



VINAZA EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO MEDIANTE FERMENTACIÓN BACTERIANA

GLADIEL PADRÓN¹, KATHERINE CAMPO², MARÍA GARCÍA², LUIS MEDINA³, OSCAR VALBUENA⁴

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud

²Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería

³Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicadas (CIMA), Facultad de Ciencias de la Salud

⁴Centro de Biotecnología Aplicada (CBA), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela

*Autor de correspondencia: ovalbuena@uc.edu.ve

Resumen

La producción mundial de etanol, genera más de 100×10^6 litros/día de vinaza, subproducto de la fabricación de bebidas alcohólicas y bioetanol. Su uso como fertilizante o descarga indiscriminada en suelos y aguas, contaminan y causan problemas en ecosistemas y ambientes naturales. Para minimizar esta situación, sería pertinente usar la vinaza en procesos generadores de sustancias de alto valor agregado y apetecibles industrialmente. Este trabajo reporta la producción de ácido láctico por *Enterococcus faecalis* ACTT 29212 aclimatada a crecer en vinaza, complementada con citrato sódico, NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y Na_2HPO_4 , pH8,0, en agitación, a 25°C, y en anaerobiosis. El contenido inicial de azúcares totales (11,23 g/L), después de 120 h de incubación, descendió a 0,272 g/L (degradación de 97,6%), el ácido láctico incrementó de 0,986 a 5,73 g/L y la biomasa aumentó de 89×10^6 a 464×10^6 UFC/mL. La productividad fue 0,047 g/L×h y el rendimiento respecto al azúcar fue 52,3%. **Palabras Clave:** vinaza, caña de azúcar, ácido láctico, *Enterococcus faecalis*.

Vinasse in the Production of Lactic Acid by Bacterial Fermentation

Abstract

The worldwide production of ethanol generates more than 100×10^6 liters/day of vinasse, a byproduct from alcoholic beverage and ethanol industries. Its continuous use as fertilizer and discharges in soils and waters contaminates and causes problems in ecosystems and natural environments. To reduce this situation, vinasse should be used in processes yielding high valuable and industrially desirable products. In this research lactic acid production by *Enterococcus faecalis*. ACTT 29212 is reported. The bacteria were acclimated to grow in a medium containing vinasse, sodium citrate, NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and Na_2HPO_4 , pH8.0, at 25°C, on shaking and anaerobiosis. The initial total sugar content (11.23 g/L) descended to 0.272 g/L (97.6% consumption), lactic acid increased from 0.986 to 5.73 g/L and biomass from 89×10^6 to 464×10^6 UFC/mL, in 120 h incubations. Lactic acid yielding was 0.047 g/Lxh and the efficiency of the fermentation on basis of sugar content was 52.3%.

Keywords: vinasse, sugarcane, lactic acid, *Enterococcus faecalis*.

Introducción

El principal subproducto de las empresas destiladoras de etanol es la vinaza, efluente líquido proveniente usualmente de residuos agrícolas fermentados, presentando altas demandas química y biológica de oxígeno (DQO y DBO respectivamente), altas concentraciones de carbohidratos, nitrógeno, y fósforo, coloraciones oscuras, altos valores de sólidos disueltos y pH ácidos (Djuvic-Vukovic et al. 2013). Las elevadas cantidades producidas, estimadas en 10-13 litros de vinaza por litro de etanol hidratado obtenido (Djuvic-Vukovic et al. 2013; Damaso et al. 2014), alcanzó a nivel mundial en el año 2004 volúmenes de $41,000 \times 10^6$ litros anuales (Sánchez y Cardona, 2005) y en Venezuela en el año 2000, en solo dos productoras de ron, se generaron $1,7 \times 10^6$ litros (Gómez y Rodríguez, 2000). Estos elevados volúmenes de vinaza causan problemas de contaminación y ecológicos en ambientes naturales, al ser descargadas en ríos, lagunas y suelos sin un previo y adecuado tratamiento; además, su almacenamiento y tratamiento previo a su disposición definitiva son económicamente costosos (Djuvic-Vukovic et al. 2012). Algunos autores consideran que la utilización de residuos orgánicos, entre ellos la vinaza, contribuyen a la conservación de los recursos naturales al reciclar el carbono y elementos minerales en la biosfera, pudiendo mejorar los suelos de cultivo al sustituir el uso de fertilizantes químicos de potasio y fósforo (Mello-Prado et al. 2013; Gómez-Toro, 1996). Contrariamente, otros autores alertan que la descarga indiscriminada y continua de vinaza al medio ambiente altera la calidad del agua y suelos mediante la incorporación de sustancias recalcitrantes, aumento de la salinidad, inducción de toxicidad iónica y modificación de las propiedades químicas y fisicoquímicas de los ambientes naturales (Djuvic-Vukovic et al. 2012; Christofolletti et al. 2013; Vadival et al. 2014). Por lo tanto es pertinente establecer las características del suelo a ser tratado y la procedencia de la vinaza, pues su composición depende del tipo de suelo, características del fertilizante utilizado y de la fuente biológica y usar la vinaza en procesos tecnológicos que minimicen las descargas de este efluente líquido al medio ambiente. La vinaza se obtiene de diferentes especies vegetales, tales como caña de azúcar (Christofolletti et al. 2013), agave (Espinoza-Escalante et al. 2009), maíz, cebada, trigo, soya (Karp et al. 2011), yuca (Guna-

