

Efecto de la concentración de material inerte en un biocatalizador de alginato de calcio con células inmovilizadas sobre la fermentación láctica*

The effect on lactic fermentation of concentrating inert material with immobilised cells in a calcium alginate biocatalyser

Juan Carlos Serrato B,¹Luis A. Caicedo M.²

RESUMEN

Colombia es uno de los principales cultivadores mundiales de caña de azúcar y no ha desarrollado una industria de fermentación diversificada, centrándose principalmente en la producción de alcoholes y levaduras. El ácido láctico y sus derivados, constituyen una alternativa que da mayor valor agregado al azúcar producido y con ello se beneficiaría a las regiones que lo producen. En el presente trabajo se evaluó la cinética de producción de ácido láctico utilizando células inmovilizadas en alginato de calcio con un inerte con características zeolíticas en diferentes concentraciones. Se empleó como microorganismo *Lactobacillus delbrueckii* en un medio compuesto principalmente por sacarosa y extracto de levadura. Para los ensayos se emplearon reactores de mezcla total sin control de pH. Los resultados indican que un porcentaje de inerte entre 2 y 3% mejora la retención celular y la difusividad, produciendo por consiguiente mayores conversiones y velocidades de reacción.

PALABRAS CLAVE: ácido láctico, fermentación, biocatalizador, células inmovilizadas, alginato de calcio.

ABSTRACT

Colombia is one of the world's main sugarcane cultivating countries but it has not diversified its fermentation industry; a few fermentation industries produce alcohol and yeasts. Lactic acid and its derivatives then become alternatives providing added value to the sugar produced, thus benefiting the regions producing the sugar. This work evaluated the kinetics of lactic acid production using immobilised cells in calcium alginate at different concentrations of inert material. *Lactobacillus delbrueckii* was the microorganism used and fermentation broth mainly consisted of sucrose and yeast extract. CSTR reactors were used without pH control. The results suggested that 2% to 3% inert material in the biocatalyst increased cellular retention and diffusiveness, leading to improved conversion and reaction rate.

KEY WORDS: lactic acid, fermentation, biocatalyst, immobilised cells, calcium alginate.

Recibido: septiembre 3 de 2004

Aceptado: febrero 16 de 2005

Introducción

La tendencia mundial actual hacia la utilización de recursos renovables como reemplazo de los recursos fósiles, ha hecho que la producción de ácido láctico se realice casi exclusivamente por vía fermentativa. La producción de este ácido es un tema que ha logrado un renovado interés gracias a la aplicación de este ácido para la fabrica-

ción de polímeros y solventes biodegradables y por ser un intermedio en la producción de otros compuestos (Datta, 1995).

En Colombia no existe actualmente producción de ácido láctico ni de sus derivados, pero sí se consume una cantidad equivalente a mil millones de pesos anuales de estos productos. Esto último, sumado a la abundan-

* Universidad Nacional de Colombia, Grupo de Procesos Químicos y Bioquímicos, Departamento de Ingeniería Química, Ciudad Universitaria, Bogotá.

1 Ingeniero químico, M. Sc. Universidad Nacional de Colombia, e-mail: jcserratob@unal.edu.co

2 Ingeniero químico, I. Q. M. Sc. D. Sc., Universidad Nacional de Colombia, e-mail: lacaicedom@unal.edu.co

cia existente de un sustrato utilizable para la fermentación láctica como es el azúcar de caña, hace necesario tener en cuenta al ácido láctico como una alternativa para producir desarrollo a mediano plazo.

