

SÍNTESIS DE ÁCIDO LÁCTICO, A TRAVÉS DE LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA SIMULTÁNEA A LA FERMENTACIÓN DE UN MEDIO A BASE DE UN DESECHO DE PIÑA (*Ananas comosus*), PARA SU USO COMO MATERIA PRIMA EN LA ELABORACIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO

Carla Araya-Cloutier, Carolina Rojas-Garbanzo*, Carmela Velázquez-Carillo

Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

Correo electrónico: carolina.rojasgarbanzo@ucr.ac.cr

RESUMEN

Se evaluó el potencial de un desecho agroindustrial de piña para su utilización en la producción de ácido láctico por fermentación, utilizando *Lactobacillus casei* subespecie *rhamnosus*. Se realizaron fermentaciones del sustrato de piña como tal e hidrolizado enzimáticamente con invertasa. El tratamiento enzimático permitió aumentar el rendimiento de 84 a 98% (m/m) y la concentración de ácido láctico de 64 a 75 g/L, al obtenerse un consumo total de los azúcares presentes en el medio hidrolizado, en comparación con la fermentación del medio sin hidrólisis que presentó una concentración residual de sacarosa de 15 g/L. La productividad total del proceso de fermentación del medio sin hidrólisis fue de 5,4 g/h de ácido láctico, mientras que la fermentación del medio invertido obtuvo una productividad menor de 4,3 g/h; esto producto del aumento en el tiempo total de fermentación de 35 a 40 h al hidrolizar la sacarosa. La productividad máxima disminuyó de 5,5 a 3,9 g/L.h de ácido láctico, al realizar el tratamiento enzimático. Debido a la alta eficiencia obtenida en la conversión de los azúcares en ácido láctico, la hidrólisis enzimática del medio es la mejor opción para obtener una concentración mayor de este compuesto y para su potencial aplicación en la producción de plásticos biodegradables.

Palabras claves: ácido láctico, fermentación, desechos agroindustriales, piña, hidrólisis enzimática.

ABSTRACT

The potential of a pineapple waste as feedstock for the production of lactic acid by fermentation, using *Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus*, was evaluated. Fermentations of the pineapple substrate as it is and treated with invertase were carried out. The hydrolysis of the medium increased the lactic acid yield from 84 to 98%(m/m), and the lactic acid concentration from 64 to 75 g/L, as a result of the total consumption of the sugars present in the hydrolyzed medium, in comparison with the fermentation of the medium without hydrolysis, that resulted in a residual concentration of 15 g/L of sucrose. The total productivity of the fermentation of the medium without hydrolysis was 5.4 g/h of lactic acid, whereas in the fermentation of the inverted medium a lower total productivity of 4.3 g/h was obtained. This was a result of the increase of the total fermentation time from 35 to 40 h, for the hydrolyzed medium. The maximum volumetric productivity decreased from 5.5 to 3.9 g/L.h of lactic acid when the medium was treated with invertase. Due to the high efficiency obtained in the conversion of the sugars to lactic acid, the enzymatic hydrolyzed medium is the best option to obtain higher concentrations of lactic acid and to its potential application for biodegradable plastics production.

Keywords: lactic acid, fermentation, agroindustrial wastes, pineapple, enzymatic hydrolysis.

1. INTRODUCCIÓN

Aproximadamente 3,5 billones de toneladas de desechos de la agricultura son producidos por año en el mundo [1]. Estos desechos representan un desafío ambiental y tienen

