

**Evaluación de las proteínas hidrolizadas del lactouero como fuente de nitrógeno en la  
fermentación acidoláctica de la lactosa**

**Paula Andrea Duarte Manchego**

**Trabajo de grado para optar el título de Ingeniero químico**

**Director**

**Carlos Jesús Muvdi Nova**

**Ingeniero Químico, Msc., Ph. D.**

**Codirector**

**Juan Carlos Gonzalez Tellez**

**Ingeniero Químico**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ingenierías Físicoquímicas**

**Escuela de Ingeniería Química**

**Bucaramanga**

**2018**

*"Alabad al Señor, todos los pueblos, aclamadlo, todas las naciones, 2.pues su amor por nosotros es muy grande y su lealtad dura por siempre."*

*Salmos, 117*

### Agradecimientos

Te agradezco Dios nuestro por respaldarme y llenarme de tu infinito amor a lo largo de mi vida, a la santísima Virgen María mi madre intercesora, a todos los ángeles y santos por su continua protección.

A mis padres, Víctor Duarte y Paula Manchego por amarme tanto, por los sacrificios que han tenido que pasar por verme salir adelante y a mis hermanos Juan Camilo y Emanuel, por llenar mi vida de color... ustedes, mi familia, son mi motivación día tras día.

A mis amigos, especialmente a María Fernanda Ortiz, Laura Montaña, Paola Arteaga, y Diana Manosalva, por ser más que mis amigas, mis hermanas, mis cómplices, mis confidentes.

Al movimiento Juan XXIII, al grupo de liturgia de la Parroquia San Francisco de Asís, al Padre Carlos Julio Vargas de la parroquia San Vicente de Paul, por sus oraciones, cariño y apoyo brindado.

A mi director, el profesor Carlos Jesús Muvdi Nova, por sus enseñanzas, confianza y el tiempo ofrecido para cumplir a cabalidad este proyecto. Al ingeniero Juan Carlos González por su constante apoyo y dedicación y al profesor Hermínsul de Jesús Cano por brindarme su ayuda, tiempo y guía.

A la Universidad Industrial de Santander, a sus directivos, profesores, técnicos y compañeros por la formación y colaboración permanente.

A los integrantes del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos CICTA-UIS por su disposición, conocimientos y un buen ambiente laboral, clave en el logro del presente trabajo de grado.

## Contenido

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	14
1. Objetivos .....	19
1.1 Objetivo General .....	19
1.2 Objetivos Específicos.....	19
2. Metodología .....	20
2.1 Fase 1: Análisis del efecto del pH y de la temperatura sobre el grado de hidrólisis de proteínas de lactosuero utilizando la enzima Gelzyme L 500 <sup>®</sup> .....	21
2.2 Fase 2: Seguimiento y caracterización de la hidrólisis en el tiempo. ....	22
2.3 Fase 3: Evaluación del efecto del suministro de los hidrolizados obtenidos como fuente de nitrógeno en la fermentación láctica a partir de la lactosa.....	23
2.3.1 Activación del microorganismo .....	23
2.3.2 Preparación del inóculo .....	24
2.3.3 Estandarización del inóculo .....	24
2.3.4 Fermentaciones lácticas tipo batch.....	24
2.3.5 Cuantificación de lactosa y ácido láctico .....	25
3. Análisis y discusión de resultados .....	26
3.1 Análisis del efecto del pH y la temperatura sobre el grado de hidrólisis de proteínas de lactosuero utilizando la enzima Gelzyme L 500 <sup>®</sup> .....	26

---

3.2 Seguimiento y caracterización de la hidrólisis en el tiempo.....	29
3.3 Evaluación de los hidrolizados de proteína como fuente de nitrógeno en la fermentación láctica a partir de la lactosa. ....	33
4. Conclusiones.....	39
5. Recomendaciones .....	40
Referencias Bibliográficas .....	41

## Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
<i>Figura 1.</i> Diagrama metodológico del proyecto de grado.....	20
<i>Figura 2.</i> Obtención de las proteínas del lactosuero mediante su desnaturalización térmica y ácida.....	21
<i>Figura 3.</i> Montaje de la hidrólisis.....	22
<i>Figura 4.</i> Ensamblaje electroforesis SDS- PAGE.....	23
<i>Figura 5.</i> Azada del microorganismo para su siembra en el medio del precultivo.....	24
<i>Figura 6.</i> Medios de fermentación después de su esterilización, con las fuentes de nitrógeno, con extracto de levadura (izquierda), hidrolizado al 7%p/p (centro) e hidrolizado al 1%p/p (derecha).....	25
<i>Figura 7.</i> Porcentaje de grado de hidrólisis Vs tiempo, en función del cambio del pH y de la temperatura.....	27
<i>Figura 8.</i> Condiciones de pH y temperatura que alcanzaron los más altos porcentajes de grado de hidrólisis.....	28
<i>Figura 9.</i> Curva de evolución del grado de hidrólisis.....	30
<i>Figura 10.</i> Electroferograma por Tricina- SDS PAGE de: a. solución de proteínas de lactosuero previo a la hidrólisis; b. proteínas de lactosuero hidrolizadas durante 150 min (tiempo medio a la estabilización); c. proteínas de lactosuero hidrolizadas durante 300 min.....	32

*Figura 11.* a. Curva de evolución de las UFC/mL de la primera serie de fermentaciones; b. y d. Densidad óptica (660nm) y pH primera serie de fermentaciones; c. y e. Densidad óptica (660nm) y pH segunda serie de fermentaciones..... 36

*Figura 12.* Velocidad de crecimiento microbiano ( $\mu$ ) de la *Lactobacillus casei* ATCC 334 mediante regresión lineal del Ln(UFC) Vs tiempo utilizando como fuente de nitrógeno: a) extracto de levadura al 1%p/p, hidrolizado al 1%p/p, hidrolizado al 7%p/p..... 37

## Lista de Tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Propiedades principales de las proteínas del lactosuero. ....	16
Tabla 2. <i>Análisis bromatológico de la solución de proteínas del lactosuero antes de su hidrólisis.</i> ....	26
Tabla 3 <i>a. Solución acuosa de proteínas de lactosuero previa a la hidrólisis; b. Extracto de levadura; c. Cambio en el color de las proteínas hidrolizadas de lactosuero al variar pH y temperatura durante 90 min.</i> ....	29
Tabla 4. <i>Porcentaje de nitrógeno amino y nitrógeno total en base seca del extracto de levadura y de las WP (proteínas del lactosuero- whey protein) durante la hidrólisis.</i> ....	30
Tabla 5. <i>Evolución de la absorbancia y el recuento de UFC/mL en el tiempo durante el precultivo de Lactobacillus casei ATCC 393.</i> .....	33

## Resumen

**Título:** Evaluación de las proteínas hidrolizadas del lactouero como fuente de nitrógeno en la fermentación acidoláctica de la lactosa \*

**Autora:** Paula Andrea Duarte Manchego \*\*

**Palabras Clave** Proteínas, lactouero, nitrógeno, fermentación

### Descripción

Este trabajo de investigación se desarrolló en el marco de un proyecto de maestría en ingeniería química, el cual busca valorizar el lactosuero mediante su pretratamiento, basado en etapas de desproteización y clarificación, para disminuir su efecto espumante para emplearlo posteriormente como sustrato en la fermentación láctica, lo cual resulta en un problema al llevarse a cabo a escala industrial, ya que actualmente se emplean fuentes de nitrógeno costosas como el extracto de levadura lo que provoca un bajo rendimiento del proceso. A partir de lo anterior, surge la idea de hidrolizar empleando la enzima Gelzyme L500© las proteínas de lactosuero que en el proyecto de maestría se descartan, variando pH y T para obtener las condiciones que garantizaron la mayor ruptura de enlaces peptídicos (%DH); se caracterizó el hidrolizado por medio de la curva de evolución alcanzando un 30%DH a los 30 min (tiempo de estabilización), por medio de la técnica tricina SDS-PAGE se evidenció un tamaño molecular final menor a 6,5kDa y se cuantificó el % de nitrógeno amino y total durante la hidrólisis. Finalmente se evaluaron tres fuente de nitrógeno: hidrolizado al 7%p/p, hidrolizado diluido al 1%p/p y extracto de levadura con una concentración del 1% p/p. Se obtuvieron resultados similares de los medios fermentativos los cuales contenían extracto de levadura e hidrolizado al 1%p/p, respecto al tiempo de adaptación, tiempo de estabilización y velocidad específica de crecimiento de la bacteria y concentraciones de lactosa consumida y ácido láctico producido.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas Escuela de Ingeniería Química Director Carlos Jesús Muvdi Nova Ingeniero Químico, Msc., Ph. D. Codirector Juan Carlos Gonzalez Tellez Ingeniero Químico

## Abstract

**Título:** Evaluación de las proteínas hidrolizadas del lactouero como fuente de nitrógeno en la fermentación acidoláctica de la lactosa \*