La inmovilización de microorganismos es una alternativa para superar la baja productividad y la fuerte inhibición por producto que experimenta la fermentación en lote convencional. Adicionalmente tiene otras ventajas sobre esta última como actividad estable, reusabilidad, posibilidad de operación continua y bajo riesgo de contaminación. De las técnicas de inmovilización conocidas, una de las más populares debido a su sencillez y bajo costo es el método de atrapamiento en geles, especialmente en alginato de calcio (Senthuran, 1997; Senthuran, 1999; Oyaas, 1996; Tango, 2002). Sin embargo, este método de inmovilización hace que se puedan presentar efectos difusionales dentro de las partículas del soporte que pueden causar la muerte por inanición de los microorganismos que se encuentren a una mayor profundidad en el interior del soporte y por lo tanto disminuir la productividad de este tipo de fermentaciones (Tuli, 1985; Yoo, 1996; Cronopoulous, 2002). Por consiguiente, autores como Burns, 1985, han estudiado la adición de materiales como magnetita, polvo de ladrillo, etc., como medio para aumentar la porosidad del catalizador. Este trabajo pretende entonces evaluar el efecto de la introducción de un agente inerte dentro de la matriz de alginato de calcio sobre la producción de ácido láctico en una fermentación con células inmovilizadas.

Materiales y métodos

Microorganismo y medio de cultivo

El microorganismo utilizado fue *Lactobacillus delbrueckii* proveniente de la Universidad Federal de Río de Janeiro; sus características se muestran en (Medina, 2001). Este fue conservado a 4°C en agar MRS y transferido bisemanalmente. El medio de fermentación utilizado fue el siguiente: sacarosa 45 g/L, extracto de levadura 15 g/L, KH_2PO_4 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1%, MgSO_4 0.5% y MnSO_4 5 ppm. La sacarosa utilizada fue azúcar sin refinar del ingenio del Cauca, el extracto de levadura fue Oxoid y los demás reactivos utilizados fueron grado analítico.

Método de inmovilización

En este trabajo se utilizó la técnica de atrapamiento en un gel de alginato de calcio descrita a continuación: se mezcló una suspensión concentrada del microorganismo en fase exponencial con una solución de alginato de sodio al 3% y diferentes porcentajes de material inerte consistente en un sólido con características zeolíticas. Esta mezcla se agitó hasta lograr uniformidad y posteriormente se goteó sobre una solución de CaCl_2 0.5 M. Las partículas allí formadas tuvieron un tiempo de gelificación de 30 minutos y posteriormente fueron retiradas con una malla y lavadas dos veces con aproximadamente 200 mL de solución isotónica.

El biocatalizador está formado entonces por tres componentes: alginato de sodio, células y un material poroso tipo zeolita. A este catalizador se le llamó Algicen y se asignó un número que corresponde al porcentaje en peso del material poroso adicionado. Se probaron cuatro tipos de biocatalizador (Algicen 0, 1, 2 y 3).

Fermentación con células inmovilizadas

La fermentación se llevó a cabo en erlenmeyers de 500 mL, con un volumen de trabajo de 300 mL; a una temperatura de 42°C y con una agitación de 150 rpm mediante un agitador orbital. Para iniciar la fermentación se adicionó al medio estéril un número de partículas inmovilizadas equivalente a un 5% de su volumen. La fermentación se realizó sin control de pH.

Métodos analíticos

La biomasa fue medida por medio de absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Spectronic 20. Las concentraciones de ácido láctico y sacarosa fueron cuantificadas por HPLC (Waters) con la siguiente técnica: agua como fase móvil a un flujo de 1.2 mL/min, se utilizó una precolumna KC-G y una columna Shodex KC-811 mantenida a 30°C, y un detector de índice de refracción.

Resultados y discusión

La influencia del soporte sobre la fermentación con células inmovilizadas se analizó por medio de tres indicadores diferentes: el crecimiento de células libres, el consumo de sustrato y la producción de ácido láctico.

Efecto del tipo de soporte sobre el crecimiento de las células libres

En la figura 1 se puede observar que a medida que el porcentaje de material poroso adicionado aumenta, el crecimiento del microorganismo fuera de las partículas inmovilizadas es mayor; esto es de esperarse ya que un aumento en la porosidad del soporte favorece el escape del microorganismo hacia el medio y este una vez allí crece de forma libre.

