

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO POR FERMENTACIÓN DE MUCÍLAGO DE CAFÉ CON *LACTOBACILLUS BULGARICUS* NRRL-B548

LACTIC ACID PRODUCTION BY FERMENTATION OF COFFEE MUCILAGE WITH *LACTOBACILLUS BULGARICUS* NRRL-B548

MARIO ARIAS ZABALA

Profesor Asociado, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín, marioari@unal.edu.co

LINA HENAO NAVARRETE

Ingeniera Química, lnavarrete@hotmail.com.co

YULIETH CASTRILLÓN GUTIÉRREZ

Ingeniera Química, ycastrillon@gmail.com.co

Recibido para revisar febrero 29 de 2008, aceptado octubre 15 de 2008, versión final octubre 24 de 2008

RESUMEN: Se estudió la producción de ácido láctico (AL) por hidrólisis y fermentación simultánea de mucílago de café con *Lactobacillus bulgaricus* NRRL-B548 en matraces de 500 ml, conteniendo 400 ml de medio, agitados a 110 rpm. El pH del medio fue controlado manualmente entre 5.6 y 6.0 por adición de NaOH 5M cada 2 horas. La temperatura fue mantenida en 45°C. El volumen de inóculo fue de 10% del volumen de trabajo. Con miras a optimizar la productividad (P) del AL se ensayaron tres valores de concentración de inóculo (5, 10 y 15 g/l) y tres de concentración inicial de azúcares reductores totales (ART) (27, 35 y 60 g/l). La mayor concentración final de AL fue 41 g/l, obtenida con un inóculo de 10 g/l y una concentración inicial de ART de 60 g/l. La máxima productividad fue 1.44 g/l-h, a las 25 horas de fermentación, y se obtuvo con un inóculo de 10 g/l y una concentración inicial de ART de 60 g/l. Con estas mismas condiciones se obtuvo la máxima productividad al final del proceso (30 h) de 1.39 g/l-h. El coeficiente de rendimiento máximo (Y_{PS}), calculado a las 30 horas de fermentación, fue de 1.67 g/g, correspondiente a un inóculo de 15 g/l y una concentración inicial de ART de 60 g/l.

PALABRAS CLAVE: Ácido láctico, mucílago, fermentación, *Lactobacillus bulgaricus*.

ABSTRACT: It was studied the lactic acid (LA) production by simultaneous hydrolysis and fermentation of coffee mucilage with *Lactobacillus bulgaricus* NRRL-B548 in 500 ml vessels with 400 ml of medium, stirred at 110 rpm. The pH of medium was manually controlled between 5.6 and 6.0 by addition of NaOH 5M each 2 hours. Temperature was maintained at 45°C. The inoculum volume was 10% of the work volume. In order to optimize the LA productivity (P) three values of inoculum concentration (5, 10 and 15 g/l) and three initial concentrations of total reduction sugars (TRS) (27, 35 and 60 g/l) were tested. The maximal final concentration of LA was 41 g/l, obtained with an inoculum of 10 g/l and initial concentration of TRS of 60 g/l. The maximal productivity was 1.44 g/l-h, after 25 hours of fermentation, and it was obtained with an inoculum of 10 g/l and initial concentration of TRS of 60 g/l. At these same conditions it was obtained the maximal productivity at the end of the process (30 h) of 1.39 g/l-h. The maximal yield coefficient (Y_{PS}), calculated at 30 h of fermentation, was 1.67 g/g, corresponding to an inoculum of 15 g/l and initial concentration of TRS of 60 g/l.

KEY WORDS: Lactic acid, mucilage, fermentation, *Lactobacillus bulgaricus*.