**Autora:** Paula Andrea Duarte Manchego \*\*

**Palabras Clave** Proteínas, lactouero, nitrógeno, fermentación

### Descripción

Este trabajo de investigación se desarrolló en el marco de un proyecto de maestría en ingeniería química, el cual busca valorizar el lactosuero mediante su pretratamiento, basado en etapas de desproteización y clarificación, para disminuir su efecto espumante para emplearlo posteriormente como sustrato en la fermentación láctica, lo cual resulta en un problema al llevarse a cabo a escala industrial, ya que actualmente se emplean fuentes de nitrógeno costosas como el extracto de levadura lo que provoca un bajo rendimiento del proceso. A partir de lo anterior, surge la idea de hidrolizar empleando la enzima Gelzyme L500© las proteínas de lactosuero que en el proyecto de maestría se descartan, variando pH y T para obtener las condiciones que garantizaron la mayor ruptura de enlaces peptídicos (%DH); se caracterizó el hidrolizado por medio de la curva de evolución alcanzando un 30%DH a los 30 min (tiempo de estabilización), por medio de la técnica tricina SDS-PAGE se evidenció un tamaño molecular final menor a 6,5kDa y se cuantificó el % de nitrógeno amino y total durante la hidrólisis. Finalmente se evaluaron tres fuente de nitrógeno: hidrolizado al 7%p/p, hidrolizado diluido al 1%p/p y extracto de levadura con una concentración del 1% p/p. Se obtuvieron resultados similares de los medios fermentativos los cuales contenían extracto de levadura e hidrolizado al 1%p/p, respecto al tiempo de adaptación, tiempo de estabilización y velocidad específica de crecimiento de la bacteria y concentraciones de lactosa consumida y ácido láctico producido.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas Escuela de Ingeniería Química Director Carlos Jesús Muvdi Nova Ingeniero Químico, Msc., Ph. D. Codirector Juan Carlos Gonzalez Tellez Ingeniero Químico

## Introducción

El ácido láctico, es un compuesto hidróscopico, orgánico, incoloro, inodoro, de baja volatilidad, nombrado por la IUPAC como ácido 2-hidroxiopropanoico, es utilizado en procesos alimenticios como regulador de pH, potenciador del sabor, mientras que sus sales de sodio y potasio tienen propiedades conservantes y antimicrobianas; en la industria farmacéutica, como electrolito y en el sector químico, como solvente biodegradable, y precursor del ácido poliláctico (polímero termoplástico biodegradable) (Ameen & Caruso, 2017; Hofvendahl *et al.*, 2000).

Se proyecta que su mercado mundial alcance una tasa de crecimiento anual compuesta de 16,73% desde el 2017 al 2021, dada la tendencia por parte del consumidor hacia productos amigables con el medio ambiente y menos perjudiciales para la salud (Business Wire Inc. 2017). En el caso de Colombia, a pesar de que el valor de sus exportaciones ha aumentado en los últimos años, sigue mostrando una baja producción, aspecto que muestra la oportunidad de estudiar el diseño de estrategias para impulsar su producción nacional (García *et al.* 2010).

El ácido láctico puede ser obtenido por síntesis química a partir de la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico, cuyo producto es una mezcla racémica de sus dos isómeros ópticos, dextrógira D(-), perjudicial para el metabolismo humano produciendo acidosis y descalcificación (García *et al.*, 2010) y levógira L(+) clasificado como sustancia GRAS (generalmente seguro) según la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos). Se dice que el 90% de la producción mundial se lleva a cabo por vía biotecnológica, ya que tiene la ventaja de

formar uno de los isómeros dependiendo principalmente de la bacteria u hongo seleccionado (Hofvendahl & Hahn-Hägerdal, 2000).

Para la fermentación, existen variables que modifican en mayor medida la productividad y características finales, por un lado, el crecimiento microbiano se verá influenciado al existir alta concentración de iones de hidrógeno en el medio (bajo pH), ya que afecta el funcionamiento de sus enzimas y el transporte de nutrientes en la célula, por lo que en múltiples estudios se ha buscado la forma de optimizar el pH con el fin de aumentar la fase exponencial de crecimiento del microorganismo y formación de producto (Panesar *et al.*, 2010); otro factor es la temperatura, la cual influye en el desarrollo de los microorganismos, por lo que se requiere establecer el rango óptimo de crecimiento.

Las bacterias lácticas como la *Lactobacillus casei* empleada en el presente estudio, tienen una productividad limitada por lo que requieren complejos nutricionales, ricos en aminoácidos y fuente de vitaminas; por lo que uno de los factores más importantes es la fuente de nitrógeno (Mohseni *et al.*, 2016). En la literatura se ha reportado el uso de extracto de levadura (Panesar *et al.*, 2010; Amrane, 2001; Garcia *et al.*, 2010; Serna & Rodriguez, 2005) debido a que conduce a productividades más altas, gracias al contenido de purina, pirimidina y vitamina B (Nancib *et al.*, 2001). Sin embargo, al considerar una aplicación de tipo industrial, su elevado costo afecta la rentabilidad del proceso, razón por la cual en los últimos años se han estudiado fuentes de mayor disponibilidad y bajo costo que conduzcan a un proceso competitivo y sostenible.

Una de las fuentes de nitrógeno alternativas con potencial uso en procesos fermentativos puede obtenerse mediante el aprovechamiento de las proteínas hidrolizadas de lactosuero, subproducto obtenido durante la elaboración del queso.

Se estima que se producen 9L de lactosuero por cada kg de queso, conteniendo alrededor del 20% de las proteínas de la leche, entre las que se encuentra la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), esta proteína es soluble en solución salina y experimenta cambios conformacionales al variar el pH, aunque el más importante es su desnaturalización entre 50 a 90 °C, con efecto reversible por debajo de 70 °C (Sawyer, 2003; De Wit *et al.*, 1980); La  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -La) por el contrario es insoluble en solución salina, se desnaturaliza a 65,2 °C y a un pH de 6,7, además, su grado de renaturalización es del 90% al enfriarse. En menor proporción se encuentra la albúmina sérica bovina (BSA), en la que la unión de ácidos grasos limita su desnaturalización mediante calor y las inmunoglobulinas (Ig) que son glicoproteínas de diferentes tamaños moleculares que comparten anticuerpos comunes con un pH de desnaturalización de 3,5 (Parra, 2009; Morr *et al.*, 1993). Las propiedades más relevantes de las proteínas del lactosuero se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1.

Propiedades principales de las proteínas del lactosuero.

	$\beta$ -Lg	$\alpha$ -La	BSA	Ig
Peso molecular (kDa)	18,3	14,2	66,4	$\geq 146$
Punto isoelectrico	5,2	4,2- 4,5	4,7- 4,9	5,5- 8,3
Concentración en el lactosuero (g/l)	2- 4	1-1,5	0,4	0,4- 1

Nota. Modificado de Farrell *et al.*, (2004); Morr *et al.*, (1993).

A pesar de su contenido nutricional, el lactosuero ha sido considerado un residuo y al ser vertido directamente a fuentes hídricas resulta en un problema ambiental ya que tiene una DBO (demanda biológica de oxígeno) de 3,5Kg y una DQO (demanda química de oxígeno) de 6,8 kg por cada 100 kg de lactosuero (Ghaly & Kamal, 2004), motivo por el cual se ha venido buscando nuevas y mejores alternativas de uso.

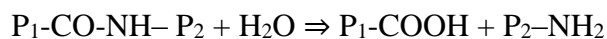
Es así como surge la idea de inducir la precipitación de las proteínas de lactosuero, mediante un tratamiento térmico y ácido, para su posterior hidrólisis enzimática a las condiciones más favorables de pH y temperatura, y estudiar su efecto como fuente de nitrógeno en la fermentación láctica de la lactosa.

Este trabajo de investigación se desarrolla en el marco del proyecto de maestría titulado *Estudio de la valorización de lactosuero ácido mediante pretratamiento a distintos grados, basado en etapas de desproteinización, clarificación y concentración, para su uso como sustrato en la fermentación láctica*, del ingeniero Juan Carlos González Téllez.

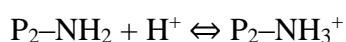
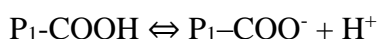
Los hidrolizados son el resultado de un mecanismo de ruptura de enlaces peptídicos (Benítez *et al.*, 2008), siendo objeto de estudio al tener distintas propiedades funcionales, entre ellas, antioxidantes, que permiten eliminar radicales libres que causan daños en células y tejidos (Shu *et al.*, 2015), antimicrobianas, inmunoestimuladoras y antihipertensivas (Biziulevicius *et al.*, 2006), (Antila *et al.*, 1991), características importantes para la formulación de productos alimenticios o farmacéuticos (bebidas saludables y dietas enterales). Sin embargo, poco ha sido el enfoque como fuente de nitrógeno en procesos fermentativos, para la producción de ácido láctico.

Según el sistema catalizador, la hidrólisis enzimática ha contado con mayor aceptación en todos los sectores científicos e industriales, al ser la alternativa menos agresiva y permitiendo un control sobre el grado de ruptura de enlaces peptídicos; a diferencia de la hidrólisis ácida, que al emplear altas temperaturas destruye algunos aminoácidos y vitaminas por completo y daña otras parcialmente; y a la hidrólisis básica, que en el proceso de neutralización conduce inevitablemente a la formación de productos de degradación tóxicos.

