

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“COMPETENCIA DE PSEUDOMONAS Y
LACTOBACILLUS EN LA PRODUCCIÓN
DE ÁCIDOS LÁCTICO Y
LACTOBIÓNICOS PARA USO EN
ALIMENTOS FUNCIONALES”**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR**

MELISA VIGIL GARCIA

JULIO, 2015



RESUMEN

El interés en la reutilización y revalorización de los subproductos crece a la vez que lo hace la preocupación por el medio ambiente. En el presente trabajo se estudia la utilización de suero de queso, residuo altamente contaminante de la industria alimentaria, para producir ácidos orgánicos, en concreto ácido láctico y lactobiónico con las bacterias *Lactobacillus Casei* y *Pseudomona Taetrolens*. Estos ácidos son de gran interés en muchos sectores de la industria como son alimentario, farmacéutico, cosmético, químico y textil.

Se hace una comparación de los cultivos puros de cada bacteria con cultivos mixtos, en condiciones favorables para cada bacteria y se utiliza citometría de flujo para comprobar el estado fisiológico de las células durante el desarrollo de las fermentaciones.

Los resultados obtenidos indican que las bacterias en general se desarrollan mejor y son más productivas en los cultivos puros que en los mixtos además de que el *Lactobacillus Casei* tolera mejor la presencia de la otra bacteria en ambos cocultivos que dicha bacteria.

ABSTRACT

The interest in the reuse and revaluation of byproducts grows at the same time than concern for the environment. In the present work it has been studied the valorization of the cheese whey, an important byproduct of the food industry, to produce organic acids, in particular lactic and lactobionic acids with *Lactobacillus Casei* and *Pseudomona Taetrolens* bacterium. These acids are of great interest in many sectors of industry as food, pharmaceutical, cosmetic, chemical and textile industries.

In this work, a comparison of the pure cultures and mixed cultures under favorable conditions fermentations of each bacteria is carry out. Flow cytometry is used to check the physiological state of cells during the fermentations development. This technique has been revealed as very useful to follow the physiological state of the biomass during the fermentation process.

The results obtained show that in general, the cells grow better and present higher productivity in pure cultures than in mixed cultures. Moreover, the *Lactobacillus Casei* bacteria tolerate better the presence of the other bacteria in both mixed cultures than this bacteria.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objeto	3
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS	5
2.1. Mercado actual y producción del ácido láctico	6
2.2. Mercado actual y producción del ácido lactobiónico	7
2.3. Métodos de operación y seguimiento de los bioprocesos	9
2.3.1. Citometría de flujo	10
2.4. Separación de los productos	11
2.4.1. Separación del ácido láctico	11
2.4.2. Separación del ácido lactobiónico	11
2.5. Alimentos funcionales	12
2.6. Interés de la coproducción	13
2.6.1. Ejemplos de cocultivos	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1. Medio de cultivo: suero de queso	17
3.2. Microorganismos	17
3.2.1. Lactobacillus Casei	17
3.2.2. Pseudomona Taetrolens	17
3.3. Fermentaciones: condiciones	18
3.3.1. Fermentación con Lactobacillus Casei	18
3.3.2. Fermentación con Pseudomona Taetrolens	18
3.3.3. Fermentación mixta	19
3.4. Toma de muestras y análisis	20
3.4.1. pH	20
3.4.2. Densidad óptica y siembra en placas	20
3.4.3. HPLC	20
3.4.4. Citometría de flujo	21

4. RESULTADOS	23
4.1. Evolución del pH	24
4.2. Densidad óptica	25
4.3. Recuento de placas	26
4.4. Evolución en la concentración de lactosa	30
4.5. Producción de ácido láctico	31
4.6. Producción de ácido lactobiónico	31
4.7. Evolución del estado fisiológico de los microorganismos	32
5. CONCLUSIONES	37
6. BIBLIOGRAFÍA	39
7. APÉNDICES	42

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Propiedades y características del ácido láctico.	7
Tabla 2.	Propiedades y características del ácido lactobiónico.	8
Tabla 3.	Resumen de datos de producción.	38
Tabla 4.	Datos medios de pH de los cultivos.	43
Tabla 5.	Datos medios de densidad óptica de los cultivos.	44
Tabla 6.	Datos medios de UFCs de <i>Lactobacillus Casei</i> de los cultivos.	45
Tabla 7	Datos medios de UFCs de <i>Pseudomona Taetrolens</i> de los cultivos.	46
Tabla 8.	Datos medios de concentración de lactosa de los cultivos.	47
Tabla 9.	Datos medios de producción de ácido láctico de los cultivos.	48
Tabla 10.	Datos medios de producción de ácido lactobiónico de los cultivos.	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ácido láctico.	6
Figura 2.	Ácido lactobiónico.	7
Figura 3.	Esquema de funcionamiento del citómetro de flujo.	10
Figura 4.	Esquema del proceso fermentativo con <i>Lactobacillus Casei</i> .	18
Figura 5.	Esquema del proceso fermentativo con <i>Pseudomona Taetrolens</i> .	19
Figura 6.	Equipo de cromatografía líquida de alta resolución.	21
Figura 7.	Citómetro de flujo Cytomics FC 500.	22
Figura 8.	Evolución del pH en las fermentaciones de <i>Lactobacillus Casei</i> (L.C.), <i>Pseudomona Taetrolens</i> (P.T.), cocultivo en condiciones de L.C. y cocultivo en condiciones de P.T.	24
Figura 9.	Evolución de la densidad óptica en las fermentaciones de L.C. puro, P.T. puro, cocultivo en condiciones de L.C. y cocultivo en condiciones de P.T.	25
Figura 10.	Recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs) en la fermentación de L.C. puro.	26
Figura 11.	Placa de agar MRS con colonias de <i>Lactobacillus Casei</i> .	26
Figura 12.	Recuento de UFCs en la fermentación de P.T. puro.	27
Figura 13.	Placa de agar NB con colonias de <i>Pseudomona Taetrolens</i> .	27
Figura 14.	Recuento de UFCs en la fermentación mixta en condiciones de L.C.	28
Figura 15.	Placa de agar NB con colonias de P.T. poco desarrolladas.	29
Figura 16.	Recuento de UFCs en la fermentación mixta en condiciones de P.T.	29
Figura 17.	Placas de agar con contaminación.	30
Figura 18.	Evolución de la concentración de lactosa en los cuatro cultivos.	30
Figura 19.	Producción de ácido láctico en el cultivo puro de L.C. y los cocultivos.	31
Figura 20.	Producción de ácido lactobiónico en el cultivo puro de P.T. y los cocultivos.	32
Figura 21.	Evolución de la fermentación de L.C. puro con tinción CV6/IP.	32
Figura 22.	Evolución de la fermentación de P.T. puro con tinción CV6/IP.	33
Figura 23.	Evolución de la fermentación en C.C. L.C. con tinción CV6/IP.	33
Figura 24.	Evolución de la fermentación de L.C. puro con tinción DiBAC/IP.	34
Figura 25.	Evolución de la fermentación de P.T. puro con tinción DiBAC/IP.	35
Figura 26.	Evolución de la fermentación en C.C. L.C. con tinción DiBAC/IP.	35

1. INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento de sustancias residuales como medida para el ahorro está a la orden del día en todo el mundo. En todos los procesos de fabricación se obtienen subproductos o residuos que suponen una reducción en el rendimiento de la operación, y por tanto un coste. Estos subproductos necesitan ser eliminados de alguna forma, y en muchas ocasiones pueden ser peligrosos para el medio ambiente, lo que exige de tratamientos previos o métodos de eliminación más costosos. Por ello en la actualidad, es primordial buscar alternativas que permitan la reutilización de estos subproductos para obtener otros productos de valor añadido y reducir en la medida de lo posible la cantidad de residuo generado, disminuyendo así los costes y creando nuevas fuentes de ingresos.

En el estudio que se detalla a continuación se emplea suero de queso como materia prima, que es el líquido resultante de la separación de la grasa y la caseína de la leche durante el proceso de fabricación del queso. Este elemento, pese a ser empleado en gran medida como complemento nutricional en piensos para la alimentación de ganado, fuente de lactosa alimentaria, en la fabricación de fertilizantes y como materia prima para la obtención de bioetanol (Spalatelu, 2012), supone un problema debido a que la cantidad empleada para dichos usos es muy reducida en comparación con las cantidades producidas anualmente en todo el planeta.

Las cantidades de este suero lácteo que se generan anualmente rondan los 160 millones de toneladas a nivel mundial, cifra que debido al aumento de producción de queso aumenta año a año entre el 1 y 2% aproximadamente (Spalatelu, 2012; Guimarães *et al.*, 2010). Los residuos generados por el subsector lácteo fabricante de queso suponen el 26% de los residuos totales generados por la industria alimentaria (Alonso, 2013).

Comparando la cantidad de queso producido y los residuos que se generan se puede determinar que por cada kilogramo de queso se producen alrededor de 9 litros de suero (Guimarães *et al.* 2010; Siso, 1996), cantidad muy elevada para poder ser aprovechada en su totalidad.

Por otro lado su aprovechamiento responde también a términos medioambientales ya que es una sustancia altamente contaminante por su contenido en proteínas, lípidos, minerales y sobre todo lactosa (5-6%). Este último componente es el mayor responsable de los altos valores de DQO (entre 60 y 80 g/L) y de DBO (entre 30 y 50 g/L) que presenta el suero, lo que hace inviable su vertido directo a ríos, mares y ni siquiera a la red de alcantarillado municipal puesto que el tratamiento recibido sería

insuficiente. Un modo de rebajar la DQO es recuperando la proteína, pero solo se conseguiría reducir en 10 g/L (Guimarães *et al.*, 2010; Siso, 1996, Spalatelu, 2012) lo que sigue siendo insuficiente. Su vertido supondría serios problemas de contaminación para el medioambiente ya que afecta a las propiedades físicas y químicas del suelo dificultando el ejercicio de la agricultura en la zona, y en el caso de ríos, mares o lagos rebajaría peligrosamente la concentración de oxígeno resultando así mortal para todo tipo de vida acuífera (Panesar *et al.*, 2007). El suero lácteo es considerado el residuo más contaminante de la industria alimentaria.

La revalorización de este suero mediante aplicaciones biotecnológicas dando lugar a productos de gran interés comercial como son los ácidos orgánicos supone un gran ahorro en tratamiento de residuos a la vez que una nueva fuente de ingresos deseable en toda industria. Dado el gran volumen disponible, cuya reducción es imposible por otros métodos, es viable una implantación de estas operaciones biotecnológicas a escala industrial.

En este caso, los ácidos orgánicos que se van a estudiar son ampliamente utilizados en la industria textil, alimentaria y farmacéutica. Estos ácidos pueden obtenerse mediante síntesis química pero por razones que serán explicadas en el siguiente capítulo es interesante su producción biotecnológica y eso hace que se esté en plena investigación y desarrollo de métodos eficientes y económicos.

1.1. OBJETIVO

En este trabajo se va a estudiar el uso del suero como materia prima para la producción biotecnológica conjunta de algunos ácidos orgánicos, en concreto ácido láctico y lactobiónico, utilizando para ello las especies *Lactobacillus Casei* y *Pseudomona Taetrolens*. Los objetivos de este trabajo son:

- El estudio de condiciones de operación diferentes, cada una favorable a una de las bacterias en cuanto a aireación, agitación y temperatura de incubación.
- La comparación de los experimentos en cocultivo con los cultivos puros de cada bacteria.

- Establecer las mejores condiciones de operación en cocultivos para el caso concreto de estas dos bacterias.
- Utilizar citometría de flujo para comprobar el estado fisiológico de las células durante los experimentos.
- Analizar del progreso de las fermentaciones mediante cromatografía líquida de alta resolución, medida del pH, densidad óptica y recuento de unidades formadoras de colonias.

2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1. MERCADO ACTUAL Y PRODUCCIÓN DEL ÁCIDO LÁCTICO

El ácido láctico, ó ácido 2-hidroxipropanoico (figura 1), fue reconocido como producto de fermentación por Blondeaur ya en el año 1847 (Serna-Cock, 2005), pero aun en la actualidad continúan las investigaciones para el desarrollo de nuevas técnicas de fermentación a nivel industrial que consigan disminuir los costes de producción a través del uso de materias primas recicladas, nuevos microorganismos que alcancen altas concentraciones de producto y altos rendimientos, y nuevas técnicas de separación y purificación. Aun así, en el año 2010 fabricantes como Purac, Cargill y Galactic alcanzaron una producción total de unas 250000 toneladas de ácido láctico por vía fermentativa (Alonso, 2013), que suponen un 90% de la producción total de ácido láctico (Panesar *et al.*, 2007).

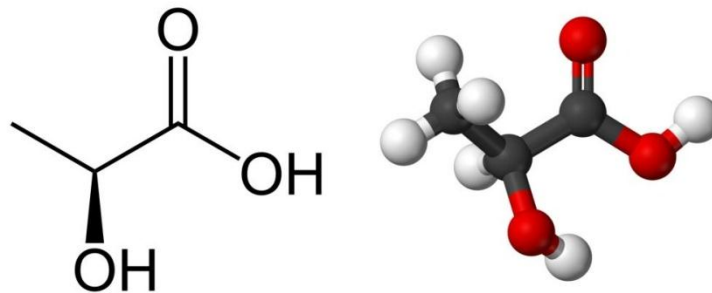


Figura 1. Ácido láctico.

Este ácido se puede obtener por síntesis química mediante la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico, lo que produce lactonitrilo que se hidroliza a ácido láctico, y también mediante la reacción a alta presión de acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de un catalizador que en este caso es ácido sulfúrico (Serna-Cock, 2005). El problema que deriva de la producción de ácido láctico mediante síntesis química es que el producto obtenido es una mezcla racémica de los isómeros L y D ópticamente inactivos, mientras que la producción biotecnológica genera isómeros puros ópticamente activos (se presentan sus propiedades en la tabla 1) esenciales para la producción de nuevos polímeros biodegradables, concretamente el ácido poliláctico (PLA) (Alonso *et al.*, 2010; Panesar *et al.*, 2010). Este polímero se está introduciendo en el mercado como un gran sustituto de otros polímeros de origen petroquímico.