altos costos de disposición [2]. La piña (*Ananas comosus*) es el segundo producto agrícola en importancia exportable de *Costa Rica* [3]. Los desechos de la industrialización de la piña constituyen hasta el 65% del fruto [4], de manera que existen grandes volúmenes de desechos que podrían ser aprovechados de formas alternativas. La utilización de los residuos de piña para la producción biotecnológica de ácido láctico es una opción interesante para reducir el costo de producción de este producto químico y, a la vez, permite dar valor agregado a un desecho agroindustrial, que presenta un alto contenido de carbohidratos fermentables [5]. El ácido láctico es uno de los compuestos químicos con mayor demanda a nivel mundial (130-150 mil TM/año) por tener gran aplicabilidad en la industria alimentaria, química y farmacéutica [1]. El interés en la producción biotecnológica de ácido láctico ha incrementado debido a las nuevas tendencias ambientalistas. Por un lado, ofrece una alternativa a la contaminación causada por las industrias químicas al utilizar recursos renovables para su producción [6]; y por otro, puede ser utilizado como materia prima para la producción de plásticos biodegradables [7]. El ácido poliláctico es un polímero biodegradable derivado del ácido láctico que se produce a partir de fuentes 100% renovables. Este polímero presenta muchas propiedades iguales o incluso mejores que algunos plásticos tradicionales, por lo que representa una alternativa como material de empaque bastante innovadora y prometedora [8].

En el presente estudio se evaluó la fermentación de un sustrato a base de un desecho de una industria procesadora de piña para la producción de ácido láctico. Sin embargo, en fermentaciones de sustratos a base de banano y melazas con *L. casei* sub. *ramnosus*, la utilización de la sacarosa ha sido incompleta [9], mientras que la hidrólisis enzimática con invertasa ha mejorado el crecimiento celular y la producción de ácido láctico [10]. De manera que se estudió también el efecto de la hidrólisis enzimática con invertasa del medio de cultivo simultánea a la fermentación, sobre el proceso de producción de ácido láctico.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Microorganismo y preparación del cultivo bacteriano. El microorganismo utilizado en este estudio fue *Lactobacillus casei* subespecie *ramnosus* ATCC 11443, bacteria láctica homofermentativa, obtenida de *Hansen* (*Horsholm, Dinamarca*). La bacteria liofilizada se activó a 37°C por 18 h en 5 mL de caldo *De Man Rogosa Sharpe* (MRS). El cultivo madre se preparó tomando 1 mL del cultivo y enriqueciendo en 100 mL de caldo MRS

por 24 h a 37°C. El inóculo se preparó transfiriendo 1,00 mL del cultivo madre a 100 mL de caldo MRS e incubando durante 18 horas a 37°C, para inocular el sustrato a base de piña con 0,5% (v/v) del cultivo de *L. casei*.

2.2. Enzima. La enzima utilizada para la hidrólisis del medio de fermentación fue *Invertase* (E.C. 3.2.1.26), obtenida de *Novozymes (Lund, Suiza)*. La determinación de la actividad de la enzima invertasa se midió agregando 0,5 mL de una solución enzimática al 0,01% (m/v) a 5 mL de una solución de sacarosa al 5,4% (en buffer de acetato 0,1 M, pH 4,5) e incubando a 35°C por 10 minutos, tomando muestras cada minuto. Al finalizar el periodo de incubación la enzima se inactivó a 85°C por 10 minutos. La glucosa residual, producto de la hidrólisis de la sacarosa, se cuantificó mediante el método colorimétrico descrito por *Trinder* [11]. La actividad enzimática obtenida fue 36.800 UE/g de enzima; en donde una unidad enzimática (UE) se definió como los miligramos de glucosa producidos por minuto, bajo las condiciones experimentales usadas.

2.3. Materia prima. La materia prima utilizada fue desecho de pulpa de piña (*Ananas comosus*), obtenido de la planta *Florida Products (Heredia, Costa Rica)*. Este desecho primeramente se prensó para obtener jugo y posteriormente se sometió a tratamiento térmico (75°C/5 min) para su estabilización.

