

Producción de ácido láctico con cepas de *Enterococcus* aisladas de ganado

Suárez-Hernández, L. A.¹, Guatemala-Morales, G. M.¹, Corona-González, R. I.², Kirchmayr, M. R.³, Arriola-Guevara, E.², Mondragón Cortez, P. M.⁴

¹Unidad de Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Av. Normalistas #800, Col. Colinas de la Normal, Guadalajara, Jal., 44270, México. ²Departamento de Ingeniería Química, CUCEI, Universidad de Guadalajara, Blvd. Marcelino García Barragán #1421, Guadalajara, Jal.,

³Unidad de Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Camino Arenero #1227, Col. El Bajío, Zapopan, Jal., 45019, México. 44430, México. ⁴Unidad de Tecnología Alimentaria, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C., Camino Arenero #1227, Col. El Bajío, Zapopan, Jal., 45019, México. 44430, México. gguatemala@ciatej.mx

Palabras clave: ácido láctico, *Enterococcus*, MALDI-TOF

Introducción

El ácido láctico (AL; ácido 2-hidroxipropiónico) es una biomolécula con múltiples aplicaciones en la industria de los alimentos, cosmética, química, textil, farmacéutica y biomédica por lo que tiene un alto valor agregado en los mercados mundiales. El AL se considera una plataforma química al intervenir como precursor para la síntesis de ácido propiónico, acetaldehído, lactida, ácido acrílico, ácido pirúvico, lactato de etilo, 2,3-pentanediona, entre otros. Además, se utiliza para la fabricación del ácido poliláctico, un polímero biodegradable, biocompatible y amigable con el ambiente que se utiliza para producir materiales de embalaje, fibras y espumas. Sin embargo, los costos de producción del AL limitan su aplicación extensiva. De tal modo, la búsqueda de sustratos económicos y la mejora de su productividad se han convertido en los objetivos más importantes para quienes lo producen. El AL puede producirse mediante síntesis química o por fermentación a escala industrial. En la síntesis química convencional se utilizan petroquímicos como materia prima en procesos con altos requerimientos energéticos y catalizadores, liberan grandes cantidades de contaminantes al ambiente y producen una mezcla racémica de ácido DL-láctico que aumentan los costos de separación. Estos inconvenientes pueden ser superados más fácilmente con la producción microbiológica de AL por fermentación, ya que muchos microorganismos sintetizan AL enantioméricamente puro en procesos que ocurren en condiciones cercanas a las ambientales. También brinda la oportunidad de utilizar sustratos económicos con bajo consumo energético e incluso material de desecho y ofrece beneficios ambientales [1-3].

El AL producido por fermentación se obtiene tradicionalmente con bacterias pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*. A las bacterias que lo producen se les conoce comúnmente como bacterias del ácido láctico (BAL). Las BAL son microorganismos microaerófilos Grampositivos, catalasa negativos y no esporulan. Muestran fenotipos fermentativos homolácticos, heterolácticos o de ácidos mixtos, según la cepa analizada y las condiciones de crecimiento utilizadas. Algunas de las BAL se clasifican como probióticos ya que pueden proporcionar beneficios para la salud humana cuando se administran en cantidades adecuadas. Estas bacterias tienen una fuerte adaptación a sustratos ricos en nutrientes como la leche y la carne por lo que su desarrollo depende de fuentes exógenas de aminoácidos y vitaminas y se les considera nutricionalmente exigentes. Esto representa una clara desventaja del uso de las BAL en la producción industrial de AL porque los componentes del medio de cultivo son muchos, su costo es elevado y la purificación del AL producido suele ser más compleja y costosa [1,2,4].