Sin embargo, al observar la curva correspondiente a Algicen 3 se advierte que el crecimiento en el medio es el menor para todos los soportes, aun incluso para el alginato sin material poroso.

La inmovilización busca retener la mayor cantidad de células dentro del soporte, para obtener una mayor productividad y evitar un proceso de separación más complejo después de la fermentación, por lo que el comportamiento observado para el Algicen 3 es el deseado; sin embargo, este no se explica si se tiene en cuenta solamente el fenómeno de aumento de porosidad del soporte, la posibilidad de que el entrecruzamiento del ion calcio en los soportes con alto porcentaje de sólido sea diferente, cau-

sando un empaquetamiento que dificulta la migración celular, puede ser una explicación.

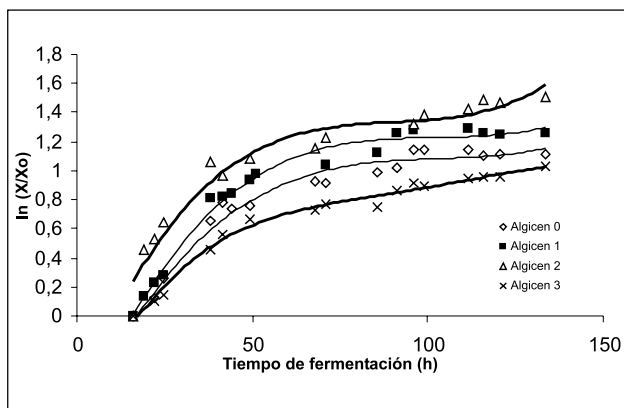


Figura 1. Cinética de crecimiento de las células libres para los diferentes tipos de soporte.

De otro lado, se puede observar una clara disminución en la velocidad de crecimiento a partir de las 70 horas de fermentación, ocasionada por la inhibición que produce el ácido láctico (inhibición por producto).

Según la Figura 1, el periodo de crecimiento exponencial para las células libres parece terminar para todos los tipos de soporte alrededor de las 50 horas de fermentación, sin embargo, al observar la Figura 3 se nota que la producción de ácido continúa, comportamiento que es más notorio para Algicen 2 y 3. Este hecho, sumado a la baja concentración de células libres obtenida y a que en los trabajos anteriores de (Medina, 2001) y (Serrato, 2004) se encontró que para este microorganismo la mayor parte de la producción de ácido láctico está asociada al crecimiento, implica que la producción de ácido fue en su mayoría resultado de la acción de las células inmovilizadas.

Efecto del tipo de soporte sobre el consumo de sustrato

El consumo de sacarosa tiene una tendencia similar para todos los tipos de soporte, como puede observarse en la Figura 2, lo que indica que este no interfiere con el proceso de fermentación.

Adicionalmente se puede ver el efecto que la inhibición por producto tiene sobre el consumo de sustrato, ya que para todos los tipos de soporte la concentración final de sustrato se mantiene estable, o sea que se limita su consumo por los niveles de concentración de ácido láctico alcanzado que causan la inhibición del crecimiento y del consumo de sustrato. Debido a ello, para todos los tipos de soporte la concentración final de sustrato es similar y su variación se encuentra dentro de los límites de confiabilidad del método utilizado.

