

DISEÑO DE MEDIOS DE CULTIVO A PARTIR DE HIDROLIZADOS DE PLASMA BOVINO

L. Toyé, D.M. Legisa, L. Navarro, M.L. Matos, M.V. Catone
Centro de Biotecnología Industrial – INTI
ltoye@inti.gob.ar

Introducción

El diseño y formulación de medios de cultivo para microorganismos requiere una base de nutrientes que aporte polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos. El tratamiento enzimático de subproductos industriales surge como alternativa de bajo costo para la obtención de estos nutrientes. Distintos procesos de hidrólisis enzimática pueden dar lugar a valiosas fuentes de proteínas. La elección del sustrato y del grado de hidrólisis, son factores que influyen en las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del hidrolizado (Tsoraeva y Zhurbenko, 2000). Sin embargo, no en todos los casos es factible hacer estas sustituciones, ya que la presencia o ausencia de ciertos nutrientes puede condicionar el crecimiento celular, así como la expresión de algunos metabolitos. En los últimos años, se ha explorado el potencial de ciertos productos de desecho cuyo tratamiento genera grandes costos asociados a los procesos productivos. En el caso de la industria cárnica el tratamiento y puesta en valor de subproductos como la sangre animal disminuye los costos de producción y genera un valor agregado al proceso productivo total.

Objetivo

El objetivo de este trabajo consiste en evaluar los hidrolizados obtenidos a partir de plasma bovino deshidratado como fuente de nitrógeno para el crecimiento de una cepa de *Lactobacillus casei* en comparación con el medio comercial, comúnmente utilizado y plasma sin hidrolizar.

Descripción

Obtención de hidrolizados

Se realizaron distintas hidrólisis enzimáticas en bioreactor (New Brunswick, Eppendorf, EUA) con control de temperatura a 60°C y regulación a pH 8 con NaOH 0,5M, con el fin de obtener hidrolizados de plasma bovino deshidratado al 5% en solución acuosa. Se probaron 2 relaciones distintas de enzima/sustrato (E/S) para obtener un hidrolizado con alto grado de hidrólisis (rel E/S 20%) y con bajo grado de hidrólisis (rel E/S 2%). La enzima utilizada, Alcalase® 2.4 L FG (Novozymes), es una serina endoproteasa que hidroliza uniones peptídicas internas.

Preparación de medios de cultivo

Se utilizaron los hidrolizados de alta y baja hidrólisis, y plasma sin hidrolizar para el reemplazo de peptona de carne comercial en la formulación de medio MRS para la producción de biomasa de una cepa de *Lactobacillus casei*. Para encontrar la concentración adecuada se probaron los distintos hidrolizados en un 100, 50 y 10 %. Se realizaron cultivos en medio comercial, como control frente a los hidrolizados, para probar la eficiencia en el crecimiento microbiano.

Condiciones de cultivo

Los cultivos se realizaron en microplaca de pozo profundo por triplicado de las distintas concentraciones y tipos de hidrolizados en cultivos *over-night* a 37°C y 200 rpm. Al finalizar el período de incubación se comparó la DO_{600nm} alcanzada para cada caso.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos de tres ensayos independientes se realizó aplicando un anova de dos factores bajo el test de Bonferroni con el programa "Graphpad Prism 5". La comparación se realizó frente a un medio preparado con peptona comercial.

Resultados

Hidrolizados obtenidos

En la tabla 1, se muestran los hidrolizados obtenidos con dos relaciones E/S distintas con el fin de obtener un mínimo y máximo grado de hidrólisis (GH). La hidrólisis enzimática finaliza cuando el consumo de base se estabiliza (ya que el consumo de base neutraliza los protones liberados en la hidrólisis de proteínas). El grado de hidrólisis alcanzado se estimó por el método de pH-estado (Guadix y col., 2000).

