

Fermentación de *Lactobacillus pentosus* para la producción de ácido láctico

A. González-Leos^{1,2}, M. G. Bustos-Vázquez^{1,2}, G. C. Rodríguez-Castillejos², F. Vázquez-Nava², A.L. González-Pérez², A. Del ángel-Del ángel¹ y N. Rodríguez-Durán¹.

1 Departamento de Biotecnología, Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas Blvd. E. C. González 1201 Pte. Col. Jardín, 89840 Ciudad Mante, Tamaulipas, México. gbustos@docentes.uat.edu.mx

2 Departamento de Tecnología de Alimentos, UAM Reynosa-Aztlán, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Calle 16 y Lago de Chapala S/N Col. Aztlán C.P. 88740, Cd. Reynosa, Tamaulipas, México.

RESUMEN: {Debido al alto contenido de hemicelulosa en el bagazo de caña de azúcar y ser uno de los materiales de biomasa más abundantes disponibles y de bajo precio es posible su utilización como materia prima en fermentaciones para la producción de ácido láctico. El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo cinéticas de fermentación para la producción biotecnológica de ácido láctico, para ello, el bagazo se caracterizó y se trató químicamente para obtener muestras de hidrolizados ricos en hemicelulosa. El ácido láctico se obtuvo por la vía heterofermentativa utilizando la cepa *Lactobacillus pentosus* CECT 4023T, alcanzando un rendimiento teórico de 93.17% y rendimientos de $Y_{P/S}$ de 0.811 gg^{-1} , $Q_P = 0.3691 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Los resultados alcanzados demuestran la idoneidad de *Lactobacillus pentosus* CECT 4023T para ser utilizado como un productor eficiente de ácido láctico, utilizando hidrolizados lignocelulósicos a partir del bagazo de caña en un enfoque de biorrefinería.

Palabras clave: ácido láctico, bagazo de caña de azúcar, hidrolizado.

ABSTRACT: Due to the high hemicellulose content in sugarcane bagasse, one of the most abundant and low-price biomass materials available, it's possible to use it as a raw material in fermentations for the production of lactic acid. The aim of this research paper was to carry out fermentation kinetics on the biotechnological production of lactic acid. In order to do so, bagasse was characterized and chemically treated to obtain samples of hydrolysates rich in hemicellulose. Lactic acid was obtained for the heterofermentative pathway using the strain *Lactobacillus pentosus* CECT 4023T, which reached a theoretical yield of 93.17%, $Y_{P/S}$ yields of 0.811 gg^{-1} and $Q_P = 0.3691 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. The end results demonstrated the suitability of *Lactobacillus pentosus* CECT 4023T as an efficient producer of lactic acid.

Keywords: Lactic acid, sugarcane bagasse, hydrolysate.

Área: Aprovechamiento y valorización de subproductos

INTRODUCCIÓN

El bagazo de caña de azúcar es una fuente de biomasa lignocelulósica con alto potencial de aprovechamiento ya que está constituido por, aproximadamente, 50% de celulosa, 25% de hemicelulosa y 25% de lignina (Martínez *et al.*, 2002). El contenido de lignocelulosa se puede hidrolizar para producir azúcares fermentables para la obtención de productos biológicos de valor agregado como el ácido láctico, lo que aumenta la economía del proceso (Laopaiboon *et al.*, 2010). Después del tratamiento de hidrólisis de los materiales lignocelulósicos, la fracción de hemicelulosa se adecua para hacer que los azúcares (xilosa y glucosa) sean accesibles para los microorganismos fermentadores. Sin embargo, no todos los microorganismos fermentadores pueden utilizar la xilosa (pentosa). Una alternativa interesante es desarrollar un bioproceso tecnológico y económicamente viable sin utilizar estas cepas modificadas (Bustos *et al.* 2004). *Lactobacillus pentosus* puede usarse de esta manera, ya que puede fermentar la glucosa a ácido láctico por fermentación homoláctica y también puede convertir eficientemente la xilosa en ácido láctico y ácido acético por fermentación heteroláctica (Bustos *et al.*, 2018; Cruz *et al.*, 2007).

