

# Obtención de Ácido Láctico por Fermentación de Lactosuero empleando Bacterias Ácido Lácticas aisladas de la Región Centro del País

Paula C. Garnero<sup>(1)</sup>, Romina Daniele<sup>(1)</sup>, Victoria Zanazzo<sup>(1)</sup>, Paola Chiappero<sup>(1)</sup> y Verónica V. Nicolau<sup>(1,2)</sup>

UTN Facultad Regional San Francisco, pgarnero@gmail.com

<sup>(1)</sup>GPol (UTN San Francisco), Av. De la Universidad 501, (2400) San Francisco, Córdoba, Argentina.

<sup>(2)</sup>INTEC (UNL-CONICET), Güemes 3450, (3000) Santa Fe, Argentina.

**Resumen**—La explotación de los desechos industriales se aprecia por el cuidado del medioambiente y por el ahorro económico. En este sentido, el lactosuero resulta atractivo para producir ácido poliláctico, pero su bajo rendimiento en ácido láctico limita su uso. El objetivo de este trabajo ha sido seleccionar cepas de bacterias ácido lácticas con buena capacidad acidificante para ser empleadas en la producción de ácido láctico a partir de lactosuero. En esta primera etapa, se aislaron 35 cepas de bacterias ácido lácticas obtenidas de 5 muestras de suero y 2 muestras de leche cruda de la Región Centro de nuestro país. Las cepas resultaron, en su mayoría, mesófilas y homofermentantes, y las seleccionadas fueron las denominadas SM1, R3 y L1c3 (lactococos) y M3 y L4c2 (lactobacilos). Los lactococos resultaron más rápidos para acidificar que los lactobacilos, con una disminución de pH y una producción de ácido a las 48 h de 2,5 unidades y 1 g/L, y 1,6 unidades y 0,7 g/L, respectivamente. La cepa L4c2 se usó como inóculo para la obtención de ácido láctico por fermentación de lactosuero con un rendimiento aproximado del 50%.

**Palabras clave**—Lactosuero, Capacidad acidificante, Aislados de bacterias lácticas, Ácido poliláctico.

## I. INTRODUCCIÓN

Una de las estrategias utilizadas para abaratar los costos de producción de ácido poliláctico es emplear como materia prima desechos agrícolas o suero de quesería, subproductos que son abundantes en nuestro país. El suero es el subproducto más abundante de las industrias lácteas y es fuente inagotable de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) capaces de fermentar la lactosa presente a ácido láctico.

La vía biotecnológica es indispensable para producir ácido láctico ópticamente puro [1]. Panesar *et al.* (2010) [2] y García *et al.* (2013) [3] obtuvieron ácido L(+) láctico por fermentación de suero de quesería empleando *Lactobacillus casei*. De manera similar, Schepers *et al.* (2004) [4] y Urribarrí *et al.* (2006) [5] obtuvieron el par racémico del ácido láctico a partir de *Lactobacillus helveticus* en procesos en 2 etapas y continuo, respectivamente. Sin embargo, los bajos rendimientos de ácido láctico empleando lactosuero hacen necesario buscar nuevos microorganismos que posean buena capacidad acidificante y mayor resistencia a las condiciones de fermentación [6]. Además, la utilización de cultivos lácticos comerciales en sustitución de la microbiota autóctona podría llevar a la pérdida de las cepas nativas a largo plazo [7].

Existen numerosos trabajos que involucran el aislamiento, identificación y caracterización de BAL provenientes de quesos y otros productos lácteos para ser empleados como cultivos iniciadores y mejorar las características de los productos [8]- [15]. Por otra parte, Mondragón *et al.* (2006) [16] aislaron e identificaron BAL a partir de leche agria, con el objeto de emplearlas en la producción de biomasa utilizando lactosuero como sustrato. De manera similar Sánchez *et al.* (2007) [17] emplearon una fermentación extractiva para la producción y separación de ácido láctico, usando lactosuero como sustrato y *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* como inóculo. Hasta el momento no se han encontrado en la literatura trabajos sobre el aislamiento de BAL y su posterior empleo en la producción de APL.