wan et al. 2015) y uvas (Salgado et al. 2011), entre otros materiales. Como reflejo de sus altos valores de DQO Y DBO, la vinaza contiene una amplia variedad de compuestos químicos carbonados, entre los más comunes se reportan ácido acético, ácido láctico, glicerol y carbohidratos (Vadival et al. 2014); esta propiedad ha sido aprovechada para su uso en la fabricación de compuestos y productos de mayor valor agregado, tales como ácido acético, fertilizantes, alimentos para animales (Djuvic-Vukovic et al. 2013), biogás (Espinoza-Escalante et al. 2009), ácido láctico (Ghaffar et al. 2014). Este último ha sido obtenido de una gama de sub productos agroindustriales, entre ellos melasas (Wang et al. 2015; Dumbrepatil et al. 2008; Wee et al. 2004; Nandesana y Kumar, 2008), vinazas de vino (Salgado et al. 2011), caña de azúcar (Djuvic-Vukovic et al. 2013; Djuvic-Vukovic et al. 2012, Djuvic-Vukovic et al. 20013a; Christofolletti et al. 2013) y soya (Karp et al. 2011) o de azúcares purificados, lactosa (Dumbrepatil et al. 2008), glucosa (Lee et al. 2014; Subramanian et al. 2015), entre otras fuentes carbonadas, mediante el uso de cepas bacterianas. Bajo estas circunstancias es posible obtener ácido láctico ópticamente puro, es decir el isómero D o el L, de acuerdo a la cepa bacteriana utilizada, constituyendo esta situación una de las ventajas del método microbiológico sobre la síntesis química del ácido láctico, en la cual usualmente se produce una mezcla racémica de ambos estereoisómeros (Dumbrepatil et al. 2008; Subramanian et al. 2014; Ghaffar et al. 2014; Meng et al. 2012). Adicionalmente, el costo de la vinaza es muy bajo en comparación a los de los materiales usados en la síntesis química del ácido (Dumbrepatil et al. 2008), lo cual constituye un atractivo económico y finalmente, la síntesis química presenta mayores y más complejos problemas de contaminación para el medio ambiente (Nandasana y Kumar, 2008). El uso de ácido láctico como materia prima para la elaboración de productos químicos abarca un amplio espectro industrial (Castillo-Martínez et al. 2013), incluyendo preservadores de alimentos, acidulantes, productos farmacéuticos y textiles, emulsificantes, síntesis de ésteres, polietilenglicol, ácido acrílico, óxido de propileno y ácido poliláctico, fabricación de prótesis y suturas quirúrgicas (Djuvic-Vukovic et al. 2013a; Karp et al. 2011; Dumbrepatil et al. 2008) y ha sustituido a la empresa petroquímica en la síntesis de plásticos (Gunawan et al. 2015). Consecuentemente, debido a la muy escasa información

publicada sobre la producción de ácido láctico a base de vinaza (Djuvic-Vukovic et al. 2012) e intentando utilizar un subproducto agrícola abundante, de fácil adquisición y bajo costo, como es la vinaza, en este trabajo se describe un método microbiológico para la producción de ácido láctico, usando el efluente como substrato fermentable y una cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC29212. Adicionalmente, el uso de tal efluente líquido tendería al menos a minimizar los efectos negativos de su descarga definitiva al medio ambiente y el producto obtenido, ácido láctico, podría constituir la materia prima para múltiples actividades industriales en el ámbito nacional.

Materiales y Métodos

1.1 Material Biológico

1.1.1-Vinaza: obtenida de una empresa productora de etanol a partir de caña de azúcar, ubicada en San Felipe, estado Yaracuy, Venezuela.