El ácido láctico (LA) es un producto químico con una amplia gama de aplicaciones, principalmente en la industria alimentaria (se utiliza aproximadamente el 80% de la producción total, especialmente como conservante microbiano o como agente para la acidificación o el control de pH), se produce principalmente por vía biotecnológica, siendo el costo del medio de cultivo de gran importancia

económica. El ácido láctico es utilizado en cosméticos, productos farmacéuticos, grabado de metales y operaciones de acabado de textiles y para la producción de ácido poliláctico biodegradable (PLA) que es empleado para aplicaciones médicas como suturas y clips para el cierre de heridas o dispositivos protésicos (Moldes *et al.*, 2007; Serna & Stouvenel, 2005; García *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta que la mayoría de los esfuerzos se centran en la valoración de la fracción celulósica, este trabajo tiene como objetivo aprovechar los azúcares hemicelulósicos presentes en la fracción líquida obtenida tras la hidrólisis ácida del bagazo de caña. En este estudio, se probó la capacidad de *L. pentosus* CECT 4023T para producir ácido láctico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

El bagazo de caña de azúcar fue proporcionado por el Ingenio Aarón Sáenz Garza de Ciudad Mante, Tamaulipas, México. El acondicionamiento del material fue un proceso de secado, molienda y tamizado (5 mm). Posteriormente, fue almacenado en recipientes cerrados para evitar fluctuaciones de humedad.

Hidrólisis ácida

Luego del acondicionamiento de la biomasa lignocelulósica, se realizó el tratamiento del bagazo de caña, usando una relación Sólido: Líquido 1:8 con ácido sulfúrico diluido al 2%, y a 122 °C, con un tiempo de reacción de 24 min, descrito previamente por Aguilar *et al.* (2002). El hidrolizado hemicelulósico obtenido fue separado del material fibroso por filtración al vacío. Del líquido se tomaron alícuotas para el análisis del hidrolizado hemicelulósico, se diluyeron y filtraron a través de una membrana de 0.45 µm y se analizaron por HPLC, para determinar el contenido de glucosa, xilosa, y ácido acético, usando una columna Transgenomic ICSepICE-ION 300 (fase móvil H₂SO₄ 0,0025 N, flujo de 0,5 mL/min, 37°C, y detector de IR a 880 nm a una temperatura de 40°C). Así mismo se determinó el contenido de compuestos inhibidores liberados tras la hidrólisis, mediante un análisis espectrofotométrico UV-Vis para determinar furfural e Hidroximetilfurfural a una longitud de onda de 230 nm y 260 nm respectivamente.

Microorganismo

El microorganismo utilizado fue *Lactobacillus pentosus* CECT-4023T (ATCC-8041) de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) (Valencia, España). Las condiciones de operación de la cepa fue a 35 °C por 24 h en placas usando el medio MRS agar, descrito por Mercier *et al.*, (1992). El inóculo se preparó por solubilización de células en placas con 5 mL de hidrolizado estéril. La biomasa en el inóculo se midió por densidad óptica en 600 nm.

Fermentación ácido láctica

El hidrolizado de bagazo fue neutralizado con CaCO₃ a un pH final de 6.5, y el CaSO₄ precipitado fue separado del sobrenadante por filtración. El hidrolizado neutralizado fue suplementado con 10 gL⁻¹ de extracto de levadura y 10 gL⁻¹ de Corn Steep Liquor (CSL) esterilizado y usado directamente en el medio de fermentación. Los experimentos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen final de 100 mL. El medio fue suplementado con CaCO₃ (30 gL⁻¹) para neutralizar el ácido láctico producido. La fermentación se realizó en un agitador orbital a 150 rpm y 35 °C, tomando muestras (2 mL) a diferentes tiempos de fermentación, centrifugando a 6000 rpm durante 3 min. Los sobrenadantes se almacenaron para analizar la glucosa, xilosa, ácido acético y ácido láctico por HPLC. Los experimentos se realizaron por duplicado reportando los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Uso de hidrolizado de bagazo de caña