Los costos principales de la producción de AL por fermentación son los nutrientes y carbohidratos necesarios para el crecimiento y producción del AL, el proceso de recuperación y la purificación hasta el producto final. Para cubrir la demanda mundial del AL aunado a sus múltiples aplicaciones, el costo de producción mediante los cultivos fermentativos tradicionales es demasiado alto. Se han hecho estimaciones económicas que establecen los costos generales de producción de AL igual o menor a un dólar por kilogramo de AL para que el proceso sea comercialmente viable. Como resultado, para que una cepa de BAL sea utilizada para la producción industrial de AL debe cumplir con algunos criterios importantes que incluyen una producción igual o mayor a 100 g/L de AL con rendimientos cercanos al teórico (0.9 g de AL por gramo de glucosa) y una alta pureza quiral del AL producido (>99%) que permitan facilitar las etapas de purificación. Disminuir

los costos de producción tiene el potencial de expandir tanto el mercado mundial del AL como de sus derivados. Con base en estos requerimientos, se han buscado nuevas cepas bacterianas capaces de producir AL que permitan superar las limitaciones técnicas de los procesos fermentativos tradicionales y se han incluido más cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Enterococcus*. Un rasgo importante de estas bacterias novedosas productoras de AL es la capacidad de utilizar una mayor diversidad de hexosas y pentosas, lo que permite utilizar fuentes de carbono no convencionales, renovables, disponibles y económicos e incluso material residual o de desecho como la lignocelulosa (Tabla 1) [3-6].

Tabla 1. Producción de ácido láctico con diferentes fuentes de carbono con BAL no comunes [3, 5].

Cepa	Sustrato	Proceso fermentativo	AL (g/L)	Y _{AL} (g/g)	P _{AL} (g/L h)
<i>E. mundtii</i> QU 25	Celobiosa	Lote	119	0.83	1.12
	Xilosa	Lote	86.7	0.84	0.90
	Glucosa y celobiosa	Lote	35.1	0.91	2.99
<i>E. faecalis</i> RKY1	Hidrolizado de madera	Lote	93.0	0.93	1.7
<i>E. faecalis</i> SI	Celulosa hidrolizada	Lote	59.81	0.95	-
<i>Lb. coryniformis</i> ATCC 25600	Celulosa hidrolizada	Lote	54.0	0.89	0.5
<i>Lb. lactis</i> IO-1	Xilosa	Lote	33.26	0.68	-
<i>Lb. lactis</i> RM 2-24	Celobiosa	Lote	80.0	0.80	1.66
<i>Lb. casei</i> – <i>Lb. lactis</i>	Jugo de dátil	Lote	60.3	-	1.2
<i>Lb. brevis</i>	Olote de maíz	Lote	39.1	0.70	0.81
<i>Lb. ramnosus</i> ATCC 7469	Hidrolizado de papel	Lote	73.0	0.97	2.9

AL: ácido láctico; Y_{AL}: rendimiento de AL; P_{AL}: productividad de AL.

En este escenario, se han aislado e investigado BAL que hasta el momento no tienen un uso tan amplio para la producción fermentativa de AL. Además, tienen la capacidad metabólica para utilizar carbohidratos puros y también los contenidos en hidrolizados de material residual como los derivados de la lignocelulosa. Sin embargo, las cepas de *Lactobacillus* suelen ser nutricionalmente más exigentes en comparación con las cepas de *Enterococcus*. Además, los enterococos crecen más rápidamente aún en medio de cultivo simples y tienen un metabolismo facultativo por lo que toleran más fácilmente el oxígeno. Pessione y colaboradores (2014) reportaron una cepa de *Enterococcus faecium* LLAA-1 capaz de producir grandes cantidades de AL enantioméricamente más puro (98.8%) en medios de cultivo complejos en comparación con cepas de *Lactobacillus*. Posteriormente, demostraron que dicha cepa de *E. faecium* era capaz de crecer y producir AL de diversos carbohidratos como los presentes en frutas y otros desechos vegetales (sacarosa, xilosa, glucosa, fructosa y celobiosa) [7]. Con base en lo anterior, el objetivo principal de la investigación fue aislar e identificar bacterias del género *Enterococcus* y evaluar su capacidad para producir ácido láctico con glucosa en cultivo por lote.