1.1.2-Cepa bacteriana: *Enterococcus faecalis*, cepa ACTT29212, suministrada por el Departamento de Microbiología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

1.2-Medios de cultivo.

Caldo nutritivo No.105443 (CN) y agar nutritivo No.105450 (AN) fueron adquiridos de Merck; medios de activación (MA), complementados con vinaza (MV) y de fermentación (MF) fueron preparados en el laboratorio, esterilizándose a 121 °C, 15 psi durante 15 min. Su composición y uso se especificará posteriormente.

1.3-Cultivos bacterianos.

Asadas de un cultivo de *E. faecalis*, mantenidos en agar semisólido, se transfirieron a CN, incubándose a 37 °C durante 24-48 h, hasta el desarrollo de turbidez. Seguidamente, el cultivo fue sometido a una etapa de activación y otra de aclimatación a la vinaza, previo a su uso en el proceso fermentativo. En la etapa de activación alícuotas de 1 ml de cultivo en CN se adicionaron a 200 mL de MA (8 g/L de CN, 1 g/L de citrato de sodio, 5 g/L de NaCl, 5 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ y 2,5 g/L de Na_2HPO_4 , pH 7,0), incubándose a 37 °C durante 48 h. Para la etapa de aclimatación se prepa-

raron tres diferentes medios MV, medio 50MV (400 mL de vinaza + 400 mL de MA), medio 70MV (560 mL de vinaza + 240 mL de MA) y medio 100MV (800 mL de vinaza), los cuales se esterizaron según lo señalado anteriormente. El protocolo de aclimatación consistió en inocular 800 mL de 50MV con 5 mL del cultivo en MA, luego de 24 h de incubación 5 mL del cultivo en 50MV se transfirieron a 800 mL de 70MV, incubándose durante otras 24 h y finalmente, 5 mL del cultivo 70MV se adicionaron a 800 mL de 100MV y se incubó por 24 h. Todas las incubaciones se efectuaron a 37 °C y la variación de pH, fue usada como indicador de la viabilidad y actividad metabólica de la cepa bacteriana. La población bacteriana obtenida del cultivo en 100MV fue utilizada en experimentos en los cuales se evaluó el comportamiento bacteriano en largos periodos de incubación en presencia de vinaza; estas experiencias se efectuaron a 25 °C y al inicio y 96 h de incubación el pH se ajustó a 8,0 (Castillo-Martinez et al. 2013) con hidróxido de sodio 20 % p/v, la incubación se efectuó durante ocho días. Diariamente se determinó el pH con un equipo digital Corning, modelo 240, y se estableció la variación de pH.

1.4-Optimización del cultivo bacteriano en medios con vinaza.

Para maximizar la actividad microbiana se procedió a analizar el comportamiento bacteriano al variar el pH, la concentración de sales del medio y la temperatura, en incubaciones de 24 h, aplicando un diseño experimental factorial 2^3 . A tal efecto el pH del medio se ajustó a 7,0 y 8,0; la temperatura a 25 °C y 37 °C y la concentración salina baja 1X (citrato de sodio 0,5 g/L, NaCl 2,5 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1,25 g/L y Na_2HPO_4 2,5 g/L) y alta 3X (citrato de sodio 1,5 g/L, NaCl 7,5 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 3,75 g/L y Na_2HPO_4 7,5 g/L). El diseño factorial incluyó tres evaluaciones independientes (replicas), cada una con ocho tratamientos diferentes, con un total de 24 incubaciones. Las combinaciones evaluadas se especifican en la tabla 3. De nuevo la variación de pH se asignó a crecimiento y actividad metabólica bacteriana. El análisis de los datos obtenidos (variación del pH, Δ pH)se efectuó mediante el programa estadístico Minitab 16.

1.5-Proceso fermentativo en un fermentador anaeróbico.

Una vez establecidas las condiciones de máxima ac-

tividad bacteriana se procedió a efectuar la fermentación de la vinaza en un fermentador anaeróbico de ocho litros de capacidad y 6-7 litros de volumen útil de trabajo. El medio de cultivo conteniendo 6 L de vinaza, 3 g de citrato de sodio, 15 g de cloruro de sodio, 15 g de sulfato de amonio y 7,5 g de fosfato disódico, pH 8,0, fue esterilizado a 121 °C, 15 psi durante 15 min y se adicionó 600 mL de cultivo de *E. faecalis* en 100MV, bajo condiciones de anaerobiosis, 25 °C y agitación constante (300 rpm). El sistema se monitoreo por cinco días; diariamente el pH se ajustó a 8,0 por agregado de hidróxido de sodio 20 % m/v y se retiraron alícuotas de 200 mL para determinar biomasa (UFC/mL), azúcares totales y ácido láctico. El ácido láctico producido se purificó mediante tratamiento con $Ca(OH)_2$ y H_2SO_4 (Nuñez et al. 2009).

