



## Uso potencial del suero de queso tipo “ranchero” para la producción de una bebida fermentada con gránulos de kéfir

### Potential of “Ranchero” cheese whey for fermented beverage production with kefir grains

Tania Fernanda Bueno-García<sup>1</sup>, Sandra Teresita Martín del Campo<sup>1\*</sup>, Ma. Anaberta Cardador-Martínez<sup>1</sup>, Blanca Isabel Maldonado-Guevara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Epigmenio González 500, Fracc. San Pablo, 76130, Querétaro, Qro.

\*Autor de correspondencia: smartinde@tec.mx

Recibido 14 de agosto 2021; recibido en forma revisada 25 de octubre de 2021; aceptado 15 de noviembre de 2021

#### RESUMEN

El suero es el subproducto principal de la industria quesera que retiene parte de los compuestos de la leche tales como lactosa, proteínas y minerales; esta carga orgánica representa un problema ambiental cuando es vertido en agua y suelo. Las aplicaciones actuales para el uso de este residuo se limitan a la escala industrial, por lo que el suero proveniente de pequeñas y medianas empresas generalmente se desecha sin ningún tratamiento. En este trabajo se evaluó el uso del suero de queso “ranchero” para la preparación de una bebida fermentada utilizando granos de kéfir, estudiando el efecto de la temperatura, tiempo y cantidad de inóculo en la fermentación. El contenido de lactosa, ácido láctico, ácido propiónico y péptidos se determinó por medio de la técnica de cromatografía líquida (HPLC). La capacidad antioxidante del producto final se evaluó por medio de los métodos ABTS y DPPH. Con base en los resultados hay una mayor producción de ácidos orgánicos, péptidos y actividad antioxidante fermentando durante 72 h, a 35 °C, con una concentración de inóculo de 1.5g/100 ml. Finalmente, se considera que tales condiciones pueden ser

implementadas fácilmente por productores locales para obtener una bebida con propiedades nutricionales y antioxidantes a partir del suero.

**Palabras clave:** suero, granos de kéfir, fermentación, ácido láctico, péptidos, actividad antioxidante

### **ABSTRACT**

Whey is the main by-product of cheese production that retains some milk compounds such as lactose, proteins, and minerals. Whey discarded in water and soil represents an environmental issue due to the organic load. Current applications for cheese whey treatment are mainly at an industrial scale, where the whey from local production generally is not treated. In this work, beverage production using “ranchero” cheese whey and kefir grains was evaluated, studying the effect of temperature, time, and inoculum concentration on fermentation. Lactose, lactic acid, propionic acid, and peptides were quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity of the final product was evaluated by the ABTS and DPPH methods. Based on the results, higher organic acid production, peptides, and antioxidant activity are obtained by fermenting for 72 h, at 35 °C, using an inoculum concentration of 1.5 g/100 ml. Finally, it is considered that local producers can easily apply such conditions to obtain a nutritional and antioxidant drink from whey.

**Keywords:** whey, kefir grains, fermentation, lactate, peptides, antioxidant activity

## INTRODUCCIÓN

El queso es el segundo producto lácteo más consumido en el mundo (OECD/FAO, 2020). En México, se producen más de 40 tipos de queso, donde el “ranchero” es uno de los más populares (Cervantes-Escoto et al., 2019). Durante su elaboración, se generan alrededor de 9 litros de suero por kilogramo de queso procesado. Este líquido contiene hasta el 55% de los sólidos de la leche (lactosa, proteínas y minerales), siendo contaminante por su alta demanda química y bioquímica de oxígeno (Osorio-González et al., 2018; Rama et al., 2019). Las aplicaciones actuales del suero se limitan a la escala industrial, donde se aprovecha cerca de 50% del volumen (Caballero et al., 2021). Sin embargo, el suero derivado de pequeñas empresas usualmente se desecha sin ningún tratamiento o aplicación (Osorio-González et al., 2018).

Considerando las características nutricionales del suero, este puede ser utilizado para obtener un producto similar al Kéfir, una bebida a base de leche que se fermenta con un consorcio microbiano compuesto por bacterias ácido lácticas, ácido acéticas, propiónicas y levaduras, dando origen a los granos de

kéfir (Dertli & Çon, 2017). Durante la fermentación, se producen principalmente ácidos orgánicos y péptidos, que se asocian con actividades antihipertensivas, antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias. Por su parte, algunas especies de los granos de kéfir son considerados aptos para el consumo humano (Dertli & Çon, 2017; Nejati et al., 2020). Estudios previos indican que las condiciones de crecimiento y fermentación influyen en gran medida en la producción de metabolitos, afectando directamente la calidad del producto final (Azi et al., 2020; Gorek & Peèar, 2016; Sabokbar & Khodaiyan, 2016; Settanni et al., 2020).