Como primer paso, en el proceso de la hidrólisis, la proteasa actúa sobre el enlace peptídico, rompiéndolo, e incorporando por un lado el ion hidróxido para formar el grupo carboxilo y por el otro, el ion hidrógeno libre para formar el grupo amino, según la siguiente ecuación:



Los grupos amino y carboxilo formados tras la hidrólisis pueden estar parcialmente ionizados según los siguientes equilibrios (Guadix *et.*, 2000):



La cantidad de grupos amino recién formados provoca un aumento de nitrógeno amino y al no existir un control de pH, el sistema se acidifica, ya que el grupo amino al estar parcialmente protonado conlleva a disminuirlo continuamente.

Para realizar su seguimiento y control se mide el grado de hidrólisis DH, definido como el porcentaje de enlaces peptídicos rotos, el cual está determinado por la cantidad de proteína a hidrolizar, la relación enzima/sustrato, la naturaleza de la enzima y condiciones operacionales como el pH, la temperatura y el tiempo de reacción (Hill & Schmidt, 1962; Coelho *et al.*, 2012). La técnica comúnmente empleada es conocida como pH-state (Adler-Nissen, 1986) que permite correlacionar el grado de hidrólisis con la cantidad de base añadida para mantener el pH de trabajo constante, según la siguiente ecuación:

$$DH\% = \frac{B \cdot N_B}{M_P \cdot h_{tot} \cdot \alpha} * 100 \quad \text{Ecuación 1)}$$

Donde, B representa el volumen acumulado de NaOH (mL),  $N_B$  es la concentración de NaOH(N);  $M_P$  es la masa total de proteína hidrolizada (g);  $h_{tot}$  representa el número total de enlaces peptídicos, tomado como 8,8 meq / g (Ghosh *et al.*, 2017),  $\alpha$  es el grado de disociación de grupos

amino liberados durante la hidrólisis, el cual está en función del pH y del pK (ver ecuación 2), 7,1 fue el valor promedio de pK tomado para proteínas del lactosuero (Adler-Nissen, 1986).

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1 + 10^{pH-pK}} \quad \text{Ecuación 2)}$$

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Evaluar la obtención de hidrolizados de proteína de lactosuero para su aplicación como fuente de nitrógeno en la fermentación láctica a partir de lactosa.

### 1.2 Objetivos Específicos

- Analizar el efecto del pH y la temperatura sobre el grado de hidrólisis de proteínas concentradas de lactosuero, utilizando la enzima Gelzyme L 500<sup>®</sup>.
- Caracterizar los hidrolizados obtenidos en términos de la curva de evolución del grado de hidrólisis, tamaño de péptidos y porcentaje de nitrógeno total y amino.
- Evaluar el efecto del suministro de los hidrolizados obtenidos como fuente de nitrógeno en la fermentación láctica a partir de lactosa comercial.

## 2. Metodología

La Figura 1 presenta el diagrama metodológico planteado, donde se muestran las fases desarrolladas durante este proyecto de grado.

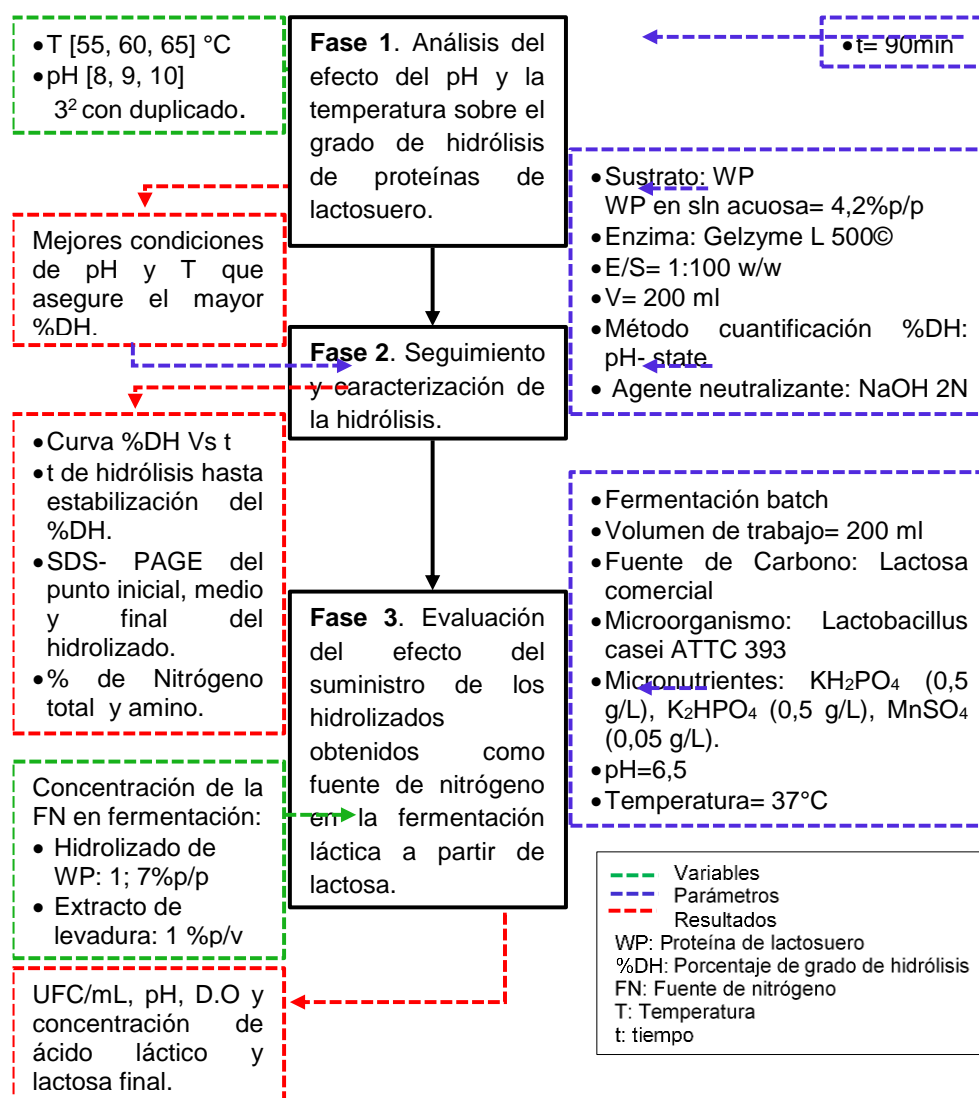


Figura 1. Diagrama metodológico del proyecto de grado.

## 2.1 Fase 1: Análisis del efecto del pH y de la temperatura sobre el grado de hidrólisis de proteínas de lactosuero utilizando la enzima Gelzyme L 500®.

Para analizar la influencia del pH y de la temperatura sobre el grado de hidrólisis, se realizó un diseño experimental aleatorio, con tres niveles (8, 9, 10), (55, 60, 65°C); valores seleccionados de acuerdo a las mejores condiciones de actividad reportadas por el fabricante de la enzima Gelzyme L 500 © (PROENZIMAS S.A), utilizando como sustrato a hidrolizar proteína del lactosuero desnaturalizada mediante tratamiento térmico y ácido (93°C, 40 min y pH 4,4), (Figura 2). Esta proteína desnaturalizada fue diluida en agua destilada a una concentración de 4,2%p/v, manejando una relación enzima sustrato del 1% en un volumen de trabajo de 200 ml (Figura 3) (Shu *et al.*, 2015 ; Galvão *et al.*, 2001).



Figura 2. Obtención de las proteínas del lactosuero mediante su desnaturalización térmica y ácida.

Las pruebas se realizaron durante 300 min, haciendo seguimiento al grado de hidrólisis (%DH) por el método pH-state (Adler-Nissen, 1986), registrando el volumen de NaOH 2N consumido para mantener el pH de trabajo (Spellman *et al.*, 2003; Prieto, 2007). La enzima se inactivó a 95°C por 15 min (Salis *et al.*, 2007). Posteriormente, las muestras se mantuvieron en congelación a 20°C para su conservación y posterior análisis (Ghosh *et al.*, 2017).



*Figura 3.* Montaje de la hidrólisis

## **2.2 Fase 2: Seguimiento y caracterización de la hidrólisis en el tiempo.**

Se realizó nuevamente la hidrólisis de proteínas de lactosuero utilizando los parámetros pH y temperatura que proporcionaron mayor grado de hidrólisis en la Fase 1. El tiempo fijado, fue hasta la estabilización de la reacción. Los hidrolizados obtenidos se mezclaron, caracterizaron y congelaron para su posterior uso en las fermentaciones.

La caracterización del caldo obtenido al finalizar la hidrólisis se realizó mediante la cuantificación del % de nitrógeno total y amino por el método de Kjeldahl, este último sin digestión. También se separaron las especies proteicas utilizando electroforesis SDS PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) (Schägger, 2006). Esta técnica es comúnmente empleada para separar proteínas en el rango de masa 1–100 kDa, ya que las concentraciones de acrilamida en los geles son bajas facilitando la electrotransferencia. Dentro de esta técnica existen dos sistemas, la glicina-SDS-PAGE (también conocida como Laemmli-SDS-PAGE) y la tricina- SDS-PAGE, la diferencia se encuentra en los valores de pK de los grupos

funcionales (glicina y tricina) que definen sus movilidades electroforéticas respecto a las muestras a analizar.