1.6-Métodos analíticos.

Para la determinación de los parámetros fisicoquímicos de la vinaza se emplearon los siguientes métodos: demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno ($DBO_{5,20C}$) y sólidos totales, métodos 5220D, 5210B y 2540B respectivamente (Clescery et al 1998) y nitrógeno total según la norma 1195-80 (24-COVENIN). Los azúcares totales se determinaron por el método de antrona (Rendina, 1974), midiendo la absorbancia a 640nm, la curva de calibración obtenida, ($Y = 0,022 + 0,01825 X$, $r = 0,9965$), calculada por regresión lineal, se estableció entre 4 y 40 μg de glucosa y se ensayó 1 mL de una dilución 1:1000 del líquido a analizar. El ácido láctico se purificó mediante la alcalinización con $Ca(OH)_2$ y posterior acidificación con H_2SO_4 (Meng et al. 2012; Nuñez et al. 2009). El contenido de ácido láctico se estableció por adición $FeCl_3$ 1 % m/v a 5 mL de una dilución 1:1000 de los líquidos a ser analizados y determinación de la absorbancia a 440 nm (Nuñez et al. 2009). La curva de calibración, calculada por regresión lineal ($Y = -0,0145 + 0,00452 x$, $r = 0,9978$) incluyó cantidades de ácido láctico de 6 a 60 μg . El número de colonias por mL (UFC/mL) se obtuvo al sembrar diluciones seriadas del medio de cultivo en placas de AN y posterior incubación a 37 °C durante 24-48 h.

Resultados y Discusión

Las características fisicoquímicas de la vinaza se detallan en la tabla 1, estableciéndose adicionalmente los valores máximos permisibles de acuerdo al decreto 883, artículos 10, 12 y 15 y decreto 2635, artículos 49 y 50 de la Republica Bolivariana de Venezuela (Gacetas Oficiales 5021 y 5243).

Todos los parámetros determinados superaron los valores permisibles, indicando que este tipo de efluente no debería ser descargado al medio ambiente (cuerpos de agua incluyendo aguas cloacales y suelos), y que tratamientos previos antes de su disposición definitiva deberían ser ejecutados. La alta DQO ($67.000 mgO_2/L$), indica elevados niveles de moléculas carbonadas, las cuales al oxidarse abióticamente reducen la concentración de oxígeno disuelto en agua, afectando negativamente la fauna acuática (peces e invertebrados) produciendo su muerte. Alta $DBO_{5,20C}$ ($21.749 mgO_2/L$) implica presencia de moléculas carbonadas resistentes a la biodegradación y que permanecen en los ambientes naturales por tiempos relativamente largos, ejerciendo efectos tóxicos sobre la biota presente en los ambientes implicados. Elevadas cantidades de sólidos totales ($0,0567 g/mL$) interfieren con el paso de luz a capas profundas de los cuerpos de agua, interfiriendo con la fotosíntesis efectuada por organismos autótrofos y disminuyendo la concentración de oxígeno disuelto en el agua, estableciéndose condiciones anóxicas no deseables para la biota que habita en tales ambientes. Niveles altos de nitrógeno ($0,29 g/L$) podrían eutroficar los cuerpos de agua, produciéndose cantidades excesivas de plantas acuáticas que interfieren con el paso de luz y por ende con la fotosíntesis y adicionalmente incrementan la DQO. El pH ácido (Djuvic-Vucovic et al. 2013; Djuvic-Vukovic et al. 2013a) ejerce efectos tóxicos particularmente sobre los microorganismos acuáticos. No obstante, el relativo alto valor de la DQO y el contenido de azúcares totales determinados ($14,68 g/L$) podría justificar el uso de la vinaza para obtener productos carbonados de alto valor agregado, tales como el ácido láctico, y consecuentemente usar un subproducto industrial abundante, que por sus características y cantidades producidas tiende a contaminar el medio ambiente (Djuvic-Vukovic et al. 2012; Christoletti et al. 2013; Vadival et al. 2014).

Luego de obtener crecimiento de la cepa de *E. fae-*

Tabla 1. Caracterización físico química de la vinaza.

