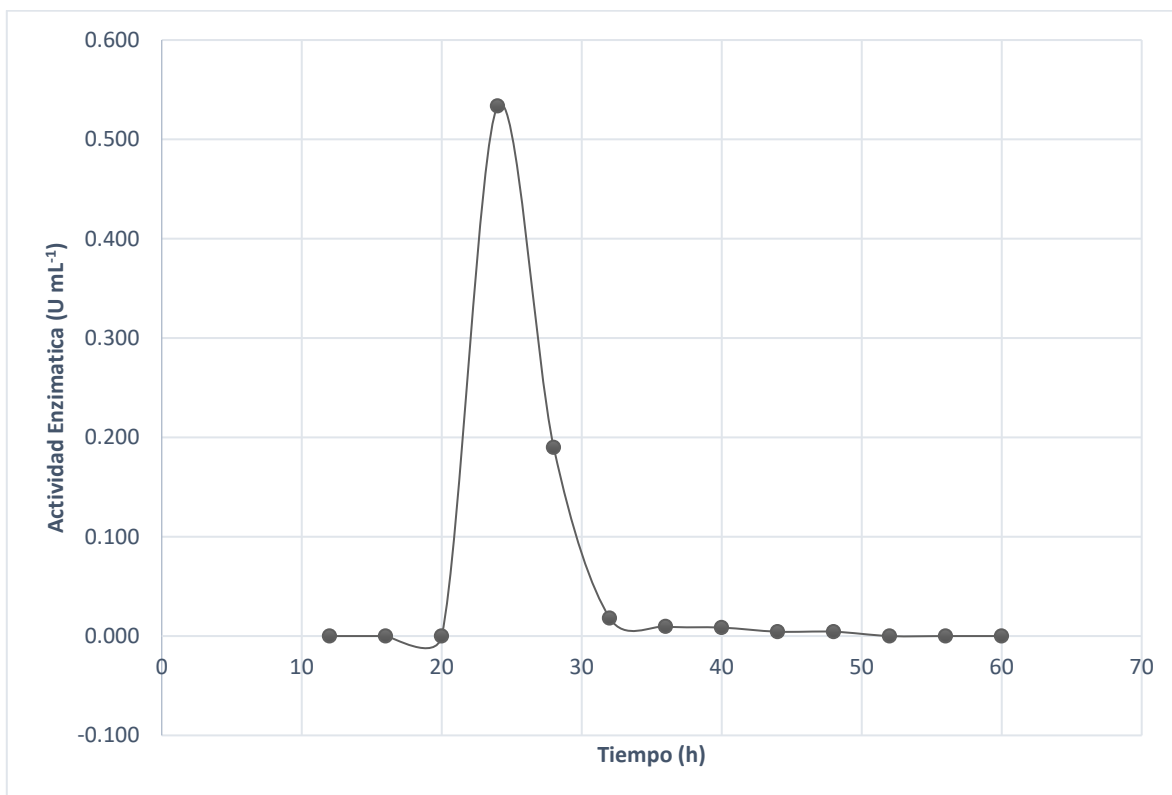


Figura 24. Cinética Enzimática de β - galactosidasa escala banco

Al contrastar las Figuras 24 y 25, se observa la relación que existe entre la actividad enzimática y la concentración total de proteínas. Al igual que se observó en la escala laboratorio existe una gran producción de proteínas en el mismo período en el cual la actividad enzimática alcanza su máximo. Se puede observar que los puntos más

altos se desplazan de la hora 24 hasta la 32. Se alcanzó un total de 28.64 mg mL^{-1} de proteínas totales al analizarlas por el método de Biuret.

En cuanto a la diferencia en el lapso de tiempo que existe de la producción proteica en la escala laboratorio y banco, se puede observar que no es notable, ya que inicialmente se alcanzaba un máximo a la hora 36. Además, se observó que existió una producción proteica mayor en la escala laboratorio (39.49 mg mL^{-1}), a diferencia de la de banco donde se alcanzó un total de 28.64 mg mL^{-1} .