Se decidió trabajar con el sistema tricina – SDS-PAGE al 16% de acrilamida bisacrilamida AB-3, ya que permite la resolución de proteínas menores a 30 kDa y se llevó a cabo el protocolo de tinción de Coomassie ya que se mantiene unido a la proteína, y su sensibilidad es alta. A continuación, se muestra el ensamblaje del sistema tricina- SDS PAGE para separar las especies proteicas



Figura 4. Ensamblaje electroforesis SDS- PAGE.

### **2.3 Fase 3: Evaluación del efecto del suministro de los hidrolizados obtenidos como fuente de nitrógeno en la fermentación láctica a partir de la lactosa.**

**2.3.1 Activación del microorganismo** Se utilizó la cepa *Lactobacillus casei* ATCC 393 (Velasquez *et al.*, 2015) en presentación *kwik stick*, la cual fue activada en agar Tripticasa de soya (MERCK), incubada en placas Petri a 37°C durante 24h y luego conservadas a 4°C para su posterior uso.

**2.3.2 Preparación del inóculo** Se tomó una azada del microorganismo activado (Figura 5) y se transfirió a 200mL de medio de precultivo con la siguiente composición: lactosa 44 g/L, extracto de levadura 10 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g/L,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,05 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 g/L (Büyükkileci & Harsa, 2004) y se le dio un tiempo de incubación cercano a las 12h.



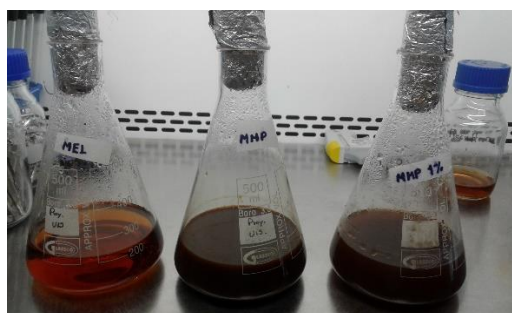
*Figura 5.* Azada del microorganismo para su siembra en el medio del precultivo.

**2.3.3 Estandarización del inóculo** Se realizó la medición de densidad óptica y recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) cada 4h, de modo que su concentración se encontrara en el orden de  $10^6$  y  $10^8$  UFC/mL, correspondiente a la fase de crecimiento exponencial del microorganismo (Castro, 2011).

**2.3.4 Fermentaciones lácticas tipo batch** Se realizaron dos series de fermentaciones lácticas (original y duplicado) en modo discontinuo, en matraces Erlenmeyer de 500 mL (volumen de trabajo de 200 mL), a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , 130rpm (agitación orbital), pH de 6,5, utilizando para el sustrato la misma composición de la fuente de carbono y micronutrientes (sales) del precultivo, con la diferencia en que se evaluaron 3 fuentes de nitrógeno distintas (Figura 5):

hidrolizados de proteínas del lactosuero obtenidos de la Fase 2 en una concentración de 7% (hidrolizado sin diluir) y de 1% p/p de materia seca (hidrolizado diluido); al mismo tiempo se llevó a cabo una tercera fermentación con extracto de levadura al 1% p/v.

El 1% se debe a que en la literatura los rendimientos y productividades más altas se obtuvieron al utilizar 10 g/L de extracto de levadura (Ghaly & Kamal, 2004), (Serna & Rodriguez, 2005), lo que corresponde a un 1% del volumen total. Teniendo en cuenta que el extracto de levadura tiene 9 veces más de nitrógeno amino (Tabla 4), se plantea trabajar con hidrolizado al 7% p/p en materia seca, buscando acercarse a este valor.



*Figura 6.* Medios de fermentación después de su esterilización, con las fuentes de nitrógeno, con extracto de levadura (izquierda), hidrolizado al 7% p/p (centro) e hidrolizado al 1% p/p (derecha).

**2.3.5 Cuantificación de lactosa y ácido láctico** Los productos de fermentación obtenidos se caracterizaron en cuanto a concentración de ácido láctico y lactosa por la técnica HPLC, empleando una columna Coregel 107H acoplada a un equipo UFLC LC 20AD (Shimadzu), seguida de un detector de índice de refracción RID-10A. El equipo operó en modo isocrático, a una temperatura de 80°C, con flujo de 0,6 mL/ min. La fase móvil empleada fue ácido sulfúrico 8mM, el tiempo que tomó cada análisis fue de 25min.

### 3. Análisis y discusión de resultados

#### 3.1 Análisis del efecto del pH y la temperatura sobre el grado de hidrólisis de proteínas de lactosuero utilizando la enzima Gelzyme L 500<sup>®</sup>.

La solución acuosa de proteína del lactosuero previa a su hidrólisis fue caracterizada mediante un análisis bromatológico, del cual sus resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

*Análisis bromatológico de la solución de proteínas del lactosuero antes de su hidrólisis.*

<b>Humedad [%p/p]</b>	<b>81,61</b>
Materia seca [%p/p]	18,39
Proteína [%p/p]	11,23
Ceniza [%p/p]	0,57
Grasa [%p/p]	ND
Carbohidratos totales [%p/p]	6,58

En la Figura 7, se muestra el porcentaje de DH de proteínas de lactosuero empleando la enzima Gelzyme L 500<sup>®</sup>, a diferentes niveles de temperatura y pH. Todas las pruebas tuvieron una duración de 90 min.

Se observa la curva del grado de hidrólisis de forma creciente con una tendencia a estabilizarse para diferentes valores de pH y temperatura. Dicho comportamiento también se ha encontrado en

la literatura para otras proteasas como la Tripsina, la Papaína, la Pancreatina y la Flavourzyme, la Alcalasa, la Neutrasa, entre otras (Perea *et al.*, 1993; Prieto, 2007; Shu *et al.*, 2015).

Los DH más altos se obtuvieron a 60 y 65 °C, ambos a un pH de 10 (Figura 8). De forma general, se evidenció mayor grado de ruptura de enlaces peptídicos al aumentar el pH de trabajo, sin embargo, respecto a la temperatura muestra mayores valores a 60°C.

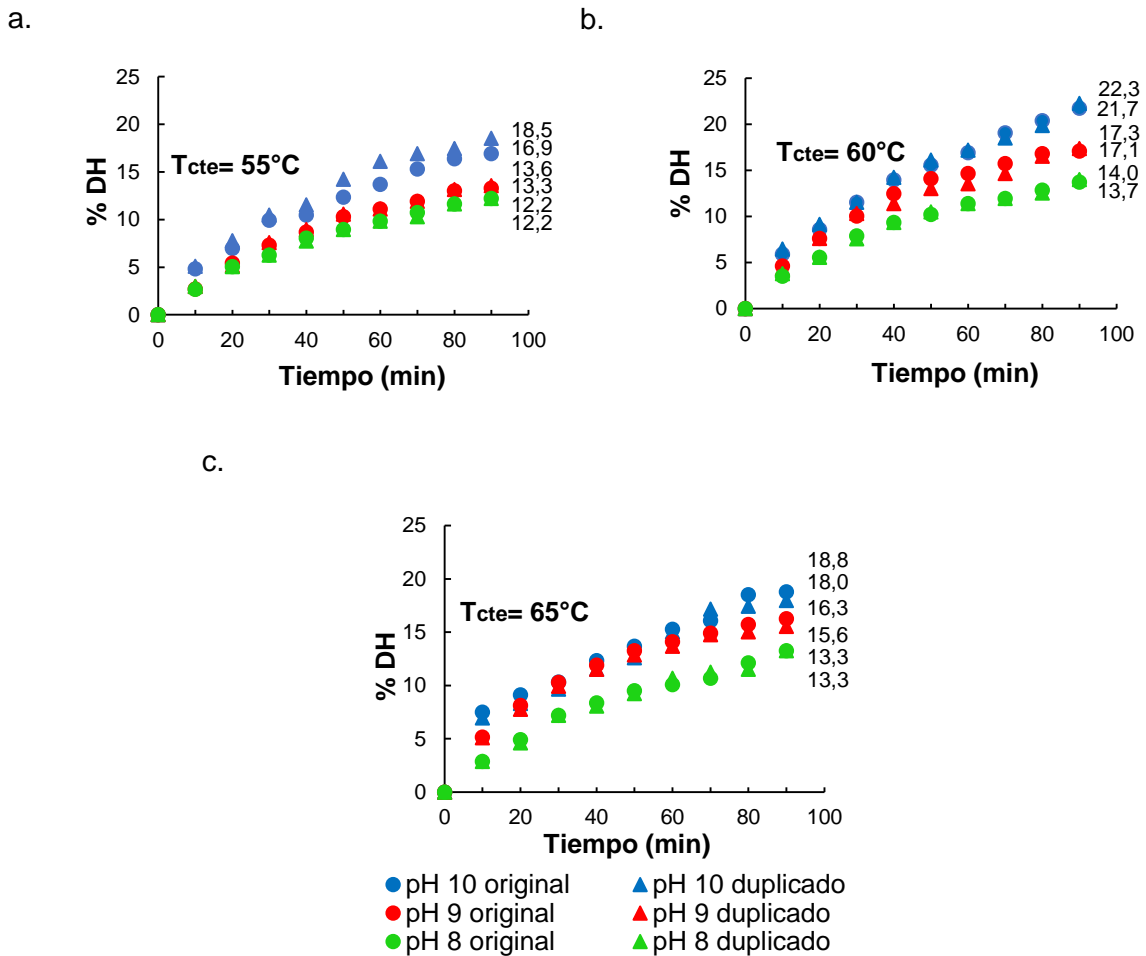


Figura 7. Porcentaje de grado de hidrólisis Vs tiempo, en función del cambio del pH y de la temperatura.