Parámetros	Valor experimental	Valor permisible
DQO (mgO ₂ /L)	67.000	350
DBO _{5,20C} (mgO ₂ /L)	21.749	60
Sólidos totales (g/L)	56,72	0,16
Nitrógeno total (g/L)	0,29	0,04
Azúcares totales (g/L)	14,68	No Aplica
Acidez (pH)	4,30	6,0-9,0

calis en CN, indicado por desarrollo de turbidez, se procedió a activar la cepa en MA, al determinar la variación del pH del medio, de 7,0 bajó a 5,8. En la etapa de aclimatación el pH de los medios MV se ajustó a 8,0; la actividad bacteriana en estos medios se manifestó por cambios de pH, hacia el lado ácido, en los dos periodos de cuatro días de incubación. El cambio en el pH se observó en los tres tipos de medios MV utilizados, pero solamente se reportan los datos correspondientes al sistema con 100MV (tabla 2).

Tabla 2. Variación de pH (Δ pH) en medio suplementado con vinaza por *E. faecalis*

	Tiempo de cultivo (días)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Δ pH *diario	2,1	0,2	0,1	0	1,9	0,2	0,2	0
Δ pH total a 4 y 8 días de incubación				2,4				2,3
*pH inicial y final del medio 8,0 y 5,6 respectivamente								

La variación de pH se observó a los tiempos iniciales de incubación (1-3 y 5-7 días) deteniéndose la variación al cuarto día de cultivo (días 4 y 8), lo cual podría indicar el consumo total del azúcar del medio por las bacterias o la inhibición del proceso fermentativo por altos niveles de ácido láctico y valores de pH cercanos a 5 (Djuvic-Vukovic et al. 2013; Djuvic-Vukovic et al. 2012; Wang et al. 2015; Wee et al. 2004; Nandessana et al. 2008; Castillo-Martinez et al. 2013; Meng et al. 2012). La variación de pH fue de 2,4 y 2,3 unidades de pH para el primer y segundo periodo de incubación respectivamente, observándose la mayor variación al primer y quinto días de incubación (2,1 y 1,9 unidades de pH respectivamente), el pH final del cultivo fue de 5,6. Luego de demostrar el crecimiento de *E. faecalis* a pH 8,0 y por periodos de tiempo relativamente largos (8días), se procedió a establecer las condiciones de cultivo, para maximizar su crecimiento, mediante un diseño experimental factorial 2³, evaluando la temperatura de incubación, el pH del medio de cultivo y la concentración salina; de nuevo

la variación de pH fue el parámetro respuesta tomado como índice de actividad fermentativa y crecimiento bacteriano. Los resultados de tales experiencias se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Variación de pH (Δ pH) en el diseño factorial experimental 2³ mediada por *E. faecalis*.

Sistema	Temperatura (°C)	pH inicial	Sales	pH final	Δ pH* (DE)**
1	25	7,0	Baja	5,76	(± 0,21)
2	37	7,0	Baja	5,83	1,17(± =,15)
3	25	8,0	Baja	5,93	2,07(±0,25)
4	37	8,0	Baja	6,00	2,00(±0,26)
5	25	7,0	Alta	5,66	1,34(±0,15)
6	37	7,0	Alta	5,70	1,30(±0,10)
7	25	8,0	Alta	6,03	1,97(±0,21)
8	37	8,0	Alta	5,93	2,07(±0,21)

A pH 7,0 la variación de pH en los sistemas 1, 2, 5 y 6 se ubicó entre 1,24 y 1,34 unidades de pH con un valor promedio de 1,26. A pH 8 la respuesta fue mayor, en los sistemas 3, 4, 7 y 8, la variación de pH varió entre 1,97 y 2,07, con un valor promedio de 2,02 unidades de pH, lo cual prácticamente duplicó el valor obtenido a pH 7,0. El análisis estadístico ANOVA para estas experiencias indicó que el pH inicial posee influencia significativa ($\alpha < 0,05$) sobre las variaciones de pH en los sistemas; por el contrario los parámetros temperatura y concentración de sales no presentaron influencias significativas ($\alpha > 0,05$) sobre la respuesta (Δ pH). Consecuentemente el pH inicial del cultivo es el factor preponderante en la actividad fermentativa mediada por la bacteria bajo las condiciones experimentales utilizadas; resultados similares han sido reportados al usar Aloe vera para la producción de ácido láctico (Gómez-Gómez et al. 2015). Establecidas estas condiciones se efectuó el proceso fermentativo tal como se indica en Materiales y Métodos (sección 2.5). Es importante señalar que muchos de los procedimientos que utilizan vinaza o melaza como materia prima para obtener ácido láctico complementan los medios de cultivo con extracto de lavadura (Djuvic-Vukovic et al. 2012; Wee et al. 2004; Lee et al. 2014; Cocks et al. 2013); al respecto se ha determinado que entre el 30 y 68% de los gastos asociados al cultivo del microorganismo son imputables al extracto de levadura (Djuvic-Vukovic et al. 2012; Ghaffar et al. 2014; Cocks et al. 2013; Salgado et al. 2011), lo cual aumenta los gastos de producción de ácido láctico. En este trabajo no se utilizó tal extracto, como lo reportan otros autores (Djuvic-Vukovic et al. 2012; Dumbrepatil et al. 2008). Los resultados se presentan en figura 1.