Para obtener hidrolizados directamente fermentables la materia prima se sometió a un proceso de hidrólisis ácida con ácido sulfúrico a siguiendo condiciones realizadas por Aguilar *et al.*, (2002). La

hidrólisis ácida de este Material Lignocelulósico (MLC) conduce a la generación de azúcares hemicelulósicos principalmente xilosa así como glucosa en menor proporción como principales componentes. Simultáneamente, durante el proceso se forma una mezcla compleja de toxinas microbianas, que en este tipo de hidrolizado es uno de los mayores problemas en relación con una mayor transformación biotecnológica, mostrando cinéticas lentas, productividades limitadas y rendimientos en comparación con los medios de fermentación realizados a partir de azúcares comerciales o hidrolizados con menos concentraciones de inhibidores (Bustos *et al.*, 2004). La Tabla I muestra la composición de los hidrolizados y el medio sintético, con concentraciones de 30.77 g de xilosa/L, 3.745 g de glucosa/L, 0.20 g de Arabinosa/L, con una concentración total de azúcares de 34.31 gL⁻¹.

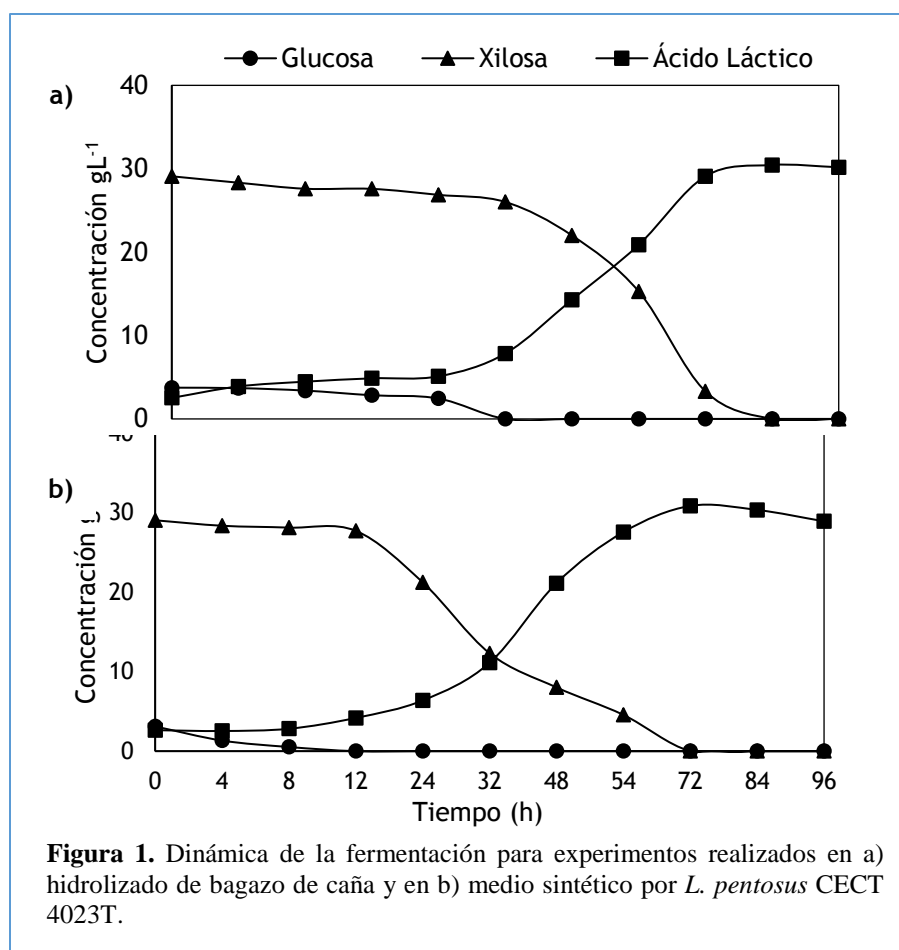
Tabla I. Composición de medios sintéticos e hidrolizados obtenidos bajo diferentes grados de concentración.

	Xilosa (gL ⁻¹)	Glucosa (gL ⁻¹)	Arabinosa (gL ⁻¹)	Ácido Acético (gL ⁻¹)	Furfural (gL ⁻¹)	HMF (gL ⁻¹)
Hidrolizado de bagazo	30.77 ± 0.15	3.34 ± 0.17	0.20 ± 0.15	3.83 ± 0.13	1.71 ± 0.1	1.24 ± 0.9
Medio sintético	29.03 ± 0.19	3.11 ± 0.54	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Los resultados alcanzados de xilosa en este trabajo fue superior que los logrados por González *et al.*, (2017) utilizando el bagazo de caña de azúcar, en las mismas condiciones de Aguilar *et al.*, (2002) pero en tiempos mayores (60 minutos) quienes reportaron 24.79 gL⁻¹ de xilosa.

