

# Evaluación del uso de lignina como agente encapsulante de bacterias ácido-lácticas para la producción de ácido láctico

## Evaluation of the use of lignin as an encapsulating agent of lactic-acid bacteria to produce lactic acid

Presentación: 21/08/2024

### **María Celeste Porporatto**

GPol, Departamento de Ingeniería Química, Facultad Regional San Francisco, Universidad Tecnológica Nacional – Argentina  
[celesteporporatto@gmail.com](mailto:celesteporporatto@gmail.com)

### **Valentina Basconi Vilosio**

GPol, Departamento de Ingeniería Química, Facultad Regional San Francisco, Universidad Tecnológica Nacional – Argentina  
[vasconivilosio@gmail.com](mailto:vasconivilosio@gmail.com)

### **Roxana Paez**

INCUVA- EEA Rafaela – Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) – Argentina  
[paez.roxana@inta.gob.ar](mailto:paez.roxana@inta.gob.ar)

### **Verónica Viviana Nicolau**

GPol, Departamento de Ingeniería Química, Facultad Regional San Francisco, Universidad Tecnológica Nacional – Argentina  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) – Argentina  
[vnicolau@sanfrancisco.utn.edu.ar](mailto:vnicolau@sanfrancisco.utn.edu.ar)

## **Resumen**

La lignina, uno de los biopolímeros más abundantes en la Tierra, es un recurso prometedor para aplicaciones sostenibles. Las bacterias ácido-lácticas son clave en la bioconversión de permeado de lactosuero (subproducto de la industria quesera) en ácido láctico, donde la inmovilización celular ofrece ventajas operativas.

En este trabajo se evaluó el impacto de la lignina Kraft de eucalipto en el crecimiento de bacterias ácido-lácticas y su uso para encapsularlas en matrices de alginato de sodio y una mezcla de alginato con alcohol polivinílico. Se comparó el rendimiento de las células inmovilizadas con células libres en la fermentación de permeado de suero lácteo, analizando el crecimiento bacteriano y la producción de ácido láctico. Además, se estudió el efecto de la técnica de congelación-descongelación en la viabilidad celular.

Los resultados indicaron que la lignina no afecta el crecimiento de BAL, es viable como agente encapsulante, y la congelación-descongelación no compromete la viabilidad del biocatalizador.

**Palabras clave:** bacterias ácido-lácticas, encapsulación, fermentación

## **Abstract**

Lignin, one of the most abundant biopolymers on Earth, is a promising resource for sustainable applications. Lactic acid bacteria are key in the bioconversion of whey permeate (cheese industry by-product) into lactic acid, where cell immobilization offers operational advantages.

In this work, the impact of eucalyptus Kraft lignin on LAB growth and its use to encapsulate lactic acid bacteria in sodium alginate and a mixture of alginate with polyvinyl alcohol matrices was evaluated. The performance of immobilized cells was compared to free cells in the fermentation of whey permeate, analyzing bacterial growth and lactic acid production. Additionally, the effect of the freezing-unfreezing technique on cell viability was studied.

The results indicated that lignin does not affect LAB growth, is viable as an encapsulating agent, and freezing-unfreezing does not compromise the viability of the biocatalyst.

**Keywords:** lactic-acid bacteria, encapsulation, fermentation

## Introducción

La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes y ampliamente distribuidos en la Tierra, constituyendo una parte significativa de la biomasa vegetal. A pesar de su abundancia y potencial, las tecnologías y métodos para su aprovechamiento y transformación están en una etapa de evolución y desarrollo continuo. Esto se debe a la complejidad estructural de la lignina y a los retos técnicos asociados con su procesamiento, lo que limita su utilización a gran escala en aplicaciones industriales. Sin embargo, la investigación y el desarrollo en este campo están avanzando, con el objetivo de mejorar la eficiencia de su uso y explorar nuevas aplicaciones sostenibles para este valioso recurso natural.

Se han realizado investigaciones sobre el uso de lignina en matrices de secado para encapsular microorganismos probióticos (Huy Vu, 2021), así como agente de inmovilización en la formulación de bioinoculantes (Tapia-Olivares, 2019) y enzimas para diversos bioprocesos (Benítez-Mateos et al., 2021). No obstante, hasta donde los autores conocen, no se han documentado estudios que exploren el uso de lignina Kraft (LK) para la encapsulación de bacterias ácido-lácticas (BAL) en la producción biotecnológica de ácido láctico (AL).