Metodología

Para el aislamiento de bacterias productoras de AL, se tomaron 300 muestras por hisopado de ganado vacuno, equino y porcino y se procesaron con base en el método de aislamiento propuesto por Suárez-Hernández y colaboradores (2019) [8]. Las muestras se sometieron a una etapa de enriquecimiento en caldo infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés) con azida de sodio como agente bacteriostático de las bacterias Gramnegativas. Posteriormente, las muestras se inocularon en placas de agar sangre para el aislamiento bacteriano. Transcurrido el tiempo de incubación, se analizaron las reacciones hemolíticas de las colonias desarrolladas, la morfología colonial, se analizó la producción de la enzima catalasa y se realizó una tinción de Gram. Las cepas se reseleccionaron en placas de BHI hasta confirmar su pureza y se conservaron en ultracongelación a -80°C con glicerol como crioprotector. Las cepas puras se identificaron por espectrometría de masas MALDI-TOF (desorción/ionización con láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo) en un equipo MALDI-TOF MS Microflex LT con el software MALDI-BIOTYPER RTC; Bruker Daltonics. Los espectros generados se compararon automáticamente con la librería BDAL (Bruker Daltonics) con un criterio de identificación exitosa de biotyper log > 1.70.

Se analizó el perfil de producción de AL y ácidos orgánicos de las cepas aisladas de ganado con un medio de cultivo cuya composición fue (g/L): 20 glucosa, 10 extracto de levadura, 2.5 K₂HPO₄, 2 NaCl, 1.5 MgSO₄*7H₂O [8]. El inóculo se preparó de la siguiente forma, se inoculó una asada de cada cepa mantenida en ultracongelación en placas de BHI fresco por 24 h a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se transfirieron 1-2 colonias en 30 mL de caldo BHI en botellas serológicas (60 mL de capacidad total) y se incubaron a 37°C por 12 h a 200 rpm en un agitador orbital. Posteriormente, el inóculo se ajustó a una concentración de 0.3 a 660 nm de absorbancia con agua destilada estéril y se inocularon 60 mL de medio de cultivo en una relación de 10% (v/v) en botellas serológicas. Las botellas se incubaron en un agitador orbital a 200 rpm y 37°C por 24 h. Se tomaron muestras cada 3 h y se determinó la concentración de ácidos orgánicos por cromatografía de líquidos (Aminex HPX-87H Biorad®; a 50°C; 0.6 mL/min H₂SO₄ 5mM; detector de fotodiodos Waters®). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se utilizó una cepa de *E. coli* ATCC 25922 como control.

Resultados y discusión

Se obtuvieron 575 colonias bacterianas, 3 colonias de levaduras y una de moho durante la etapa de aislamiento. Del grupo de bacterias obtenidas, se aislaron y purificaron 10 cepas con potencial para producir AL provenientes de caballos (90%) y una (10%) de burro. Después de la identificación por espectrometría de masas (MALDI-TOF), se demostró que dichas bacterias pertenecían al género *Enterococcus*. Grewal y colaboradoras (2020) han propuesto a las cepas de *Enterococcus* como las bacterias más prometedoras para la producción fermentativa de AL a escala industrial por sus múltiples ventajas metabólicas frente a otras bacterias productoras de AL. Además, se han propuesto como parte fundamental para la creación de biorrefinerías dedicadas principalmente a la síntesis microbiológica de AL [3]. En la Figura 1 se observa la producción de AL y ácido acético (AA) obtenida con las cepas de *Enterococcus* aisladas del ganado. Se demostró que dichas cepas tenían un perfil metabólico heterofermentativo, es decir, produjeron una mezcla de ácidos orgánicos (láctico y acético). Las bacterias con la mayor producción de AL fueron las cepas de *E. faecalis* con una producción aproximada de 4 g/L. Estas cepas, también presentaron las más altas productividades (hasta 0.19 g/L h AL) (ver Tabla 2). Sin embargo, la pureza del AL dichas cepas de *E. faecalis* apenas alcanzó el 80%. Esto fue originado por la síntesis de hasta 1.05 g/L de AA.