La Figura 1a muestra el perfil de la producción de ácidos orgánicos y el consumo de fuentes de carbono por parte de *L. pentosus*. Se observa claramente que hubo un consumo de glucosa en las primeras 32 horas de fermentación, mientras que la xilosa se fue agotando lentamente, mostrando tendencias similares a las observadas por Bustos *et al.*, 2004 y 2005, en medios de fermentación con *L. pentosus*

La cinética de fermentación (Figura 1a) muestra que se pueden preparar medios de fermentación adecuados a partir de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar, consiguiendo concentraciones finales de ácido láctico hasta de 29.741 gL^{-1} tras 72 h de fermentación, lo que representa una productividad volumétrica (Q_P) de $0.369 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, un rendimiento del producto ($Y_{P/S}$) de 0.811 gg^{-1} y un rendimiento teórico ($Y_{P/Sth}$) del 93.172%. Si se considera la estequiometría de los dos azúcares consumidos: glucosa y xilosa. Estos resultados son particularmente interesantes si se tiene en cuenta la ausencia de tratamientos de detoxificación durante la preparación de los hidrolizados. Bustos *et al.*, 2005, obtuvieron ácido láctico con *L. pentosus* a partir de hidrolizados de podas de sarmiento en diferentes concentraciones sin utilizar ningún proceso de lisis en los medios de fermentación.



Por otra parte, la Figura 1b muestra la evolución en el consumo de azúcares, así como de la producción de ácido láctico y acético en medio sintético, simulando la misma concentración de azúcares pero sin adición de compuestos liberados tras la hidrólisis (ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural), esto para comparar la posible inhibición del crecimiento de *L. pentosus*, durante la cinética de fermentación. En las Figuras 1a y 1b se muestra la interacción por *L. pentosus* CECT 4023T, entre consumo de sustrato y producción de ácido láctico, observando que esta cepa es capaz de adaptarse al medio en presencia de compuestos tóxicos liberados tras las hidrólisis y aun así alcanzar rendimientos teóricos altos. Wischral, *et al.*, (2019) evaluaron las condiciones óptimas al utilizar extracto de levadura, utilizando hidrolizados de bagazo de caña de azúcar para la producción de ácido láctico y *Lactobacillus pentosus* alcanzando en 48 h concentraciones de $19,17 \text{ gL}^{-1}$ de ácido láctico, con rendimientos de 0.80 gg^{-1} , correspondiente a una productividad volumétrica $0.40 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Estos valores son menores a los logrados en este estudio utilizando 10 gL^{-1} de EL y 10 gL^{-1} de CSL.

La Tabla II presenta los datos relativos a la producción de ácido láctico en las fermentaciones por lotes realizadas en frascos Erlenmeyer. La concentración final de ácido acético alcanzada fue de 11.588 gL⁻¹, como principal subproducto.

Tabla II. Parámetros estequiométrico productividades y rendimientos para ensayos de bioconversión por <i>Lactobacillus pentosus</i> CECT 4023T.		
Parámetro	Hidrolizado de bagazo de caña	Medio sintético
Xilosa T ₀ gL ⁻¹	29.093 ± 0.849	29.03 ± 0.466
Xilosa T _F gL ⁻¹	0.000 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Glucosa T ₀ gL ⁻¹	3.745 ± 0.119	3.11 ± 0.248
Glucosa T _F gL ⁻¹	0.000 ± 0.00	0.000 ± 0.00
Ácido láctico T ₀ gL ⁻¹	2.522 ± 0.584	2.63 ± 0.43
Ácido láctico T _F gL ⁻¹	29.741 ± 0.689	30.84 ± 0.19
Ácido acético T ₀ gL ⁻¹	4.113 ± 0.243	0.00 ± 0.0
Ácido acético T _F gL ⁻¹	11.588 ± 0.165	6.30 ± 0.7
Tiempo (h)	72	72
Q _P (gL ⁻¹ h ⁻¹)	0.369	0.3917
Q _S (gL ⁻¹ h ⁻¹)	0.454	0.4445
Y _{P/S} (gg ⁻¹)	0.811	0.8812
Rendimiento teórico (%)	93.172	95.27
Q _P = Productividad volumétrica de ácido láctico, Q _S = Consumo de azúcares, Y _{P/S} = rendimiento de ácido láctico (g de ácido láctico producido / g consumido de glucosa + xilosa) * ácido láctico producido x 100/(Xilosa consumida x 0,6 + glucosa consumida).		