El AL tiene múltiples aplicaciones en diversas industrias como la alimentaria, la farmacéutica y cosmética, y la industria química (Datta et al., 2006). La producción de AL a través de la vía biotecnológica permite producir enantiómeros específicos (L- o D-ácido láctico) utilizando la cepa adecuada, lo cual es altamente valorado en aplicaciones específicas como la fabricación de bioplásticos; en contraste, a la síntesis química que produce una mezcla racémica.

Las BAL son conocidas por su uso en la producción de AL y compuestos antimicrobianos, así como por su capacidad para mejorar la salud intestinal y reforzar el sistema inmunológico (Holzapfel, 2002; Parvez et al., 2006). A pesar de sus numerosos beneficios y usos, las BAL enfrentan ciertos desafíos cuando se utilizan en aplicaciones industriales. Las condiciones ambientales adversas, que incluyen variaciones en el pH, la temperatura y el estrés osmótico, pueden reducir significativamente su viabilidad y actividad (Ljungh et al., 2006; Salminen et al., 1998). En su forma libre, las BAL son particularmente vulnerables, lo que se traduce en una limitación en su efectividad y estabilidad en productos finales.

La encapsulación en matrices poliméricas se presenta como una solución prometedora para proteger a las BAL y mejorar su viabilidad y funcionalidad. Este proceso implica la inclusión de las BAL en una matriz de material semipermeable polimérico que permita la difusión bidireccional de moléculas, tales como la afluencia de oxígeno, nutrientes, factores de crecimiento y otros, esenciales para el metabolismo celular, así como también la salida de desechos. La encapsulación de células ofrece ciertas ventajas como: separación y reutilización de las células al final de la fermentación, mayor densidad celular, velocidad de reacción y productividad volumétrica, y prevención de la inactivación interfacial. Dentro de los hidrogeles más empleados para la encapsulación de BAL se destacan los hidrogeles de alginato de sodio (S) y alcohol polivinílico (PVA) (Radosavljević et al., 2019).

Por otra parte, el uso de lactosuero como medio de fermentación en la producción de AL ofrece una serie de ventajas significativas. El lactosuero, un subproducto abundante de la industria quesera, es rico en lactosa, el azúcar fermentable que sirve como fuente principal de carbono para las BAL. Aprovechar este subproducto no solo contribuye a la sostenibilidad al reducir el desperdicio de recursos, sino que también disminuye los costos de producción al utilizar una materia prima económica y fácilmente disponible.

El propósito de este estudio fue, en primer lugar, evaluar el efecto de la LK en el crecimiento de las BAL. Luego, encapsular las BAL en dos matrices poliméricas distintas, una con LK y S, y otra con LK, S y PVA, para comparar su rendimiento con células libres en la fermentación de permeado de lactosuero. Finalmente, se analizó el impacto de la técnica de congelación-descongelación en la viabilidad del biocatalizador formulado con LK y S.

## Desarrollo

### Microorganismo y Preparación de los Cultivos Bacterianos

Se utilizó *Lactobacillus rhamnosus* (LR), cepa nativa perteneciente a la colección del Grupo de Polímeros (GPol, UTN). En todos los casos, se partió de un conservado bacteriano de LR el cual se activó mediante dos repiques sucesivos. Cada repique se realizó adicionando un 2% v/v de inóculo en Caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS) estéril, y luego se incubó 24 h en estufa a 37 °C.

### Materiales

Se emplearon los siguientes insumos y materiales: LK de eucalipto industrial (Suzano SA), alginato de sodio industrial, permeado de suero lácteo (Arla Food S.A), caldo MRS (Neogen), agar (Neogen), extracto de levadura (Neogen), peptona de carne (Neogen), Tween 80 (Biopack), sulfato de magnesio (Cicarelli), sulfato de manganeso (Cicarelli), citrato de sodio (Cicarelli), dicloruro de calcio (Cicarelli), y alcohol polivinílico (Cicarelli),

Para las fermentaciones se utilizó un medio estéril formulado a partir de permeado de suero lácteo (lactosa 27,6 g/L, extracto de levadura 2,5 g/L, peptona de carne 2,5 g/L, Tween 80 0,25 mL/L y solución de Mg/Mn 5mL/L) (Lavari et al., 2015).

### Síntesis del Biocatalizador

Para la preparación del biocatalizador se adoptó la metodología descrita por Radosavljević et al. (2019). A fin de aumentar la concentración celular, se realizó un tercer repique del cultivo bacteriano al 10% v/v en 500 mL de Caldo MRS, se incubó en estufa a 37 °C durante 24 h y luego se centrifugó a 3000 rpm para obtener el pellet bacteriano, el cual se suspendió y homogeneizó en la solución polimérica estéril.

