

Producción de ácido láctico por fermentación de lactosuero empleando una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* inmovilizada en una matriz polimérica

Lactic acid production by fermentation of whey using a strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* immobilized in a polymeric matrix

Presentación: 26 y 27 de octubre de 2022

Sofía I. Ruiz Miraglio

GPol, Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional San Francisco, Argentina.
sfuizmiraglio@hotmail.com

Rocío Boriglio

GPol, Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional San Francisco, Argentina.
rocioboriglio@gmail.com

Luciana Belmonte

GPol, Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional San Francisco, Argentina.
luciladner@gmail.com

Paola Chiappero

GPol, Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional San Francisco, Argentina.
chiappero.pao@gmail.com

Paula C. Garnero

GPol, Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional San Francisco, Argentina.
pcgarnero@gmail.com

Verónica V. Nicolau

GPol, Universidad Tecnológica Nacional. Facultad Regional San Francisco, Argentina.
vnicolau@santafe-conicet.gov.ar

Resumen

La inmovilización de bacterias en alginato de sodio es una práctica prometedora en los procesos biotecnológicos que permite la reutilización de la biomasa en diferentes ciclos fermentativos. El objetivo de este trabajo es obtener ácido láctico por fermentación de lactosuero empleando una cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* inmovilizada en perlas de alginato de sodio en comparación a una fermentación con células libres. Se determinó la eficiencia de la encapsulación por medición de lactosa y mediante recuento en placa. La productividad volumétrica fue de 0,17 gL⁻¹h⁻¹ y 0,10 gL⁻¹h⁻¹ para el sistema de células libres y el sistema de células encapsuladas, respectivamente.

El empleo de lactosuero, subproducto (o residuo) más abundante de las industrias lácteas, permitirá disminuir los grandes volúmenes desechados y los consecuentes problemas de contaminación para generar un producto de alto valor agregado que no se produce en Argentina.

Palabras clave: ácido láctico, bacterias ácido lácticas, inmovilización, fermentación

Abstract

Immobilization of bacteria in sodium alginate is a promising practice in biotechnological processes that allows the reuse of biomass in different fermentative cycles. The aim of this work is to obtain lactic acid by fermentation of whey using a strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* immobilized on sodium alginate beads. Encapsulation efficiency was determined by lactose measurement and plate count. The volumetric productivity was 0.17 gL⁻¹h⁻¹ and 0.10 gL⁻¹h⁻¹ in the cell-free system and in the encapsulated cell system, respectively. The use of whey, the most abundant by-product (or residue) of the dairy industries, will make it possible to reduce the large volumes discarded and the consequent pollution problems to generate a high value-added product that is not produced in Argentina.

Keywords: lactic acid, lactic acid bacteria, immobilization, fermentation.

Introducción

El ácido láctico (AL) es un ácido carboxílico, con un grupo hidroxilo en el carbono adyacente al grupo carboxilo de fórmula (C₃H₆O₃), este producto químico versátil y de gran valor despierta un creciente interés mundial como precursor del poli(ácido)láctico (PLA).

La vía biotecnológica es indispensable para producir AL ópticamente puro [1]. Las bacterias ácido lácticas (BAL) se encuentran entre los microorganismos más prometedores para la bioconversión de diversos subproductos como es el lactosuero, subproducto más abundante de la industria láctea, generando un producto de alto valor agregado que no se produce en nuestro país y así poder reducir los consecuentes problemas de contaminación.

La inmovilización de bacterias es una práctica prometedora en los procesos biotecnológicos que permite la reutilización de la biomasa en diferentes ciclos fermentativos. Se ha propuesto el uso de BAL inmovilizadas hasta 7 fermentaciones continuas [2]. Además, esta tecnología presenta numerosas ventajas como mayor densidad celular, prevención de la inactivación interfacial, velocidad de reacción y productividad volumétrica [3].