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el suero de quesería como sustrato para la preparación de una bebida usando granos de kéfir como cultivo iniciador y establecer las condiciones más adecuadas para la producción de ácidos orgánicos, péptidos y actividad antioxidante.

## METODOLOGÍA

### 1. Obtención de muestras

#### 1.1 Granos de kéfir

Los granos de kéfir se obtuvieron en el municipio de Landa de Matamoros, Querétaro, México a partir de un cultivo preexistente mantenido en leche.

#### 1.2 Suero

El suero de quesería fue proporcionado por un productor local de queso ranchero (Nopala, Hidalgo, México), el cual se recolectó después de la cuajada. El suero se calentó a 94 °C por 10 min antes de la fermentación para inactivar la carga microbiana.

### 2. Diseño experimental

Se realizó un experimento factorial completo con tres factores: temperatura (25 °C, 35 °C), concentración de inóculo (C1: 1 g/100 ml, C2: 1.5 g/100 ml) y tiempo de fermentación (24, 48 y 72 h), incluyendo 12 tratamientos y tres réplicas.

### 3. Fermentación

Se inocularon 200 ml de suero con la concentración correspondiente de inóculo de acuerdo con el

tratamiento. La incubación se realizó en condiciones estáticas en cámaras de clima constante (Memmert, HPP750, Alemania). Después de la fermentación, se prepararon alícuotas y fueron almacenadas a -10 °C hasta su análisis.

### 4. Determinación de biomasa

El peso húmedo de los granos de kéfir fue registrado antes y después de la fermentación. El incremento de biomasa se calculó por la diferencia en peso usando una balanza analítica (OHAUS, Pioneer).

### 5. Determinación de pH

El pH se midió directamente al final de la fermentación usando un potenciómetro (Oakton, pH 510 series, México).

### 6. Determinación de ácidos orgánicos y lactosa

El ácido láctico y propiónico se identificaron y cuantificaron por HPLC (Leclercq-Perlat et al., 1999) con algunas modificaciones. Se agregaron 5 ml de ácido tricloroacético (240 g/l, Sigma-Aldrich, EUA) y 5 ml de agua destilada a 5 ml de muestra. La mezcla se homogeneizó y después fue incubada a 25 °C por 1 h. 2 ml de la mezcla se filtraron directamente en viales con

un filtro PTFE de 45  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, Alemania).

Para el análisis, se utilizó un equipo de HPLC Agilent Technologies 1200 series (Palo Alto, EUA) equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD). Se prepararon curvas de calibración para ácido láctico (0-10 g/l, Sigma-Aldrich, Alemania), ácido propiónico (0-10 g/l, Sigma-Aldrich), ácido acético (0-5 g/l, Karal, México) y ácido butírico (0-5 g/l, Sigma-Aldrich, EUA).

Siguiendo el mismo método, para la detección de lactosa se agregaron 2.5 ml de solución de Carrez I (150 g/l, Sigma-Aldrich, Alemania), 2.5 ml de solución de Carrez II (240 g/l, Sigma-Aldrich) y 0.5 ml de hidróxido de sodio 1 M (Karal, México) a 2 ml de muestra. 2 ml de la mezcla se filtraron en viales. Se preparó una curva de calibración de D(+)-lactosa monohidratada (0-100 g/l, Sigma-Aldrich, Países Bajos) para el análisis.

### **7. Determinación de péptidos**

5 ml de muestra fueron incubados a 40 °C por 14 días hasta eliminar la humedad. Los sólidos se suspendieron en 2 ml de agua destilada y el volumen total se filtró en viales.

Los péptidos se determinaron por el método de HPLC (Hernández-Galán et al., 2017). El área bajo la curva se utilizó como medida de la concentración. Se detectaron tres péptidos en todas las muestras analizadas, con los tiempos de retención 1.556 (péptido 1), 2.342 (péptido 2) y 2.674 (péptido 3) min.

### **8. Evaluación de actividad antioxidante**

Previo al análisis, se descongelaron muestras de suero en baño de agua caliente (60 °C) y se centrifugaron a 5000 r/min por 15 min. Se midió la capacidad antioxidante por medio de los métodos ABTS y DPPH (Parra-Ocampo et al., 2020) con algunas modificaciones. En el primer caso, se preparó una solución 2.45 mM del radical ABTS (Sigma-Aldrich), usando una solución de persulfato de potasio 2.45 mM (Sigma-Aldrich, EUA). Todas las muestras se analizaron por triplicado usando un espectrofotómetro de absorbancia de microplacas xMark™ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Japón). Los resultados se reportaron como % de decoloración.

