

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO A PARTIR DE LACTOSUERO

Romina Daniele ⁽¹⁾, Victoria Zanazzo ⁽¹⁾, Paula C. Garnero ⁽¹⁾, Verónica V. Nicolau ^(1,2)

⁽¹⁾ GPol, UTN Regional San Francisco, Av. de la Universidad 501, (2400) San Francisco, Córdoba, Argentina.

⁽²⁾ INTEC (UNL-CONICET), Güemes 3450, (3000) Santa Fe, Argentina.

E-mail de contacto: pcgarnero@gmail.com

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 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 25 cepas de bacterias ácido lácticas obtenidas de 5 sueros de la región Centro de nuestro país. Las cepas resultaron, en su mayoría, mesófilas y homofermentantes, y las seleccionadas fueron las denominadas SM3, R3 y J3 (lactococos) y M4 y Sc3 (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 1,7 unidades y 1 g/L, y 1,6 unidades y 0,7 g/L, respectivamente.

Introducción

El ácido poliláctico (APL) es un poliéster termoplástico de origen bacteriano que posee propiedades similares a los plásticos sintéticos derivados del petróleo (poliolefinas y poliestireno), es biodegradable y se produce a partir de sustratos renovables. Actualmente, existen sólo algunas industrias que producen APL a partir de la fermentación de carbohidratos, pero su costo es aún elevado comparado con los plásticos sintéticos tradicionales. Una de las estrategias utilizadas para abaratar los costos 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 (Ghaffar *et al.*, 2014). Panesar *et al.* (2010) y García *et al.* (2013) obtuvieron ácido L(+) láctico por fermentación de suero de quesería empleando *Lactobacillus casei*. De manera similar, Schepers *et al.* (2004) y Urribarrí *et al.* (2006) 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 (Wang *et al.*, 2014). 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 (González *et al.*, 2003).

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 (Coghan *et al.*, 1997; Villanueva, 2007; Alvarado Rivas *et al.*, 2007; Ramos-Izquierdo *et al.*, 2009; Muyanja *et al.*, 2003; Guessas y Kihal, 2004; Olivera, 2011; Latorre Díez, 2011). Por otra parte, Mondragón *et al.* (2006) aislaron e identificaron BAL a partir de leche agria, con el objeto de emplearlas en la producción de biomasa utilizando lactosuero como sustrato. Hasta el momento no se han encontrado en la literatura trabajos sobre el aislamiento de BAL a partir de suero fresco 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 sueros frescos provenientes de la elaboración de quesos cremosos de la región

Centro del país. Además se seleccionaron 5 cepas de interés tecnológico, por ser las que demostraron tener la mejor capacidad acidificante para ser empleadas en la segunda etapa de la investigación, la que involucrará la fermentación de lactosuero y posterior síntesis de APL.

Metodología

Material

Agar Man Rogosa Sharpe (MRS, Biokar), Caldo MRS (Biokar), peptona de Carne (Merck), leche en polvo descremada con un contenido de carbohidratos de 52 g/L (La Serenísima), Solución NaOH 0.1N (Anedra), HCl 0.1 N (Biopack), Kit de Gram (Britania).

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.

Aislamiento, purificación, identificación y conservación

Se tomaron 50 ml de la producción del día de cada suero, en envases recolectores estériles. Las muestras fueron refrigeradas y conservadas a -4 °C hasta el momento de su uso (dentro de las 24 h luego de la toma de muestra). Se aislaron, purificaron y conservaron 25 cepas de BAL [(SM1, SM2, SM3, SM4 y SM5); (R1, R2, R3, R4 y R5); (M1, M2, M3, M4 y M5); (J1, J2, J3, J4, J5); (Sc1, Sc2, Sc3, Sc4, Sc5)] obtenidas de sueros frescos provenientes de la elaboración de quesos cremosos, suministrados 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).

