

VALORIZACIÓN DE EFLUENTES INDUSTRIALES: PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE ÁCIDO L-LÁCTICO, PRECURSOR DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES

Antonella Gutierrez¹

¹Cientibecaria. Departamento de Medio Ambiente. (FICH-UNL)

Estudiante de Ingeniería Ambiental. (FICH-UNL)

Área temática: Ingeniería. Sub-área: Ambiental

Palabras clave: biorefinería, bacterias lácticas, ácido L-láctico, efluentes de industrias de bebidas gaseosas, fermentación

INTRODUCCIÓN

Algunos efluentes líquidos de las industrias de bebidas azucaradas, en particular aquellos generados por "operaciones de descarte" (producto rechazado durante el proceso de elaboración por políticas de calidad, producto devuelto desde góndola por falta de gas o cumplimiento de la fecha de vencimiento, entre otros), presentan una concentración de azúcares simples (glucosa, fructosa y sacarosa) que oscila entre 100 y 120 g/L. Estos efluentes tienen la particularidad de exhibir una alta carga orgánica, con una Demanda Química de Oxígeno (DQO) que puede alcanzar valores cercanos a los 140.000 mg O₂/L, lo que determina la necesidad de un tratamiento previo a su volcado a un cuerpo receptor. Estos procesos, entre los que se encuentra la digestión anaeróbica, son costosos, demandan un alto tiempo de residencia y equipos de gran volumen. Estudios previos desarrollados en el laboratorio han demostrado que la fermentación "batch" mediada por bacterias lácticas es un proceso técnicamente factible para la producción de ácido L-láctico a partir de efluentes de la industria de bebidas azucaradas. Aparte del beneficio económico que representaría la comercialización del ácido L-láctico (producto con alto valor de mercado, demanda insatisfecha en nuestro país y escasa o nula producción nacional), este proceso se traduciría en una alternativa al tratamiento convencional, con el consiguiente ahorro de los costos de inversión y operación.

El ácido láctico es el AHA más importante desde el punto de vista industrial, debido a la variedad de aplicaciones que tiene, destacándose su empleo en la industria alimenticia, cosmética, química y de plásticos y farmacéutica. En la última década se incrementó el interés por el ácido láctico debido a su empleo en medicina como precursor de polímeros biodegradables y biocompatibles utilizados en prótesis e implantes.

La fermentación mediada por bacterias lácticas es un proceso que presenta grandes desafíos para la implementación a escala industrial. Por tal motivo, resulta de especial interés investigar las condiciones operacionales (pH, temperatura, velocidad de agitación, modo de operación) así como las biológicas (concentración del inóculo, relación biomasa/azúcar, requerimientos nutricionales de las bacterias, efecto de los compuestos presentes en los efluentes, entre los más importantes). En el presente trabajo, se decidió evaluar el impacto del pH sobre el desempeño de las bacterias lácticas y seleccionar la mejor alternativa para lograr una fermentación láctica exitosa.

OBJETIVOS

Evaluar el efecto del pH sobre el desempeño de las bacterias lácticas y seleccionar la estrategia más sencilla, económica y efectiva para estabilizarlo en los valores apropiados para el crecimiento de las bacterias y producción de ácido láctico.

METODOLOGÍA

Las fermentaciones se llevaron a cabo en reactores tanque de 50 ml, preservando la esterilidad. Los reactores fueron operados en forma "batch" bajo condiciones anaeróbicas y a temperatura constante de 37°C. El ensayo se realizó por duplicado, contabilizándose el tiempo de inicio de la fermentación inmediatamente después de la inoculación. Las muestras se recogieron inmediatamente después de la inoculación y cada 12 h hasta el final del experimento. La concentración inicial de bacterias en el primer ensayo fue de 180 mg/L, mientras que en el segundo ensayo fue de 100 mg/L. Las células se cultivaron previamente en caldo MRS a 37°C durante 72 h.

En todos los experimentos se empleó una cepa de bacteria láctica comercial (*Lactobacillus casei* CRL431), microorganismo heterofermentativo facultativo y productor del isómero L del ácido láctico a partir de hexosas. Se empleó un medio sintético compuesto por glucosa 100 g/L y 5 g/L de extracto de levadura comercial (Britania, Argentina). A cada reactor se lo suplementó con diversos compuestos para regular el pH: carbonato de calcio (CaCO₃), carbonato de magnesio (MgCO₃) y buffer fosfato 0,1 M. En todos los casos se agregó indicador Púrpura de Bromo-Cresol.