En esta primera etapa de la investigación se aislaron, purificaron y conservaron 25 cepas de BAL obtenidas de 5 muestras de sueros frescos provenientes de la elaboración de quesos cremosos y 10 cepas obtenidas de 2 muestras de leche cruda de la región Centro del país. Además se seleccionaron 5 cepas de interés tecnológico, por ser las que demostraron tener la mejor capacidad acidificante. Una de las cepas seleccionadas se usó como inóculo en la obtención de ácido láctico por fermentación de lactosuero. El ácido láctico será empleado, en la segunda etapa de la investigación, para la síntesis de APL.

## II. METODOLOGÍA

### A. Materiales

Agar y caldo Man Rogosa Sharpe (MRS), Caldo MRS, peptona de Carne, leche en polvo descremada con un contenido de carbohidratos de 52 g/L (La Serenísima), suero en polvo (Santa María) con un contenido de lactosa de 80 g/L, soluciones de NaOH 1 N y NaOH 0.1N, solución de HCl 0.1 N, y Kit de Gram, ácido fosfórico 50% p/p, hidróxido de amonio 28% p/p, extracto de levadura, triptona y Tween 80 como antiespumante.

Para la reconstitución de la leche se preparó una solución de 100 g/L con agua destilada y se esterilizó a vapor fluyente durante 30 minutos.

### B. Aislamiento, purificación, identificación y conservación de los cultivos puros

Se tomaron 50 ml de la producción del día de las correspondientes muestras de suero y leche cruda en envases recolectores estériles. Las muestras fueron

refrigeradas y conservadas a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso (dentro de las 24 h luego de la toma de muestra). Se aislaron, purificaron y conservaron 5 cepas de BAL obtenidas de cada muestra. Las muestras de sueros frescos provenientes de la elaboración de quesos cremosos, fueron suministradas por las empresas Santa María (San Francisco, Córdoba, Argentina), Ramolac (Ramona, Santa Fe, Argentina), Manfrey (Freyre, Córdoba, Argentina), Don Silvano (Josefina, Santa Fe, Argentina), y Sancor (Devoto, Córdoba, Argentina) mientras que las correspondientes a leche cruda fueron provistas por 2 tambos de las localidades de San Bartolo y Freyre de la provincia de Córdoba.

La metodología empleada para el aislamiento, purificación, identificación y conservación de las BAL a partir de cada muestra se plasma en la Fig. 1.

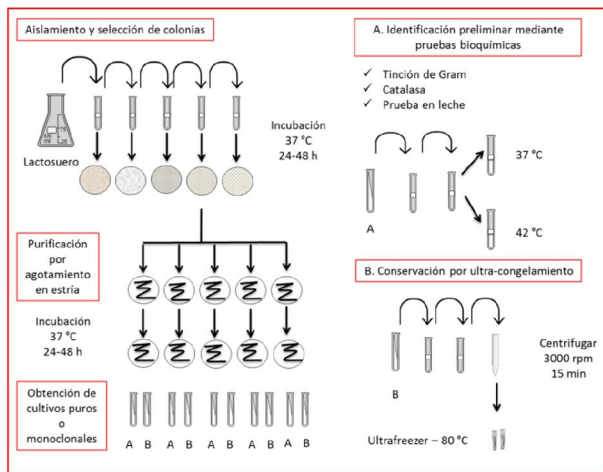


Fig. 1: Metodología de obtención de los aislados de BAL (aislamiento, purificación, obtención de los cultivos puros, identificación preliminar y conservación).

Para el aislamiento se prepararon diluciones seriadas  $1/10$  ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) en agua peptonada ( $1\text{ g/L}$ ) y se sembraron  $1\text{ ml}$  de cada una de ellas en profundidad en Agar MRS, incubándolas durante 24-48 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se escogieron 5 colonias puntiformes, blancas o translúcidas, que se sometieron a una doble purificación mediante la técnica de siembra en estrías en placas de Agar MRS. A partir de cada una de las cepas purificadas se realizaron resiembras en tubos con Agar MRS distribuido en forma de picos de flauta, que se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 h a fin de obtener cultivos puros o monoclonales para los ensayos posteriores. La generación de gas, puesta de manifiesto por el desplazamiento del medio agarizado hacia arriba dentro del tubo de ensayo, permitió reconocer el comportamiento metabólico heterofermentante.