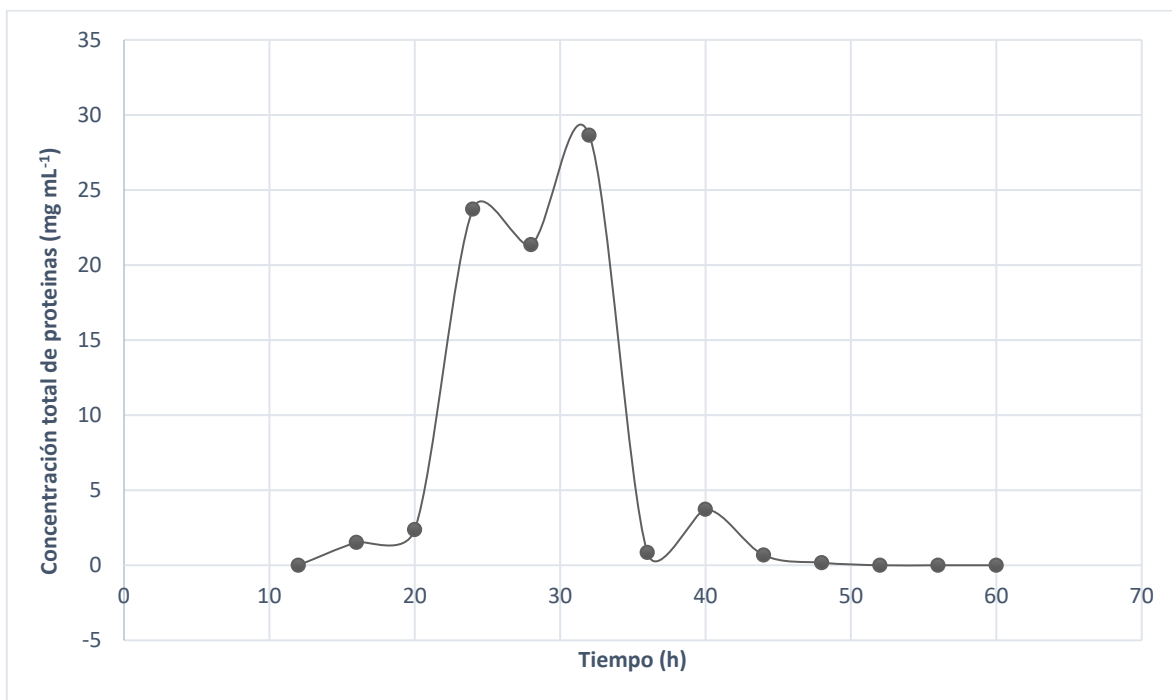


Figura 25. Curva de proteínas totales de *L. casei*

5.6. Parámetros Cinéticos

En la Tabla número 11 se puede observar los parámetros cinéticos optimizados gracias al diseño central compuesto, en conjunto con la superficie de respuesta. Inicialmente se muestra el incremento de la velocidad específica de crecimiento (μ) en un 40% y la velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}) en la escala banco en un 10

%. Además, esto se puede observar comparando las gráficas de crecimiento celular, ya que, el microorganismo llega al pico de la fase exponencial (2.778 g L⁻¹) en un menor tiempo (22 h). Para sustentar lo mencionado, es necesario mencionar que el tiempo de duplicación celular (Tabla 11) disminuyó en la escala banco como efecto de una mayor velocidad de crecimiento celular.

De la misma manera, la optimización de la productividad de la biomasa es presentada en la Tabla No. 11, donde se muestra en un ámbito volumétrico y gravimétrico. Inicialmente se muestra que la productividad de la biomasa volumétrica aumentó en aproximadamente un 25%. Así mismo, se optimizó la productividad máxima volumétrica de la biomasa en un 70%.

En cuanto a la actividad enzimática máxima, la Tabla No. 11 indica la concentración superior obtenida por las enzimas en la escala banco, valor superior al 30 % en relación con la escala laboratorio. De la misma manera el aumento de la actividad enzimática específica fue considerable, al sobrepasar dos veces en la escala banco cuando el volumen de trabajo aumenta.