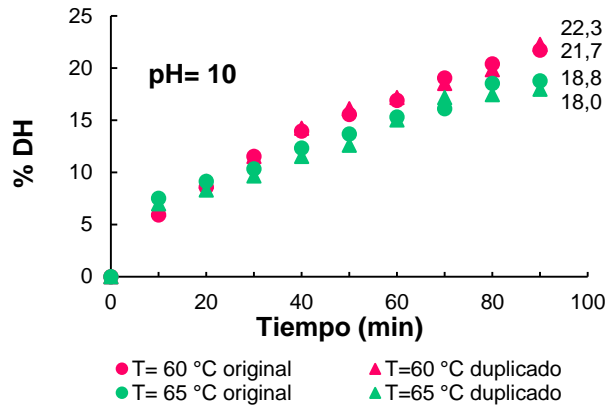


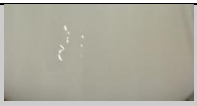
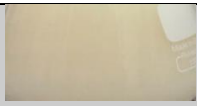









Figura 8. Condiciones de pH y temperatura que alcanzaron los más altos porcentajes de grado de hidrólisis.

Por otro lado, en la Tabla 3a, se muestra la apariencia de la solución antes de la hidrólisis junto con el extracto de levadura (Tabla 3b) y en la Tabla 3c, se observan los cambios en la apariencia a distintas condiciones de trabajo, tornándose más oscuro al aumentar el pH y la temperatura. Este cambio se genera por dos razones: la aparición de especies proteicas de diferentes tamaños moleculares (DH) y por la pérdida de las estructuras de orden superior (desnaturalización de las proteínas); este segundo aspecto, se debe principalmente por el aumento de la temperatura.

Tabla 3

a. Solución acuosa de proteínas de lactosuero previa a la hidrólisis; b. Extracto de levadura; c. Cambio en el color de las proteínas hidrolizadas de lactosuero al variar pH y temperatura durante 90 min.

c.	T°C	pH		
		8	9	10
 	55			
	60			
	65			

### 3.2 Seguimiento y caracterización de la hidrólisis en el tiempo

A partir de la fase anterior, se obtuvieron los valores de pH y temperatura que garantizan el mayor grado de hidrólisis de proteínas de lactosuero. En la Figura 9, se muestra la curva de evolución de grado de hidrólisis, operando a estas condiciones hasta estabilizarse. Se aprecia que el grado de hidrólisis alcanzado fue aproximadamente 30% DH a los 300 min. Este valor es alto al compararlo con investigaciones de hidrólisis al utilizar como sustrato lactosuero crudo, como el reportado por Coelho *et al.* (2012), en el que se emplea pancreatina y papaína como biocatalizadores, estabilizándose a las 240 min y logrando un DH no mayor al 24%. Este resultado contrasta con el estudio realizado por Zheng *et al.* (2008), en el que se emplea concentrado de proteína (WPC) con una concentración del 78 %p/p y Alcalasa, en el que se obtuvo 30% DH a los 180min. Se deduce que estas diferencias se deben a varios factores, en primer lugar, al sustrato del que depende la disposición en que se encuentren las proteínas y su concentración, y en segundo lugar la enzima utilizada. Sobre este último aspecto a la fecha no se ha reportado el uso de la enzima Gelzyme L 500<sup>®</sup> en la hidrólisis de proteínas de lactosuero.

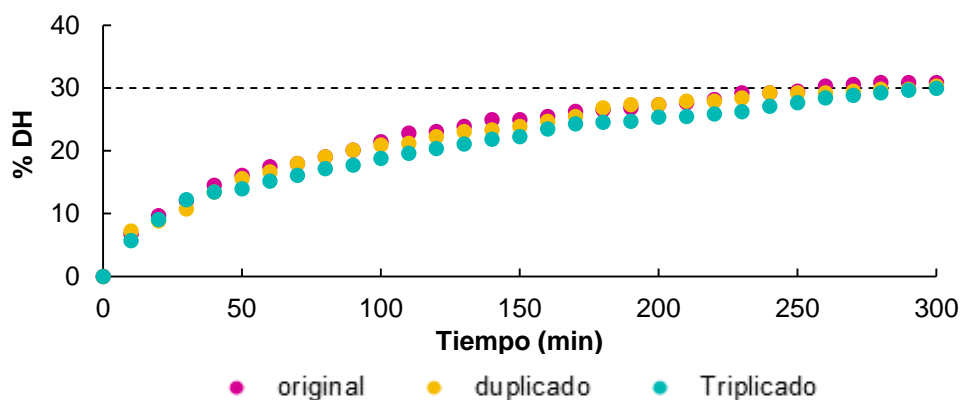


Figura 9. Curva de evolución del grado de hidrólisis.

Por otra parte, para la caracterización se comparó el porcentaje de nitrógeno amino y nitrógeno total del extracto de levadura y de las proteínas del lactosuero antes, durante y al finalizar la hidrólisis (Tabla 4).

Tabla 4.

Porcentaje de nitrógeno amino y nitrógeno total en base seca del extracto de levadura y de las WP (proteínas del lactosuero- whey protein) durante la hidrólisis.

Fuente de nitrógeno	Extracto de levadura	Solución de WP previo a la hidrólisis	Hidrolizado a los 150 min	Hidrolizado a los 300 min (tiempo de estabilización)
Nitrógeno amino (%AN)	4,7872	0,3475	0,5286	0,5361
Nitrógeno total (%TN)	10,6383	9,3537	9,3391	9,3430
AN/TN	0,4499	0,0372	0,0560	0,0574

En ella se evidencia una menor disposición de nitrógeno libre (%AN) por parte del hidrolizado, pero similitud entre los porcentajes de nitrógeno total. En los primeros 150 min de hidrólisis, la velocidad de reacción es mayor dando como resultado más liberación de nitrógeno durante este tiempo, sin embargo, a los 300min estos valores se mantienen cercanos. Como se pudo observar

en la Figura 9, a medida que transcurre la hidrólisis la pendiente se estabiliza por lo que no existe mayor diferencia al comparar el % de nitrógeno amino a los 150 min y al finalizar el proceso. Según Prieto (2007), una menor relación AN/TN, sugiere indirectamente que la especie proteica al finalizar la hidrólisis, tiene mayor tamaño molecular a la encontrada en el extracto de levadura.

En la Figura 10, se muestra el electroferograma mediante la técnica tricina- SDS PAGE, en el que cada banda representa una especie proteica. Igualmente se indica el porcentaje de concentración en la muestra inyectada en cada carril y su respectivo peso molecular. La Figura 10a presenta la solución acuosa de proteína de lactosuero al 4,2% p/p antes de la hidrólisis sin la adición de la enzima; la Figura 10b corresponde al hidrolizado a los 150 min, tiempo medio de estabilización; la Figura 10c corresponde al hidrolizado luego de 300 min, tiempo en el que el grado de hidrólisis DH se estabilizó; finalmente en la figura 10d, se encuentra la cromatografía del marcador de proteínas, el cual ayuda a establecer aproximadamente el peso molecular de las muestra a analizar.

La caracterización por este método se vio favorecida al emplearse 16% de acrilamida bisacrilamida AB-3 ya que evitó el paso de proteínas o péptidos de alto peso molecular, lo que permitió observar claramente las principales proteínas que se encuentran en el lactosuero.

Al igual que en el estudio de hidrólisis de suero pasteurizado empleando Flavourzyme, previo a la hidrólisis, Ghosh *et al.*, (2017) reportan el análisis por tricina- SDS PAGE, en donde se observan dos bandas principales las cuales corresponden a las proteínas  $\beta$ -lactoglobulina (18,3 kDa) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (13,5 kDa) que corresponden a las de mayor concentración en el lactosuero, pero al transcurrir el tiempo de reacción estas bandas se hicieron más ligeras y otras zonas descendentes se tornan oscuras indicando la presencia de especies proteicas menores a 6,5 kDa.