2.4. Preparación del medio de cultivo. El medio básico de fermentación consistió de: jugo de piña (80% v/v en agua), con una concentración de azúcares iniciales de 77 g/L, enriquecido con extracto de levadura (5 g/L), sulfato de magnesio hepta-hidratado (0,60 g/L), sulfato de manganeso monohidratado (0,03 g/L), acetato de sodio (1 g/L), bifosfato de potasio (0,5 g/L) y monofosfato de potasio (0,5 g/L) [12, 13]. El medio de cultivo se esterilizó en una autoclave a 121°C, 20 psi (1,36 atm.) por 15 minutos. Las sales de fosfatos se esterilizaron en un *erlenmeyer* por aparte y se adicionaron al sustrato ya estéril para evitar la precipitación de las mismas por reacciones con el resto de sales. El volumen de sustrato utilizado en todas las fermentaciones fue de 2,0 L.

2.5. Fermentaciones y toma de muestras. Las fermentaciones se llevaron a cabo en biorreactores *Bioflo 110 New Brunswick* mediante un sistema como se describe en la Figura 1.

El sustrato a base de piña se calentó a 35°C y se inoculó con 20 mL del cultivo de *L. casei* preparado como se describió anteriormente, para iniciar la fermentación. Para evaluar el efecto de la hidrólisis enzimática, se inyectaron 2,5 mL de una solución de invertasa al

1%(m/v) simultáneamente con la inoculación del microorganismo. Previo a su adición, la solución enzimática fue microfiltrada (0,45 μm) para evitar la posible contaminación del medio estéril. Durante la fermentación el pH se controló en $5,0 \pm 0,2$ mediante una disolución de hidróxido de sodio 5,0 N; la temperatura se reguló en 35°C ; y la agitación en 250 rpm. Cada 1-3 horas se tomaron 10-15 mL de muestra del medio de fermentación con el fin de analizar la concentración de ácido láctico producido y la concentración de azúcares residuales (glucosa, sacarosa y fructosa) en el medio. Las muestras se centrifugaron, se microfiltraron (0,45 μm) y se congelaron a -18°C para su análisis.

Las fermentaciones se llevaron a cabo mediante un proceso por lote repetido, finalizando cada cinética cuando la fermentación láctica alcanzaba la fase estacionaria y evacuando el caldo fermentado manteniendo la esterilidad dentro del frasco de fermentación; luego se volvía a llenar con 2 L de sustrato nuevo estéril para comenzar con una nueva fermentación reutilizando las bacterias presentes.

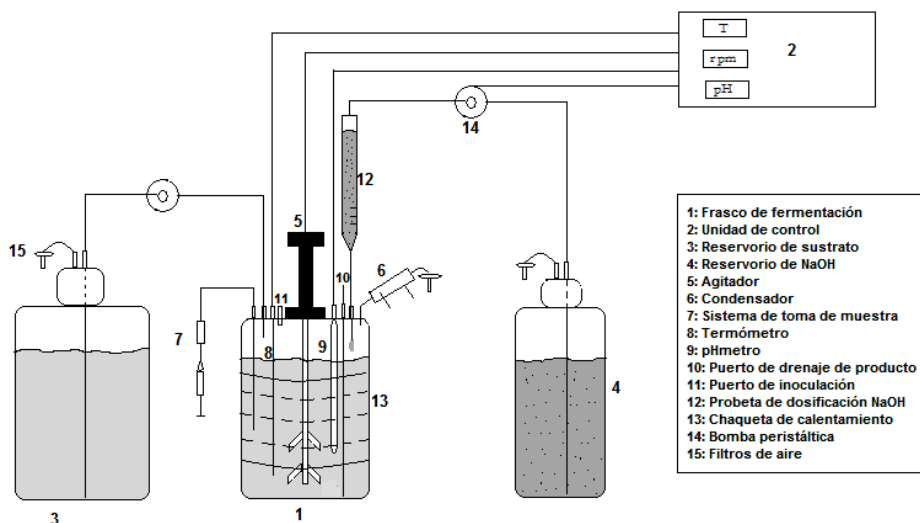


Figura 1. Diagrama del sistema de fermentación básico utilizado para producción de ácido láctico por lote repetido.