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

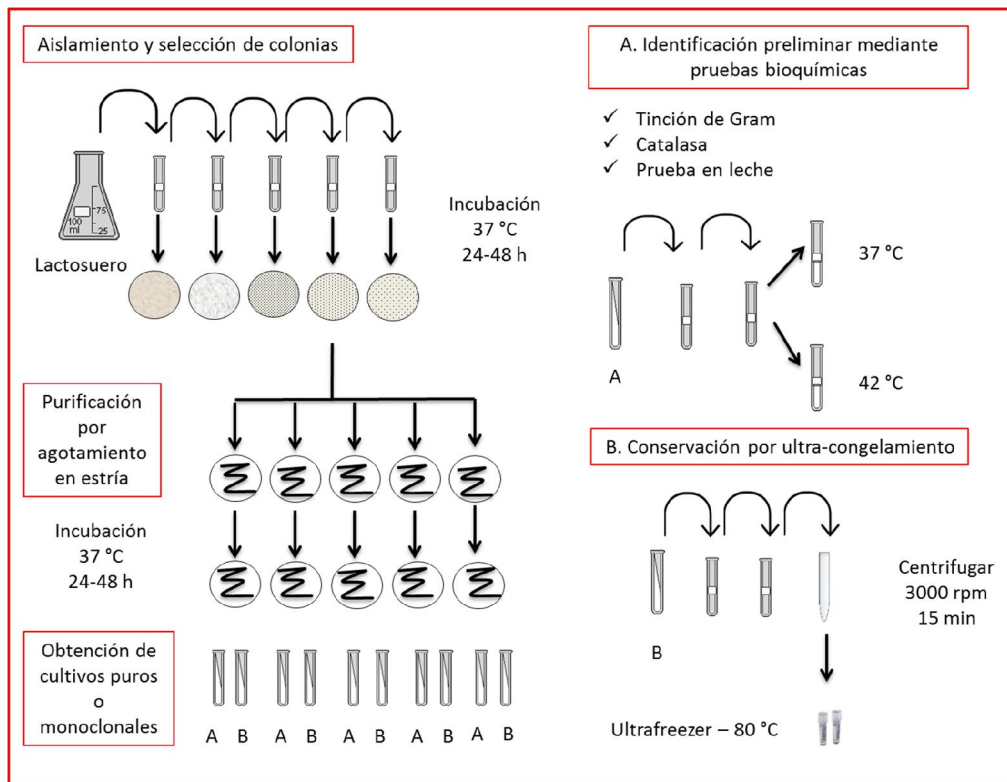


Fig. 1. Metodología de obtención de los aislados de BAL (aislamiento, purificación, obtención de los cultivos puros, identificación preliminar y conservación).

Para el aislamiento se prepararon diluciones seriadas y se sembraron en profundidad en Agar MRS, incubándolas durante 24-48 h a 37 °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 °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 (Fig. 2).



Fig. 2. Fotografía de cultivo puro heterofermentante en tubo con Agar MRS (M4).

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 °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 A y se realizaron dos resiembras consecutivas en 10 ml de Caldo MRS, las cuales fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Luego se sembraron 2 tubos de ensayo conteniendo 10 ml de leche estéril con 1 ml de inóculo y se incubaron a 37 y 42 °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 °C, en comparación con el formado a 42 °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 ml de Caldo MRS, incubando a 37 °C durante 24 y 12 h. Luego se centrifugó el último cultivo (12 h) a 3000 rpm durante 15 minutos, se desechó el sobrenadante y se re-suspendió el sedimento en 5 ml de Caldo MRS con el agregado de un 15% (v/v) de glicerol. Estas suspensiones celulares concentradas se distribuyeron en tubos Eppendorf y en crioviales para su conservación a -80 °C.

Capacidad acidificante

Para la preparación del inóculo se sembró 1 ml de los conservados en tubos Eppendorf en 10 ml de Caldo MRS, se incubó a 37 °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 ml de leche estéril con 1 ml de inóculo, el que poseía una concentración celular comprendida entre 1×10^8 y 1×10^9 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 °C. Se empleó un pHmetro marca HANNA y un electrodo HI 8424 para medir el pH. Para la medición de acidez se titularon 10 ml de muestra con NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

La concentración de ácido láctico, expresada en g/L, se determinó aplicando el siguiente cálculo [ec. (1)]:

$$\text{Ác. láct. (g/L)} = 0,9 \times (V - V_B) \times N \times f \quad (1)$$

donde V, N y f corresponden al volumen gastado en la titulación (ml), a la normalidad y al factor de corrección del NaOH 0,1 N, respectivamente, y V_B al volumen gastado (ml) a tiempo cero.