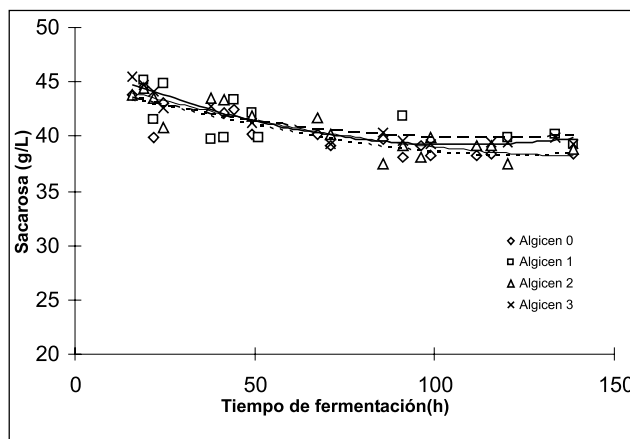


Figura 2. Cinética de consumo de sustrato para los diferentes tipos de soporte

No existe información en la literatura internacional sobre fermentación con células inmovilizadas sin control de pH, ya que este control permite disminuir la inhibición por producto y por medio de esto aumentar el consumo de sustrato y la producción de ácido láctico. El trabajo de (Medina, 2011), reporta bajo condiciones similares un consumo de sacarosa del 14% para células inmovilizadas en alginato de calcio sin material poroso, valor similar al obtenido en este estudio para todos los tipos de soporte que varió entre 11 y 13%.

Efecto del tipo de soporte sobre la producción de ácido láctico

Como se notó anteriormente en la cinética de crecimiento (Figura 1), hubo una inhibición por producto hacia las 70 horas, que coincide con la disminución de la velocidad de producción que se observa en la Figura 3; sin embargo, este efecto es diferente para los distintos tipos de soporte. Para aquellos con menor contenido de material poroso la inhibición fue más fuerte ya que sólo se alcanzó una concentración máxima de ácido cercana a 2.5 g/L, mientras que los otros soportes (Algicen 2 y 3) lograron una concentración alrededor de 3 g/L. Esto parece indicar que el aumento en la concentración de sólido en el soporte disminuye las resistencias difusionales para el ácido láctico y que existe una concentración mínima de material poroso a partir de la cual esto se hace más notorio.

Al analizar las curvas de producción en función del tiempo (Figura 3) a partir de la hora 70, se observa un comportamiento extraño, ya que se presenta una disminución de las concentraciones de ácido en el medio con el tiempo. Este fenómeno puede ser originado por un cambio de sentido en el flujo del ácido láctico al tratar de alcanzar condiciones de equilibrio de concentraciones dentro y fuera de las partículas del sistema de inmovilización. El mayor descenso se presenta en los soportes con menor contenido de sólido, lo que indica mayores resistencias difusionales que causan a su vez grandes regiones de baja concentración dentro del catalizador.

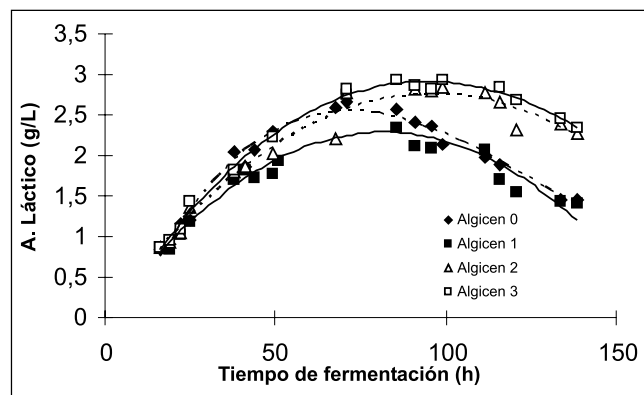


Figura 3. Cinética de producción de ácido láctico para los diferentes tipos de soporte

Este cambio en el sentido de flujo del ácido láctico también es encontrado por Wang, 1995, en los resultados de su modelo para la difusión dentro de sistemas de células inmovilizadas, aunque se explica allí que es debido a la difusión de los iones sodio utilizados para el control de pH. Yabannavar, 1991, también realiza un análisis de la transferencia de masa para un sistema de células inmovilizadas y encuentra este mismo hecho, descubriendo adicionalmente que aunque la difusión de los sustratos no está limitada, la difusión del ácido láctico sí, y por ello se acumula en el interior de la partícula creando condiciones inhibitorias en esta región.