1. INTRODUCCION

El ácido láctico (AL) es un químico valioso, ampliamente usado en las industrias de alimentos, farmacéutica, de cueros, textil y cosmética [5,15]. Dada su excelente reactividad, debido a que tiene tanto un grupo hidroxilo como uno carboxilo en su estructura, el AL puede sufrir una serie de conversiones químicas en productos potencialmente útiles como óxido de propileno, propilén glicol, 2,3-pentane-diona, ésteres de lactato, alanina y los ácidos acrílico, propiónico, acético y pirúvico [5, 10,11]. Recientemente ha habido un considerable incremento en la demanda de ácido L(+)-láctico para la producción de ácido poliláctico (APL), un polímero biodegradable cuyas aplicaciones van desde material para empaque hasta fibras textiles y aplicaciones biomédicas [2,4,11,18]. El AL es producido por síntesis química o por fermentación microbiana de diferentes carbohidratos [10,19]. Su síntesis química resulta siempre en una mezcla racémica de los isómeros D- y L-, lo cual es su principal desventaja. Su producción fermentativa tiene las ventajas de utilizar fuentes renovables como sustrato y producir ácido L- ó D-láctico ópticamente puro, dependiendo de la cepa seleccionada [10,18]. El mercado mundial del ácido láctico está creciendo a una tasa anual de 12-15% [17]. Mucho de este incremento se atribuye a los productos emergentes APL y al solvente benéfico ambientalmente etil lactato [16].

Una de las principales dificultades en la producción a gran escala del AL es el costo de las materias primas [15], siendo de interés encontrar nuevos medios de bajo costo para mejorar la economía del proceso [4]. El costo de las materias primas puede representar hasta el 68% del costo total para la producción de ácido láctico a partir de permeado de suero de leche y extracto de levadura [12]. El mucílago, un subproducto del proceso de beneficio del café, es un residuo utilizable potencialmente en la fermentación láctica como sustrato, dada su composición química. El mucílago está constituido por una capa gruesa de tejido esponjoso de 0.4 a 2.0 mm de espesor. Contiene 15% de sólidos en la forma de un hidrogel coloidal insoluble en agua, sin estructura celular; estos sólidos tienen 80% de ácidos pécticos y

20% de azúcar. El mucílago representa el 22% en peso del café despulpado y el 13% del peso del grano maduro y contribuye con el 28% de la contaminación generada por el beneficio húmedo tradicional del café, lo que equivale en promedio a una demanda química de oxígeno (DQO) de 120.000 mg/l [14]. La mayoría de azúcares totales del mucílago están en forma reductora. Su composición química es: 84.2% agua, 8.9% proteína, 4.1% azúcares reductores, 0.91% ácido péctico y 0.7% ceniza [6].

Hasta la fecha no se ha reportado ningún estudio que utilice el mucílago como sustrato para la producción de AL por fermentación. En este artículo se reportan los resultados obtenidos de la fermentación de mucílago con *Lactobacillus bulgaricus* NRRL-B548, gentilmente donada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, bajo distintas condiciones de concentración de inóculo y concentración inicial de sustrato, en proceso discontinuo en matraces agitados de 500 ml conteniendo 400 ml de medio.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismo Y Preparación Del Inóculo

Se utilizó la cepa liofilizada NRRL-B548 de *Lactobacillus bulgaricus*. La cepa se activó incubándola a 37°C en medio MRS en condiciones microaerobias. Los inóculos se prepararon en suero lácteo en polvo (70 g/l) enriquecido con extracto de levadura como fuente de nitrógeno, y fueron subcultivados cada dos días, hasta tener un volumen de inóculo suficiente con una concentración de biomasa entre 40 y 60 g/l.

2.2 Obtención Y Pretratamiento Del Mucílago De Café

El mucílago empleado se obtuvo en la Subestación El Rosario, granja experimental de la Federación Nacional de Cafeteros, localizada en el municipio de Venecia (Antioquia). Debido a la alta proporción de sólidos suspendidos provenientes de los restos de pulpa, endospermo,

pergamino y otras impurezas con que el mucílago sale del desmucilagador mecánico, se hace indispensable su filtración. Los filtrados fueron recolectados en bolsas plásticas y esterilizados inmediatamente en autoclave a 15 psig y transportados al laboratorio donde se conservaron a 4°C hasta el momento de su utilización.

2.3 Hidrólisis Enzimática

Con el fin de hacerlo más asimilable por el microorganismo, el mucílago se sometió a hidrólisis enzimática simultánea con la fermentación. Para ello se empleó la pectinasa comercial Pectinase AT-8XL, la cual hidroliza y despolimeriza la pectina del mucílago a un pH de 1 a 7 (óptimo entre 2.5 y 3.5) y en un intervalo de temperatura de 37 a 52°C. Análisis preliminares (datos no mostrados) permitieron establecer que la hidrólisis y la fermentación simultáneas reducen el tiempo de producción del ácido láctico y que la hidrólisis enzimática completa se alcanza aproximadamente a las 6 horas de iniciada la fermentación.