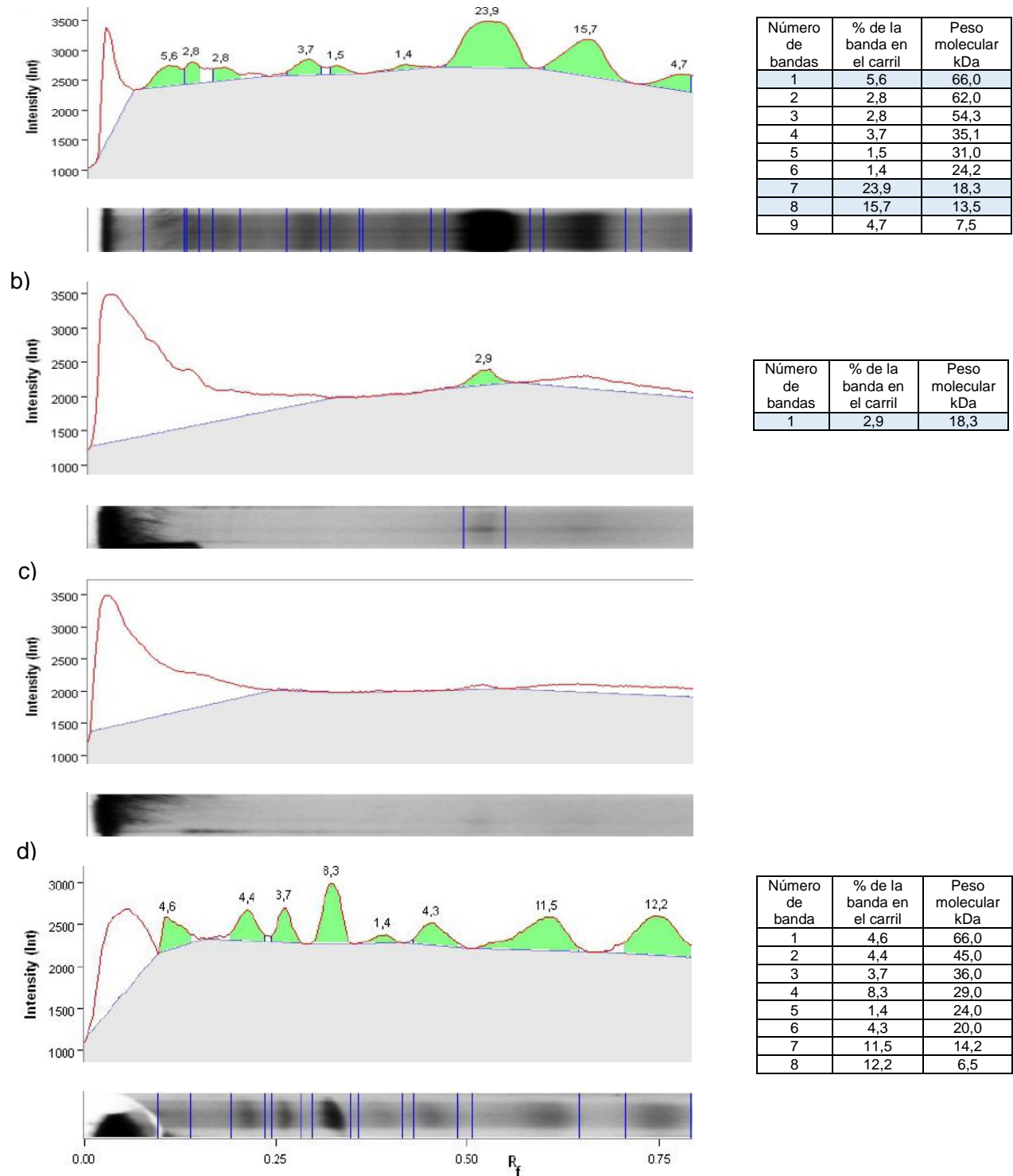


Figura 10. Electroferograma por Tricina- SDS PAGE de: a. solución de proteínas de lactosuero previo a la hidrólisis; b. proteínas de lactosuero hidrolizadas durante 150 min (tiempo medio a la estabilización); c. proteínas de lactosuero hidrolizadas durante 300 min.

### 3.3 Evaluación de los hidrolizados de proteína como fuente de nitrógeno en la fermentación láctica a partir de la lactosa.

El crecimiento de *Lactobacillus casei* ATCC 393, en el precultivo utilizado para su activación previa a la fermentación, fue caracterizado en términos de absorbancia y UFC/mL (Tabla 5), con el fin de estandarizar el tamaño del inóculo y conseguir una población entre  $10^6$  y  $10^8$  UFC/mL (Castro, 2011); lo que garantiza que la bacteria se encuentre en su fase exponencial de crecimiento.

Tabla 5.

*Evolución de la absorbancia y el recuento de UFC/mL en el tiempo durante el precultivo de Lactobacillus casei ATCC 393.*

Tiempo [h]	Absorbancia	Recuento [UFC/mL]
0	0,001	$6 \times 10^7$
4	0,224	$1,05 \times 10^8$
8	0,757	$4,04 \times 10^8$
12	0,872	$4 \times 10^9$

Se realizaron dos series de fermentaciones que partieron de inóculos con absorbancias de 0,285 y 0,135, para el original y duplicado, respectivamente, ubicándose la población inicial de microorganismo entre  $10^7$  y  $10^8$  UFC/mL. Cabe resaltar que la mayor absorbancia registrada para el precultivo de la prueba original, sugiere que la cantidad de microorganismos añadida al medio de fermentación en este caso, fue un poco mayor que la añadida en la segunda fermentación.

En la Figura 11 se muestra el seguimiento al crecimiento microbiano en las pruebas de fermentación realizadas mediante recuento de UFC/mL (sólo para la primera fermentación), medición de densidad óptica y pH.

En la Figura 11a, se observa un comportamiento similar para los tres medios de fermentación. En el caso del extracto de levadura y el hidrolizado al 1%p/p, el microorganismo tuvo un periodo de adaptación entre 10 y 23h en el medio, estabilizando su crecimiento a las 34h, mientras que al emplear hidrolizado al 7%p/p la fase de latencia fue de 34h, culminando su fase exponencial a las 48h. Castro (2011) reporta un tiempo de estabilización en el crecimiento a las 28h para *Lactobacillus casei* ATCC 334, utilizando un medio a base de lactosuero desproteinizado, los mismos cofactores del presente estudio, utilizando extracto de levadura al 1%p/p, un inóculo activado en caldo MRS y sin control de pH. La activación del microorganismo en caldo MRS al ser más rico en compuestos nitrogenados como proteasa de peptona, extracto de carne, entre otros, pudo favorecer una mayor velocidad de crecimiento del microorganismo. Igualmente, se pudo haber aprovechado los nutrientes presentes en el lactosuero, para alcanzar un crecimiento más rápido.

Igualmente, se observa que el hidrolizado al 7%p/p tuvo menor crecimiento microbiano y su descenso en el pH fue más lento (Figura 11d y 11e). Este aspecto podría estar relacionado a una limitación en el crecimiento por exceso de nitrógeno total, dado que existe una diferencia apreciable en sus porcentajes de la siguiente forma: medio con extracto de levadura (1,1%p/p); hidrolizado de proteína al 1%p/p, (1,3%p/p) y medio con hidrolizado al 7%p/p, (9,3%p/p), lo cual se soportaría en el hecho de un crecimiento microbiano y descenso en el pH muy similares, para los medios con extracto de levadura e hidrolizado al 1%p/p. Es importante aclarar que el efecto de las sales no se consideró como causa, ya que su concentración es baja (0,53%p/p en base seca), como se vio en el análisis bromatológico presentado en la segunda fase.

Por otra parte, la literatura indica que la especie *Lactobacillus casei* presenta inhibición a pH <5, aspecto confirmado en el presente trabajo y evidenciado en las Figuras 11d y 11e, donde se

aprecia un cese en el crecimiento a un pH de 4,89; 4,15 y 5,13, para los medios con extracto de levadura al 1%p/p, hidrolizado al 1%p/p e hidrolizado al 7%p/p, respectivamente. Es de apreciar que en la segunda serie de fermentaciones, la curva de la densidad óptica no muestra un periodo de adaptación del microorganismo, además se observa un descenso en el pH mucho más rápido en comparación a la primera fermentación, con lo cual se podría pensar que el haber añadido un inóculo con menor D.O. (menor concentración inicial de microorganismos), favoreció la adaptación al medio de fermentación. De esta manera estudiar el efecto del tamaño del inóculo en los medios analizados permitiría determinar la concentración más favorable.