Estos dos autores llegan a la conclusión de la formación de un gradiente de pH intrapartícula inhibitorio en una fermentación con control de pH. Los resultados presentados en este trabajo son para un sistema que no cuenta con control de pH, lo que implica que la creación de condiciones inhibitorias dentro de la partícula sea más rápida y mayor debido a que no existe un método para disminuir la concentración del ácido producido y por lo tanto el consumo de sustrato y la producción de ácido deben ser menores incluso para las halladas en una fermentación con células libres sin control de pH.

Si se comparan las concentraciones de ácido láctico máximas logradas por la fermentación con célula libre sin control de pH reportadas por Serrato 2004 con las obtenidas en este trabajo con células inmovilizadas sin control de pH, para la primera se obtuvieron 8,51 g/L, mientras que con el Algicén 3 se lograron 2,93 g/L, lo que indica, como se mencionó anteriormente, que se crearon concentraciones inhibitorias focalizadas dentro de las partículas inmovilizadas que ocasionaron una menor producción.

Aunque la mayoría de la literatura existente sobre inmovilización (Senthuran, 1997; Senthuran, 1999; Tango, 2002; Cronopoulous 2002) reporta aumentos en la productividad de las fermentaciones con células inmovilizadas con respecto a la fermentación con células libres, esas pruebas se realizaron con control de pH y no son comparables con el comportamiento contrario que muestran los resultados obtenidos en este estudio. Esto destaca la impor-

tancia del control de pH para esta fermentación, ya que con este tipo de control se pueden obtener concentraciones de ácido láctico superiores a 30 g/L.

Conclusiones

El material utilizado como medio de aumento de la porosidad del soporte fue efectivo en disminuir las resistencias difusionales presentes en los sistemas con células inmovilizadas por atrapamiento.

De los tipos de soporte utilizados el más adecuado para continuar con los estudios sobre la fermentación con células inmovilizadas es el Algicén 3, ya que produce una baja liberación celular al medio de fermentación, pero produce a la vez la concentración final de ácido láctico más alta.

La disminución de la concentración de ácido láctico en el medio que se presentó hacia el final de las fermentaciones realizadas, puede ser causada por una migración de este ácido hacia el interior de las partículas inmovilizadas.

Nomenclatura

X = Concentración de biomasa libre en el medio de fermentación (g de células secas/L).

X_0 = Concentración inicial de biomasa libre en el medio de fermentación (g de células secas/L).

Bibliografía

- Burns, M.; Kwestadze, J.; Gloves, H., "Dried calcium alginate magnetic spheres for lactic fermentation", en *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 27, 1985, pp. 137-145.
- Chronopoulos, G., "Lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei* in free cell form and immobilized on gluten pellets", en *Biotechnology Letters*, Vol. 24, 2002, pp 1233-1236.
- Datta, R. et al., "Technological and economic potential of poly(lactic) acid and lactic acid derivatives", en *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 16, 1995, pp 221-231.
- Medina, I., "Evaluación de la producción a nivel de banco de ácido láctico por fermentación con células inmovilizadas", proyecto de grado presentado a la Universidad Nacional de Colombia para optar al título de ingeniero químico, 2001.
- Oyaas, J.; Storro, I., "Uptake of lactose and continuous lactic acid fermentation by entrapped non growing *Lactobacillus helveticus* in whey permeate", en *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 46, 1996, pp 240-249.
- Senthuran, A. et al., "Lactic acid fermentation in a recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei*", en *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 55, 1997, pp 841-853.
- Senthuran, A. et al., "Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in a recycle batch reactor: a step towards optimization", en *Journal of Biotechnology*, Vol. 73, 1999, pp 61-70.

Serrato, J. C., "Estudio cinético de la fermentación láctica en un reactor de lecho fijo con recirculación", tesis presentada a la Universidad Nacional de Colombia para optar al título de magíster en ingeniería química, 2004.

