

Obtención de ácido láctico: Fermentación en fase dual mediante *Actinobacillus succinogenes*

Favio Ayala

Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente, Valladolid 47000, España

Se presentan los resultados obtenidos para la obtención de ácido láctico partiendo de glucosa como sustrato, utilizando el microorganismo *Actinobacillus succinogenes*, favoreciendo la ruta menos común hacia el piruvato con las condiciones adecuadas: Medio de crecimiento; 53286 Brain Heart Broth (SIGMA-ALDRICH), medio de fermentación; 60 g glucosa, 30 g extracto de levadura, 2 g urea, 2 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1.99 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.11 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 4.4 g Na_2HPO_4 , 4.06 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (composición por litro), temperatura 37 °C, pH inicial 6.25, suministro de gases a doble fase de O_2 y CO_2 , agitación 400 rpm. La concentración de ácido láctico obtenida, operando en discontinuo fue 21.33 g L^{-1} , con un rendimiento global de 0.427 (g de ácido láctico/ g de glucosa) y una productividad de 0.314 g $L^{-1}h^{-1}$.

1. INTRODUCCIÓN

El ácido láctico fue descubierto en 1780 por el químico sueco Scheele, quien lo aisló de leche agria, fue reconocido como producto de fermentación por Blonodeaur en 1847 y tan solo en 1881, Littlelon inicia la fermentación a escala industrial [1].

Existen dos isómeros ópticos, el D (-), láctico y el L (+) láctico y una forma racémica constituida por fracciones equimolares de las formas D (-) y L (+). A diferencia del isómero D (-), la configuración L (+) es metabolizada por el organismo humano [1].

Ambas formas isoméricas del ácido láctico pueden ser polimerizadas y se pueden producir polímeros con diferentes propiedades dependiendo de la composición [1].

El ácido láctico es un importante químico con amplias aplicaciones industriales: alimentaria, bioplásticos, farmacéutica, cosmética, cuero, textil, y las industrias químicas. [2].

Propiedades del ácido láctico

Fórmula	$C_3H_6O_3$
Peso molecular	90,08
Índice de refracción	1,4414
Punto de fusión	L(+) y D(-) 52,8 a 54 °C
Punto de ebullición	125-140 °C
Gravedad específica	1206
Calor de combustión	3616 cal/g
Viscosidad	40,33 mNsm ⁻²
Densidad	1,249
Constante dieléctrica	22ε

En la industria alimentaria se usa como acidulante y conservante. Las industrias químicas lo utilizan como solubilizador y como agente controlador de pH. En la producción de pinturas y resinas, puede ser utilizado como precursor del ácido poliláctico (PLA), un polímero biodegradable con interesantes usos en la industria y la medicina; se considera ésta la principal aplicación del ácido y la causa por la cual ha aumentado considerablemente su demanda [1].

El ácido láctico puede ser producido mediante síntesis química o por medio de procesos de fermentación. Este último proceso ha atraído mucho interés ya que no es dependiente del petróleo como materia prima, tiene beneficios medioambientales significativos, y consume menos energía [2].

La producción biotecnológica está basada en la fermentación de sustratos ricos en carbohidratos por bacterias u hongos y tiene la ventaja de formar enantiómeros D (-) o L (+), óptimamente activos. La producción biotecnológica depende del tipo de microorganismo utilizado, la inmovilización o recirculación del microorganismo, el pH, la temperatura, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el modo de fermentación empleado y la formación de subproductos [1].

Las bacterias que pueden utilizarse para la producción de ácido láctico son cocos y bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, no esporulados, inmóviles y catalasa negativo, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Leuconostc*, *Tetragenococcus*, y otros [1].

Las bacterias del ácido láctico (LAB) tienen requerimientos nutricionales complejos debido a su limitada habilidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B. La mayoría de LAB producen únicamente una forma isomérica de ácido láctico. Las especies de los géneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, producen únicamente isómeros L, mientras las especies del género *Leuconostc* producen únicamente isómeros D. Sin embargo, algunas LAB producen formas racémicas donde el isómero predominante depende de cambios en la aireación, cantidad de NaCl,

tipo de fermentación, incrementos en el pH y concentración de sustrato [1].

Actinobacillus succinogenes (Fig. 1) aislado de la tripa del bovino, puede ser útil para la fermentación del ácido succínico en condiciones anaeróbicas [2].

Actinobacillus succinogenes es un capnophile, anaerobio facultativo, mesófilo, bacteria gram-negativa que naturalmente produce altas concentraciones de succinato como un producto final de fermentación, además de formiato, acetato y etanol. *Actinobacillus succinogenes* convierte la glucosa en fosfoenolpiruvato (PEP), en la que a partir de ese punto, el metabolismo se divide en las dos ramas siguientes (Fig. 2); (i) la vía del piruvato-lactato y formiato-acetato-etanol, y (ii) la vía del succinato [3].

