

ESTUDIO DEL METABOLISMO DEL GLICEROL EN BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

EmilianoCian¹

¹ *Departamento de Medio Ambiente.Fac. de Ingeniería y Cs. Hídricas (FICH-UNL).
Estudiante de Lic. en Biotecnología (FBCB-UNL).
emilianocian@gmail.com*

Área: Ciencias Biológicas
Sub-Área: Biotecnología
Grupo: X

Palabras clave: Ácido L-láctico, Bacterias Acido lácticas, Glicerol.

INTRODUCCIÓN

El ácido L-láctico es el AHA (α -Hidroxi Ácido) más importante desde el punto de vista industrial, debido a la variedad de aplicaciones que tiene, destacándose su empleo en la industria alimenticia, cosmética, química, de plásticos y farmacéutica. En la última década su producción se vio incrementada debido a su empleo en medicina como precursor de polímeros biodegradables y biocompatibles utilizados en prótesis e implantes. Alrededor del 40% del costo global del proceso es debido al costo de la materia prima empleada para la obtención de ácido láctico (glucosa y sacarosa, principalmente).

Por otro lado, el glicerol es el principal subproducto de la producción de biodiesel (Yazdani y González 2007; Myint y El-Halwagi 2009), por lo que es un sustrato abundante y de bajo costo. Es por este motivo que ha recibido un renovado interés como potencial sustrato para la producción de biomasa y compuestos de alto valor agregado a través de las vías de oxidación y reducción disponibles en diferentes microorganismos.

Estudios previos realizados por el Grupo de Trabajo han demostrado que la fermentación "batch" mediada por bacterias lácticas (BAL) es un proceso técnicamente factible para la producción de ácido L-láctico a partir de glicerol proveniente de efluentes industriales. Además del beneficio económico que significaría la producción de ácido L-láctico a partir de glicerol, no menos importante es el hecho de que su aprovechamiento aportaría una solución medioambientalmente viable para su creciente acumulación. Pero a pesar de lo promisorio de esta modalidad, se debe tener en cuenta que la fermentación mediada por BAL es un proceso que presenta grandes desafíos para su implementación a escala industrial. Por tal motivo, resulta de especial interés investigar el metabolismo del glicerol en diferentes especies de BAL y evaluar el impacto de las condiciones operacionales (pH, temperatura, aireación) sobre el desempeño fermentativo de las BAL.

OBJETIVOS

Evaluar el metabolismo del glicerol en siete cepas de BAL y su desempeño fermentativo frente a diferentes sustratos carbonados y condiciones de fermentación.

METODOLOGÍA

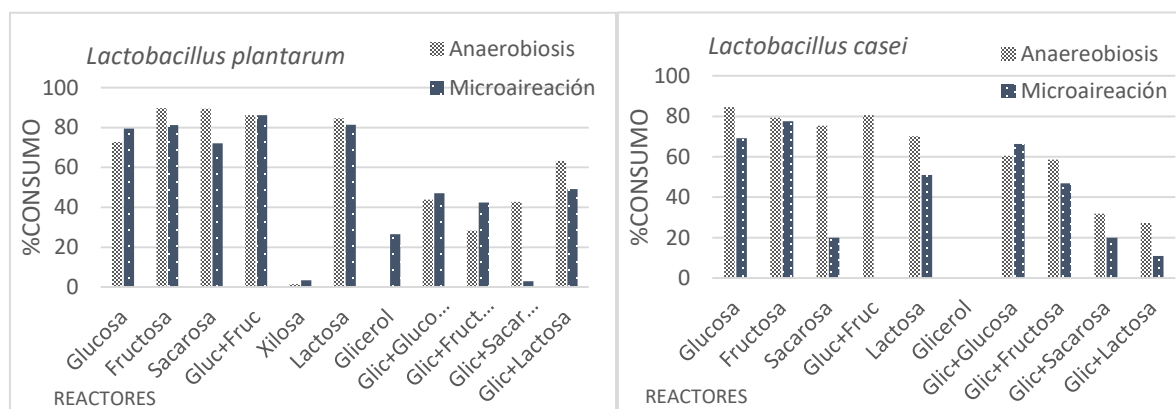
Se estudiaron siete cepas de BAL: *Lactobacillus casei*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Weisella paramesenteroides* y *Pediococcus pentosaceus*. La caracterización del espectro de sustratos carbonados susceptibles de ser consumidos por las cepas se estudió en dos etapas: primero mediante un *screening* de cada una de las cepas con distintas fuentes de carbono y luego mediante ensayos de co-metabolismo de los sustratos individuales en forma conjunta con glicerol.

Se partió de un inóculo preparado a partir de un stock guardado en heladera y periódicamente repicado en atmósfera microbiológicamente estéril. Se dejó crecer con agitación constante en medio MRS durante 12-24 horas a 37 ± 1 °C. Previo a la inoculación de los reactores se separó la biomasa por centrifugación y lavados con buffer fosfato estéril y se resuspendió en un volumen adecuado. La concentración se estimó por espectrofotometría y el pH del medio fue controlado con un sensor ThermoOrion 105^o ajustado a 6.5 mediante dosificación con NaOH.