Tango, M.; Ghaly, A., "A continuous lactic acid production system using an immobilized packed bed of *Lactobacillus helveticus*", en *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 58, 2002, pp. 712-720.

Tuli, A.; Khana, P. y Marwaha, S., "Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*", en *Enzyme and microbial technology*, Vol. 7, 1985, pp. 164-168.

Wang, H.; Seki, M.; Furusaki, S., "Mass transfer behavior in lactic acid fermentation using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*", en *Journal of chemical engineering of Japan*, Vol. 28, 1995, pp. 480-482.

Yabannavar, V. Wang, D., "Analysis of mass transfer for immobilized cells in extractive lactic acid fermentation", en *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 37, 1991, pp. 544-550.

Yoo, I. et al., "Encapsulation of *Lactobacillus casei* in liquid core alginate capsules for lactic acid production", en *Enzyme and microbial technology*, Vol. 19, 1996, pp. 428-433.

PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN AUTOMATIZACIÓN INDUSTRIAL

La automatización industrial es un conjunto de técnicas que involucran la aplicación e integración de sistemas industriales de forma autónoma. Es una área en la que confluyen diferentes disciplinas para la solución de problemas industriales. Los problemas de eficiencia, productividad, calidad, decisiones estratégicas y diseño de procesos, tanto a nivel de producción y planta como gerencial, son también problemas de automatización industrial.

Se cuenta con la infraestructura disponible en los laboratorios correspondientes a los diferentes departamentos de la Facultad; algunos de estos laboratorios son: Control, Mecatrónica, Servomecanismos, CAM y Salas de Cómputo.

PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN CALIDAD DE LA ENERGÍA

El programa curricular de Especialización en Calidad de la Energía Eléctrica fue creado por Acuerdo Número 32 del 12 de noviembre de 2004 del Consejo de Sede, y este mismo autorizó su apertura mediante el Acuerdo 33 de la misma fecha. Sus principales objetivos son:

- Profundizar el conocimiento de los distintos componentes involucrados en el campo de la calidad de la energía eléctrica.
- Aportar desde la ingeniería eléctrica al sector de la energía eléctrica en el marco de los nuevos esquemas de regulación y prestación del servicio.

PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN ESTRUCTURAS

La especialización promoverá la actualización, profundización y ampliación de conocimientos en el campo específico de la Ingeniería Estructural. Se espera que quienes participen en él desarrollen capacidades para resolver problemas particulares complejos en el área de estudio. El programa de especialización está conformado por un conjunto de siete asignaturas y un trabajo final de especialización. La dedicación del programa puede ser de tiempo parcial.

- La Especialización en Estructuras de la Universidad Nacional de Colombia tiene como objeto de estudio el análisis y diseño de estructuras, las investigaciones que los sustentan, incluyendo el estudio de las propiedades pertinentes de los materiales con que se construyen, la utilización racional del fin fundamental de esta rama del saber: diseñar estructuras que cumplan su función de manera segura, estética y económica.
- La formación para el desarrollo de la actividad investigativa, científica, académica y para el desempeño profesional especializado en el campo que le es propio.
- Generar conocimientos, comprobar aquellos que ya forman parte del saber y de las actividades del hombre, así como crear y adaptar tecnologías para dar soluciones a los problemas de la sociedad.
- Contribuir al mejoramiento de la calidad académica en la Universidad Nacional de Colombia y responder a los requerimientos del progreso de la ciencia y las necesidades sociales del país.
- Plantear alternativas de cambio tecnológico, económico y social, generando al mismo tiempo mecanismos de retroalimentación que permitan relacionar la producción del conocimiento con las demandas del mismo.

Mayores informes: Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.

Teléfono: (57 1) 316 50 00 Ext. 14120-14041-14068.

Página web: www.ing.unal.edu.co/posgrados/principal