

Valorización de residuos de la industria de confitería para la producción de poliácido málico (PMA)

Delgado Portales, R.E, Ponce Amador, D., Ramírez Zapata, E.L., González García, R. y Moscosa Santillán, M.
 Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí
 Dr. Manuel Nava 6, Zona Universitaria, 78210, San Luis Potosí, S.L.P., México. Tel:+52(444)8262440ext.6475.
 Correo: rdelgado@uaslp.mx

Palabras clave: *Aureobasidium spp*, fermentación, poliácido málico

Introducción

Los residuos de confitería son materiales ricos en azúcares fermentables, con potencial para la bioconversión y obtención de productos de interés con alto valor agregado. Dentro de estos compuestos se encuentran los ácidos orgánicos. La mayoría de estos ácidos son producidos actualmente mediante procesos químicos, requiriendo compuestos derivados del petróleo como principal materia prima.

En este contexto, la bioproducción del polímero del ácido málico (PMA), polímero conformado por repetitivas unidades de L-malil, ha tomado relevancia en los últimos años [1]. Esto, ya que no tiene la desventaja de presentar inhibición del crecimiento de la biomasa, como es el caso cuando se produce directamente el ácido málico, el cual puede obtenerse fácilmente mediante una hidrólisis posterior [2].

La cepa *Aureobasidium spp* ha demostrado altos rendimientos y resultados positivos para la obtención del PMA, mediante el uso de diferentes fuentes de azúcares fermentables [3]. En particular, el uso de residuos de confitería como materia prima, objetivo de este proyecto, presenta la ventaja de no requerir pretratamientos, brindando una opción para la disminución de costos por almacenamiento, transporte y tratamiento de estos desechos.

Metodología

La metodología de fermentación se realizó con base en el estudio Wei y col., empleando una cepa de *Aureobasidium pullulans* [4]. Para este estudio, se empleó un diseño experimental factorial completo con puntos centrales (2^k+3C), en un medio de cultivo simulando la composición ideal de un jarabe obtenido a partir de residuos de confitería. Las variables estudiadas fueron la proporción de azúcares en el medio (dextrosa:sacarosa), así como la presencia de sales de sodio (citrato y malato) para determinar la influencia de estos factores en el rendimiento obtenido y predecir el comportamiento del microorganismo en un medio a base de estos residuos. En la Tabla 1 se presenta la nomenclatura y los límites para cada variable.

Tabla 1. Variables evaluadas y límites empleados en el diseño de experimentos.

Variables	Nomenclatura	Límite superior	Límite inferior
Relación dextrosa:sacarosa ^a	X ₁	1:0	0:1
Concentración de citrato de sodio	X ₂	5 g/L	0 g/L
Concentración de malato de sodio	X ₃	7 g/L	0 g/L

^aLa concentración total de azúcares siempre corresponde a 120 g/L, la proporción de cada componente varía de 0 (0%) a 1 (100%).

A lo largo de la fermentación se midieron las siguientes variables: pH, porcentaje de sólidos solubles (°Brix), azúcares totales (AT) y azúcares reductores totales (ART) con el método Fehling, así como cuenta total para mohos (CT) mediante el método de Miles y Misra [5], la biomasa expresada como peso seco celular (DCW) y la masa de polímero obtenido por gravimetría (PMA) de acuerdo al método propuesto por Liu y Steinbüchel [6]. La determinación de °Brix y cuenta total se realizó cada 24 h, el resto de las variables de determinaron cada tercer día a lo largo del tiempo total de fermentación, el cual fue de 10 días a una temperatura de 25°C.