Además de la producción de plásticos biodegradables, los isómeros ópticamente activos L(+) son utilizados en la industria alimentaria como conservantes y acidulantes ya que son el único tipo de ácido láctico metabolizable por el cuerpo humano (Panesar *et al.*, 2010). Este ácido en general también es utilizado en la industria química como solubilizador y agente controlador de pH, en la industria farmacéutica para la producción

de medicamentos por sus sales de hierro y calcio, en la industria textil para el teñido y la impresión y en agricultura como acidulante (Serna-Cock, 2005; Alonso, 2013).

Tabla 1. Propiedades y características del ácido láctico (Alonso, 2010; Serna-Cock, 2005).

Fórmula	$C_3H_6O_3$
Peso molecular	90,08
Punto de fusión (°C)	52,8 - 54
Punto de ebullición (°C)	125 - 140
Viscosidad (Ns/m ²)	0,040
Densidad (kg/m ³)	1,249
Naturaleza	Líquida
Precio unitario (€/kg)	1,55

2.2. MERCADO ACTUAL Y PRODUCCIÓN DEL ÁCIDO LACTOBIONIÓICO

El ácido lactobiónico (4-O-β-D-galactopyranosyl-D-gluconic acid) (figura 2) es ampliamente utilizado en la industria farmacéutica, cosmética, alimentaria y química debido a sus propiedades antioxidantes, quelantes y humectantes.

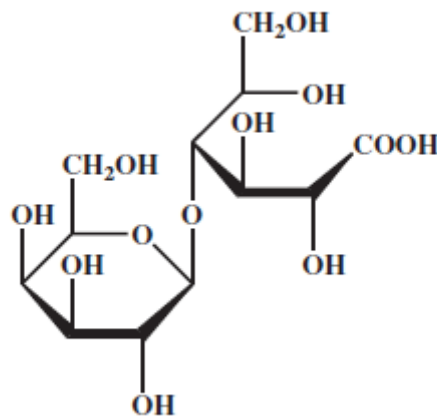


Figura 2. Ácido lactobiónico.

Su formación consiste en la oxidación del grupo aldehído libre de la glucosa que forma la molécula de lactosa a un grupo carboxilo. Existen diversos métodos para provocar esta reacción como pueden ser métodos químicos, electroquímicos, biocatalíticos y oxidaciones catalíticas heterogéneas, pero muy pocos son económicamente rentables a causa de los altos costes de los catalizadores además de

que pueden tener lugar reacciones secundarias indeseables con la consiguiente generación de subproductos (Alonso *et al.*, 2013).

Actualmente la producción del ácido lactobiónico (LBA) se sitúa entre 15000 y 17000 toneladas al año cuyos principales fabricantes son Solvay (Alemania) y FriendslandCampina Domo (Países Bajos) (Gutiérrez *et al.* 2012). Se prevé un crecimiento anual de producción del 5% aproximadamente puesto que cada vez son más los usos y aplicaciones que se encuentran para este ácido gracias a sus propiedades físico-químicas únicas (tabla 2).

Tabla 2. Propiedades y características del ácido lactobiónico (Alonso *et al.*, 2013)

Fórmula	$C_{12}H_{22}O_{12}$
Peso molecular	358,30
Punto de fusión (°C)	128 – 130
Solubilidad	Soluble en agua, ligeramente soluble en etanol y metanol anhidros.
Naturaleza	Sólida
Apariencia	Polvo blanco
pKa	3,6

Un uso muy importante que tiene este ácido en medicina es como principal ingrediente de soluciones para la conservación en frío de órganos y tejidos previa al trasplante ya que tiene la capacidad de reducir la oxidación provocada por algunos iones metálicos como el hierro. Además suprime la hinchazón provocada en los tejidos por las bajas temperaturas, y es incapaz de introducirse en las membranas celulares a causa de su estructura y tamaño (Gutiérrez *et al.*, 2012). Otra aplicación es en la protección contra la hepatitis, incluyéndolo en oligonucleótidos antisentido que son introducidos en las células de Kupffer del hígado con el objetivo de reducir la expresión del factor- α del tumor que provoca la necrosis (Alonso *et al.*, 2013).

En la industria farmacéutica y cosmética se utiliza como ingrediente queratinizante y anti-edad en productos para el cuidado de la piel, antioxidante, en el diseño de nanopartículas funcionales y nanomateriales portadores de medicinas y genes. Gracias a sus propiedades emulsificantes es utilizado en la industria química como base tensoactiva en la producción de detergentes biodegradables, además de componente anticorrosivo en la fabricación de revestimientos (Gutiérrez *et al.*, 2012, Alonso *et al.*, 2013).

Desde que el LBA fue reconocido como aditivo alimentario por la Administración de Alimentos y Medicamentos Americana (US FDA), es ampliamente utilizado en este sector como gelificante, agente acidulante de sabor dulce, antioxidante, estabilizante, refuerzo de bebidas funcionales e incluso como sustancia prebiótica (Gutiérrez *et al.*, 2012, Alonso *et al.*, 2013).

2.3. MÉTODOS DE OPERACIÓN Y SEGUIMIENTO DE BIOPROCESOS

Como en toda reacción química existen diversas formas de operación que varían en función de los recursos que se posean y de los objetivos que se pretendan alcanzar. En el caso de los biorreactores, además, entra en juego la forma en que se introduzcan las células en el caldo de fermentación.

Los biorreactores pueden operar de forma discontinua, alcanzando altas concentraciones de producto pero bajas productividades (Moresi & Parente, 2014). La desventaja de este modo de operación es que las células tienen un periodo de adaptación o retardo bastante largo (lag) antes de comenzar a multiplicarse y producir, lo que se traduce en tiempos de fermentación bastante largos que se tratan de compensar con reactores de mayor capacidad. Esto conlleva unos costes operativos demasiado altos y no resulta rentable (Panesar *et al.*, 2007).

Otra forma de operar es en continuo: se alcanzan bajas concentraciones de producto pero la productividad es considerablemente más alta sin necesidad de reactores de gran tamaño. En este caso las células pueden recircularse o inmovilizarse dentro del tanque:

- La recirculación de células implica un aumento en la concentración de biomasa dentro del fermentador que supone una mayor producción de ácido, además de una menor concentración de sustrato en el efluente.
- La inmovilización de células puede realizarse por adsorción, atrapamiento en gel o enlace covalente. De esta forma se puede tener una alta densidad de células en el fermentador que podrán ser reutilizadas, y se evita la posterior separación de la biomasa del caldo de cultivo (Panesar *et al.*, 2007).

En el caso de que tenga lugar una inhibición por producto, se pueden emplear sistemas que incluyan la separación de éste del medio de cultivo (Moresi & Parente, 2014). Estos métodos de separación serán mencionados más adelante.

2.3.1. Citometría de flujo

En el seguimiento de los bioprocesos los métodos más utilizados para comprobar el crecimiento de la biomasa son la medida de la densidad óptica (turbidimetría), el peso seco de las células o el recuento en placas de agar. Estos métodos dan información del crecimiento celular basándose en su capacidad de reproducción, pero sin tener en cuenta su estado fisiológico.

Concretamente el recuento de placas es utilizado para comprobar la viabilidad de las células, considerando que estas son viables si son capaces de reproducirse, pero además de ser un método lento, a veces no es fiable ya que algunas células tienen dificultades para crecer en medio artificiales.

La citometría de flujo proporciona información acerca de la heterogeneidad fisiológica de los cultivos de células y se utiliza también en el análisis cuantitativo de la biomasa total (Quirós *et al.*, 2007). Consiste en la medida simultánea de varias características físico-químicas (tamaño, volumen, pH, densidad, potencial de membrana, contenido en proteínas, capacidad de dispersión de la luz...) de las células que van pasando una a una en un flujo a través del citómetro. Esta medida se realiza haciendo incidir un haz de luz perpendicularmente sobre cada célula de forma que se dispersa vertical y horizontalmente además de excitar los fluorocromos que puedan estar unidos a las células haciendo que emitan luz (figura 3). Esta luz dispersada y emitida es captada por unos detectores que la convierten en impulsos eléctricos (March & Eiros, 2012).

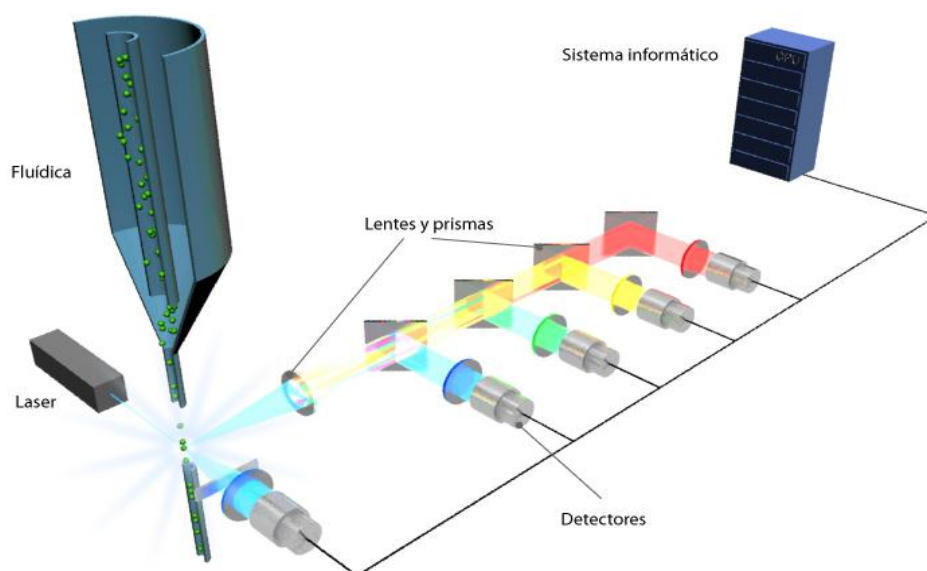


Figura 3. Esquema de funcionamiento del citómetro de flujo.

Así, es posible caracterizar, cuantificar y separar las distintas poblaciones celulares que pueda haber y se dispondrá de una información más detallada sobre la viabilidad de las células.

2.4. SEPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS

La etapa posterior a la fermentación corresponde a la separación y purificación de los ácidos obtenidos, cuyos métodos más comunes serán citados a continuación.

2.4.1. Separación del ácido láctico

El ácido láctico en concreto tiene la característica de que sus sales son altamente solubles en agua, lo que dificulta su separación. Algunas técnicas utilizadas son:

- Recuperación de las sales de calcio (lactato de calcio) mediante precipitación o concentración por electrodiálisis, y posteriormente regeneración del ácido adicionando ácido sulfúrico y posteriormente purificándolo mediante intercambio iónico y decolorización (es el método tradicional y más económico) (Moresi & Parente, 2014) ó bien regenerando el ácido mediante electrodiálisis con membrana bipolar e intercambio iónico (Serna-Cock, 2005).
- Recuperación del lactato de calcio y a continuación tratamiento con carbón activado, o bien extracción con solventes, o esterificación con metanol seguida de destilación e hidrólisis (Serna-Cock, 2005).
- Mediante extracción con membranas líquidas e intercambio iónico. Puede utilizarse simultáneamente a la fermentación con un sistema de recirculación. (Moresi & Parente, 2014).
- Microfiltración con flujo cruzado (Serna-Cock, 2005).

2.4.2. Separación del ácido lactobiónico

Las técnicas de separación y purificación del ácido lactobiónico pueden ser:

- Concentración del ácido y precipitación mediante la adicción de etanol al medio de fermentación.

- Evaporación del medio para obtener un líquido espeso, seguido de una deshidratación mediante destilación con dioxano y tolueno y finalmente cristalización.
- Intercambio iónico con resinas de anión débilmente básico para recuperar la disolución acuosa de ácido lactobiónico seguido de secado por spray.
- Evaporación para concentrar la disolución, seguido de una cristalización por precipitación y finalmente un intercambio iónico.

Se siguen investigando métodos de separación y purificación integrados en el proceso de fermentación de forma que resulten más económicos (Alonso *et al.*, 2013)

2.5. ALIMENTOS FUNCIONALES

El concepto de alimento funcional nació en Japón en los años 80, y en general se utiliza para denominar a todos aquellos alimentos que poseen alguna de estas características además de proporcionar los nutrientes necesarios para el organismo:

- Prevenir enfermedades.
- Mejorar el estado físico y mental del consumidor.
- Capacidad para curar algunas dolencias.

Aunque el concepto de alimento funcional es muy general y abarca muchos tipos de alimentos, se suele emplear para alimentos que contienen ingredientes desarrollados tecnológicamente que posean algún beneficio para la salud (Siró *et al.*, 2008).

El mercado de estos productos ha crecido enormemente en los últimos años, así en Europa en mercado de los alimentos funcionales movía entre 3,6 y 7,2 billones de € en el año 2003 (Siró *et al.*, 2008) y en el año 2013 ha alcanzado los 25 billones de € (Murcia, 2013). En España concretamente, estos productos suponían el 17% del mercado alimentario en el 2006 y se prevé que en el 2020 alcanzarán el 40% (Siró *et al.*, 2008). En el año 2013 la facturación rodaba entre 2,8 y 3,5 millones de € según el Ministerio de Economía (Murcia, 2013).

En este mercado no sólo entran empresas del sector alimentario, ya que algunas compañías farmacéuticas empiezan a interesarse en estos productos. Las causas son que en comparación con los productos farmacéuticos, los alimentos funcionales tienen tiempos más cortos de desarrollo y unos costes más bajos.

Al principio los alimentos funcionales únicamente incluían vitaminas como la vitamina C, E ó el ácido fólico, y minerales como el calcio, hierro o zinc. Posteriormente se fueron incluyendo algunos micronutrientes como el omega 3, el fitosterol o la fibra soluble (Siró *et al.*, 2008).

