

ENCAPSULACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR FERMENTACIÓN DE LACTOSUERO

Soffá I. Ruiz Miraglio ⁽¹⁾, Rocío Boriglio ⁽¹⁾, Luciana Belmonte ⁽¹⁾, Paola Chiappero ⁽¹⁾,
Paula C. Garnero ⁽¹⁾, Verónica V. Nicolau ⁽¹⁾

⁽¹⁾ GPol, UTN, Facultad Regional San Francisco, Av. De la Universidad 501, (2400) San Francisco, Córdoba, Argentina.
e-mail de contacto: pcgarnero@gmail.com

Resumen

La explotación de los desechos industriales se aprecia tanto por el cuidado del medioambiente como por el ahorro económico. El ácido láctico (AL) es un químico versátil y de alto valor con un creciente interés mundial como precursor del poli(ácido láctico) (PLA). En este sentido, el lactosuero resulta atractivo para producir AL.

El objetivo de este trabajo es obtener AL por fermentación de lactosuero empleando una cepa de la especie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* inmovilizada en una matriz polimérica que permita su separación y reutilización al final de la fermentación. La encapsulación de bacterias en alginato de sodio presenta diversas ventajas como mayor densidad celular, velocidad de reacción y productividad volumétrica.

En este trabajo se evaluó el rendimiento de la fermentación discontinua de lactosuero por bacterias de la especie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* encapsuladas en una matriz de alginato de sodio en comparación a células libres. Se determinó la eficiencia de la encapsulación por determinación de lactosa y mediante la medición del número de células viables encapsuladas empleando la técnica de dilución seriada y siembra en profundidad en placa. El rendimiento de la fermentación fue de 40,20% en el sistema de células libres y 21,13% en el sistema de células encapsuladas, y la productividad volumétrica fue de 0,17 gL⁻¹h⁻¹ y 0,10 gL⁻¹h⁻¹; 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 nuestro país.

Palabras clave: encapsulación, fermentación, ácido láctico, bacterias ácido lácticas, lactosuero.

Introducción

El 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 de PLA. El AL es quiral, por lo que se pueden encontrar dos enantiómeros: uno es el dextrógiro ácido D-(+)-láctico o d-ácido láctico (en este caso, el ácido (R)-láctico); el otro es el levógiro ácido L-(-)-láctico o l-ácido láctico (en este caso, ácido (S)-láctico), que es el que tiene importancia biológica.

La vía biotecnológica es indispensable para producir AL ópticamente puro [1]. Las bacterias lácticas 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 la reutilización de bacterias lácticas inmovilizadas para un máximo de 7 fermentaciones [2]. Además, esta tecnología presenta numerosas ventajas como mayor densidad celular, prevención de la inactivación interfacial, velocidad de reacción y productividad volumétrica.

El alginato de sodio es un polisacárido con características similares a los hidrogeles solubles en agua y ha sido empleado como matriz para la encapsulación de bacterias ácido lácticas donde el número de células libres encontradas post fermentación no se vio influenciado por el contenido de alginato [2,3].

En este trabajo se estudia la obtención de AL a partir de lactosuero y células de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* encapsuladas en una matriz de 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 siembra en profundidad en placa.

Materiales y métodos

Microorganismo

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

Materiales

Agar Man Rogosa Sharpe (MRS, Biokar), Caldo MRS (Biokar), Peptona de Carne (Merck), Suero en polvo, Solución NaOH 0.1N (Anedra), ácido fosfórico 50%, Alginato de sodio, Dicloruro de calcio, Citrato de sodio, Extracto de levadura, Triptona, Tween, Etanol. Todos los productos químicos utilizados son de grado analítico y microbiológico.

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 y 800 ml de agua destilada (70 g/l), en un vaso de precipitado. Para la precipitación de proteínas se ajustó a pH 4,25 con una solución de ácido fosfórico 50%, ya que está por debajo del punto isoeléctrico de las proteínas. Luego se trasvasó a un frasco autoclavable de 1L y se esterilizó a vapor fluente con esterilizador de vapor a presión portátil Numak.

Las proteínas precipitadas se separaron por filtración al vacío empleando un embudo Büchner conectado a un kitasato y una bomba de vacío.

