



EVALUACIÓN DE BACTERIAS ANTÁRTICAS COMO POTENCIALES PRODUCTORAS DE ÁCIDO LÁCTICO

Tesina de grado de la Licenciatura en Bioquímica

Bach. Camila Rodríguez

Tutor: Msc. M.^a Laura Camesasca

Co tutor: Dra. Ing. Alim. M.^a Eugenia Vila

Departamento de Bioingeniería, IIQ
Facultad de Ingeniería, Udelar.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos	1
Índice de tablas	2
Índice de figuras	3
Resumen	4
Capítulo 1: Introducción	5
1.1 Ácido láctico	5
1.2 Fermentación ácido-láctica	7
1.2.1 Producción a nivel industrial: avances y limitantes	7
1.2.2 Microorganismos productores de ácido láctico	8
1.2.3 Factores que afectan la fermentación ácido-láctica	11
1.2.4 Formulación del medio de cultivo mediante el uso de herramientas estadísticas	13
1.3 Ecosistema antártico	14
Capítulo 2: Objetivos	16
2.1 Objetivos generales	16
2.2 Objetivos específicos	16
Capítulo 3: Materiales y métodos	17
3.1 Procesamiento de las muestras, almacenamiento y caracterización de las cepas	17
3.1.1 Procesamiento	17
3.1.2 Guardado de cepas	17
3.1.3 Caracterización	18
3.1.4 Amplificación del gen 16S ARN ribosomal y secuenciación	18
3.2 Ensayos de fermentación	19
3.2.1 Desarrollo de inóculo	19
3.2.2 Fermentaciones	19
3.2.3 Estudio del efecto de la temperatura en el crecimiento celular y la producción de ácido láctico .	20
3.2.4 Estudio del efecto del pH en el crecimiento celular y la producción de ácido láctico	20
3.2.5 Estudio de la fuente de carbono	20
3.2.6 Estudio de fuentes de Nitrógeno	21
3.3 Diseño experimental del medio de cultivo	21
3.4 Métodos Analíticos	23
3.4.1 Seguimiento del crecimiento celular	23
3.4.2 Determinación de azúcares y ácido láctico	23
Capítulo 4: Resultados y discusión	24
4.1 Aislamiento, preselección y caracterización de bacterias productoras de ácido	24
4.2 Selección de las cepas con mayor potencial de producción de ácido láctico	27
4.3 Estudio de los factores que afectan el rendimiento en la producción de ácido láctico por la cepa lua	30
4.3.1 Influencia de la temperatura	30

4.3.2	Influencia del pH	31
4.4	Diseño del medio de cultivo	35
4.4.1	Selección de la fuente de carbono	35
4.4.2	Selección de la fuente de nitrógeno	38
4.4.3	Diseño experimental del medio de cultivo	40
Capítulo 5:	Conclusiones y perspectivas	50
Referencias	52
Anexo	61
1.	Medios de cultivo y buffers	61
2.	Aislamientos	63
3.	Análisis estadístico	64
3.1	Verificación de la producción de ácido láctico y selección de la cepa con mayor producción	64
3.2	Estudio de la influencia de la temperatura	66
3.3	Estudio de la influencia del pH	68
3.4	Selección de la fuente de carbono	69
3.5	Diseño experimental del medio de cultivo	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Bacterias ácido-lácticas homofermentativas y heterofermentativas	10
Tabla 2.	Niveles y valores de los factores estudiados en el DCCR.....	21
Tabla 3.	Corridas del diseño compuesto central con sus diferentes niveles asignados.	22
Tabla 4.	Características morfológicas e identificación a nivel de género las cepas preseleccionadas.	26
Tabla 5.	Concentración de sustrato consumido y ácidos producidos durante la fermentación de las cepas preseleccionadas.....	28
Tabla 6.	Concentración de biomasa, consumo de sustrato y producción de ácidos a diferentes temperaturas	30
Tabla 7.	Rendimiento en función del consumo de sustrato a las 72 horas de fermentación y velocidad inicial de producción de ácido láctico en función del pH.	34
Tabla 8.	Concentración de biomasa celular, consumo de sustrato y ácido láctico producido para cada fuente de carbono ensayada.	36
Tabla 9.	Consumo de sustrato, crecimiento celular, concentración de ácido láctico y rendimiento de producto por gramo de fructosa en función de la fuente de nitrógeno utilizada.	39
Tabla 10.	Diseño experimental y resultados del diseño compuesto central rotacional.	42
Tabla 11.	Ajuste de mínimos cuadrados y estimaciones de los parámetros en la respuesta asociada a la velocidad específica de crecimiento celular.	45
Tabla 12.	Ajuste de mínimos cuadrados y estimaciones de los parámetros en la respuesta asociada a la velocidad inicial de producción de ácido láctico.	47
Tabla 13.	Ajuste de mínimos cuadrados y estimaciones de los parámetros en la respuesta asociada a la concentración de ácido láctico.	49
Tabla 14.	Lugar de origen de las 9 cepas aisladas en la Península Fildes, Isla Rey Jorge (62°11S, 58°54W).	63

Tabla 15. Análisis de la varianza para el modelo cuadrático de la respuesta sobre el crecimiento celular.	71
Tabla 16. Ajuste de mínimos cuadrados y estimaciones de los parámetros en la respuesta asociada a la velocidad específica de crecimiento celular.	71
Tabla 17. Análisis de la varianza para el modelo cuadrático de la respuesta sobre la velocidad inicial de producción de ácido láctico.	72
Tabla 18. Ajuste de mínimos cuadrados y estimaciones de los parámetros en la respuesta asociada a la velocidad inicial de producción de ácido láctico.	72
Tabla 19. Análisis de la varianza para el modelo cuadrático de la respuesta sobre la concentración de ácido láctico.	73
Tabla 20. Ajuste de mínimos cuadrados y estimaciones de los parámetros en la respuesta asociada a la concentración de ácido láctico.	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Demanda de ácido láctico en los diferentes sectores de acuerdo con el mercado global de ácido láctico en 2018.	6
Figura 2. Flujo del proceso de la producción de ácido láctico a partir de la obtención de la materia prima hasta obtención de producto por fermentación microbiónológica.	7
Figura 3. Vías de fermentación de carbohidratos en LABs para producir ácido láctico a partir de varios azúcares presentes en materias primas renovables.	10
Figura 4. Ilustración de la región experimental definida en el diseño compuesto central.	14
Figura 5. Foto de un cultivo en medio sólido con Bromocresol púrpura, en placa de Petri.	24
Figura 6. Observación al microscopio óptico (100X) de las Tinciones de Gram.	25
Figura 7. Observación al microscopio óptico de un cultivo de L1 con 72 horas de incubación.	27
Figura 8. Cuantificación del consumo de sustrato, ácido láctico producido, ácido acético presente y concentración celular a las 72 horas de un cultivo a 20°C y 200 rpm.	29
Figura 9. Fermentación de glucosa llevada a cabo por LUA, a 20°C para cada pH estudiado.	33
Figura 10. Perfil del consumo de sustrato, crecimiento celular y producción de ácido láctico por LUA, en medio MRS utilizando fructosa como fuente de carbono, con pH inicial 8 y a 20°C en botellas agitadas.	36
Figura 11. Perfil del consumo de sustrato, crecimiento celular y producción de ácido láctico por LUA, en medio MRS utilizando glucosa como fuente de carbono, con pH inicial 8 y a 20°C en botellas agitadas.	37
Figura 12. Valores predichos vs. experimentales para la velocidad específica de crecimiento celular.	44
Figura 13. Valores predichos vs. experimentales para la velocidad inicial de producción de ácido láctico. ...	46
Figura 14. Valores predichos vs. experimentales para la concentración de ácido láctico.	48

RESUMEN

En la actualidad, la producción de compuestos biológicos de interés comercial a partir del uso de tecnologías verdes se encuentra en auge, debido a la necesidad de contribuir al desarrollo sustentable. El ácido láctico ha ganado relevancia, gracias a la a la versatilidad de sus aplicaciones y, a la posibilidad de ser producido de forma biotecnológica, a partir de un gran número de microorganismos. Estos pueden ser fácilmente encontrados en prácticamente todos los ambientes. La necesidad de aumentar el conocimiento científico sobre el continente antártico hace que este sea un lugar propicio para la búsqueda de estos microorganismos.

En este trabajo, se aislaron dos cepas de bacterias ácido-lácticas antárticas pertenecientes al género *Carnobacterium* (IA y LUA). La cepa LUA fue seleccionada para el estudio de las condiciones fisicoquímicas para la producción de ácido láctico, tales como temperatura y pH del medio de cultivo. La temperatura óptima para la producción de ácido láctico fue de 20°C. En el caso del pH, los resultados indicaron que la cepa de trabajo no es capaz de crecer en cultivos con pH menor a 5, siendo 8 el valor de pH óptimo para la producción de ácido láctico. Posteriormente se evaluaron distintas fuentes de carbono y nitrógeno, con el fin de seleccionar aquellas que favorecieran la producción de ácido láctico. Como resultado, se seleccionó la fructosa como fuente de carbono y el sulfato de amonio como fuente de nitrógeno.

Finalmente, se utilizaron métodos estadísticos para el diseño del medio de cultivo. Se estudiaron dos niveles de concentración de los cuatro factores principales, siendo estos: fructosa, sulfato de amonio, extracto de carne y extracto de levadura. Las respuestas analizadas fueron velocidad específica de crecimiento celular, velocidad inicial de la producción de ácido láctico y concentración de ácido láctico (en g/L). Los resultados permitieron conocer el tipo de influencia de cada factor y la concentración para la cual la respuesta estudiada es máxima. En el primer caso, el valor máximo de la respuesta se obtiene cuando se utilizan 27,1 g/L de fructosa, 19,1 g/L de sulfato de amonio, 11,1 g/L de extracto de carne y 5,3 g/L de extracto de levadura, mientras que, en el segundo caso, el máximo se obtiene con 31,7 g/L, 21,2 g/L, 9,4 g/L y 5,3 g/L, respectivamente. El valor máximo de concentración de ácido láctico se alcanza con 33,9 g/L de fructosa, 16,8 g/L de sulfato de amonio, 9,4 g/L de extracto de carne y 5,7 g/L de extracto de levadura.

A futuro, se podría escalar este proceso a biorreactores, evaluando diferentes modalidades de fermentación y utilizando sustratos provenientes de residuos industriales ricos en fructosa. Por último, sería interesante realizar un estudio técnico-económico, para evaluar la viabilidad del escalado a un nivel industrial.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 ÁCIDO LÁCTICO

La producción biológica de compuestos con valor comercial ha ganado mayor interés en los últimos tiempos debido a un aumento en la demanda de energía y a los problemas ambientales inducidos por la combustión de combustibles fósiles. El desarrollo de nuevas técnicas para obtener productos con tecnologías verdes es esencial para el desarrollo sustentable (Hassan et al., 2020; Srivastava et al., 2020).

El ácido láctico, de origen biotecnológico, se ha convertido en un producto de gran interés y demanda en el mercado mundial. Su demanda crece año a año, siendo su actual producción próxima a los 150 millones de libras al año. Se espera que su crecimiento sea entre un 10 y un 15% por año (Wassewar et al., 2005). El costo del ácido láctico por tonelada es de aproximadamente 1.400 dólares, esta información fue obtenida en el sitio web Pharmacompas (www.pharmacompas.com).

El ácido 2-hidroxiopropanoico ($\text{CH}_3\text{-CHOHCOOH}$), mejor conocido como ácido láctico, fue descubierto en 1870 por el químico sueco Scheele, quien lo aisló de la leche agria. El ácido láctico tiene un carbono asimétrico, lo cual da lugar a actividad óptica. Existen dos isómeros ópticos, el D (-) y el L (+). A diferencia del isómero D (-), la configuración L (+) puede ser metabolizada por el organismo humano (Yu et al., 2008). El ácido láctico puede ser obtenido por vía química o biotecnológica. La síntesis química puede ser llevada a cabo utilizando cianuro de hidrógeno y acetaldehído como precursores de lactonitrilo, que luego de ser destilado e hidrolizado da como resultado ácido láctico. Otros métodos consisten por ejemplo en la oxidación de monóxido de carbono, agua y propilenglicol a elevadas temperaturas y presión, la degradación de azúcares con catalizadores, la hidrólisis de ácido cloropropiónico y la oxidación de propileno con ácido nítrico (Andrea et al., 2017). Todos estos métodos tienen la desventaja de que el ácido láctico producido es una mezcla de los isómeros L (+) y D (-), dando como resultado un compuesto ópticamente inactivo. Generalmente, el ácido láctico en sus formas enantioméricas con mayor pureza óptica presentan mayor valor que en forma de mezcla racémica, debido a que tienen mayores aplicaciones (Grabar et al., 2006). Por lo cual, el 90% del ácido láctico producido en el mundo es elaborado de forma biotecnológica.

Alrededor del 85 % del ácido láctico producido se emplea en la industria alimentaria como acidulante y preservante en confitería, extractos, jugos de frutas, esencias, limonadas, jarabes, cervecería y otros. Dependiendo de la pureza, el ácido láctico encuentra aplicaciones en distintas ramas de la industria (Serna-Cock et al., 2005). En la industria cosmética es utilizado como

humectante, debido a su capacidad de retención de agua, también se utiliza como matizador de piel y rejuvenecedor ya que es capaz de interferir en la acción de la tirosinasa. En el ámbito farmacéutico es utilizado para la fabricación de ungüentos tópicos, lociones, suturas quirúrgicas y prótesis (Martínez et al., 2013). Presenta también una gran importancia en la fabricación de productos de limpieza tales como disolventes y humectantes entre otros. A nivel de la industria química es utilizado como precursor en la síntesis de productos químicos oxigenados como ésteres de acrilato, propilenglicol, óxido de propileno e intermediarios químicos como plastificantes de ésteres de lactato (Olszewska-Widdrat et al., 2019). Por otra parte, el ácido láctico puede ser fácilmente polimerizado para formar ácido poli láctico (PLA). Los polímeros de ácido láctico presentan aplicaciones médicas tales como suturas, liberación controlada de drogas, implantes ortopédicos rellenando los huecos en huesos y uniendo membranas y pieles. Además, los polímeros de ácido láctico con aplicaciones como material de empaque (bioplásticos) han ganado importancia debido a los problemas medioambientales. En el mercado internacional, los polímeros producidos de forma biológica son preferidos para usos médicos comparados con los producidos mediante procesos químicos o enzimáticos (Kathiresan et al., 2008). Ambas formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizadas para producir polímeros con diferentes propiedades, dependiendo de la composición (Serna-Cock et al., 2005).

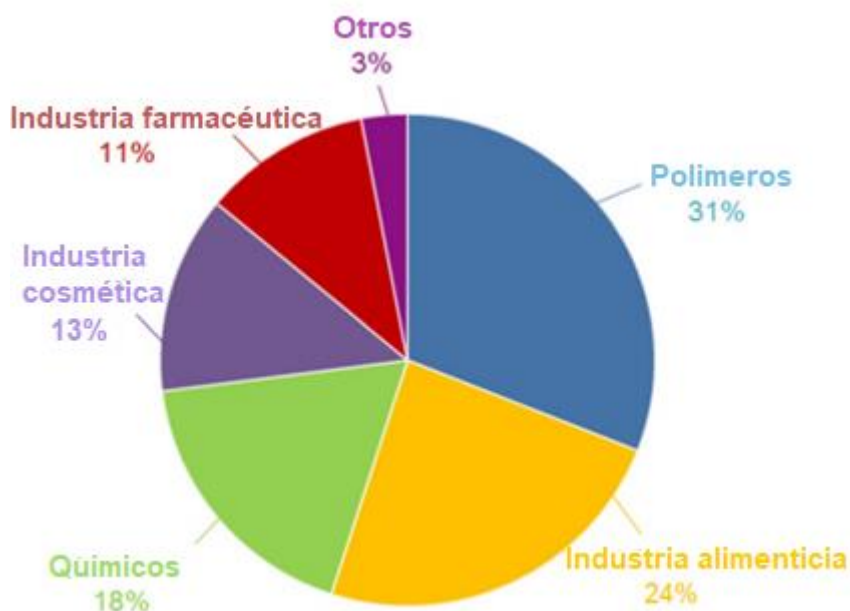


Figura 1. Demanda de ácido láctico en los diferentes sectores de acuerdo con el mercado global de ácido láctico en 2018 (Adaptado de Rawoof et al., 2021).

1.2 FERMENTACIÓN ÁCIDO-LÁCTICA

1.2.1 PRODUCCIÓN A NIVEL INDUSTRIAL: AVANCES Y LIMITANTES

La producción biotecnológica está basada en la fermentación microbiológica de sustratos ricos en carbohidratos, y tiene la ventaja de formar enantiómeros D (-) o L (+), ópticamente activos. Las ventajas de la producción por fermentación incluyen la utilización de desechos orgánicos y recursos renovables como sustratos, además de que el consumo de energía durante el proceso es reducido en comparación con la síntesis química. Tanto el proceso como el producto resultante dependen del tipo de microorganismo utilizado, de si este se encuentra inmovilizado o en recirculación, del pH, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el modo de fermentación empleado y la formación de subproductos (Serna-Cock et al., 2005).

La efectividad del proceso de fermentación puede ser medida por la concentración de ácido láctico producido, el rendimiento de ácido láctico basado en la cantidad de sustrato consumido o por la productividad ($\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) (Hofvendahl et al., 2000).

La producción de ácido láctico de forma biotecnológica todavía enfrenta problemas en términos de productividad y los costos que involucra. En la actualidad, debido a la abundancia de materiales renovables, se ha experimentado con el uso de diferentes sustratos. Sin embargo, algunos de estos sustratos requieren pretratamientos antes de poder ser utilizados para fermentar. Estos permiten aumentar la biodisponibilidad de los azúcares fermentables y la eliminación de compuestos tóxicos para los microorganismos (Guarnizo et al., 2009). El costo que involucra el pretratamiento en ocasiones suele ser equivalente al que se ahorra utilizando sustratos renovables. Por lo tanto, la selección de la materia prima a ser utilizada como sustrato resulta una etapa clave sobre el costo final del producto. Es por esta razón que un gran número de investigaciones en biotecnología apunta a la optimización de estos pretratamientos, con el fin de aumentar la eficiencia y disminuir los costos.

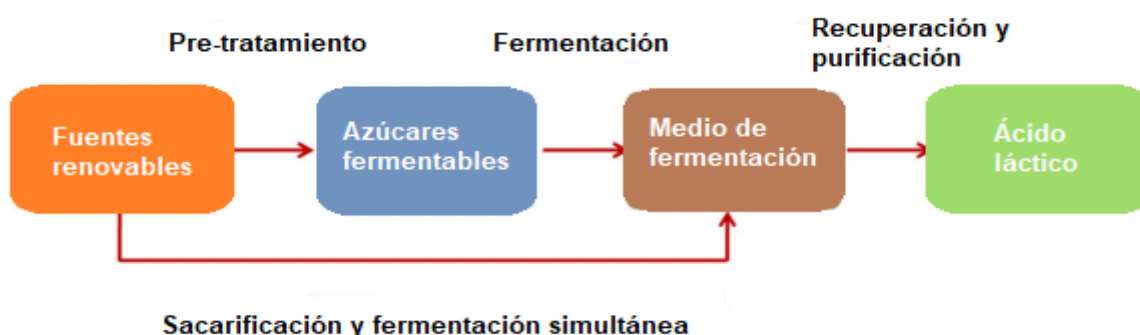


Figura 2. Flujo del proceso de la producción de ácido láctico a partir de la obtención de la materia prima hasta obtención de producto por fermentación microbiológica (Adaptado de Rawoof et al., 2021).