Las pruebas bioquímicas realizadas constituyeron un primer paso para la identificación preliminar de los aislados como pertenecientes al grupo de las BAL. Estos ensayos fueron los siguientes: tinción de Gram, prueba de la catalasa (es característico de las BAL ser aerotolerantes y catalasa negativas) y prueba de propagación de los aislados en leche a  $37$  y  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , determinando así su carácter de mesófilas o termófilas.

Para la preparación del inóculo de la prueba de propagación en leche se tomó material celular con ansa ojal de las estrías de los tubos en pico de flauta A y se realizaron dos resiembras consecutivas en  $10\text{ ml}$  de Caldo MRS, las cuales fueron incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Luego se sembraron 2 tubos de ensayo conteniendo  $10\text{ ml}$  de leche estéril con  $1$

$\text{ml}$  de inóculo y se incubaron a  $37$  y  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 24-48 h. Las BAL mesófilas se caracterizaron por la rápida formación de un coágulo que lució más definido en el tubo a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , en comparación con el formado a  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , observándose lo opuesto para las BAL termófilas.

Para la conservación se tomó material de las colonias del tubo en pico de flauta B y se realizaron 2 resiembras consecutivas en  $10\text{ ml}$  de Caldo MRS, incubando a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 y 12 h. Luego se centrifugó el último cultivo ( $12\text{ h}$ ) a  $3000\text{ rpm}$  durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se re-suspendió el sedimento en  $5\text{ ml}$  de Caldo MRS con el agregado de un  $15\%$  (v/v) de glicerol. Estas suspensiones celulares concentradas se distribuyeron en crioviales para su conservación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### C. Selección de cepas con mayor capacidad acidificante

Se seleccionaron 5 cepas (de las 35) con mayor capacidad acidificante y resistencia a la acidez producida, que al mismo tiempo demostraron mayor rapidez en la disminución de pH. Para la preparación del inóculo se sembró  $1\text{ ml}$  de los conservados en  $10\text{ ml}$  de Caldo MRS, se incubó a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 h y luego se realizó una resiembra en las mismas condiciones. Para cada una de las cepas se inocularon 6 frascos con  $100\text{ ml}$  de leche estéril con  $1\text{ ml}$  de inóculo, el que poseía una concentración celular comprendida entre  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9\text{ ufc/ml}$ . Se midió la acidez titulable y el valor de pH a las 0, 8, 24 y 48 h de incubación a  $37$  y  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se empleó un pHmetro marca HANNA y un electrodo HI 8424 para medir el pH. Para la medición de acidez se titularon  $10\text{ ml}$  de muestra con  $\text{NaOH } 0,1\text{ N}$ , utilizando fenolftaleína como indicador.

### D. Fermentación Láctica

Para la fermentación se empleó un fermentador de vidrio de  $1\text{ L}$  con tapa de acero inoxidable equipado con agitador mecánico, termómetro digital, manómetro, calefacción externa mediante recirculación de agua proveniente de un baño termostático, controlador de pH, y reservorio con solución de hidróxido de amonio  $28\%$  p/p para la corrección de pH mediante apertura de válvula solenoide (Fig. 2).

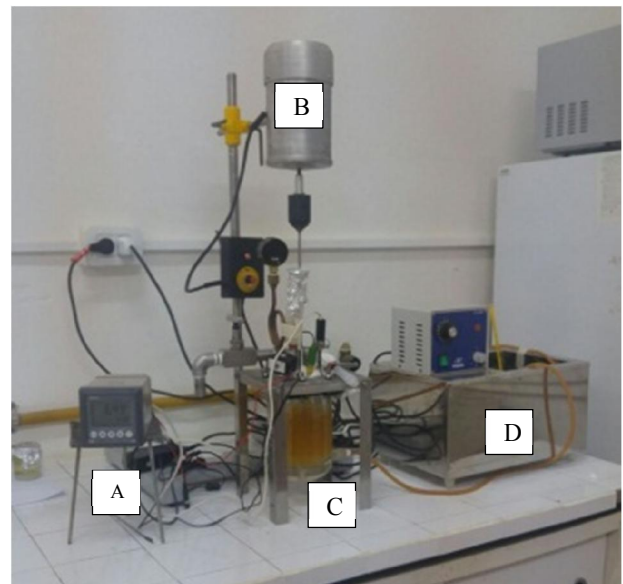


Fig. 2: Foto que muestra el sistema de fermentación (A: controlador de pH, B: agitador mecánico, C: fermentador, y D: baño termostático)