Se realizó un seguimiento en el tiempo de los siguientes parámetros: 1) Biomasa, por turbidimetría a 480 nm. Estos valores se correlacionaron con la concentración de microorganismos mediante una curva de calibrado previamente construida siguiendo la técnica estándar para determinar Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV). 2) Azúcares reductores, por el método espectrofotométrico del ácido dinitrosalicílico (DNS; Miller, 1959). 3) Ácido láctico, mediante un kit enzimático específico, siguiendo las recomendaciones específicas del fabricante (Wiener Lab., Argentina).

RESULTADOS

Se realizaron ensayos previos de fermentación sobre diferentes fuentes de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, manitol, sorbitol y xilosa) para confirmar el tipo de metabolismo de la cepa empleada y el espectro de sustratos carbonados capaces de ser metabolizados. Tal como se esperaba, la cepa de *L. casei* ensayada presentó metabolismo heterofermentativo facultativo, con producción de ácido L-láctico sin generación de CO₂ (vía homofermentativa) a partir de las hexosas. También resultó capaz de fermentar glucosa, fructosa y sacarosa, dato muy importante para el presente proyecto por tratarse de los azúcares presentes en los efluentes en estudio.

Numerosos reportes disponibles en la literatura especializada indican que el pH óptimo para la fermentación láctica se sitúa en valores cercanos a 6.5 y el mismo debe mantenerse durante toda la fermentación, es decir, neutralizado el ácido que van produciendo las bacterias. Este dato fue confirmado mediante ensayos de fermentación a diferentes pH iniciales del medio de fermentación. Por otro lado, se corroboró que la fermentación láctica era incompleta cuando el pH del medio no se regulaba durante toda la experiencia, seguramente por inhibición por producto. Se decidió entonces, evaluar diferentes estrategias para mantener el pH en valores cercanos a 6,5 durante toda la experiencia: a) buffer fosfato 0.1 M, b) dosificación puntual con NaOH 10 N, c) carbonato de calcio (40 g/L) y d) carbonato de magnesio (40 g/L).

Los ensayos de fermentación fueron realizados por duplicado, empleando medios sintéticos y se registró la evolución en el tiempo de las concentraciones de biomasa, azúcares y ácido láctico. Para los reactores con carbonatos no se reportan los resultados de la concentración de biomasa dado que los carbonatos dificultaron su

determinación. Además, para estos reactores sólo se midió producción de ácido láctico a tiempo inicial y final. Con estos datos se calculó el Rendimiento en ácido láctico (Y_{AL} , g ácido láctico/g azúcar consumido). Las gráficas se muestran en la Figura 1, mientras que el rendimiento en ácido láctico se presenta en la Tabla 1.