El costo de la producción de ácido láctico se debe en su mayoría a la materia prima utilizada y al procesamiento posterior necesario para la recuperación del producto. Esto último consiste en la separación y purificación del producto final del medio de fermentación, que puede contener impurezas, nutrientes, ácidos orgánicos y azúcares residuales. En la fermentación convencional, el medio de fermentación debe ser neutralizado debido a la producción de ácido, por lo que se producen sales de lactato como producto final. El lactato debe ser posteriormente precipitado y acidificado mediante la adición de compuestos como ácido sulfúrico. El uso de estas sustancias químicas supone aproximadamente el 50% del costo de la producción de ácido láctico e implica la generación de productos secundarios indeseados (Anil et al., 2019).

Un gran número de sustratos diferentes se han utilizado para la producción de ácido láctico por bacterias ácido-lácticas. Los factores que se analizan a la hora de elegir un sustrato son la disponibilidad, el precio y la pureza. El producto de mayor calidad se obtiene cuando el sustrato fermentado es un azúcar puro, pero este proceso es desfavorable económicamente debido a que el costo de estos azúcares excede al costo del ácido láctico. En su lugar, se suelen utilizar desechos de la industria agrícola y forestal (Hofvendahl et al., 2000). Los residuos de la industria agrícola son ricos en carbohidratos como glucosa, galactosa, xilosa, celobiosa, arabinosa y manosa (Martínez et al., 2013). Estos residuos presentan un contenido mínimo de proteínas, y su componente de lignina y hemicelulosa los vuelve inapropiados para su uso en la alimentación humana, lo que hace que sean sustratos ideales para la producción de ácido láctico por fermentación microbiana (Akalin et al., 2017). Ejemplos de estos sustratos son melaza de remolacha, hidrolizados de hemicelulosa y lignocelulosa, tallos de maíz, etc. Recientemente, los residuos lignocelulósicos han ganado interés debido a su abundancia, la ausencia de azúcares alimenticios, la renovabilidad y su bajo costo (Abdel-Rhman et al., 2015).

1.2.2 MICROORGANISMOS PRODUCTORES DE ÁCIDO LÁCTICO

Los microorganismos capaces de producir ácido láctico se dividen en dos grupos: bacterias y hongos. Aunque la mayoría de los estudios sobre la producción de ácido láctico se centran en las bacterias, los hongos filamentosos como los *Rizhopus*, son capaces de fermentar glucosa de forma aeróbica y producir ácido láctico (Idler et al., 2014; Wee et al., 2006).

Las bacterias ácido-lácticas (LAB) son prácticamente los microorganismos mejor estudiados, constituyendo un gran grupo heterogéneo de bacterias con un metabolismo estrictamente fermentativo, que producen ácido láctico durante la fermentación de carbohidratos. Son bacterias Gram positivas, anaerobias aerotolerantes o microaerófilicas, cocos y/o bastones no esporulantes, frecuentemente encontrados formando cadenas. Son capaces de crecer a temperaturas entre 5 y

45°C, en un rango óptimo de pH de 5,5-6,5. Están perfectamente adaptadas a los ambientes ricos en nutrientes y fuentes de energía, y su metabolismo está dirigido a la producción de ácido para competir con los microorganismos con los que comparten el hábitat (Corry et al., 2003). Están ampliamente extendidas en la naturaleza y pueden ser aisladas a partir de granos, plantas verdes, vegetales fermentables, superficies mucosas de animales, derivados de lácteos y carnes, y además de esponjas frescas o en descomposición, algas marinas, mariscos, cangrejos y peces del ambiente marino.

Las bacterias ácido-lácticas comprenden los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Weisella* y *Leuconostoc* (Djukic-Vuković et al., 2013; Lee et al., 2020; Lin et al., 2020; Ramchandran et al., 2012), siendo *Lactobacillus* el género más abundante, que contiene unas 80 especies de bacterias productoras de ácido láctico. Estas bacterias presentan requerimientos nutricionales complejos debido a su incapacidad de sintetizar vitaminas del complejo B y aminoácidos (Hofvendahl et al., 2000). Los medios de cultivo suelen ser suplementados con polisorbatos de distinto peso molecular. Estos compuestos aumentan la permeabilidad de la membrana celular, lo que promueve el ingreso de nutrientes al interior de la célula (Hayek et al. 2013; Qi et al., 2009).

Dependiendo de los subproductos obtenidos y la habilidad para fermentar los distintos azúcares, las bacterias ácido-lácticas se dividen en dos grupos (Rawoof et al., 2021):

- Homofermentativas: utilizan la ruta metabólica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMB), mejor conocida como glucólisis. El ácido láctico es el producto mayoritario, obteniéndose en hasta un 85% a partir de glucosa, en una relación estequiométrica de hasta dos moles de ácido láctico por mol de glucosa. Esta reacción produce además dos moles de ATP por mol de glucosa.
- Heterofermentativas: utilizan la ruta metabólica de la fosfocetolasa. La generación de ácido láctico es aproximadamente el 50% en esta fermentación. Un mol de glucosa produce un mol de ácido láctico, un mol de etanol y un mol de dióxido de carbono. Se produce además una sola molécula de ATP por molécula de glucosa consumida.

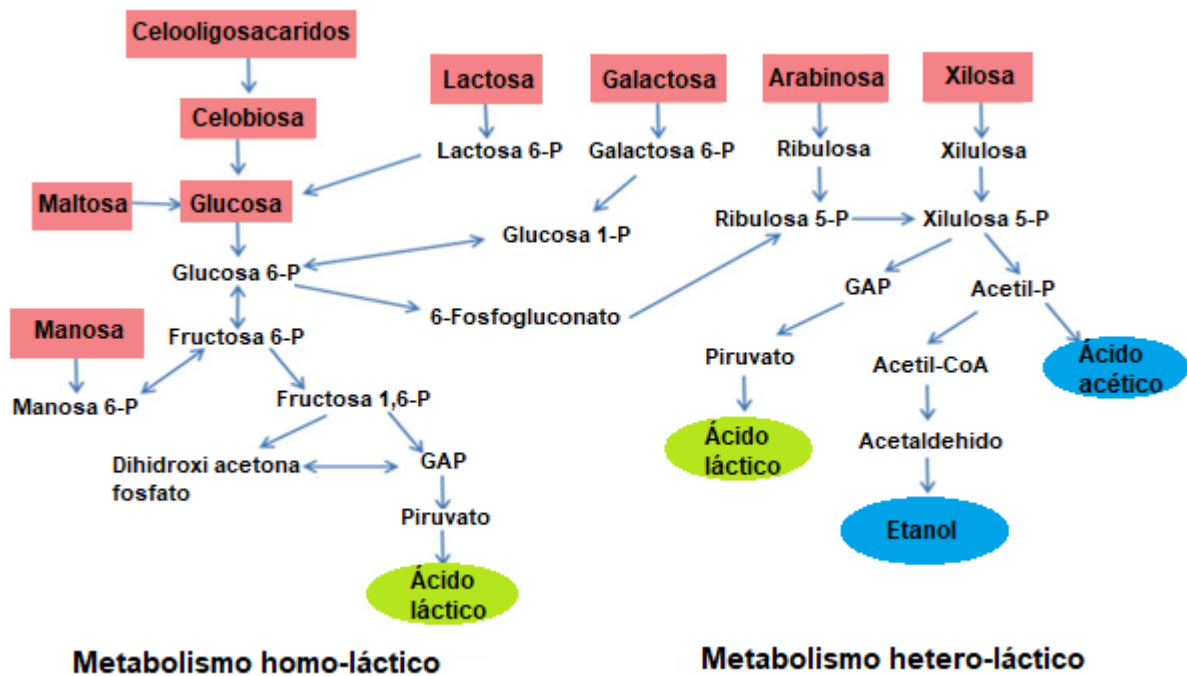


Figura 3. Vías de fermentación de carbohidratos en LABs para producir ácido láctico a partir de varios azúcares presentes en materias primas renovables (Adaptado de Rawoof et al., 2021).

Tabla 1. Bacterias ácido-lácticas homofermentativas y heterofermentativas (Adaptado de Abdel-Rahman et al., 2013).

Característica	LAB Homofermentativas	LAB Heterofermentativas
Producto	Ácido láctico	Ácido láctico, etanol, diacetil, formiato, acetoina o ácido acético y CO ₂ .
Ruta metabólica	Hexosas: vía Embden-Meyerhof Pentosas: vía de las pentosas fosfato	Hexosas: vía del fosfogluconato y vía de la fosfocetolasa Pentosas: vía de la fosfocetolasa
Rendimiento teórico de ácido láctico por sustrato	Hexosas: 1,0 g/g (2,0 mol/mol) Pentosas: 1,0 g/g (1,67 mol/mol)	Hexosas: 0,5 g/g (1,0 mol/mol) Pentosas: 0,6 g/g (1,0 mol/mol)
Género	<i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , algunas especies <i>Lactobacillus</i> , <i>Carnobacterium divergens</i>	<i>Leuconostoc</i> , <i>Oenococcus</i> , <i>Carnobacterium</i> , algunas especies <i>Lactobacillus</i> .

Las bacterias ácido-lácticas son incapaces de producir ATP por respiración oxidativa, por lo que el ácido láctico es el principal producto final de la fermentación de azúcares, proceso mediante el cual ocurre la conservación de la energía (Hofvendahl et al., 2000).

A pesar del gran volumen de información acerca de las LAB, hay pocos estudios acerca de las de origen marino. Las bacterias ácido-lácticas de origen marino juegan un rol importante en la transformación de la materia orgánica, especialmente en la superficie de sedimentos marinos profundos. Sólo algunas cepas de especies de LABs han sido identificadas en ambientes marinos. Entre ellas se encuentran algunas pertenecientes al género *Carnobacterium*, como *C. funditum* y *C. alterfunditum*, reportadas en Ace Lake, Antártida (Kathiresan et al., 2008).

1.2.3 FACTORES QUE AFECTAN LA FERMENTACIÓN ÁCIDO-LÁCTICA

La eficiencia y la economía de la producción de ácido láctico a partir de la fermentación microbiana sigue siendo un problema desde muchos puntos de vista, y entre ellos, la composición del medio de fermentación presenta un rol vital en la mejora de la producción. Los medios utilizados para la fermentación del ácido láctico mediada por microorganismos influyen significativamente en el producto final del proceso. El diseño apropiado del medio de cultivo afecta el desempeño del microorganismo en la optimización de la producción de ácido láctico (Hayek et al. 2013).

Se ha visto en bibliografía, que los parámetros de fermentación pueden favorecer la producción de un determinado metabolito modulando las rutas metabólicas involucradas. Entre estos, se encuentran la temperatura, el pH, la velocidad de agitación, el nivel de oxígeno disuelto, y la composición del medio de cultivo. La cinética del crecimiento microbiano puede ser usada para estimar el costo efectivo de la producción de ácido láctico a gran escala (Abdul Karim et al., 2006).

La productividad de los metabolitos microbianos puede ser incrementada mediante la manipulación de los requerimientos nutricionales, parámetros físicos y modificación genética de las cepas. El desarrollo de un medio de cultivo económico requiere la selección de fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio y elementos traza.

1.2.3.1 EFECTO DEL PH

Durante el proceso de fermentación, la concentración de ácido láctico en el medio aumenta, por lo que el pH disminuye. Esto conduce a una disminución en el crecimiento microbiano. Adicionalmente, el metabolismo celular se inhibe debido al pH bajo y la alta concentración de ácido láctico. Como el ácido láctico es capaz de atravesar la membrana celular, aumenta su acumulación

en el interior de la célula, provocando la ruptura de la membrana (Grabar et al., 2006). Por esta razón, se suelen adicionar bases fuertes como hidróxido de sodio o de calcio al medio de cultivo, con el fin de neutralizar la acumulación de ácidos orgánicos. La acumulación de producto puede ser reducida si se recupera el ácido láctico del medio de cultivo de forma simultánea a su producción (Hetényi et al., 2011).

1.2.3.2 TEMPERATURA

La temperatura es un aspecto importante para tener en cuenta cuando se quiere mejorar el crecimiento celular y la producción de ácido láctico. Para obtener un aumento en la productividad y disminuir las posibles contaminaciones, un aumento en la tolerancia a altas temperaturas sería favorable. Por otro lado, trabajar con cultivos a bajas temperaturas también favorece la disminución de contaminaciones, ya que pocos microorganismos pueden crecer de forma eficiente a estas temperaturas (Margesin et al., 1994). A pesar de que las LABs son capaces de crecer hasta los 50°C, la mayor concentración y productividad de ácido láctico obtenida es entre los 30-43°C (Abdel-Rahman et al., 2013). La temperatura óptima del proceso dependerá del sustrato y del microorganismo utilizado. En la mayoría de los casos, el crecimiento microbiano varía con la temperatura usada durante la fermentación, y la temperatura óptima para la máxima concentración de biomasa no es la misma que la óptima para el máximo rendimiento y productividad del proceso (Abdel-Rahman et al., 2011).

1.2.3.3 NUTRIENTES

Las bacterias ácido-lácticas requieren ciertas cantidades de nutrientes para su crecimiento. Aunque la fuente de carbono es importante para el crecimiento y la reproducción bacteriana, la suplementación del medio de cultivo con minerales, vitaminas y nitrógeno es esencial para el crecimiento, mantenimiento y producción de ácido láctico (Bouabidi et al., 2018).

Dentro de los elementos de más importancia en la nutrición, el carbono se encuentra en forma de azúcares con alto contenido energético, mientras que el nitrógeno actúa como componente principal en los procesos metabólicos y anabólicos, encontrándose disponible en compuestos orgánicos, aminoácidos y péptidos. La elección de una fuente de carbono a una concentración apropiada puede resultar un factor determinante ya que la inhibición por sustrato afecta el rendimiento y la productividad en la producción de ácido láctico. Cuando la concentración de sustrato es muy alta, pueden ocurrir problemas como el estrés osmótico, una fase lag más larga, baja actividad y lisis celular (Gonzalez-Leos et al., 2019).

Otro factor importante en la producción de ácido láctico es la relación entre el carbono y el nitrógeno. Una relación C/N aceptable resulta en un efecto positivo en la fermentación ácido-láctica, y puede ser obtenido agregando fuentes de nitrógeno complejas al medio de cultivo, tales como peptona, extracto de levadura y extracto de carne, o algunas fuentes más simples como urea y sulfato de amonio (Hofvendahl et al., 2000). Entre estos, el extracto de levadura es muy eficiente en la producción de ácido láctico. Como se mencionó anteriormente, las bacterias ácido-lácticas son auxótrofas para muchas vitaminas y aminoácidos. El extracto de levadura es capaz de compensar estos requerimientos nutricionales complejos, ya que contiene péptidos, aminoácidos, vitaminas, elementos traza y ácidos nucleicos (Klotz et al., 2017), pero puede aumentar el costo del proceso. Fuentes de nitrógeno alternativas que presenten un menor costo pueden ser por ejemplo el Corn Steep Liquor, harinas de pescado, larvas de gusano de seda y extractos de salvado de trigo (Kiros et al., 2017).

Además de las fuentes de carbono y nitrógeno, los minerales y vitaminas también juegan un papel importante en la fermentación ácido-láctica. La adición de sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, sulfato ferroso y piridoxina puede estimular el crecimiento microbiano (Wang et al., 2015).

1.2.4 FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO MEDIANTE EL USO DE HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS

El estudio del balance entre los distintos componentes nutricionales de un medio de cultivo, que favorezcan la producción del metabolito de interés, puede ser abordado ya sea por métodos convencionales o estadísticos. Los métodos convencionales involucran el cambio de una única variable independiente mientras que las demás permanecen en un nivel fijo. Por otra parte, los métodos estadísticos ofrecen muchas ventajas sobre los convencionales, ya que son rápidos y confiables, arrojan los nutrientes con mayor efecto, ayudan a entender las interacciones entre los nutrientes en concentraciones variables y reducen notoriamente el número de experimentos, por lo que permiten ahorrar tiempo, material, reactivos y mano de obra (Chauhan et al., 2006).

El método de superficie de respuesta es un protocolo experimental diseñado de forma estadística, en el cual varios factores son estudiados de forma simultánea. Este método ha sido aplicado de forma progresiva en la optimización del crecimiento microbiano (Roebuck et al., 1995). El enfoque multivariado reduce el número de experimentos, mejora las posibilidades de interpretación estadística e indica las posibles interacciones entre las variables. El diseño compuesto central es el más usado para diseñar la superficie de respuesta. Aunque la rotabilidad es una propiedad deseable en un diseño compuesto central, en el caso de que extender los puntos axiales más allá de la región experimental definida por los límites inferiores y superiores para cada factor sea una dificultad, se

puede utilizar un diseño centrado en las caras (Neter et al., 1996). Ambos diseños se ilustran en la Figura 4.

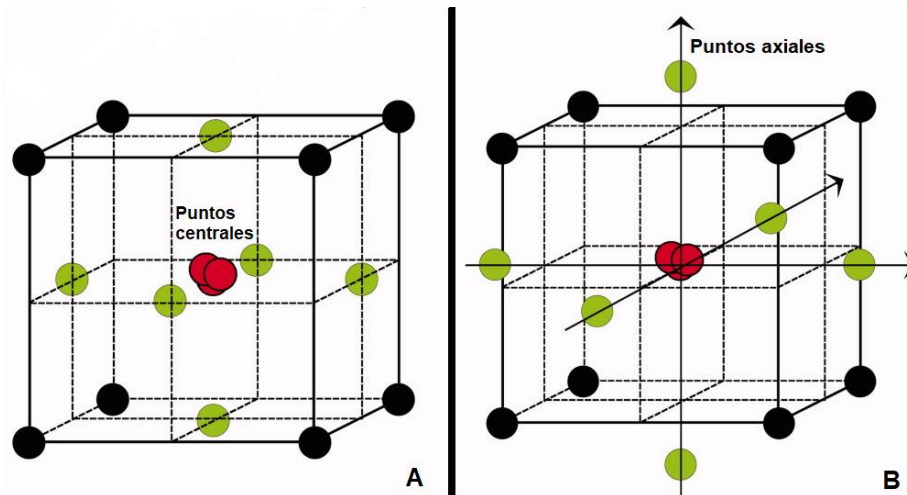


Figura 4. Ilustración de la región experimental definida en el diseño compuesto central. A) Diseño compuesto central centrado en las caras. B) Diseño compuesto central rotacional.

1.3 ECOSISTEMA ANTÁRTICO

Los ambientes fríos abarcan una gran superficie en la tierra; aproximadamente el 85% de la biosfera se encuentra constantemente expuesta a temperaturas menores a los 5°C, y alrededor del 14% corresponde a las regiones polares. La Antártida, el continente más al sur de la tierra, abarca aproximadamente 14 millones de km². Aproximadamente el 98% de este continente está cubierto por hielo y nieve, y las temperaturas en áreas costeras se encuentran típicamente dentro de un rango de -35°C y 5°C; sin embargo, las temperaturas en las áreas más alejadas de la costa pueden llegar a ser más extremas, desde los -70°C en invierno a los -25°C en verano. Es el continente que presenta las condiciones climáticas más severas del planeta, limitando la diversidad de seres vivos que se pueden encontrar, en comparación con otros ecosistemas de latitudes más bajas. La primavera y el verano austral permiten reducir la dureza de las condiciones en los ambientes antárticos (Camacho et al., 2005; Quintana et al., 1995).