2.4 Fermentación

Se realizaron nueve (9) fermentaciones, correspondientes a un diseño experimental completamente al azar, resultantes de considerar dos factores (concentración del inóculo y concentración de azúcares reductores totales, ART) y tres niveles para cada factor, como se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Diseño experimental de las fermentaciones
Table 1. Experimental design of fermentations

Factor	Niveles		
Concentración de inóculo (g/l)	5	10	15
Concentración de ART (g/l)	27	35	60

Inicialmente se varió la concentración del inóculo, manteniendo la concentración inicial de azúcares reductores totales (ART) en un valor constante de 35 g/l. Posteriormente se varió la concentración inicial de ART manteniendo la del

inóculo en el mejor valor establecido en la etapa anterior. El criterio para determinar los mejores valores de concentración de inóculo y concentración inicial de ART fue la productividad de AL.

El medio de cultivo en cada erlenmeyer consistió de 400 ml de mucílago estéril complementado con extracto de levadura (10 g/l) como fuente de nitrógeno, debido a la ausencia de este elemento en el mucílago. El pH se ajustó manualmente entre 5.6 y 6.0 por adición de NaOH 5M cada 2 horas. La agitación se mantuvo en 110 rpm empleando un agitador de acción rotatoria acondicionado con una cámara de temperatura controlada. La temperatura se mantuvo en 45°C. Después de la hora 10 se tomaron muestras de medio cada 2 h. Las muestras tomadas eran inmediatamente centrifugadas. El precipitado se utilizó para determinar la concentración de biomasa por peso seco y el sobrenadante se almacenó para la posterior determinación de ácido láctico y azúcares reductores.

2.5 Métodos De Análisis

La biomasa se determinó por el método de peso seco [13], para lo cual se resuspendió el precipitado resultante de la centrifugación de la muestra, con 10 ml de agua destilada y se centrifugó nuevamente. Este procedimiento se realizó tres veces. El precipitado de biomasa lavado se secó en estufa a 65°C durante 24 horas, tiempo en que se obtuvo peso constante, y se pesó con precisión de 0.1 mg. La determinación de los azúcares reductores totales (ART) se hizo siguiendo el método de Lane-Eynon [1]. El ácido láctico (AL) se determinó por colorimetría [1], para lo cual se utilizó un espectrofotómetro marca Spectronic 20 Genesys.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Considerando que las concentraciones de sustrato, biomasa y producto tendieron a estabilizarse después de las 30 horas de fermentación, se tomó éste como el tiempo final de las fermentaciones. En la Tabla 2 se reportan las producciones, rendimientos y productividades de AL a las 30 horas (P_{30}), así

como las productividades máximas (P_{max}) de ácido láctico de las distintas fermentaciones y el tiempo en que se alcanzaron las mismas.

Los valores reportados en la Tabla 2 son comparables a algunos valores de concentración y productividad máxima (P_{max}) reportados en la literatura para fermentaciones lácticas en proceso discontinuo utilizando diversos sustratos y microorganismos, como se observa en la Tabla 3 [7].

La mayor P_{max} fue 1.44 g/l-h y se obtuvo en la Fermentación 2, correspondiente a un inóculo de 10 g/l y una concentración inicial de ART de 60 g/l, la mayor utilizada en este estudio. Es de anotar que la productividad máxima y el rendimiento de la Fermentación 9 son bastante próximos a los de la Fermentación 2, indicando que un aumento en la concentración del inóculo de 10 a 15 g/l no tiene un efecto significativo sobre el comportamiento de la fermentación. Esto es importante de tener en cuenta en el caso de procesos a escalas industrial donde una variación de concentración de inóculo de 50% puede corresponder a una variación significativa en la cantidad de biomasa inicial.

El mayor rendimiento de sustrato en producto fue 1.67 g/g obtenido en la Fermentación 3, correspondiente a un inóculo de 15 g/l y una concentración inicial de ART de 27 g/l. Este resultado reviste alguna lógica si se tiene en cuenta que ésta fue la fermentación con mayor concentración inicial de biomasa y menor concentración inicial de sustrato, condiciones

que llevarían a una alta conversión fraccional de sustrato en producto.