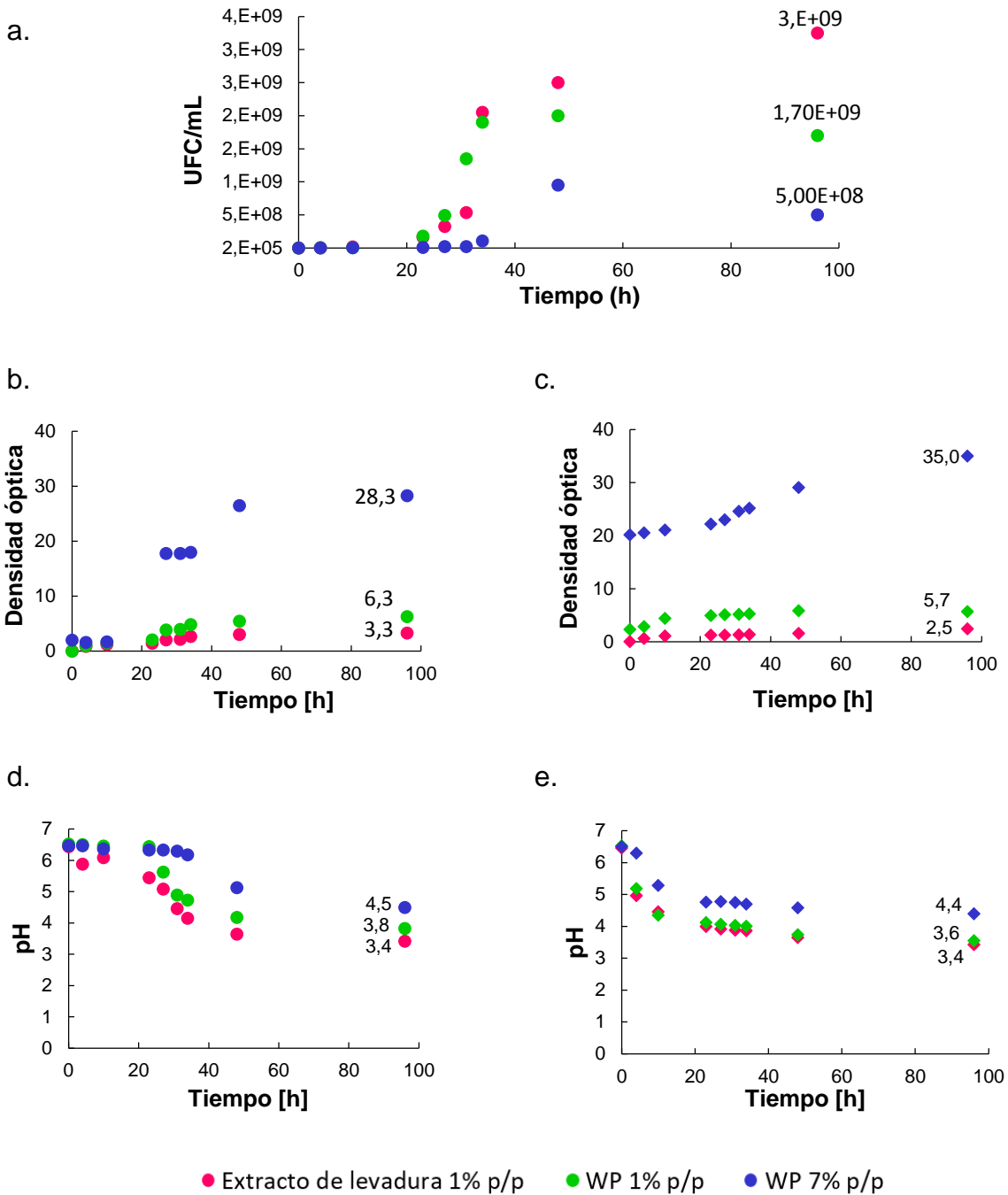


Figura 11. a. Curva de evolución de las UFC/mL de la primera serie de fermentaciones; b. y d. Densidad óptica (660nm) y pH primera serie de fermentaciones; c. y e. Densidad óptica (660nm) y pH segunda serie de fermentaciones.

En la Figura 12, se muestra la regresión lineal del Ln (UFC) de los puntos de la fase exponencial versus tiempo, para las tres fuentes de nitrógeno estudiadas en la primera serie de fermentaciones; en las que la pendiente representa la velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{\text{máx.}}$ ).

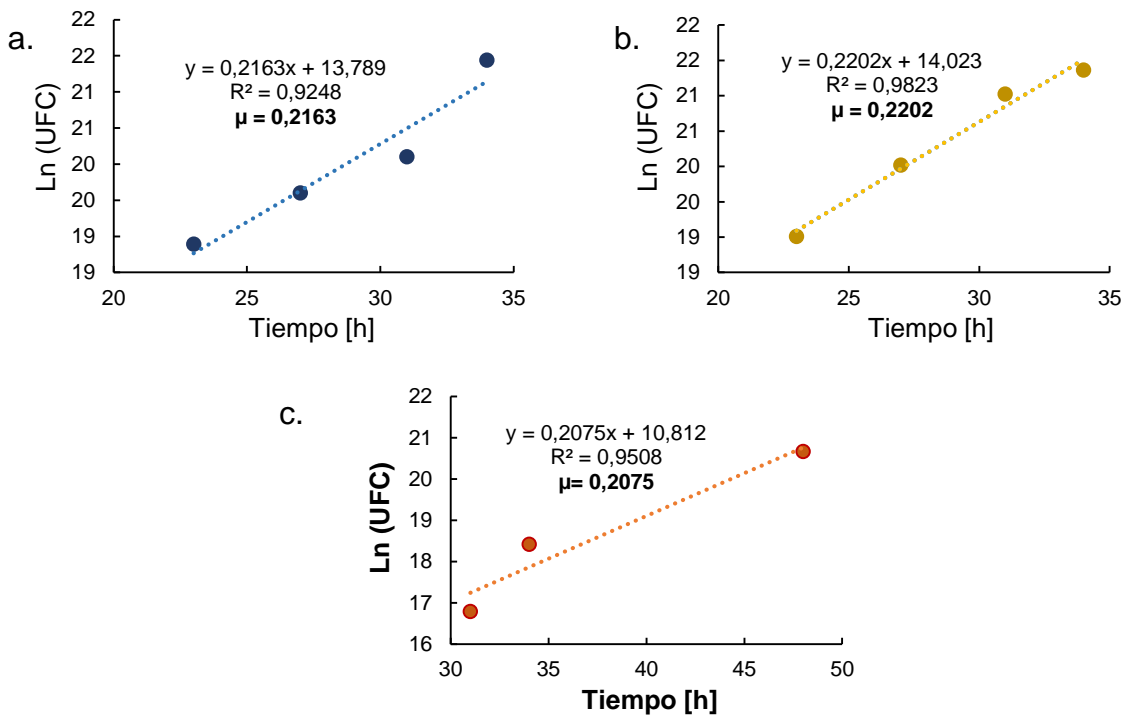


Figura 12. Velocidad de crecimiento microbiano ( $\mu$ ) de la Lactobacillus casei ATCC 334 mediante regresión lineal del Ln(UFC) Vs tiempo utilizando como fuente de nitrógeno: a) extracto de levadura al 1%p/p, hidrolizado al 1%p/p, hidrolizado al 7%p/p.

Los valores de  $\mu_{\text{máx.}}$   $0,2103\text{h}^{-1}$ ;  $0,2202\text{ h}^{-1}$  y  $0,2075\text{ h}^{-1}$  del extracto de levadura, hidrolizado de proteínas del lactosuero al 1%p/p e hidrolizado al 7%p/p respectivamente, fueron similares a los obtenidos por Ghaly (2004) y Altıok *et al.*, (2006), quienes trabajaron con extracto de levadura y lactosuero, presentando una  $\mu_{\text{máx.}}$  de  $0,25\text{ h}^{-1}$  y  $0,26\text{ h}^{-1}$ . Los valores de  $\mu$  de los hidrolizados al ser similares con los reportados al emplear al extracto de levadura como fuente de nitrógeno indican

que el microorganismo metabolizó adecuadamente los hidrolizados de proteína de lactosuero para su crecimiento.

Por otro lado, en el momento de dar inicio a las fermentaciones, para los medios con hidrolizado fue necesario la adición de ácido láctico para regular su pH al pH de trabajo (6,5). Al cuantificar la producción de ácido láctico, el medio con hidrolizado al 7%p/p en un  $t=0$  mostró una concentración de 3,6g/L y finalizó a 8,89g/L; en el medio con hidrolizado al 1%p/p se inició a 2,8g/L de ácido láctico y finalizó con 15,34 g/L, en el caso del medio con extracto de levadura no necesitó la regulación de su pH, al finalizar las 96h de fermentación produjo 14,122 g/L. Por lo tanto, las productividades al finalizar el tiempo de fermentación (96h) alcanzadas son: 0,055, 0,131; 0,147 g/L.h respectivamente. Lo cual está acorde con el descenso del pH durante la fermentación y a mayor velocidad utilizando los medios con hidrolizado y extracto de levadura al 1%p/p.

En el estudio de Büyükkileci & Harsa (2004) quienes utilizaron 10 g/L de extracto de levadura como fuente de nitrógeno, la cantidad de ácido láctico fue de 46 g/L con una productividad de 1,87 g/L.h durante 30h. Este mayor valor de productividad se debe a que el estudio realizó las fermentaciones con control en el pH utilizando  $\text{CaCO}_3$  a 60% p/v; lo que evita alcanzar el pH de inhibición y permite prolongar la fase exponencial del microorganismo.

Respecto a la cantidad de lactosa consumida los valores del extracto de levadura e hidrolizado de proteínas de lactosuero al 1%p/p fueron de 25,44g/L y 21,43g/L, mientras que el hidrolizado al 7% consumió 16,74g/L; estos resultados de consumo de sustrato fueron bajos al compararlos con las fuentes de nitrógeno más empleadas en fermentaciones lácticas como peptona que a las 48h consume alrededor de 85,7g/L, y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  que en el mismo tiempo consume 83g/L, ambos

casos con control de pH, lo que resulta en mejor aprovechamiento de la fuente carbono y mayor producción de ácido láctico

#### 4. Conclusiones

Se evidenció un comportamiento alcalino por parte de la enzima Gelzyme L 500<sup>®</sup>, ya que se alcanzó un mayor grado de hidrólisis a un pH de 10, lo que permitió mayor ruptura de enlaces peptídicos. Respecto a la temperatura, se evidenció un máximo a 60°C. La proteasa tuvo varios puntos a favor, como la disponibilidad en el mercado, su costo y grado de hidrólisis respecto a otras enzimas reportadas en la literatura.