Las islas Shetland del Sur están ubicadas en el océano Glaciar Antártico. La isla Rey Jorge es la más grande de este archipiélago. La península Fildes está ubicada al suroeste de la isla y es el área más extensa sin cobertura de hielo permanente de la misma. Durante la estación estival, el paisaje rocoso se cubre de pequeños arroyos y cañadas de deshielo que se forman con agua

proveniente del glaciar y nieve fundida. A medida que avanza el verano se forman alfombras de briófitas, líquenes y tapetes microbianos de forma aislada (Camacho et al., 2005).

La investigación biológica tiene una amplia expansión en zonas del mundo que son consideradas como extremas, ya sea por la temperatura, humedad u otras características peculiares; y dadas las características particulares de la Antártida, ese se convierte poco a poco en un lugar atractivo para investigaciones. Para tener una referencia cuantitativa del auge de la investigación científica en la Antártida, en materia biológica y de bioprospección antártica como tal, entre 1988 y 1989 existía una sola patente proveniente de la bioprospección antártica (Johnson et al., 2005), mientras que para el año 2013 se registraron un total de 185 patentes (Villamizar Lamus et al., 2013).

La mayoría de los microorganismos cultivables que habitan el continente antártico son mesófilos y ocupan nichos temporales que no son considerados como extremos. Por el contrario, los microorganismos psicrótróficos o psicrófilos están especialmente adaptados a los ambientes con bajas temperaturas. Al crecer en bajas temperaturas, presentan varias restricciones en su crecimiento, como la reducción en las velocidades de las reacciones enzimáticas, mayor eficiencia en el sistema de transporte y en la fluidez de membranas, y mayor estabilidad de las estructuras de los ácidos nucleicos. La habilidad de estos microorganismos para prosperar a bajas temperaturas depende de numerosas adaptaciones, necesarias para mantener las velocidades metabólicas y sostener el crecimiento de forma compatible con la vida en el frío (Tsuji et al., 2016).

Las condiciones extremas del ambiente antártico hacen que este resulte atractivo para la búsqueda de microorganismos como posibles nuevas fuentes de compuestos de interés biotecnológico (Vila et al., 2019). Las bacterias ácido-lácticas (LAB), son microorganismos ampliamente estudiados. Sin embargo, existen pocos trabajos sobre las mismas en la Antártida.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

En este trabajo se propone evaluar la importancia de diferentes parámetros fisicoquímicos, así como la composición del medio de cultivo, en la producción de ácido láctico mediada por una cepa bacteriana antártica.

2.1 OBJETIVOS GENERALES

El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de bacterias ácido-lácticas psicrófilas y/o psicotolerantes, provenientes de ambientes antárticos, en la producción de ácido láctico y su posible aplicación biotecnológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtención de cultivos puros de cepas bacterianas productoras de ácido.
2. Clasificación morfológica y posterior identificación a nivel de género de las cepas seleccionadas.
3. Selección de la cepa que presenta mayor producción (en g/L) de ácido láctico.
4. Definir las condiciones del bioproceso para la producción de ácido láctico para la cepa seleccionada (temperatura, pH, medio de cultivo).

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS, ALMACENAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS

3.1.1 PROCESAMIENTO

Se recolectaron 18 muestras sólidas y líquidas (en tubos estériles de 50 mL) de la Península Fildes en la Isla Rey Jorge, durante una expedición organizada por el Instituto Antártico Uruguayo durante el mes de febrero de 2020. Aproximadamente 100 mg de cada muestra fueron resuspendidos en 900 μ L de suero fisiológico estéril (NaCl 0,9% w/v) para realizar diluciones seriadas que posteriormente fueron sembradas en los medios adecuados.

Las muestras provenientes de materia orgánica, suelo y sedimento fueron sembradas en condiciones aerobias, en los siguientes medios: YPD-Br e YPG-Br (ver Anexo 1). Los cultivos fueron incubados a 20°C por 72 h. Las muestras provenientes de agua fueron aisladas en tubos de Man, Rogosa and Shape (MRS) agar inclinado con bromofenol azul al 0,002% en condiciones anaerobias, mediante el gaseado con N₂, e incubadas a 4°C y 15°C durante 72h.

Aquellas colonias capaces de producir un cambio de color en el medio a su alrededor (debido a la disminución del pH) indicando la producción de ácido, fueron aisladas con la técnica de estriado en el mismo medio hasta obtener un cultivo puro. Las cepas obtenidas fueron denominadas acorde al nombre de la muestra de origen.

3.1.2 GUARDADO DE CEPAS

Una vez que la pureza fue verificada, tras la obtención consecutiva de tres repiques axénicos, las cepas fueron guardadas en ultrafreeezer a -80°C en perlas de vidrio con 20% de glicerol en el medio de cultivo. En caso de las cepas aerobias se utilizó Tryptic Soy Broth (TSB, Oxford). Las cepas anaerobias fueron guardadas en 20% de leche descremada (ver Anexo 1) y 80% de glicerol.

3.1.3 CARACTERIZACIÓN

Las cepas fueron caracterizadas en base a la morfología de las colonias obtenidas mediante observación con lupa, y por su morfología celular y tinción de Gram mediante observación con microscopio óptico.

3.1.4 AMPLIFICACIÓN DEL GEN 16S ARN RIBOSOMAL Y SECUENCIACIÓN

Las 9 cepas seleccionadas fueron identificadas genéticamente mediante la secuenciación del gen 16S ARNr. El ADN fue extraído utilizando el GeneJET Genomic DNA Purification Kit #K0721, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La amplificación del fragmento 16S ARNr se realizó en una mezcla de reacción con un volumen total de 50 µL conteniendo: 2,5 U de MangoTaq Polimerasa (Bioline), 10 µL de solución buffer (5X), 2,5 µL de una solución 50 mM de MgCl₂, 2,5 µL de cada uno de los cebadores universales (0,5 µM) 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), y 8 µL de una dilución 1/50 de ADN genómico. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Palm-1870 Cyclor™ (Corbett Research UK Ltd.) con el siguiente ciclo: desnaturalización inicial 3 min a 95°C, luego 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 58°C, 60 s a 72°C, y un paso de extensión final de 9 min a 72°C.

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (1%), a 70 V. El tamaño de los amplicones fue determinado utilizando un marcador de peso molecular (GeneRuler Plus DNA Ladder, ThermoScientific). La secuenciación de los fragmentos amplificados fue realizada por Macrogen Inc. (Corea) utilizando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTAG-3'), 758F (5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3'), 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3') Y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3').

Las secuencias de ADN obtenidas para cada aislamiento fueron alineadas por CLUSTALW (Thompson et al., 1994), utilizando MEGA 7 (Kumar et al., 2016). Las secuencias ensambladas de ADN obtenidas fueron analizadas en BLASTn (Altschul et al., 1990) y comparadas con las secuencias del gen 16S ARNr de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.2 ENSAYOS DE FERMENTACIÓN

3.2.1 DESARROLLO DE INÓCULO

Las cepas aerobias fueron descongeladas y cultivadas en sus respectivos medios sólidos y almacenadas a 20°C de 5 a 6 días. Posteriormente fueron inoculadas, mediante la suspensión de una colonia, en 75 mL de sus respectivos medios líquidos en matraces de 250 mL e incubadas a 20 °C en shaker orbital a 200 rpm durante 24 horas.

Las cepas anaerobias fueron descongeladas en MRS agar en tubos inclinados, en atmósfera de N₂, y almacenadas a 20°C de 5 a 6 días. Posteriormente fueron inoculadas, mediante la suspensión de una colonia, en botellas de 50 mL conteniendo 25 mL de medio e incubadas a 20°C en shaker orbital a 200 rpm durante 24 horas. Las botellas fueron llevadas a anaerobiosis mediante gaseado con N₂ y posterior sellado hermético de las mismas con precinto metálico.

En el caso de las cepas aerobias, se extrajo el volumen correspondiente al 10% v/v del medio de fermentación. El volumen extraído fue centrifugado a 6500 rpm, a 4°C durante 10 minutos. El pellet obtenido se resuspendió en 5 mL de suero fisiológico utilizando agitador tipo vortex y vuelto a centrifugar en las mismas condiciones. Por último, se adicionaron 5 mL de medio fresco y se resuspendió el pellet nuevamente para ser utilizado como inóculo de la fermentación.

Para las cepas anaerobias se inocularon medios de fermentación con 10% v/v de los cultivos anteriores en fase exponencial.

3.2.2 FERMENTACIONES

Cada ensayo de fermentación se realizó a 20°C, por duplicado, en matraz Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 125 mL del medio de cultivo correspondiente según la cepa. Se mantuvieron durante 72 horas en un shaker orbital a 200 rpm. Se extrajeron 2 mL de muestra, cada 24 horas, para analizar la concentración celular, glucosa y/o glicerol, ácido láctico y ácido acético. El crecimiento celular fue analizado mediante la medida de la densidad óptica del cultivo a 600 nm (OD₆₀₀). Una vez finalizada la fase exponencial, se centrifugaron las muestras a 6500 rpm, a 4°C durante 10 minutos (Thermo Scientific, IEC CL30R) y se guardaron los sobrenadantes en freezer a -20°C para su posterior análisis.

En el caso de las cepas anaerobias, la fermentación fue llevada a cabo en botellas con sellado hermético de 100 mL, conteniendo 50 mL de medio de cultivo.

3.2.3 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO CELULAR Y LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Se realizaron cultivos a 10, 15, 20, 25 y 30°C, por duplicado, en shaker orbital, de acuerdo con lo descrito en la sección 3.2.2. Se tomaron muestras cada 24 horas para monitorear el crecimiento celular, el consumo de glucosa y la producción de ácido láctico.

3.2.4 ESTUDIO DEL EFECTO DEL PH EN EL CRECIMIENTO CELULAR Y LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Se realizaron cultivos con la cepa elegida por duplicado en shaker orbital, según lo descrito en la sección 3.2.2. Se trabajó en un rango de pH de 5 a 9, utilizando buffer Citrato 0,15 M para pH 5 y 0,1 M para pH 6, buffer fosfato (K_2HPO_4 - KH_2PO_4) 0,1 M para pH 7 y 0,01 M para pH 8 y buffer Glicina-NaOH 0,1 M para pH 9. Se tomaron muestras cada seis horas para monitorear el crecimiento celular, el consumo de glucosa y la producción de ácido láctico.

3.2.5 ESTUDIO DE LA FUENTE DE CARBONO

Se realizaron cultivos con la cepa elegida por duplicado en shaker orbital, según lo descrito en la sección 3.2.2. La fuente de carbono fue sustituida en el medio MRS por 20 g/L de los siguientes azúcares: arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, manosa, y xilosa. Se tomaron muestras cada seis horas para monitorear el crecimiento celular, el consumo de glucosa y la producción de ácido láctico.

3.2.6 ESTUDIO DE FUENTES DE NITRÓGENO

De la misma forma que en el punto 3.2.5 se llevaron a cabo cultivos manteniendo las condiciones enumeradas en 3.2.2. En este caso, se sustituyeron las fuentes de nitrógeno originales del medio MRS (peptona y extracto de carne) por 20 g/L de una de las siguientes fuentes de Nitrógeno: Peptona, Urea, Sulfato de Amonio, Caseína, Triptona Vegetal.

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL DEL MEDIO DE CULTIVO

Método de superficie de respuesta

Se realizó un diseño compuesto central rotacional (DCCR) para cuatro variables independientes en dos niveles cada una, con 8 puntos axiales y tres réplicas del punto central. A partir de este, se obtuvo un modelo polinomial de segundo orden, en el cual se determinaron los valores óptimos de las variables estudiadas para la producción de ácido láctico. Los factores estudiados fueron fructosa, sulfato de amonio, extracto de levadura y extracto de carne. Para cada variable se estudiaron dos niveles: alta concentración (+) y baja concentración (-). En la Tabla 2 se muestran los factores nutricionales estudiados y sus correspondientes niveles. En la Tabla 3 se presentan las corridas del DCCR.

Tabla 2. Niveles y valores de los factores estudiados en el DCCR.

Factor		Rangos y niveles				
		-2	-1	0	1	2
Fructosa (g/L)	X ₁	10	20	30	40	50
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	X ₂	2	11	20	29	38
Extracto de carne (g/L)	X ₃	0	2.5	5	7.5	10
Extracto de levadura (g/L)	X ₄	0	5	10	15	20

Tabla 3. Corridas del diseño compuesto central con sus diferentes niveles asignados.

Corrida	Fructosa	(NH ₄) ₂ SO ₄	Extracto de carne	Extracto de levadura
1	-1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1	-1
3	-1	-1	-1	1
4	-1	-1	1	1
5	-1	1	-1	-1
6	-1	1	1	-1
7	-1	1	-1	1
8	-1	1	1	1
9	1	-1	-1	-1
10	1	-1	1	-1
11	1	-1	-1	1
12	1	-1	1	1
13	1	1	-1	-1
14	1	1	1	-1
15	1	1	-1	1
16	1	1	1	1
17*	-2	0	0	0
18*	2	0	0	0
19*	0	-2	0	0
20*	0	2	0	0
21*	0	0	0	-2
22*	0	0	0	2
23*	0	0	-2	0
24*	0	0	2	0
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0
27	0	0	0	0

*Corridas correspondientes a los puntos axiales.

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software Infostat/Estudiantil versión 2019 para determinar las significancias estadísticas en las diferencias entre los datos ($p \leq 0,05$). El diseño experimental fue realizado utilizando el software Protimiza Experimental Designe.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1 SEGUIMIENTO DEL CRECIMIENTO CELULAR

El crecimiento celular fue determinado por turbidimetría, midiendo la densidad óptica a 600 nm con un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific). Las muestras fueron diluidas con agua destilada con el fin de obtener valores de absorbancia menores a 0,9 unidades. Se determinó la relación entre la densidad óptica y el peso seco de biomasa, y la concentración de biomasa se reportó en gramos de biomasa seca por litro de medio de cultivo (g/L). La determinación del peso seco de la biomasa celular se llevó a cabo filtrando 10 mL de un cultivo en fase estacionaria, midiendo la densidad óptica de diez diluciones por triplicado. La biomasa celular filtrada se secó en estufa a 105 °C hasta peso constante.

3.4.2 DETERMINACIÓN DE AZÚCARES Y ÁCIDO LÁCTICO

Los sobrenadantes provenientes de las fermentaciones fueron filtrados utilizando filtros de PVDF de 0,2 μm y posteriormente analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) utilizando un equipo Shimadzu CLASS-VP 5.04 equipado con un detector de Índice de Refracción (RID-10A). La glucosa, el glicerol, el ácido láctico y el ácido acético fueron identificados y cuantificados utilizando una columna AMINEX 87H, por comparación de las áreas y tiempos de retención obtenidos con los estándares correspondientes. La separación cromatográfica se realizó utilizando una fase móvil de H_2SO_4 0,05 M en agua ultrapura con un flujo de 0,3 mL/min a 45°C durante 40 minutos.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 AISLAMIENTO, PRESELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO

A partir de las dieciocho muestras recolectadas en el continente antártico, se aislaron doce cepas, de las cuales ocho fueron aisladas en condiciones aerobias a 20°C, una en condiciones aerobias a 4°C y tres en condiciones anaerobias a 4°C. Los medios de cultivo utilizados fueron complementados con un indicador de pH para observar la producción de ácido.

De las doce cepas obtenidas en primera instancia, se seleccionaron aquellas que fueron capaces de producir ácido.

A continuación, se muestran imágenes de algunas de las cepas seleccionadas para ilustrar el cambio de color en el medio de cultivo.

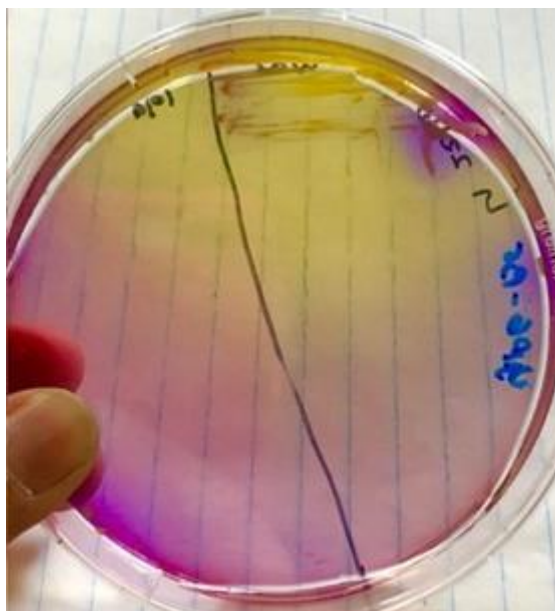


Figura 5. Foto de un cultivo en medio sólido con Bromocresol púrpura, en placa de Petri. Siembra en estrías de una colonia con 24 horas de incubación, se observa la presencia de un halo amarillo alrededor del estriado por la producción de ácidos.

De las doce cepas aisladas inicialmente, fueron preseleccionadas nueve debido a su capacidad de producir ácido según lo indicado anteriormente, dichas cepas se muestran en la Tabla 4.

Se realizó la correspondiente caracterización morfológica de las colonias de las cepas preseleccionadas y tinción de Gram. En la Figura 6 se pueden observar imágenes de las tinciones Gram para las cepas L141, L142, L8A, L8B, LUA e IA.

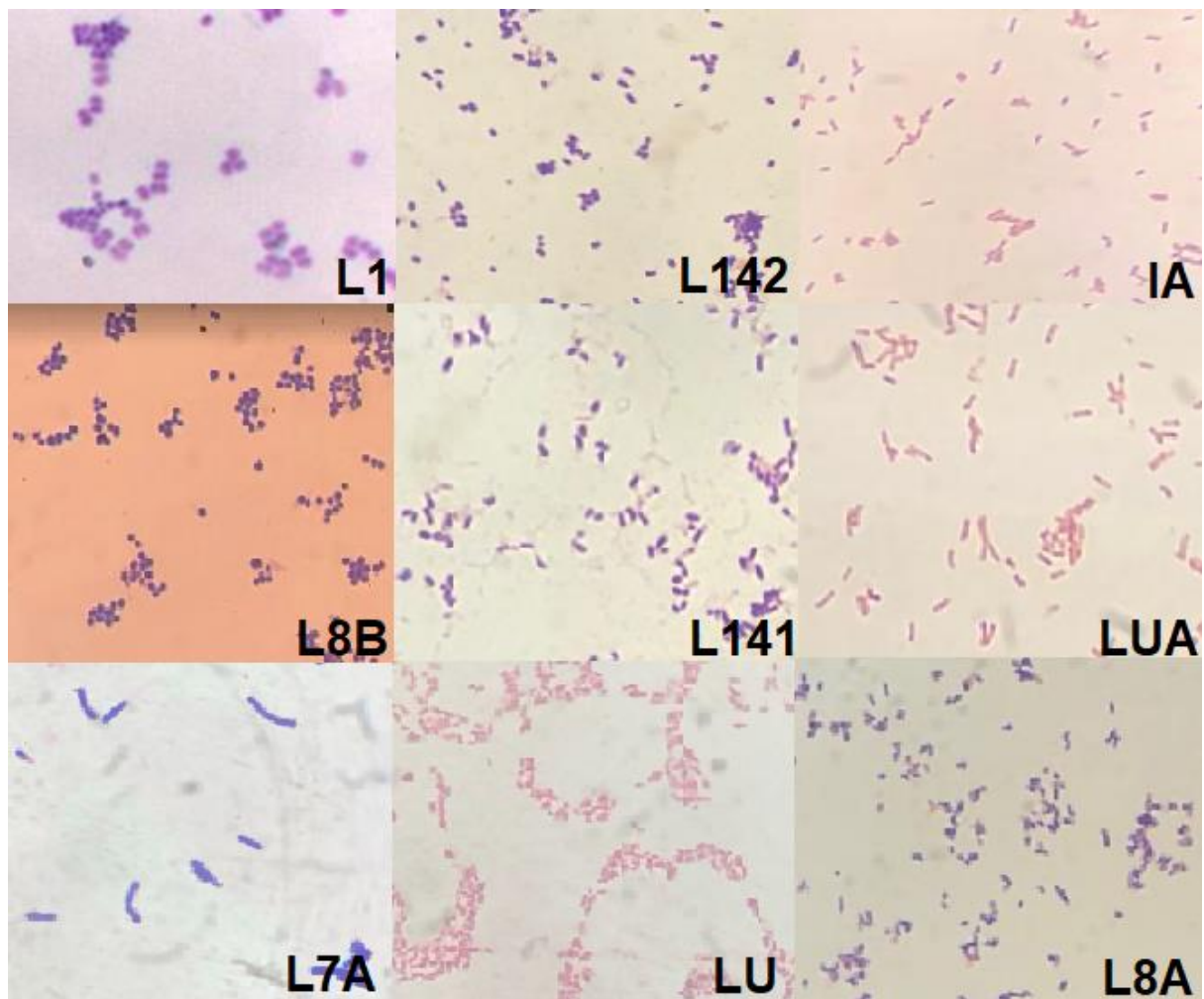


Figura 6. Observación al microscopio óptico (100X) de las Tinciones de Gram. Para las cepas L8A, L141 y L142 se observan cocobacilos Gram (+), para las cepas IA y LUA bacilos gram (+) y en el caso de la cepa L8B cocos Gram (+).