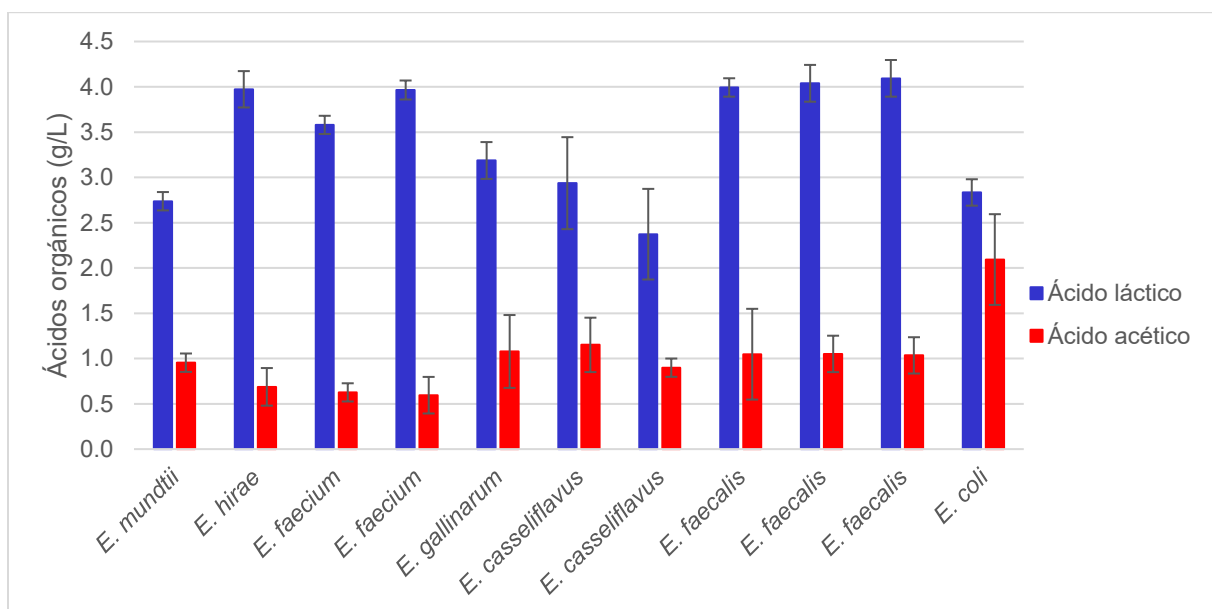


Figura 1. Producción de ácidos orgánicos con *Enterococcus* aislados de ganado.

También se obtuvieron dos cepas de *E. faecium* cuyos rendimientos fueron superiores a 0.5 g de AL por g de glucosa consumida y con las cuales se obtuvo AL con una pureza del 85-87%. Las cepas de *E. faecium* se han propuesto como parte fundamental en el desarrollo de procesos fermentativos para producir AL a escala industrial puesto que tienen la capacidad metabólica de sintetizar grandes cantidades de AL enantioméricamente puro en comparación con otras BAL [7]. Además, las cepas de estos microorganismos

han incrementado su uso como modelo ideal para la acidificación de diversas matrices y productos alimenticios gracias a su diversidad metabólica para crecer en diferentes sustratos y producir AL. De este modo, se utilizan para la acidificación de la leche (de diversos mamíferos), la producción de yogurt y la maduración de productos cárnicos [3-5,7]. Por su parte, la cepa de *E. hirae* presentó la más alta pureza del AL (91%) y un rendimiento de 0.51 g/g. Sin embargo, se demostró que las cepas analizadas únicamente consumieron aproximadamente 6-7 g/L de la glucosa del medio de cultivo. Esto representa apenas el 30% de la fuente de carbono y esto podría tener origen en procesos de inhibición por producto puesto los experimentos se llevaron a cabo en condiciones no controladas de pH [1,2,5]. Este es apenas un estudio inicial que permitirá seleccionar las cepas para realizar experimentos en condiciones más controladas.

Tabla 2. Características bioquímicas, rendimientos y parámetros cinéticos obtenidos con *Enterococcus* aislados de ganado.