El suero desproteínizado 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. Se ajustó a pH 6 con solución de NaOH 1N. Finalmente 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 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Para la reactivación se tomó 1 ml del conservado de la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* empleando micropipeta BOECO Germany y se sembró en 10 mL de caldo 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. Por último, se preparó el precultivo de 10 mL (inóculo) con suero desproteínizado enriquecido de nutrientes para que las bacterias se adapten al medio donde se llevará a cabo la fermentación. Se incubó a 37 °C durante 24 - 48 h. (Fig. 1)

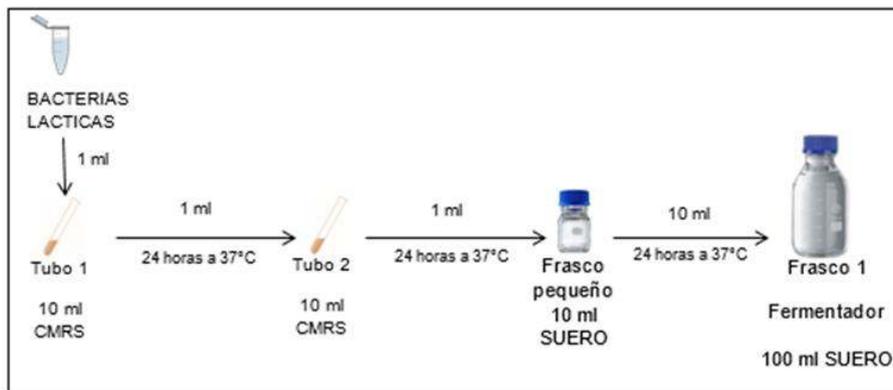


Figura 1. Reactivación de BAL.

Encapsulación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Para la inmovilización de las bacterias ácido lácticas se empleó la metodología de encapsulación en perlas de alginato de sodio descrita por Champagne y col. (1992) [2].

Para la producción de las perlas se sembró el inóculo de 10 mL en 100 ml de caldo MRS y se incubó a 37 °C durante 24 h. 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% solución de peptona estéril, y esta suspensión se adicionó a una solución de alginato [2,3].

La suspensión de células en solución de alginato se adicionó por goteo en una solución 0,1 M de cloruro de calcio (CaCl_2) bajo agitación magnética a 50 rpm y en condiciones de asepsia. Luego de 30 min de fortalecimiento en la solución de cloruro de calcio las perlas fueron recuperadas y lavadas. Las cantidades de alginato de sodio y de cloruro de calcio empleadas para la encapsulación se muestran en la Tabla 1.

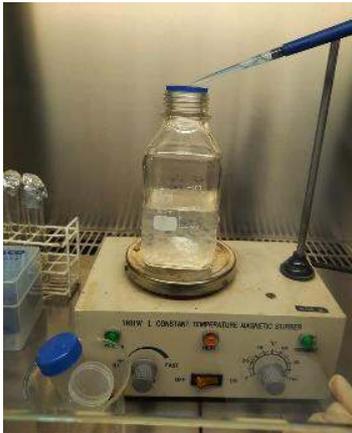
Las perlas fueron recuperadas por inmersión en una solución de etanol 60% durante 2,5 min a fin de eliminar células libres. Luego se realizaron lavados con solución de peptona 0,1% y fueron conservadas a 4°C.

En la Figura 2 se muestran las fotos del sistema empleado para la síntesis de las perlas (a) así como una imagen de las perlas obtenidas (b).

Tabla 1. Síntesis de perlas de alginato.

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

a)



b)

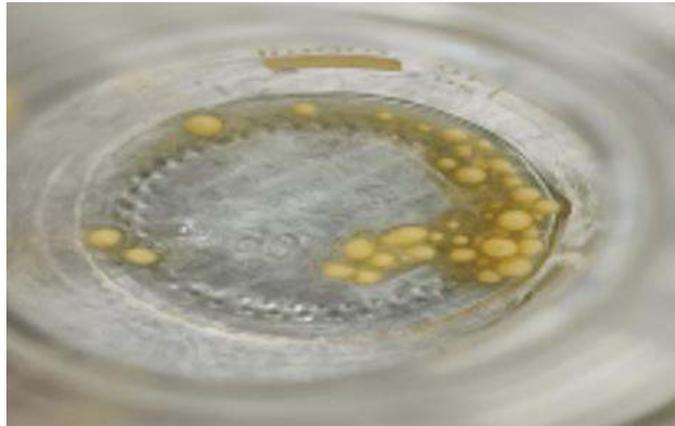


Figura 2. Encapsulación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* en alginato de sodio: a) Síntesis, y b) Perlas.

Fermentación

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



Figura 3. Sistema de fermentación.