De forma paralela, se llevó a cabo la identificación de las cepas a nivel de género mediante la secuenciación del gen 16S ARNr. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 4.

Tabla 4. Características morfológicas e identificación a nivel de género las cepas preseleccionadas.

Nombre de la cepa	Morfología celular	Tinción de Gram	Color de colonias	Medio de cultivo	Microorganismo con mayor similitud en la base de datos	Identidad (%)
LUA	Bacilos	+	Blancas	MRS	<i>Carnobacterium gallinarum</i>	99
IA	Bacilos	+	Blancas	MRS	<i>Carnobacterium divergens</i>	100
L7A	Bacilos	+	Blancas	YPD-Br	<i>Bacillus proteolyticus</i>	100
L141	Cocobacilos	+	Amarillas	YPD-Br	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	98
L142	Cocobacilos	+	Amarillas	YPD-Br	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	99
L8A	Cocobacilos	+	Anaranjadas	YPG-Br	<i>Rhodococcus yunnanensis</i>	99
L8B	Cocos	+	Blancas	YPD-Br	<i>Staphylococcus edaphicus</i>	100
LU	Bacilos	+	Blancas	YPD-Br	<i>Pseudomonas silesinesis</i>	100
L1	Cocos	+	Amarillas	YPG-Br	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	100

Se obtuvieron cepas de seis géneros bacterianos distintos. Estos se encuentran dentro de los filos Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria. Las cepas L141, L142 y L8A fueron identificadas con el mismo género y podrían llegar a ser de la misma especie. Esto podría verificarse utilizando otras técnicas de biología molecular, tales como hibridación ADN-ADN, alineación de secuencias genómicas o *finger printing*. Todos los géneros obtenidos fueron identificados en la Antártida por trabajos previos (Gundlapalli et al., 2004; Hongcan et al., 2000; Lavin et al., 2013; Pantůček et al., 2018; Ruberto et al., 2005; Zhu et al., 2018). Por otro lado, los géneros *Carnobacterium*, *Bacillus* y *Pseudomonas* han sido identificados como potenciales productores de ácido láctico a nivel industrial (Camesasca et al., 2021; Corry et al., 2003).

Para la cepa L1, el resultado arrojado por la secuenciación del gen 16S ARNr indica la pertenencia al género *Micrococcus*, el cual se encuentra dentro del filo Actinobacteria. Algunas de las especies de este género se caracterizan por la formación de filamentos ramificados que se asemejan de cierta forma a los micelios de los hongos (Barka et al., 2016). En la Figura 7, se pueden observar estas estructuras características, presentes en un cultivo L1 de 72 horas.

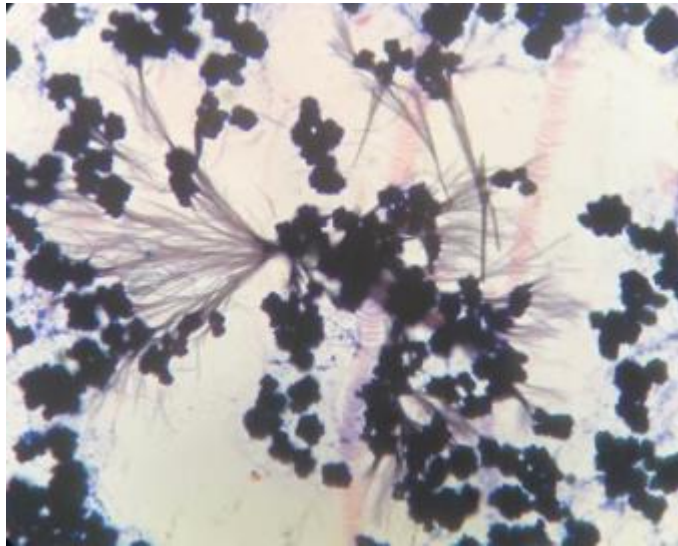


Figura 7. Observación al microscopio óptico de un cultivo de L1 con 72 horas de incubación.

4.2 SELECCIÓN DE LAS CEPAS CON MAYOR POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

Con el objetivo de identificar los ácidos producidos por las cepas preseleccionadas, se realizaron análisis de HPLC de cultivos de 72 horas de dichas cepas, en sus respectivos medios de cultivos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentración de sustrato consumido y ácidos producidos durante la fermentación de las cepas preseleccionadas.

Cepa	Consumo de glucosa (g/L) *	Ácido láctico (g/L) *	Ácido acético (g/L) *
L141	5,6 ± 1,1	1,8 ± 0,3	0,9 ± 0,2
L142	8,1 ± 0,4	1,6 ± 0,2	0,1 ± 0,1
L8B	7,9 ± 1,4	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,6
L7A	20,0 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,4 ± 0,1
LU	3,7 ± 0,5	1,4 ± 0,1	1,9 ± 0,3
IA	18,6 ± 0,5	7,5 ± 0,3	0,8 ± 0,0
LUA	11,7 ± 0,4	8,2 ± 1,8	0,8 ± 0,0

*Valores promedio ± desviación estándar de ensayos realizados por duplicado.

A partir de la Tabla 5 podemos concluir que las cepas con mayor producción de ácido láctico en las condiciones ensayadas fueron IA y LUA, para las cuales se obtuvo una acumulación de 7,5 ± 0,3 g/L y 8,2 ± 1,8 g/L respectivamente. En el caso de las cepas cultivadas con glicerol como fuente de carbono (L8A y L1), no fue posible verificar la producción de ácido láctico ni cuantificar el consumo de sustrato. Esto se debe a que el glicerol y el ácido láctico coeluyen en el mismo tiempo de retención. Además, ambas cepas fueron identificadas dentro del filo Actinobacteria, para el cual no se encuentran géneros identificados como productores de ácido láctico.

En el caso de las demás cepas, la producción de ácido observada con el uso del indicador de pH durante la etapa de selección inicial puede deberse a que son capaces de producir ácido láctico, pero en muy bajas concentraciones, o a la producción de otros ácidos orgánicos (Kaminski et al., 2018; Pantůček et al., 2017; Zhang et al., 2005; Zhao et al., 2009).

Las bacterias pertenecientes al género *Carnobacterium* son consideradas homofermentativas, producen ácido láctico a partir del consumo de glucosa. En el caso de *Carnobacterium divergens*, estudios previos demuestran que esta especie es capaz de metabolizar glucosa a través de la vía glucolítica, presentando un metabolismo homofermentativo (Borch et al., 1986; Juturu & Wu 2015).

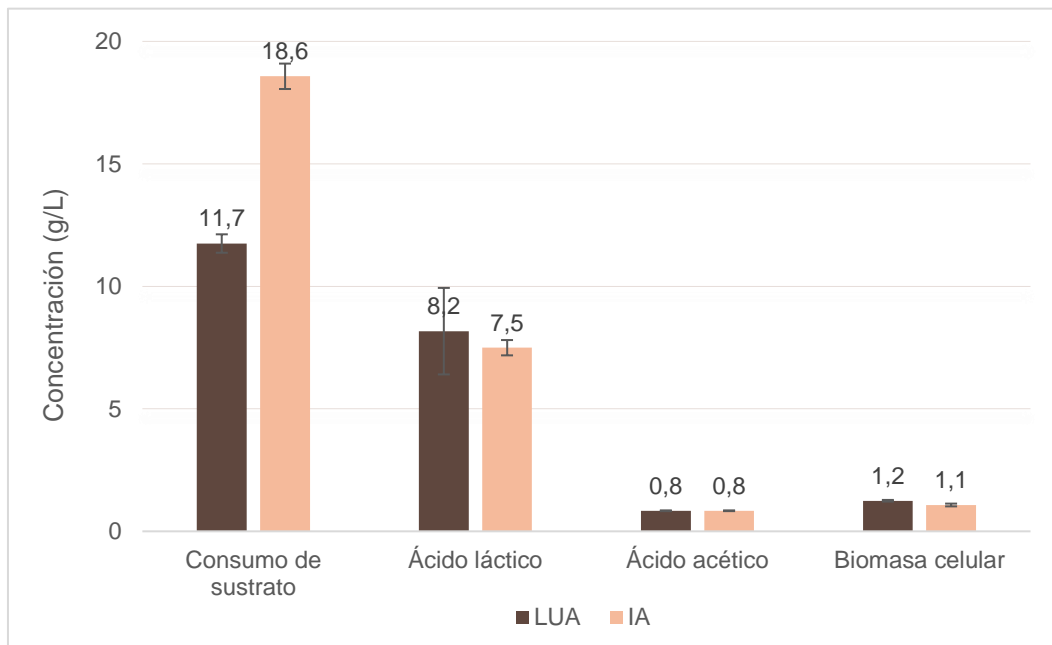


Figura 8. Cuantificación del consumo de sustrato, ácido láctico producido, ácido acético presente y concentración celular a las 72 horas de un cultivo a 20°C y 200 rpm.

Del análisis estadístico de los datos mostrados en la Figura 8, se deduce que la diferencia en la producción de ácido láctico para ambas cepas no es significativa, por lo que en primera instancia cualquiera de las dos podría ser seleccionada para continuar con los objetivos planteados.

Con el fin de elegir una cepa para poder continuar con los objetivos planteados, se realizó el cálculo de los coeficientes estequiométricos $Y_{p/s}$ e $Y_{p/x}$, a partir de los valores obtenidos en la Figura 7. El análisis estadístico de estos coeficientes muestra una diferencia significativa entre los resultados obtenidos para las dos cepas. El $Y_{p/s}$ obtenido para IA fue de 0,4 mientras que para LUA fue de 0,7. Este último se acerca más 1, valor del rendimiento teórico esperado para este proceso (Abdel-Rahman et al., 2013). El $Y_{p/x}$ para IA fue de 6,0 g/g, mientras que para LUA fue 7,5 g/g.

Debido a lo mencionado anteriormente, se seleccionó la cepa LUA para el estudio de las condiciones de producción.

4.3 ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN EL RENDIMIENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR LA CEPA LUA

Se procedió a estudiar el efecto de los factores fisicoquímicos, temperatura y pH, sobre la producción de ácido láctico por la cepa LUA, perteneciente al género *Carnobacterium*, seleccionada en la etapa anterior. Una vez determinadas las condiciones óptimas de temperatura y pH que favorecieron la producción de ácido láctico, se determinó la importancia de la composición del medio de cultivo en la producción. Para ello se evaluaron diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, así como el efecto de otros componentes a diferentes concentraciones.

4.3.1 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

En primer lugar, se estudió la influencia de la temperatura en la producción de ácido láctico, realizando fermentaciones a 10, 15, 20, 25 y 30°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentración de biomasa, consumo de sustrato y producción de ácidos a diferentes temperaturas en botellas agitadas a 200 rpm luego de 72 horas de fermentación.

Temperatura (°C)	Biomasa (g/L)	Consumo de glucosa (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Ácido acético (g/L)
10	0,7 ± 0,1	0,0 ± 0,0	1,8 ± 0,4	0,7 ± 0,0
15	0,7 ± 0,0	3,4 ± 1,2	1,6 ± 0,1	2,9 ± 0,0
20	1,3 ± 0,1	17,9 ± 0,4	6,3 ± 0,4	1,6 ± 0,0
25	0,8 ± 0,0	13,4 ± 0,2	5,5 ± 0,1	2,3 ± 0,0
30	0,7 ± 0,0	2,6 ± 0,1	4,3 ± 0,0	0,7 ± 0,0

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos para la concentración de biomasa, el consumo de sustrato y la producción de ácido láctico y ácido acético a las diferentes temperaturas ensayadas. Se obtuvo crecimiento microbiano a todas las temperaturas ensayadas. La concentración de biomasa a 20°C fue de $1,3 \pm 0,1$ g/L, decreciendo a $0,7 \pm 0,1$ g/L cuando la temperatura fue inferior (10 y 15°C) y a $0,8 \pm 0,0$ g/L y $0,7 \pm 0,0$ g/L cuando la temperatura fue mayor (25 y 30°C respectivamente).

La producción de ácido láctico fue estadísticamente igual para 10 y 15 °C y para 20, 25 y 30°C, alcanzando un valor promedio de 1,7 g/L en el primer caso y 5,4 g/L en el segundo caso. Se seleccionó la condición de 20°C para continuar con los objetivos del trabajo, ya que a esta temperatura se obtuvo el máximo crecimiento celular.

Las distintas cepas de bacterias ácido-lácticas difieren en sus requerimientos de temperatura, pero, en general, los resultados obtenidos coinciden con los datos publicados en trabajos anteriores. En el caso de *Carnobacterium gallinarum*, el rango de temperatura de crecimiento reportado es de 0 a 35°C (Schillinger et al., 1995), lo que concuerda con los resultados obtenidos. Para *C. Maltaromaticum*, la temperatura óptima de crecimiento reportada es 28°C (Edima et al., 2008). En el caso de *C. divergens*, la temperatura óptima reportada es 23°C (Masson et al., 1997).

4.3.2 INFLUENCIA DEL PH

De acuerdo con trabajos previos, el crecimiento de las especies de *Carnobacterium* se encuentra inhibido a pH 4,5, por otro lado, muestran buen crecimiento a pH 9 (Edima et al., 2008). Además, los resultados indican que en aquellas fermentaciones en donde el pH del medio de cultivo se mantiene constante, la concentración de ácido láctico obtenida es mayor o igual que en aquellas en las que no hay control de pH (Hofvendhal et al., 2000).

Para estudiar la influencia del pH en la producción de ácido láctico por la cepa LUA, se realizaron ensayos a 20°C en botellas agitadas, manteniendo el pH del medio de cultivo a 5, 6, 7, 8 y 9. Los buffers utilizados para cada caso se muestran en materiales y métodos. En simultáneo, se realizaron controles sin buffer, es decir, corrigiendo el cambio en el pH durante los muestreos mediante el agregado de NaOH 1M y HCl 1M según fuera necesario. Estos controles se mantuvieron a pH 5, 7 y 9. El objetivo de los controles fue verificar que las diferencias en los parámetros observados se debieran únicamente al pH y no al posible consumo de algún componente del buffer.

A partir de los resultados obtenidos se observó que a pH 5 no hay crecimiento celular. Por lo tanto, el crecimiento de LUA se vio inhibido a pH menor a 6, lo cual coincide con lo descrito anteriormente. Para el resto de los pH estudiados, el crecimiento celular se mantuvo constante, sin

diferencias estadísticamente significativas. En todos los casos (a excepción de pH 5) el consumo de glucosa a las 72 horas de fermentación fue total.

A pesar de que a pH 6 la concentración de biomasa celular alcanzada fue la misma que a pH mayores, la concentración de ácido láctico en este caso fue la menor para el rango ensayado (sin tener en cuenta pH 5), alcanzando apenas los $3,2 \pm 0,5$ g/L. Este valor es inferior al obtenido en las fermentaciones sin control de pH realizadas en etapas anteriores.

Debido a que el crecimiento de la biomasa se mantiene constante en el rango de pH 7-9, se calcularon los coeficientes estequiométricos y las velocidades iniciales de producción de ácido láctico para las fermentaciones realizadas a pH 7, 8 y 9. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.

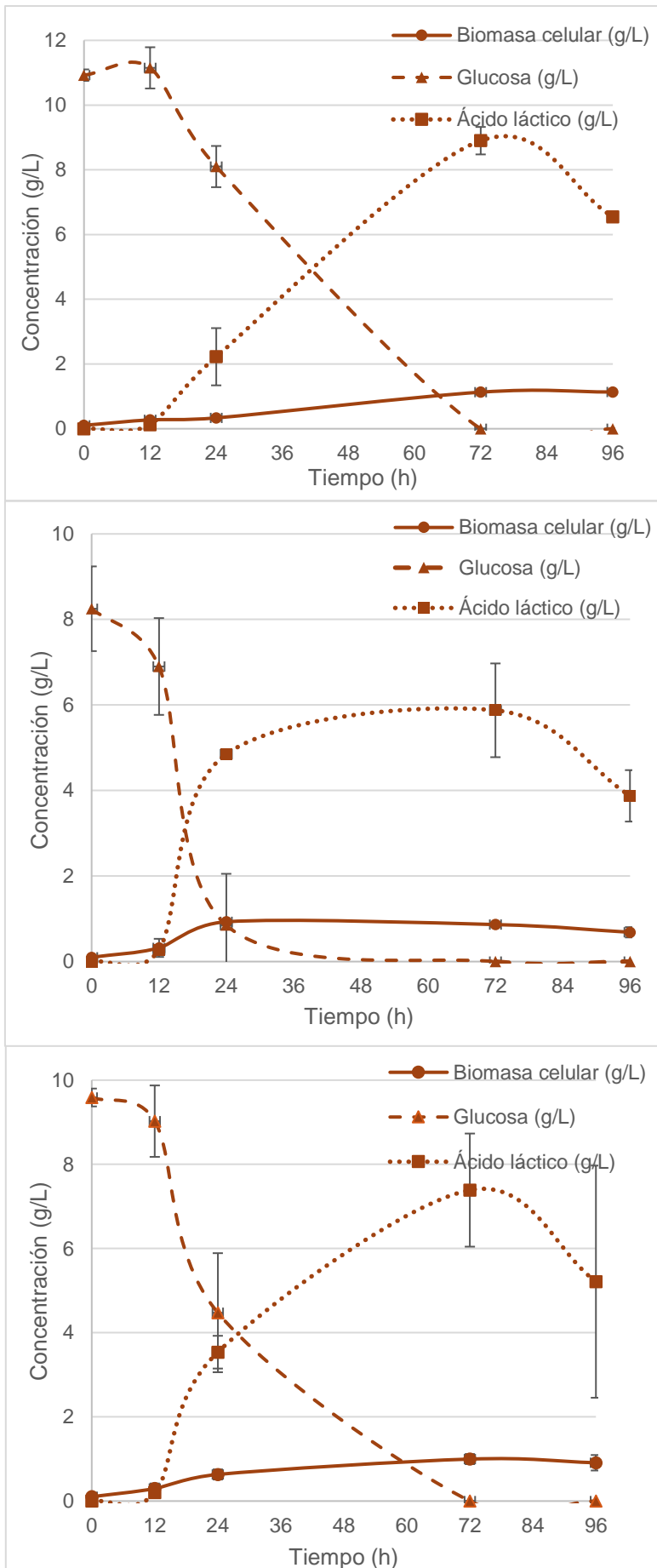


Figura 9. Fermentación de glucosa llevada a cabo por LUA, a 20°C para cada pH estudiado. A) pH 7, B) pH 8, C) pH 9. En trazo continuo el perfil de biomasa vs tiempo, en trazo discontinuo el perfil de glucosa vs tiempo, y en trazo puntuado el perfil de ácido láctico vs tiempo.