Los alimentos funcionales se podrían clasificar de la siguiente forma (Siró *et al.*, 2008):

- Probióticos: son los que incluyen microorganismos vivos con la capacidad de conferir algún beneficio para la salud si se ingiere la cantidad adecuada.
- Prebióticos: son ingredientes no digeribles que ayudan a los microorganismos presentes generalmente en el aparato digestivo a realizar su actividad beneficiando al consumidor.
- Bebidas funcionales: son bebidas no alcohólicas a las que se les añaden vitaminas u otros ingredientes funcionales.
- Cereales funcionales: generalmente funcionan como prebióticos incluyendo fibra soluble en sus ingredientes.
- Productos de panadería: aunque aún no están muy desarrollados, pueden contener vitaminas, minerales y por supuesto fibra.
- Productos para reducir el colesterol: son productos que contienen ésteres de fitostanol ó ácidos omega 3 que ayudan en la reducción del colesterol.

2.6. INTERÉS DE LA COPRODUCCIÓN

A la vista de las múltiples propiedades de estos dos ácidos, y del imparable crecimiento de sus usos y aplicaciones en los distintos sectores industriales, puede resultar interesante una producción conjunta partiendo de la misma materia prima.

Lo que se pretende es maximizar el rendimiento en cuanto al aprovechamiento de sustrato, en este caso la lactosa contenida en el suero de queso, de forma que además de producir ambos ácidos, se reduciría la DQO del suero haciendo más fácil y económico su posterior tratamiento para su vertido.

Las ventajas de esta metodología de trabajo serían un menor consumo de recursos, tanto materiales como energéticos, ya que se utiliza un mismo volumen para

la fermentación con ambas bacterias, y se conseguiría una mayor revalorización del suero.

Como inconvenientes se presentan la posible incompatibilidad entre ambas bacterias, *L. Casei* y *P. Taetrolens*, y la problemática de la posterior separación de ambos ácidos, que será mencionada en el capítulo correspondiente de este trabajo.

2.6.1. Ejemplos de cocultivos

A continuación se enumeran algunos ejemplos de procesos en los que se emplean cultivos mixtos, tanto de industria alimentaria como química:

- Elaboración de vino: en los casos en los que el vino se elabora mediante fermentación espontánea, esta se lleva a cabo con las bacterias y levaduras endémicas presentes tanto en la superficie de la uva como en los equipos utilizados en la bodega. Este método de elaboración implica variación en las características organolépticas y en la velocidad de fermentación de unos años a otros ya que ni la cantidad ni el orden de sucesión de los microorganismos será igual (Escalante-Minakata & Ibarra-Junquera).
- Producción de yogurt: la fermentación del yogurt se realiza generalmente de forma controlada con la interacción de las especies *Lactobacillus Bulgaris* y *Streptococcus thermophilus* (Escalante-Minakata & Ibarra-Junquera).
- Incrementar el valor nutritivo de los residuos de café y té verde mediante fermentación con cultivos mixtos microbianos para su uso en alimentación de ganado además de eliminar las emisiones de metano de dichos residuos (Senevirathne *et al.*, 2012).
- En el tratamiento de aguas residuales para la eliminación de productos farmacéuticos y de cuidado personal como la cafeína, ibuprofeno, ranitidina y sulfametoxazol con un cultivo mixto de bacterias heterótrofas (Vasiliadou *et al.*, 2013).
- En la producción de polihidroxialcanoatos (PHA) utilizando como sustrato glicerol crudo que es el subproducto principal (10% v/v del éster final) de las industrias de biodiesel. También se producen polihidroxibutiratos (PHB) todo ello utilizando cultivos mixtos de bacterias aeróbicas (Moita *et al.*, 2014).

- En la biodegradación de hidrocarburos, concretamente gasoil de PDV rango diesel, mediante un cultivo mixto de tres cepas de *Pseudomonas* (Otoniel *et al.*, 2005)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MEDIO DE CULTIVO: SUERO DE QUESO

El suero de queso que se utiliza como medio de cultivo para las fermentaciones es suministrado por la empresa Industrias Lácteas Asturianas (ILAS-Reny Picot) y se distribuye en garrafas de 5 L, con una concentración de lactosa de unos 250 g/L aproximadamente que resulta demasiado alta para este trabajo, por lo que se debe diluir con agua destilada hasta obtener una concentración cercana a 40 g/L. Además debe ser esterilizado mediante filtración de forma que se elimina la grasa, bacterias y proteínas de gran tamaño que puedan interferir en la fermentación. Este proceso se lleva a cabo mediante microfiltración tangencial por un cassette de membranas de PVDF (Millipore) con un tamaño de poro de 0,22 μm .

En este caso el volumen resultante a esterilizar tras la dilución sería demasiado alto, aumentando la probabilidad de contaminación en el proceso de filtración por lo que se hace una primera dilución, se ajusta el pH del suero a 6,5 con NaOH 6N, después se filtra y finalmente se rediluye en condiciones de esterilización en campana hasta el volumen deseado.

3.2. MICROORGANISMOS

3.2.1. *Lactobacillus Casei*

La bacteria *Lactobacillus Casei* se mantiene congelada a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una disolución de glicerol al 40 % v/v. Se reactiva en placas de Man Rogosa and Sharpe (MRS, Biokar diagnostics) con agar al 2% (p/v), que se incuban a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48-72 horas y después se mantienen a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.2. *Pseudomona Taetrolens*

La bacteria *Pseudomona Taetrolens*, al igual que el *Lactobacillus Casei*, se mantiene congelada a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una disolución de glicerol al 40% v/v. Se reactiva en placas de Nutrient Broth (NB, que contiene 1 g/L de extracto de carne, 2 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de peptona y 5 g/L de NaCl) con agar al 2% (p/v), que se incuban a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas y después se mantienen a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3. FERMENTACIONES: CONDICIONES

3.3.1. Fermentación con *Lactobacillus Casei*

Tras la reactivación en placas de agar MRS, se inoculan 250 ml de caldo MRS con una colonia aislada de bacterias en condiciones microaerófilas, a 37 °C y sin agitación durante 16 horas. A continuación se añaden 10 ml (10% v/v) de este caldo a 90 ml de suero que se utiliza como preinóculo, y se mantienen en las mismas condiciones pero con agitación de 100 rpm durante 20 horas.

Finalmente, con 50 ml del preinóculo (10% v/v) se inoculan 450 ml de suero (figura 4) y se incuban en las mismas condiciones de temperatura, agitación y aireación.

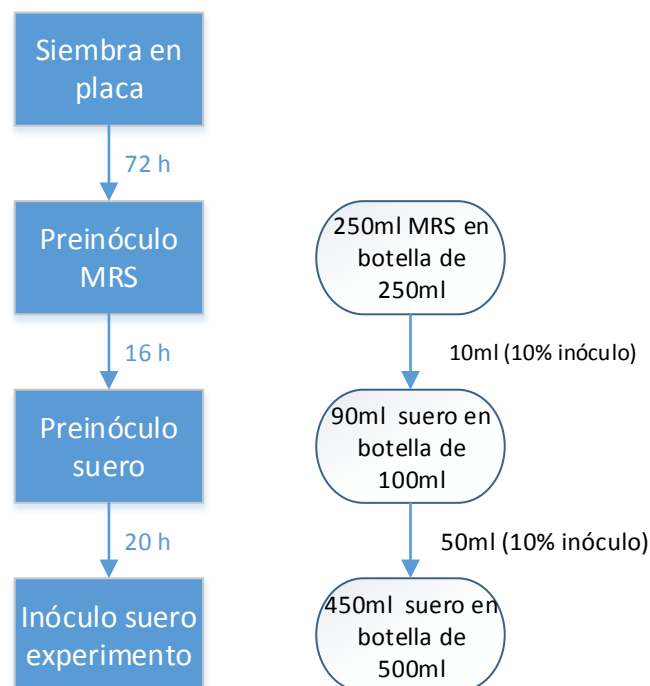


Figura 4. Esquema del proceso fermentativo con *Lactobacillus Casei*.

3.3.2. Fermentación con *Pseudomona Taetrolens*

Una vez reactivada la bacteria en placas de agar NB, se utiliza una colonia aislada para inocular 100 ml de caldo NB que se incuban en un matraz de 500 ml (el volumen de líquido debe ser aproximadamente 1/5 del volumen del recipiente para conseguir las condiciones de aireación deseadas) a 30 °C y con una agitación de 250 rpm durante 10 horas. Después se utiliza la biomasa contenida en un 10% (v/v) (se centrifuga a 12000xg durante 10 minutos, se elimina el sobrenadante y se resuspende

en suero) para inocular 100 ml de suero que será utilizado como preinóculo, incubado en las mismas condiciones durante 12 horas.

Por último, con la biomasa contenida en 40 ml del preinóculo se inoculan 400 ml de suero que serán incubados en botellas de 2 L en las mismas condiciones citadas anteriormente (figura 5).

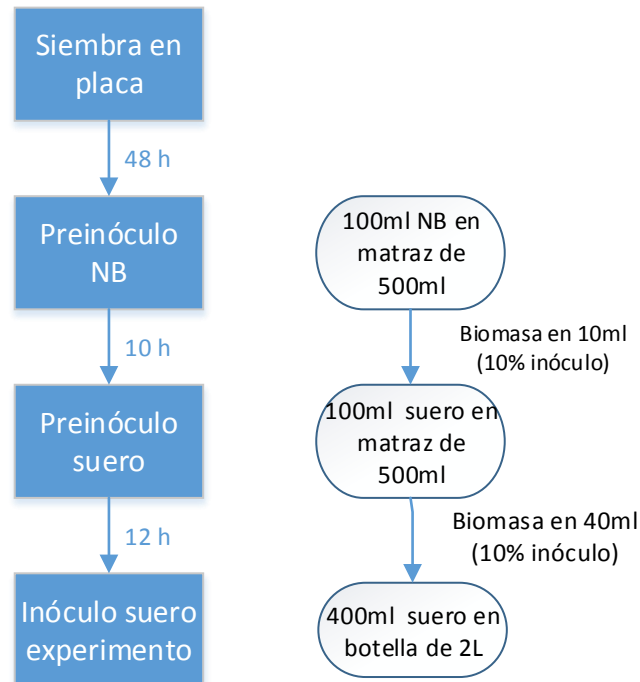


Figura 5. Esquema del proceso fermentativo con *Pseudomonas Taetrolens*.

3.3.3. Fermentación mixta

Las fermentaciones con cocultivo de bacterias se realizan por cuadruplicado, de forma que dos se incuban en las condiciones óptimas para el *Lactobacillus Casei* y otras dos en las condiciones óptimas para la *Pseudomonas Taetrolens*. En ambas opciones se trabaja de la misma forma que en las fermentaciones puras hasta los preinóculos de suero.

En el cocultivo en condiciones óptimas para el *Lactobacillus Casei* la fermentación se lleva a cabo en botellas de 500 ml que inicialmente contienen 450 ml de suero. Se inoculan con 50 ml (10% v/v) del preinóculo de *L. Casei*, y con la biomasa contenida en 50 ml del preinóculo de *P. Taetrolens*.

En el caso del cocultivo en condiciones óptimas para la *Pseudomonas Taetrolens*, las fermentaciones se realizan en botellas de 2 L que contienen 360 ml de suero inicial.

Se inoculan con 40 ml (10% v/v) del preinóculo de *L. Casei* y con la biomasa contenida en 40 ml del preinóculo de *P. Taetrolens*.

Tanto las fermentaciones puras como las mixtas se realizan por duplicado como experimentos independientes.

3.4. TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS

Todas las muestras tanto de cultivos puros como de cocultivos recibirán el mismo tratamiento que se detalla a continuación.

3.4.1. pH

Se toma una alícuota de 2 ml que es centrifugada durante 10 minutos a 12000xg (KUBOTA High Speed Refrigerated Centrifuge 6500). El sobrenadante se vuelca en otro tubo y se mide su pH (pH-meter BASIC 20+ CRISON).

3.4.2. Densidad óptica y siembra en placas

Se toma una alícuota de 1 ml en un tubo Eppendorf y se centrifuga (Eppendorf Centrifuge 5415D) durante 5 minutos a 13200 x g. El pellet obtenido se resuspende en NaCl 0,7 % (p/v), se diluye 1 a 10 y se mide su densidad óptica por triplicado para comprobar el crecimiento celular, a una longitud de onda de 600 nm en el espectrofotómetro (UV-VIS spectrophotometer UV-1203 SHIMADZU).

Para la siembra en placas se realizan diluciones seriadas de dicho pellet resuspendido, también con NaCl 0,7 % (p/v), y en función del dato obtenido de densidad óptica se siembran unas diluciones u otras.

3.4.3. HPLC

El sobrenadante de dicha alícuota de 1 ml se utiliza para medir la evolución de las concentraciones de sustratos y productos (en este caso lactosa, ácido láctico y lactobiónico) mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC).

Como la concentración de lactosa es mucho mayor que la de los ácidos se deben hacer dos diluciones distintas de cada muestra, una a 1:5 para los ácidos y otra a 1:20 para la lactosa, ambas con agua destilada y filtradas mediante una jeringa que incorpora un filtro de 0,45 μm .

La fase móvil utilizada en la cromatografía es una disolución de H_2SO_4 0,450 mM en agua MiliQ, previamente filtrada a vacío con un tamaño de poro de 0,22 μm y sometida a ultrasonidos durante 30 minutos.

La columna del cromatógrafo es un modelo ICSep ICE-ION-300 (Transgenomic Inc., San José, California) que opera a una temperatura de 75 °C, con un flujo de la fase móvil de 0,3 ml/min y una presión aproximada de 40 bar. El detector utilizado es el índice de refracción (RID) del cromatógrafo Agilent (modelo Serie 1200, California) y el software para la adquisición de datos es el Agilent ChemStation. El Equipo se muestra en la figura 6.



