

**EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN EN UN BIO-RECTOR
PARA LA PRODUCCIÓN DE NISINA**

**LEIDY VIVIANA ÁLVAREZ GARCÍA
ANA MARÍA BLANCO VÁSQUEZ**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
MEDELLÍN
2014**

**EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN EN UN BIO-RECTOR
PARA LA PRODUCCIÓN DE NISINA**

**LEIDY VIVIANA ÁLVAREZ GARCÍA
ANA MARÍA BLANCO VÁSQUEZ**

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero Químico

**Asesor
MABEL MILENA TORRES TABORDA
Magister en Biotecnología**

**UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA
ESCUELA DE INGENIERÍAS
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
MEDELLÍN
2014**

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Medellín, Febrero de 2014

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a mis padres los cuales me apoyaron en todo momento para seguir adelante con mis estudios Universitarios, se dé todo el esfuerzo y el amor que me han brindado para hacer realidad este proyecto de vida. Les estoy Inmensamente agradecida por esta oportunidad y de alguna u otra manera a las amistades que me acompañaron durante este proceso.

Leidy Viviana Álvarez García

Dedico este proyecto a mis padres quienes me dieron la oportunidad de realizar mis estudios Universitarios y a mis amigos que con una voz de aliento, siempre estuvieron ahí para apoyarme.

Ana María Blanco Vásquez.

AGRADECIMIENTOS

Los autores presentan sus agradecimientos a:

Magister en Biotecnología Mabel Milena Torres Taborda por su constante entrega, comprensión y asesoramiento, para que se llevase a cabo el desarrollo del proyecto. También agradecemos a todos aquellos que pertenecen al Centro de Estudios y de Investigación Biotecnología (CIBIOT), que con paciencia nos ayudaron a solucionar una a una las dudas que fueron surgiendo en el camino.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	11
1. MARCO TEÓRICO	15
1.1 LANTIBIÓTICOS	15
1.2 NISINA	18
1.3 <i>LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP. LACTIS</i>	21
1.4 PRODUCCIÓN DE NISINA	21
1.4.1 Sustratos	22
1.4.1.1 Suero permeado-suero de quesería	23
1.4.2 Condiciones de operación	25
1.4.2.1 Medios de cultivo	26
1.4.2.2 pH	27
1.4.2.3 Aireación	27
1.4.2.4 Temperatura	28
1.4.2.5 Agitación	28
1.5 SISTEMAS DE FERMENTACIÓN	29
2. METODOLOGÍA	33
2.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUERO	33
2.2 ENSAYOS PRELIMINARES	33
2.2.1 Mantenimiento de Cepas	33

2.2.2 Activación de cepa	33
2.2.3 Medio de cultivo	33
2.2.4 Pre-inóculo	34
2.2.5 Inóculo	34
2.2.6 Selección regulador de pH	34
2.2.7 Cuantificación de nisina	35
2.3 ENSAYOS EN BIO-REACTOR CONTROLADO	37
2.3.1 Inóculo para el reactor	37
2.3.2 Producción de nisina	37
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	39
3.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUERO	39
3.2 REGULADOR DE PH	41
3.3 PARÁMETROS DE CRECIMIENTO $\mu_{\max}$ SEGÚN EL MODELO DE GOMPERTZ	43
3.4 CUANTIFICACIÓN DE NISINA	46
3.5 FERMENTACIÓN EN REACTOR BIOFLO 110	50
3.5.1 Producción de nisina en bio-reactor controlado a las condiciones óptimas de operación	57
4. CONCLUSIONES	60
5. RECOMENDACIONES	61
6. BIBLIOGRAFÍA	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lantibióticos tipo A y tipo B	17
Figura 2. Estructura primaria de la nisina A	19
Figura 3. Estructura primaria de la nisina z	20
Figura 4. Fermentador automático para el tratamiento magnético de una suspensión del <i>Lactococcus lactis</i>	30
Figura 5. Reactor continuo de lecho empacado	32
Figura 6. Peso seco de la biomasa utilizando NaOH y NH ₄ OH como reguladores de pH	41
Figura 7. Datos de biomasa ajustados al modelo de Gompertz	44
Figura 8. Cuantificación de la nisina-precipitación por salado	47
Figura 9. Prueba de actividad de la nisina	51
Figura 10. Diagrama de Pareto	52
Figura 11. Efectos principales de la actividad de la nisina	54
Figura 12. Prueba de actividad con aireación en las fermentaciones como variable adicional	56
Figura 13. Montaje para la producción de nisina en reactor BioFlo 110	57
Figura 14. Determinación de la actividad de la nisina a pH: 7.5 y 100 rpm	58

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Composición del suero según el tipo: ácido o dulce	24
Tabla 2. Composición química del suero	25
Tabla 3. Condiciones de operación del reactor BioFlo 110	38
Tabla 4. Caracterización del suero de quesería de la planta Lácteos Buenavista	39
Tabla 5. Determinación de la actividad con acidificación de la muestra	48
Tabla 6. Determinación de la actividad con acidificación y calentamiento de la muestra	49
Tabla 7. Fermentaciones en reactor BioFlo 110	50
Tabla 8. Efectos estimados en las variables evaluadas pH y agitación	51
Tabla 9. Análisis de la varianza para la producción de nisina con suero de quesería	53

RESUMEN

La nisina es un péptido bactericida, producida por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, este agente antimicrobiano es utilizado en la industria de alimentos como un conservante natural y muestra actividad contra un amplio rango de bacterias Gram positivas, sus esporas, y algunas Gram negativas.

Durante la ejecución de este proyecto se evaluaron las condiciones operacionales en un bio-reactor controlado tales como el pH, la velocidad de agitación y tiempo de fermentación, para la producción de nisina, utilizando como microorganismo productor *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* y suero de quesería que es un efluente industrial, esto para disminuir los costos que surgen al emplear medios de cultivo comerciales, lo que puede impulsar su escalado a nivel industrial. Mediante un diseño de experimentos se determinó que un pH de 7,5 y una agitación de 100 rpm son las condiciones adecuadas para la producción de la bacteriocina, donde el parámetro de velocidad de crecimiento $\mu_{\text{máx}}$ fue de $0,366 \text{ h}^{-1}$. Por último se encontró que a las 8 h de fermentación se produjo la mayor cantidad de nisina obteniéndose un halo de inhibición promedio de 0,93 cm, esto se estableció cualitativamente mediante la medición de los halos de inhibición en las pruebas de actividad.

PALABRAS CLAVES: NISINA, BACTERIOCINA, SUERO DE QUESERÍA, CONSERVANTE, GRAM-POSITIVA, *LACTOCOCCUS LACTIS SUBSP LACTIS*, FERMENTACIÓN, BIOMASA, BIO-REACTOR

INTRODUCCIÓN

Una de las principales causas de proliferación de enfermedades a nivel mundial es el deterioro de los alimentos originado principalmente por diferentes agentes microbianos, químicos y físicos que son inaceptables para el consumo humano (GENMIC, 2007), (Cintas, 2001). Estimándose una pérdida del 20% en los alimentos como frutas y verduras por el deterioro microbiano. (Cintas, 2001), (Marchese, 2012). En el mundo se pierden aproximadamente 13000 millones de toneladas de alimentos al año, asegura la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (Gomez, 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha notificado que cada año los siete agentes patógenos principales en los alimentos (*Campilobacter jejuni*, *Clostridium*, *E coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Toxoplasidium gondii*) causan 76 millones de casos de infección al año solamente en los Estados Unidos, lo que da lugar a pérdidas económicas superiores a los 7 millones de dólares (Instituto Nacional de salud, 2012).

La incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos contaminados ha alcanzado grandes proporciones en todo el mundo y la calidad en cuanto inocuidad de los alimentos se ha convertido en la preocupación principal de la comunidad internacional. A pesar de la escasez de datos, ha sido posible identificar la aparición de nuevos problemas directamente relacionados con el deterioro de alimentos, como la pobreza, la exposición a ambientes contaminados y la falta de instalaciones aptas para la preparación de los alimentos entre otros. Estos problemas pueden tener carácter químico, biológico o físico y provocan un efecto perjudicial en la salud de quien lo consume (Navarro, 2012).

Para retrasar el deterioro de los alimentos debido a la acción de microorganismos, se emplean sustancias antimicrobianas para inhibir, retardar o prevenir el desarrollo y la proliferación de bacterias, levaduras y mohos. Como los son los compuestos sulfatados, nitratos, nitritos, ácido benzoico, ácido ascórbico, entre otros (Garcés, 2008). Este creciente consumo de conservantes artificiales en los alimentos, ha originado algunas enfermedades degenerativas en el sistema metabólico tales como: cáncer, malformaciones en fetos, teratogénicas, mutagénicas (Berry, 1990).

Teniendo en cuenta lo anterior se hace necesario el uso de conservantes no perjudiciales para la salud, como lo son las bacteriocinas, estas son péptidos bactericidas producidos por algunas bacterias para inhibir el crecimiento de una cepa bacteriana similar y que pueden ser fácilmente metabolizadas en la flora intestinal sin generar daños en el cuerpo. Entre ellas se encuentran las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas, las cuales han sido ampliamente estudiadas (Hee, 2002), (Tecnología de Alimentos: Bacteriocina, 2008), (Dermirci. A., 2004).

El péptido nisina, es producido por cepas de *Streptococcus lactis* o *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. (Simsec, Akkoc, H & Saris, 2009), (Ababouch, Chaibi, & Busta, 1992). Este agente antimicrobiano muestra actividad contra un amplio rango de bacterias Gram positivas y sus esporas, y algunas bacterias Gram negativas (Dermirci. A., 2004).

La nisina es una de las bacteriocinas más estudiadas, única avalada por la FDA (Food and Drugs Administration) para su uso como conservante en los alimentos, con una dosis máxima de 33000 U/kg de peso corporal (Simsec, Akkoc, H., & Saris, 2009). Dicha bacteriocina se ha utilizado en la industria farmacéutica, en la producción de cosméticos, y en productos para la atención odontológica,

tratamiento de úlceras gástricas, infecciones del colón, además para el control potencial de la natalidad y en la práctica veterinaria (Delves & Davies, 2004).

Las ventajas de la nisina sobre otros conservantes de alimentos están dadas por su no toxicidad, estabilidad térmica a bajo pH, es incolora y no tiene sabor. Además potencia el sabor, la textura e incrementa el valor nutricional de los alimentos (Dermirci. A., 2004).

En relación a la producción de nisina, se han abordado análisis principalmente desde las variables del pH, temperatura, aireación, agitación y medios de cultivo, para llegar a las condiciones óptimas de producción (Amiali, Lacroix, & Simard, 1998).

Los requerimientos para el crecimiento de especies productoras de nisina, como *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, son suministrados generalmente a partir de medios comerciales de composición definida tales como el M-17, debido a esto la producción de nisina resulta costosa a gran escala, (Burzul & Ömer, 2009).

En respuesta a lo anterior se han evaluado algunos subproductos de origen agroindustrial (entre ellos se encuentra el suero de quesería), con la finalidad de disminuir los costos de producción y mejorar el medio de cultivo, cumpliendo así con los requerimientos de crecimiento del microorganismo productor de la nisina, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, (Zhang, Zhaoliang, Wub, & Wang, 2011), (Harb V & Herrera A, 2009).

El suero de quesería posee una alta capacidad contaminante por su contenido en proteínas y lactosa, lo que permite la fácil reproducción de microorganismos ocasionando cambios en la DBO que varía entre 30000 a 50000 mgO₂/L (Burbano, 2012). Durante muchos años este efluente ha sido eliminado en ríos, cloacas y campos provocando así una fuerte contaminación del medio ambiente,

en un principio se buscó aprovechar este suero, como alimento para cerdos y producción de queso ricotta, pero gran parte del volumen de suero producido seguía descartándose. Actualmente, el suero de quesería es un subproducto valioso que puede utilizarse para la producción de suero en polvo como sustituto de leche en polvo para panificación, elaboración de bebidas lácteas, helados y chocolates y caramelos (Valencia, 2008). Actualmente, se estima que la producción mundial del suero residual alcanza los 145 millones de toneladas anuales (Valencia Denicia & Leticia Ramírez, 2009).

Según estudios realizados en la Universidad Pontificia Bolivariana por Harb y Herrera (2009), el suero de quesería puede emplearse para la producción de nisina adicionando un suplemento de caseína entre 12-17 g/L y ajustando el pH en un rango inicial entre 5-5,5; con lo cual se encontró que un aumento en el pH ocasiona una disminución en la producción de nisina y aumento en la producción de biomasa y además, se definió una metodología simple para la concentración de la nisina en la que se obtuvo un efecto de inhibición superior al reportado para las dosis recomendadas de nisina a nivel comercial (Harb V & Herrera A, 2009).