2.6. Métodos de análisis. La concentración de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) se determinó utilizando el kit enzimático K-SFRUGL de Megazyme (Napa, California USA), llevando a cabo el procedimiento descrito por Megazyme [14]. La concentración de ácido láctico presente se analizó por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó una columna BioRad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm; Richmond, California USA) y

se inyectó 20 μL de muestra utilizando H_2SO_4 0,005 mol/L como fase móvil, flujo isocrático de 0,9 mL/min, temperatura 35°C, longitud de onda de 210 nm y presión 90 kgf/cm² (87,11 atm).

2.7. Análisis estadístico. Utilizando el programa estadístico de JUMP 4, se realizó una prueba t de student para determinar la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos tratamientos evaluados utilizando la productividad total (P_T) y máxima (P_{\max}), el rendimiento (R), azúcares consumidos (A_C), concentración final de ácido láctico (AL), tiempo de fermentación (TF) y tiempo de fase lag (LAG), como variables respuesta.

El cálculo de los parámetros de eficiencia se presenta en las ecuaciones 1 a 5:

$$P_T \text{ (g/h)} = \frac{M_{AL}}{(TF - LAG)} \quad (1)$$

$$P_{\max} \text{ (g/L*h)} = m_{\max} \quad (2)$$

$$R \text{ (%m/m)} = \frac{M_{AL}}{M_{Azi}} \times 100 \quad (3)$$

$$A_C \text{ (%)} = \frac{MAz_i - MAz_r}{MAz_i} \times 100 \quad (4)$$

$$AL \text{ (g/L)} = \frac{M_{AL}}{V_s} \quad (5)$$

donde M se refiere a la masa en gramos; Az a la suma de los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa; los subíndices i y r se refieren al contenido inicial y residual de azúcares y V_s al volumen de sustrato. Para obtener la P_{\max} , se tomaron cuatro puntos de la curva de producción de ácido láctico contra tiempo, que dieran la pendiente máxima (m_{\max}).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Fermentación del medio a base de jugo de piña sin hidrólisis enzimática.

Como es común en las fermentaciones de mezclas de azúcares, el microorganismo prefirió consumir primero los azúcares simples como la glucosa y la fructosa, antes de adaptar sus vías metabólicas para consumir la sacarosa (véase la Figura 2). Sin embargo, el consumo de

sacarosa fue prácticamente nulo; la bacteria no entró en una segunda fase de adaptación para consumir este azúcar, dando como resultado en una concentración residual de 15 g/L de sacarosa en el medio de cultivo. El microorganismo no logró consumir toda la sacarosa presente (sólo un 23%) aún después de 50 horas de haber iniciado la fermentación. Este resultado fue el mismo obtenido por Nancib et al. [15], en la fermentación de jugo de dátil donde *L.casei* sub. *ramnosus* consumió la glucosa y fructosa paralelamente mientras que la sacarosa no fue metabolizada; y por Chan-Blanco et al. [9], que obtuvo sólo un 27% de consumo de sacarosa presente en un medio enriquecido a base de puré de banano con *L. casei*, al término de 70 horas de fermentación. Este resultado no es favorable si se piensa en la utilización del ácido láctico en un proceso de síntesis de ácido poliláctico ya que la calidad de la materia prima es uno de los factores determinantes. La presencia de sacarosa aunque sea en niveles muy bajos, puede provocar la caramelización impidiendo el desarrollo de la reacción de polimerización [16].

En este caso, se alcanzó una concentración de ácido láctico de 64 g/L (127 g) después de 35 horas de fermentación, con un periodo de fase lag de aproximadamente 11 horas.