El perfil de producción de ácido láctico en todos los casos presentados se asemeja a una función exponencial. A tiempos iniciales, la relación lineal entre la concentración de ácido láctico y el tiempo nos permite calcular las velocidades iniciales de producción, momento en el cual los efectos de inhibición pueden considerarse despreciables. Los valores de las pendientes de cada gráfico se encuentran en la Tabla 7. En los gráficos se observa además que el crecimiento de biomasa es constante en los tres casos, y que, a las 72 horas de fermentación, todo el sustrato fue consumido.

Si se observa el comportamiento de la producción de ácido láctico entre las 72 y las 96 horas, la concentración de ácido láctico disminuye en los tres casos (Figura 9). Este comportamiento ocurre luego de que se consume todo el sustrato, lo que podría indicar que la cepa de trabajo es capaz de consumir el lactato en ausencia de otras fuentes de carbono. Este fenómeno del metabolismo de las bacterias ácido-lácticas ya ha sido previamente descrito (Kandler et al., 1983).

Tabla 7. Rendimiento en función del consumo de sustrato a las 72 horas de fermentación y velocidad inicial de producción de ácido láctico en función del pH.

pH	$Y^{p/s}$ (g/g)	V_i ácido láctico (h^{-1})
7	0,8 ^{a,b}	0,2 ^c
8	0,7 ^a	0,4 ^d
9	0,9 ^b	0,3 ^c

Como se observa en la Tabla 7, el rendimiento de producto por gramo de sustrato consumido en la condición de pH 9 fue 0,9 g/g, siendo este prácticamente igual al valor teórico para bacterias con metabolismo heterofermentativo. Para pH 7 el rendimiento de producto fue de 0,8 g/g, mientras que a pH 8 se obtuvo el rendimiento más bajo, siendo este de 0,7 g/g. Estos valores no presentan una diferencia estadística significativa. En cuanto a la velocidad inicial de producción de ácido láctico, los valores obtenidos sí presentan diferencias estadísticamente significativas. La velocidad inicial de producción de ácido láctico más alta se obtuvo para la fermentación a pH 8 ($0,4 h^{-1}$), esto concuerda con lo observado en la Figura 9, en donde la pendiente de la recta obtenida para pH 8 es visiblemente mayor que para pH 7 y 9. De esta forma, se decidió continuar trabajando a pH 8.

Debido a la dificultad en la manipulación que implica el control de pH mediante el agregado de una base en botellas cerradas herméticamente, sumado a la necesidad de esterilizar los

componentes del medio por separado en el caso del uso de buffers, para evitar la pérdida de nutrientes, se decidió trabajar en condiciones de pH inicial de 8.

4.4 DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

4.4.1 SELECCIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO

Con el objetivo de diseñar un medio de cultivo que favoreciera la producción de ácido láctico se realizó, en primera instancia, un estudio de las fuentes de carbono capaces de ser consumidas por la cepa LUA. Los azúcares ensayados fueron arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, maltosa, manosa y xilosa. Los ensayos fueron realizados utilizando MRS como medio de cultivo (sustituyendo la glucosa por cada azúcar) a pH inicial 8, en botellas agitadas a 20°C.

Los resultados obtenidos indican que en todos los casos hubo crecimiento de biomasa, pero no hubo diferencias significativas entre las distintas fuentes de carbono. Sin embargo, al observar la columna correspondiente al consumo de sustrato, cuando se utiliza galactosa como fuente de carbono, el consumo de sustrato a las 72 horas de fermentación es de $0,0 \pm 0,0$ g/L, por lo que el microorganismo no fue capaz de consumir este azúcar y es probable que haya utilizado algún otro componente del medio de cultivo como fuente de carbono, como por ejemplo la peptona. En el caso de la arabinosa, el consumo máximo fue de $0,7 \pm 0,1$ g/L, por lo que este sustrato tampoco es metabolizado de manera efectiva por la cepa de trabajo, algo similar ocurrió con la xilosa, siendo el consumo máximo obtenido $1,6 \pm 0,7$ g/L. La cepa LUA aislada presenta un mayor porcentaje de identidad con la especie *Carnobacterium gallinarum* (99%), para la cual trabajos anteriores describen que no es capaz de producir ácido a partir de arabinosa y xilosa (Hammes et al., 2006; Schillinger et al., 1995), esto coincide con los resultados obtenidos en este trabajo.

Cuando se utilizó fructosa como sustrato, la concentración de ácido láctico alcanzada fue de $6,4 \pm 0,5$ g/L, mientras que cuando se utilizó glucosa, en este ensayo la concentración de ácido láctico alcanzada fue de $6,5 \pm 0,1$ g/L. El análisis estadístico de estos valores indica que no hay diferencias significativas en el uso de fructosa y glucosa como fuente de carbono para la producción de ácido láctico.

Tabla 8. Concentración de biomasa celular, consumo de sustrato y ácido láctico producido para cada fuente de carbono ensayada. Los valores presentados corresponden a la muestra tomada a las 72 horas de fermentación.

Fuente de carbono	Biomasa celular (g/L)	Consumo de azúcar (g/L)	Ácido láctico (g/L)
Arabinosa	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,0 ± 0,0
Celobiosa	1,0 ± 0,3	6,6 ± 2,5	0,1 ± 0,1
Fructosa	0,8 ± 0,2	7,0 ± 1,6	6,4 ± 0,5
Galactosa	0,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Glucosa	0,9 ± 0,0	7,3 ± 0,4	6,5 ± 0,0
Maltosa	0,9 ± 0,1	8,3 ± 1,4	4,0 ± 0,6
Manosa	1,0 ± 0,4	5,6 ± 0,9	4,1 ± 0,2
Xilosa	0,6 ± 0,0	1,6 ± 0,7	0,0 ± 0,0

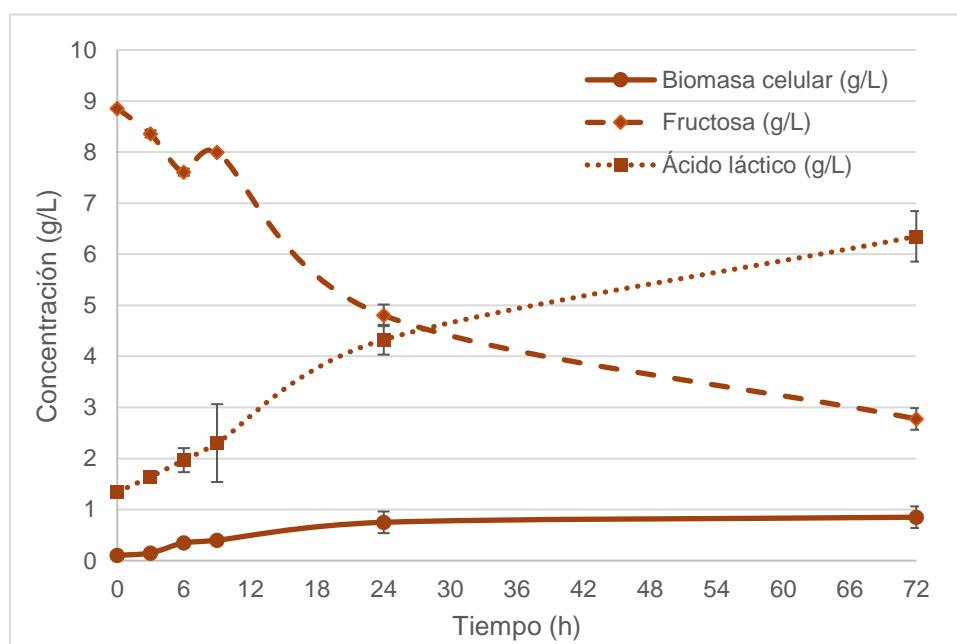


Figura 10. Perfil del consumo de sustrato, crecimiento celular y producción de ácido láctico por LUA, en medio MRS utilizando fructosa como fuente de carbono, con pH inicial 8 y a 20°C en botellas agitadas.

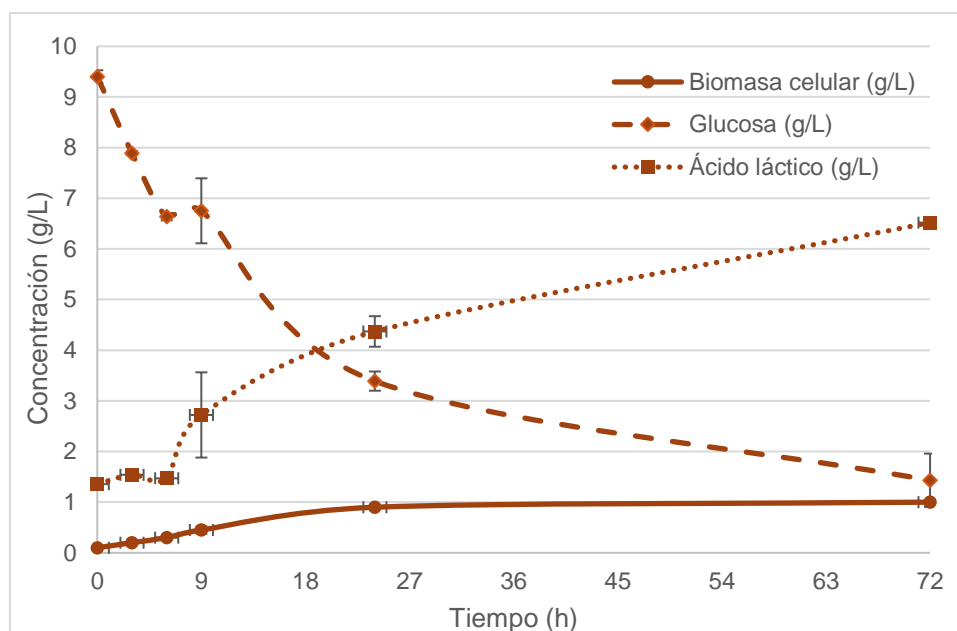


Figura 11. Perfil del consumo de sustrato, crecimiento celular y producción de ácido láctico por LUA, en medio MRS utilizando glucosa como fuente de carbono, con pH inicial 8 y a 20°C en botellas agitadas.

La fructosa es un isómero estructural de la glucosa que ofrece una alternativa razonable al uso de la misma, ya que su captación y utilización se encuentran más reguladas. Estudios comparativos demuestran que cuando los medios de cultivo son suplementados con fructosa, la excreción de acetato es menor en comparación a la suplementación con glucosa (Giruca et al., 1993). La fructosa puede encontrarse en jarabes de maíz, frutas en descomposición, mieles provenientes de fuentes florales, etc. Estos sustratos pueden ser alternativas más económicas y sustentables.

Debido a que la mayoría de los trabajos realizados sobre la producción de ácido láctico por LABs se encuentra enfocada en el uso de glucosa como sustrato, en este trabajo se decidió continuar utilizando fructosa como fuente de carbono, con el fin de ampliar el conocimiento sobre el uso de este sustrato. Por otra parte, la utilización de fructosa como fuente de carbono, puede darle al uso de esta cepa un interés industrial, ya que la fructosa es una fuente de carbono presente en sustratos frecuentemente utilizados en la industria tales como el jugo de caña de azúcar, jugo de sorgo dulce, entre otros (Chwastek et al., 2015; Wu et al., 2015). Estas fuentes de carbono son ampliamente utilizadas en la producción de bioetanol, pudiendo resultar atractiva la generación de coproductos de mayor valor agregado en el marco del concepto de biorrefinerías.

4.4.2 SELECCIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO

Una vez determinada la fuente de carbono a utilizar, se procedió a realizar un estudio de las fuentes de nitrógeno en base a su efecto en la producción de ácido láctico. Se llevaron a cabo fermentaciones en botellas agitadas a 20°C durante 48 horas, utilizando MRS como medio de cultivo, con fructosa como de sustrato y pH inicial de 8. Las fuentes de nitrógeno ensayadas fueron peptona, triptona vegetal, caseína, urea y sulfato de amonio. Este ensayo se realizó sin el agregado de extracto de carne al medio de cultivo. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

Durante este ensayo, no fue posible realizar el seguimiento del crecimiento celular por densidad óptica, ya que las células no se encontraban en una suspensión homogénea, sino que parecían formar agregados que no permitían la determinación de la turbidez. En este caso, la biomasa celular fue medida a tiempo final de la fermentación por peso seco.

La formación de estos agregados celulares pudo haber sido causada por el déficit nutricional del medio de cultivo, ya que como se mencionó anteriormente, no se suplementó con extracto de carne. Las bacterias del género *Carnobacterium* son en su mayoría aisladas a partir del intestino de animales (Laursen et al., 2005; Ringø et al., 1998), por lo que podría haber algún componente del extracto de carne que fuera necesario para el crecimiento de estas bacterias.

La ausencia del extracto de carne también pudo haber influido en el metabolismo catabólico o afectar la disponibilidad del sustrato (Danielski et al., 2019). Esto puede observarse en el consumo de fructosa. Cuando se utilizó peptona en presencia de extracto de carne a las 24 horas de fermentación este fue de $4,1 \pm 0,6$ g/L, mientras que, en ausencia de extracto de carne, a las 48 horas, apenas alcanzaba los $3,1 \pm 0,2$ g/L. El extracto de carne es un componente rico en vitaminas del complejo B, las cuales son esenciales para el crecimiento de las bacterias del género *Carnobacterium* (Hofvendahl et al., 2000).

Comparando los resultados de producción de los ensayos en concentración de ácido láctico (g/L), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes fuentes de nitrógeno. Es por esto que se decidió analizar los rendimientos de producto en base al consumo de sustrato. El mayor rendimiento de producto obtenido ocurre cuando se utiliza sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, siendo este de 1,9 g/g.

Tabla 9. Consumo de sustrato, crecimiento celular, concentración de ácido láctico y rendimiento de producto por gramo de fructosa en función de la fuente de nitrógeno utilizada.

Fuente de Nitrógeno	Biomasa celular (g/L)	Consumo de fructosa (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Yp/s (g de ácido láctico/g de fructosa)
Peptona	0,9 ± 0,3	3,1 ± 0,2	5,0 ± 0,2	1,6
Triptona vegetal	0,8 ± 0,1	4,2 ± 0,7	4,8 ± 0,0	1,1
Caseína	0,8 ± 0,0	3,9 ± 0,8	4,6 ± 0,1	1,2
Urea	1,6 ± 0,1	2,1 ± 0,6	3,3 ± 0,4	1,6
Sulfato de amonio	0,9 ± 0,1	2,1 ± 0,4	4,1 ± 0,1	1,9

El sulfato de amonio es una fuente de nitrógeno inorgánica, en el sitio web Pharmacompass, su costo por tonelada ronda los U\$S 3.000 (www.pharmacompass.com), mientras que 500 g de peptona bacteriológica (Sigma Aldrich) cuestan U\$S 77, lo que sería aproximadamente U\$S 154.000 por tonelada. Debido a que el ácido láctico es un producto de bajo precio de venta, el objetivo es disminuir el costo del proceso. En este caso, se obtuvo un mejor rendimiento de producto con el uso de una fuente de nitrógeno más económica, por lo que se pudo disminuir el costo del proceso. Por lo tanto, la fuente de nitrógeno seleccionada para los ensayos posteriores es el sulfato de amonio.

4.4.3 DISEÑO EXPERIMENTAL DEL MEDIO DE CULTIVO

Para comprender el efecto de los cuatro principales factores nutricionales del medio de cultivo (fructosa, sulfato de amonio, extracto de carne y extracto de levadura) sobre la producción de ácido láctico por la cepa LUA, y con el fin de favorecer la misma, se realizó un diseño del medio de cultivo. Para esto se llevó a cabo un diseño compuesto central rotacional, con dos niveles para cada factor, resultando en 27 corridas. Cada una de ellas fue realizada durante 72 horas a 20°C y 200 rpm, con pH inicial 8.

Durante este experimento se llevaron a cabo controles del pH del medio en cada toma de muestra, lo que permitió conocer que, a las 24 horas de fermentación, el pH del medio (que inicialmente era 8) alcanzaba las 5 unidades. En el estudio de la influencia del pH en el crecimiento celular realizado previamente, se obtuvo que la cepa de trabajo no presentaba crecimiento a valores de pH menores a 6. Una vez alcanzado un pH igual a 5, el crecimiento celular se encontró inhibido y se mantuvo constante durante el resto de la fermentación. En cuanto a la producción de ácido láctico, una vez que se alcanzó la concentración reportada en la Tabla 10, la misma se mantuvo constante, lo que indica que ocurrió una inhibición por producto de los microorganismos. Es sabido que la acumulación de ácido láctico inhibe el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas debido a la alteración del pH a condiciones ácidas. De acuerdo con algunos autores, algunos ácidos débiles como el ácido láctico inhiben el crecimiento bacteriano debido a que causan un descenso del pH externo. El ácido láctico es protonado una vez que es exportado hacia el exterior de la célula, obteniendo así una carga neta neutra. Cuando el medio de cultivo alcanza un pH igual al pKa del ácido láctico (3,86) comienza a difundir a través de la membrana hacia el interior de la célula. Una vez adentro, se disocia a lactato debido a que el pH intracelular es mayor, siendo este insoluble, por lo que queda retenido en el interior celular. En consecuencia, la célula debe utilizar ATP para bombear protones hacia afuera. Eventualmente, comienza a volverse imposible para la célula mantener el pH del medio interno dentro de un rango fisiológicamente aceptable, ya que la energía se agota, provocando la inhibición del crecimiento celular y, finalmente, la muerte de la bacteria (Gonçalves et al., 1999; Othman et al., 2017; Singvhi et al., 2018; Wee et al., 2006). Otros autores afirman que, el efecto inhibitorio del ácido láctico sobre el metabolismo celular y la proliferación podría deberse a un incremento de la presión osmótica en el medio, y a la formación de otros subproductos como el ácido acético, ácido fórmico o formiato de sodio, los cuales causan un efecto inhibitorio propio (Cui et al., 2016; Lin et al., 2008).

Para poder analizar la influencia de los factores nutricionales estudiados sin tener en cuenta el efecto descrito anteriormente se decidió estudiar la fase inicial del proceso, en la cual la concentración de ácido láctico acumulado aun no alcanza niveles de inhibición por producto. Para esto se tomó en cuenta la velocidad específica de crecimiento celular (μ) y la velocidad inicial de producción de ácido láctico (V_i ácido láctico), se midió además la concentración de ácido láctico acumulada al final de cada corrida.

La matriz diseñada con los niveles codificados y sus respectivos resultados experimentales se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Diseño experimental y resultados del diseño compuesto central rotacional.