Figura 6. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución.

3.4.4. Citometría de flujo

Para la observación y el seguimiento del estado fisiológico de las células, estas se analizan cada cierto tiempo mediante citometría de flujo.

Se toma una muestra de 1 ml y se elimina el sobrenadante tras haberla centrifugado a 13200xg durante 6 minutos. Se lava el pellet resultante dos veces con un tampón fosfato salino (PBS) (filtrado a 0,22 μm , esterilizado y con pH de 7,4). Se somete a ultrasonidos durante unos segundos y se reparten en tubos eppendorf volúmenes de 200 μl para proceder a su tinción. Uno de ellos se analiza sin teñir para utilizarlo como control negativo, y otro se tiñe con el fluorocromo SYBR Green. Este fluorocromo se une al ADN por lo que tiñe todas las células independientemente de su estado fisiológico y se utiliza para distinguir la señal que corresponde a las bacterias con la señal de ruido del aparato. La solución de trabajo del SYBR Green se prepara a partir de una solución

stock congelada, añadiendo 10 μl de dicha solución stock a 990 μl de una mezcla de PBS y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Se añaden 2 μl para la tinción y se incuba durante 15 minutos en oscuridad.

En otro tubo se utiliza una mezcla de los fluorocromos ChemChromeV6 (CV6) e Ioduro de Propidio (IP). El fluorocromo CV6 tiñe células con actividad metabólica y se encuentra en solución stock congelada. La solución de trabajo se prepara a partir de 50 μl de solución stock que se añaden a 450 μl de agua destilada estéril. Para teñir se utilizan 8 μl y se incuba durante 15 minutos en oscuridad. El fluorocromo IP, por el contrario, penetra en las células con la membrana dañada. La solución de trabajo se prepara a partir de 140 μl de la solución stock congelada, añadidos a 860 μl de agua destilada estéril. Para teñir se utilizan 7,5 μl y se incuba durante 30 minutos en oscuridad.

Por último el tubo restante se tiñe con los fluorocromos IP y bis-(1,3-dibutilbarbiturato) trimetinaoxonol (DiBAC₄³). El fluorocromo DiBAC₄³ penetra en las células que presentan la membrana despolarizada y aumentan la señal cuando la célula no es viable. La solución de trabajo se prepara a partir de 5 μl de la solución stock congelada y 995 μl de la mezcla PBS y EDTA. Se tiñe con 40 μl y se incuba 15 minutos en oscuridad. Como controles se utilizaron células tanto de P.Taetrolens como de L.Casei, en plena fase exponencial de crecimiento y tratadas con alcohol isopropilo, por separado, combinando células vivas con dañadas, y combinando ambas especies.

El citómetro de flujo utilizado es el Cytomics FC 500 (Beckman Coulter) con fuente láser de iones y con cuatro detectores de fluorescencia (figura 7). El software utilizado para la adquisición de datos es el Cytomics RXP (Beckman Coulter).



Figura 7. Citómetro de flujo Cytomics FC 500.

4. RESULTADOS

4.1. EVOLUCIÓN DEL PH

En las siguientes gráficas se presenta la evolución del pH de las distintas fermentaciones:

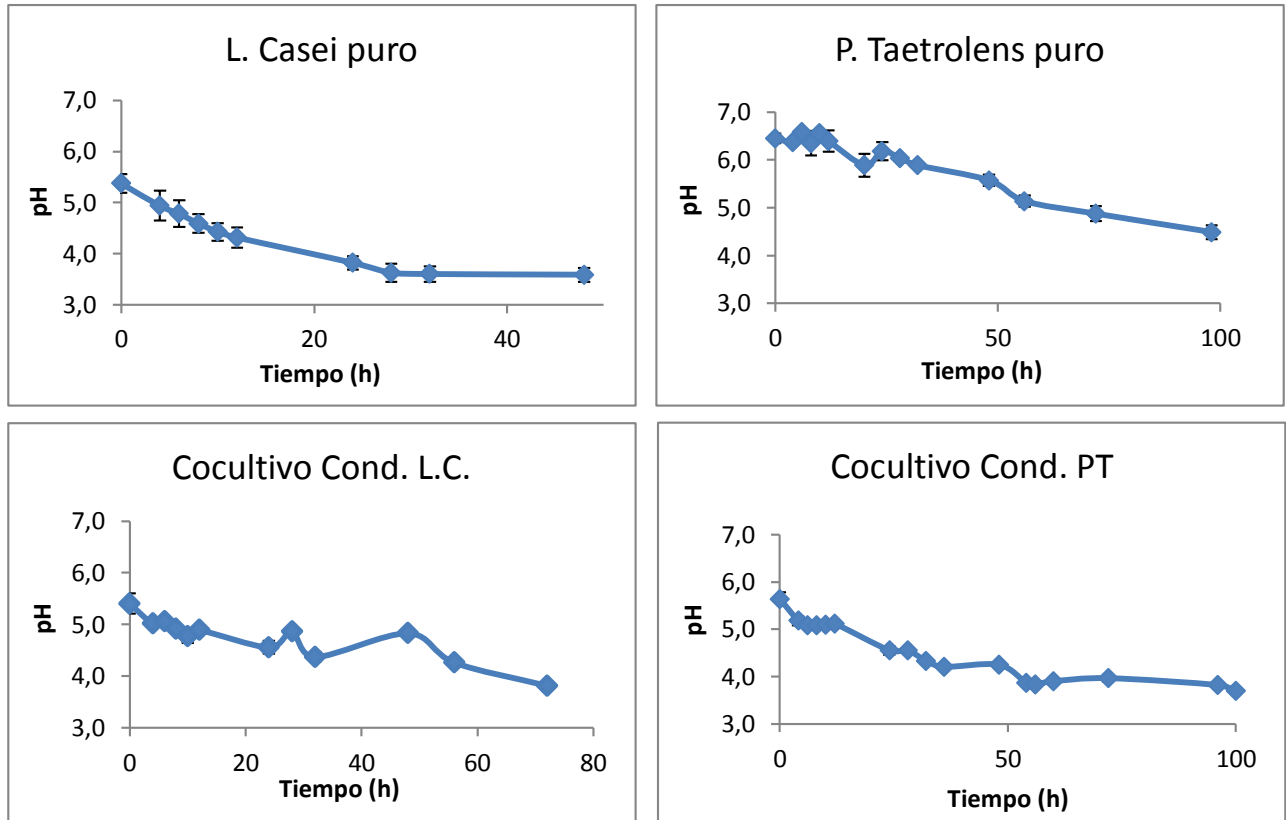


Figura 8. Evolución del pH en las fermentaciones de *Lactobacillus Casei* (L.C.), *Pseudomona Taetrolens* (P.T.), cocultivo en condiciones de L.C. y cocultivo en condiciones de P.T.

Se observa que las fermentaciones en las que entra en juego el *Lactobacillus Casei* parten de un pH más bajo, aproximadamente de 5,3. Esto se debe a que el inóculo se realiza con suero que ya ha bajado de pH debido a la actividad del L.C., mientras que la fermentación de la *Pseudomona* pura se inocula únicamente con la biomasa y no afecta al pH inicial del suero que es 6,5. En esta fermentación se observa una leve subida de pH inicial, esto es causado por los subproductos nitrogenados que aparecen al ser metabolizadas las proteínas del suero. Cuando comienza la producción de ácido el pH comienza a descender.

Ambos cocultivos alcanzan un pH final de 3,7 aproximadamente, siendo el cocultivo en condiciones de P.T. ligeramente más rápido (datos en apéndice, tabla 4).

4.2. DENSIDAD ÓPTICA

A través de la densidad óptica (apéndice, tabla 5) se puede comprobar el crecimiento de la biomasa. En las gráficas que se presentan a continuación se observan las curvas de crecimiento en cada tipo de fermentación:

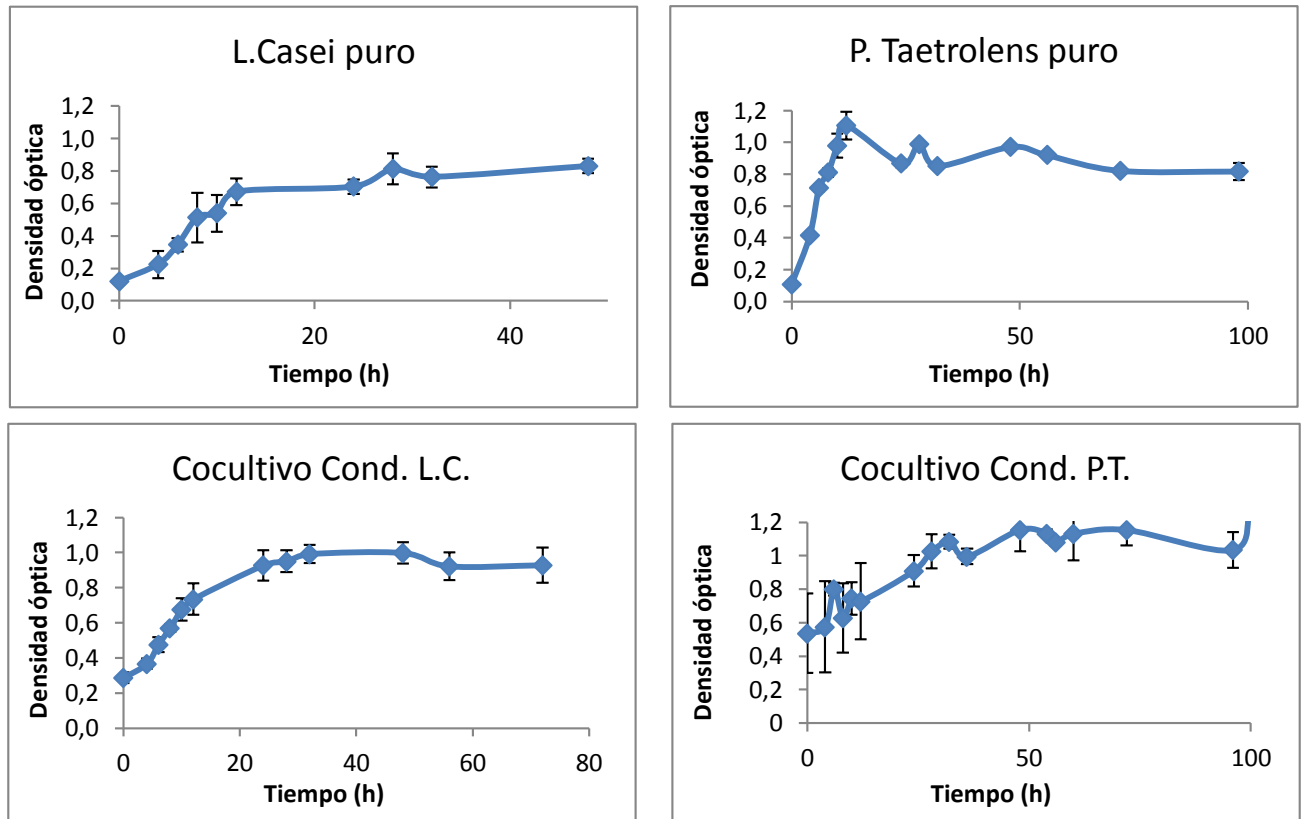


Figura 9. Evolución de la densidad óptica en las fermentaciones de L.C. puro, P.T. puro, cocultivo en condiciones de L.C. y cocultivo en condiciones de P.T.

Las gráficas de cocultivos presentan una mayor cantidad de biomasa, cosa que era de esperar ya que se inocula con el doble de bacterias. El cocultivo en condiciones de L.C. alcanza la unidad de densidad óptica mientras que en condiciones de P.T. llega casi al 1,2, pero también parte del doble de biomasa al inicio por lo que el crecimiento en valor absoluto es mayor en el cocultivo de L.C.

Con los datos del recuento en placas y citometría se podrá determinar que bacterias son las que mejor soportan las condiciones de cocultivo.

4.3. RECuento DE PLACAS

El recuento de placas sirve para hacer una comprobación cualitativa y cuantitativa del crecimiento bacteriano ya que además de conocer cómo crecen, se comprueba que es la bacteria objeto de estudio y no una contaminación.

En la figura 10 se presenta el recuento de las fermentaciones de L.C. puras, y en la figura 11 un ejemplo de una placa con agar MRS en la que ha crecido la bacteria (datos en apéndice, tabla 6).

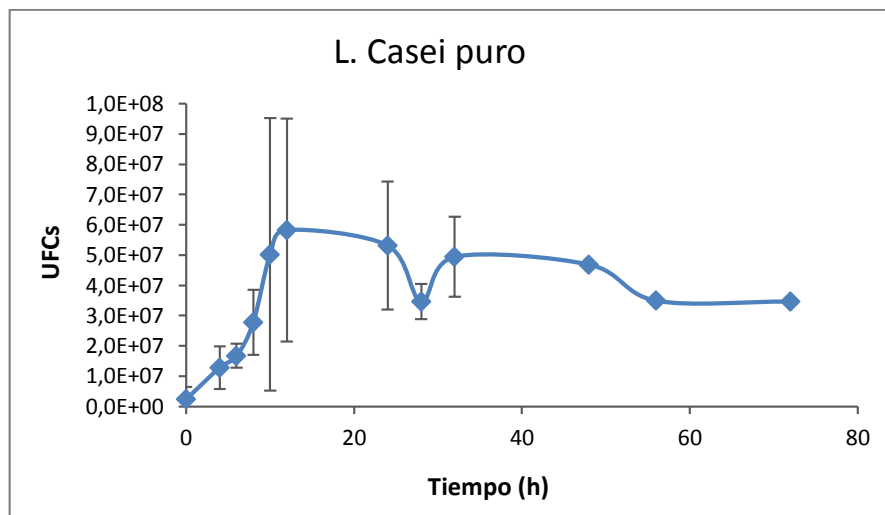


Figura 10. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs) en la fermentación de L.C. pura.