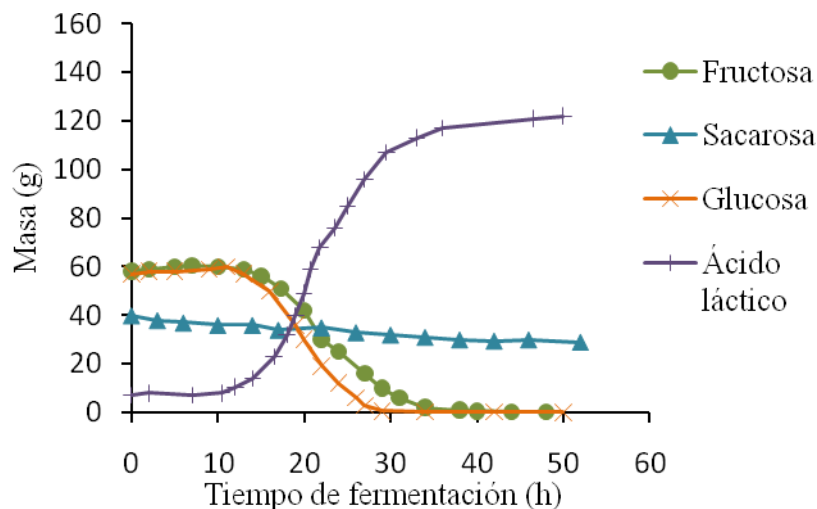


Figura 2. Cinéticas de fermentaciones promedio (n = 3) con *Lactobacillus casei* sub. *ramnosus* de un medio a base de jugo de piña.

3.2. Hidrólisis enzimática y fermentación simultáneas del medio a base de jugo de piña. La hidrólisis enzimática con invertasa del medio de fermentación permitió el consumo total de los azúcares presentes en el sustrato, tal como se muestra en la Figura 3. Se puede

observar como la concentración inicial de glucosa y fructosa es mayor (35 g/L en promedio) por la inversión de la sacarosa, en comparación con el medio control (30 g/L en promedio). En este caso se logró alcanzar una concentración máxima de 75 g/L (150 g) de ácido láctico en un tiempo de fermentación de 40 horas, y la bacteria se adaptó más rápido al medio con únicamente azúcares simples al reducir el tiempo de fase lag de 11 a 7 horas. Dado que la concentración de azúcares fermentables es mayor por la hidrólisis de la sacarosa, el tiempo de fermentación aumentó aproximadamente 5 horas. Sin embargo, la hidrólisis de la sacarosa simultánea a la fermentación permitió producir un 15% más de ácido láctico, en comparación con la fermentación del medio sin hidrólisis además de eliminar la sacarosa la cual es interferencia en el proceso de polimerización [16].

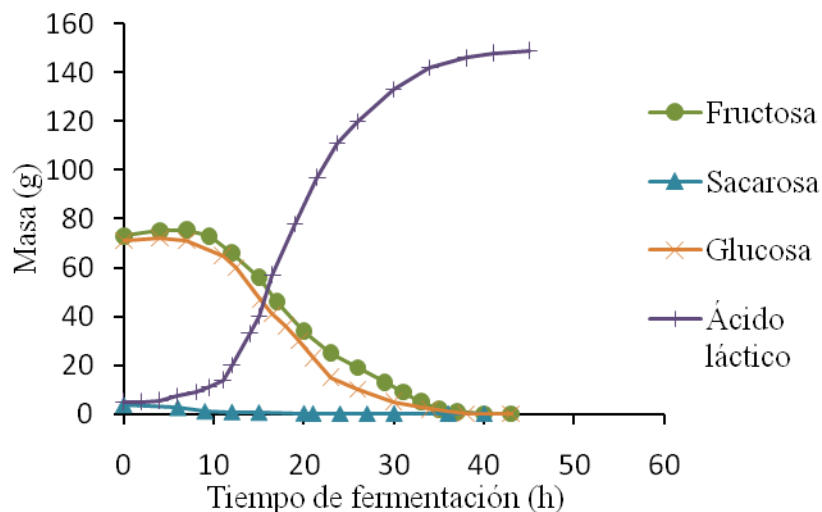


Figura 3. Cinéticas de fermentaciones promedio (n = 3) con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus* de un medio a base de jugo de piña tratado con invertasa.