La máxima concentración final de AL, 41 g/l, obtenida en la Fermentación 2, es mayor a la reportada utilizando otros sustratos como alfalfa y, en algunos casos, suero de leche. Otros estudios reportan concentraciones finales de AL mayores a las aquí encontradas, pero utilizando sustratos puros como glucosa y sacarosa (ver Tabla 3), lo cual incrementa sensiblemente el costo final del AL obtenido.

En la Figura 1 se observa el comportamiento cinético de la mejor fermentación (Fermentación 2), definida como aquella que presentó la mayor productividad. En esta figura se observa que la concentración de biomasa permanece baja e incluso empieza a disminuir a las 30 horas, aunque la concentración del sustrato aún permanece alta. Este mismo comportamiento con respecto a la biomasa se observó en todas las fermentaciones lo que se explicaría por el efecto inhibitorio del AL sobre el crecimiento celular, ampliamente reportado en la literatura [3,8,9]. Este comportamiento muestra la conveniencia de ir retirando el AL producido del medio a medida que se va formando, manteniendo de este modo su concentración baja reduciendo su efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular e incrementando la conversión del sustrato en producto.

Tabla 2. Resultados de las fermentaciones
Table 2. Results of the fermentations

Fermentación	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Inóculo (g/l)	5	10	15	5	10	15	5	10	15
[ART] _o (g/l)*	36.0	62.2	29.1	59.5	27.3	38.0	25.0	33.4	58.4
[ART] _f (g/l)	16.1	34.8	13.5	41.5	14.0	13.7	12.0	13.5	34.5
[AL] _f (g/l)	27.8	41	30.4	31.3	26.3	34.7	22.5	31.5	38.8
Y_{PS} (g/g)**	1.14	1.20	1.67	1.25	1.63	1.17	1.45	1.31	1.22
P_{30} (g/l-h)	0.76	1.10	0.87	0.75	0.72	0.95	0.63	0.87	0.98
P_{max} (g/l-h)	0.97	1.44	1.1	1.32	1.02	1.24	0.9	1.14	1.39
t_{max} (h)***	23	25	12	10	12	21	12	23	27

*Valor determinado experimentalmente en $t = 0$

**Rendimiento de producto con respecto al sustrato.

***Tiempo correspondiente a la productividad máxima en cada fermentación.

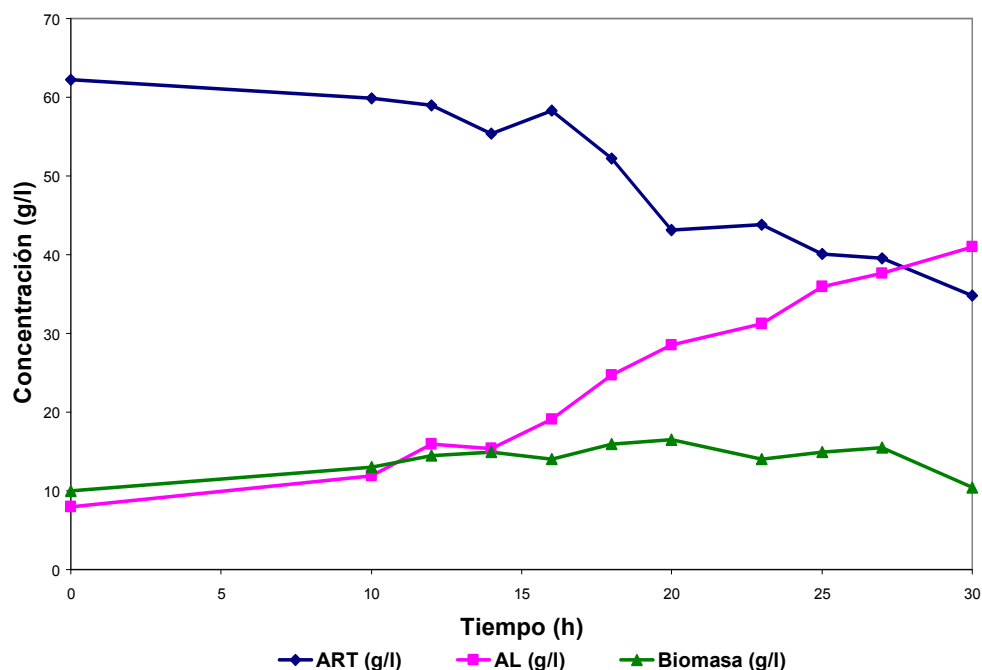


Figura 1. Comportamiento cinético de la fermentación con inóculo de 10 g/l y $[ART]_0$ de 60 g/l
Figure 1. Kinetic behavior of the fermentation with inoculum of 10 g/l and $[ART]_0$ of 60 g/l