Resultados y discusión

Con un total de 11 experimentos realizados y mediante el análisis estadístico (ANOVA) del rendimiento como variable de respuesta, se obtuvieron valores de R^2 de 0.96 y R^2 ajustada de 0.9, lo que indica que, el modelo representa adecuadamente el comportamiento de la variable de respuesta en función de los parámetros seleccionados. No obstante, la calidad de los datos no es la ideal ($Q^2=0.5$) y se aprecia que para un intervalo de confianza de 95%, la regresión es significativa. Además, la prueba de *Lack of fit* no presenta significancia estadística relevante. Por lo tanto, es posible aseverar que el modelo predice de manera adecuada la variable de respuesta. El modelo planteado fue el siguiente:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_1 x_2 + \beta_5 x_1 x_3 + \beta_6 x_2 x_3 \quad (1)$$

También, como resultado del estudio estadístico se analizó la significancia de los parámetros del modelo ($p=0.05$). Al sustituir los valores de los parámetros resultantes de la regresión, se obtuvo la siguiente representación matemática para el comportamiento del rendimiento:

$$y = 29.00 + 1.5x_1^2 - 4x_2^2 - 0.2x_3^2 + 1.5x_1^2 x_2^2 + 1.7x_1^2 x_3^2 + 1.2x_2^2 x_3^2 \quad (2)$$

La relevancia de cada factor puede apreciarse más fácilmente en el Figura 1, donde se representan los valores de los coeficientes o parámetros obtenidos (escalados y centrados) respecto a la variable de respuesta. La gráfica muestra que x_1 presenta una influencia positiva sobre el rendimiento, es decir que la presencia en mayor proporción de dextrosa respecto al de sacarosa parece tener un efecto positivo sobre los rendimientos finales. Sin embargo, la variable x_2 es la que tiene mayor influencia sobre el rendimiento. Además, la influencia es negativa, lo que significa que la presencia de citrato de sodio disminuye la producción de poliácido málico. Por otro lado, la presencia de malato de sodio no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento obtenido (x_3). Tampoco se observa efecto significativo de la interacción de ambas sales ($x_2 x_3$).

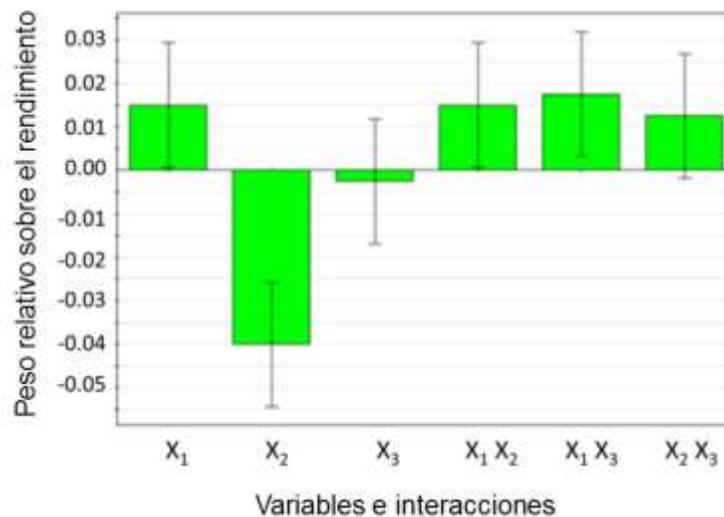


Figura 1. Efecto de los factores analizados para el modelo del rendimiento de la fermentación por *Aureobasidium pullulans* en el medio modelo.

No obstante, las interacciones entre la proporción de azúcares y la presencia de ambas sales ($x_1 x_2$, $x_1 x_3$), generan un ligero aumento en la respuesta. Esto es, a mayor proporción de dextrosa en presencia de ambas sales, se obtiene un mayor rendimiento.