3.3. Comparación de los tratamientos. En la Tabla 1 se presentan los diferentes parámetros relacionados con el proceso de fermentación para cada uno de los tratamientos evaluados (sin y con hidrólisis enzimática con invertasa). Teóricamente, en las fermentaciones homolácticas 2 moles de ácido láctico se producen a partir de cada mol de glucosa, aunque una conversión de 100% es difícil de conseguir [17]. Sin embargo, el microorganismo fue bastante eficiente al fermentar el medio hidrolizado y presentó un rendimiento de ácido láctico de 98% (m/m), significativamente mayor ($p < 0,05$) que el rendimiento con el medio sin hidrólisis. Estos resultados concuerdan con los de *Thongwai* [10], que en la fermentación de un medio a base de melazas con *Lactobacillus casei* sub. *rhamnosus*, logró aumentar el

rendimiento de producción de ácido láctico de 60 a 91% mediante la inversión del medio con invertasa. Además, la concentración de ácido láctico alcanzada en el medio a base de piña fue significativamente mayor ($p < 0,05$) con el tratamiento con hidrólisis enzimática, producto del consumo total de los azúcares presentes en el medio de cultivo.

En cuanto a las productividades, el tratamiento con invertasa provocó una disminución de estos parámetros. La productividad máxima fue significativamente mayor ($p < 0,05$) para el medio sin hidrólisis (5,5 g/L.h) que para el medio hidrolizado (3,9 g/L.h). Generalmente una concentración mayor de azúcares simples en el medio puede afectar la actividad enzimática del microorganismo, según el fenómeno conocido como inhibición por sustrato [18], lo que provoca una reducción en la velocidad máxima de producción de ácido. De acuerdo a Siebold et al. [19], *L.casei* sub. *rhamnosus* experimenta inhibición por sustrato a partir de 26 g/L de glucosa en el medio, de manera que en la piña con 77 g/L de azúcares totales, es muy probable que haya experimentado este efecto.

La productividad total de la bacteria también disminuyó significativamente ($p < 0,05$) (véase la Tabla 1) por el efecto del aumento del tiempo de fermentación derivado de una mayor concentración inicial de azúcares fermentables. A pesar de este resultado, una concentración mayor de ácido láctico en el medio es preferible, sobre todo en procesos industriales, ya que el producto requiere un proceso de concentración menor, abaratando el costo de purificación posterior [17].

El tiempo total de fermentación (tiempo en el que la producción de ácido láctico se detiene) fue significativamente mayor para el medio con tratamiento con invertasa (40 horas) mientras que la fase lag fue significativamente menor (7 horas), en comparación con el medio sin hidrólisis (35 y 11 horas, respectivamente). Esto refleja que *L.casei* se adapta más rápido a un medio más simple con sólo glucosa y fructosa como sustrato, pero la fermentación de dicho medio se prolonga más porque el porcentaje de consumo de azúcares es mayor. También hay que considerar que el tiempo real de fermentación del medio sin hidrólisis es mucho mayor de 50 horas; sin embargo, este dato no se conoce porque no se dio el tiempo suficiente para que la bacteria consumiera la sacarosa presente. Por lo que, considerando este aspecto, el tiempo de fermentación con el tratamiento enzimático de 40 horas sería menor que el tiempo del medio sin hidrólisis.

Tabla 1. Eficiencia de fermentación de *Lactobacillus casei sub. rhamnosus* del medio control y del medio con tratamiento enzimático con Invertasa¹.

<i>Parámetro</i>	<i>Tratamiento</i>		<i>Probabilidad²</i>
	<i>Control</i>	<i>Hidrólisis con Invertasa</i>	
Rendimiento (% m/m)	84 ± 2	98 ± 1	0,0005*
Acido Láctico Producido (g/L)	64 ± 3	75 ± 3	0,0063*
Azúcares consumidos (% m/m)	79 ± 2	99,9 ± 0,5	0,0001*
Productividad total (g/h)	5,4 ± 0,4	4,3 ± 0,1	0,0070*
Productividad máxima (g/L.h)	5,5 ± 0,3	3,9 ± 0,1	0,0005*
Tiempo de fermentación (h)	34,7 ± 0,7	40 ± 2	0,0027*
Tiempo de fase lag (h)	11,2 ± 0,9	7,3 ± 0,7	0,0023*