**Preparación del mosto:** Se preparó una solución con un contenido de lactosa de 4,5% a partir de 56 g de suero en polvo y 800 ml de agua destilada en un frasco autoclavable de 1L. El pH se ajustó a pH=4,25 con una solución de ácido fosfórico 50% (por debajo del punto isoelectrico de las proteínas), y se esterilizó a vapor fluente. Las proteínas precipitadas se separaron por filtración al vacío. El suero desproteneizado se enriqueció con extracto de levadura (20 g/l) y triptona (10 g/l) como fuente de nitrógeno y se adicionó 1 g/l de Tween 80 como antiespumante. Finalmente se ajustó a pH=6 con solución de NaOH 1 N.

**Reactivación del microorganismo y preparación del inóculo:** 1 ml del conservado de una de las 5 cepas seleccionadas se sembró en 10 ml de Caldo MRS, se incubó a 37 °C durante 24 h y luego se realizó una resiembra en las mismas condiciones. Este precultivo se sembró en 100 ml de mosto y se incubó a 37 °C durante 24 h.

**Condiciones de fermentación:** se trabajó a 37 °C y pH=6 por un período de 24 h. El avance de la fermentación se siguió por titulación de la lactosa mediante la técnica de Felhing, Causse y Bonnans (FCB). Al final de la fermentación las células se inactivaron por tratamiento térmico a 100 °C durante 30 min.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los aislados de BAL mostraron morfología y formas de agrupación variadas tales como cadenas cortas, en pares o agrupación irregular y en su mayoría resultaron ser mesófilos y homofermentantes. Todos los aislados mostraron ser Gram positivos, catalasa negativos y aerotolerantes.

Las BAL con mayor capacidad acidificante y resistencia a la acidez producida, que al mismo tiempo demostraron mayor rapidez en la disminución de pH, resultaron ser las cepas denominadas SM1, R3 y L1c3 (lactococos) y M3 y L4c2 (lactobacilos). Los lactococos resultaron más rápidos para acidificar que los lactobacilos, con una disminución de pH y una producción de ácido de 2,5 unidades y 1 g/L, y 1,6 unidades y 0,7 g/L, respectivamente.

En la Figura 3 se detallan las evoluciones de pH y acidez titulable para la cepa empleada en la fermentación (L4c2).

En relación a la fermentación, en la Fig. 4 se muestra la evolución de lactosa donde se observa una conversión final de aproximadamente 50%. Este resultado es bueno y es comparable con los reportados en la literatura [11] y [17].

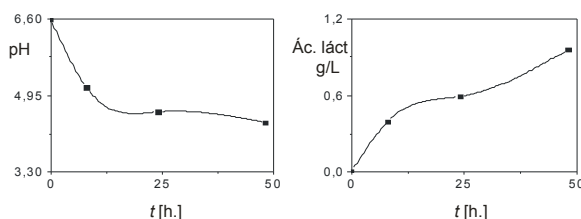


Fig. 3. Evolución del pH y de acidez del aislado seleccionado L4c2.

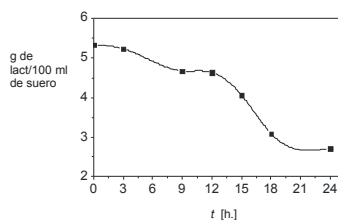


Fig. 4. Evolución de lactosa durante la fermentación empleando el aislado seleccionado L4c2.

### IV. CONCLUSIONES

Se aislaron, purificaron y conservaron 35 cepas de BAL presentes en 5 muestras de lactosuero y 2 muestras de leche cruda de 7 empresas de la región Centro del país, y se seleccionaron 5 cepas que revelaron buena capacidad acidificante. Una de las cepas seleccionadas se empleó para la obtención de ácido láctico por fermentación de lactosuero con un rendimiento aceptable aproximado del 50 %. Esto permite concluir que la microbiota presente en leches y lactosueros de la región centro del país es una potencial fuente de cepas con características tecnológicas interesantes.