El propósito de este trabajo fue establecer las condiciones de operación para la producción de nisina a partir de suero de quesería en un bio-rreactor controlado con el fin de mejorar los rendimientos de producción de este conservante natural, lo que podría impulsar su escalado a nivel industrial y la disminución del impacto ambiental por el aprovechamiento de un residuo como el suero de quesería.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LANTIBIÓTICOS

La historia de los lantibióticos es mayor que la de los antibióticos convencionales y se remonta a una época anterior al descubrimiento de la penicilina. El lantibiótico más conocido es la nisina, y fue descubierto en la década de 1920, desde entonces ha tenido una amplia aplicación como una alternativa segura para la preservación de alimentos en aproximadamente 50 países por más de 40 años (Alkhatib, Abts, Mavaro, Schmitt, & Smits, 2012).

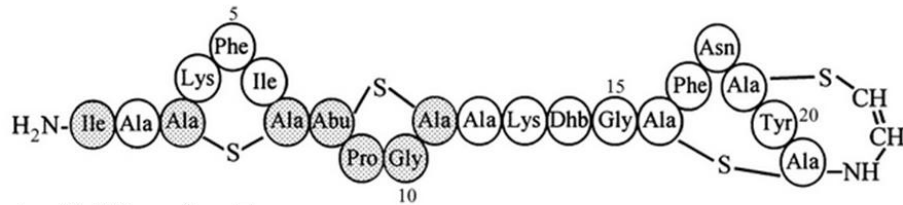
Los lantibióticos son pequeños péptidos con acción antibiótica, derivados de prepeptidos sintetizados por ribosomas en algunas bacterias Gram positivas a través de diferentes modificaciones postraduccionales (fenómeno que tiene por objeto procesar o alterar los polipéptidos recién sintetizados con el fin de producir la conformación tridimensional correcta de las proteínas) que implican la deshidratación de la serina, treonina, y los residuos de cisteína. Se conocen aproximadamente 50 lantibióticos, y casi 20 grupos de genes, que contienen los factores determinantes para la modificación, procesamiento, exportación y producción de autoprotección lo que hace a los lantibióticos compuestos atractivos para el diseño de nuevos medicamentos anti-infecciosos (Bonelli, Wiedemann, & Sahl, 2006). Los genes que codifican para la producción de los lantibióticos están altamente organizados en operones que contienen todos los genes requeridos para la maduración, el transporte, la inmunidad y la síntesis. El lantibiótico mejor caracterizado es la nisina producida por *Lactococcus lactis*, esta es activa frente a otras bacterias Gram positivas a través de distintos modos de acción (Andersena, Carvalhob, & Neves, 2008).

Los antibióticos según su estructura se dividen en dos grupos: antibióticos tipo A y tipo B. Entre los tipo A están la nisina, subtilina, galidermina y pep5, estas bacteriocinas se caracterizan por ser alargadas y anfifílicas (Bonelli, Wiedemann, & Sahl, 2006), las tipo A son moléculas lineales fuertemente catiónicas, en contraste las tipo B que son moléculas globulares con poca o ninguna carga neta, como la ancovenina. Los antibióticos tipo B también son fuertemente anfifílicos. Sin embargo, poseen menor libertad conformacional que la de los péptidos tipo A (Bonelli, Wiedemann, & Sahl, 2006), (Bower, Bothwell, & McGuire, 2001).

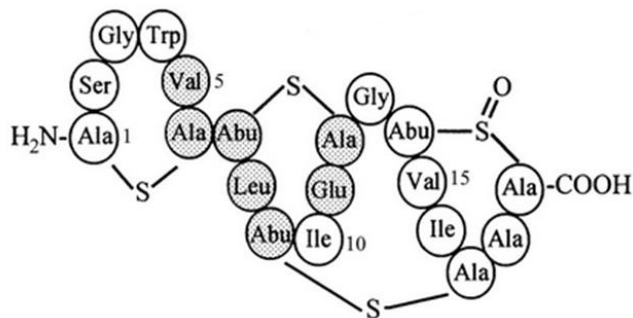
En la Figura 1 se observa la estructura de los antibióticos tipo A y tipo B. Los primeros atacan a las bacterias mediante la formación de poros en la membrana citoplasmática, mientras que los otros inhiben la biosíntesis de la pared celular. Los aminoácidos conservados que probablemente son cruciales para la actividad de los péptidos se muestran sombreados en la Figura 1. ABU: Ácido amino butírico, DHA: Deshidroalanina, ALA-S-ALA: Lantionina, DHB:β-Metildeshidroalanina, ABU-S-ALA: β Metil-lantionina (Sahl & Brötz, 2000).

Lantibióticos tipo A

Nisina



Actargadina



17

1.2 NISINA

La nisina es un péptido producido por ciertas cepas de *Lactococcus lactis subs Lactis* y se caracteriza por su efecto antimicrobiano (Juncioni de Arauz & Otros., 2009).

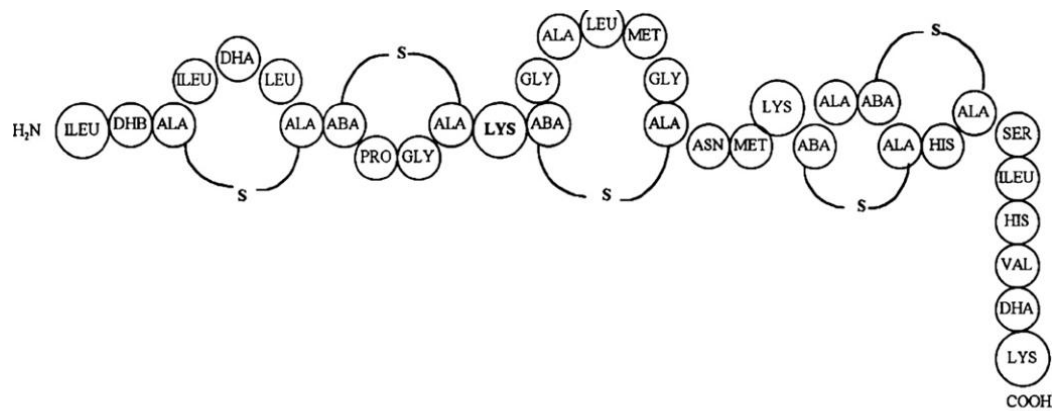
La nisina es una bacteriocina de bajo peso molecular que inhibe el crecimiento de una amplia gama de microorganismos Gram positivos así como la germinación y el crecimiento excesivo de esporas de *Bacillus* y *Clostridium*. Debido a su toxicidad insignificante para seres humanos, se ha utilizado ampliamente como un conservante en la industria alimentaria. Existen numerosas aplicaciones de la nisina como un preservante natural de alimentos, incluyendo productos lácteos, carnes y alimentos enlatados (Asaduzzaman & Kenji, 2009). Adicionalmente, se ha utilizado como agente potencial en productos farmacéuticos, veterinarios y productos para el cuidado de la salud (Juncioni de Arauz & Otros., 2009).

Esta bacteriocina se descubrió cuando diversas investigaciones encontraron que las cepas de *Lactococcus lactis* producían una sustancia que inhibía el crecimiento de otros cultivos en el queso. En 1944, Mattick y Hirsch lograron aislar la sustancia inhibidora; más tarde, en 1950, el mismo grupo de investigación aplicó con éxito la nisina en un tipo de queso suizo y en el queso fundido para prevenir el deterioro causado por los microorganismos del género *Clostridium* (Juncioni de Arauz & Otros., 2009).

La nisina recibió la designación GRAS (Generalmente reconocida como seguro, por sus siglas en inglés) en 1988, debido a que no es tóxica, se degrada por enzimas digestivas, además no brinda sabor ni color (Piña Suarez & otros, 2011). Existen dos variantes de origen natural de la nisina, la nisina A y la nisina Z, que difieren en un único aminoácido en la posición 27. La asparagina en la nisina Z se

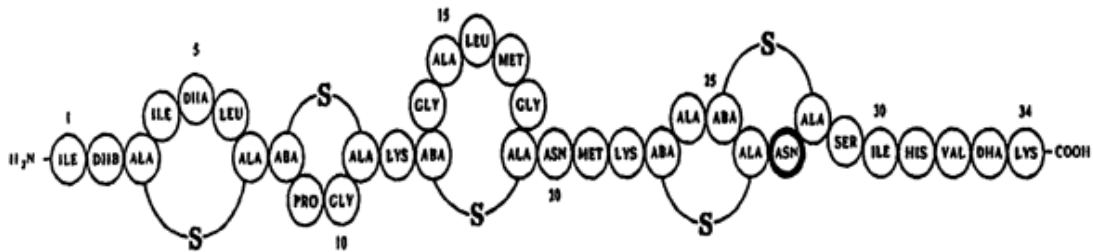
sustituye por histidina en la nisina A. La nisina Z parece ser ligeramente más difusible en agar y más soluble en pH neutro (Cabo, Murado, González, & Pastoriza, 2001). En las Figuras 2 y 3 se observa la estructura primaria de la nisina A y Z respectivamente.

Figura 2. Estructura primaria de la nisina A.



Fuente: Zhang, Zhaoliang, Wub, Wang. Effect of ionic strength on the foam separation of nisin from the fermentation, 2011. En: Science Direct, [En línea] <Disponible en <http://www.sciencedirect.com>>.

Figura 3. Estructura primaria de la nisina Z



Fuente: Meindert De Vos, Kuipers & Siezen. Lantibiotics similar to nisin a, lactic acid bacteria which produce such lantibiotics, method for constructing such lactic acid bacteria and method for preserving foodstuffs with the aid of these lantibiotics and these lactic acid bacteria producing lantibiotics. EE.UU. 5928946 A. 27 de Julio de 1999.

La producción de nisina por *Lactococcus lactis subs Lactis* está regulada por un mecanismo denominado percepción en quórum a nivel transcripcional en el que la nisina actúa como una molécula inductora (Piña Suarez & otros, 2011).

Para determinar el espectro antimicrobiano de la nisina sobre microorganismos patógenos de los alimentos se mide la actividad en unidades internacionales (UI) y se emplean microorganismos sensibles como las bacterias Gram positivas *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, en el caso de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella* puede determinarse la actividad cuando ha sido comprometida la integridad de la membrana externa. La nisina también inhibe el crecimiento de las esporas de *Bacillus anthracis*, previniendo el establecimiento del metabolismo oxidativo y afectando el potencial de membrana de las esporas germinativas (Piña Suarez & otros, 2011).

1.3 LACTOCOCCUS LACTIS

El *Lactococcus lactis* es una especie de bacteria no esporulante, no mótil, Gram positiva usada extensamente en la producción de mantequilla y queso (Madigan & Martinko, 2005). En las dos últimas décadas, la fisiología y genética de esta bacteria han sido estudiadas de forma detallada (Mierau, Olieman, Mond, & Smid, 2005). Las bacterias de este género son típicamente esféricas u ovoides, de 0,5 a 1,2 μm por 0,5 a 1,5 μm , y se agrupan en pares o en cadenas cortas. El *Lactococcus* difiere de otras bacterias ácido lácticas por su tolerancia al pH, la sal y temperaturas de crecimiento entre 30°C y 37°C, por lo que es considerado un microorganismo mesofílico. Se emplea en la industria láctea en la manufactura de fermentados como quesos o yogures. (Moreno, 2010).

Lactococcus lactis se caracteriza por su capacidad para convertir la lactosa casi exclusivamente en ácido láctico produciendo una acidificación rápida del medio, lo que inhibe la proliferación de otros organismos (Zhang, Zhaoliang, Wub, & Wang, 2011).

1.4. PRODUCCIÓN DE NISINA

Como se mencionó anteriormente la nisina es producida por el *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, durante el proceso de fermentación (Pongtharangku & Demirci, 2006). Su biosíntesis se produce durante la fase de crecimiento exponencial y se detiene por completo cuando las células entran en la fase de crecimiento estacionario (Vessoni P & Morales, 2002); para su producción se requieren sustratos con los nutrientes necesarios y el establecimiento de las condiciones de fermentación óptimas que permitan el crecimiento del microorganismo.

1.4.1 Sustratos

Diferentes tipos de sustratos se han utilizado para la producción de nisina como: melaza de azúcar, papas de desecho, vísceras de pescado hidrolizadas, cebada y suero permeado o suero de desecho de la industria quesera (Chuanbin , Yan , & Shulin, 2005) (W.S, R.J, & N.W, 1997) (Piña Suarez & otros, 2011)

Algunos estudios realizados con papas de desecho revelan que estas están enriquecidas con nutrientes como el almidón, minerales, y proteínas, pero estos solos no pueden proporcionar lo suficiente para el crecimiento de *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, generándose la necesidad de proporcionar nutrientes adicionales a fin de obtener un mayor y mejor crecimiento de la bacteria ácido láctica y por ende un incremento en la producción de nisina (Chuanbin , Yan , & Shulin, 2005).