Figura 11. Placa de agar MRS con colonias de *Lactobacillus Casei*.

Los valores de UFCs son muy dispares de unas fermentaciones a otras, de ahí los valores tan grandes de los errores en la figura 10. Aun así se observa un crecimiento hasta alcanzar casi los 6×10^7 UFCs en un mililitro en las primeras horas de fermentación seguido de un descenso leve pero continuo a causa de la muerte de las bacterias.

En la figura 12 se presentan los valores medios de UFCs para las fermentaciones de P.T. pura, así como una placa de agar NB con colonias de *Pseudomona* en la figura 13 (datos en apéndice, tabla 7).

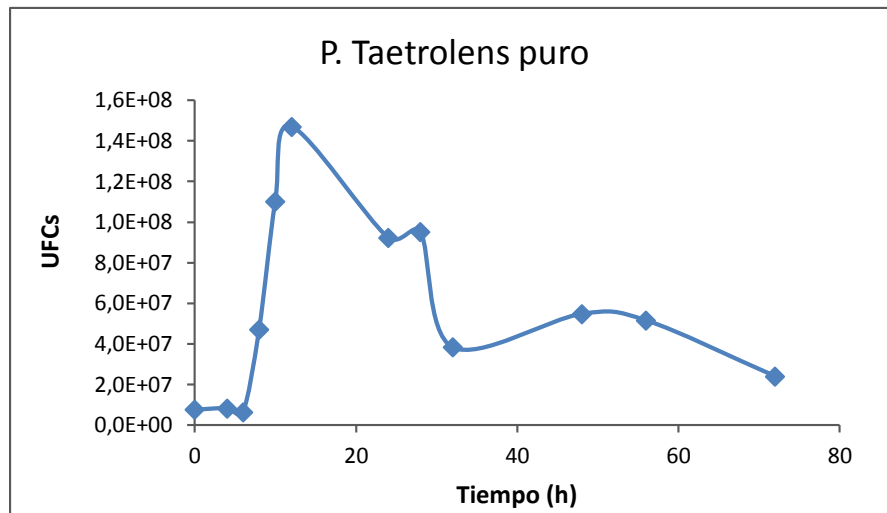


Figura 12. Recuento de UFCs en la fermentación de P.T. pura.

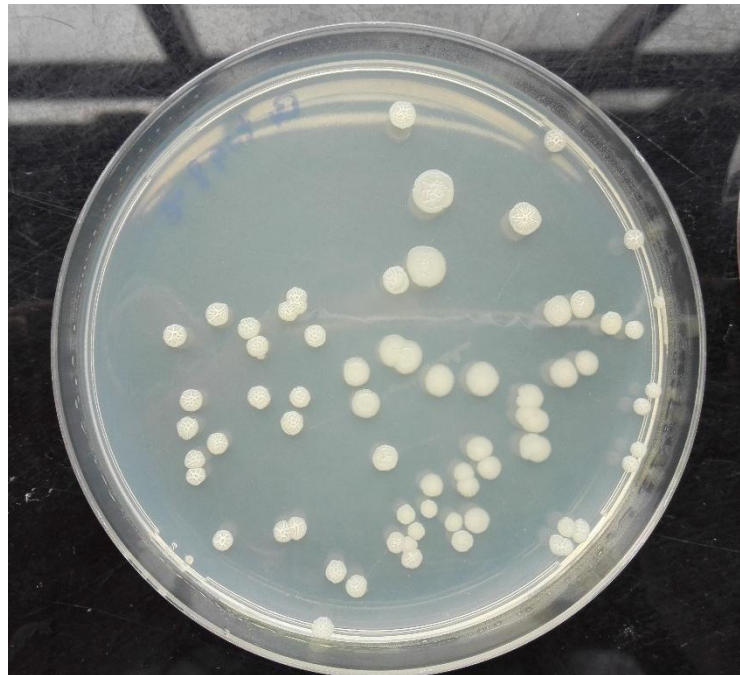


Figura 13. Placa de agar NB con colonias de *Pseudomona Taetrolens*.

Al igual que en el caso del *Lactobacillus Casei*, en las primeras horas de fermentación la cantidad de bacterias aumenta considerablemente hasta los $1,47 \times 10^6$ UFCs por mililitro, y después desciende de forma algo más brusca.

En los cocultivos se hacen siembras en ambos medios (NB y MRS), pero cada bacteria crece solamente en su medio. En la figura 14 se muestran los recuentos de UFCs del cocultivo en condiciones de L.C., tanto de *Pseudomona* como de *Lactobacillus* (datos en apéndice, tablas 6 y 7).

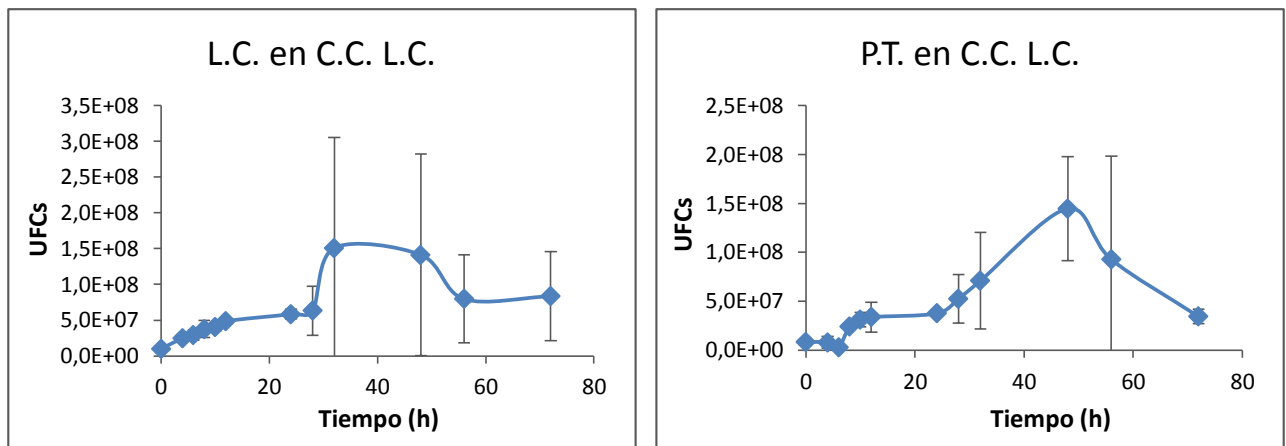


Figura 14. Recuento de UFCs en la fermentación mixta en condiciones de L.C.

En el cocultivo las tendencias son más irregulares aunque se aproximan a las anteriores, con un crecimiento inicial más lento que en los cultivos puros hasta casi los $1,5 \times 10^8$ UFCs de ambas bacterias, seguido de un descenso causado por la muerte de estas.

En las placas de agar se observa que las colonias de *Pseudomona*, a partir de las 8 horas son mucho más pequeñas que en el cultivo puro (figura 15), en cambio las colonias de *Lactobacillus* tienen el mismo tamaño en cocultivo y en cultivo puro.

Los recuentos de UFCs del cocultivo en condiciones de P.T. se muestran en la figura 16 para ambas bacterias (datos en apéndice, tablas 6 y 7). El L.C. muestra un crecimiento muy pequeño en las primeras de horas llegando a $7,9 \times 10^7$ UFCs por mililitro, y luego desciende suavemente. La cantidad de UFCs de P.T. cae directamente a cero en las primeras 8 horas y no muestra ningún crecimiento.

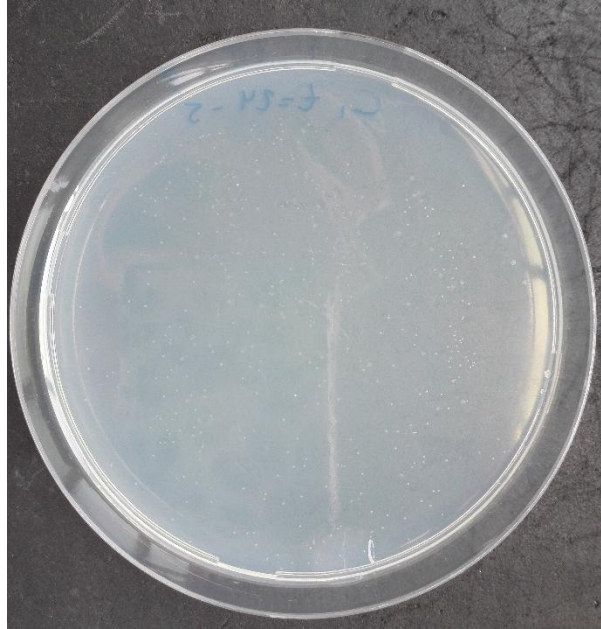


Figura 15. Placa de agar NB con colonias de P.T. poco desarrolladas.

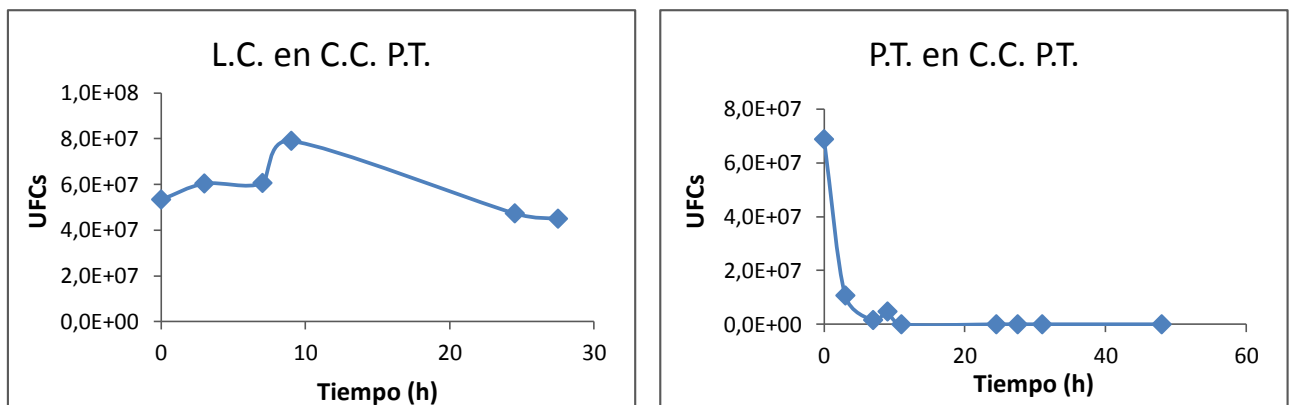


Figura 16. Recuento de UFCs en la fermentación mixta en condiciones de P.T.

No se cuenta con muchos datos del cocultivo en condiciones de *Pseudomona Taetrolens* ya que en varias ocasiones resultó contaminado por otras bacterias que fueron identificadas a la hora de hacer el recuento en las placas. En la figura 17 se muestran algunas de estas contaminaciones. En la primera imagen estas colonias tienen una textura diferente que se puede apreciar en la ampliación, y en la segunda imagen se ve claramente ya que son de otro color.

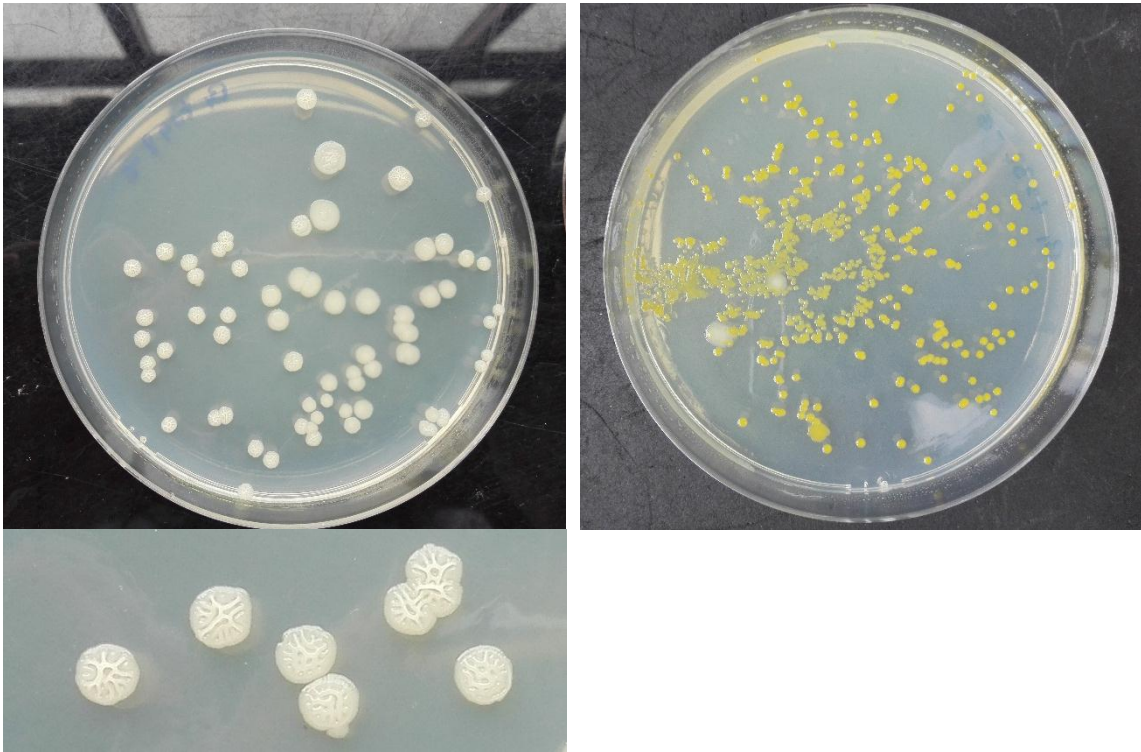


Figura 17. Placas de agar con contaminación.

4.4. EVOLUCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LACTOSA

La concentración de lactosa presente en el suero de todos los cultivos sigue una tendencia descendente, lo que es de esperar ya que es el sustrato de la reacción, pero muy irregular como se puede observar en la figura 18 (datos en apéndice, tabla 8). Parte de un valor de entre 35 y 50 g/L y desciende hasta los 25 o 30 g/L según el cultivo.