Se obtuvo un 30% DH a un pH de 10 y 60 °C con tiempo de estabilización de 300min, el cual resulta ser alto al compararlo con investigaciones al utilizar como sustrato lactosuero crudo, pero menor que al emplear concentrado de proteína; se deduce que se debe a la disposición en que se encuentran las proteínas (estructura molecular) y a su concentración. Al caracterizar las proteínas del lactosuero se evidenció mayor liberación de nitrógeno en los primeros minutos, lo cual respalda la curva de evolución de la hidrólisis. Por otra parte, mediante la técnica de electroforesis tricina-SDS PAGE se pudo observar la desaparición progresiva de las proteínas y formación de especies proteicas con un tamaño molecular menor a 6,5 kDa.

Los medios de fermentación con las fuentes de nitrógeno, extracto de levadura e hidrolizado al 1%p/p mostraron un comportamiento similar respecto a UFC/mL, densidad óptica y pH, teniendo en ambos casos un periodo de adaptación entre 10 y 23h, estabilizándose el crecimiento a las 34h;

mientras que al emplear hidrolizado al 7%p/p fue menor el crecimiento microbiano y su descenso en el pH fue más lento, con un tiempo de adaptación igual a 34h y hasta las 48h alcanzó su fase estacionaria. Este aspecto podría estar relacionado a una limitación en el crecimiento por exceso de nitrógeno total, ya que el medio con extracto de levadura cuenta con 1,1%p/p de nitrógeno total; el medio con hidrolizado de proteína al 1%p/p, cuenta con 1,3%p/p, y el medio con hidrolizado al 7%p/p, tiene 9,3%p/p de nitrógeno total.

Para los medios con extracto de levadura al 1%p/p, hidrolizado de proteína al 1%p/p e hidrolizado al 7%p/p, las concentraciones de ácido láctico producido luego de 96h de fermentación fueron, 23,54; 19,413 y 12,1 g/L, respectivamente; obteniendo los siguientes valores de productividad; 0,126; 0,202 y 0,242 g/L.h, respectivamente. El medio con extracto de levadura consumió 31,281g/L de lactosa, con hidrolizado al 1%p/p, 24,501g/L y con hidrolizado al 7%p/p 9,8139g/L; resultados en parte explicados debido a fermentaciones realizadas sin control de pH.

## **5. Recomendaciones**

Trabajar en los protocolos de fermentación láctica con control de pH, de modo que se puedan hacer pruebas bajo estas condiciones empleando hidrolizados de proteínas del lactosuero como fuente de nitrógeno, lo cual permitiría aumentar las productividades.

Estudiar el efecto del tamaño del inóculo en los medios de fermentación, para establecer la concentración que permita disminuir los tiempos de adaptación y estabilización en el crecimiento del microorganismo fermentativo.

**Referencias Bibliográficas**

- Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. New York, USA: Elsevier Applied Science Publishers. Retrieved from <http://hdl.handle.net/2027/mdp.39015011640284>
- Altok, D., Tokatlı, F., & Harsa, S. (2006). kinetic modelling of lactic acid production from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(May), 1190–1197. <https://doi.org/10.1002/jctb>
- Ameen, S. M., & Caruso, G. (2017). Chemistry of lactic acid. In *Lactic Acid in the Food Industry* (pp. 7–18). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58146-0>
- Amrane, A. (2001). Batch cultures of supplemented whey permeate using *Lactobacillus helveticus*: Unstructured model for biomass formation, substrate consumption and lactic acid production. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(9–10), 827–834. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00341-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00341-6)
- Antila, J., Paakkari, I., Jarvinen, A., Mattila, M., Laukkane, M., Pihlanto-Leppala, A Mantsala, P., & Hellman, J. (1991). Opioid peptides derived from in vitro proteolysis of bovine whey proteins. *Int Dairy J*, 1, 215–229.
- Benítez, R., Ibarz, A., & Pagan, J. (2008). Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones Resumen. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 42(2), 227–237. <https://doi.org/1851-6114>
- Biziulevicius, G., Kislukhina, O., Kazlauskaite, J., & Zukaite, V. (2006). Food protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a “cause and effect” theory of bifunctionality. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 46, 131–138.
- Büyükkileci, A. O., & Harsa, S. (2004). Batch production of L(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* (NRRL B-441). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(9), 1036–1040. <https://doi.org/10.1002/jctb.1094>

- Castro, A. (2011). *Caracterización del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo utilizando la tecnología de membranas*. Universidad Autónoma De Querétaro.
- Coelho, M., Silva, M., Silva, V., De Souza, M., Lopes, C., & Afonso, W. (2012). Analysis of whey protein hydrolysates: Peptide profile and ACE inhibitory activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48(4), 747–757. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502012000400019>
- De Wit, J. N., & Swinkels, G. A. M. (1980). A differential scanning calorimetric study of the thermal denaturation of bovine beta-lactoglobulin: thermal behaviour at temperatures up to 100°C. *Biochimica et Biophysica Acta*, 624, 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.012>
- Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., ... Swaisgood, H. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87(1), 1641–1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(70\)86141-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(70)86141-0)
- Galvão, C. M. a., Silva, A. F. S., Custódio, M. F., Monti, R., & Giordano, R. D. L. C. (2001). Controlled hydrolysis of cheese whey proteins using trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91–93, 761–776. <https://doi.org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:761>
- García, C. A., Arrázola, G. S., & Durango, A. M. (2010). *Producción de ácido láctico por vía biotecnológica*. Temas agrarios. Universidad de Córdoba.
- Ghaly, A. E., & Kamal, M. A. (2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research*, 38, 631–644. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.019>
- Ghosh, B. C., Prasad, L. N., & Saha, N. P. (2017). Enzymatic hydrolysis of whey and its analysis. *Journal of Food Science and Technology*, 54(6), 1476–1483. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2574-z>
- Guadix, A., Guadix, E. M., Páez, M. P., González, P., & Camacho, F. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*, 41(1), 79–89. <https://doi.org/10.4067/S0718-09342007000200003>

- Hill, R., & Schmidt, W. (1962). The complete enzymic hydrolysis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 237(2), 64.
- Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4), 87–107. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(99\)00155-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(99)00155-6)
- Mohseni, J., Fazeli, M., & Lavasani, A. S. (2016). Effect of various parameters of carbon and nitrogen sources and environmental conditions on the growth of *Lactobacillus Casei* in the production of lactic acid. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 5(August), 49–54.
- Morr, C. V., & Ha, E. Y. W. (1993). Whey protein concentrates and isolates: Processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 33(6), 431–476. <https://doi.org/10.1080/10408399309527643>
- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F., & Boudrant, J. (2001). The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology*, 78(2), 149–153. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00009-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00009-8)
- 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>
- Parra, R. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4967–4982. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v62n1/a21v62n1.pdf>
- Perea, A., Ugalde, U., Rodriguez, I., & Serra, J. L. (1993). Preparation and characterization of whey protein hydrolysates: Applications in industrial whey bioconversion processes. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(5), 418–423. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90129-P](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90129-P)
- Prieto, C. (2007). *Diseño y optimización de un reactor de membrana discontinuo para la hidrólisis enzimática de proteínas*. Universidad De Granada.

- Salis, A., Monduzzi, M., & Solinas, V. (2007). *Industrial enzymes*. (P. Julio & A. MacCabe, Eds.), *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*. Dordrecht, The Netherlands: Springer. <https://doi.org/10.1007/1-4020-5377-0>
- Sawyer, L. (2003).  $\beta$ -lactoglobulin. In P. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy chemistry: proteins* (Vol. 1, pp. 1–2). Kluwer Academic/Plenum.
- Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, *1*(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Serna, L., & Rodríguez, A. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, *5*(1), 54–65. <https://doi.org/10.1080/11358120509487672>
- Shu, G., Zhang, Q., Chen, H., Wan, H., & Li, H. (2015). Effect of five proteases including alcalase, flavourzyme, papain, proteinase k and trypsin on antioxidative activities of casein hydrolysate from goat milk. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology*, *19*(2), 65–74. <https://doi.org/10.1515/auaft-2015-0015>
- Spellman, D., McEvoy, E., O’Cuinn, G., & FitzGerald, R. J. (2003). Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: Comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal*, *13*(6), 447–453. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00053-0)
- Velasquez, J., Giraldo, G., Padilla, L., & Giraldo, Y. (2015). Crecimiento de *Lactobacillus casei* ssp *casei* ATCC 393 en suero clarificado. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *13*(1), 19–27. Retrieved from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612015000100003&lang=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612015000100003&lang=pt)
- Zheng, H., Shen, X., Bu, G., & Luo, Y. (2008). Effects of pH, temperature and enzyme-to-substrate ratio on the antigenicity of whey protein hydrolysates prepared by Alcalase. *International Dairy Journal*, *18*(10–11), 1028–1033. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.05.002>