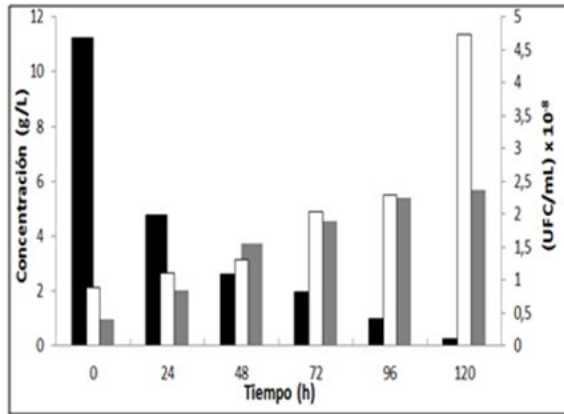


Figura 1. Variación de la biomasa (cuadros blancos), azúcares (cuadros negros) y ácido láctico (cuadros grises) durante la fermentación de vinaza respecto al tiempo de incubación.

La biomasa incrementó de 89×10^6 UFC/mL hasta 464×10^6 UFC/mL; no fue aparente la fase de latencia y el crecimiento fue progresivo alcanzando el valor máximo a las 120 h de incubación; resultados similares han sido reportados por otros autores (Djuvic-Vukovic et al. 2012). La concentración de azúcar disminuyó desde 11,23 g/L hasta 0,272 g/L y la concentración de ácido láctico incrementó de 0,986 g/L a 5,73 g/L en el mismo periodo de incubación. La permanencia de pequeñas cantidades de azúcar luego de largos periodos de incubación ha sido reportada por otros laboratorios pudiendo ascender hasta 5-6 g/L (Djuvic-Vukovic et al. 2012). De acuerdo a los datos obtenidos el consumo de azúcar alcanzó niveles del 97,6% y el incremento de ácido láctico fue de 5,8 (5,73/0,986) veces mayor luego de la incubación, obteniéndose 4,814 g/L de ácido durante el tiempo de incubación, y el rendimiento de la conversión de azúcar a ácido láctico fue 52,3% [$5,73 \times 100 / (11,23 - 0,272)$]. En el reactor, conteniendo 6,6 L de medio fermentativo, se consumieron 72,32 g de azúcar [$(11,23 - 0,272) \times 6,6$], se obtuvieron 37,81 g de ácido láctico ($5,73 \times 6,6$) y la productividad se calculó en 0,047 g/Lxh ($5,73/120$). Bajo estas circunstancias en un reactor de 1000 L, se podrían producir 5,73 Kg de ácido láctico y consumir 10,96 Kg de azúcares totales. La concentración de ácido láctico (g/L), productividad (g/Lxh) y rendimiento respecto a contenido de azúcares totales ($100 \times \text{g/g}$), son bajos al compararlos con lo reportado por otros laboratorios cuyos valores oscilaron entre 42-182 g/L, 0,90-5,0