Métodos analíticos

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

La muestra desproteinizada se colocó en la bureta de vástago acodado y se procedió a la titulación en ebullición de 15 mL de reactivo de FCB en 50 mL de agua destilada contenidos en un Erlenmeyer de 250 mL empleando azul de metileno como indicador.

Los resultados se calcularon empleando la sig. Expresión [ec. (1)]:

$$\text{g lactosa/100 mL} = \frac{X \times 100 \times F}{V} \quad (1)$$

donde X es el título del reactivo de FCB, V (mL) es el volumen de la solución desproteïnizada gastado en la titulaci3n y F es el factor de diluci3n ($F=10$).

Al tratarse de un m3todo no estequi3mico se deben utilizar iguales vol3menes de reactivo FCB, la misma temperatura de calentamiento, concentraciones de az3car similares, y el mismo tiempo de reacci3n. S3lo as3 las determinaciones ser3n comparables y los an3lisis reproducibles. La determinaci3n debe efectuarse durante los dos primeros minutos de ebullici3n. Caso contrario, se cometen errores.

Para medir el pH se emple3 un pHmetro marca HANNA y un electrodo HI 8424.

Para la determinaci3n del n3mero de c3lulas viables se utiliz3 la t3cnica de diluci3n seriada y siembra en profundidad en placa. El n3mero total de c3lulas viables se expres3 como UFC/mL.

Para la determinaci3n del di3metro de las perlas de las se emple3 el software ImageJ. Se tomaron 5 perlas y se colocaron en una placa de Petri y se tom3 una foto de cada una de las perlas. Se program3 ImageJ para utilizar una escala real, se midieron los di3metros y se calcul3 el promedio. Este procedimiento se hizo antes y despu3s de la fermentaci3n.

Resultados y discusi3n

Para las c3lulas encapsuladas se parti3 de una concentraci3n inicial celular de 3×10^7 UFC/mL y al final de la fermentaci3n se observ3 un incremento celular de $2,02 \times 10^9$ UFC/mL. Por el contrario, para las c3lulas libres se parti3 de una concentraci3n celular de $1,52 \times 10^9$ UFC/mL y al final de la fermentaci3n su concentraci3n disminuy3 a $2,2 \times 10^7$ UFC/mL. Estos resultados sugieren una mayor protecci3n de las bacterias encapsuladas lo que permite su multiplicaci3n celular durante la fermentaci3n y retarda la producci3n del metabolito.

En ambas fermentaciones se parti3 de pH 6. Al final de las fermentaciones el pH descend3 a pH 4,79 y 3,27 para el sistema con c3lulas inmovilizadas y el correspondiente a c3lulas libres. La disminuci3n de pH es consecuencia de la producci3n de AL siendo mayor para el sistema de c3lulas libres. En el sistema encapsulado la protecci3n de las c3psulas permite el crecimiento celular en su interior y retarda la producci3n de AL en concordancia a las mediciones de crecimiento celular.

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 de AL resultaron menor para el sistema encapsulado en concordancia con las mediciones finales de pH.

El di3metro medio inicial de las perlas fue de $3,40 \pm 0,23$ mm y el final de $3,22 \pm 0,37$ mm observ3ndose buena estabilidad a las condiciones de fermentaci3n.

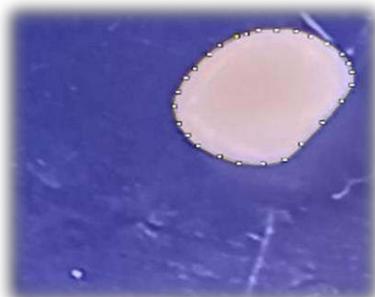


Figura 5. Imagen de una perla. Software Image J.

Tabla 2. Fermentaciones: Rendimiento y Productividad.

	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)	0,17	0,10

Conclusiones

La técnica de encapsulación resulta ser una herramienta prometedora para la obtención biotecnológica de AL.

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.

Agradecimientos

A UTN por el financiamiento (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 "Lactococcus lactis Release from Calcium Alginate Beads". *Applied and environmental microbiology*, vol. 58, no. 5, p. 1429-1434, may 1992. (Received 12 November 1991/Accepted 10 February 1992)
- [3] Kowalska, E., Ziarno, M., Ekielski, A., & Żelaziński, T. (2022). Materials Used for the Microencapsulation of Probiotic Bacteria in the Food Industry. *Molecules*, 27(10), 3321.