La alta demanda de fuentes peptídicas a escala industrial para la producción de bacterias ácido lácticas y bacteriocinas ha elevado el precio de los productos generados. Por lo que se han realizado estudios para obtener fuentes alternativas de suplementos protéicos. Vásquez y Morales en 2010 evaluaron la producción de peptonas a partir de vísceras de pescado hidrolizadas, mostrando ser excelentes para el crecimiento de bacterias ácido lácticas, y de microorganismos con requerimientos de nutrientes peptídicos. Se logró una disminución de los costos respecto a la utilización de medios comerciales (MRS, TGE, APT) (Vásquez, Gonzales, & M.A, 2004).

El extracto fermentado de cebada (FBE) obtenido a partir del subproducto de la cebada de shochu y sus fracciones de etanol fueron evaluadas por Furuta y colaboradores (2008), como un medio de cultivo y suplemento por contener nitrógeno y diversos tipos de minerales y vitaminas útiles que estimulan el

crecimiento de bacterias ácido lácticas, para la producción de nisina A por *Lactococcus lactis subsp. lactis* ATCC 11454.

1.4.1.1 Suero permeado- Suero de quesería.

La nisina comercial es producida por fermentación a gran escala con medios de cultivo que contienen un alto grado de nutrientes, como el suero permeado, un subproducto de la industria quesera y que sirve como un medio económico para la producción de la bacteriocina (Xia, Chung, & Yang, 2003).

El suero de quesería también se ha empleado como alimento para animales y producción de suero en polvo que se utiliza como sustituto de la leche en polvo y huevo para panificación (Valencia, 2008), mejorando el contenido nutricional de los alimentos.

Existen dos clases de suero, suero dulce y suero ácido, los cuales dependen de los métodos empleados para la coagulación de la leche. El suero dulce, proviene de quesos coagulados con renina; la mayoría de este suero se compone de nitrógeno no proteico y tiene una gran concentración de lactosa (cerca del 51% de todo el suero), es más rico en proteínas (7%) pero pobre en ácido láctico, el porcentaje restante es un conjunto de sales y minerales. El pH oscila entre 6,4 y 6,6. El suero ácido proviene de quesos coagulados con ácido acético; es el subproducto común de la fabricación de queso blanco y por su pH de 4,6 resulta corrosivo para los metales, contiene mayor proporción de nitrógeno no proteico (27%) y posee menos lactosa (42%), ya que por provenir de leches ácidas, parte de la lactosa se convierte en ácido láctico (10%) y debido a la desnaturalización que ocasiona este pH es más pobre en proteínas (6%). La Tabla 1 muestra la composición del suero de acuerdo al proceso de elaboración de quesos.

Tabla 1. Composición del suero según el tipo ácido o dulce.

Composición media del suero		
Propiedad	Suero dulce	Suero ácido
pH	5,8-6,6	4,4-5,0
Lactosa (%)	51,0	42,0
Proteínas (%)	7,0	6,0
Materia grasa (%)	0,2	1,0
Minerales (%)	4,0-5,0	7,0-8,0
Calcio (%)	0,45	1,05
Fósforo (%)	0,4	0,8
Ácido láctico (%)	0,0	10,0

Fuente: Pintado Vallejo, Pamela Jackeline. Elaboración de manjar utilizando suero de quesería a diferentes niveles como sustituto de la leche en el Cantón Pastaza. Ecuador.2012. [En Línea]. <Disponible en: <http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/TESIS%20DE%20PAMELA%20PINTADO.pdf>>

Aproximadamente 9 Kg de suero resultan de la producción de cada kilogramo de queso fresco producido y el costo asociado con la eliminación de este volumen de suero de leche genera un alto costo a nivel ecológico, puesto que la alta demanda química de oxígeno (DQO) (50KgO₂/ton suero) de suero de leche o permeado de suero hacen de su disposición un problema. Por lo tanto, el uso de este residuo como materia prima para la fermentación ha sido durante mucho tiempo de interés industrial, ya que genera un valor agregado al residuo y se disminuye el impacto ambiental. Los productos resultantes de la fermentación de suero de leche incluyen el ácido láctico, ácido acético y propanoico (Xia, Chung, & Yang, 2003). En la Tabla 2 se observa la composición química del suero.

Tabla 2: Composición química media del suero.

Componente	(%)
Cenizas	0,65
Grasas	~0,3
Agua	93,1
Proteínas	~0,9
Lactosa	~5,1
Sólidos totales	~6,8

Fuente: Garibey y García, Mariano; Quintero Ramírez, Rodolfo; López Minguiá Canales, Agustín. Biotecnología alimentaria. 4. Ed. México: Limusa, 2002. p. 63

En Colombia, actualmente el suero de leche es utilizado para la elaboración de bebidas lácteas refrescantes, el residuo sólido resultante es utilizado en compostaje y la fase líquida se emplea como fertilizante en los pastos. Sin embargo no todo este residuo es aprovechado o llevado a plantas de tratamiento de agua, el 59.4% del suero producido en el país es vertido en el sistema de alcantarillado como un efluente agroindustrial (Burbano, 2012). La disposición de éste no es una solución totalmente viable a nivel económico ni ambiental debido a la producción de malos olores (Sánchez Sánchez, Gil Garzón, Giraldo Rojas, Millán Cardona, & Villada Ramirez, 2009).

1.4.2 Condiciones de operación

La producción de nisina se ve afectada por varios factores como el tipo cepa productora, la composición de los nutrientes de los medios de cultivo, pH, temperatura, agitación y aireación (Pongtharangku & Demirci, 2006).

1.4.2.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son geles o soluciones que están compuestos por los nutrientes necesarios para el debido crecimiento de los microorganismos, esto bajo ciertas condiciones de pH y temperatura. Los medios comercialmente usados para el crecimiento bacteriano de los microorganismos necesarios para la producción de la nisina, son el MRS y el M17 respectivamente.

Los ingredientes que contienen los medios de cultivo como el MRS (peptonas, sales, azúcares y levadura) tienen efectos diferentes sobre el rendimiento de la bacteriocina y la biomasa (Sharma, Garg, & Singh, 2010). Es por esto, que se ha intentado desarrollar un medio óptimo para la producción máxima de nisina ya que se ha encontrado que los medios de cultivo están estrechamente relacionados con el crecimiento y la formación de la biomasa.

La cepa productora de nisina *Lactococcus lactis*, requiere de medios ricos en nutrientes, tales como leche, suero de quesería o un medio orgánico complejo, que permitan un buen desarrollo del microorganismo dentro del medio. (Kim, Hall, & Dunn, 1997).

El medio utilizado para la producción de nisina es básicamente similar al que se utiliza para el crecimiento de cultivos iniciadores, es decir, un medio que soporta altas tasas de crecimiento y formación de una gran biomasa. El aumento en la concentración de fosfato estimula la producción de nisina, y se obtienen altos rendimientos suplementando con una fuente de nitrógeno. La biosíntesis de la nisina es fuertemente dependiente de la presencia de azufre, y aminoácidos como serina y treonina (Kim, Hall, & Dunn, 1997).

1.4.2.2 pH

El pH es importante tanto para el crecimiento de la biomasa como para la producción de la nisina debido a que la agregación y la adsorción de esta bacteriocina a las células y/o a la degradación proteolítica dependen del pH y puede afectar la actividad de la bacteriocina en el medio de cultivo (Sharma, Garg, & Singh, 2010).

Liu, Kyung y otros (2005), mediante un diseño experimental que consistía en la producción de nisina en un bio-reactor de lecho empacado evaluaron cual sería el pH óptimo que permitiera la mayor producción de nisina, de esta forma encontraron que la actividad de la nisina se favorece a pH entre 5,5 y 6,5 siendo 5,5 el valor con mejores resultados para la producción de nisina, mientras que el pH 6,5 es mejor para la acumulación de biomasa.

Durante la producción de la nisina, el pH generalmente debe mantenerse constante. Esto se consigue mediante el taponamiento del medio de cultivo inicialmente o por adición continua de un álcali como el NH_4OH o el NaOH . En la literatura se reportan valores de pH entre 5,8-6,5 para la producción de nisina (Chuanbin , Yan , & Shulin, 2005) (Thunyarat & Demirci, 2006) (Cabo, Murado, González, & Pastoriza, 2001) (Liu, X., & Otros, 2005).

1.4.2.3 Aireación

La tolerancia al oxígeno de las bacterias ácido lácticas se asocia a diferentes vías metabólicas que dan lugar a rendimientos diferentes. Con respecto a esto, mientras que algunos autores sugirieron el uso de condiciones anaeróbicas, otros han encontrado que una atmósfera enriquecida en oxígeno (60% de O_2) mejora considerablemente la producción de nisina, de esta manera, los efectos de la

aireación dependen de la bacteriocina en estudio (Cabo, Murado, González, & Pastoriza, 2001).

1.4.2.4 Temperatura

Durante el proceso de fermentación para la producción de nisina, es de vital importancia establecer la temperatura óptima a la cual la actividad de la nisina es mayor, generalmente esta temperatura se encuentra entre los 30-37 °C (Mall , Kumar Mohanty, Bhawanishankar, & Tunga , 2010).

Sharma y otros (2010) evaluaron la actividad de la nisina tomando como rango de estudio temperaturas entre 25 y 50 °C. Para la producción de nisina se utilizó como microorganismo productor el *Lactococcus lactis*, y el pH del medio se mantuvo constante en 7,5 durante las 24 h de fermentación, bajo estas condiciones se encontró que la mayor actividad de la bacteriocina se logra a los 35°C.

1.4.2.5 Agitación

La relación entre agitación-aireación en un proceso de fermentación tiene un efecto significativo sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de masa y el consumo celular de oxígeno. Generalmente, al aumentar los niveles de agitación y aireación se presentan aumentos considerables en la velocidad de transferencia de oxígeno al medio de cultivo y disminuciones en los consumos específicos de oxígeno, indicando respectivamente, mejoras en la velocidad de difusión molecular y la posible pérdida de viabilidad celular ante el incremento de la intensidad del mezclado (Bedoya Pérez & Hoyos Sánchez, 2010). Se han evaluado diversos valores de agitación para la producción de nisina siendo los más comunes 100,

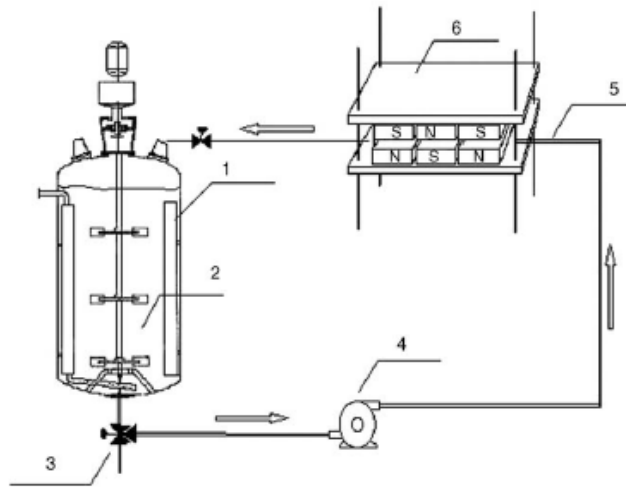
180 y 300 rpm (Mall, Kumar Mohanty, Bhawanishankar Patankar, Mody, & Tunga, 2010).

1.5 SISTEMAS DE FERMENTACIÓN

La obtención de nisina a nivel industrial se ha realizado en sistemas en continuo, semibatch y en batch utilizando diversos tipos de reactores, estos generalmente son contruidos o adaptados para cumplir con las condiciones operacionales de producción.

Existen reactores con control automático que permiten fijar variables como el pH, agitación, tiempo de fermentación y aireación. Estudios realizados por Chacón y otros (2006) fueron llevados a cabo en un fermentador BioFlo III de 4L, e inoculado con un 10% v/v de un preinóculo a 30°C, durante 24 horas a 50 rpm. Los autores evaluaron tanto el rendimiento de la biomasa como de la producción de nisina con y sin recirculación del medio de cultivo, encontrando que el rendimiento de la nisina con respecto a la biomasa ($Y_{p/x}$) decrece en un 62% y el rendimiento de la nisina respecto a al sustrato ($Y_{p/s}$) decrece en un 53% cuando se introduce recirculación al sistema; también tomaron en cuenta el efecto de la intensidad de un campo magnético en la producción de nisina como variable de interés, obtuvieron que los mejores resultados se alcanzan a las 4h de fermentación con 1.5 m/s de flujo de recirculación y un campo de 5 mT. El bio-reactor de la Figura 4 es ejemplo de un fermentador automático configurado para el tratamiento magnético de una suspensión de *Lactococcus lactis*.

Figura 4. Fermentador automático para el tratamiento magnético de una suspensión de *Lactococcus lactis* que consta de: (1) Fermentador, (2) Medio de cultivo, (3) Válvula de tres vías, (4) Bomba peristáltica, (5) Tubo de acero inoxidable y (6) Generador de campo magnético.



Fuente: Chacón, D., Haber Pérez, V., Rodríguez, O., & Monte Alegre, R. Effect of the extremely low frequency magnetic field on nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* using cheese whey permeate, 2006. En: *Process Biochemistry*, 1967-1973.