Corrida	Fructosa	Sulfato de amonio	Extracto de carne	Extracto de levadura	Biomasa (g/L)	μ (h ⁻¹)	Ácido láctico (g/L)	Vi ácido láctico (h ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	0,6	0,065 ± 0,01	5,5 ± 0,1	0,169 ± 0,01
2	-1	-1	1	-1	1,0	0,141 ± 0,01	6,2 ± 0,2	0,268 ± 0,02
3	-1	-1	-1	1	0,9	0,073 ± 0,02	6,0 ± 0,1	0,231 ± 0,02
4	-1	-1	1	1	1,1	0,146 ± 0,03	6,3 ± 0,0	0,068 ± 0,01
5	-1	1	-1	-1	0,6	0,100 ± 0,01	5,4 ± 0,0	0,231 ± 0,03
6	-1	1	1	-1	0,9	0,267 ± 0,02	6,0 ± 0,0	0,201 ± 0,02
7	-1	1	-1	1	0,9	0,105 ± 0,02	4,8 ± 0,2	0,284 ± 0,04
8	-1	1	1	1	0,9	0,136 ± 0,00	6,1 ± 0,1	0,196 ± 0,01
9	1	-1	-1	-1	0,7	0,086 ± 0,01	5,9 ± 0,2	0,251 ± 0,00
10	1	-1	1	-1	1,1	0,146 ± 0,01	6,6 ± 0,1	0,268 ± 0,02
11	1	-1	-1	1	0,7	0,076 ± 0,03	6,5 ± 0,1	0,217 ± 0,10
12	1	-1	1	1	1,1	0,150 ± 0,01	6,9 ± 0,0	0,347 ± 0,01
13	1	1	-1	-1	0,6	0,093 ± 0,02	5,9 ± 0,1	0,347 ± 0,01
14	1	1	1	-1	1,0	0,142 ± 0,04	6,5 ± 0,1	0,366 ± 0,01
15	1	1	-1	1	0,8	0,094 ± 0,01	6,2 ± 0,2	0,299 ± 0,01
16	1	1	1	1	1,0	0,144 ± 0,02	6,6 ± 0,1	0,366 ± 0,00
17	-2	0	0	0	0,8	0,220 ± 0,01	4,0 ± 0,0	0,097 ± 0,01
18	2	0	0	0	0,7	0,244 ± 0,03	5,3 ± 0,1	0,119 ± 0,02
19	0	-2	0	0	0,5	0,237 ± 0,01	5,4 ± 0,0	0,102 ± 0,01
20	0	2	0	0	0,5	0,225 ± 0,02	5,0 ± 0,2	0,102 ± 0,01
21	0	0	0	-2	0,6	0,244 ± 0,04	5,1 ± 0,1	0,100 ± 0,02
22	0	0	0	2	0,7	0,234 ± 0,01	5,4 ± 0,1	0,116 ± 0,02
23	0	0	-2	0	0,8	0,251 ± 0,01	5,4 ± 0,1	0,108 ± 0,03
24	0	0	2	0	0,8	0,259 ± 0,01	5,2 ± 0,0	0,283 ± 0,02
25	0	0	0	0	0,9	0,147 ± 0,02	6,4 ± 0,1	0,347 ± 0,01
26	0	0	0	0	0,9	0,107 ± 0,15	6,7 ± 0,2	0,347 ± 0,01
27	0	0	0	0	1,1	0,134 ± 0,05	6,5 ± 0,1	0,347 ± 0,01

4.4.3.1 EFECTO DE LOS FACTORES SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR

Para el estudio de la influencia de los cuatro factores estudiados sobre el crecimiento celular se obtuvo la siguiente ecuación de regresión lineal:

$$Y_1 = 0,13 + 0,01 x_1 + 0,02 x_1^2 + 0 x_2 + 0,03 x_2^2 + 0,03 x_3 - 0,07 x_3^2 + 0 x_4 + 0,03 x_4^2 - 0,02 x_1 x_2 - 0,01 x_1 x_3 + 0,02 x_1 x_4 + 0,01 x_2 x_3 - 0,02 x_2 x_4 - 0,01 x_3 x_4$$

Ecuación 1. Regresión lineal obtenida para el efecto sobre el crecimiento celular

En donde Y es la respuesta prevista, en este caso la velocidad específica de crecimiento celular (μ , h^{-1}) y X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son las variables codificadas de los factores fructosa, sulfato de amonio, extracto de levadura y extracto de carne, respectivamente. El modelo cuadrático de la superficie de respuesta se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) y los resultados obtenidos se muestran en el Anexo 3.5.

La máxima velocidad específica de crecimiento celular se obtiene con 27,1 g/L de fructosa, 19,1 g/L de sulfato de amonio, 11,1 g/L de extracto de carne y 5,3 g/L de extracto de levadura.

El ANOVA realizado sobre el modelo de regresión cuadrática demuestra que el modelo obtenido es significativo, la bondad de ajuste del modelo se comprobó mediante el coeficiente de determinación (R^2), siendo este 0,947, lo cual indica que el 94,71% de las variaciones en cada corrida para la velocidad inicial de crecimiento celular son atribuidas a las variables independientes. El coeficiente de correlación múltiple ($R=0,973$) también arroja un valor alto, lo que indica que los valores obtenidos experimentalmente y los predichos por el modelo son muy similares. Esta correlación también se comprueba en el gráfico de los valores predichos versus los experimentales, que se muestra en la Figura 12, ya que todos los puntos se encuentran sobre la línea diagonal, lo que significa que no hay desviaciones significativas al modelo.

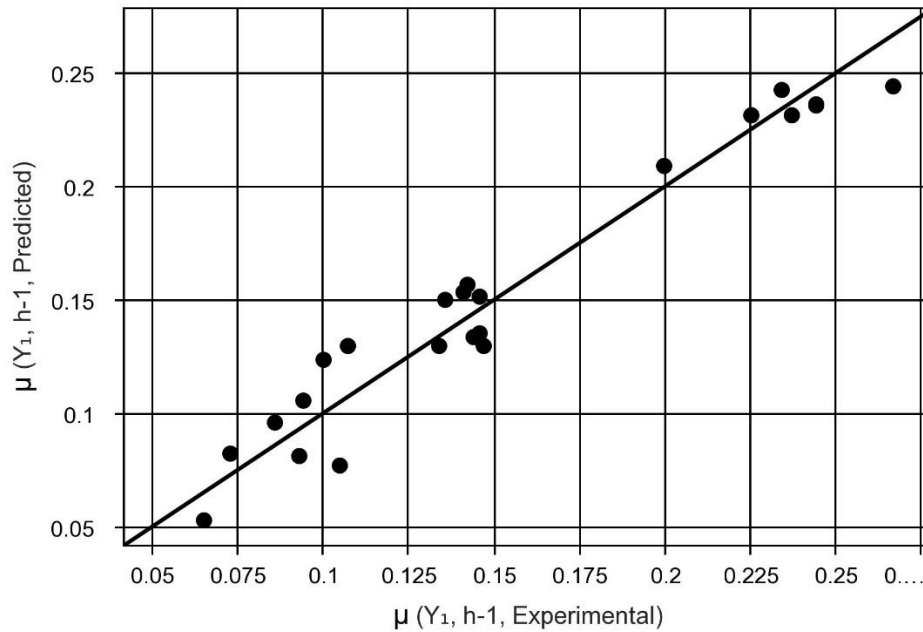


Figura 12. Valores predichos vs. experimentales para la velocidad específica de crecimiento celular.

Para estudiar la interacción entre las variables estudiadas se utilizaron los valores de probabilidad obtenidos para cada coeficiente de la ecuación 1. Mientras menor sea el p-valor, más significativo será el coeficiente correspondiente. Para la respuesta estudiada, el efecto cuadrático del extracto de levadura es la variable más significativa, seguido por el efecto cuadrático del extracto de carne, el efecto lineal del extracto de levadura, el efecto cuadrático del sulfato de amonio y el efecto cuadrático de la fructosa (Tabla 11). Esto sugiere que las concentraciones de los cuatro factores estudiados presentan influencia en la velocidad inicial del crecimiento celular en el medio de cultivo utilizado. El efecto de la fructosa, el sulfato de amonio y el extracto de levadura sobre la respuesta estudiada es positivo, lo que indica que cuanto más alta es la concentración utilizada de estos factores, mayor será la velocidad inicial de crecimiento celular. La fructosa es utilizada por el microorganismo como fuente de carbono y el sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, por lo que son los principales nutrientes para la biosíntesis de metabolitos necesarios para el crecimiento celular. En cuanto al extracto de levadura, debido a que las bacterias ácido-lácticas presentan altos requerimientos nutricionales y son incapaces de sintetizar algunos aminoácidos y vitaminas (Hofvendahl et al., 2000; Wee et al., 2006), es razonable que este factor presente una influencia positiva en el crecimiento bacteriano, ya que es capaz de otorgarle los factores de crecimiento necesarios para el correcto desarrollo celular.

Tabla 11. Ajuste de mínimos cuadrados y estimaciones de los parámetros en la respuesta asociada a la velocidad específica de crecimiento celular.

Variable	Coefficiente	p-valor
Fructosa	0,01	0,2660
Fructosa ²	0,02	0,0026
Sulfato de amonio	0,00	1,0000
Sulfato de amonio ²	0,03	0,0015
Extracto de carne	0,03	0,0013
Extracto de carne ²	-0,07	0,0002
Extracto de levadura	0,00	0,7836
Extracto de levadura ²	0,03	0,0010
Fructosa*Sulfato de amonio	-0,02	0,0184
Fructosa*Extracto de carne	-0,01	0,1272
Fructosa*Extracto de levadura	0,02	0,0399
Sulfato de amonio*Extracto de carne	0,01	0,4711
Sulfato de amonio*Extracto de levadura	-0,02	0,0305
Extracto de carne*Extracto de levadura	-0,01	0,1102

4.4.3.2 EFECTO DE LOS FACTORES SOBRE LA VELOCIDAD INICIAL DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

En el caso de la velocidad inicial de producción de ácido láctico, el estudio de la influencia de los cuatro factores nutricionales seleccionados derivó en la siguiente ecuación de regresión lineal:

$$Y_1 = 0,35 + 0,07 x_1 - 0,02 x_1^2 + 0,03 x_2 - 0,06 x_2^2 - 0,01 x_3 + 0 x_3^2 + 0,01 x_4 - 0,05 x_4^2 - 0,01 x_1 x_2 + 0,05 x_1 x_3 + 0 x_1 x_4 + 0,01 x_2 x_3 + 0 x_2 x_4 + 0 x_3 x_4$$

Ecuación 2. Regresión lineal obtenida para el efecto sobre la velocidad inicial de producción de ácido láctico.

En donde Y es la velocidad inicial de producción de ácido láctico y X₁, X₂, X₃ y X₄ son las variables codificadas de los factores fructosa, sulfato de amonio, extracto de levadura y extracto de carne, respectivamente. De manera análoga a lo descrito anteriormente, el modelo cuadrático de la superficie de respuesta se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) y los resultados obtenidos se muestran en el Anexo 3.5.

A partir de la ecuación 2 se obtiene la máxima concentración de cada variable para la cual la velocidad inicial de producción de ácido láctico será máxima. Este valor se alcanzó para 31,7 g/L de fructosa, 21,2 g/L de sulfato de amonio, 9,4 g/L de extracto de carne y 5,3 g/L de extracto de levadura.

El ANOVA realizado indica que el modelo obtenido es significativo. La bondad de ajuste permite afirmar que el 88,08% de las variaciones en cada corrida para la velocidad inicial de producción de ácido láctico son atribuidas a las variables independientes, El coeficiente de correlación múltiple ($R=0,939$) indica que los valores obtenidos experimentalmente y los predichos por el modelo son muy similares como se muestra en la Figura 13.

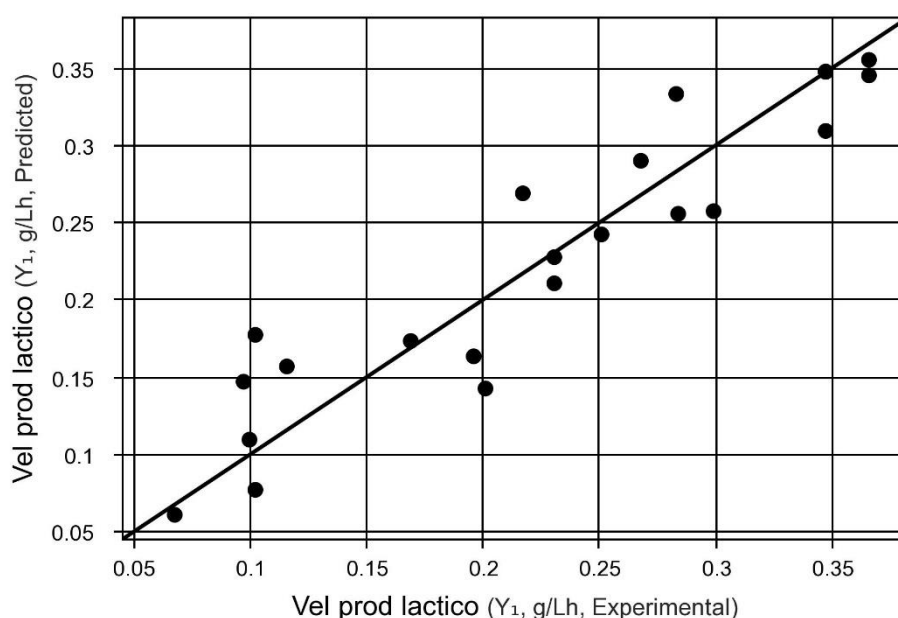


Figura 13. Valores predichos vs. experimentales para la velocidad inicial de producción de ácido láctico.

Para esta respuesta, el efecto cuadrático del sulfato de amonio es la variable más significativa, seguido por el efecto cuadrático del extracto de levadura, y el efecto lineal de la fructosa (Tabla 12). Esto sugiere que la concentración del extracto de carne no tiene efecto sobre la velocidad inicial de producción de ácido láctico, pero si los otros tres factores estudiados. En el caso de la fructosa, el efecto es positivo, es decir, un aumento en la concentración de fructosa provoca un aumento en la velocidad inicial de producción de ácido láctico. El efecto del sulfato de amonio es negativo, por lo que debe utilizarse en el nivel bajo si se quiere obtener un aumento en la respuesta estudiada, esto también sucede para el extracto de levadura.

Tabla 12. Ajuste de mínimos cuadrados y estimaciones de los parámetros en la respuesta asociada a la velocidad inicial de producción de ácido láctico.

Variable	Coefficiente	p-valor
Fructosa	0,07	0,0035
Fructosa ²	-0,02	0,3070
Sulfato de amonio	0,03	0,0907
Sulfato de amonio ²	-0,06	0,0024
Extracto de carne	-0,01	0,5049
Extracto de carne ²	0,00	0,9052
Extracto de levadura	0,01	0,3766
Extracto de levadura ²	-0,05	0,0028
Fructosa*Sulfato de amonio	-0,01	0,4054
Fructosa*Extracto de carne	0,05	0,0183
Fructosa*Extracto de levadura	0,00	0,8764
Sulfato de amonio*Extracto de carne	0,01	0,2398
Sulfato de amonio*Extracto de levadura	0,00	0,8935
Extracto de carne*Extracto de levadura	0,00	0,9167

4.4.3.3 EFECTO DE LOS FACTORES SOBRE LA CONCENTRACIÓN (EN G/L) DE ÁCIDO LÁCTICO

Para el estudio de la influencia de los cuatro factores estudiados sobre la concentración de ácido láctico, se obtuvo la siguiente ecuación de regresión lineal:

$$Y_1 = 6,53 + 0,34 x_1 - 0,47 x_1^2 - 0,20 x_2 - 0,33 x_2^2 + 0,21 x_3 + 0,61 x_3^2 + 0,04 x_4 - 0,30 x_4^2 + 0,06 x_1 x_2 - 0,05 x_1 x_3 + 0,13 x_1 x_4 + 0 x_2 x_3 - 0,20 x_2 x_4 - 0,11 x_3 x_4$$

Ecuación 3. Regresión lineal obtenida para el efecto sobre la producción de ácido láctico.

Siendo Y la concentración de ácido láctico y X₁, X₂, X₃ y X₄ las variables codificadas descritas anteriormente. De manera análoga a los casos anteriores, el modelo cuadrático de la superficie de respuesta se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) y los resultados obtenidos se muestran en el Anexo 3.5.

La ecuación 3 permite conocer aquellas concentraciones de los factores estudiados para las cuales la concentración final de ácido láctico será máxima. Estos son 33,9 g/L para la fructosa, 16,8 g/L para el sulfato de amonio, 9,4 g/L para el extracto de carne y 5,7 g/L para el extracto de levadura.

El ANOVA demuestra que el modelo obtenido es significativo. La bondad de ajuste indica que el 97,84% de las variaciones en cada corrida para la concentración de ácido láctico son atribuidas a las variables independientes. El coeficiente de correlación múltiple ($R=0,988$) indica que los valores obtenidos experimentalmente y los predichos por el modelo son muy similares tal como se muestran en la Figura 14.

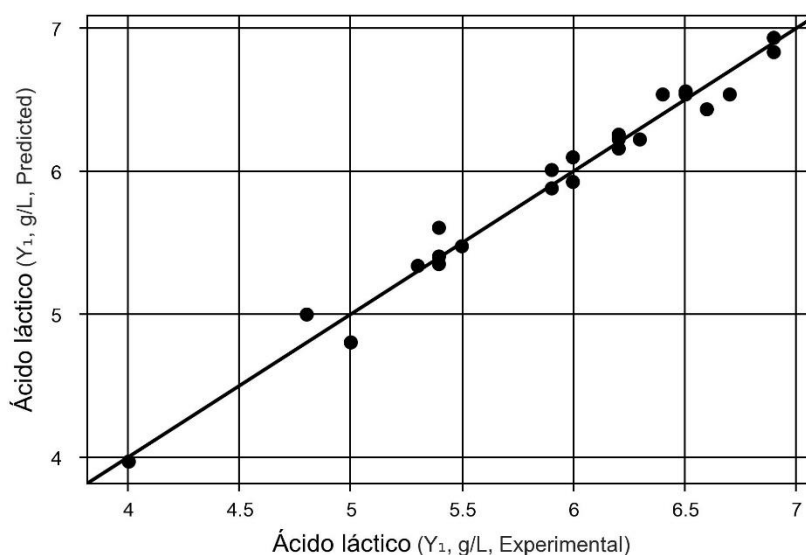


Figura 14. Valores predichos vs. experimentales para la concentración de ácido láctico.

En el caso de la concentración de ácido láctico, tanto el efecto lineal como el cuadrático de la fructosa son significativos, siendo positivo el primero y negativo el segundo, esto significa que un aumento en la concentración de la fructosa va a producir un aumento en la concentración de ácido láctico hasta cierto valor, y si se aumenta más allá de eso, comienza a ocurrir el efecto contrario, es decir, la concentración de ácido láctico disminuirá. Esto sucede porque la fructosa es utilizada como fuente de carbono, participando directamente en la biosíntesis del ácido láctico. Al utilizarse en concentraciones más allá del valor óptimo predicho por el modelo, esta comienza a tener un efecto de inhibición por sustrato, afectando el desempeño del microorganismo. Para el sulfato de amonio, al igual que para la velocidad inicial de producción de ácido láctico, presenta un efecto significativo en su forma lineal y cuadrática. Para esta variable ambos efectos son negativos. Como el sulfato de amonio es el nutriente utilizado como fuente de nitrógeno por el microorganismo, que ya sabemos por la respuesta de velocidad inicial de crecimiento que su efecto es positivo en la misma, no podemos eliminarlo del medio de cultivo, por lo que lo ideal sería fijarlo en el nivel mínimo estudiado. El extracto de carne también presenta un efecto significativo sobre la respuesta estudiada, siendo este positivo. Esto puede deberse a que, como se mencionó anteriormente, las bacterias ácido-

lácticas presentan grandes requerimientos nutricionales (Hofvendahl et al., 2000), los cuales pueden ser abarcados por este suplemento. En particular, las pertenecientes al género *Carnobacterium* se encuentran frecuentemente en el intestino de peces (Laursen et al., 2005; Ringø et al., 1998), por lo que es de esperarse que el extracto de carne presente algún factor de crecimiento necesario para el correcto desempeño de su metabolismo. Por último, el extracto de levadura presenta un efecto significativo únicamente en su forma cuadrática, afectando la producción de ácido láctico de forma negativa. Además, para esta respuesta, la interacción entre el sulfato de amonio y el extracto de levadura presenta un efecto negativo significativo. Los coeficientes y sus respectivos parámetros asociados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Ajuste de mínimos cuadrados y estimaciones de los parámetros en la respuesta asociada a la concentración de ácido láctico.