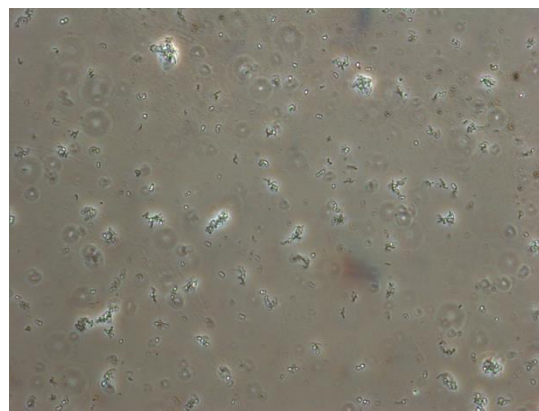


Fig. 1. Foto microscópica de cepa *Actinobacillus succinogenes* utilizada en el experimento.

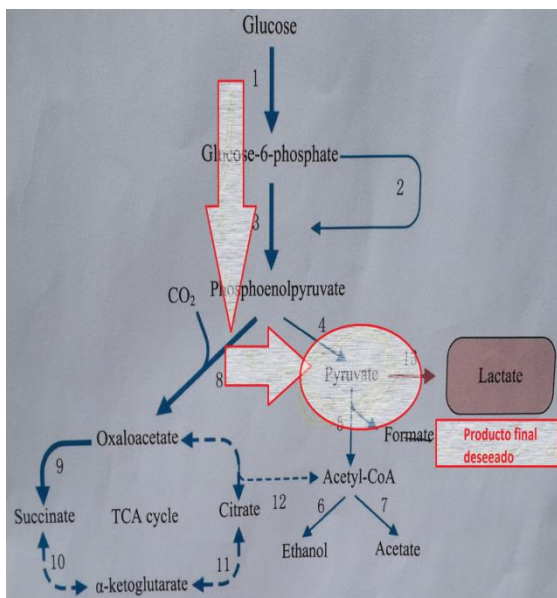


Fig. 2. Vías metabólicas simplificadas del metabolismo central de *Actinobacillus succinogenes*. No se muestran todas las etapas catalizadas por enzimas y productos intermedios [4].

Este trabajo tiene como finalidad demostrar la capacidad del microorganismo *Actinobacillus succinogenes*, de producir ácidos orgánicos a partir de glucosa, en este caso, que siga la ruta metabólica del piruvato bajo las condiciones adecuadas para la obtención de ácido láctico como producto principal, por el método de fermentación a doble fase, la primera fase, aerobia, suministrando O_2 y la segunda, anaerobia, suministrando CO_2 .

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Cepa y medios

Actinobacillus Succinogenes DSMZ 22257 fue obtenido del Instituto de Leibniz DSMZ Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares.

Medios de mantenimiento y crecimiento; 53286 Brain Heart Broth (SIGMA-ALDRICH) usado para el cultivo de diversos microorganismos exigentes,

patógenos incluyendo levaduras y mohos. Composición: cerebros de ternera (infusión de 200g) 12.5 g/L, corazón de res (infusión de 250 g) 5.0 g/L, peptona 10.0 g/L, cloruro de sodio 5.0 g/L, D (+)-glucosa 2.0 g/L, fosfato de hidrógeno disódico 2.5 g/L. pH final 7.4 (+/- 0.2 a 25 °C).

Instrucciones: Disolver 37 g en 1 litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Para la preparación del inóculo, se utilizaron 50 mL del medio de crecimiento, que se inoculan con 1 mL del microorganismo (descongelado completamente y homogeneizado). Crecimiento durante 24 h en incubadora orbital a 37 °C.

Medio de fermentación; su composición por litro inicialmente fue: 60 g glucosa, 30 g extracto de levadura, 2 g urea, 2 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1.99 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.11 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 4.4 g Na_2HPO_4 , 4.06 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ [4]. El volumen de inoculación fue 5% (v/v). La glucosa fue esterilizada por aparte en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. La concentración inicial de glucosa estuvo en el rango de 50-60 g L^{-1} . Posteriormente, 20 g de glucosa fueron añadidos en el proceso por lotes (a las primeras 20 horas del experimento), para compensar el sustrato consumido hasta ese momento.

2.2 Fermentación biorreactor agitado

Fermentaciones de doble fase en el proceso por lotes fueron llevadas a cabo a 37 °C en un biorreactor agitado de 0.5 L, el cual contenía 0.4 L de medio de fermentación + 0.02 L de inóculo concentrado (5% v/v). El pH inicial fue de 6.25.