g/Lxh y 56-98 %g/g, respectivamente. Sin embargo los resultados no son comparables debido a que en todos los estudios aludidos (Djuvic-Vukovic et al. 2013; Djuvic-Vukovic et al. 2012; Djuvic-Vukovic et al. 2013a; Subramanian et al. 2015; Ghaffar et al. 2015; Salgado et al. 2011), el medio de cultivo conteniendo vinaza, con una concentración de azúcares reductores de 12 g/L (Djuvic-Vukovic et al. 2013; Djuvic-Vukovic et al. 2012), fue complementado con altas concentraciones de glucosa, 55-169 g/L, adicionada como sólido o en soluciones al 70% m/v (Djuvic-Vukovic et al. 2013a) y en algunos casos se incluyó extracto de levadura. Esta situación podría indicar que la producción de ácido láctico en estos medios proviene en gran proporción del azúcar exógeno suministrado al medio y no de lo contenido en la vinaza. En este estudio, el medio estuvo constituido por vinaza pura (100MV), al cual se adicionó 0,60 g/L de citrato de sodio, sin adiciones de glucosa ni de otra fuente carbonada. El bajo rendimiento general podría ser justificado por la baja concentración de azúcares presentes en la vinaza, debido a que la bacteria debe consumir parte de la fuente carbonada disponible para satisfacer sus necesidades metabólicas y reproductivas y el remanente sería entonces utilizado para la producción de metabolitos secundarios, es decir, ácido láctico. Los resultados reportados se obtuvieron solo después de aclimatar la cepa de *E. faecalis* por un mínimo de 11 días en medios conteniendo cantidades crecientes de vinaza. El objetivo fue utilizar la mayor cantidad de vinaza y producir un compuesto de elevado valor agregado. Finalmente el incremento en biomasa podría justificar el uso de la vinaza fermentada como un aditivo con alto nivel de proteínas destinado a la preparación de alimentos para animales (Djuvic-Vukovic et al. 2012; Djuvic-Vukovic et al. 2013a). Como dato adicional, un estimado de los costos asociados en la adquisición de medios de cultivo, sales, hidróxidos y reactivos para determinar glucosa y ácido láctico en este estudio, no superaron los Bs. 160; el costo de 1 gramo de ácido láctico (90% de pureza), de acuerdo a cotizaciones de empresas internacionales dedicadas a la comercialización de productos químicos es de US\$ 34.

Conclusiones

Enterococcus faecalis, usando vinaza como fuente de carbono, consumió 97,6% de los azúcares totales iniciales, equivalente a 72,32 g, en un reactor de 6-7 litros de capacidad útil de trabajo, produciendo 37,81 g de ácido láctico en una incubación de 120 h, a 25 °C, pH 8,0 y en anaerobiosis. El proceso fermentativo fue altamente dependiente del pH inicial del medio de cultivo.

Agradecimientos

Reconocemos la valiosa colaboración en la preparación del manuscrito de MSc Luís Amaíz, Ing Pedro Lugo y TSU Darío Valbuena.

Bibliografía

Castillo-Martínez, F.A.; E.M. Balcinas; J.M. Salgado; J.M. Dominguez-González; A. Converti; R.P. Sousa-Oliveira. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends Food Sci Tech* 30(2013):70-83.

Christofolletti, C.A.; J.P. Escher; J.E. Correia; J.F. Marinho; C.S. Fontanetti, (2013). Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. *Wast Manag* 33(12):2752-2761.

Clesceri, L.S.; A.E. Greenberg; A.D. Eaton. Editors. (1978). Standard methods for examination of water and wastewater. 20th edition. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF). Washington DC, USA. pp. (5-17)-(5-18); (5-3)-(5-7), 257-258.

Cocks, L.S.; C.A. Rengifo-Guerrero; M.A. Rojas-Restrepo. (2013). The use of earth worm flour for lactic acid biomass product. *Afric J Biotechnol* 12(40):5962-5967.

COVENIN. Republica de Venezuela, Ministerio de Fomento. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Alimentos. Norma 1195-80. Determinación de nitrógeno. Método Kjeldhal.

Damaso, MCT; Machado, CMM; de Sousa-Rodrigues, D; Belem, SG; Chan-Salum, TF. (2014). Bioprocesses for biofuels: an overview of the Brazilian case. *Chem Biol Technol Agric* 1(1):1-8.

Djukic-Vukovic A.P.; L.V. Mojovic; S. Nikolic; J. Pejin; Y. Skocic-Tanackoy; K. Mihajlovski. (2013). Distillery stillage as a new substrate for lactic acid production in batch and fed-batch fermentation. *Chem Eng Trans* 34:97-102.

Djukic-Vukovic, A.P.; L.V. Mojovic; M.S. Vukasonomic-Sekulic; N.B. Rakin; S.B. Nikolic; J.D. Pejin; M.L. Bulatovic. (2012). Effect of different fermentation parameters on L lactic acid production from liquid distillery stillage. *Food Chem* 134(2):1038-1043.

Djukic-Vukovic, A.P.; L.V. Mojovic; B.M. Jokic; S.B. Nikolic; J.D. Pejin. (2013a). Lactic acid production on liquid stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite. *Bioresource Technol* 135:454-458.

Dumbrepatil, A; Adsul, M; Chaudhary, S; Khire, J; Gokhale, D. (2008). Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* sub sp *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Appl Environ Microbiol* 74(1):333-355.