Pongtharangku & Demirci, (2006) evaluaron la producción de nisina empleando un reactor con células inmovilizadas de *Lactococcus lactis* formando una biopelícula, realizando la fermentación con alimentación discontinua a diferentes perfiles de pH.

Zhaoliang y otros (2011) evaluaron los efectos del medio de cultivo en un reactor de biopelícula sobre la producción de la nisina y diferentes perfiles de pH. Entre los perfiles se encuentran: un perfil 1 de pH constante a 6,8, un segundo perfil a pH constante con una autoacidificación después de 4h, y un tercer perfil de pH ajustándolo cada 2h. Cuando se aplicó el perfil 1 en un fed-batch la fermentación mejoró la producción de nisina para la suspensión de células. Para el perfil 2 y 3

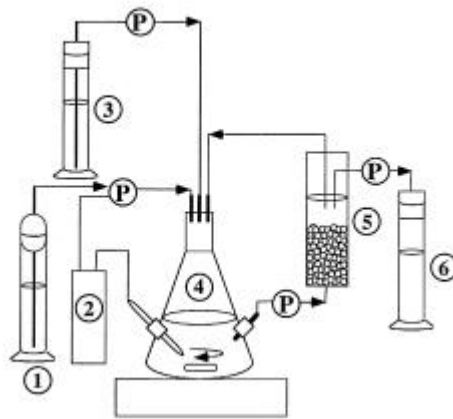
se obtuvo una producción de nisina significativamente menor, debido a la toxicidad de exceso de ácido láctico producido durante la fermentación. Este estudio sugiere que la fermentación al ser realizada en un fed-bach puede ser utilizada con éxito para aumentar la producción de nisina tanto para suspensiones de células como reactores de biopelícula (Pongtharangu & Demirci, 2006).

Liu, Kyung y otros (2005), construyeron un bio-reactor continuo de lecho empacado, utilizando una matriz fibrosa de algodón para inmovilizar las células. La temperatura del bio-reactor fue controlada mediante la circulación continua de agua. El pH en el bio-reactor se controló utilizando un controlador automático de pH e hidróxido de amonio al 15%. El medio de fermentación fue bombeado en el reactor a velocidad baja, a través de una bomba peristáltica. El diseño anterior también fue probado para fermentaciones operando en modo batch.

Otro tipo de reactores comúnmente utilizados para realizar fermentaciones a nivel de laboratorio consiste en recipientes de vidrio como erlenmeyers provistos de un sistema para la recolección de muestras y un agitador orbital que proporciona la agitación requerida (Harb V & Herrera A, 2009).

Las estrategias utilizadas para el montaje de los diferentes equipos varían de investigación a investigación de acuerdo a la disponibilidad y el costo de los equipos, de esta manera se han encontrado en la literatura modelos de reactores como el de la Figura 5. Este reactor fue diseñado por Sonomoto y otros (2000) para la producción de nisina z por inmovilización de *Lactococcus lactis*.

Figura 5: Reactor continuo de lecho empacado, conformado por un contenedor de álcali (1), un controlador de pH (2), un contenedor de medio fresco (3), contenedor con agitación para control de pH (4), un reactor de lecho empacado (5), un contenedor para la toma de muestras y recolección de producto (6) y 3 bombas (P).



Fuente: Sonomoto, K., Chinachoti, N., Endo, N., & Ishizaki, A. (2000). Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 325-334.

Parente y Ricciardi (1994) evaluaron la producción de la bacteriocina de *Enterococcus faecium* DPC1146 en una fermentación por lotes con un reactor de tanque agitado con control de temperatura, el medio de cultivo estaba formado por glucosa, triptona, hidrolizado de caseína, extracto de levadura, KH_2PO_4 , Tween 80, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$. La bacteriocina se produjo durante el crecimiento exponencial mostrando una cinética de metabolito primario. Esta producción se detuvo al final de la fase exponencial y la actividad antimicrobiana disminuyó. El pH óptimo de producción fue de 5,5.

2. METODOLOGÍA

2.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUERO DE QUESERÍA

Se caracterizó cada lote de suero de quesería, suministrado por la empresa Lácteos Buenavista S.A.S. ubicada en el km 3 vía la Unión - Sonsón en el departamento de Antioquia, determinando el contenido de azúcares, ácido láctico, y ácido acético por HPLC, además se determinó el contenido de proteínas por el método de Biuret (Parente, Brienza, Moles, & Ricciardi, 1995), el contenido de grasas por el método de Rose-Gottlieb, porcentaje de sólidos, cenizas y pH.

2.2 ENSAYOS PRELIMINARES

2.2.1 Mantenimiento de cepas

Se mantuvieron los microorganismos (*Lactococcus lactis* y *Lactobacillus.sp*) congelados a -20°C utilizando un medio crioprotector. Para su posterior utilización fueron resuspendidos en M17 o MRS, que están compuestos principalmente por glucosa, levadura, peptonas y sales (Wolf-Hall, 2009) y fueron preservados en viales.

2.2.2 Activación de cepas

Se sembró un vial descongelado en 20 mL de medio M-17 (esterilizado a 118°C/10min). Se incubó a 30°C por 24 h.

2.2.3 Medio de cultivo

El medio de cultivo estuvo compuesto por suero de quesería (2000 mL) suplementado con sulfato de magnesio (1g/mL), sulfato de manganeso (0.2g/L),

extracto de levadura (27.6g/mL) y Tween 80 (0.04g/mL) (Piña Suarez & otros, 2011)

Para la preparación del medio de cultivo, el suero de leche suplementado se esterilizó a 118 °C durante 10 minutos; posteriormente fue refrigerado a 4°C durante una noche para permitir la sedimentación de algunos compuestos presentes en el suero. Una vez sedimentado el medio de cultivo suplementado, se tomó el sobrenadante para realizar la fermentación (Harb V & Herrera A, 2009).

2.2.4 Pre-inóculo

De la cepa activada se tomó 1mL y fue transferido a 20 mL de medio suplementado compuesto por suero de leche, sulfato de magnesio (0,5 g/L), sulfato de manganeso (0,1 g/L), extracto de levadura (13,8 g/L) y Tween 80 (0,02 g/L) (Piña Suarez & otros, 2011), se ajustó el pH a 6,5 con NH₄OH. Se incubó esta solución a 30°C por 10 h.

2.2.5 Inóculo

De la solución anterior se tomó 1mL y se adicionaron en 50 mL de otra solución de suero de leche, de igual manera como se describe en el numeral 2.2.3 y se incubó a 30°C por 10 h.

2.2.6 Selección regulador de pH

Se evaluaron dos agentes reguladores de pH para determinar cual de ellos favoreció el crecimiento del microorganismo, en la producción de biomasa. Para esto, se prepararon 1800 mL de medio de cultivo, para ser repartidos en cuatro erlenmeyers de 1000 mL provistos de un tubo con tapón, a cada erlenmeyer se le ajustó el pH a 6,5, a dos de ellos con NH₄OH y a los otros dos con NaOH, luego se esterilizó el medio a 15 psi durante 20 minutos y se inoculó con *Lactococcus lactis subsp Lactis*, posteriormente se inició la fermentación con agitación orbital

de 154 rpm, se tomaron muestras de 10 mL del medio en tubos falcón cada dos horas durante 8 horas para determinar el contenido de biomasa y la producción de nisina.

Las muestras fueron centrifugadas durante 15 minutos a 4°C y 4500 rpm, el sobrenadante se conservó para hacer pruebas de cuantificación de la nisina (numeral 2.2.7), la biomasa centrifugada se resuspendió con 10 mL de agua destilada y fue centrifugada nuevamente a las mismas condiciones para eliminar restos de medio de cultivo. La biomasa fue secada en un horno de convección forzada a 80°C durante 24 horas para determinar su peso seco.

Se determinó la velocidad de crecimiento máxima específica, $\mu_{\max}$, para los ensayos preliminares de acuerdo con el modelo sigmoidal de Gompertz (Zwietering & Jongerburger, 1990).

2.2.7 Cuantificación de nisina

La actividad de la nisina se determinó utilizando un microorganismo sensible presente en los alimentos, como el *Lactobacillus sp.* Inicialmente se evaluaron tres procedimientos sugeridos por los autores Atta, Refaat, & El-Waseif (2009), Guo (2011) y Badr & Hussein (2005):

Procedimiento 1 (Precipitación por salado): 50 mL de medio fermentado fueron centrifugados a 7000 rpm por 20 min a 4°C, se le adicionó sulfato de amonio al sobrenadante hasta alcanzar el 60% de saturación se agitó durante 2 h a 10 °C y se centrifugó a 7000 rpm por 50 min a 4°C. Se resuspendió el pellet en 25 mL de HCl 0,02 M. Al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio hasta alcanzar el 80% de saturación, se agitó durante 2 h a 4°C y se centrifugó a 7000 rpm por 50 min a 4°C, se resuspendió el pellet en 25 mL de HCl 0,02 M y se midió la actividad.

Procedimiento 2 (Acidificación de la muestra): a 10 mL de medio fermentado se le ajustó el pH a 2,0 usando HCl concentrado y se centrifugó a 7000 rpm por 20 min a 4°C, luego se diluyó el sobrenadante (1/2) con HCl 0,02 M y se filtró empleando un filtro de 0,45 µm. y se midió la actividad.

Procedimiento 3 (Acidificación y calentamiento de la muestra): a 10 mL de medio fermentado se le ajustó el pH entre 2,0 y 3,0 usando HCl concentrado, se llevó a un baño de agua hirviendo por 5 min. Se enfrió y se centrifugó a 7000 rpm por 20 min a 4°C, se ajustó el pH del sobrenadante a 6,0 con NH₄OH y se filtró usando un filtro 0,45 µm. Posteriormente se midió la actividad.

La actividad de la nisina, se relacionó de manera cualitativa con el tamaño del halo de inhibición ocasionado por la misma y se expresó en unidades de longitud (cm) utilizando el método de difusión en agar con *Lactobacillus sp.* como microorganismo sensible indicador. El *Lactobacillus sp* se cultivó en caldo MRS y se incubó a 30°C durante 24 h. Se tomaron 1,5 mL de este inóculo el cual se transfirió a 250 mL de agar semisólido MRS (0,8% de agar agar). 20 mL del medio MRS inoculado se transfirió a cajas de petri. Después que el agar solidificó, se cortaron pozos de 5 mm de diámetro empleando un tubo de vidrio estéril. (Vessoni P, Faustino J & Pessoa, 2005).

De cada uno de los sobrenadantes obtenidos en los procedimientos 1, 2 y 3 se adicionaron 50 µL en los pozos (una muestra de sobrenadante por caja, máximo 4 pozos por caja) como blanco se utilizó nisina comercial diluida en HCl 0,02 M. Las cajas de petri fueron llevadas a un refrigerador durante 24 h, transcurrido este tiempo las muestras fueron transferidas a una incubadora a 30°C por 24 h sin invertirlas. Después de este periodo se midieron los halos de inhibición en cuatro direcciones utilizando como instrumento de medición un pie de rey y se calculó el promedio de los halos.

2.3 ENSAYOS EN BIO-REACTOR CONTROLADO

2.3.1 Inóculo para el reactor

Se prepararon preinóculos e inóculos siguiendo un proceso similar al descrito en los numerales 2.2.4 y 2.2.5. Para el preinóculo se utilizaron 20 mL del medio de cultivo preparado de igual manera que en el numeral 2.2.3, y para el inóculo se prepararon 100 mL de la solución descrita en el numeral 2.2.3, esta última solución se le administró a 1,3 L del medio suplementado, la fermentación se realizó por un periodo de 24 h en un bio-reactor instrumentado de 3 L. (BioFlo 110 con control automático de pH y chaqueta de calentamiento). Además, al preinóculo y al inóculo se les adicionó una solución de nisina comercial (1,86 UI/L) como inductor en dosis subletales, 186 μ L al preinóculo y 1,86 μ L al inóculo de acuerdo con lo propuesto por Piña y colaboradores (Piña Suarez & otros, 2011).

2.3.2 Producción de nisina

Se evaluó la influencia del pH (6,0-7,5) y velocidad de agitación (100-300 rpm) para la producción de la nisina expresada en términos de la variable respuesta: actividad de nisina, mediante un diseño de experimentos factorial 2². Para esto se realizaron cuatro fermentaciones de 1,4 L con duplicado, en un bio-reactor controlado Bioflo 110, utilizando un 10% de inóculo de *Lactococcus lactis* subsp.*Lactis*, durante periodos de tiempo de 24 horas. Transcurridas dos horas de haberse iniciado la fermentación se agregaron al bio-reactor 2,5 mL nisina comercial como inductor, de concentración 1,86 UI/L (Piña Suarez & otros, 2011).

La Tabla 3 muestra los ensayos y las condiciones en las que se realizaron las pruebas.