Cepa	Hemólisis	Catalasa	Gram	AL (g/L)	Y _{AL} (g/g)	P _{AL} (g/L h)	AA (g/L)	Y _{AA} (g/g)	P _{AA} (g/L h)	Pureza (%AL)
<i>E. mundtii</i>	α	-	+	2.74	0.41	0.11	0.95	0.14	0.04	75
<i>E. hirae</i>	α	-	+	3.97	0.51	0.17	0.69	0.09	0.03	91
<i>E. faecium</i>	α	-	+	3.58	0.52	0.15	0.63	0.09	0.03	85
<i>E. faecium</i>	α	-	+	3.96	0.56	0.17	0.59	0.07	0.02	87
<i>E. gallinarum</i>	γ	-	+	3.19	0.52	0.13	1.08	0.17	0.04	75
<i>E. casseliflavus</i>	α	-	+	2.94	0.40	0.12	1.15	0.16	0.05	71
<i>E. casseliflavus</i>	α	-	+	2.37	0.37	0.11	0.90	0.14	0.04	73
<i>E. faecalis</i>	γ	-	+	3.99	0.36	0.11	1.05	0.14	0.04	80
<i>E. faecalis</i>	α	-	+	4.04	0.59	0.17	1.05	0.15	0.04	80
<i>E. faecalis</i>	α	-	+	4.09	0.53	0.19	1.03	0.13	0.04	80
<i>E. coli</i>	γ	-	-	2.83	0.44	0.12	2.09	0.49	0.09	56

β: Hemólisis completa; α: hemólisis parcial; γ: hemólisis negativa. +: Grampositivo; -: Gramnegativo. AL: ácido láctico; Y_{AL}: rendimiento de AL; P_{AL}: productividad de AL; AA: ácido acético; Y_{AA}: rendimiento de AA; P_{AA}: productividad de AA.

Conclusiones

Con base en los resultados, se concluyó que el método de aislamiento utilizado permitió aislar, seleccionar e identificar bacterias del género *Enterococcus*. También se demostró que todas las cepas de *Enterococcus* aisladas del ganado produjeron AL por procesos heterofermentativos en los que se obtuvo una mezcla de ácidos láctico y acético. Las cepas aisladas de *Enterococcus* podrían tener potencial para producir AL.

Referencias

- Ahmad, A., Banat, F., Taher, H. (2020). A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges. *Environmental Technology & Innovation* **20**: 2-21.
- Miller, C., Fosmer, A., Rush, B., McMullin, T., Beacom, D., Suominen, P. (2017). Industrial production of lactic acid. *Comprehensive Biotechnology* **3**: 208-217.
- Grewal, J., Sadaf, A., Yadav, N., Khare, S. K. (2020). Agroindustrial waste based biorefineries for sustainable production of lactic acid. *Waste Biorefinery. Integrating Biorefineries for Waste Valorisation*. Bhaskar, T., Pandey, A., Rene, E. R., Tsang, D. C. W. (Eds). First edition, 125-153. Elsevier, London.
- Sauer, M., Russmayer, H., Grabher, R., Peterbauer, C. K., Marx, H. (2017). The efficient clade: Lactic acid bacteria for industrial chemical production. *Trends in Biotechnology* **35**: 756-769.
- Abdel-Rahman, M., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2011). Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. *Journal of Biotechnology* **156**: 286-301.
- Segupta, S., Das, P., Datta, S. (2018). Fermentative production of optically pure lactic acid from renewable materials. *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials* 1-8.
- Pessione, A., Zapponi, M., Mandili, G., Fattori, P., Mangiapane, E., Mazzoli, R., Pessione, E. (2014). Enantioselective lactic acid production by an *Enterococcus faecium* strain showing potential in agro-industrial waste bioconversion: Physiological and proteomic studies. *Journal of Biotechnology* **173**: 31-40.
- Suárez-Hernández, L. A., Guatemala-Morales, G. M., Corona-González, R. I., Mendoza, M., Kirchmayr, M. R., Arriola-Guevara, E. (2019). Método de aislamiento de bacterias con potencial para producir ácido hialurónico. En *Avances de Investigación en Inocuidad de los alimentos, e-Gnosis [online]* Vol. 2 <http://www.e-gnosis.udg.mx/index.php/trabajosinocuidad>, ISSN 1665-5745. Consultado: 30 septiembre 2020.