La mezcla anterior se goteó en 500 mL de una solución estéril de dicloruro de calcio al 2% p/v bajo agitación de 50 rpm en cabina de flujo laminar. Las gotas gelifican en contacto con la solución de dicloruro de calcio atrapando así las células bacterianas en su interior (Fig. 1).

El biocatalizador obtenido (perlas) se mantuvo bajo agitación durante 60 minutos en la solución de dicloruro de calcio para permitir su endurecimiento. Finalmente, el biocatalizador se separó y se lavó con agua destilada (Fig. 2).



Figura 1. Preparación del biocatalizador.



Figura 2. Biocatalizador.

Para la conservación del biocatalizador, se lo suspendió en glicerol estéril como crioprotector y luego se congeló a -4 °C.

### *Evaluación de la viabilidad celular en presencia de LK*

Se prepararon dos cultivos bacterianos en caldo MRS. A uno de los cultivos se le adicionó 1% p/v de LK. Ambos cultivos se incubaron 24 h en estufa a 37 °C y se realizaron los correspondientes recuentos en placa.

Para el recuento en placa de células libres, se tomó 1 mL de la muestra y se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada con posterior siembra en placa de Petri con agar MRS. Las placas se incubaron 72 h en estufa a 37 °C y se realizaron los recuentos de colonias, expresándolos en UFC/mL.

### *Utilización de los biocatalizadores en fermentación*

Para la preparación del biocatalizador de matriz SL se utilizaron las siguientes soluciones poliméricas estériles: S 2% p/v y LK 2% p/v, en una proporción 1:1.

Para la preparación del biocatalizador de matriz SLA se utilizaron las siguientes soluciones poliméricas estériles: S 2% p/v, LK 2% p/v y PVA 5% p/v, en una proporción de 1:1:2,5 respectivamente.

Se llevaron a cabo tres fermentaciones en un baño calefactor a 37 °C por 24 h y pH libre (Fig. 3): con células libres, con células encapsuladas en la matriz SL y con células encapsuladas en la matriz SLA; todas por triplicado.

Se realizaron mediciones iniciales y finales de pH, lactosa mediante titulación de Fehling-Cause-Bonnans, acidez expresada en grados Dornic y recuento en placa de las células libres y de las células encapsuladas.



Figura 3. Sistema de fermentación.

Para el recuento en placa de células encapsuladas se disolvieron bajo agitación 1 g de perlas en 9 mL de una solución estéril de citrato de sodio 2% p/v y luego se realizaron diluciones seriadas en agua peptonada con posterior siembra en placa de Petri con agar MRS. Las placas se incubaron 72 h en estufa a 37 °C y se realizaron los recuentos de células viables, expresándolos en UFC/g de biocatalizador.

#### *Evaluación de la viabilidad celular del biocatalizador post congelación*

El biocatalizador analizado en esta tarea corresponde a la matriz SL. Luego de la determinación de la concentración celular en el biocatalizador, el mismo se congeló a -4 °C durante 60 días empleando glicerol como crioprotector. Posteriormente, se procedió a su descongelamiento a temperatura ambiente y se determinó la concentración celular post-congelación mediante recuento en placa de células encapsuladas.

## Resultados

Con respecto al recuento de células en cultivos con y sin LK, la concentración inicial celular en ambos medios fue de  $3,83 \times 10^7$  UFC/mL. Luego de 24 h, se registró un aumento de la viabilidad celular alcanzando  $1,70 \times 10^9$  UFC/mL en el cultivo sin LK y  $2,42 \times 10^9$  UFC/mL en el cultivo con LK. Estos resultados demostraron que la presencia de LK no afecta el crecimiento celular de las BAL.

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de las fermentaciones. Las condiciones iniciales de pH y lactosa en todos los casos fueron de 6,07 y 27,6 g/l, diferenciándose en la concentración inicial celular. Para la fermentación con células libres se partió de una concentración inicial de  $1,80 \times 10^7$  UFC/mL, mientras que para las células encapsuladas las concentraciones fueron de  $4,55 \times 10^5$  UFC/mL y  $9,5 \times 10^5$  UFC/mL para los cultivos encapsulados en SL y SLA, respectivamente; con concentraciones dentro de los biocatalizadores de  $2,25 \times 10^7$  UFC/g en la matriz SL y  $1,82 \times 10^7$  UFC/g en la matriz SLA.

Tabla 1. Fermentaciones: Mediciones finales de pH, acidez, lactosa y UFC. Factor de conversión sustrato-producto  $Y_{(p/s)}$  y productividad.