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la identificación preliminar de los aislados. En la Fig. 3 se detallan las evoluciones de pH y acidez titulable para cada una de las 5 cepas seleccionadas; a 37 y 42 °C.

Tabla 1. Características de los aislados de BAL.

| Cepa | Gram | Morfología | Agrupación | Catalasa | Crecimiento en leche | | Metabolismo fermentativo |
|------|------|-----------------|---------------------------------------|----------|----------------------|-------|--------------------------|
| | | | | | 37 °C | 42 °C | |
| SM | + | Cocos | Cadenas cortas, en pares o en racimos | - | ++ | + | Homofermentante |
| R | + | Cocos | Cadenas cortas, en pares o en racimos | - | ++ | + | Homofermentante |
| M | + | Bacilos cortos | Irregular | - | ++ | + | Hetero y Homofermentante |
| J | + | Cocos | Cadenas cortas, en pares o en racimos | - | + | ++ | Homofermentante |
| Sc | + | Cocos y bacilos | En cadenas y en racimos | - | + | ++ | Homofermentante |

Los aislados de BAL mostraron morfología y formas de agrupación variadas, y en su mayoría resultaron ser mesófilos y homofermentantes (Tabla 1).

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 SM3, R3 y J3 (lactococos) y M4 y Sc3 (lactobacilos). Los lactococos resultaron más rápidos para acidificar que los lactobacilos, con una disminución de pH y una producción de ácido de 1,7 unidades y 1 g/L, y 1,6 unidades y 0,7 g/L, respectivamente.