Tabla 3. Condiciones de operación del reactor BioFlo 110

N° Ensayo	pH	Agitación
1	6	100
2	6	300
3	7,5	300
4	7,5	100

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUERO

La caracterización físicoquímica de los sueros de queso constituye un paso importante en la utilización de estos subproductos de la industria láctea en los distintos procesos industriales. (Miranda Miranda & otros, 2009)

Con el fin de establecer las características de la materia prima (suero de quesería) otorgada por la planta Lacteos Buenavista, se realizó la caracterización del suero, en la Tabla 4 se presenta el contenido de azúcares, ácidos, proteínas, grasas, sólidos y cenizas .

Tabla 4. Caracterización del suero de quesería de la planta Lacteos Buenavista.

Parámetro	Valor
Lactosa (g/L)	4,303±0,055
Fructosa (g/L)	0,453±0,640
Ácido Láctico (g/L)	1,748±0,066
Ácido Acético (g/L)	0,002±0,002
Proteínas (g/mL)	7,564
pH	5,940-6,220
Sólidos totales (g/mL)	0,065
Sólidos sedimentables (mL/Lh)	0,500
Cenizas (g/mL)	6x10 ⁻³
Grasa (g/mL)	5x10 ⁻³

La composición del suero de quesería, varía dependiendo del tipo leche usada y el tipo de queso a producir; en este proyecto se empleó suero de queso fresco tipo cuajada y quesito. De acuerdo a los resultados obtenidos durante el proceso de caracterización, el suero de quesería se clasifica como suero dulce, con base en el pH y el contenido de ácido acético.

Se encontró un contenido de lactosa de 4,3 g/L, una cantidad muy baja con respecto a la reportada por otros autores. Miranda y colaboradores (2009) hallaron un contenido de lactosa de 47,86 g/L para el suero de quesería. Ellos explican que el descenso en el contenido de lactosa de los sueros podría ser el resultado de la actividad fermentativa de los microorganismos incorporados a la materia prima láctea durante la fabricación de quesos; como por ejemplo bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* entre otras propias del yogur, que desdoblan la lactosa, en ácido láctico, y por consiguiente, causan un descenso del contenido del mismo en el suero de queso.

En cuanto al contenido de proteína estos mismos autores muestran un valor de 9,84 g/L cercano al del presente trabajo de 7,564 g/L. La diferencia puede estar asociada a las transformaciones químicas que ocurren por el desdoblamiento de las proteínas cuando estos subproductos son fermentados producto de la adición de bacterias ácido lácticas (Miranda Miranda & otros, 2009).

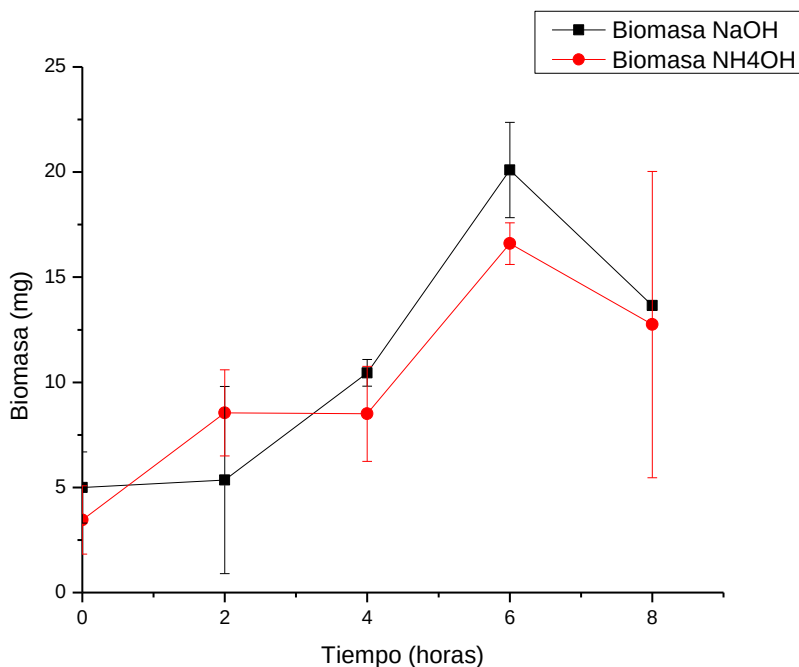
De acuerdo con lo anterior se encuentra que la composición fisicoquímica del suero de quesería es dependiente del proceso inicial de la fermentación ácido láctica. Lo que finalmente determinaría la aplicación de este subproducto para su posterior uso, bien sea para la producción de alimentos o algún objeto de estudio en particular, de acuerdo a las especificaciones de calidad que sean fijadas.

3.2 REGULADOR DE pH

Para el establecimiento del efecto del regulador de pH, se realizaron cuatro fermentaciones simultáneas en bio-reactores ajustando el pH inicial del medio con dos tipos de alcali: NH_4OH 1N y NaOH 1N. La biomasa obtenida en dichas fermentaciones se utilizó para determinar el peso seco.

La Figura 6 muestra el promedio aritmético entre la biomasa producida por la fermentación con los reguladores de pH (NaOH y NH_4OH) y sus respectivas réplicas, el pH del medio de cultivo para cada réplica se ajustó inicialmente a 6.5, transcurridas las 8 horas de fermentación el pH disminuía en un rango de 4,2 y 4,5.

Figura 6. Peso seco de la biomasa utilizando NaOH y NH_4OH como reguladores del pH.



El gráfico anterior reúne la información obtenida durante 8 horas de fermentación, la curva de color rojo representa el promedio aritmético del peso de la biomasa obtenido con las fermentaciones realizadas para el regulador de pH NH_4OH y la curva de color negro representa el promedio aritmético del peso de la biomasa obtenido con las fermentaciones realizadas para el regulador de pH NaOH , en ambas curvas se observa un aumento en la producción de biomasa con el tiempo, evidenciándose un comportamiento similar en el crecimiento celular, también se observa un descenso en la producción de biomasa a las ocho horas. Un análisis estadístico de la desviación estándar por trayecto de producción de biomasa, muestra que para los datos obtenidos esta desviación no es significativa, de este modo, en la Figura 6 se observa que las desviaciones estándar con respecto al promedio de producción en mg de biomasa se translanan, es decir, que hay estabilidad durante el proceso de fermentación para los cuatro ensayos realizados.

El efecto regulador del pH ha sido ampliamente estudiado por diversos autores, Cabo y otros (2001), encontraron que el pH se mantiene constante a medida que hay una adición continua del álcali. Hul y Gibbons (1997) estudiaron el efecto regulador de pH con tres tipos de álcali diferentes NaOH , NH_4OH y NH_4HCO_3 , encontrando que con los dos últimos hay un aumento sustancial en la producción de nisina y ácido láctico; por otra parte Mierau y otros (2005), establecieron que el NaOH por ser un agente de neutralización más alcalino que el NH_4OH , podría ocasionar daños celulares, además, el NH_4OH podría contribuir al metabolismo de amonio de la célula.

Para la ejecución de este proyecto se eligió como agente regulador el NH_4OH debido a que presenta una fuente adicional de nitrógeno (Van't Hul & Gibbons, 1997), que favorece el crecimiento de la biomasa y la producción de nisina, esto debido a que es un suplemento adicional para el medio de cultivo.

3.3 PARÁMETRO DE CRECIMIENTO $\mu_{m\acute{a}x}$ SEGÚN EL MODELO DE GOMPERTZ

Diversos modelos matemáticos han sido desarrollados con el objeto de predecir el comportamiento de las poblaciones bacterianas cuando crecen en condiciones controladas de laboratorio, para estimar el crecimiento, la supervivencia y/o la muerte de los microorganismos en relación a los factores críticos que los afectan, como lo son la temperatura, pH, actividad de agua, entre otros (Valbuena & Otros, 2005).

El modelo sigmoidal de Gompertz está basado en una relación exponencial entre la velocidad de crecimiento específico y la densidad de la población (Castro & Otros, 2008). En este trabajo se empleó la ecuación de Gompertz modificada citada por Zwietering, H.M et al (1990) para modelar la curva de crecimiento obtenida experimentalmente. Como resultado se obtuvieron los parámetros necesarios para calcular la máxima velocidad específica de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$).

$$y = A \exp - \exp \frac{\mu_{max}}{A} (\lambda - t) + 1 \quad (1)$$

Dónde:

λ : Está definida como el tiempo de adaptación (h)

A: corresponde a la relación entre el valor máximo alcanzado de biomasa (Cx_{∞}) y el contenido de biomasa inicial (Cx_0).

$$A = \ln \left(\frac{Cx_{\infty}}{Cx_0} \right) \quad (2)$$

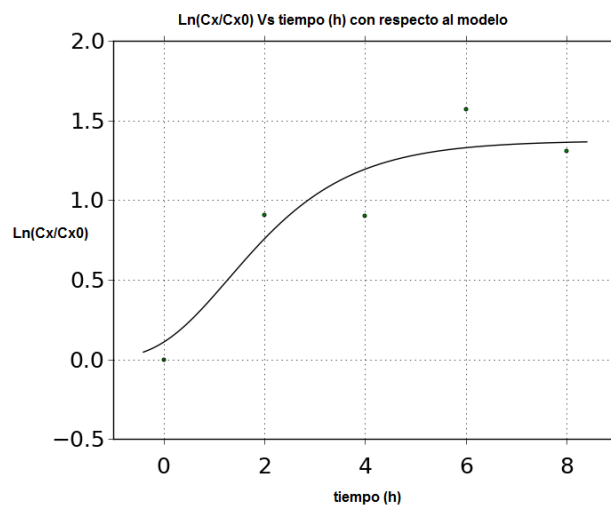
$\mu_{m\acute{a}x}$: Es la velocidad máxima de crecimiento (h^{-1})

Con los datos experimentales encontrados utilizando el regulador de pH escogido, NH_4OH , se encontraron los parámetros del modelo de Gompertz haciendo uso de la herramienta computacional ZunZun (www.zunzun.com), con el fin de ajustar los datos experimentales al modelo seleccionado.

El coeficiente de determinación (R^2) encontrado para el modelo fue de 0,87, el R^2 ajustado fue de 0,74, y la raíz del error cuadrático de la media (RMSE) fue de 0,19, lo que indica que existe una relación entre las variables evaluadas con respecto al valor real, debido a que el R^2 representa que el 87% de los datos obtenidos pueden ser explicados por medio del modelo de Gompertz.

En la Figura 7 se observa que la línea sólida correspondiente al modelo ajustado presenta una relación cercana a los puntos obtenidos del modelo de Gompertz.

Figura 7. Datos de biomasa producida ajustados al modelo de Gompertz



Se encontró una velocidad máxima de crecimiento específica:

$$\mu_m = 0,366 \text{ h}^{-1}$$

Este parámetro se evaluó a partir de los datos tomados para la fermentación con un pH 6,5 y agitación 150 rpm durante un periodo de 8 h. La velocidad máxima de crecimiento es específica para cada microorganismo y para cada medio de cultivo según lo planteado por Piña Suarez y otros (2011), ellos encontraron una velocidad máxima de crecimiento μ_m de $0,86 \text{ h}^{-1}$, para esto realizaron un diseño de experimentos factorial 3^3 con una réplica empleando suero suplementado con los mismos componentes empleados en el presente trabajo de grado, y la fermentación la realizaron manteniendo un pH constante de 6,5 y una agitación 200 rpm utilizando como microorganismo productor *Lactococcus lactis*, durante un periodo de tiempo de 8 h.

En un estudio realizado por Martínez y otros (2009), obtuvieron un rango para la velocidad de crecimiento específica de $0,655 \text{ h}^{-1}$ y $0,756 \text{ h}^{-1}$ al cabo de 8 h de fermentación para la bacteria ácido láctica en estudio.

De esta manera la velocidad máxima de crecimiento específica de $0,366 \text{ h}^{-1}$ indica que es un valor bajo de μ_m , en relación a lo expuesto por los autores ya mencionados; probablemente esto es debido a que dicho valor, se ve afectado por las condiciones atmosféricas del bio-reactor tales como: la temperatura y el pH.

Para esta investigación se realizaron los ensayos a una temperatura de 25°C , una temperatura inferior a la evaluada por Martínez y otros (2005), quienes encontraron que en un rango de 30°C a 35°C , el microorganismo muestra la mejor respuesta de crecimiento, de acuerdo a estos resultados un incremento en la temperatura ($30\text{-}35^\circ\text{C}$) podría ocasionar un incremento en la velocidad de reacción enzimática provocando así el aumento de μ_m . (GIGM, 2014).

El pH es otro de los factores que influyen en el valor de μ_m , ya que se ha encontrado que tanto el aumento (Mierau, Olieman, Mond, & Smid, 2005) como el descenso de éste en el medio produce un retraso en la tasa de crecimiento

bacteriano. En la mayoría de los procesos industriales, la acumulación de ácido láctico a pH bajo causa la detención en el crecimiento, en general el *Lactococcus lactis* crece de manera óptima a valores de pH en el rango de 6,3 a 6,9, pero el límite inferior para el crecimiento está en un rango de 4,0 a 5,0, dependiendo de la cepa y la composición del medio (Sanchez & Otros, 2008).