Tabla 3. Valores de producción y productividad de AL para distintos sistemas fermentativos en proceso discontinuo [7]

Table 3. Values of production and productivity of LA to different fermentation systems in batch process [7]

Organismo	Sustrato	AL (g/l)	P_{max} (g/l-h)
<i>Ent. faecium</i>	Alfalfa	27	
<i>Lb. casei</i> SU No 22	Suero de leche	22	
<i>Lb. delbrueckii</i> IFO 3534	Glucosa	83	1.5
<i>Lb. delbrueckii</i> MIX varias cepas	Maíz hidroliz. + cebada	85	
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i>	Suero de leche	44	
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> Ch H 2217	Suero de leche	115	
<i>Lb. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> NRRL B-548	Lactosa	45	11
<i>Lb. helveticus</i> ATCC 15009	Suero de leche	49	1.3
<i>Lb. helveticus</i> L89	Suero de leche		3.1
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	Sacarosa	77	1.7
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	Glucosa	80	5.1
<i>Lb. rhamnosus</i> ATCC 10863	Glucosa	38	
<i>Lc. lactis</i> 65.1	Glucosa	39	
<i>Str. thermophilus</i>	Lactosa	40	7.1
<i>Lb. bulgaricus</i> NRRL-B548*	Mucílago	41	1.44

* Este estudio

La Figura 2 muestra el comportamiento de la productividad (P) de AL con el tiempo, para las distintas fermentaciones. Se observa claramente que la Fermentación 2 no sólo es la que presenta la mayor productividad puntual, a las 23 horas de fermentación, sino que es la que presenta prácticamente la mayor productividad a lo largo de todo el tiempo de fermentación. Un

comportamiento muy similar, desde el punto de vista de las productividades, es el exhibido por la Fermentación 9. Sin embargo, Esta última difiere de la Fermentación 2 en que la concentración del inóculo es 50% mayor, hecho que cobra relevancia a la hora de escalar el proceso debido a la cantidad inicial de biomasa que habría que preparar a escala de industrial.

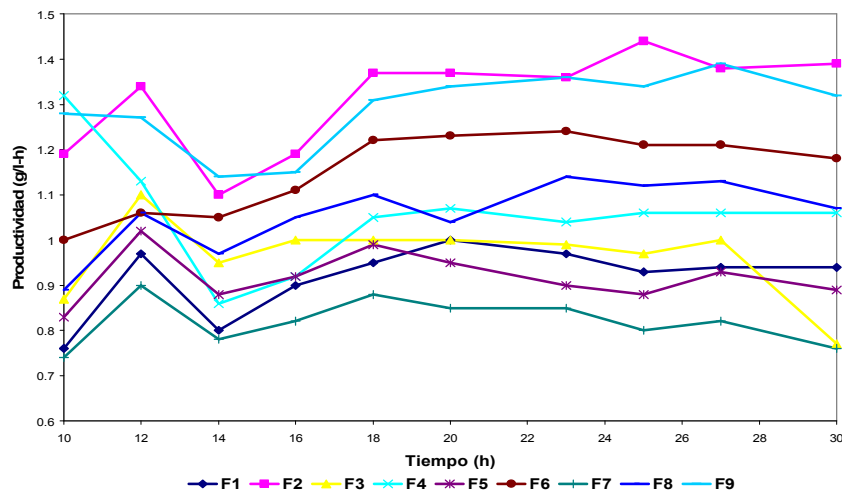


Figura 2. Variación de la productividad (P) del AL con el tiempo para las distintas fermentaciones
Figure 2. Variations of LA productivity (P) with time for the different fermentations