Las cepas seleccionadas por su mayor capacidad de producción de ácido láctico se caracterizarán taxonómicamente aplicando técnicas bioquímicas, y se emplearán para la posterior obtención de APL.

### AGRADECIMIENTOS

A U.T.N, CONICET, y SeCYT por el financiamiento.

### REFERENCIAS

- [1] T. Ghaffar, M. Irshad, Z. Anwar, T. Agil, Z. Zulifqar, A. Tariq, M. Kamran, N. Ehsan, S. Mehmoo, "Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification", *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, vol. 30, pp. 1-8, 2014.
- [2] P. Panesar, J. Kennedy, C. Knill, M. Kosseva, "Production of L(+) Lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey", *Brazilian Archives of Biology And Technology*, vol. 53, pp. 219-226, 2010.
- [3] C. García, G. Arrázola, M. Villalba, "Producción de Ácido Láctico de lactosuero suplementado utilizando *Lactobacillus casei*", *Biocología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, vol. 11, pp. 136-143, 2013.
- [4] A. Schepers, J. Thibault, C. Lacroix, "Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process: Model and experiments", *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 38, pp. 324-337, 2006.
- [5] L. Urribarrí, A. Vielma, G. Paéz, J. Ferrer, Z. Mármol, E. Ramones, "Producción de ácido láctico a partir de suero de leche, utilizando *Lactobacillus helveticus* en cultivo continuo", *Revista Científica. Universidad de Zulia*, vol. 14, pp. 1-11, 2006.
- [6] Y. Wang, Y. Tashiro, K. Sonomoto, "Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 20, pp. 1-9, 2014.
- [7] J. Gonzalez, M. Mas, R. Tabla, J. Moriche, I. Roa, J. Rebollo, P. Cáceres, "Autochthonous starter effect on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of Ibore goat's milk cheeses", *INRA, EDP Sciences*, vol. 83, pp. 193-202, 2003.
- [8] T. Cohan, M. Barbosa, E. Beuviel, B. Bianchi-Salvadori, P. Cocconcelli, I. Fernandes, J. Gomez, R. Gomez, G. Kalantzopoulos, A. Ledda, M. Medina, M. Rea, E. Rodriguez, "Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products", *Journal of Dairy Research*, vol. 64, pp. 409-421, 1997.
- [9] G. Villanueva, "Tesis: Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyaca)" *Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia*, 2007.
- [10] C. Alvarado Rivas, Z. Chacón Rueda, J. Otoniel Rojas, B. Guerrero Cárdenas, G. López Corcuera, "Aislamiento, Identificación y Caracterización de Bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal. Su uso como cultivo iniciador", *Revista Científica, FCV-LUZ*, vol. 17, pp. 301-308, 2007.
- [11] B. Ramos-Izquierdo, A. Bucio-Galindo, C. Bautista-Muñoz, E. Aranda-Ibáñez, F. Izquierdo-Reyes, "Aislamiento, Identificación y Caracterización de Bacterias Ácido Lácticas para la elaboración de Queso crema tropical", *Universidad y Ciencia*, vol. 25, pp. 159-171, 2009.

- [12] C. Muyanja, J. Narvhus, J. Treimo, T. Langsrud, "Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 80, pp. 201-210, 2003.
- [13] B. Guessas y M. Kihal, "Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goat's milk", *African Journal of Biotechnology*, vol. 3, pp. 339-342, 2004.
- [14] J. Olivera, "Tesis: Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche. Unidad de Tecnología de Alimentos", *Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay*, 2011.
- [15] I. Latorre Díez, "Tesis: Caracterización Bioquímica y Tecnológica de cepas ácido lácticas aisladas de leche cruda de oveja en el proceso de elaboración de queso artesano de Teruel", *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Teruel, España*, 2011.
- [16] M. Mondragón-Parada, M. Nájera-Martínez, C. Juárez-Ramírez, J. Galíndez-Mayer, N. Ruiz-Ordaz, E. Cristiani-Urbina, "Lactic acid bacteria production from whey", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 134, pp. 223-232, 2006.
- [17] N. Sánchez, D. Ramírez, A. Zapata, "Evaluación de un sistema de Fermentación extractiva para la producción de ácido láctico utilizando suero de leche como sustrato", *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, vol. 14, pp. 27-34, 2007.