3.4 CUANTIFICACIÓN DE NISINA

Se analizaron tres procedimientos o pretratamientos diferentes para determinar la actividad de la nisina, para esto, se hicieron pruebas de precipitación por salado, acidificación de la muestra y acidificación con calentamiento de la muestra.

Las pruebas de sensibilidad se realizaron para conocer la capacidad de la nisina de inhibir el crecimiento de otras bacterias. También con este método se puede conocer la cantidad de nisina en cada etapa de fermentación. Eso quiere decir que tomando muestras por ejemplo cada hora se puede determinar cómo avanza el proceso de fermentación y producción del compuesto (Miller, 2012).

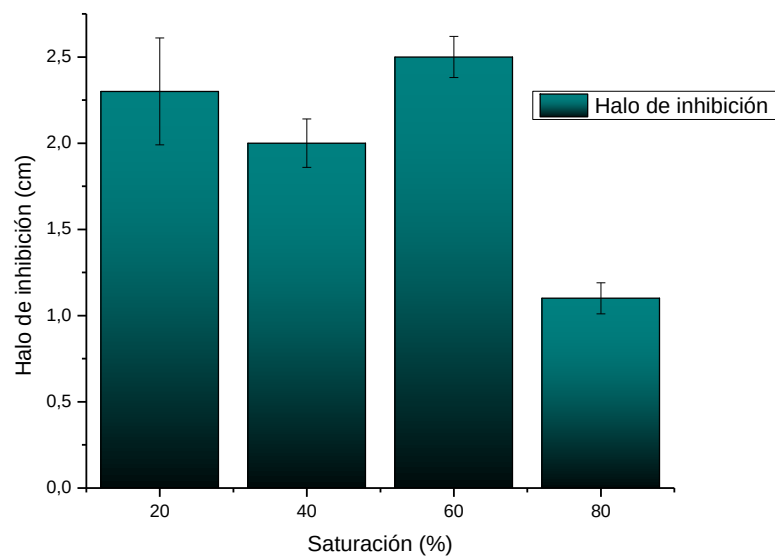
- Precipitación por salado (procedimiento 1 del numeral 2.2.7):

El método tiene dos pasos principales, primero se precipitan las proteínas con sales como el sulfato de amonio y luego se hace la prueba de sensibilidad para conocer la cantidad de proteínas que se precipitaron con el uso de la sal.

Se realizaron pruebas de precipitación por salado al 20%, 40%, 60% y 80% de saturación con sulfato de amonio a muestras de nisina comercial, para establecer el porcentaje de saturación con el que se lograría obtener mayor extracción de la nisina.

Se eligió realizar la precipitación por salado de las muestras utilizando sulfato de amonio al 60% de saturación, esto se evidencia en la Figura 8 al obtenerse un promedio de los halos de inhibición más alto con un valor 2,5 cm, logrando así que la nisina tenga un mejor rendimiento de extracción con ese grado de saturación.

Figura 8. Cuantificación de la nisina- Precipitación por salado.



Según Pérez Minor (2004) al emplear una concentración de sulfato de amonio entre el 60% y 80% se observó mayor actividad de la nisina para *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*. Por otro lado, en la tesis de Hernández López (2002) en el procedimiento de la precipitación de otras bacteriocinas, como linenscina OC2, se utilizaron concentraciones de sal desde 70% hasta la sobresaturación, obteniéndose mayor actividad en este rango, para la bacteriocina en estudio,(Miller, 2012).

En este estudio se realizó una fermentación para evaluar la actividad de la nisina mediante el método de precipitación por salado; sin embargo, no se obtuvieron

resultados positivos con la prueba de sensibilidad, por lo que se evaluaron otros métodos

De esta manera, para la determinación de la efectividad de los procedimientos dos y tres se tomaron las muestras respectivas de la misma fermentación, como se indica a continuación.

- Acidificación de la muestra (procedimiento 2):

Para la evaluación de este método se tomaron 10 mL de muestra de la fermentación con réplica cada dos horas. En este caso las muestras fueron acidificadas con HCl como se describe en el procedimiento 2 del numeral 2.2.7. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Determinación de la actividad con acidificación de la muestra.

Tiempo(h)	Halo Promedio(cm)
2	1,8±0,00
4	1,95±0,07
6	1,95±0,07
8	1,9±0,14
10	1,95±0,07
12	1,95±0,07
14	2±0,00
16	1,7±0,00

Se encontró que para el promedio aritmético entre los halos de inhibición de cada fermentación y su réplica no hubo diferencia significativa en la cantidad de nisina obtenida al evidenciarse en la actividad de la misma una desviación estándar cercana al valor promedio para cada intervalo de tiempo evaluado.

- Acidificación de la muestra y calentamiento (procedimiento 3):

En este caso también se tomaron 10 mL de muestra de la fermentación y su réplica cada dos horas, estas fueron acidificadas con HCl y se sometieron a calentamiento y posterior enfriamiento tal y como se indica en el procedimiento 3 descrito en el numeral 2.2.7 de la metodología.

Tabla 6. Determinación de la actividad de la nisina con acidificación y calentamiento de la muestra.

Tiempo(h)	Halo Promedio(cm)
2	1,85±0,35
4	1,7 ±0,14
6	1,65±0,07
8	1,6±0,14
10	1,85±0,49
12	1,8±0,14
14	1,65±0,21
16	1,8±0,00

Al igual que en el procedimiento anterior se encontró que para el promedio aritmético entre los halos de inhibición de cada fermentación y su réplica no hubo diferencia significativa en la cantidad de nisina obtenida, al evidenciarse en los resultados de la prueba de actividad una desviación estándar cercana al valor promedio. De esta manera se obtuvo que los valores de los halos de inhibición al aplicar los procedimientos dos y tres son comparables, por tanto, basados en los resultados anteriores se seleccionó el procedimiento 2 (Acidificación de la muestra), por ser una metodología más simple para determinar la actividad de la nisina, debido a que se encontró que el calentamiento y posterior enfriamiento de

las muestras no afecta significativamente la inhibición del *Lactobacillus sp* por la nisina,

3.5 FERMENTACIONES EN REACTOR BIOFLO 110

En esta parte del proceso de investigación, el estudio se enfocó en aquellos aspectos que están relacionados directamente con la producción de la nisina y los factores que influyeron en la actividad de la misma.

Se evaluó el efecto de las variables: pH (6, 7,5) y agitación (100 rpm, 300 rpm) sobre la producción de la nisina en un bio-reactor controlado por medio de un diseño de experimentos factorial 2^2 con réplica. Empleando la herramienta computacional StatGraphics.

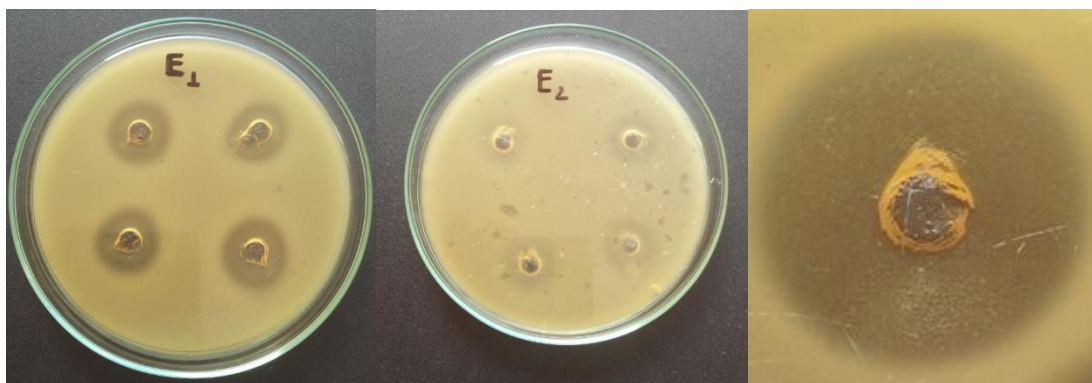
En la Tabla 7 se muestran los valores de las condiciones de operación evaluadas en el bio-reactor con sus respectivas réplicas al igual que los halos de inhibición determinados en la actividad de la nisina.

Tabla 7. Fermentaciones en reactor BioFlo 110

N° Ensayo	pH	Agitación rpm	Promedio halo de inhibición (cm)
1	6	100	0,5±0,058
2	6	300	0,5±0,05
3	7,5	300	0,2±0,046
4	7,5	100	0,5±0,096
1 réplica	6	100	0,4±0,000
2 réplica	6	300	0,1±0,000
3 réplica	7,5	300	1,2±0,096
4 réplica	7,5	100	1,2±0,216

En la Figura 9 se muestran algunos de los resultados en las pruebas de actividad obtenidas de las fermentaciones.

Figura 9. Prueba de actividad de la nisina.



E1: Ensayo 1

E2: Ensayo 2

Se encontró que de las variables evaluadas, la agitación, tiene un efecto negativo, sobre la actividad de la nisina, es decir, a medida que aumenta la agitación se produce menos cantidad de nisina; mientras que un aumento en el pH en el intervalo estudiado favorece la producción de la misma. Para establecer el tipo de efecto de cada variable se calcularon los efectos estimados y las interacciones, tal como se muestra en la Tabla 8. También se muestra el error estándar de cada uno de los efectos, los cuales se basan en el error total con 3 grados de libertad.

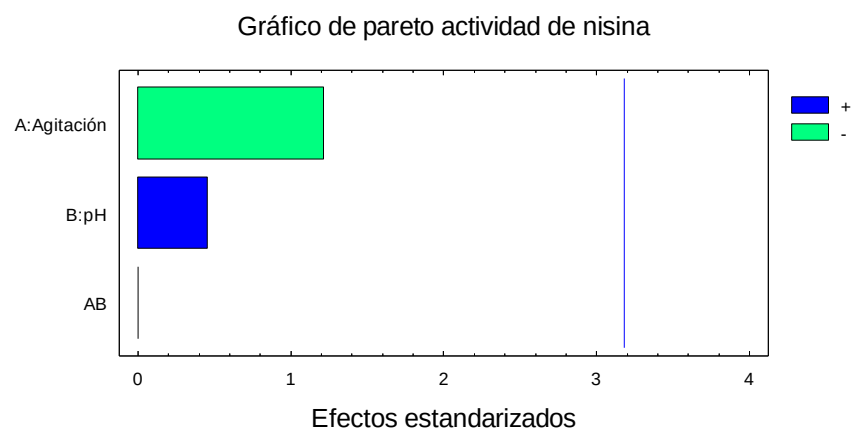
Tabla 8. Efectos estimados en las variables evaluadas: pH y agitación.

Efectos estimados	
Promedio	5,75 +/- 1,6457
A: Agitación	-4,0 +/- 3,2914
B:pH	1,5 +/- 3,2914
AB	0,0 +/- 3,2914

Una manera de establecer los factores de mayor incidencia sobre el proceso, es a través de un diagrama de Pareto, que ilustra los efectos significativos de las variables sobre la actividad de la nisina, ubicados en orden decreciente de significancia.

El diagrama de Pareto muestra una relación directamente proporcional entre el efecto estandarizado y la longitud de barra, es decir, el efecto estimado dividido el error estándar. Este gráfico se muestra en la Figura 10.

Figura 10. Diagrama de Pareto para la actividad de la nisina.



Las variables o factores que se utilizaron fueron A: Agitación, B: pH, y la variable respuesta utilizada es la actividad de nisina.

La línea vertical es llamada valor P y se emplea para establecer el grado de error que sea estadísticamente significativo, generalmente se trabaja con un margen de error del 5% para garantizar una mayor confiabilidad en los resultados.

Cuando una variable tiene un efecto significativo sobre la variable de respuesta, el gráfico sobrepasa la línea del valor P. En este caso como ninguna de las variables estudiadas sobrepasa el valor P, quiere decir que aunque se presentan diferencias, estas no son apreciables entre un cambio de nivel a otro.

Para observar la significancia estadística de los efectos se puede ver la Tabla 9, la cual muestra el análisis de la varianza para la actividad enzimática de cada uno de los efectos estimados.

Tabla 9. Análisis de la varianza para la producción de nisina con suero de quesería

Fuente	SS	GL	MS	F	P
A: Agitación	32,0	1	32	1.48	0,31120
B:pH	4,5	1	4,5	0.21	0,67950
AB	0,0	1	0	0	1,00000
Error Total	65,0	3	21,67		

SS: Suma cuadrática

G.L: Grados de libertad

MS: Media Cuadrática

F: Valor F

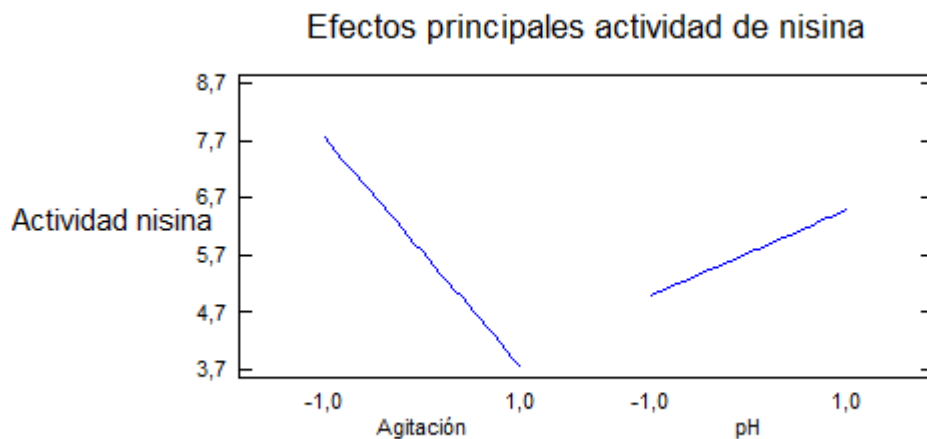
P: Valor P.