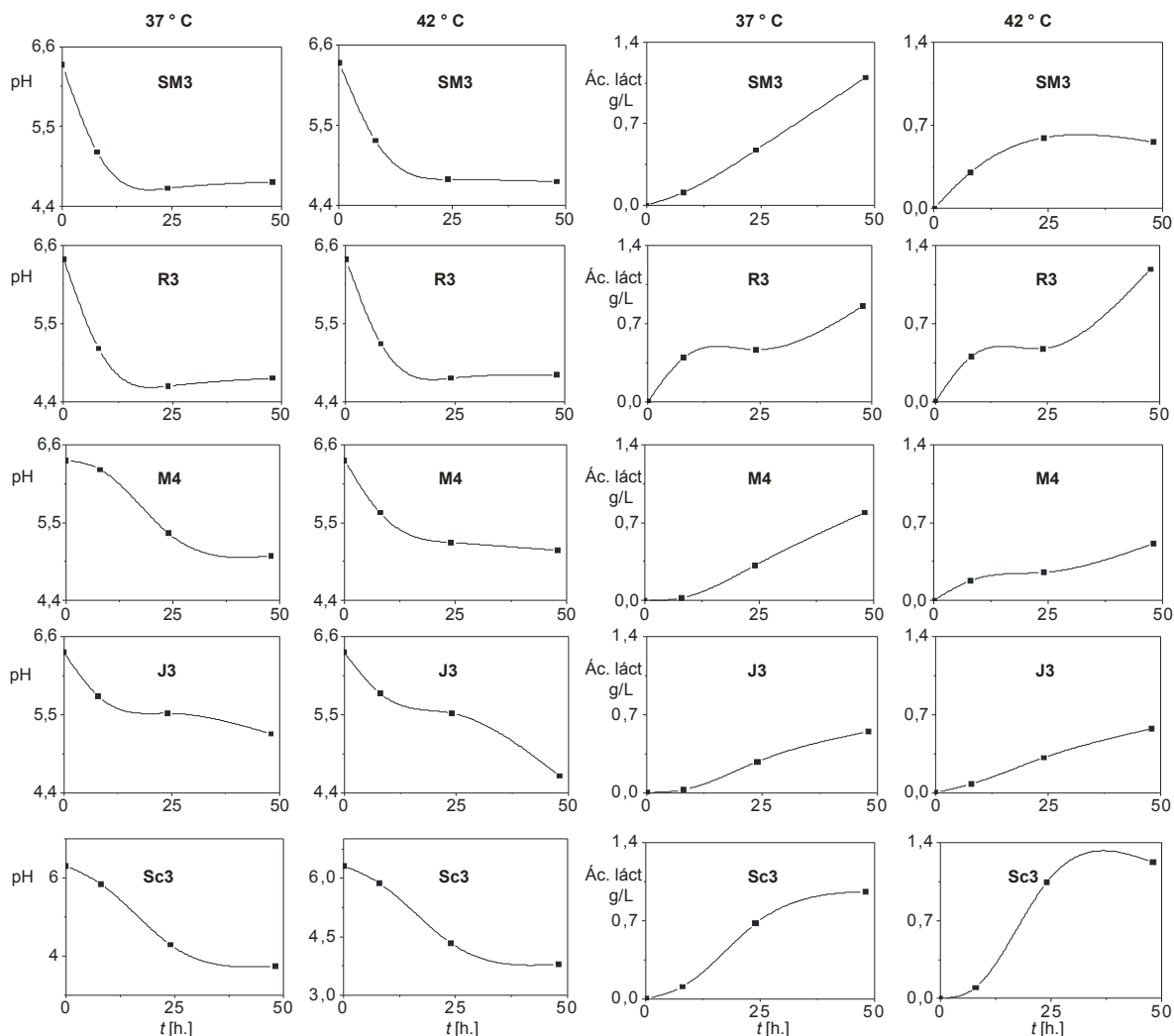


Fig. 3. Evolución del pH y de acidez de los aislados seleccionados de BAL.

Conclusiones

Se aislaron, purificaron y conservaron 25 cepas de BAL presentes en lactosueros provenientes de 5 empresas de la región Centro del país, y se seleccionaron aquellas que revelaron buena capacidad acidificante. Esto permite concluir que la microbiota presente en este efluente de la industria quesera 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 luego para la obtención de ácido láctico a partir de lactosuero y para la posterior obtención de APL.

Agradecimientos

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

Referencias

- Alvarado Rivas, C., Chacón Rueda, Z., Otoniel Rojas, J., Guerrero Cárdenas, B., López Corcuera, G. (2007). *Revista Científica, FCV-LUZ*, 17(3), 301-308.
- Coghan, T., Barbosa, M., Beuviel E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M., Rodriguez, E. (1997). *Journal of Dairy Research*, 64, 409-421.
- García, C., Arrázola, G., Villalba, M. (2013). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 11(1), 136-143.
- Ghaffar, T., Irshad, M., Anwar, Z., Agil, T., Zulifqar, Z., Tariq, A., Kamran, M., Ehsan, N., Mehmoo, S. (2014). *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 7(1), 1-8.
- Gonzalez, J., Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Rebollo, J., Cáceres, P. (2003). *INRA, EDP Sciences*, 83, 193-202.
- Guessas, B., Kihal, M. (2004). *African Journal of Biotechnology*, 3(6), 339-342. Web: <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Latorre Díez, I. (2011). 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.
- Mondragón-Parada, M., Nájera-Martínez, M., Juárez-Ramírez, C., Galíndez-Mayer, J., Ruiz-Ordaz, N., Cristiani-Urbina, E. (2006). 134, 223-232.
- Muyanja, C., Narvhus, J., Treimo, J., Langsrud, T. (2003). *International Journal of Food Microbiology*, 80, 201-210.
- Olivera, J. (2011). 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.
- Panesar, P., Kennedy, J., Knill, C., Kosseva, M. (2010). *Brazilian Archives of Biology And Technology*, 53(1), 219-226.
- Ramos-Izquierdo, B., Bucio-Galindo, A., Bautista-Muñoz, C., Aranda-Ibáñez, E., Izquierdo-Reyes, F. (2009). *Universidad y Ciencia*, 25(2), 159-171. Web: www.ujat.mx/publicaciones/uciencia
- Schepers, A., Thibault, J., Lacroix, C. (2004). *Enzyme and Microbial Technology*, 38, 324-337.
- Urribarrí, L., Vielma, A., Paéz, G., Ferrer, J., Mármol, Z., Ramones, E. (2006). Villanueva, G. (2007). Tesis: Aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belen (Boyaca). Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia.
- Wang, Y., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2014). *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 20(20), 1-9.