### **9. Análisis estadístico**

Los datos se analizaron con el software Statistica 14.0.015 (TIBCO Software, Inc.). Se aplicaron los

análisis de varianza (ANOVA), el coeficiente de correlación de Pearson y se realizó un análisis discriminante (GDA) para estudiar el efecto de los factores sobre las diferentes variables de respuesta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Análisis de varianza (ANOVA)

De acuerdo con los resultados del análisis, la temperatura tuvo un efecto significativo sobre la biomasa ( $p = 0.000$ ), el pH ( $p = 0.000$ ), la capacidad antioxidante (DPPH) ( $p = 0.000$ ) y la concentración de ácido láctico ( $p = 0.000$ ), lactosa ( $p = 0.000$ ) y de péptido 1 ( $p = 0.037$ ). La producción de ácido láctico, péptido 1 y capacidad antioxidante fueron mayores a 35 °C, con 5.75 g/l, 42,181.8 mAU·s y 39.8%, respectivamente. Esto se relacionó a una posible desintegración de la matriz de polisacárido que rodea los granos de kéfir (kefirán), lo que produjo gránulos de menor tamaño y aumentó la interacción microorganismo-sustrato (Gorek & Peàr, 2016).

Por otro lado, los factores de tiempo y concentración de inóculo aumentaron significativamente la biomasa ( $p < 0.001$ ), la concentración de ácido láctico ( $p < 0.01$ ), péptido 1 ( $p < 0.05$ ) y la capacidad antioxidante

(DPPH) ( $p < 0.01$ ), con valores máximos a las 72 h de fermentación y 1.5 g de granos de kéfir/100 ml de suero. No se observaron diferencias significativas en el contenido de lactosa, por lo que se asume que otros compuestos fueron utilizados como fuente de carbono durante la fermentación, tal es el caso del glicomacropéptido de caseína o el kefirán (Magalhães-Guedes et al., 2011; Nejati et al., 2020).

La actividad antioxidante por ABTS presentó diferencias significativas para las interacciones temperatura-tiempo ( $p = 0.001$ ) y concentración de inóculo-tiempo ( $p = 0.035$ ), obteniendo un porcentaje máximo de decoloración de 37.85% y 35.27%, respectivamente. Estos valores fueron ligeramente diferentes a los obtenidos en el suero sin fermentar (36.78 %), lo que se atribuyó a un efecto amortiguador de las proteínas del suero, manteniendo una estructura estable en medio ácido (M'hir et al., 2019).

En este estudio no se encontraron diferencias significativas para la concentración de ácido propiónico y los péptidos 2 y 3, por lo que su concentración se mantuvo sin cambios considerables durante el proceso de fermentación.

## 2. Correlación

El valor de pH correlacionó significativamente ( $p < 0.001$ ) con la concentración de ácido láctico (-0.917), péptido 1 (-0.620) y la actividad antioxidante por DPPH (-0.866). Los coeficientes negativos indican que estas variables incrementaron conforme el pH del medio disminuyó. A su vez, el contenido de ácido láctico tuvo una correlación positiva ( $p < 0.01$ ) con el ácido propiónico (0.451), el péptido 1 (0.644) y la actividad antioxidante (0.732). De forma similar, Şanlıdere Aloglu y Öner, (2011) observaron un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) de la actividad antioxidante y proteolítica con la disminución del pH. Una mayor actividad proteolítica produciría péptidos de bajo peso molecular, los cuales suelen exhibir actividad antioxidante (Hernández-Galán et al., 2017).

Por su parte, los péptidos 2 y 3 establecieron una correlación positiva ( $P < 0.01$ ), donde su concentración aumenta o disminuye de manera simultánea, sugiriendo que proceden de la misma fuente (proteína).

Finalmente, se encontró una correlación negativa ( $p < 0.5$ ) entre la actividad antioxidante por los métodos de DPPH y ABTS (-0.348), lo que podría relacionarse con

la degradación de proteínas en el suero (exhibiendo capacidad antioxidante por ABTS), formando péptidos con actividad captadora del radical DPPH (péptido 1).

## 3. Análisis discriminante

Las variables que permitieron discriminar o diferenciar las muestras por grupos se seleccionaron por medio del análisis discriminante (GDA). Se logró una clasificación del 100% de las muestras en dos grupos (25 y 35 °C) con las variables pH y biomasa para la temperatura. Mientras la concentración de ácido láctico, ácido propiónico, la biomasa y la actividad antioxidante (DPPH), clasificaron correctamente el 91.66% de los casos de acuerdo con el tiempo de fermentación en tres grupos (24, 48 y 72 h), la clasificación incorrecta (8.34%) indica que algunas muestras son similares. Por último, el 97.22% de las muestras se agruparon por las variables biomasa, pH, péptido 1 y actividad antioxidante, mostrando diferencias para los doce tratamientos.