Los resultados del diseño de experimentos fueron correlacionados con la evolución de cuenta total y biomasa, obteniendo resultados consistentes. En efecto, en los medios donde hay presencia de 100% sacarosa y citrato, sin importar la presencia o ausencia de malato, la cepa no pudo sobrevivir más allá del tiempo mencionado. El efecto inhibitor del citrato en el ciclo de Krebs, mencionado en la literatura, se corrobora al observar la disminución de la cuenta microbiana inicial. Este efecto es inhibido cuando el medio tiene presencia de dextrosa. Esto se debe probablemente a que la célula se adapta a la presencia de citrato y tiene manera de continuar con su metabolismo, gracias a la reserva de monosacárido, el cual puede metabolizar con mayor facilidad. En efecto, *Aureobasidium pullulans* contiene más de 800 secretadores de proteínas, donde el 45% de ellos están relacionados con enzimas activas en la degradación o catabolismo de carbohidratos, que incluyen varios azúcares como sucrosa, maltosa, lactosa, galactosa, fructosa y xilosa [7].

Para mostrar el efecto de las variables influyentes en este estudio, la Figura 2 muestra una gráfica de contorno del rendimiento en función de la concentración de citrato de sodio y de la concentración de dextrosa. Aquí se observa que, para una determinada concentración de la sal de sodio, se obtiene mayor rendimiento a medida que se incrementa la concentración de dextrosa en el medio. También se observa el pronunciado efecto inhibitor del citrato de sodio sobre el rendimiento.

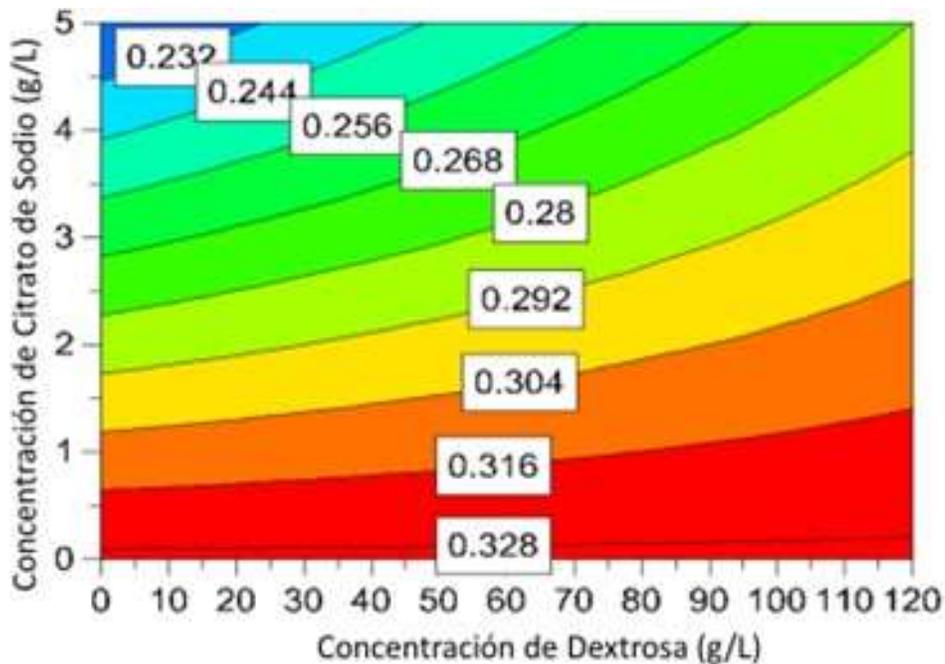


Figura 2. Efecto de la concentración de citrato de sodio y dextrosa sobre el rendimiento de la fermentación en el medio modelo.

Para finalizar con el análisis estadístico, en la Figura 3, se muestra la gráfica de paridad entre los valores experimentales y los valores predichos obtenidos a través del modelo. Como se observa, los puntos están cerca de la línea recta de 45°. Sin embargo, los puntos al centro del grupo de datos muestran un comportamiento fuera de esta línea, si bien puede atribuirse a cierto grado de curvatura en el comportamiento de los datos, que daría como resultado explorar el ajuste en un modelo del tipo cuadrático, mediante los resultados obtenidos por la prueba *lack of fit* del ANOVA, esta idea es descartada.