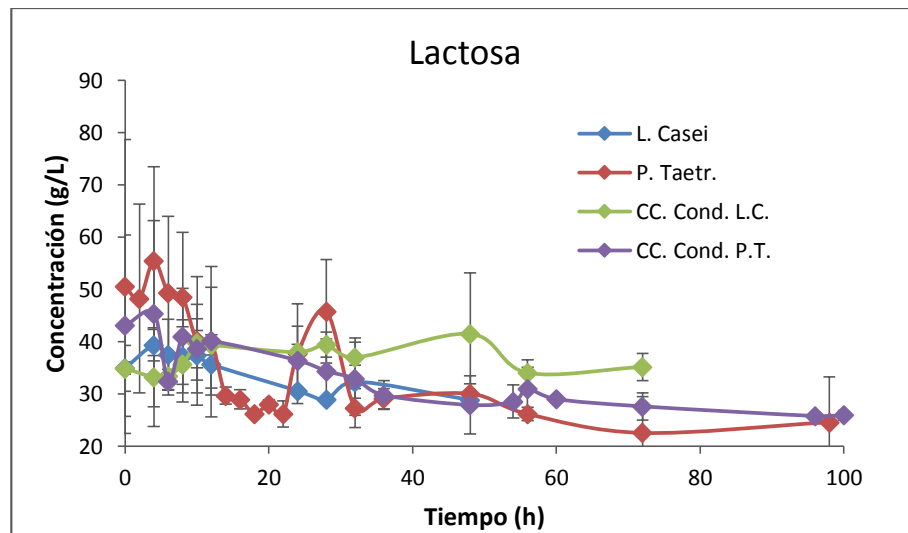


Figura 18. Evolución de la concentración de lactosa en los cuatro cultivos.

4.5. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO

A continuación (figura 19) se compara la producción de ácido láctico del cultivo puro de L.C. con ambos cocultivos.

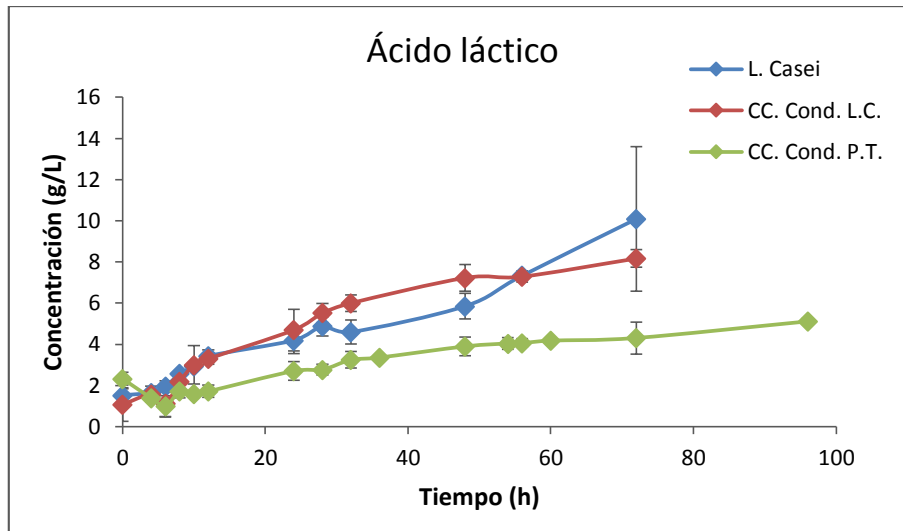


Figura 19. Producción de ácido láctico en el cultivo puro de L.C. y los cocultivos.

La fermentación en la que se alcanza más concentración de ácido láctico es en el cultivo puro de L.C., llegando a 10 g/L a las 72 horas. En el cocultivo en condiciones de L.C. se llega a una concentración menor pero bastante cercana, de 8,2 g/L, y en el cocultivo en condiciones de P.T., a las 72 horas la concentración aún era de 4,3 g/L, llegando a los 5,1 a las 96 horas (datos en apéndice, tabla 9).

4.6. PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LACTOBIÓNICO

Al igual que en el apartado anterior, se presenta en la figura 20 una comparación de la producción de ácido lactobiónico del cultivo puro de P.T. y los dos cocultivos.

En el cultivo puro de P.T. se alcanza una concentración de 10,7 g/L a las 98 horas, mientras que en los cocultivos este valor es bastante más bajo. En el cocultivo en condiciones de Pseudomona únicamente se llega a 2,5 g/L de ácido, cifra que se mantiene desde las 54 horas hasta el final de la fermentación, y en el cocultivo en condiciones de L.C. no se llega a producir nada (datos en apéndice, tabla 10).

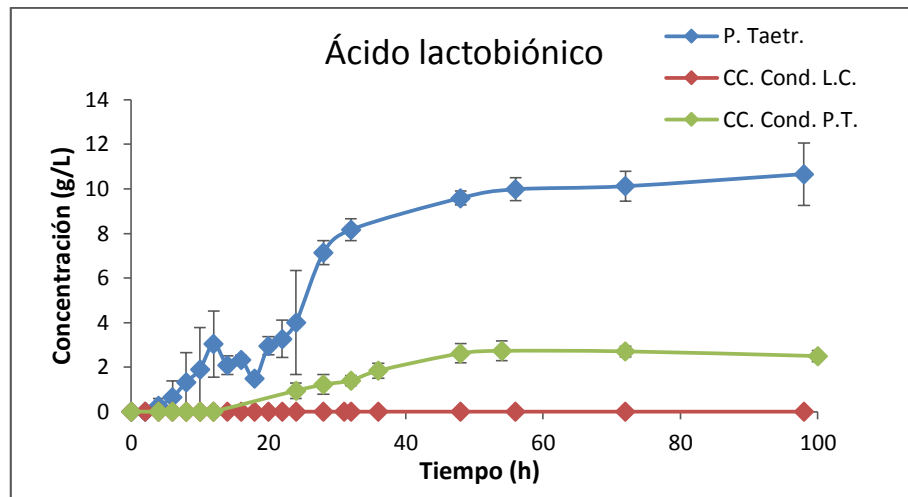


Figura 20. Producción de ácido lactobiónico en el cultivo puro de P.T. y los cocultivos.

4.7. EVOLUCIÓN DEL ESTADO FISIOLÓGICO DE LAS CÉLULAS

A continuación se presentarán las imágenes de citometría donde se puede comprobar el estado de las células. Las primeras figuras (figuras 21, 22 y 23) muestran las células con la tinción de CV6-IP, de las fermentaciones puras y los cocultivos.

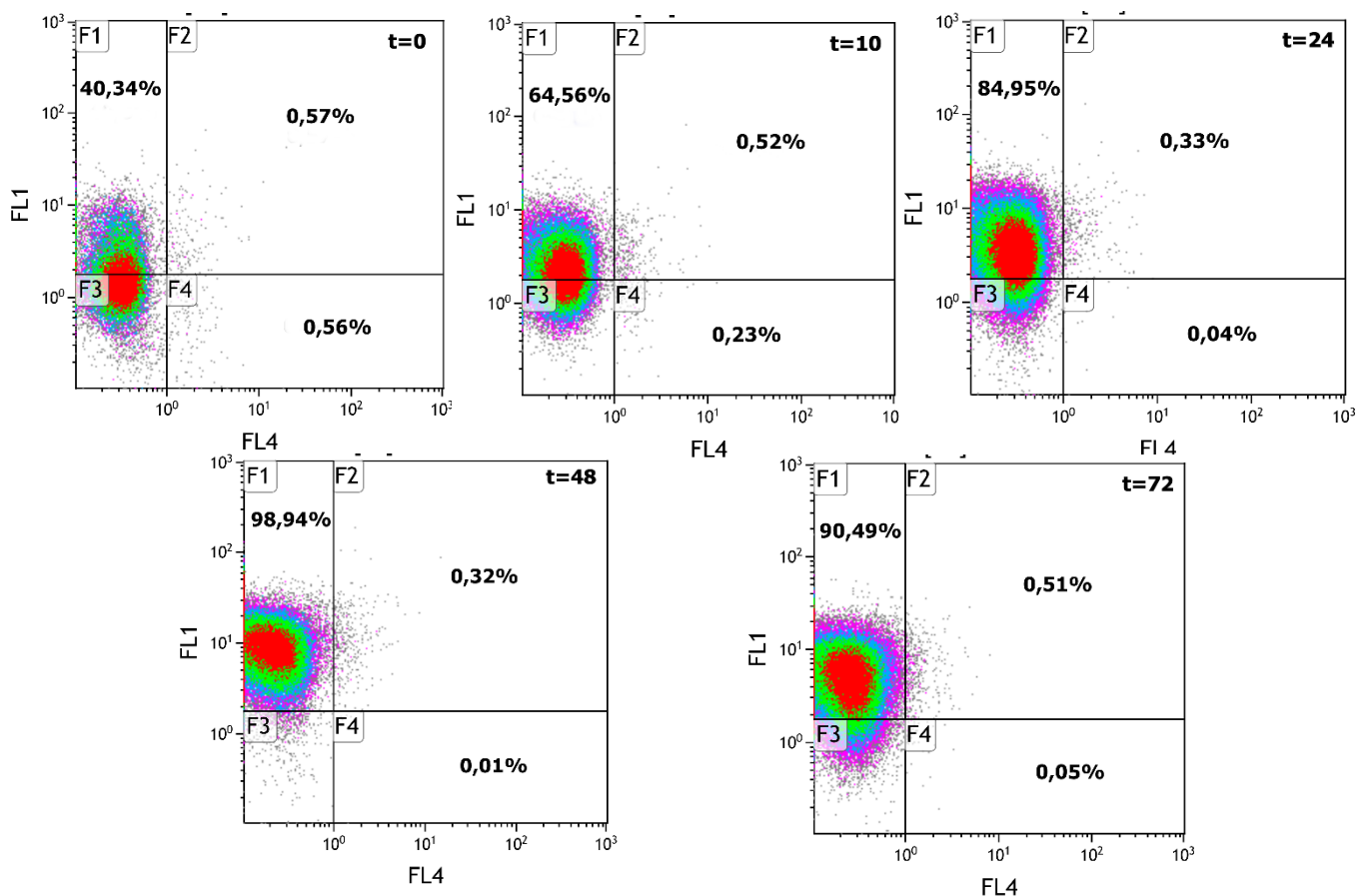


Figura 21. Evolución de la fermentación de L.C. puro con tinción CV6/IP.

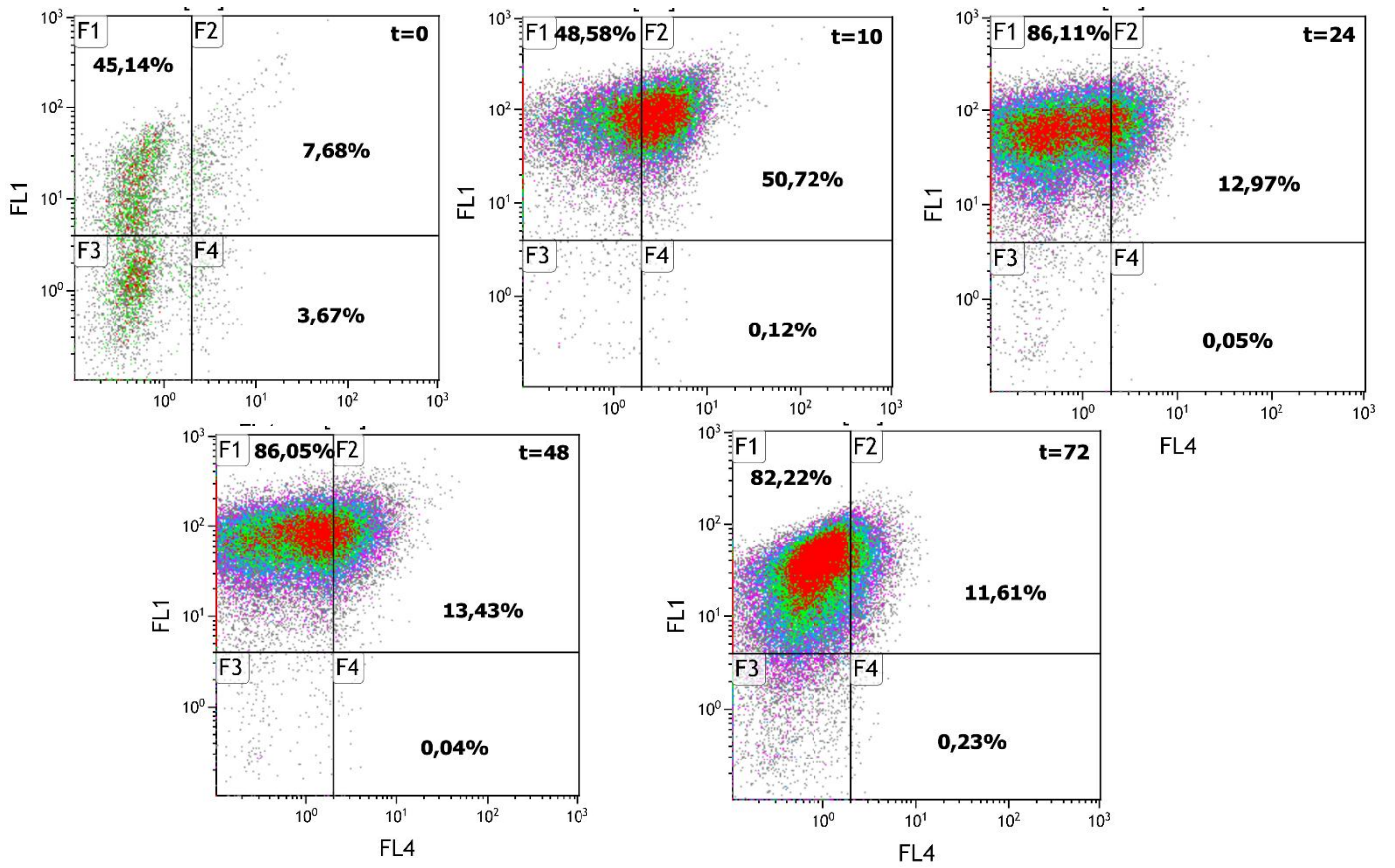


Figura 22. Evolución de la fermentación de P.T. puro con tinción CV6/IP.