La fermentación dual del proceso se estableció de la siguiente forma:

Durante la fase aerobia, la concentración de oxígeno disuelto (DO) fue monitoreada por medio de una sonda previamente calibrada, se conectó la bomba de aire fijando un flujo de entrada que permitiera mantener un 20% DO, aire que previamente a ingresar al medio, pasaba por un microfiltro para evitar contaminantes. La agitación fue fijada en 400 rpm para mantener el nivel de $DO \geq 20\%$.

En la fase anaerobia, a las 20 h de operación, se paró el aporte de aire y se introdujo glucosa (de forma directa 20 g), y se conectó la entrada de CO_2 , manteniendo una agitación de 400 rpm suficiente para mantener la mezcla en el reactor.



Fig. 3. Imagen del reactor en operación.

Puesta en marcha del reactor:

Se conecta el baño de termostatación ($T = 37^\circ C$) y, una vez alcanzada la temperatura de operación, se introduce el medio de fermentación y el inóculo concentrado (5% v/v), estableciéndose el nivel de agitación que garantice una buena mezcla en el reactor. Los medios previamente esterilizados en autoclave a $121^\circ C$ durante 15 minutos. Se toman muestras a intervalos regulares de tiempo para proceder a la determinación de las variables del proceso.

2.3 Métodos de análisis

Las concentraciones de biomasa se estimaron a partir de la densidad óptica (OD) del medio de fermentación con un espectrofotómetro HITACHI U-2000 a una longitud de onda de 660 nm. La determinación del consumo de glucosa y la producción de ácidos orgánicos se realizó mediante HPLC (detector IR-Waters), utilizando una columna AMINEX HPX-87H (BIORAD) y temperatura de $60^\circ C$. La fase móvil fue H_2SO_4 5 mM a un flujo de 0.6 mL min^{-1} .

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se llevaron a cabo diferentes ensayos de fermentación dual, presentándose en las figuras 4 y 5 los resultados más significativos.

En la figura 4, se muestra la evolución de la concentración de sustrato (glucosa) a lo largo del tiempo, se puede observar al tiempo de 20 h, el punto de inflexión entre ambas fases, cuando se hizo el cambio de oxígeno al dióxido de carbono y se añadieron 20 g de glucosa directamente al biorreactor.

Para la fase anaerobia se puede observar que hubo poco consumo del sustrato respecto al consumo en la fase aerobia, manteniendo una concentración casi constante durante las últimas 48 h del proceso.

En la figura 5, se muestran los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación, el de mayor interés, ácido láctico y en menor grado ácido acético. En análogo con el consumo de sustrato, se observa un incremento significativo de concentración de ácido láctico durante la fase aerobia, al realizar el cambio a fase anaerobia, se sigue produciendo ácido láctico aunque de forma más lenta en comparación con la primera fase.

La cantidad final de ácido láctico obtenido en la fermentación fue de 21.33 g L⁻¹, con un rendimiento global de 0.427 (g de ácido láctico/ g de glucosa) y una productividad de 0.314 g L⁻¹h⁻¹. Respecto del crecimiento en biomasa, se obtuvo un coeficiente de rendimiento de 0,06 (g de células/g de glucosa).

Existen escasas referencias en bibliografía sobre el tema. Puede destacarse la experimentación llevada a cabo en similares condiciones, aunque operando en modo "fed-batch". Para un biorreactor de 5 L, se encontraron los siguientes resultados: la cantidad final de ácido láctico de 135,6 g L⁻¹, rendimiento global de 0,96 (g láctico/ g de glucosa) y productividad de 3,22 g L⁻¹h⁻¹ [2].