La Tabla 9 es conocida como la tabla ANOVA, la cual muestra la variabilidad de la actividad de la nisina por separado para cada uno de los efectos. Evalúa el significado estadístico de cada efecto comparando la media cuadrática frente a la estimación del error experimental. En este caso, ningún efecto tiene el valor P inferior a 0,05, lo que indica que no puede establecerse una dependencia de la actividad enzimática con respecto a la velocidad de agitación y el pH para los ensayos realizados en el nivel de confianza del 95,0%. El R-cuadrado estadístico indica que el modelo incorporado explica el 45,61% de la variabilidad en la actividad de la nisina. El R-cuadrado ajustado, que es más adecuado para comparar modelos con diferentes números de variables independientes, es 4,81%.

Lo que muestra la baja relación entre las variables utilizadas, agitación y pH, se puede deber a la dispersión de los datos obtenidos. El error estándar de estimación muestra que la desviación estándar de los residuos es de 4,65. El error absoluto medio (MAE) de 2,75 y es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) comprueba los residuos para determinar si hay alguna correlación significativa basada en el orden en el que aparecen en el archivo de datos. Dado que el valor P es mayor que 0,05, no hay indicación de la posible correlación serial en los residuos.

En la Figura 11 se puede observar la influencia de los efectos principales de la nisina en la actividad de la misma, de esta manera se determina que se favorece la actividad de la nisina a una agitación baja (nivel -1) y un pH alto (nivel +1) dentro del rango de estudio establecido.

Figura 11. Efectos principales de la actividad de la nisina



Estadísticamente se estableció que no hay diferencias significativas entre un tratamiento y otro, es decir, para las variables que se evaluaron a las condiciones de operación descritas en la Tabla 3, no se encontraron respuestas diferentes en el halo de inhibición; sin embargo, al observar el gráfico de los efectos principales

de la actividad de la nisina, Figura 11, pudieron observarse algunas diferencias que permitieron seleccionar las condiciones más favorables para la producción de nisina, de esta manera se puede observar que se obtiene mayor cantidad de la bacteriocina con la agitación más baja y el pH más alto, es decir a 100 rpm y 7,5, respectivamente.

Comparando los resultados obtenidos para el pH con los reportados en la literatura, se observa que el pH encontrado está alejado de los valores óptimos para la producción de nisina propuestos por otros autores (5,8-6,5) (Cabo, Murado, González, & Pastoriza, 2001).

Mierau y colaboradores encontraron que el aumentar el pH a 7,5, produce un retraso en la tasa de crecimiento bacteriano; sin embargo, para el presente estudio este efecto no fue apreciable, lográndose un crecimiento bacteriano similar al presentado a pH de 6,0. Estos mismos autores sugirieron que el uso de NH_4OH como agente neutralizante combinado con un aumento en el pH de la fermentación a 7,0 conduce a un crecimiento exponencial más prolongado aumentando la densidad celular (Mierau, Olieman, Mond, & Smid, 2005).

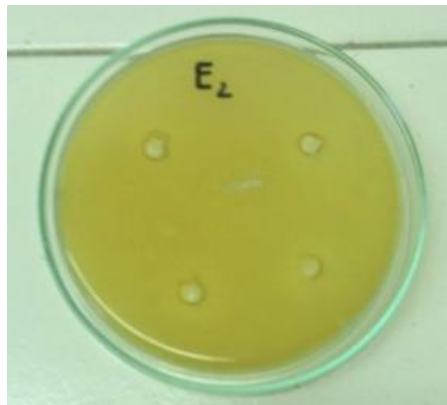
Mierau y Kleerebezem (2005), establecieron que no solo el pH y la agitación, son parámetros claves para la producir nisina, también lo son la composición del medio de cultivo (C, N y minerales), la temperatura de la fermentación, la cantidad de nisina que se utiliza como inductor, y el agente neutralizante, debido a que al estudiarse cuidadosamente estos parámetros por medio de un diseño de experimentos factorial, se puede lograr un aumento en la producción de la nisina mostrándose a su vez un aumento sustancial en el rendimiento.

Mall y otros (2010) evaluaron diferentes valores para la agitación en un rango de 100,140 y 180 rpm y encontraron que cuando el *Lactococcus lactis* se cultivó a 100 rpm la producción de nisina aumentó significativamente. Lo cual coincide con

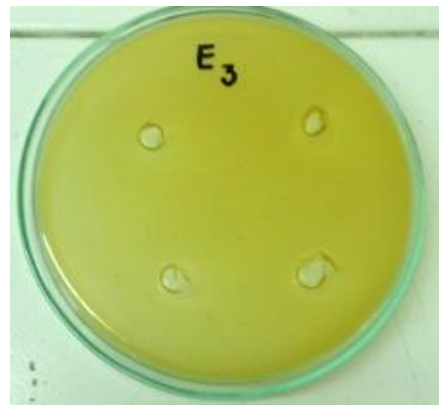
lo obtenido en el presente trabajo de grado donde se evaluó un rango de 100 y 300 rpm, encontrándose que al emplear una agitación de 100 rpm ésta mejora la producción de nisina en comparación a una agitación más alta como la propuesta que fue de 300 rpm.

En estudios preliminares realizados para la evaluación de las mejores condiciones de operación en la producción de nisina, se realizaron fermentaciones a las mismas condiciones mencionadas en la Tabla 3 agregando como variable adicional aireación al sistema, como resultado se encontró que la aireación no permitió la producción de nisina durante las 24 horas de estudio, ya que no se presentó actividad, estableciendo que la producción de nisina se favorece en condiciones estrictamente anaeróbicas. Ver Figura 12.

Figura 12: Prueba de actividad con aireación en las fermentaciones como variable adicional.



E₂: Ensayo 2 con aireación



E₃: Ensayo 3 con aireación

De esta manera se presentan ciertas variabilidades con estudios anteriormente realizados por diferentes autores ya que mientras algunos sugieren el uso de condiciones anaerobias como Hirsch (1951), otros encontraron que una atmósfera de oxígeno enriquecida al 60% de oxígeno aumenta la producción de nisina

considerablemente, estableciendo que el efecto de la aireación depende de la bacteriocina y la cepa en estudio (Cabo, Murado, González, & Pastoriza, 2001).

Cabo y otros (2001) en un estudio relacionado con el efecto de la aireación en medios de cultivo para la producción de nisina encontraron que en el punto máximo de producción de biomasa, la bacteriocina se cuadruplicó cuando el porcentaje de saturación de oxígeno se incrementó del 50 al 100 % sugiriendo que existe una relación entre la bio-producción de la bacteriocina con una vía metabólica oxidativa, demostrando que la aireación tiene un significado especial para la nisina ,ya que la tolerancia al oxígeno de las bacterias ácido lácticas (LAB) se asocia a diferentes vías metabólicas que dan lugar a diferentes rendimientos.

3.5.1. Producción de nisina en un bio-reactor controlado a las condiciones de operación seleccionadas.

Se realizó una fermentación con una réplica, en las que se evaluó el efecto del tiempo en la producción de nisina con los valores de pH y agitación previamente seleccionados durante el diseño de experimentos, es decir a pH: 7,5 y 100 rpm. La temperatura de la fermentación se mantuvo fija a 25°C.

En la Figura 13 se observa el montaje para la producción de nisina en el reactor BioFlo 110.

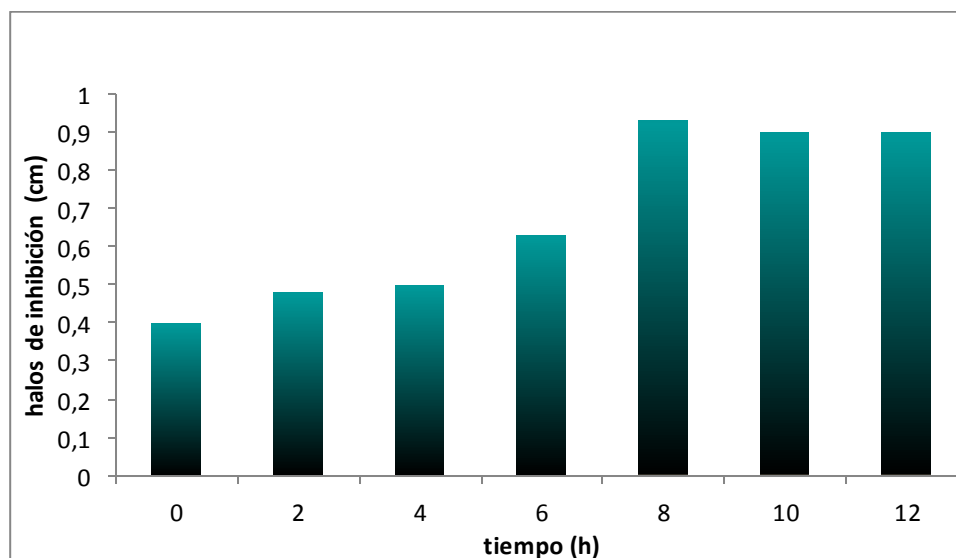
Figura 13. Montaje para la producción de nisina en reactor BioFlo 110.



Para la evaluación de la fermentación en el tiempo, se tomaron muestras cada 2 horas, de esta manera se obtuvo que la mayor actividad de la nisina se produjo a las 8 horas de fermentación en donde se formaron halos de inhibición entre 0,9 y 1 cm.

En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos de la actividad de la nisina, en esta se observa el tiempo de crecimiento del *Lactococcus lactis* en función de los halos de inhibición, en dicha figura, se muestra que hay presencia de nisina a las 0 horas producto del inductor adicionado al inicio de la fermentación, durante las 4 horas siguientes se observa un aumento leve en la producción de nisina debido a que el microorganismo inicia la fase de adaptación, dentro de las 6 y 8 horas posteriores la producción de nisina aumenta significativamente debido a que el microorganismo se encuentra en la fase de crecimiento exponencial, por último se observa que durante las horas siguientes no hubo incremento en la producción de nisina ya que es en este punto donde inicia la fase estacionaria y de muerte celular por lo que no se produce actividad.

Figura 14. Determinación de la actividad de la nisina en el tiempo, a pH 7,5 y 100 rpm



Por consiguiente la actividad de la nisina está íntimamente relacionada con el tiempo de fermentación y adicionalmente con las variables pH, agitación y composición del medio de cultivo. Así, varios autores se han dedicado a estudiar el comportamiento de la bacteria ácido láctica a través del tiempo y la influencia que sobre ella presentan las demás variables Piña Suarez y otros (2011) establecieron que el tiempo en el cual se alcanza la mayor cantidad de producción de nisina depende del pH, de esta manera ellos obtuvieron los siguientes resultados:

- A las 8 h de fermentación con un control de pH 5,5 se alcanza la mayor actividad de nisina.
- A las 12 h de fermentación con un control de pH de 6,5 se alcanza mayor actividad de la nisina.
- A las 24 h de fermentación y con control de pH de 6,0 alcanza la mayor actividad de nisina.

En el presente trabajo se encontró que el tiempo necesario para producir la mayor cantidad de nisina a las condiciones operacionales ya descritas fue de 8 horas, con un control de pH de 7,5, contrario a lo obtenido por Piña y Suarez, quienes encontraron que se puede alcanzar la máxima producción de nisina a las 8 horas con un pH más bajo, 5,5, mostrando así que el tiempo en el cual se alcanza la máxima producción de nisina depende tanto las condiciones de pH como de las demás condiciones de operación: temperatura, agitación y medio de cultivo.

4. CONCLUSIONES

El contenido de ácido acético en el suero fue de 0,02 g/L con un pH entre 5,94 y 6,22, lo que indicó que el suero utilizado fue un suero dulce.

No se presentó diferencia significativa en la producción de biomasa con respecto al uso de los reguladores de pH NH_4OH o NaOH . Por lo que se seleccionó como regulador de pH el NH_4OH , ya que aporta nitrógeno como nutriente para el medio de cultivo.

Se eligió como metodología para evaluar la actividad de la nisina, acidificar la muestra a un pH de 2 y posterior centrifugación de la misma a una temperatura de 4 °C y 7000 rpm, alcanzando un halo de inhibición promedio de 1,9 cm.