Biocatalizador	t(h)	pH	Acidez (°D)	lactosa (g/L)	UFC	$Y_{(p/s)}$ (g AL/g lactosa)	Productividad (g/Lh)
LR LIBRE	24	3,26	11,09	20,69	$1,04 \times 10^9$ <sup>a</sup>	1,56	0,46
MATRIZ SL	24	3,56	5,26	26,64	$2,96 \times 10^9$ <sup>b</sup>	1,66	0,22
MATRIZ SLA	24	3,83	4,11	24,60	$3,42 \times 10^9$ <sup>b</sup>	1,20	0,17

<sup>a</sup> UFC/mL, y <sup>b</sup> UFC/g.

El crecimiento celular al final de las fermentaciones fue de 2 órdenes log UFC superior tanto para las células libres como para las células encapsuladas.

El factor de conversión sustrato-producto,  $Y(p/s)$ , se incrementó en el siguiente orden:  $SLA < BL \cong SL$ .

En cuanto a la producción de AL, la matriz SL superó a la matriz SLA con una productividad de 0,22 g/Lh. La baja productividad de los biocatalizadores en la producción de AL respecto a las células libres (0,46 g/Lh) puede deberse a la baja carga celular inicial de los biocatalizadores en el medio de cultivo (5 log UFC/ml) en comparación con las células libres (7 log UFC/ml).

En cuanto al estudio de la viabilidad celular en el biocatalizador post congelación podemos decir que antes de la congelación, la concentración en el biocatalizador era de  $2,19 \times 10^9$  UFC/g y después de 60 días de congelamiento, la concentración se redujo a  $1,22 \times 10^9$  UFC/g. Aunque se observa una disminución en la concentración celular, esta se mantiene dentro del mismo orden de magnitud en la escala logarítmica sugiriendo que la congelación-descongelación es un método viable de conservación del biocatalizador.

## Conclusiones

Los resultados experimentales demostraron que la adición de LK al medio de cultivo en una concentración del 1% p/v no afecta el crecimiento de la cepa de LR. En cuanto a las fermentaciones con las BAL encapsuladas, se demostró que la presencia de LK no influye en el crecimiento celular dentro del biocatalizador. Además, la técnica de congelación-descongelación resultó ser efectiva para la conservación de cepas encapsuladas de LR, manteniendo su viabilidad a largo plazo sin comprometer su actividad biológica. Los resultados preliminares indican que la LK de madera dura tiene un potencial prometedor como agente de encapsulación de BAL, lo que sugiere una aplicación valiosa para su valorización.

## Referencias

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., F., & Villarán, M. C. (2010). "Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions". *International Journal of Food Microbiology*, 142(1-2), 185-189.

Datta, R., & Henry, M. (2006). "Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies—a review". *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(7), 1119-1129.

Dr. Ana I. Benítez-Mateos, Stefania Bertella, Jean Behaghel de Bueren, Prof. Jeremy S. Luterbacher, Prof. Francesca Paradisi. (2021). "Dual Valorization of Lignin as a Versatile and Renewable Matrix for Enzyme Immobilization and (Flow) Bioprocess Engineering". *European Chemical Societies Publishing*. Disponible en <<https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cssc.202100926>>

Heidebach, T., Först, P., & Kulozik, U. (2009). "Microencapsulation of probiotic cells for food applications". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(4), 354-371.

Holzappel, W. H. (2002). "Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries". *International Journal of Food Microbiology*, 75(3), 197-212.

Huy Vu. (2021). "Food Science and Technology". *Food Science and Technology*, 148, 111725-111735.

Lavari, L., Rocco, I., Paez, R., Zotta, T., Cuatrin, A., Reinheimer, J., Parente, E., Vinderola, G. (2015). "Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying". *Food Science and Technology*. 63, 322-330.

Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry". *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.

Ljungh, A., & Wadström, T. (2006). "Lactic acid bacteria as probiotics". *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 7(2), 73-89.

Parvez, S., Malik, K. A., Kang, S. A., & Kim, H. Y. (2006). "Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*. 100(6), 1171-1185.

Radosavljevic, M. (2019). "Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in polyvinyl alcohol/ calcium alginate matrix for production of lactic acid". *Journal of Biotechnology*. 45(3), 123-134.

Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W. M. & Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1-2), 93-106.

Tapia-Olivares. (2019). "Dual revalorization of lignin through its use as a versatile and renewable matrix for enzyme immobilization and (flow) bioprocess engineering". *Molecules*, 24, 4613-4611.