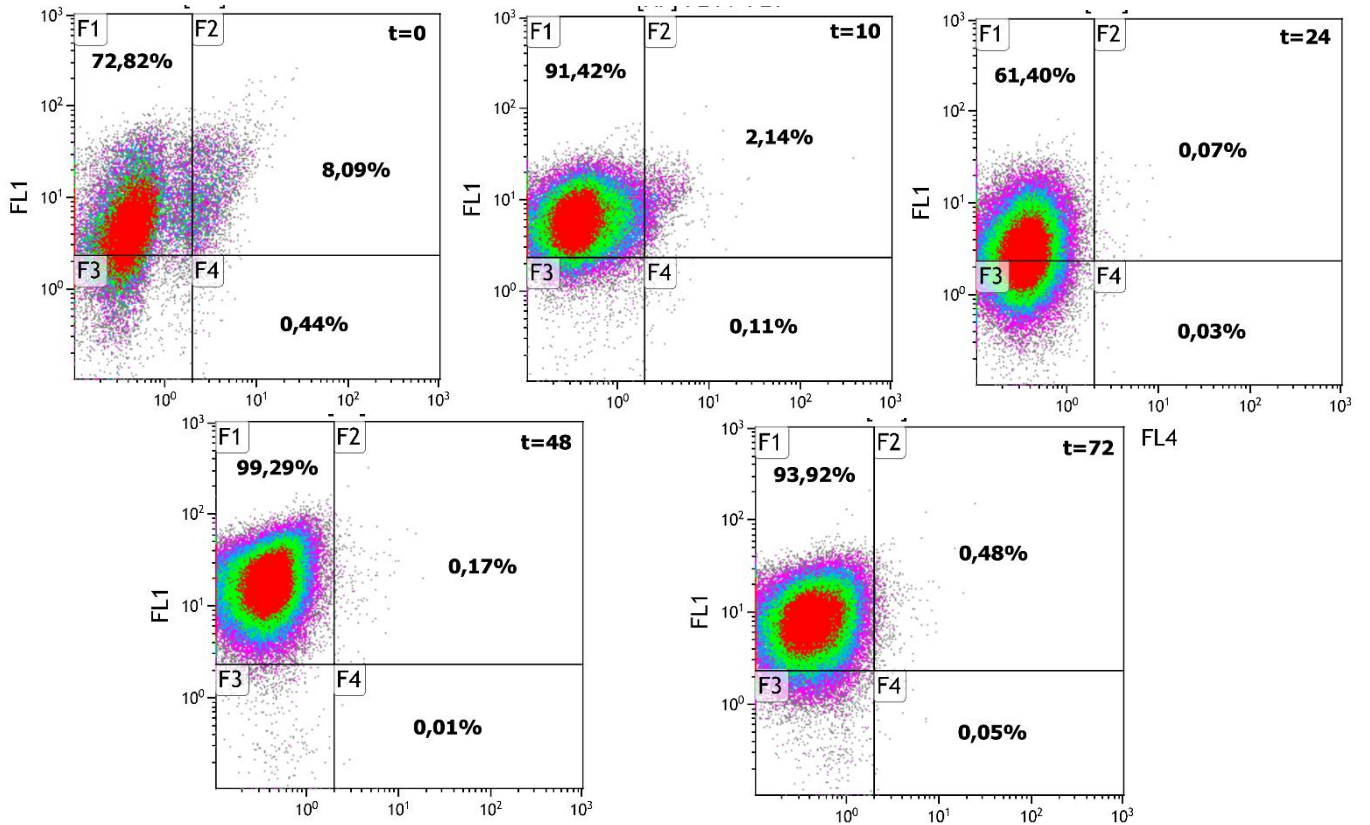


Figura 23. Evolución de la fermentación en cocultivo con condiciones L.C. con tinción CV6/IP.

En el cuadrante F1 se encuentran las células teñidas por el CV6, lo que significa que son metabólicamente activas. En todas las fermentaciones se observa un aumento en el porcentaje de células de este cuadrante con el tiempo, a excepción de las 72 horas en las que la cantidad de células metabólicamente activas disminuye como era de esperar.

En el cuadrante F4 se muestran las células teñidas por el IP, es decir, las células con la membrana dañada. Hasta las 72 horas apenas hay células dañadas en ninguna fermentación.

El cuadrante F2 recoge las células teñidas por ambos fluorocromos, por lo que sería células vivas pero con la membrana dañada. Únicamente aparecen células en este cuadrante en la fermentación de *Pseudomona Taetrolens* pura, y la cantidad va disminuyendo con el tiempo.

En las figuras 24, 25 y 26 se muestran los citogramas de Dibac e IP. En este caso el cuadrante F1 recoge las células teñidas por Dibac, lo que supone que son células con la membrana despolarizada.

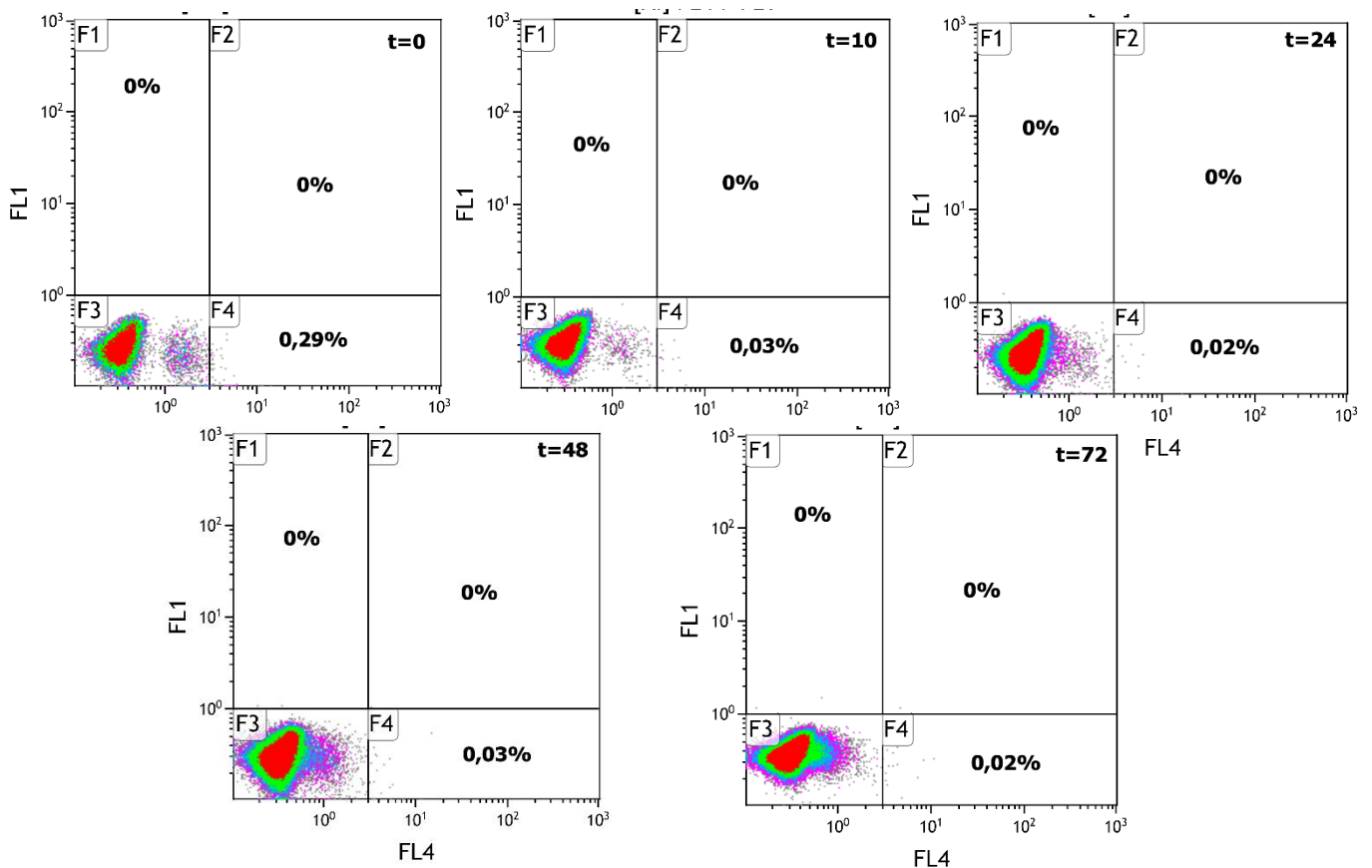


Figura 24. Evolución de la fermentación de L.C. puro con tinción Dibac/IP.

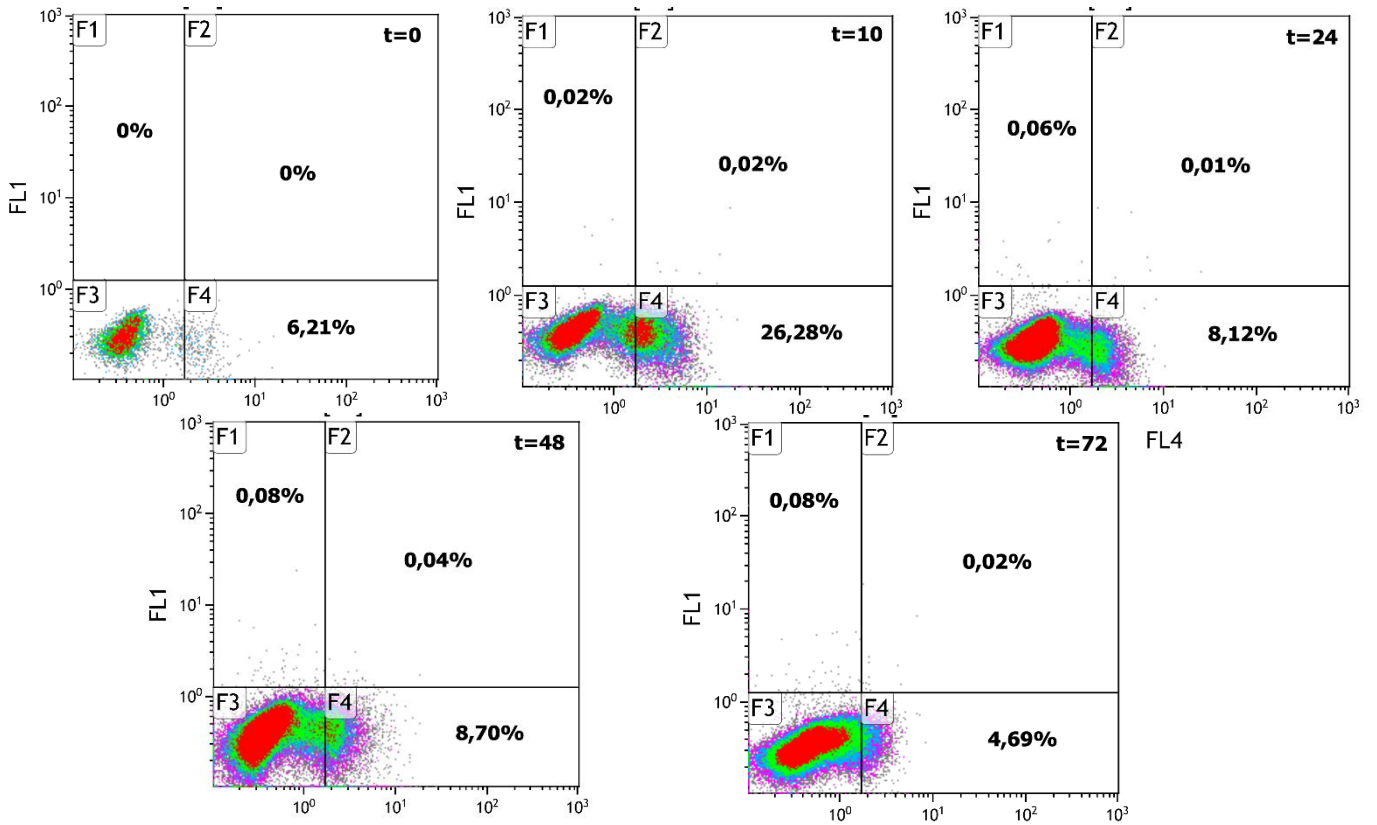


Figura 25. Evolución de la fermentación de P.T. puro con tinción Dibac/IP.