El valor de la actividad enzimática específica aumentó notablemente al incrementar el volumen de la fermentación. La actividad específica se incrementó debido a la concentración considerable de lactasas en las proteínas totales de la solución.

Tabla 11

Parámetros Cinéticos

| Parámetro | Resultados | | |
|--|--------------------|--------------|-----------------|
| | Escala Laboratorio | Escala Banco | Unidades |
| Velocidad Específica de Crecimiento | 0.0394 | 0.0649 | h ⁻¹ |

| (μ) | | | |
|---|--------|--------|------------------|
| Velocidad Máxima de Crecimiento (μ_{max}) | 0.0899 | 0.0905 | h^{-1} |
| Tiempo de Duplicación (td) | 7.70 | 7.65 | h^{-1} |
| Productividad Máxima de Biomasa Volumétrica ($Y_x max$) | 0.0812 | 0.109 | $g L^{-1}h^{-1}$ |
| Productividad Máxima de Biomasa ($Y_x max$) | 0.0649 | 0.2180 | $g h^{-1}$ |
| Actividad Enzimática Máxima | 0.3762 | 0.5343 | $U mL^{-1}$ |
| Actividad Enzimática Específica | 0.0095 | 0.0224 | $U mg^{-1}$ |

Para el desarrollo de un bioproceso exitoso es necesario una productividad de biomasa alta, para obtener una cantidad considerable de producto. La productividad máxima de este estudio fue de $0.1090 g L^{-1} h^{-1}$ ó $0.218 g h^{-1}$, sin embargo, otros autores mencionados a continuación exponen resultados superiores debido al uso

de condiciones de pH, agitación y temperatura controladas durante toda la etapa del bioproceso en biorreactores. Aguirre-Ezkauriatza et al. (2010) exponen que *L. casei* en suero de leche de cabra alcanza una productividad de biomasa de $0.21 \pm 0.02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ siendo superior a la productividad alcanzada en el presente estudio. Actualmente, existen dos máximos exponentes en la producción de β -galactosidasas. En uno de los estudios más recientes Venkateswarulu et al. (2017) extrajo lactasas de *B. subtilis* VUVD001 con una actividad enzimática de 63.54 U mL^{-1} . Perini et al. (2013) optimizó la producción de β -galactosidasas de *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 a partir de un medio suplementado con suero de leche, el cual la actividad enzimática máxima fue de 21.99 U mL^{-1} . En contraste a los grandes productores de lactasa, Kim & Rajagopal (2000), obtuvieron una actividad enzimática máxima de 2.5 U mL^{-1} a partir de *Lactobacillus crispatus*. Consecuentemente, al comparar la actividad enzimática máxima del estudio (0.5343 U mL^{-1}) se puede concluir la actividad baja de esta enzima frente a otros es notablemente inferior. Esto se puede atribuir a la falta de estandarización de factores que se han mantenido estables dentro de este estudio como el pH, la temperatura, la agitación, la disolución de oxígeno, entre otros. Es preciso mencionar que en un estudio posterior se puede mejorar la actividad enzimática y la productividad del bioproceso mediante el uso de un biorreactor STR (*stirred tank reactor*).

Es claro que la concentración de biomasa, la productividad y la actividad enzimática de otros microorganismos es mayor a la de este estudio, sin embargo, es preciso mencionar que no existen estudios previos de la optimización o producción de β -galactosidasas a partir de cultivos de *L. casei*. Para la optimización de la actividad enzimática y la concentración de la biomasa fue necesario tomar puntos centrales referentes a estudios con diferentes microorganismos.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

El *Lactobacillus casei* ATCC393 es el microorganismo con mayor producción de proteínas, biomasa y actividad enzimática durante 24 h, al ser comparado con *L. acidophilus* y *B. subtilis*.