	Relación E/S (%)	Tiempo de reacción (min)	Grado de hidrólisis (%)
Bajo GH	2	360	11
Alto GH	20	30	22

Tabla 1. GH de los hidrolizados obtenidos

Cultivos en microplaca

Se evaluó la capacidad de generar biomasa a partir de distintas concentraciones de plasma de alta y baja hidrólisis, y sin hidrolizar, como reemplazo de peptona de carne comercial en la formulación de medio MRS. Se observó que aquellos medios formulados con el 100% de plasma lograban tener valores de biomasa más altos (Figura 1).

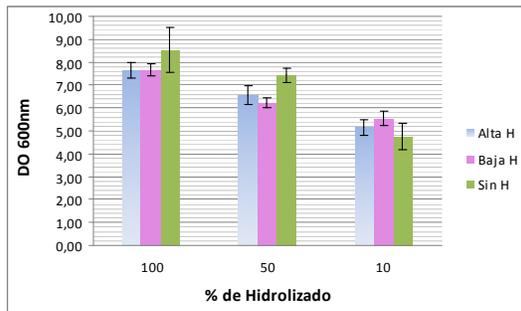


Figura 1: En las barras se observa los valores de biomasa obtenidos a partir de medio MRS formulado con distintos hidrolizados reemplazando la peptona de carne en distintos porcentajes.

Plasma hidrolizado y sin hidrolizar vs Medio comercial

En la figura 2 se puede observar que el plasma sin hidrolizar presentó valores de DO_{600nm} más altos que los hidrolizados, pero al evaluar la factibilidad de su uso a escala industrial, debió descartarse por su poca solubilidad y gran variabilidad en los resultados obtenidos.

Las diferencias encontradas entre alta y baja hidrólisis no fueron significativas, aunque sí se observaron diferencias frente al medio comercial, resultando en una mayor producción de biomasa con los medios formulados con hidrolizados.

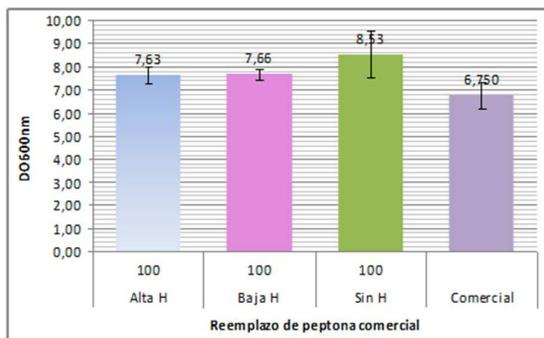


Figura 2: Las barras representan los valores de biomasa obtenida en tres ensayos independientes, al comparar los distintos hidrolizados con el medio comercial.

Conclusiones

- En las condiciones de trabajo utilizadas podemos concluir que el uso de hidrolizados de plasma bovino puede ser un buen sustituto para medios con peptonas comerciales para la generación de biomasa de *Lactobacillus casei*.
- Al comparar el porcentaje de hidrolizado en la composición del medio, se observaron diferencias significativas entre los distintos porcentajes utilizados. Al comparar los porcentajes de hidrolizado en la composición del medio, se observaron diferencias significativas. En este caso, la formulación con el 100% de hidrolizado mostró los valores de biomasa más altos.
- La comparación entre alta y baja hidrólisis no muestra diferencias significativas. Por lo tanto resulta más conveniente la utilización de hidrolizados con baja hidrólisis dado que son generados con un menor costo de enzima, y de esta manera con mayor posibilidad de implementación a escala industrial.
- El plasma bovino sin hidrolizar no resultó homogéneo ni de fácil preparación lo cual generó mayor variabilidad entre replicas, si bien mostró altos rendimientos en el crecimiento de *Lactobacillus*.
- Se planea la realización del escalado de los resultados obtenidos para evaluar la aplicación de estos medios económicos a escala industrial.

Bibliografía

Garboza, F., Frontado, R. y Noguera N. (2011). Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*. Rev de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2011; 31:138-143.

Tsoraeva, A. and Zhurbenko, R. (2000). Development and Characterization of a Mixed Nutrient Base for the Culture of a Wide Range of Microorganisms. Rev. Latinoamericana de Microb.42:155-161.

Zhurbenko R. (2006) Caracterización de la peptona de soya para el cultivo de microorganismos. Rev. Cubana Med Trop 58(2):109-18.