El alginato de sodio es un polisacárido con estructura similar a los hidrogeles solubles en agua y ha sido empleado como matriz para la encapsulación de BAL donde el número de células libres encontradas post fermentación no se vio influenciado por el contenido de alginato [1]

En este trabajo se estudia la obtención de AL a partir de lactosuero y células de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* encapsuladas en alginato de sodio en comparación a una fermentación con células libres. Se evalúa el rendimiento y la eficiencia de la encapsulación por determinación de lactosa y medición del número de células viables empleando la técnica de dilución seriada y recuento en placa.

Desarrollo

Microorganismos

Cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC N° 11842, subespecie de *Lactobacillus* con buena capacidad de producción de AL a partir de lactosuero. BAL homofermentante y productora de L-ácido láctico.

Preparación del medio de fermentación

Se preparó una solución con un contenido de lactosa de 4,4-5% a partir de 56 g de suero en polvo en 800 ml de agua destilada (70 g/l), en un vaso de precipitado. Se separó un volumen equivalente a un 10% del volumen final del suero para la preparación del inóculo y se esterilizó en autoclave.

Reactivación de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Para la reactivación se tomó 1 ml del conservado de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en 10 mL de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) incubando durante 24 - 48 h a 37 °C. Se realizaron resiembras en tubos con Agar MRS, que se incubaron a 37 °C durante 24 - 48 h. (Fig. 1).

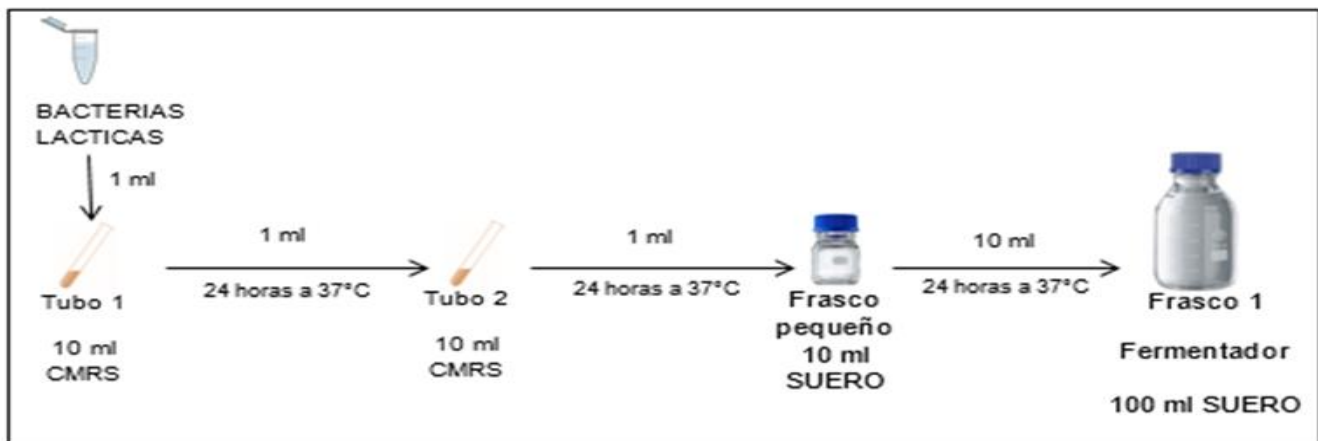


Figura 1. Reactivación de BAL.

Encapsulación de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Para la inmovilización de las BAL se empleó la metodología de encapsulación en perlas de alginato de sodio descrita por Champagne y col. (1992).

Las células se recuperaron por centrifugación a 5000 rpm a lo largo de 10 a 15 min. El precipitado de células se resuspendió en 25 ml de solución al 0,1% de peptona estéril y esta suspensión se adicionó a una solución de alginato de sodio (Tabla 1). La suspensión de células en solución de alginato se adicionó por goteo en una solución 0,1 M de cloruro de calcio (CaCl₂) bajo agitación magnética a 50 rpm y en condiciones de asepsia (Fig. 2).