Los ensayos de fermentación fueron realizados en reactores de vidrio de 10mL (construidos *ad-hoc*), con sistemas de trampa de gases y toma muestra para mantener esterilidad y anaerobiosis. Cada reactor fue suplementado con peptona de carne, extracto de levadura y la fuente de carbono correspondiente, en una concentración de 10 g/L. Para los ensayos de co-metabolismo, además cada reactor contó con glicerol en una concentración de 10 g/L. Se realizó un seguimiento en el tiempo de los siguientes parámetros: a) ácido láctico, mediante kit enzimático específico (Wiener Lab., Argentina); b) glicerol mediante kit enzimático específico (SB, Santa Fe, Argentina); c) biomasa, por espectrofotometría a 480nm y a través de sólidos suspendidos totales (APHA, 2005); d) azúcares, por métodos espectrofotométricos. Los azúcares reductores fueron determinados por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) descrito por (Miller, 1959) y los azúcares totales mediante el método "fenol-sulfúrico" (Dubois et al., 1956).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 1** se muestra el desempeño fermentativo de las cepas de BAL estudiadas, en ensayos con diferentes fuentes de carbono y dos condiciones (anaerobiosis y microaireación). Si bien las BAL no disponen de la maquinaria para metabolizar sustratos carbonados empleando el oxígeno como aceptor final, se decidió evaluar el impacto de la aireación



(a)

(b)

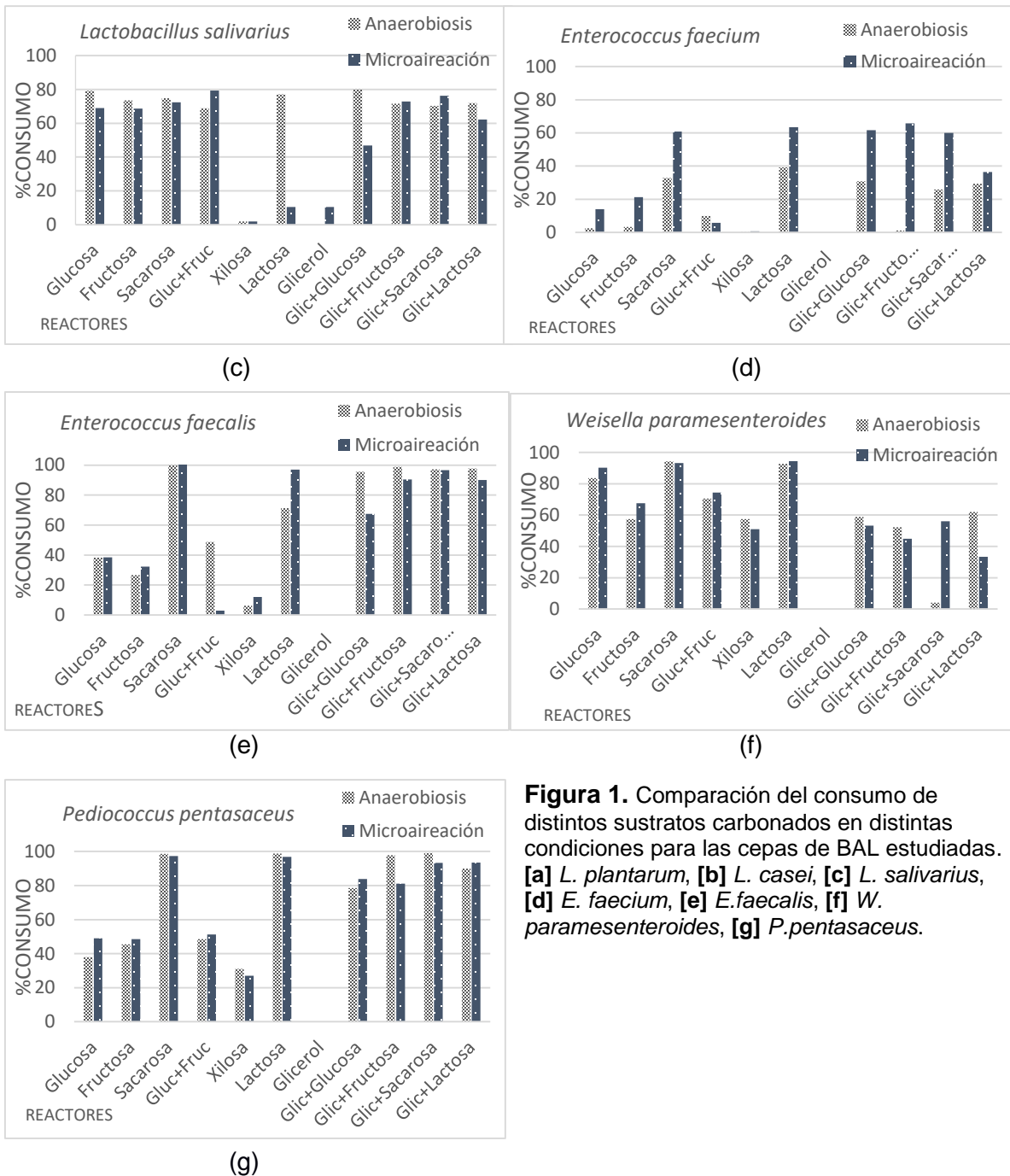


Figura 1. Comparación del consumo de distintos sustratos carbonados en distintas condiciones para las cepas de BAL estudiadas. [a] *L. plantarum*, [b] *L. casei*, [c] *L. salivarius*, [d] *E. faecium*, [e] *E. faecalis*, [f] *W. paramesenteroides*, [g] *P. pentasaceus*.