Gracias al desarrollo del diseño experimental Plackett Burman se obtuvo las variables significativas para el crecimiento de la biomasa y la actividad enzimática de la lactasa producida por *Lactobacillus casei* ATCC393. La variable más influyente para la actividad enzimática fue la concentración de suero de leche. Sin embargo, por fuentes bibliográficas se concluyó que se debe insertar cofactores divalentes como el MgSO_4 y el MnSO_4 . Por lo tanto, a partir de 7 variables iniciales se escogieron 3 variables (suero de leche, MgSO_4 y el MnSO_4) para la optimización del medio de cultivo.

A partir del diseño central compuesto y las superficies de respuesta se obtuvo que la concentración ideal de lactosa en el suero de leche debe ser de 4.68 \% p v^{-1} , para la optimización de la actividad enzimática de β – galactosidasa. Además, las concentraciones óptimas de las sales MgSO_4 y MnSO_4 fueron de 7.36 g L^{-1} y 0.0272 g L^{-1} , respectivamente.

Los parámetros cinéticos al aumentar el volumen y cambiar las condiciones del medio de cultivo fueron superiores gracias al proceso de optimización por medio del método de superficie de respuesta. La concentración celular máxima obtenida después de la optimización fue de 3.026 g L^{-1} a las 36 h. En contraste, la actividad enzimática máxima fue obtenida a las 24 h con un valor de 0.534 U mL^{-1} . Adicionalmente, la actividad específica aumentó en un 57% debido a la mayor concentración de enzima en las proteínas totales. La velocidad máxima aumentó aproximadamente en un 10 %, alcanzando una velocidad de 0.0905 h^{-1} . De igual manera se optimizó la productividad de la biomasa en un 70 % con un valor final de 0.109 g h^{-1} .

6.2 Recomendaciones

Se recomienda hacer un posterior DCC con el fin de obtener puntos óptimos mejor establecidos tomando como referencia los puntos máximos obtenidos dentro de este estudio.

Se recomienda realizar una optimización de la fermentación en un biorreactor donde las concentraciones de pH, temperatura, rotación y concentración de oxígeno sean constantes.

Es preciso realizar la misma optimización con otras especies de *Lactobacillus*.

Para asegurar la producción de enzimas de alta calidad es clave realizar nuevos diseños experimentales con distintas fuentes alternativas de carbono y otros cofactores enzimáticos.

Se sugiere realizar procesos *down stream* del bioproceso como purificación de las enzimas e inmovilización enzimática.

REFERENCIAS

- Ackerberg, T., Labuschagne, I., & Lombard, M. (2012). *The use of prebiotics and probiotics in infant formula*. *South African Family Practice*, 54(4), 321–323. <https://doi.org/10.1080/20786204.2012.10874243>
- Aguirre-Ezkauriatza, E. J., Aguilar-Yáñez, J. M., Ramírez-Medrano, A., & Alvarez, M. M. (2010). *Production of probiotic biomass (Lactobacillus casei) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures*. *Bioresource Technology*, 101(8), 2837–2844. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.047>
- Akolkar, S. K., Sajgure, A., & Lele, S. S. (2005). *Lactase production from Lactobacillus acidophilus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6–7), 1119–1122. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-0079-9>
- Al, H. E. T. (1979). (Escherichia coli), 4090–4095.
- Anjum, N., Maqsood, S., Masud, T., Ahmad, A., Sohail, A., & Momin, A. (2014). *Lactobacillus acidophilus: Characterization of the Species and Application in Food Production*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(9), 1241–1251. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.621169>
- Avonts, L., Uytven, E. Van, & Vuyst, L. De. (2004). *Cell growth and bacteriocin production of probiotic Lactobacillus strains in different media*, 14, 947–955. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.04.003>
- Bandhu, S., Dasgupta, D., Akhter, J., Kanaujia, P., Suman, S. K., Agrawal, D., ... Ghosh, D. (2014). *Statistical design and optimization of single cell oil production from sugarcane bagasse hydrolysate by an oleaginous yeast Rhodotorula sp. IIP-33 using response surface methodology*. *SpringerPlus*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-691>
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., ... Hansen, E. B. (2012). *Food fermentations: Microorganisms with technological*