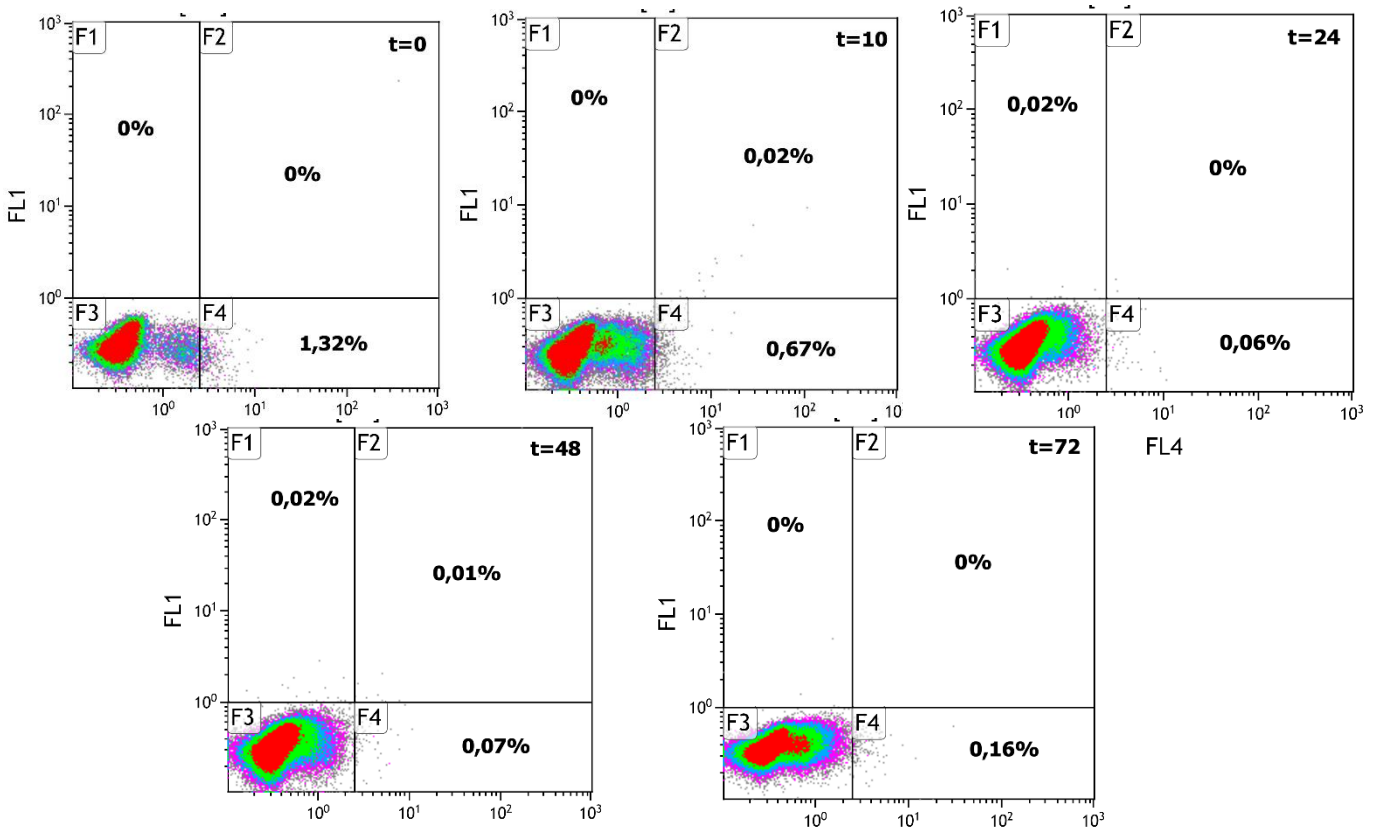


Figura 26. Evolución de la fermentación en C.C. L.C. con tinción Dibac/IP.

El Dibac no tiñe las células de ninguna de las fermentaciones, sin embargo en la fermentación de *Pseudomona Taetrolens* pura aparecen células teñidas con IP, es decir, con la membrana dañada (cuadrante F4). Con el paso de las horas el porcentaje de células dañadas disminuye.

5. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que los cultivos mixtos en las condiciones de operación que se han estudiado son menos productivos que los cultivos puros.

En el cocultivo en condiciones favorables para *Lactobacillus Casei*, esta bacteria parece desarrollarse sin problema y sintetizar ácido láctico, pero lo hace en menor cantidad que cuando se encuentra en cultivo puro. La *Pseudomona Taetrolens* en estas condiciones se desarrolla muy poco. Se pueden contabilizar colonias en las placas de agar y se observa un aumento en cantidad, pero a partir de cierto tiempo estas colonias son muy pequeñas. Además no se produce nada de ácido lactobiónico por lo que se concluye que estas condiciones no son nada favorables para la *Pseudomona Taetrolens*.

En el cocultivo en condiciones favorables para *Pseudomona Taetrolens*, el *Lactobacillus Casei* se desarrolla y produce aunque en menor cantidad que en los otros cultivos. La *Pseudomona* también se desarrolla peor, y produce la cuarta parte de ácido lactobiónico que llega a producir en el cultivo puro. En la tabla 3 se muestra un resumen de los datos de producción.

Tabla 3. Resumen de datos de producción.

	L.C. puro	P.T. puro	CC. cond. L.C.	CC. cond. P.T.
Ácido láctico (g/L)	10,1	-	8,2	5,1
Ácido lactobiónico (g/L)	-	10,7	0	2,5

El *Lactobacillus Casei* es capaz de convivir en sus condiciones con la *Pseudomona Taetrolens* influyendo únicamente en la producción de ácido láctico que desciende 2 g/L, y también es capaz de adaptarse a las condiciones de aireación, temperatura y agitación de dicha bacteria aunque la producción baje significativamente.

Por otra parte, la *Pseudomona* se ve más afectada por la presencia del *Lactobacillus*, ya que en el cocultivo en condiciones de P.T. la producción de lactobiónico desciende mucho, y en las condiciones de L.C. directamente no sintetiza nada.

En las imágenes proporcionadas por el software de citometría de flujo no se distinguen una bacteria de la otra, por lo que hay que recurrir al recuento en placas para comprobar el crecimiento de cada una de ellas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALONSO S. Obtención de ácidos orgánicos por fermentación de subproductos lácteos. Tesis doctoral, Oviedo 2013.
- ALONSO S. *et al.* Bio-production of lactobionic acid: Current status, applications and future prospects. *Biotechnology Advances*, 31, 1275-1291, 2013.
- ALONSO S. *et al.* Residual yoghurt whey for acid lactic production. *Biomass and Bioenergy*, 34, 931-938, 2010.
- ESCALANTE-MINAKATA P. & IBARRA-JUNQUERA V. Los cultivos mixtos y las fermentaciones alcohólicas.
- GUIMARÃES P.M.R *et al.* Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28, 375-384, 2010.
- GUTIERREZ L. *et al.* Lactobionic acid: A high value-added lactose derivative for food and pharmaceutical applications. *International Dairy Journal*, 26, 103-111, 2012.
- MARCH G.A. & EIROS J.M. Citometría de flujo: fundamento, instrumentación y aplicaciones en microbiología clínica. *Electronic Journal of Biomedicine*, 3, 45-53, 2012.
- MOITA R. *et al.* Crude glycerol as feedstock for polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *Water Research*, 58, 9-20, 2014.
- MORESI M. & PARENTE E. Production of some organic acids (Citric, gluconic, lactic and propionic). *Fermentation (Industrial)*, 804-815.
- MURCIA J.L. Alimentos funcionales. *Distribución y Consumo*, 5, 48-50, 2013.
- OTONIEL J. *et al.* Biodegradación de gasoil rango diesel por un cultivo mixto de bacterias. *Ciencia*, 13 (1), 23-33, 2005.
- PANESAR P.S. *et al.* Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105, 1-14, 2007.
- PANESAR P.S *et al.* Production of L(+) lactic acid using *Lactobacillus Casei* from whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, n.1, 219-226, 2010.

- QUIRÓS C. *et al.* Application of flow cytometry to segregated kinetic modeling based on the physiological states of microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, nº 12, 3993-4000, 2007.
- SENEVIRATHNE N.D. *et al.* Effect of mixed microbial culture treatment on the nutritive value of coffee, green tea and oolong tea residues and the effect of fermented residues on *in vitro* rumen fermentation. *APCBEE Procedia*, 4, 66-72, July 2012.
- SERNA-COCK L. Producción biotecnológica de ácido láctico: Estado del arte. *Ciencia y tecnología alimentaria*, 5, 54-65, 2005.
- SIRÓ I. *et al.* Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. *Appetite*, 51, 456-467, 2008.
- SISO M.I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 57, 1-11, 1996.
- SPALATELU C. Biotechnological valorization of whey. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 10, 1-8, 2012.
- VASILIADOU I.A. *et al.* Biological removal of pharmaceutical and personal care products by a mixed microbial culture: Sorption, desorption and biodegradation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 108-119, 2013.

7. APÉNDICES

Tabla 4. Datos medios de pH de los cultivos.

pH				
Tiempo (h)	L. C. puro	P. T. puro	Cocultivo Cond. L.C.	Cocultivo Cond. P.T.
0	5,38	6,46	5,41	5,64
3			5,02	
4	4,94	6,38	5,06	5,18
5			4,92	
6	4,78	6,58	4,77	5,08
7			4,89	
8	4,59	6,35	4,56	5,09
9			4,86	
10	4,43	6,57	4,37	5,09
11			4,83	
12	4,32	6,40	4,26	5,12
20		5,89		
24	3,82	6,19	3,81	4,55
24,5			4,46	
28	3,62	6,04	3,74	4,33
31			4,36	
32	3,60	5,89	3,69	4,20
36		4,99		4,25
48	3,59	5,58	3,76	3,86
54				3,84
56		5,14	3,48	3,90
60				3,96
72		4,88	3,51	3,82
96				3,70
98		4,49	3,97	
100				3,77

Tabla 5. Datos medios de densidad óptica de los cultivos.

Densidad óptica				
Tiempo (h)	L. C. puro	P. T. puro	Cocultivo Cond. L.C.	Cocultivo Cond. P.T.
0	0,120	6,455	0,287	0,538
4	0,224	6,375	0,367	0,576
6	0,345	6,580	0,477	0,800
8	0,514	6,350	0,571	0,629
10	0,539	6,565	0,678	0,745
12	0,672	6,398	0,735	0,728
20		5,890		
24	0,703	6,185	0,928	0,910
28	0,813	6,040	0,951	1,027
32	0,763	5,890	0,992	1,084
36		4,990		0,997
48	0,830	5,575	0,998	1,156
54				1,134
56		5,140	0,923	1,082
60				1,132
72		4,875	0,929	1,155
96				1,035
98		4,490		
100				1,317

Tabla 6. Datos medio de UFCs de *Lactobacillus Casei* en los cultivos.

UFCs L. Casei			
Tiempo (h)	L. C. puro	Cocultivo Cond. L.C.	Cocultivo Cond. P.T.
0	2,49E+06	9,83E+06	5,33E+07
4	1,29E+07	2,49E+07	
6	1,67E+07	2,92E+07	
7			6,07E+07
8	2,79E+07	3,76E+07	
9			7,90E+07
10	5,02E+07	4,00E+07	
12	5,83E+07	4,86E+07	
24	5,31E+07	5,83E+07	
24,5			4,73E+07
27,5			4,50E+07
28	3,47E+07	6,31E+07	
32	4,94E+07	1,51E+08	
48	4,68E+07	1,41E+08	
56	3,49E+07	7,95E+07	
72	3,47E+07	8,34E+07	

Tabla 7. Datos medio de UFCs de *Pseudomona Taetrolens* en los cultivos.

UFCs P. Taetrolens			
Tiempo (h)	P. T. puro	Cocultivo Cond. L.C.	Cocultivo Cond. P.T.
0	7,47E+06	8,10E+06	6,87E+07
3			1,08E+07
4	8,18E+06	7,95E+06	
6	6,29E+06	2,67E+06	
7			1,50E+06
8	4,70E+07	2,42E+07	
9			4,67E+06
10	1,10E+08	3,12E+07	
11			0,00E+00
12	1,47E+08	3,38E+07	
24	9,23E+07	3,75E+07	
24,5			0,00E+00
27,5			0,00E+00
28	9,53E+07	5,25E+07	
31			0,00E+00
32	3,83E+07	7,08E+07	
48	5,47E+07	1,45E+08	0,00E+00
56	5,15E+07	9,28E+07	
72	2,40E+07	3,42E+07	
98			0,00E+00

Tabla 8. Datos medios de concentración lactosa de los cultivos.

Lactosa (g/L)				
Tiempo (h)	L. C. puro	P. T. puro	Cocultivo Cond. L.C.	Cocultivo Cond. P.T.
0	34,947	50,568	34,897	43,065
2		48,239		
4	39,336	55,409	33,216	45,390
6	37,501	49,340	33,443	32,363
8	37,198	48,500	35,673	41,014
10	37,389	40,179	39,718	38,646
12	35,644	40,003	39,388	40,127
14		29,687		
16		28,945		
18		26,181		
20		27,994		
22		26,171		
24	30,607	37,701	37,992	36,428
28	28,900	45,785	39,441	34,389
32	32,343	27,315	36,963	32,896
36		29,121		29,780
48	28,866	30,055	41,502	27,905
54				28,540
56		26,173	34,052	30,934
60				29,027
72		22,559	35,176	27,627
96				25,793
98		24,598		
100				25,959

Tabla 9. Datos medios de producción de ácido láctico de los cultivos.

Ácido láctico (g/L)			
Tiempo (h)	L. C. puro	Cocultivo Cond. L.C.	Cocultivo Cond. P.T.
0	1,527	1,075	2,329
4	1,657	1,574	1,393
6	1,954	1,128	0,992
8	2,570	2,186	1,721
10	2,939	3,006	1,594
12	3,425	3,298	1,717
24	4,196	4,698	2,705
28	4,877	5,519	2,770
32	4,598	6,000	3,248
36			3,360
48	5,852	7,225	3,899
54			4,042
56	7,334	7,289	4,063
60			4,180
72	10,088	8,166	4,310
96			5,114
100			4,843

Tabla 10. Datos medios de producción de ácido lactobiónico de los cultivos.

Ácido lactobiónico (g/L)			
Tiempo (h)	P. T. puro	Cocultivo Cond. L.C.	Cocultivo Cond. P.T.
0	0,000	0,000	0,000
2	0,000	0,000	
4	0,263	0,000	0,000
6	0,641	0,000	0,000
8	1,325	0,000	0,000
10	1,901	0,000	0,000
12	3,035	0,000	0,011
14	2,092	0,000	
16	2,329	0,000	
18	1,496	0,000	
20	2,953	0,000	
22	3,265	0,000	
24	4,001	0,000	0,944
28	7,134	0,000	1,217
32	8,167	0,000	1,398
36	4,431	0,000	1,840
48	9,592	0,000	2,617
54			2,729
56	9,981	0,000	
72	10,121	0,000	2,707
98	10,665	0,000	
100			2,495