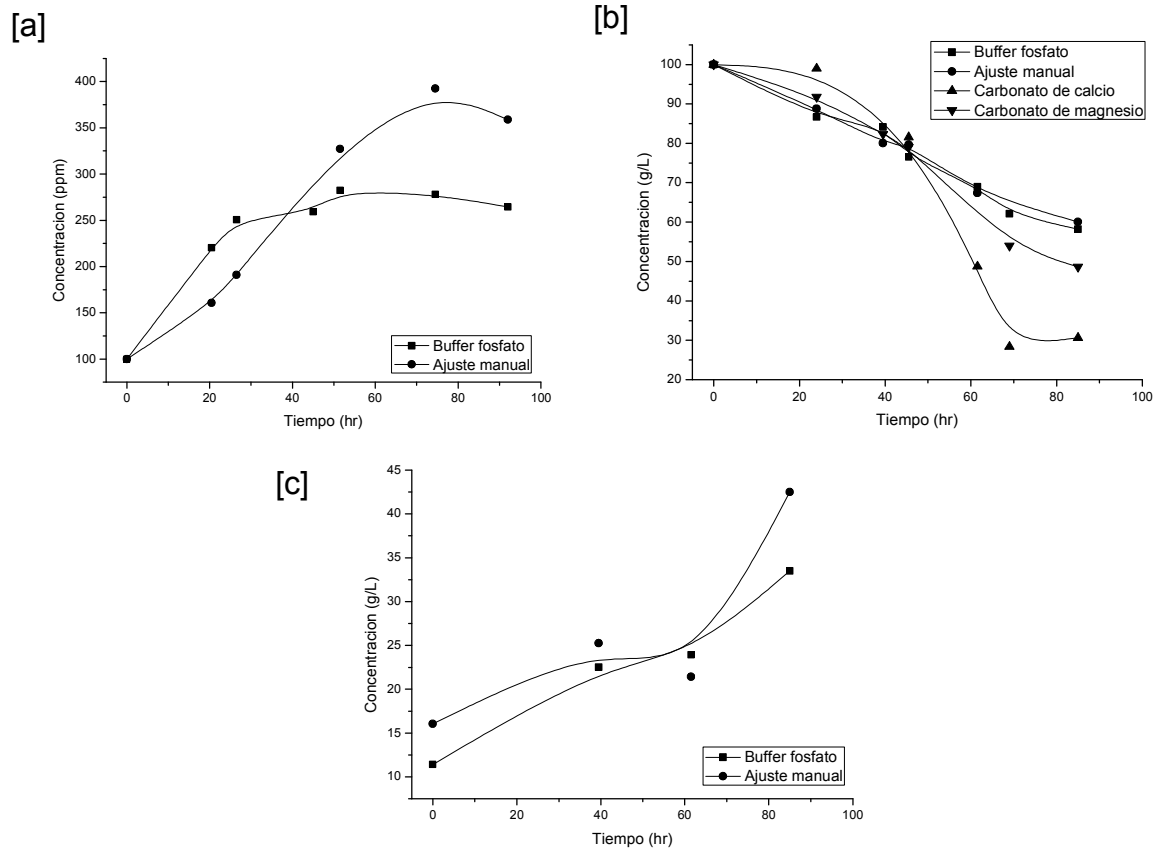


Figura 1. Ensayos de fermentación mediada por bacterias lácticas. Evolución de las concentraciones de biomasa [a], azúcar [b] y ácido láctico [c] a lo largo de los ensayos realizados. El pH del medio se mantuvo en valores cercanos a 6.5 durante toda la experiencia mediante el agregado de diferentes reactivos (ver leyendas).

Tabla 1. Rendimientos en ácido láctico de las fermentaciones realizadas.

Reactor (agente empleado para regular el pH)	Producción máxima de ácido láctico (g/L)	Rendimiento ácido láctico, Y_{AL} (g ácido láctico/g azúcar consumido)
Buffer fosfato	22,1	0,68
Ajuste manual	26,4	0,83
Carbonato de calcio	41,5	0,70
Carbonato de magnesio	24,5	0,70

Los resultados muestran que el consumo de azúcares fue de alrededor del 40% para los reactores con buffer fosfato y ajuste puntual de pH, mientras que para los reactores con carbonatos el consumo de azúcares fue mayor en el mismo período de tiempo (alrededor de 96 hs de ensayo). Se destaca que para el caso del carbonato de calcio el consumo de azúcares fue de alrededor de un 70%. Sin embargo, el mayor consumo de azúcares no tuvo relación directa con los rendimientos en ácido láctico,

dado que los mayores rendimientos se registraron en los ensayos con ajuste de pH por agregado de NaOH. Estudios adicionales son necesarios para profundizar este aspecto.

Las mediciones del pH al final de las experiencias indicaron que este parámetro se mantuvo en valores cercanos a 6.5, sugiriendo que el empleo de carbonatos es una estrategia sencilla para mantener el pH en los valores recomendados para este tipo de fermentaciones.

CONCLUSIONES

El empleo de carbonatos de calcio o magnesio como agentes amortiguadores del pH a lo largo de las fermentaciones lácticas es una alternativa técnicamente factible e interesante para la aplicación industrial del proceso, dado que se podría reemplazar costoso equipamiento para la medición, monitoreo permanente y ajuste del pH a lo largo de la fermentación.

BIBLIOGRAFÍA

- Akerberg C., Hofvendahl K., Zacchi G., Hahn-Hagerdal B.,** 1998. Modeling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 49, 682–690.
- Akerberg C., Zacchi G.,** 2000. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. *Bioresour Technol*, 75, 119–126.
- Chao G., Cuiqing M., Ping X., Li Y., Chen J., Lun SY.,** 2011. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances*, 29, 930–939.
- Datta R., Henry M.,** 2006. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies—a review. *J Chem Technol Biotechnol*, 81, 1119–1129.
- John RP., Nampoothiri KM., Pandey A.,** 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74, 524–534.
- Kricheldorf HR.,** 2001. Syntheses and application of polylactides. *Chemosphere*, 43, 49–54.
- Okano K., Tanaka T., Ogino C., Fukuda H., Kondo A.,** 2010. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 413–423.
- Romani A., Yanez R., Garrote G., Alonso JL.,** 2008. Production of lactic acid from cellulosic biosludges. *Bioresour Technol*, 99, 4247–4254.
- Schmid A., Dordick JS., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M., Witholt B.,** 2005. Poly(lactide) stereocomplexes: formation, structure, properties, degradation, and applications. *Macromol Biosci*, 5, 569–597.
- Wang L., Zhao B., Liu B., Yang C., Yu B., Li Q.,** 2010. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. *Bioresour Technol*, 101, 7895–7901.
- Wee YJ., Kim JN., Ryu HW.,** 2006. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol Biotechnol*, 44, 163–72.