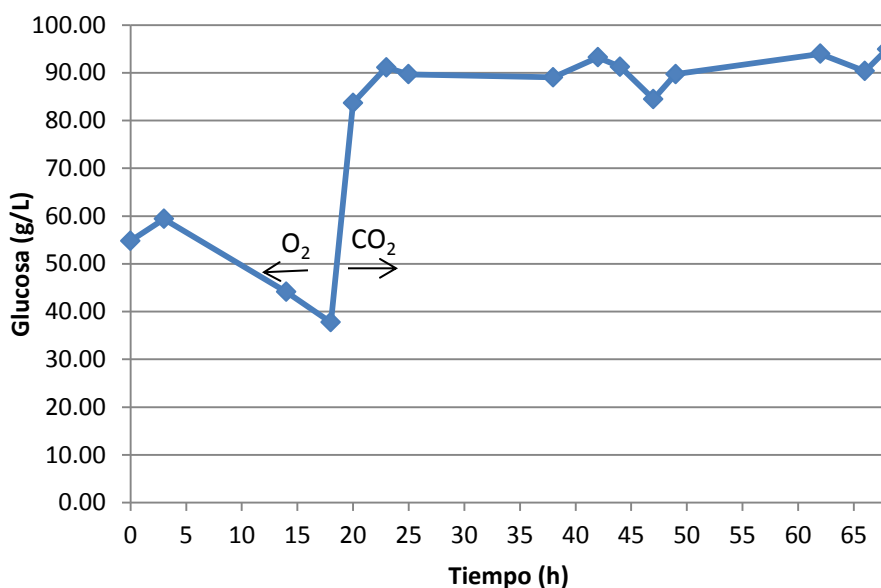


Fig. 4 Variaciones en la concentración de glucosa respecto al tiempo

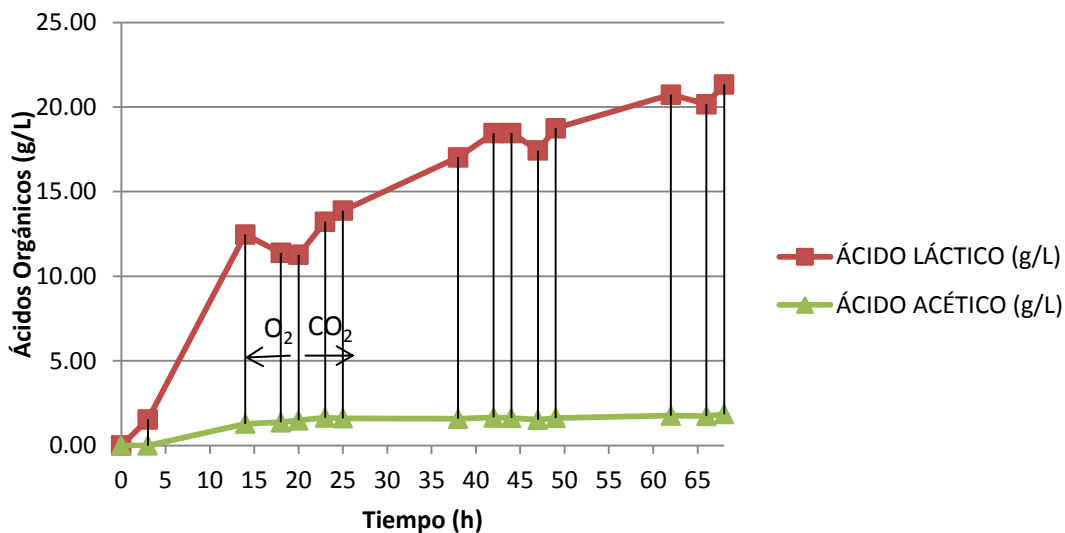


Fig. 5 Producción de ácidos orgánicos por lotes respecto al tiempo.

4. CONCLUSIONES

El trabajo desarrollado supone el punto de partida para una nueva forma de operar con el microorganismo *Actinobacillus succinogenes*, como es la fermentación dual.

Los resultados indican que la cepa de *Actinobacillus succinogenes* produce cantidades considerables de ácido láctico bajo condiciones apropiadas.

Para que el consumo de sustrato, glucosa, fuese mayormente aprovechado, sería conveniente dejar por mayor tiempo la fase aerobia, de 20 horas en un inicio a 25-30 horas, así como reducir la cantidad de sustrato suministrado en este mismo tiempo del proceso, de 20 g de glucosa a 10-15 g de glucosa, con esto también se lograría nuevamente la concentración inicial entre 50-60 g/l de glucosa y por consecuente mayor rendimiento global y productividad.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue llevado a cabo dentro del grupo de investigación "TPQ y BQ" de la Universidad de Valladolid.

REFERENCIAS

- [1] *Producción biotecnológica de ácido láctico* [en línea]. España: Alberto, 2007. [Consulta: junio de 2015] http://www.eis.uva.es/~biopolimeros/alberto/acido_lactico.htm
- [2] Wang C, Li Q, Wang D, Xing JM. Improving the lactic acid production of *Actinobacillus succinogenes* by using a novel fermentation and separation integration system. *Process Biochemistry* 2014; 49; 1245-50.
- [3] McKinlay J, Gregory J, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism

in a chemically defined growth medium. *Applied and Environmental Microbiology* 2005;71;6651-6

- [4] Li Q, Wang D, Song Z, Zhou W, Wu Y, Xing JM, Su Z. Dual-phase fermentation enables *Actinobacillus succinogenes* 130ZT to be a potential role for high-level lactate production from the bioresource. *Bioresource Technology* 2010; 101; 7665-7.