## CONCLUSIONES

La temperatura, el tamaño de inóculo y el tiempo afectan significativamente las características del producto final. La fermentación del suero a 35 °C por

72 h con una concentración de inóculo de 1.5 g de granos de kéfir/100 ml de suero producen una mayor cantidad de ácido láctico, péptidos y actividad antioxidante. El suero es un sustrato potencial para la producción de bebidas con propiedades nutricionales y antioxidantes.

### REFERENCIAS

- Azi, F., Tu, C., Rasheed, H. A., & Dong, M. (2020). Comparative study of the phenolics, antioxidant and metagenomic composition of novel soy whey-based beverages produced using three different water kefir microbiota. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(4), 1689-1697. doi:10.1111/ijfs.14439
- Caballero, A., Caballero, P., León, F., Rodríguez-Morgado, B., Martín, L., Parrado, J., . . . Ramos-Martín, A. (2021). Conversion of Whey into Value-Added Products through Fermentation and Membrane Fractionation. *Water*, 13(12). doi:10.3390/w13121623
- Cervantes-Escoto, F., Islas-Moreno, A., & Camacho-Vera, J. H. (2019). Innovando la quesería tradicional mexicana sin perder artesanidad y genuinidad. *Estudios sociales. Revista de alimentación contemporánea y desarrollo regional*, 29.
- Dertli, E., & Çon, A. H. (2017). Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 151-157. doi:10.1016/j.lwt.2017.07.017
- Gorek, A., & Peèar, D. (2016). Propagation of Natural Starter Culture in Whey: Optimization and Kinetic Study. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 481-486. doi:10.3303/CET1649081
- Hernández-Galán, L., Cardador-Martínez, A., López-del-Castillo, M., Picque, D., Spinnler, H. E., & Martín del Campo, S. T. (2017). Antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fresh goat cheese prepared without starter culture: a preliminary study. *CyTA - Journal of Food*, 15(1), 49-57. doi:10.1080/19476337.2016.1202325
- Leclercq-Perlat, M.-N., Oumer, A., Bergere, J.-L., Spinnler, H.-E., & Corrieu, G. (1999). Growth of *Debaryomyces hansenii* on a bacterial

- surface-ripened soft cheese. *Journal of Dairy Research*, 66(2), 271-281.  
doi:10.1017/S0022029999003362
- M'hir, S., Rtibi, K., Mejri, A., Ziadi, M., Aloui, H., Hamdi, M., & Ayed, L. (2019). Development of a Novel Whey Date Beverage Fermented with Kefir Grains Using Response Surface Methodology. *Journal of Chemistry*, 2019, 1218058. doi:10.1155/2019/1218058
- Magalhães-Guedes, K., Dias, D., Pereira, G., Oliveira, J., Domingues, L., Teixeira, J., . . . Schwan, R. (2011). Chemical composition and sensory analysis of cheese whey-based beverages using kefir grains as starter culture. *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 871-878. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02570.x
- Nejati, F., Junne, S., & Neubauer, P. (2020). A Big World in Small Grain: A Review of Natural Milk Kefir Starters. *Microorganisms*, 8(2), 192. doi:10.3390/microorganisms8020192
- OECD, & Food Agriculture Organization of the United Nations. (2020). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029*.
- Osorio-González, C. S., Sandoval-Salas, F., Hernández-Rosas, F., Hidalgo-Contreras, J. V., Gómez-Merino, F. C., & Ávalos de la Cruz, D. A. (2018). Potencial de aprovechamiento del suero de queso en México. *Agroproductividad*, 11, 101-106.
- Parra-Ocampo, K. A., Martín-Del-Campo, S. T., Montejano-Gaitán, J. G., Zárraga-Alcántar, R., & Cardador-Martínez, A. (2020). Evaluation of Biological, Textural, and Physicochemical Parameters of Panela Cheese Added with Probiotics. *Foods*, 9(10). doi:10.3390/foods9101507
- Rama, G. R., Kuhn, D., Beux, S., Maciel, M. J., & Volken de Souza, C. F. (2019). Potential applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. *International Dairy Journal*, 98, 25-37. doi:10.1016/j.idairyj.2019.06.012

Sabokbar, N., & Khodaiyan, F. (2016). Total phenolic content and antioxidant activities of pomegranate juice and whey based novel beverage fermented by kefir grains. *Journal of Food Science and Technol*, 53(1), 739-747.  
doi:10.1007/s13197-015-2029-3

Şanlıdere Aloğlu, H., & Öner, Z. (2011). Determination of antioxidant activity of bioactive peptide fractions obtained from yogurt. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5305-5314.  
doi:10.3168/jds.2011-4285

Settanni, L., Cruciata, M., Guarcello, R., Francesca, N., Moschetti, G., La Carrubba, V., & Gaglio, R. (2020). Valorisation of Dairy Wastes Through Kefir Grain Production. *Waste and Biomass Valorization*, 11(8), 3979-3985.  
doi:10.1007/s12649-019-00718-6