Volumen de suspensión celular (ml)	Solución de alginato de sodio		Volumen de CaCl ₂ (0.1M) Solución (ml)	Perlas	
	Volumen (ml)	% (peso/volumen)		% alginato	Peso húmedo (g)
10 ml	10 ml	2	250 ml	1,0	4,2

Tabla 1. Síntesis de perlas de alginato.



Figura 2. Encapsulación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en alginato de sodio.

Las perlas fueron recuperadas por inmersión en una solución de etanol 60% durante 2,5 min. a fin de eliminar células libres. Luego se realizaron lavados con solución de peptona 0,1% y fueron conservadas a 4°C (Fig. 3).

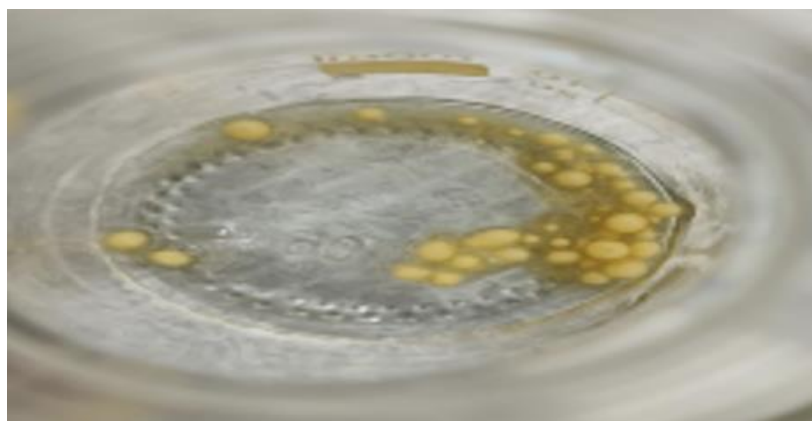


Figura 3. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* inmovilizado en perlas de alginato de sodio.

Fermentación

Se llevaron a cabo 2 fermentaciones en lactosuero desproteinizado a 37 °C durante 24 h empleando células inmovilizadas en comparación a las células libres. Los frascos cerrados se sumergieron en un baño calefactor con agitación (50 rpm).

Métodos analíticos

La concentración de lactosa se determinó por la titulación de lactosa a través de la técnica de Felhing, Causse y Bonnans (FCB).

Los resultados se calcularon empleando la siguiente expresión:

$$\frac{g \text{ de lactosa}}{100 \text{ mL}} = \frac{X \times 100 \times F}{V}$$

donde X es el título del reactivo de FCB, V (mL) es el volumen de la solución desproteinizada gastado en la titulación y F es el factor de dilución (F =10).

Al tratarse de un método no estequiométrico se deben utilizar iguales volúmenes de reactivo FCB, la misma temperatura de calentamiento, concentraciones de azúcar similares, y el mismo tiempo de reacción. Sólo así las determinaciones serán comparables y los análisis reproducibles. La determinación debe efectuarse durante los dos primeros minutos de ebullición. Caso contrario, se cometen errores.

Para la medición de pH se empleó un pHmetro marca HANNA y un electrodo HI 8424.

Para la determinación del número de células viables se utilizó la técnica de dilución seriada y siembra en profundidad en placa. El número total de células viables se expresó como UFC mL⁻¹.

Para la determinación del diámetro de las perlas se empleó el software ImageJ. Se tomaron 5 perlas y se colocaron en una placa de Petri y se tomó una foto de cada una de las perlas. Se programó ImageJ para utilizar una escala real, se midieron los diámetros y se calculó el promedio. Este procedimiento se hizo antes y después de la fermentación.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Resultados y discusión

En ambas fermentaciones se partió de pH 6. Al final de las fermentaciones el pH descendió a pH 4,79 y 3,27 para el sistema con células inmovilizadas y el correspondiente a células libres. La menor producción de ácido observada para el sistema encapsulado sugiere un efecto protector de la matriz de alginato.