Las cepas fueron capaces de aprovechar las fuentes de carbono ensayadas, aunque se registraron diferencias significativas en cuanto a la velocidad y porcentaje de consumo, indicando que el espectro de sustratos es dependiente de la especie. La xilosa, por ejemplo, solo fue asimilada por *Weisella paramesenteroides* y *Pediococcus pentasaceus*. Si bien estas cepas mostraron un consumo aceptable de todas las fuentes de carbono tanto en los medios con azúcares simples como en co-metabolismo con glicerol, *W. paramesenteroides* presentó la mayor producción de ácido láctico a partir de glucosa, fructosa y sacarosa (2,13; 1,81 y 0,94 g/L, respectivamente), mientras que con *P.*

pentasaceus se obtuvo una mayor cantidad (2,14; 2,96 y 2,10 g/L) con los mismos azúcares respectivamente pero en la modalidad co-metabolismo con glicerol.

Lactobacillus casei mostró buenos rendimientos de ácido láctico del orden de los 1,77 y 1,65 g/L para los medios simples con sacarosa y glucosa/fructosa, mientras que la producción a partir de glicerol como único sustrato fue baja. Sin embargo el co-metabolismo de glicerol con sacarosa incrementó notablemente la producción de ácido láctico (3,38 g/L). Algo muy similar se observó para *L. salivarius* en los que se registró buena producción de láctico en medios con glucosa (2,52 g/L), fructosa (2,61 g/L) y lactosa (2,94 g/L) y una aun mayor producción en co-metabolismo con glicerol de 3,33 g/L para glucosa; 3,04 g/L para para fructosa y 3,99 g/L para sacarosa.

L. plantarum fue la cepa en la que se registró mayor producción de ácido láctico llegando a valores de 6,09 y 7,36 g/L en fermentaciones con medios simples con glucosa y fructosa respectivamente. En la modalidad co-metabolismo con glicerol con las mismas azúcares, la producción disminuyó a 3,66 y 2,76 g/L respectivamente.

Enterococcus faecalis también demostró ser buen productor de ácido láctico a partir de azúcares simples como glucosa (4,84 g/L) y fructosa (4,53 g/L), doblando los valores obtenidos en medios que contenían glicerol y las mismas azúcares.

Por último, la cepa de *Enterococcus faecium* utilizada no produjo ácido láctico en cantidades importantes, a pesar de que se registraron consumos de las fuentes de carbono suministradas.

CONCLUSIONES

Las fermentaciones realizadas con glicerol como única fuente de carbono no arrojaron buenos rendimientos de ácido láctico. Sin embargo, su aumento en los medios conteniendo glicerol y algún sustrato carbonado adicional sugieren que el glicerol es derivado preferentemente a biomasa cuando es la única fuente de carbono en el medio, mientras que el co-metabolismo permitiría balancear el status redox de los procesos metabólicos y derivar una parte de este carbono a la producción de ácido láctico. Estudios posteriores deben centrarse en la identificación de las rutas metabólicas y enzimas involucradas en el metabolismo del glicerol en las cepas estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

Doi Y. 2015. L-Lactate production from biodiesel-derived crude glycerol by metabolically engineered *Enterococcus faecalis*: cytotoxic evaluation of biodiesel waste and development of a glycerol-inducible gene expression system. *Appl Environ Microbiol* 81:2082–2089.

Khalid K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. Department of Applied Chemistry, Faculty of Applied Sciences, Universiti Teknologi MARA (UiTM), 40450 Shah Alam, Selangor, Malaysia. *International Journal of Biosciences (IJB)* ISSN: 2220-6655

Murakami N., Oba M., Iwamoto M., 2016. L-Lactic acid production from glycerol coupled with acetic acid metabolism by *Enterococcus faecalis* without carbon loss. *Journal of Bioscience and Bioengineering* Volume 121, Issue 1, January 2016, Pages 89-95

Rivaldi JD., Sousa Silva M., Duarte LC., Ferreira AN. 2013. Metabolism of biodiesel-derived glycerol in probiotic *Lactobacillus* strains. *Appl Microbiol/Biotechnol* (2013) 97:1735–1743.

Veiga da Cunha M., Foster MA., 1992. Sugar-Glycerol Cofermentations in *Lactobacilli*: the Fate of Lactate. *Journal of Bacteriology*, Feb. 1992, p. 1013-1019.