- beneficial use. International Journal of Food Microbiology, 154(3), 87–97.*
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030>
- Bury, D., Geciova, J., & Jelen, P. (2001). *Effect of Yeast Extract Supplementation on beta-Galactosidase Activity of Lactobacillus delbrueckii subs. bulgaricus 11842 Grown in Whey. Czech J. Food Sci., 19(5), 166–170.* Recuperado el 4 de Enero del 2018
<https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/84794.pdf>
- Bury, D., Jelen, P., & Kaláb, M. (2001). *Disruption of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: A comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2(1), 23–29.* [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(00\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(00)00039-4)
- Daniela, P., Guti, B., & Concepci, R. (2013). Estudio del cultivo y concentración de una cepa *Lactobacillus plantarum* autóctona empleando un reactor y membranas semipermeables . Secado y estabilización de biomasa .
- Torres, A. (2016). Incidencias En Las Tendencias Del Consumo De Leche En La Ciudad De Guayaquil En Lo Que Respecta Al Posicionamiento De Mercado En Empresas Del Sector, Período 2011 - 2015.
- Di Lena, M., Quero, G. M., Santovito, E., Verran, J., De Angelis, M., & Fusco, V. (2015). *A selective medium for isolation and accurate enumeration of Lactobacillus casei-group members in probiotic milks and dairy products. International Dairy Journal, 47, 27–36.* <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.01.018>
- Doran, P. (1998). *Principio de ingeniería de los bioprocesos* (3rd ed.). Sydney: Academic Press Limited.
- FDA. (2018). *Generally Recognized as Safe (GRAS)*. Recuperado el 9 de agosto de 2018
<https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/gras/>
- Fernandes, P., & Carvalho, F. (2016). *Microbial Enzymes for the Food Industry. Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00019-4>

- Fu, W., & Mathews, A. P. (1999). *Lactic acid production from lactose by Lactobacillus plantarum: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen*. *Biochemical Engineering Journal*, 3(3), 163–170. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00014-5](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00014-5)
- Glantz, S. (2006). *Bioestadística (Sexta Edición)*. (J. D. L. Fraga, Ed.) (Sexta). San Francisco: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Hsu, C. A., Yu, R. C., & Chou, C. C. (2005). *Production of β -galactosidase by Bifidobacteria as influenced by various culture conditions*. *International Journal of Food Microbiology*, 104(2), 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.010>
- Hujanen, M., Linko, S., Linko, Y. Y., & Leisola, M. (2001). *Optimisation of media and cultivation conditions for L(+)(S)-lactic acid production by Lactobacillus casei NRRL B-441*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1–2), 126–130. <https://doi.org/10.1007/s002530000501>
- Ibrahim, S. A., Alazzeah, A. Y., Awaisheh, S. S., Song, D., Shahbazi, A., & Abughazaleh, A. A. (2010). *Enhancement of α - And β -galactosidase activity in lactobacillus reuteri by different metal ions*. *Biological Trace Element Research*, 136(1), 106–116. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8519-2>
- In Food Quality. (2011). *Microorganismos y alimentos*. *Education and Culture Lifelong Learning Programme*, 1–28. Retrieved from http://www.epralima.com/infoodquality/materiais_espanhol/Manuais/3.Microorganismos_y_alimentos.pdf
- INEC. (2016). *Población y Vivienda*. Retrieved from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-de-poblacion-y-vivienda/>
- Juers, D. H., Matthews, B. W., & Huber, R. E. (2012). *LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance*. *Protein Science*, 21(12), 1792–1807. <https://doi.org/10.1002/pro.2165>
- Kim, J. W., & Rajagopal, S. N. (2000). *Isolation and characterization of β -galactosidase from*

Lactobacillus crispatus. *Folia Microbiologica*, 45(1), 29–34.
<https://doi.org/10.1007/BF02817446>