Para las células encapsuladas se partió de una concentración inicial celular de 3 x 10⁷ UFC/mL y al final de la fermentación se observó un incremento celular de 2,02 x 10⁹ UFC/mL. Por el contrario, para las células libres se partió de una concentración celular de 1,52 x 10⁹ UFC/mL y al final de la fermentación su concentración disminuyó a 2,2 x 10⁷ UFC/mL. En concordancia con las mediciones de pH estos resultados sugieren una mayor protección de las bacterias encapsuladas, lo que permite su multiplicación celular durante la fermentación y retarda la producción del metabolito.

En la Tabla 2 se muestran las mediciones iniciales y finales de lactosa para ambas fermentaciones. A partir de las mediciones de lactosa se calcularon los rendimientos y productividades. El rendimiento y productividad resultaron

menor para el sistema encapsulado en concordancia con las mediciones finales de pH. Se espera que tiempos mayores de fermentación permitan un mayor desarrollo de AL.

	Células libres	Células inmovilizadas
Lactosa inicial (g/ 10 ml)	6,27	5,43
Lactosa final (g/10 ml)	3,72	4,29
Rendimiento (%)	40,2	21,1
Productividad (gL ⁻¹ h ⁻¹)	0,2	0,1

Tabla 2. Fermentaciones: Rendimiento y Productividad.

El diámetro medio inicial de las perlas fue de $3,40 \pm 0.23$ mm y el final de $3,22 \pm 0.37$ mm observándose estabilidad a las condiciones de fermentación.

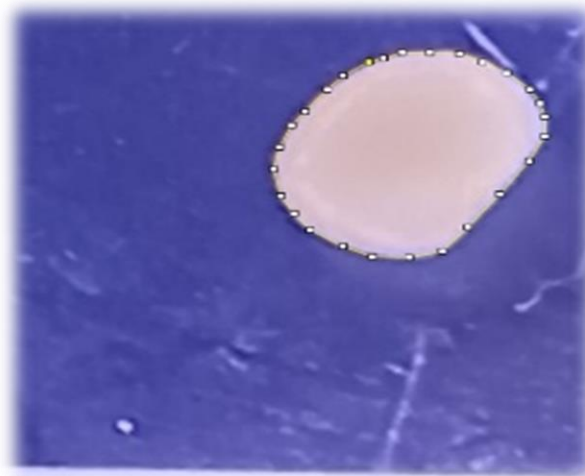


Figura 4. Imagen de una perla. Software Image J.

Conclusiones

Las perlas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* encapsulado en alginato de sodio resultaron estables a las condiciones de fermentación con una disminución del 5,3% en su diámetro medio.

La baja productividad del AL para el sistema encapsulado en comparación al sistema de células libres, así como el elevado valor de pH final y el incremento de células viables sugieren una mayor protección celular que retarda la producción del metabolito.

En trabajos a futuro se evaluarán mayores tiempos de fermentación para los sistemas encapsulados, así como modificaciones en las condiciones y recubrimiento de encapsulación a fin de mejorar el rendimiento y productividad. Se agradece a la UTN por la financiación del proyecto (PID 2020 PATCBSF0008135TC).

Referencias

[1] Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Agil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N., Mehmoo, S. (2014). Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(1), 1-8.

[2] Claude P. Champagne, Christophe Gaudy, Denis Poncelet, Ronald J. Neufeld. (1992). *Lactococcus lactis* Release from Calcium Alginate Beads. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (5),1429-1434.

[3] Radosavljević, M., Lević, S., Belović, M., Pejin, J., Djukić-Vuković, A., Mojović, L., & Nedović, V. (2020). Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in polyvinyl alcohol/calcium alginate matrix for production of lactic acid. *Bioprocess and biosystems engineering*, 43(2), 315-322.