Se encontró que la velocidad máxima de crecimiento específico del *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* fue de $0,366 \text{ h}^{-1}$ a un pH 6,5 y agitación 150 rpm durante un periodo de 8 h.

Se estableció que las condiciones de operación que permitieron alcanzar la mayor producción de nisina en el reactor Bio-flo 110 a una temperatura de trabajo de 25°C, fueron a un pH de 7,5 y agitación de 100 rpm a las 8 h de fermentación. Bajo estas condiciones se obtuvo un halo de inhibición de nisina promedio de 0,93.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar las fermentaciones del diseño de experimentos agregando como variable adicional el control de temperatura que se encuentre en un rango entre 25°C y 37°C; para evaluar el efecto de esta en la producción de nisina y en el crecimiento del microorganismo.
- Teniendo en cuenta la recomendación anterior, evaluar la producción de nisina en un rango máximo de 72 horas para las condiciones óptimas de operación.
- Evaluar la producción de nisina utilizando recirculación del medio de cultivo en el sistema de fermentación para establecer el efecto que tiene en la cantidad de nisina producida.
- Emplear otros modelos de crecimiento microbiológico que permitan establecer un mejor ajuste a los datos experimentales del crecimiento del *Lactococcus lactis* y buscar una correlación entre el área del halo de inhibición y/o concentración de nisina.
- Realizar ensayos para extraer la nisina con el fin de usarla en alimentos para establecer la efectividad de la misma.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ababouch, H., Chaibi, A., & Busta, F. (1992). Inhibition of bacterial spore growth by fatty acid and their sodium salts. *Journal of Food Protection*, 980-984.
- Alkhatib, Z., Abts, A., Mavaro, A., Schmitt, L., & Smits, S. H. (2012). Lantibiotics: How do producers become self-protected?
- Amiali, M., Lacroix, C., & Simard, R. (1998). High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 887-894.
- Andersena, A. Z., Carvalhob, A. L., & Neves, A. R. (2008). The metabolic pH response in *Lactococcus lactis*: An integrative experimental and modelling approach.
- Asaduzzaman, S., & Kenji, S. (Junio de 2009). *Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action*.
- Atta, H., Refaat, B., & El-Waseif, A. (2009). Application of Biotechnology for Production, Purification and Characterization of peptide Antibiotic Produced by Probiotic *Lactobacillus plantarum*. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 115-125.
- Badr, A. K., & Hussein, H. (2005). Characterization of Nisin Produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 499-503.
- Bedoya Pérez, J. C., & Hoyos Sánchez, R. A. (8 de Febrero de 2010). *Agitation-Aeration Relation Effects on Cell Culture of Azadirachta indica A. Juss Neem on Azadirachtin Production in a Stirred Tank Bioreactor*. Recuperado el 10 de Febrero de 2013, de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n1/a08v63n01.pdf>
- Berry, E. y. (1990). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and bacteriocin producing *Pediococcus* during manufacture of fermented semidry sausage. *Journal of Food protection*. No 53, 194-197.
- Bonelli, R. R., Wiedemann, I., & Sahl, H.-G. (2006). Lantibiotics. *Handbook of Biologically Active Peptides*.
- Bower, C. K., Bothwell, M. K., & McGuire, J. (2001). applications, Lantibiotics as surface active agents for biomedical. *Colloids and Surfaces B*, 259-265.

- Burzul, S., & Ömer., S. (2009). Stress Response Kinetics of Two Nisin Producer Strainsof *Lactococcus lactis* spp. *Lactis. Appl Biochem Biotechnoly*, 387-397.
- Cabo, M., Murado, M., González, M., & Pastoriza, L. (2001). Effects of aeration and pH gradient on nisin production. A mathematical model.
- Castro, G.y Otros.(2008).Comparación de modelos sigmoidales aplicadas al crecimiento de *Lactococcus lactis subsp.Lactis*.
- Chacón, D., Haber Pérez , V., Rodríguez, O., & Monte Alegre, R. (2006). Effect of the extremely low frequency magnetic field on nisin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis* using cheese whey permeate. *Process Biochemistry*, 1967-1973.
- Chuanbin , L., Yan , L., & Shulin, C. (2005). Effects of Nutrient Supplements on Simultaneous Fermentation of Nisin and Lactic Acid from Cull Potatoes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124.
- Delves, J., & Davies, A. (2004). *Bacteriocin Nisin* .
- Dermirci.,A., Pongtharangkul,T. (2004). *Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification*.
- Escalona R, A. y. (2005). *Peligros microbiologicos e inocuidad de alimentos*. Recuperado el 11 de Febrero de 2012, de Revista ciencia.com: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EEEupuVEAVxbcBxPwc.php>
- Furuta, Y., Maruoka, N., Omori, T., Sonomoto, K., & Nakamura, A. (2008). *Utilization of Fermented Barley Extract Obtained from a By-product of Barley Shochu for Nisin Production*.
- Garcés, L. (2008). *Aditivos y conservantes en los alimentos*. Recuperado el 11 de Febrero de 2012, de Biomanantial.
- GIGM. (s.f.). *MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL: Factores ambientales que afectan al crecimiento: temperatura*. Recuperado el 4 de Febrero de 2014, de MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL: <http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-4.htm>

Gomez, N. (2011). FAO publica preocupantes cifras sobre pérdida de alimentos en el mundo. Recuperado el 12 de 02 de 2012, de <http://www.econciencia.org/index.php/politicas-medioambientales/item/829-comida-basura.html>

Guo, W.-L., & al, E. (2011). At-line monitoring of key parameters of nisin fermentation by near infrared spectroscopy, chemometric modeling and model improvement. *World J Microbiol Biotechnol*.

Harb V, C., & Herrera A, V. (2009). O: Evaluación de la Producción de Nisina a partir del *Lactococcus Lactis* subs. *Lactis*. Medellín.

Harris, E., & Angal, S. (1995). *Protein purificaion methods: a practical approach*. New York: Oxford University Press Inc.

Hee, S. y. (2002). *Identification and characteristics of Nisin Z- producing Lactococcus lactis subps lactis isolated from Kimchi*.

Hernández L, J.C. (2002) Caracterización parcial de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVKI33.

Hirsch, A. (1951). Growth and nisin production of a strain of Streptococcus. *J Gen Microbiol*, 208-221.

Invima. (s.f.). *Enfermedades producidas por alimentos*. Recuperado el 10 de 02 de 2012, de http://www.invima.gov.co/Invima/general/docs_general/doc_informacionalimentos/Informell2007ETA_sivigila_colectivo.pdf

Juncioni de Arauz, L., & Otros. (2009). Nisin biotechnological production and application. *Food Science & Technology*, 146-154.

Kim, W., Hall, R., & Dunn, N. (1997). The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 449-453.

Liu, X., y Otros. (2005). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*.

Madigan, M., & Martinko, J. (2005). Brock Biology of Microorganism. En M. Madigan, & J. Martinko, *Brock Biology of Microorganism*. Prentice Hall.

Mall , P., Kumar Mohanty, B., Bhawanishankar, P. D., & Tunga , R. (2010). Physiochemical Parameters Optimization for Enhanced Nisin Production by *Lactococcus lactis*. *Brazilian archives of biology and technology*.

Marchese, P. (2012). *Los conservantes*. Recuperado el 10 de Febrero de 2012, de www.pascualinonet.com.ar/conservantes.htm

Martínez, F. y Otros (2009). Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Lactococcus Lactis subsp. Lactis bv. diacetylactis* 166Cvcor.

Meindert De, V. W., & otros. (2003). Lantibiotics similar to nisin a, lactic acid bacteria which produce such lantibiotics, method for constructing such lactic acid bacteria and method for preserving foodstuffs with the aid of these lantibiotics and these lactic acid bacteria producing lanti. *patente google*.

Mierau, I., Olieman, K., Mond, J., & Smid, E. J. (2005). Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin controlled gene expression system nice for industrial applications. *Microbial Cell Factories*.

Miller, T. (2012). Optimización de la producción de nisina y su aplicación en alimentos.

Miranda Miranda, O., & otros. (2009). Características físico-químicas de sueros de queso dulce y ácido procucidos en el combinado de queso de Bayamo. *RCAN*, 21-25.

GENMIC. (2007). Microbiología de alimentos. Recuperado el 12 de Febrero de 2012, de http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema_08_%20micro_alimentos.pdf

Moreno, X. J. (Agosto de 2010). *Elaboración de una bebida láctea fermentada a base de Kéfir (formulación)*. Recuperado el 12 de Enero de 2013, de <http://biblioteca.uthh.edu.mx/libro/memorias/TSU/Alimentos/2010/2008309.pdf>

N. Schneider, K. W. (2011). Analysis of nisin A, nisin Z and their degradation products by LCMS/MS.

Navarro, W. (2012). Enfermedades Transmitidas por Alimentos, una importante causa de morbilidad en nuestro país. Obtenido de <http://www.generacion.com/noticia/177764/enfermedades-transmitidas-por-alimentos-importante-causa-morbilidad-nuestro-pais>.

Parente, E., Brienza, C., Moles, M., & Ricciardi, A. (1995). A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *Journal of Microbiological Methods*, 22, 95-108.

Pérez Minor, H. (2004) Caracterización bioquímica y espectro de inhibición microbiana de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*.

Pintado Vallejo, P. J. (2012). Elaboración de manjar utilizando suero de quesería a diferentes niveles como sustituto de la leche en el cantón pastaza. Puyo, Pastaza, Ecuador.

Piña Suarez, D., & otros. (2011). *Producción de nisina por lactococcus lactis uq2 usando suero lácteo suplementado evaluación de su actividad después del secado por aspersión*. 47-55.

Pongtharangku, T., & Demirci, A. (2006). Effects of fed-batch fermentation and pH profiles on nisin production in suspended-cell and biofilm reactors.

Sahl, H. J., & Brötz, H. (2000). *New insights into the mechanism of action of lantibiotics diverse biological effects by binding to the same molecular target*. Obtenido de Oxford Journal: Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

Instituto Nacional de Salud. (2012). Obtenido de <http://foodsafety.com.co/ialimentos/noticias.html>.

Sánchez Sánchez, G. L., Gil Garzón, M. J., Giraldo Rojas, F. J., Millán Cardona, L. d., & Villada Ramirez, M. E. (2009). Aprovechamiento del suero lácteo de una empresa del norte antioqueño mediante microorganismos eficientes.

Sanchez, C., & Otros. (2008). Contribution of Citrate Metabolism to the Growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at Low pH *Applied and Environmental Microbiology*, 1136–1144.

- Sharma, S., Garg, A., & Singh, G. (2010). Optimization of Fermentation Conditions for Bacteriocin Production by *Lactococcus Lactis* CCSULAC1 on modified MRS medium. *Journal of Dairy Science*, 1-9.
- Sonomoto, K., Chinachoti, N., Endo, N., & Ishizaki, A. (2000). Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 325-334.
- Simsec, O., Akkoc, N., H., A., & Saris, P. E. (13 de Marzo de 2009). *Continuous nisin production with bioengineered Lactococcus lactis strains*. Recuperado el 14 de Marzo de 2012, de Science Direct: <http://www.sciencedirect.com.consultaremota.upb.edu.co>
- Tecnología de Alimentos: Bacteriocina. (5 de Junio de 2008). Recuperado el 12 de Febrero de 2012, de <http://tecnoyalimentos.wordpress.com/2008/06/05/bacteriocinas/>
- Thunyarat, P., & Demirci, A. (2006). Effects of fed batch fermentation pH profiles on nisin production in suspended cell and biofilm reactors.
- Valbuena, E., & Otros. (2005). Modelos cinético aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, en leche. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 464 - 475.
- Valencia, J. (2008). *El suero de quesería y sus posibles aplicaciones*.
- Van't Hul, J., & Gibbons, W. (1997). Neutralization/recovery of lactic acid lactis: effects on biomass, lactic acid, and nisin production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 527-532.
- Vásquez, J., Gonzales, M., & M.A, M. (2004). Peptones from autohydrolysed fish viscera for nisin and pediocin production.
- Vessoni P, T. C., & Moraes, A. (2002). Optimization of Nisin Production by *Lactococcus lactis*.
- Vessoni P, T. C., Faustino J, A., & Pessoa, A. (2005). Production of Nisin by *Lactococcus lactis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 637.
- W.S, K., R.J, H., & N.W, D. (1997). the effect of nisin concentration and nutrient depletion. *Appl Microbiol Biotechnol*.

Wolf-Hall, C. E. (2009). Development of a low-cost medium for production of nisin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013–2019.

Xia, L., Chung, Y.-K., & Yang, S.-T. (2003). Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*.

Zhang, F., Zhaoliang, W., Wub, Z., & Wang, H. (2011). Effect of ionic strength on the foam separation of nisin from the fermentation.

Zwietering, M., & Jongerburger, F. (1990). Modeling of bacterial growth curve. . *Departament of Food Science* , 51-56.

ZunZun.com. (s.f.). Obtenido de ZunZun.com Online Curve Fitting and Surface Fitting Web Site: <http://zunzun.com/>