4. CONCLUSIONES

El carácter altamente contaminante del mucílago, un residuo proveniente del proceso de beneficio en seco del café, su composición y valor comercial prácticamente nulo, lo convierten en un sustrato atractivo para su aprovechamiento biotecnológico. En este estudio el mucílago mostró ser un sustrato potencial para la producción de ácido láctico vía fermentación con hidrólisis enzimática simultánea. Este proceso conducido en forma discontinua en matraces agitados presentó rendimientos y concentraciones finales de AL comparables a otros procesos discontinuos reportados en la literatura con otros microorganismos y otros sustratos. Los rendimientos y productividades obtenidos en este estudio, podrían ser mejorados optimizando otros parámetros de operación como la agitación y temperatura del proceso, así

como empleando estrategias de remoción del AL del medio en la medida que se va formando, lo cual reduciría su efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular, aumentando a su vez la conversión de sustrato en producto, lo que la productividad del proceso.

REFERENCIAS

- [1] AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 5th Edit, 806-807 and 1016-1017, 1990.
- [2] BAI, D., JIA, M., ZHAO, X., BAN, R., SHEN, F., LI, X., and XU, S. L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. Chemical Engineering Science, 58, 785-791, 2003.

- [3] BALANNEC, B., BOUGUETTOU-CHA, A., and AMRANE, A. Unstructured model for batch cultures without pH control of *Lactobacillus helveticus*-Inhibitory effect of the undissociated lactic acid. *Biochemical Engineering Journal*, 35(3), 289-294, 2007.
- [4] BUSTOS, G., MOLDES, A., ALONSO, J., AND VÁZQUEZ, M. Optimization of D-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. *Food Microbiology*, 21, 143-148, 2004.
- [5] DING, S., and TAN, T. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*, 41,1451-1454, 2006.
- [6] GODOY, L. Principios de Ingeniería Bioquímica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 1987.
- [7] HOFVENDAHL, K. and HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. A review. *Enzyme and Microbial Technology*, 26, 87-107, 2000.
- [8] ISHIZAKI, A., NOMURA, Y., and IWAHARA, M. Built-in electro dialysis batch culture, a new approach to release of end product inhibition. *J. Ferment. Bioeng.*, 70, 108-113, 1990.
- [9] ISHIZAKI, A., and UEDA, T. Growth kinetics and product inhibition of *Lactococcus lactis* IO-1 culture in xylose medium. *J. Ferment. Bioeng.*, 80, 287-290, 1995.
- [10] KADAM, S., PATIL, S., BASTAWDE, K., KHIRE, J., and GOKHALE, D. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry*, 41,120-126, 2006.
- [11] NEUREITER, M., DANNER, H., MADZINGAIDIZO, L., MIYAFUJI, H., THOMASSER, C., BVOCHORA, J., BAMUSI, S., and BRAUN, R. Lignocellulose feedstocks for the production of lactic acid. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 18 (1), 55-63, 2004.
- [12] OH, H., WEE, Y., YUN, J., HAN, S., JUNG, S., and RY, H., Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology*, 96, 1492-1498, 2005.
- [13] PIRT, S.J. Principles of microbe and cell cultivation. Chapter 3. P. 16. Blackwell Scientific Publications. 1975.
- [14] ROA, G., OLIVEROS, C., ÁLVAREZ, J., RAMÍREZ, C., ÁLVAREZ, J., SANZ, J., DÁVILA, M., ZAMBRANO, D., PUERTA, G., Y RODRÍGUEZ, N. Beneficio ecológico del café. Chinchiná - Colombia. CENICAFÉ. 1999. 300 p.
- [15] ROJAN, P., MADHAVAN, N., and PANDEY, A. Solid-state fermentation of L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41, 759-763, 2006.
- [16] SINGH, S., AHMED, S, and PANDEY, A. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochemistry*, 41, 991-1000, 2006.
- [17] WASEWAR, K. Separation of lactic acid: Recent advances. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 19 (2), 159-172, 2005.
- [18] WEE, Y., KIM, J., YUN, J, and RYU, H. Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 568-573, 2004.
- [19] YANKOV, D., MOLINIER, J., KYUCHOUKOV, G., ALBERT, J., and MALMARY, G. Improvement of the lactic acid extraction. Extraction from aqueous solutions and simulated fermentation broth by means of mixed extractant and TOA, partially loaded with HCl. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 19 (1), 17-24, 2005.