Lavari, L., Páez, R., Cuatrin, A., Reinheimer, J., & Vinderola, G. (2014). *Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli*. *Journal of Dairy Research*, 81(3), 267–274. <https://doi.org/10.1017/S0022029914000156>

Liu, X., & Kokare, C. (2016). *Microbial Enzymes of Use in Industry. Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00011-X>

Madeira, J. V., Contesini, F. J., Calzado, F., Rubio, M. V., Zubieta, M. P., Lopes, D. B., & de Melo, R. R. (2016). *Agro-Industrial Residues and Microbial Enzymes: An Overview on the Eco-Friendly Bioconversion into High Value-Added Products. Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00018-2>

Montgomery, D. (2013). *Diseño y Analisis de Experimentos* (2nd ed.). Ciudad de Mexico: Diaz de Santos.

Naveena, B. J., Altaf, M., Bhadriah, K., & Reddy, G. (2005). *Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L(+) lactic acid by Lactobacillus amylophilus GV6 in SSF using wheat bran*. *Bioresource Technology*, 96(4), 485–490. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.05.020>

Ohlsson, J. A., Johansson, M., Hansson, H., Abrahamson, A., Byberg, L., Smedman, A., ... Lundh, Å. (2017). *Lactose, glucose and galactose content in milk, fermented milk and lactose-free milk products*. *International Dairy Journal*, 73, 151–154. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.06.004>

Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Knill, C. J., & Kosseva, M. (2010). *Production of L(+) Lactic Acid using Lactobacillus casei from Whey*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(1), 219–226. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000100027>

- Paz-y-Miño, C. (2016). Intolerancia a la lactosa en la población ecuatoriana. *El Telégrafo*. Retrieved from <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/columnistas/1/mala-leche>
- Perini, B. L. B., Souza, H. C. M., Kelbert, M., Apati, G. P., Pezzin, A. P. T., & Schneider, A. L. S. (2013). *Production of B-Galactosidase from cheese whey using kluyveromyces marxianus CBS 6556*. *Chemical Engineering Transactions*, 32(January), 991–996. <https://doi.org/10.3303/CET1332166>
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., & Rivas, J. (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>
- Sanchez, S., & Demain, A. L. (2016). *Useful Microbial Enzymes-An Introduction. Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications* (Vol. 2017). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00001-7>
- Sewalt, V., Shanahan, D., Gregg, L., La Marta, J., & Carrillo, R. (2016). *The Generally Recognized as Safe (GRAS) Process for Industrial Microbial Enzymes*. *Industrial Biotechnology*, 12(5), 295–302. <https://doi.org/10.1089/ind.2016.0011>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). *Microbial enzymes: industrial progress in 21st century*. *3 Biotech*, 6(2), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8>
- T. Vasiljevic, P. J. (2001). *Production of beta-galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2, 75–85.
- Velásquez, J., Giraldo, G., & Padillas, L. (2012). Viabilidad de *Lactobacillus casei ssp casei* ATCC 393 cultivado en suero de leche clarificado en un proceso de fermentación discontinuo Recuperado el 9 de Enero de 2018 <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169823914060>. *Vitae*, 19(2012).
- Venkateswarulu, T. C., Prabhakar, K. V., & Kumar, R. B. (2017). *Optimization of nutritional*

components of medium by response surface methodology for enhanced production of lactase. 3 Biotech, 7(3). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0805-7>

Wan, H., & Xia, Y. (2015). *Enzymatic transformation of stevioside using a β -galactosidase from Sulfolobus sp.* *Food Funct.*, 6(10), 3291–3295. <https://doi.org/10.1039/C5FO00631G>

Xuedong, Z. Y., & Li. (2015). *Supragingival Microbes. Atlas of Oral Microbiology*, 41–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802234-4.00003-3>

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. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.002>

Zhao L.; Liu, D., X. . W. (2007). *Effect of several factors on peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis.* *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(May), 1115–1121. <https://doi.org/10.1002/jctb>