Variable	Coficiente	p-valor
Fructosa	0,34	0,0000
Fructosa ²	-0,47	0,0000
Sulfato de amonio	-0,20	0,0007
Sulfato de amonio ²	-0,33	0,0000
Extracto de carne	0,21	0,0022
Extracto de carne ²	0,61	0,0001
Extracto de levadura	0,04	0,4629
Extracto de levadura ²	-0,30	0,0007
Fructosa*Sulfato de amonio	0,06	0,2215
Fructosa*Extracto de carne	-0,05	0,3318
Fructosa*Extracto de levadura	0,13	0,0299
Sulfato de amonio*Extracto de carne	0,00	0,9881
Sulfato de amonio*Extracto de levadura	-0,20	0,0030
Extracto de carne*Extracto de levadura	-0,11	0,0449

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A partir de las 18 muestras antárticas obtenidas se logró aislar dos cepas bacterianas productoras de ácido láctico, pertenecientes al género *Carnobacterium*. La cepa IA presentó un alto porcentaje de homología (100%) en el gen 16S del ARN ribosomal con la especie *Carnobacterium divergens*, mientras que la cepa LUA presentó mayor homología (99%) con *Carnobacterium gallinarum*. Además, se logró aislar e identificar otras 7 cepas, cuya producción de ácido láctico no fue significativa en las condiciones estudiadas. Todas las cepas obtenidas fueron guardadas en el cepario del Departamento de Bioingeniería, perteneciente a la Facultad de Ingeniería, Udelar.

De las dos cepas del género *Carnobacterium* obtenidas, LUA fue la que presentó mayor rendimiento de ácido láctico por gramo de sustrato consumido, siendo este 0,7 g/g y el más cercano al rendimiento teórico. Por este motivo, LUA fue la cepa seleccionada para el estudio de las condiciones de producción y el diseño y optimización del medio de cultivo con el fin de mejorar la producción de ácido láctico.

Del estudio de la temperatura se obtuvo que la temperatura óptima para la producción de ácido láctico por la cepa LUA fue 20°C. En cuanto al pH, se determinó que esta cepa es incapaz de crecer en medios de cultivo cuyo pH sea menor a 6, siendo 8 el pH óptimo para la producción de ácido láctico. De las fuentes de carbono estudiadas se tuvo que tanto la glucosa como la fructosa presentan una mayor producción de ácido láctico, siendo la fructosa el sustrato elegido para el diseño del medio de cultivo por su posible interés para el uso industrial. En el caso de las fuentes de nitrógeno, la concentración de ácido láctico obtenida fue la misma tanto para el sulfato de amonio como para la peptona bacteriológica, por lo que se decidió trabajar con sulfato de amonio debido a que su costo es mucho menor que el de la fuente de nitrógeno compleja mencionada anteriormente.

Se estudió la influencia de los cuatro factores nutricionales principales del medio de cultivo, fructosa, sulfato de amonio, extracto de carne y extracto de levadura, sobre tres respuestas distintas: velocidad inicial de crecimiento celular, velocidad inicial de producción de ácido láctico y concentración de ácido láctico. Para cada respuesta se obtuvo un modelo de regresión lineal capaz de predecir el comportamiento en función de las variables estudiadas. En el caso de la velocidad inicial de crecimiento celular, el valor máximo de la respuesta se obtiene cuando se utilizan 27,1 g/L de fructosa, 19,1 g/L de sulfato de amonio, 11,1 g/L de extracto de carne y 5,3 g/L de extracto de levadura. Para la velocidad inicial de producción de ácido láctico el máximo se obtiene con 31,7 g/L de fructosa, 21,2 g/L de sulfato de amonio, 9,4 g/L de extracto de carne y 5,3 g/L de extracto de levadura. El valor máximo de concentración de ácido láctico se alcanza con 33,9 g/L de fructosa, 16,8 g/L de sulfato de amonio, 9,4 g/L de extracto de carne y 5,7 g/L de extracto de levadura.

En trabajos futuros se plantea estudiar los máximos obtenidos para cada respuesta. Se podría escalar el proceso a un biorreactor y, de esta forma, teniendo el pH del medio controlado, verificar si la producción de ácido láctico obtenida es efectivamente la predicha por el modelo. También como perspectivas de este trabajo, se podrían evaluar diferentes modalidades de fermentación a nivel de biorreactor, a modo favorecer el proceso. Existen datos de bibliografía, que reportan altos niveles de producción de ácido láctico, utilizando modalidades como fed-batch o de alimentación por pulsos. Un posterior análisis técnico-económico del proceso, podría evaluar la factibilidad de su transferencia a la industria.

Por otra parte, sería interesante estudiar la producción de ácido láctico a partir del uso de jugo de caña de azúcar u otros residuos industriales ricos en fructosa, en el marco del concepto de biorrefinerías. También podría estudiarse la pureza óptica del ácido láctico durante el proceso, ya que, dependiendo de la misma, el producto obtenido podría ser de interés para la industria farmacéutica o para la producción de biopolímeros. Por último, podrían utilizarse herramientas moleculares para la modificación genética de la cepa, con el fin de favorecer aún más la producción del ácido láctico.

REFERENCIAS

1. Abdel-Rahman, MA., 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.
2. Abdel-Rahman, MA., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2013) "Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes." *Biotechnology Advances* 31:877–902.
3. Abdel-Rahman, MA., Xiao, Y., Tashiro, Y., Wang, Y., Zendo, T., Sakai, K., Sonomoto, K. (2015) "Fed-batch fermentation for enhanced lactic acid production from glucose/xylose mixture without carbon catabolite repression". *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119:153–158.
4. Abdul Karim, M.I., Mel, M., Jamal, P., Mohamed Salleh, M.R. and Alamin, N. (2006). "Media screening of lactic acid fermentation using *Lactobacillus rhamnosus*". *Journal of Agricultural Technology* 2(2): 203-210
5. Akalın, MK., Tekin, K., Karagöz, S. (2017) "Supercritical fluid extraction biofuels from biomass". *Environmental Chemistry Letters* 15:29–41.
6. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool", *Journal of Molecular Biology* 215 (3) 403–410.
7. Andrea, K., Oliveira, JARD., Martins, LHDS., Maciel, MRW., Maciel, Filho R. (2017) "Lactic acid production to purification: a review". *Bio Resource* 12:4364–4383.
8. Anil, K., Thakur, A., Panesar, PS. (2019) "Lactic acid and its separation and purification techniques: a review". *Reviews of Environmental Science and Biotechnology*.
9. Ataei, SA., Vasheghani, FE. (2008) "In situ separation of lactic acid from fermentation broth using ion exchange resins". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35:1229–1233.
10. Audet, P., Paquin, C., Lacroix, C. (1988) "Immobilized growing lactic acid bacteria with 75—carrageenan—locust bean gum gel". *Applied Microbiology and Biotechnology* 29:11–8.
11. Barka, EA., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., Van Wezel, GP. (2016). "Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria". *Microbiology and Molecular Biology Review Journal* 80:1–43.

12. Borch, E., Molin, G. (1989) "The aerobic growth and product formation of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothrix*, and *Carnobacterium* in batch cultures". *Applied and Microbiological Biotechnology*, 30, 81-88.
13. Bouabidi, ZB., El-Naas, M., Zhang, Z. (2018) "Immobilization of microbial cells for the biotreatment of wastewater: a review." *Environmental Chemistry Letters*.
14. Camacho, A., Valiente, E. (2005). "Un mundo dominado por los microorganismos. Ecología microbiana de lagos antárticos." *Ecosistemas*. 14:66-78.
15. Camesasca, L., de Mattos, J.A., Cebreiros, F., Vila, E., Lareo, C. (2021) "Lactic acid production by *Carnobacterium* sp. isolated from a maritime Antarctic lake using eucalyptus enzymatic hydrolysate" *Biotechnology Reports* 31 (2021) e00643
16. Chauhan, K. (2006) "Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice". *Bioresource Technology* 98.103
17. Chwastek, A., Klewicka, E., Klewicki, R., Sójka, M., (2015). Lactic Acid Fermentation of Red Beet Juice Supplemented with Waste Highbush Blueberry-Sucrose Osmotic Syrup as a Method of Probiotic Beverage Production. *Journal of Food Processing and Preservation*.
18. Cooper, B., Kuesters, W., Martin, C., Siegel, H. (1993) "Verfahren zur Herstellung optisch reiner D- oder L-Milchsaure". *Eur Pat Appl Patent*; EP 0 069 291 A2
19. Corry, JEL et al. (2003) "Handbook of Culture Media for Food Microbiology", Elsevier Science B.V.
20. Danielski, G., Imazaki, P (2020). "Carnobacterium maltaromaticum as bioprotective culture in vitro and in cooked ham". *Meat Science* 162 108035
21. De Bruyn, LN., Holzapfel, W.H., Visser, L. and Louw, A.I. (1988) "Glucose metabolism by *Lactobacillus divergens*". *Journal of General Microbiology*, 134, 2130--2109.
22. De Lima, J. (2010) "Lactic Acid Production Optimization", *Food Technology and Biotechnology*. 48 (2) 175–181
23. Djukic-Vuković, AP., Mojović, LV., Jokić, BM., Nikolić, SB., Pejin, JD. (2013) "Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite". *Bioresource Technology* 135:454–458.

24. Edima, H. C., Cailliez-Grimal, C., Revol-Junelles, A.-M., Rondags, E., & Millière, J.-B. (2008). Short Communication: "Impact of pH and Temperature on the Acidifying Activity of *Carnobacterium maltaromaticum*". *Journal of Dairy Science*, 91(10), 3806–3813.
25. Giurca, R., Levin, RE. (1993). "Optimization of the lactic acid fermentation of hydrolyzed cod (*Gadus morhua*) gurry with corn syrup as carbohydrate source". *Journal of Food Biochemistry* 16:277–89
26. Gonçalves, L.M.D., Ramos, A., Almeida, JS., Xavier, A.M.R.B., Carrondo, M.J.T. (1997) "Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 48 (1997) 346–350
27. Gonzalez-Leos, A., Bustos, M., Rodríguez-Castillejos, G., Rodríguez-Durán, L., Del Ángel, J. (2019) "Kinetics of lactic acid fermentation from sugarcane bagasse by *Lactobacillus pentosus*." *Revista Mexicana De Ingeniería Química* 19:377–386.
28. Gonzalez–Vara, YRA., Pinelli, D., Rossi, M., Fajner, D., Magelli, F., Matteuzzi, D. (1996) "Production of L(+) and D(-) lactic acid isomers by *Lactobacillus casei* spp. *casei* DSM 20011 and *Lactobacillus coryniformis* spp. *torquens* DSM 20004 in continuous fermentation". *Journal of Fermentations and Bioengineering*, 81:548–52.
29. Grabar, TB., Zhou, S., Shanmugam, KT., Yomano, LP., Ingram, LO. (2006) "Methylglyoxal bypass identified as source of chiral contamination in l (+) and (-) lactate fermentations by recombinant *Escherichia coli*". *Biotechnology Letters* 28:1527–1535.
30. Guarnizo, F. (2009), "Pretratamientos de la celulosa y biomasa para la sacarificación". *Scientia Et Technica*, Vol. XV, núm.42, pp.284-289 ISSN: 0122-1701.
31. Gundlapalli, S., Reddy, N., Matsumoto, GI., Schumann, P., Stackebrandt, E and Shivaji, S. (2004). "Psychrophilic pseudomonads from Antarctica: *Pseudomonas antarctica* sp. nov., *Pseudomonas meridiana* sp. nov. and *Pseudomonas proteolytica* sp. nov." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 713–719
32. Gupta, R., Gandhi, DN. (1995) "Effect of supplementation of some nutrients in whey on the production of lactic acid". *Indian Journal of Dairy Science* 48: 636–41.
33. Hammes, W. P., & Hertel, C. (2006). *The Genera Lactobacillus and Carnobacterium*.
34. Hassan, NS., Jalil, AA., Hitam, CNC., Vo, DVN., Nabgan, W. (2020) "Biofuels and renewable chemicals production by catalytic pyrolysis of cellulose: a review". *Environmental Chemistry Letters*.

35. Hetényi, K., Németh, Á., & Sevelle, B. (2011). "Role of pH-regulation in lactic acid fermentation: Second steps in a process improvement". *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(3), 293–299.
36. Hofvendahl, K., Hahn–Hägerdal, B. (2000) "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources" *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 26, Issues 2–4 Pages 87-107
37. Holzapfel, W.H. and Gerber, E.S. (1983). "Lactobacillus divergens sp. nov., a new heterofermentative Lactobacillus species producing L (+)-lactate". *Systematic and Applied Microbiology*, 4, 522--534.
38. Hujanen, M., Linko, Y-Y. (1996) "Effect of temperature and various nitrogen sources on L(1)-lactic acid production by Lactobacillus casei". *Applied Microbiology and Biotechnology*; 45:307–13.
39. Idler, C., Venus, J., & Kamm, B. (2014). "Microorganisms for the Production of Lactic Acid and Organic Lactates". *Microbiology Monographs*, 225–273
40. Javanainen, P., Linko, Y-Y. (1995) "Lactic acid fermentation on barley flour without additional nutrients". *Biotechnol Tech*; 9:543–8.
41. Jawad, A., Alkarkhi, A., Jason, O., Mat Easa, A., Norulaini, N.A. (2013). Production of the lactic acid from mango peel waste – Factorial experiment. *Journal of King Science University*.
42. Juturu, V., & Wu, J. C. (2015). Microbial production of lactic acid: the latest development. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(6), 967–977.
43. Kaminski, M.A., Furmanczyk, E.M., Sobczak, A., Dziembowski, A., & Lipinski, L. (2018). "Pseudomonas silesiensis sp. nov. strain A3 T isolated from a biological pesticide sewage treatment plant and analysis of the complete genome sequence". *Systematic and Applied Microbiology*, 41(1), 13–22.
44. Kandler, O. (1983). "Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria". *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), 209–224.
45. Kathiresan, K. (2008) "Prospects of lactic acid bacteria of marine origin". *Indian Journal of Biotechnology* Vol 7, April 2008, pp 170-177gh
46. Kiros, H., Zong, JP., Li, DX., Liu, C., Lu, XH. (2017) "Anaerobic co-digestion process for biogas production: progress, challenges and perspectives." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 76:1485–1496.

47. Klotz, S., Kuenz, A., & Prüße, U. (2017). "Nutritional requirements and the impact of yeast extract on the d-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus*". *Green Chemistry*, 19(19), 4633–4641.
48. Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) MEGA7: "molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Molecular Biology Evolution* 33 (7) 1870– 1874.
49. Laursen, B., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P., & Leisner, J. J. (2005). "Carnobacterium divergens and Carnobacterium maltaromaticum as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization". *Systematic and Applied Microbiology*, 28(2), 151–164.
50. Lavin, P. et al. (2013) "Cepa antártica de *Bacillus* sp., con actividad extracelular de tipo agarolítica y alginatoliasa." *Gayana (Concept.)*. 2013, vol.77, n.2
51. Lee, JM., Jang, WJ., Lee, EW., Kong, IS. (2020) "β-glucooligosaccharides derived from barley β-glucan promote growth of lactic acid bacteria and enhance nisin Z secretion by *Lactococcus lactis*" *LWT* 122:109–114.
52. Li, Y., & Cui, F. (2010). "Microbial lactic acid production from renewable resources". In *Sustainable biotechnology* (pp. 211-228). Springer, Dordrecht.
53. Lin, HTV., Huang, MY., Kao, TY., Lu, WJ., Lin, HJ., Pan, CL. (2020) "Production of lactic acid from seaweed hydrolysates via lactic acid bacteria fermentation". *Fermentation* 6:37.
54. Liu, H., Xu, Y., Ma, Y and Zhou, P. (2000). "Characterization of *Micrococcus antarcticus* sp. nov., a psychrophilic bacterium from Antarctica" *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 715–719
55. Margesin, R., & Schinner, F. (1994). Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 33(1), 1–14.
56. Martínez, F., Balciunas, EM., Salgado, JM., González, JMD., Converti, A., Oliveira, RPS. (2013) "Lactic acid properties, applications and production: a review". *Trending in Food Science and Technology* 30:70–83.
57. Masson, F., Lebert, A., Talon, R., & Montel, M. C. (1997). Effects of physico-chemical factors influencing tyramine production by *Carnobacterium divergens*. *Journal of Applied Microbiology*, 83(1), 36–42.

58. McCaskey, TA., Zhou, SD., Britt, SN., Strickland, R. (1994) "Bioconversion of municipal solid waste to lactic acid by *Lactobacillus* species". *Applied Biochemistry and Biotechnology*;45–46:555–63.
59. Neter, J., Kutner, M.H., Nachtsheim, C.J., Wasserman, W., (1996). "Applied Linear Statistical Models", 4th ed. McGrawHill, Chicago.
60. Olszewska-Widdrat, A., Alexandri, M., López-Gómez, JP., Schneider, R., Mandl, M., Venus, J. (2019) "Production and purification of L-lactic acid in lab and pilot scales using sweet sorghum juice". *Fermentation* 5:1–10.
61. Othman, M., Ariff, AB., Rios-Solis, L and Halim, M. (2017) "Extractive Fermentation of Lactic Acid in Lactic Acid Bacteria Cultivation: A Review". *Frontiers in Microbiology*. 8:2285.
62. Pantůček, R., Sedláček, I., Indráková, A., Vrbovská, V., Mašlaňová, I., Kovařovic, V., Doškař, J. (2017). "Staphylococcus edaphicus sp. nov., Isolated in Antarctica, Harbors the mecC Gene and Genomic Islands with a Suspected Role in Adaptation to Extreme Environments". *Applied and Environmental Microbiology*, 84(2).
63. Pantůček, R., Sedláček, I., Indráková, A., Vrbovská, V., Mašlaňová, I., Kovařovic, V., Švec, P., Králová, S., Křištofová, L., Kekláková, J., Petráš, P., Doškař, J., (2018) "Staphylococcus edaphicus sp. nov., Isolated in Antarctica, Harbors the mecC Gene and Genomic Islands with a Suspected Role in Adaptation to Extreme Environments" *Applied and Environmental Microbiology*, 84 (2) e01746-17;
64. Qi, B-K., Yao, R-S., Lai, M., Dengl, S-S. (2009) "Effect of Tween 80 on production of lactic acid by *Lactobacillus casei*". *Songklanakarin Journal Science Technology*, 31 (1), 85-89, 2009
65. Quintana, J.L., Agraz, J.L., Borgo, L.C. (1995) "Biodiversidad en la Antártida". *Ciencia Hoy*, 6(31), pp. 37-43.
66. Ramchandran, L., Sanciolo, P., Vasiljevic, T., Broome, M., Powell, I., Duke, M. (2012) "Improving cell yield and lactic acid production of *Lactococcus lactis* ssp. *Cremoris* by a novel submerged membrane fermentation process." *Journal of Membrane Science* 403/404:179–187.
67. Rawoof, S.A.A., Kumar, P.S., Vo, DV.N. (2021) "Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: a review." *Environmental Chemistry Letters* 19, 539–556.
68. Ringø, E., & Gatesoupe, F.-J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160(3-4), 177–203.