Espinoza-Escalante, FM; Pelayo-Ortiz, C; Navarro-Corona, J; González-García, Y; Bories, A; Gutiérrez-Pulido, H. (2009). Anaerobic digestion of vinasses from the fermentation of Agave tequilana Weber to tequila: the effect of pH, temperature and hydraulic retention time on the production of hydrogen and methane. *Biomass Bioenerg* 33(1):14-20.

Gacetas Oficiales. República de Venezuela. No. 5021 de fecha 18-12-1995, decreto 883, artículos 10, 12 y 15 y No. 5243 de fecha 3-10-1998, decreto 2635, artículos 40 y 50.

Ghaffar, T; Irshad, M; Anwar, Z; Aqil, T; Zulifqar, Z; Tariq, A; Kamran, M; Ehsan, N; Mehmood, S. (2014). Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification. *Sciences* 7(2):222-229.

Gómez-Gómez, JA; Giraldo-Estrada, C; Habeych, D; Baena, S. (2015). Evaluation of biological production

- of lactic acid in a synthetic médium and in Aloe vera (L.) Burm. F. processing by-products. *Univ Sci* 20(3):369-385.
- Gómez, J; Rodríguez, O. (2000). Effects of vinasse on sugarcane (*Saccharum officinarum*) productivity. *Rev Fac Agron (LUZ)* 17:318-326.
- Gómez-Toro, JM. (1996). Efecto de aplicación de la vinaza en la producción y calidad de la caña de azúcar. *Caña de Azúcar* 14(1):15-34.
- Gunawan, S; Widjaja, T; Zullaikah, S; Ernawati, L; Istianah, N: (2015). Effect of fermenting cassava with *Lactobacillus plantarum*, *Sacharomyces cerevisiae* and *Rhizopus oryzae* on the chemical composition of their flour. *Int. Food Res J* 22(3):1280-1287.
- Karp, SG; Igashiyama, AH; Siqueira, PF; Carvalho, JC; Vandenberghe, LPS; Thomaz-Soccol, V; Coral, J; Tholozan, JL; Pandey, A; Soccol, CR. (2011). Application of the biorefinery concept to produce L lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. *Bioresource Technol* 102(2):1765-1772.
- Lee, RK; Dyu, HW; Oh, H; Kim, M; Wee, YJ. (2014). Cell recycle continous fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1 for economical production of lactic acid by reduction of yeast extract supplementation. *J Microbiol Biotechnol* 24(5):661-666.
- Mello-Prado, R; Caione, G; Silva-Campos, CN. (2013). Filter cake and vinasse as fertilizers contributing to conservation agriculture. *Appl Environ Soil Sci* 2013 Article ID 581984, 8 pages.
- Meng, Y; Xue, Y; Yu, B; Gao, C; Ma, Y. (2012). Efficient production of Lactic acid with high optical purity by alkalophilic *Bacillus* sp WL-S20. *Biore-source Technol* 116:334-339.
- Nandasana, AD; Kumar, S. (2008). Kinetic modeling of lactic acid production from molasses using *Enterococcus faecalis* RK1. *Biochem Eng J* 38(3):277-284.
- Núñez, A; Michelena, G; Carrera, E; Álvarez, X. (2009). Estudios sobre la recuperación y purificación de ácido láctico para la producción de plásticos biodegradables. *ICIDCA* 43(2):20-29.
- Rendina, G. (1974). *Técnicas Aplicadas de Bioquímica*. 1ra edición. Interamericana SA de VC. México DC, México. pp 134-135.
- Salgado, JM; Rodríguez, N; Max, B; Pérez, B; Rodríguez, R; Córtes, S; Domínguez, JM. (2011). Evaluation of wine vinasse as alternative nutrients in biotechnological processes. *CyTA J Food* 9(4):278-281.
- Sánchez, OJ; Cardona, CA. (2005). Producción tecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas: *Interciencia* 30(11):671-678.
- Subramanian, MR; Talluris, S; Christopher, LP. (2015). Production of lactic acid using a new homofermentative *Enterococcus faecalis* isolate. *Microbiol Biotechnol* 8(2):221-229.
- Vadival, R; Minhas, PS; Kumar, P; Singh, Y; Rao DVK, N; Nirmala, A. (2014). Significance of vinasses waste managment in agriculture and environmental quality: Review. *Afric J Agric Res* (38):2862-2873.
- Wang, Y; Tashiro, Y; Sonomoto, K; Broschi, J. (2015). Review: Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects and limits. *Bioeng* 11(1):10-18.
- Wee, YJ; Kim, JN; Yun, JS; Ryu, HW. (2004). Utilization of sugar molasses for economical L (+) lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Enzyme Microbiol Tech* 35(6-7):568-573.