¹Los resultados se expresan como el promedio de tres repeticiones con sus respectivos intervalos de confianza ($\alpha = 0,05$). ²(*) Indica que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

4. CONCLUSIONES

El desecho de piña utilizado representa un buen sustrato para la producción de ácido láctico por fermentación, por su alto contenido de azúcares fermentables. Sin embargo, para que *L.casei sub. rhamnosus* logre utilizar eficientemente todo el sustrato presente en el medio a base de jugo de piña, en un tiempo prudencial, es preferible la hidrólisis enzimática de la sacarosa al comenzar el proceso de fermentación. Esto permite aumentar el rendimiento, reducir el nivel de nutrientes residuales y por lo tanto reducir el costo de producción de obtener ácido láctico puro; aspectos deseables para un proceso de elaboración del polímero ácido poliláctico. Por supuesto, es importante hacer el estudio económico y considerar el costo que conlleva hacer este tratamiento enzimático en el costo total del proceso.

Agradecimientos. Este trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo financiero del Consejo Nacional de Rectores (CONARE). También agradecemos a la empresa *Trisan* de *Costa Rica* por facilitarnos la enzima *Invertase* de *Novozyme*.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] John R, Nampoothiri K, Pandey A, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 526 (2007)
- [2] Jin B, Yin P, Ma Y, Zhao L, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **32**, 678 (2005)
- [3] Elizondo A, Consejo Nacional de Producción, **1(13)**, 1 (2008)
- [4] Quesada K, Alvarado P, Sibaja R, Vega J, *Rev. Iberoamer. Polím.*, **6(2)**, 158 (2005)
- [5] Rashid R. *Optimization and modeling of lactic acid production from pineapple waste*, Tesis

- Doctoral. Johor Bahru, Malasia. Technological University of Malaysia, 2008
- [6] Wee Y, Kim J, Ryu H, *Food Technol. Biotechnol.*, **44(2)**, 166 (2006)
- [7] Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B, *Enzyme Microbiol. Technol.*, **26**, 87 (2000)
- [8] Balkcom M, Welt B, Berger K. *Notes from the packaging laboratory: Polylactic acid, an exciting new packaging material*, Florida (USA): Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 2002
- [9] Chan-Blanco Y, Bonilla-Leiva A, Velázquez C, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 152 (2003)
- [10] Thongwai N. *Production of L-(+) lactic acid from blackstrap molasses by Lactobacillus casei subspecies rhamnosus ATCC 11443*, Tesis Doctoral. Louisiana, USA. Louisiana State University, 1999
- [11] Trinder P, *J. Clin. Pathol.*, **22**, 246 (1959)
- [12] Ho G, Pometto A, Hinz P, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63(7)**, 2533 (1997)
- [13] Velázquez A, Pometto A, Ho K, Demirci A, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**, 434 (2001)
- [14] Megazyme. *Sucrose, D-fructose and D-glucose assay procedure K-SUFRG*, Wicklow (Irlanda): Megazyme International Ireland Limited, 2005.
- [15] Nancib A, Nancib N, Meziane D, Boubendir A, Fick M, Boudrant J, *Bioresour. Technol.*, **96**, 64 (2005)
- [16] Fuentes D, Díaz, M, Perilla J, *Revista Colombiana de Química.*, **35**, 2 (2006)
- [17] Hujanen M, Linko S, Linko Y, Leisola M, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 129 (2001)
- [18] Shuler M, Kargi F. *Bioprocess Engineering: Basic Concepts*, New Jersey (USA): Prentice Hall, 1992, p. 71
- [19] Siebold M, Frieling P, Joppien R, Rindfleisch D, Schugerl K, Roper H, *Process Biochem.*, **30(1)**, 84 (1995)