69. Roebuck, K., Brundin, A., John, M., (1995) "Response surface optimization of temperature and pH for the growth of *Pachysolen tannophilus*". *Enzyme and Microbiology Technology*. 17, 75 – 78.
70. Roukas, T., Kotzekidou, P. (1998) "Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture". *Enzyme and Microbiology Technology*; 22:199–204.
71. Ruberto, L., Vazquez, S. (2005) "Psychrotolerant hydrocarbon-degrading *Rhodococcus* strains isolated from polluted Antarctic soils". *Antarctic Science* 17 (1): 47–56
72. S. Hayek and S. Ibrahim (2013), "Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review," *Food and Nutrition Sciences*
73. S. Johnson & D. Lohan (2005) "Bioprospecting in Antarctica" United Nations University–Institute of Advanced Studies, Yokohama.
74. Samuel, WA., Lee, YY., Anthony, WB. (1980) "Lactic acid fermentation of crude sorghum extract." *Biotechnology and Bioengineer*; 22:757–78.
75. Schillinger, U., Holzapel, W. H. (1995) "The genus *Carnobacterium*". *The Lactic Acid Bacteria* vol.2
76. Serna-Cock, L., Rodriguez-de Stouvenel, A. (2005) "Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte" *Ciencia y tecnología alimentaria* Vol 5, 001
77. Siebold, M., Von Frieling, P., Joppien, R., Rindfleisch, D., Schu"ngerl, K., Ro"per, H. (1995) "Comparison of the production of lactic acid by three different *Lactobacilli* and its recovery by extraction and electro dialysis". *Process Biochemistry*; 30:81–95
78. Singhvi, M., Zendo, T. & Sonomoto, K. (2018) "Free lactic acid production under acidic conditions by lactic acid bacteria strains: challenges and prospects". *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**, 5911–5924.
79. Srivastava, RK., Shetti, NP., Reddy, KR., Aminabhavi, TM. (2020) "Biofuels, biodiesel and biohydrogen production using bioprocesses: a review". *Environmental Chemistry Letters*.
80. Taniguchi, M., Kotani, N., Kobayashi, T. (1987) "High-concentration cultivation of lactic acid bacteria in fermentor with cross-flow filtration". *Journal of Fermentation Technology* 65:179–84

81. Thompson, JD., Higgins, DG., Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: “improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice”, *Nucleic Acids Reserche*. 22 (22)4673–4680
82. Tsuji, M. (2016) “Cold-stress responses in the Antarctic basidiomycetous yeast *Mrakia blollopis*.” *Royal Society open science* 3: 160106.
83. Vaccari, G., González–Vara, RA., Campi, AL., Dosi, E., Brigidi, P. (1993) “Fermentative production of L-lactic acid by *Lactobacillus casei* DSM 20 011 and product recovery using ion exchange resins”. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40:23–7
84. Vila, E., Hornero–Méndez, D., Azziz, G., Lareo, C., & Saravia, V. (2019). “Carotenoids from heterotrophic bacteria isolated from Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica”. *Biotechnology Reports*, e00306.
85. Villamizar Lamus, F (2013). “La Bioprospección Antártica: indefiniciones e incompatibilidades con el sistema del tratado Antártico”. *International Law: Revista Colombiana de Derecho Internacional*, (23),53-86
86. Wang, Y., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2015) “Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits.” *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119:18–18.
87. Wassewar, K.L., (2005). “Separation of lactic acid: recent advances”. *Chemistry and Biochemistry Engineering. Q.* 19, 159–172.
88. Wee, Y. J., Kim, J. N., and Ryu, H. W. (2006). “Biotechnological production of lactic acid and its recent applications”. *Food Technology and Biotechnology* 44, 163–172.
89. Wu, Y., Ma, H., Zheng, M., Wang, K. (2015). Lactic acid production from acidogenic fermentation of fruit and vegetable wastes. *Bioresource Technology*, 191(), 53–58.
90. Zhang, Y-Q. (2005). “*Rhodococcus yunnanensis* sp. nov., a mesophilic actinobacterium isolated from forest soil”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), 1133–1137.
91. Zhao, G.-Z., Li, J., Qin, S., Zhang, Y.-Q., Zhu, W.-Y., Jiang, C.-L., Li, W.-J. (2009). “*Micrococcus yunnanensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from surface-sterilized *Polyspora axillaris* roots”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2383–2387.

92. Zhu et al. (2018) “*Carnobacterium antarcticum* sp. nov., a psychrotolerant, alkaliphilic bacterium isolated from sandy soil in Antarctica” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68:1672–167

1. MEDIOS DE CULTIVO Y BUFFERS

Yeast extract – Peptone – Dextrose (YPD)

- Extracto de levadura 10 g/L
- Peptona 10 g/L
- Glucosa 20 g/L

Yeast extract – Peptone – Glycerol (YPG)

- Extracto de levadura 10 g/L
- Peptona 10 g/L
- Glicerol 20 g/L

Man Rogosa and Shape (MRS)

- Glucosa 20 g/L
- Peptona 10 g/L
- Extracto de carne 10 g/L
- Extracto de levadura 5 g/L
- Acetato de sodio 5 g/L
- Hidrogeno fosfato dipotasio 2 g/L
- Citrato de triamonio 2 g/L
- Sulfato de magnesio heptahidratado 0,2 g/L
- Sulfato de manganeso tetrahidratado 0,05 g/L
- Tween 80 1 g/L
- L-cistina 0,05 g/L

Tryptic Soy Broth (TSB)

- Peptona de caseína pancreática 17 g/L
- Peptona de soja 3 g/L
- Cloruro de sodio 5 g/L
- Hidrogeno fosfato dipotasio 2,5 g/L
- Glucosa 2,5 g/L

Leche descremada

- Leche descremada en polvo

Para 100 mL:

- Disolver 9 g de leche descremada en polvo en 100 mL de agua destilada.

Buffer Citrato pH 5

Para 50 mL:

- Pesar 1,13 g de Na_2HPO_4
- Pesar 0,6 g de ácido cítrico
- Llevar a 50 mL con agua destilada
- Ajustar a pH 5 usando NaOH o HCl según sea necesario

Buffer Citrato pH 6

Para 50 mL:

- Pesar 1,52 g de Na_2HPO_4
- Pesar 0,21 g de ácido cítrico
- Llevar a 50 mL con agua destilada
- Ajustar a pH 6 usando NaOH o HCl según sea necesario

Buffer Fosfato pH 7

Para 50 mL:

- Pesar 0,9436 g de K_2HPO_4
- Pesar 0,6304 g de KH_2PO_4
- Llevar a 50 mL con agua destilada
- Ajustar a pH 7 usando NaOH o HCl según sea necesario

Buffer Fosfato pH 8

Para 50 ml:

- Pesar 0,0884 g de K_2HPO_4
- Pesar 1,6235 g de KH_2PO_4
- Llevar a 50 mL con agua destilada
- Ajustar a pH 8 usando NaOH o HCl según sea necesario

Buffer Glicina-NaOH pH 9

Para 50 mL:

- Pesar 0,38 g de Glicina
- Pesar 0,04 g de NaOH
- Llevar a 50 mL con agua destilada
- Ajustar a pH 9 usando NaOH o HCl según sea necesario

2. AISLAMIENTOS

Tabla 14. Lugar de origen de las 9 cepas aisladas en la Península Fildes, Isla Rey Jorge (62°11S, 58°54W).

Nombre de la cepa	Origen	Medio de aislamiento	Aerobiosis	Temperatura (°C)
L141	Suelo	YPD-Br	Si	20
L142	Suelo	YPD-Br	Si	20
L8A	Suelo	YPG-Br	Si	20
L8B	Suelo	YPD-Br	Si	20
L1	Suelo	YPG-Br	Si	20
L5A	Suelo	YPG-Br	Si	20
L5B	Suelo	YPD-Br	Si	20
L9	Materia orgánica	YPG-Br	Si	20
L7A	Materia orgánica	MRS	No	4
LU	Lago	YPD	Si	4
LUA	Lago	MRS	No	4
IA	Lago	MRS	No	4

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.1 VERIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y SELECCIÓN DE LA CEPA CON MAYOR PRODUCCIÓN

Análisis de la varianza

Respuesta: producción de ácido láctico (g/L)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
láctico	14	0,97	0,94	22,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	116,79	7	16,68	31,18	0,0003
Factor	116,65	6	19,44	36,34	0,0002
Repetición	0,14	1	0,14	0,26	0,6272
Error	3,21	6	0,54		
Total	120,00	13			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,04908

Error: 0,5350 gl: 6

Factor	Medias	n	E.E.	
L7A	0,95	2	0,52	A
LU	1,40	2	0,52	A
L8B	1,60	2	0,52	A
L142	1,60	2	0,52	A
L141	1,80	2	0,52	A
IA	7,50	2	0,52	B
LUA	8,15	2	0,52	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Respuesta: $Y_{p/s}$

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
$Y_{p/s}$	4	0,88	0,64	21,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,10	2	0,05	3,63	0,3482
Factor	0,09	1	0,09	6,25	0,2422
Repetición	0,01	1	0,01	1,00	0,5000
Error	0,01	1	0,01		
Total	0,12	3			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,00000

Error: 0,0144 gl: 1

Factor	Medias	n	E.E.
IA	0,40	2	0,08 A
LUA	0,70	2	0,08 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Respuesta: $Y_{p/x}$

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
$Y_{p/x}$	4	0,76	0,29	14,44

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3,07	2	1,54	1,60	0,4879
Factor	2,46	1	2,46	2,57	0,3553
Repetición	0,61	1	0,61	0,63	0,5720
Error	0,96	1	0,96		
Total	4,03	3			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,00000

Error: 0,9604 gl: 1

categoria	Medias	n	E.E.
IA	6,00	2	0,69 A
LUA	7,57	2	0,69 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.2 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Análisis de la varianza

Respuesta: consumo glucosa (g/L)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
consumo glucosa (g/L)	10	1,00	0,99	7,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	482,98	5	96,60	323,60	<0,0001
Factor	482,53	4	120,63	404,13	<0,0001
Repetición	0,44	1	0,44	1,48	0,2910
Error	1,19	4	0,30		
Total	484,17	9			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,42886

Error: 0,2985 gl: 4

Factor	Medias	n	E.E.	
10°C	0,00	2	0,39	A
30°C	2,60	2	0,39	B
15°C	3,45	2	0,39	B
25°C	13,45	2	0,39	C
20°C	17,95	2	0,39	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Respuesta: ácido láctico (g/L)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ácido láctico (g/L)	10	0,99	0,98	7,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	35,91	5	7,18	74,80	0,0005
Factor	35,90	4	8,98	93,50	0,0003
Repetición	1,0E-03	1	1,0E-03	0,01	0,9236
Error	0,38	4	0,10		
Total	36,29	9			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,37742

Error: 0,0960 gl: 4

Factor	Medias	n	E.E.	
15°C	1,65	2	0,22	A
10°C	1,80	2	0,22	A
30°C	4,30	2	0,22	B
25°C	5,50	2	0,22	B C
20°C	6,30	2	0,22	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Respuesta: biomasa (g/L)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Biomasa (g/L)	10	0,98	0,95	6,10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,49	5	0,10	38,88	0,0017
Factor	0,49	4	0,12	48,60	0,0012
Repetición	0,00	1	0,00	0,00	>0,9999
Error	0,01	4	2,5E-03		
Total	0,50	9			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,22228

Error: 0,0025 gl: 4

Factor	Medias	n	E.E.	
10°C	0,65	2	0,04	A
30°C	0,70	2	0,04	A
15°C	0,70	2	0,04	A
25°C	0,80	2	0,04	A
20°C	1,25	2	0,04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.3 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL PH

Respuesta: biomasa (g/L)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Biomasa (g/L)	8	0,46	0,00	18,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,09	4	0,02	0,64	0,6683
Factor	0,09	3	0,03	0,80	0,5694
Repetición	0,01	1	0,01	0,17	0,7114
Error	0,11	3	0,04		
Total	0,20	7			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,92257

Error: 0,0366 gl: 3

Factor Medias n E.E.

pH9	0,88	2	0,14	A
pH	1,08	2	0,14	A
pH	1,14	2	0,14	A
pH6	1,14	2	0,14	A

Respuesta: Vi ácido láctico

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vi ácido láctico	6	0,99	0,97	4,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,03	3	0,01	53,31	0,0185
Factor	0,03	2	0,02	79,92	0,0124
Repetición	1,7E-05	1	1,7E-05	0,08	0,8075
Error	4,3E-04	2	2,2E-04		
Total	0,04	5			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,08671

Error: 0,0002 gl: 2

Factor Medias n E.E.

7	0,24	2	0,01	A
9	0,31	2	0,01	A
8	0,42	2	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Respuesta: Yp/s

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Yp/s	6	0,97	0,93	2,63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,03	3	0,01	24,05	0,0402
Factor	0,03	2	0,02	36,00	0,0270
Repetición	6,7E-05	1	6,7E-05	0,14	0,7418
Error	9,3E-04	2	4,7E-04		
Total	0,03	5			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,12725

Error: 0,0005 gl: 2

Factor	Medias	n	E.E.
8	0,72	2	0,02 A
7	0,84	2	0,02 A B
9	0,90	2	0,02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

3.4 SELECCIÓN DE LA FUENTE DE CARBONO

Respuesta: biomasa (g/L)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Biomasa	16	0,57	0,20	24,19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,39	7	0,06	1,53	0,2819
Factor	0,39	7	0,06	1,53	0,2819
Error	0,30	8	0,04		
Total	0,69	15			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,75988

Error: 0,0369 gl: 8

Factor	Medias	n	E.E.
Galactosa	0,55	2	0,14 A
Xilosa	0,60	2	0,14 A
Arabinosa	0,70	2	0,14 A
Fructosa	0,75	2	0,14 A
Maltosa	0,90	2	0,14 A

Glucosa	0,90	2	0,14	A
Manosa	0,95	2	0,14	A
Celobiosa	1,00	2	0,14	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Respuesta: ácido láctico (g/L)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Láctico	16	1,00	0,99	7,39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	99,67	7	14,24	315,49	<0,0001
Factor	99,67	7	14,24	315,49	<0,0001
Error	0,36	8	0,05		
Total	100,03	15			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,84065

Error: 0,0451 gl: 8

Factor	Medias	n	E.E.	
Xilosa	0,00	2	0,15	A
Arabinosa	0,00	2	0,15	A
Celobiosa	0,12	2	0,15	A
Galactosa	2,37	2	0,15	B
Maltosa	3,94	2	0,15	C
Manosa	4,07	2	0,15	C
Fructosa	6,00	2	0,15	D
Glucosa	6,50	2	0,15	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 15. Análisis de la varianza para el modelo cuadrático de la respuesta sobre el crecimiento celular.

Fuente	Grados de libertad	Suma cuadrática	Media cuadrática	P-valor	Fcalc
Regresión	14	0,1	0,0	0,00127	10,2
Residuos	8	0,0	0,0		
Lack of fit	6	0,0	0,0	0,46080	1,5
Pure error	2	0,0	0,0		
Total	22	0,1			

 $R^2=94,71\%$ **Tabla 16.** Ajuste de mínimos cuadrados y estimaciones de los parámetros en la respuesta asociada a la velocidad específica de crecimiento celular.

Variable	Coefficiente	Error estándar	t	p-valor
Fructosa	0,01	0,01	1,20	0,2660
Fructosa ²	0,02	0,01	4,29	0,0026
Sulfato de amonio	0,00	0,01	0,00	1,0000
Sulfato de amonio ²	0,03	0,01	4,71	0,0015
Extracto de carne	0,03	0,01	4,86	0,0013
Extracto de carne ²	-0,07	0,01	-6,46	0,0002
Extracto de levadura	0,00	0,01	0,28	0,7836
Extracto de levadura ²	0,03	0,01	5,08	0,0010
Fructosa*Sulfato de amonio	-0,02	0,01	-2,95	0,0184
Fructosa*Extracto de carne	-0,01	0,01	-1,70	0,1272
Fructosa*Extracto de levadura	0,02	0,01	2,45	0,0399
Sulfato de amonio*Extracto de carne	0,01	0,01	0,76	0,4711
Sulfato de amonio*Extracto de levadura	-0,02	0,01	-2,62	0,0305
Extracto de carne*Extracto de levadura	-0,01	0,01	-1,80	0,1102

Tabla 17. Análisis de la varianza para el modelo cuadrático de la respuesta sobre la velocidad inicial de producción de ácido láctico.

Fuente	Grados de libertad	Suma cuadrática	Media cuadrática	P-valor	Fcalc
Regresión	14	0,2	0,0	0,02337	4,2
Residuos	8	0,0	0,0		
Lack of fit	6	0,0	0,0	NaN	Infinito
Pure error	2	0,0	0,0		
Total	22	0,2			

$R^2 = 88,08\%$

Tabla 18. Ajuste de mínimos cuadrados y estimaciones de los parámetros en la respuesta asociada a la velocidad inicial de producción de ácido láctico.

Variable	Coefficiente	Error estándar	T	p-valor
Fructosa	0,07	0,02	4,08	0,0035
Fructosa ²	-0,02	0,02	-1,09	0,3070
Sulfato de amonio	0,03	0,01	1,92	0,0907
Sulfato de amonio ²	-0,06	0,01	-4,37	0,0024
Extracto de carne	-0,01	0,02	-0,70	0,5049
Extracto de carne ²	0,00	0,02	0,12	0,9052
Extracto de levadura	0,01	0,01	0,94	0,3766
Extracto de levadura ²	-0,05	0,01	-4,26	0,0028
Fructosa*Sulfato de amonio	-0,01	0,02	-0,88	0,4054
Fructosa*Extracto de carne	0,05	0,02	2,95	0,0183
Fructosa*Extracto de levadura	0,00	0,02	-0,16	0,8764
Sulfato de amonio*Extracto de carne	0,01	0,02	0,89	0,23975
Sulfato de amonio*Extracto de levadura	0,00	0,02	-0,14	0,8935
Extracto de carne*Extracto de levadura	0,00	0,02	-0,11	0,9167

Tabla 19. Análisis de la varianza para el modelo cuadrático de la respuesta sobre la concentración de ácido láctico.

Fuente	Grados de libertad	Suma cuadrática	Media cuadrática	p-valor	Fcalc
Regresión	14	11,2	0,8	0,00004	25,9
Residuos	8	0,0	0,0		
Lack of fit	6	0,0	0,0	0,46578	1,4
Pure error	2	0,0	0,0		
Total	22	11,4			

$R^2=97,84\%$

Tabla 20. Ajuste de mínimos cuadrados y estimaciones de los parámetros en la respuesta asociada a la concentración de ácido láctico.

Variable	Coefficiente	Error estándar	T	p-valor
Fructosa	0,34	0,04	9,02	0,0000
Fructosa ²	-0,47	0,04	-11,73	0,0000
Sulfato de amonio	-0,20	0,04	-5,28	0,0007
Sulfato de amonio ²	-0,33	0,04	-8,30	0,0000
Extracto de carne	0,21	0,05	4,44	0,0022
Extracto de carne ²	0,61	0,09	6,95	0,0001
Extracto de levadura	0,04	0,05	0,77	0,4629
Extracto de levadura ²	-0,30	0,06	-5,38	0,0007
Fructosa*Sulfato de amonio	0,06	0,05	1,33	0,2215
Fructosa*Extracto de carne	-0,05	0,05	-1,03	0,3318
Fructosa*Extracto de levadura	0,13	0,05	2,64	0,0299
Sulfato de amonio*Extracto de carne	0,00	0,05	-0,02	0,9881
Sulfato de amonio*Extracto de levadura	-0,20	0,05	-4,21	0,0030
Extracto de carne*Extracto de levadura	-0,11	0,05	-2,37	0,0449