Bustos *et al.*, 2004, realizó estudios con *Lactobacillus pentosus* alcanzando rendimientos y productividades superiores a los logrados en este estudio utilizando las podas de sarmiento sin etapa previa de detoxificación para la producción de ácido láctico lo que indica que, aunque sea un sustrato diferente, el bagazo de caña de azúcar presenta rendimientos altos y con potencial como residuo usado en medios de fermentación.

CONCLUSIÓN

En general los estudios llevados a cabo en esta investigación indican que el bagazo de caña de azúcar es una fuente de azúcares hemicelulósicos asimilables por la bacteria *Lactobacillus pentosus*. Aunque la bacteria *Lactobacillus pentosus* CECT 4023T presento buenos rendimientos teóricos, se vio afectada en las primeras horas de fermentación, por los compuestos inhibidores liberados tras el proceso de hidrólisis de bagazo de caña de azúcar. Por lo que se debe procurar alternativas de tratamiento con el objetivo de reducir estos compuestos.

Agradecimientos

González-Leos Adrián, agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para cursar la Maestría en Ciencias en Tecnología de los Alimentos dentro del programa de maestría de la Universidad Autónoma de Tamaulipas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, R., Ramirez, J.A., Garrote, G. & Vázquez, M., 2002. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of food engineering*, 55(4), 309-318.
- Bustos, G., Arcos, U., Vecino, X., Cruz, J. M. & Moldes, A. B. 2018. Recycled *Lactobacillus pentosus* biomass can regenerate biosurfactants after various fermentative and extractive cycles. *Biochemical Engineering Journal*, 132, 191-195.
- Bustos, G., Moldes, A.B., Cruz, J.M. & Domínguez, J.M. 2005. Influence of the Metabolism Pathway on Lactic Acid Production from Hemicellulosic Trimming Vine Shoots Hydrolyzates Using *Lactobacillus pentosus*. *Biotechnology Progress* 21, 793–798
- Bustos, G., Moldes, A.B., Cruz, J.M. & Domínguez, J.M. 2004. Production of fermentable media from vine-trimming wastes and bioconversion into lactic acid by *Lactobacillus pentosus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(15), 2105-2112.
- Cruz, J. M., Moldes, A. B., Bustos, G., Torrado, A. & Domínguez, J. M. 2007. Integral utilisation of barley husk for the production of food additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 1000-1008.
- González, A., Del Angel, J. A., González, J. L., Rodríguez, N. & Bustos-Vázquez, G. 2017. Evaluation of producing ethanol native yeasts present in sugar cane bagasse. *CienciaUAT*, 11(2), 80.
- Laopaiboon, P., Thani, A., Leelavatcharamas, V. & Laopaiboon, L. 2010. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. *Bioresource technology*, 101(3), 1036-1043.
- Martínez, E.A., Villarreal, M.L.M., Almeida e Silva, J.B., Solenzal, A.I.N., Canilha, L. & Mussatto, S.I. 2002. Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. *CYTA-Journal of Food*, 3(5), 295-301.
- Mercier, P., Yerushalmi, L., Rouleau, D. & Dochain, D. 1992. Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.*, 55(2), 111-121.
- Moldes, A. B., Bustos, G., Torrado, A. & Domínguez, J. M. 2007. Comparison between different hydrolysis processes of vine-trimming waste to obtain hemicellulosic sugars for further lactic acid conversion. *Applied biochemistry and biotechnology*, 143(3), pp. 244-256.
- Serna, L., & Stouvenel, A.R.D. 2005. Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. *CYTA-Journal of Food*, 5(1), 54-65.
- Wischrall, D., Méndez, J. & Pereira N. 2019. Statistical Optimization of Lactic Acid Production by *Lactobacillus pentosus* using Hemicellulosic Hydrolysate from Sugarcane Bagasse. *Revista Ingeniería*, 29(1), 40-50.