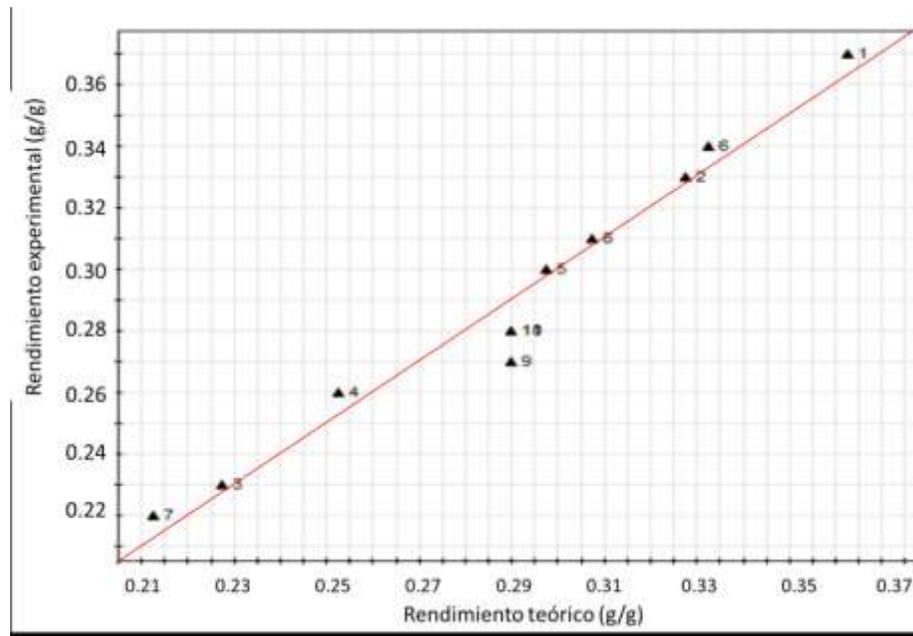


Figura 3. Comparación del rendimiento experimental y teórico para la obtención de PMA empleando *Aureobasidium pullulans*.

Conclusiones

El análisis estadístico muestra que el modelo obtenido permite predecir adecuadamente el comportamiento del sistema. Se observa el efecto inhibitor importante del citrato de sodio, el cual ya fue reportado previamente en la literatura. Sin embargo, este efecto inhibitor es ligeramente atenuado en el caso del uso de dextrosa.

Los resultados muestran la factibilidad técnica de la obtención de poliácido málico a partir de soluciones modelo de composición similar a los jarabes de desecho de la industria confitera,

Además, con el conocimiento mediante el diseño de experimentos del comportamiento de la cepa seleccionada en función de las sustancias que están en el medio a utilizar, es posible que el modelo planteado permita estimar los ajustes necesarios a las concentraciones originales al utilizar los residuos de confitería con la finalidad de obtener mejores rendimientos y hacer al proceso económicamente rentable.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo técnico de la I.A. Alejandra Loredo Becerra y la I.B.P. Nayeli del Carmen Mendoza Medina por su apoyo en la realización de análisis microbiológicos, así como de la empresa Canel's por el apoyo brindado para la realización del proyecto.

Bibliografía

1. Liu S.J., Steinbüchel (1997). A Production of poly(malic acid) from different carbon sources and its regulation in *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol. Lett.* **19**:11–14.
2. Li Y., Chi Z., Wang G.Y., Wang Z.P., Liu G.L., Lee C.F., Ma Z.C., Chi Z.M. (2015). Taxonomy of *Aureobasidium spp.* and biosynthesis and regulation of their extracellular polymers. *Crit. Rev. Microbiol.* **41**:228–237.
3. Zan Z., Zou X. (2013). Efficient production of polymalic acid from raw sweet potato hydrolysate with immobilized cells of *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223 in aerobic fibrous bed bioreactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **88**(10):1822-1827.
4. Wei P., Cheng C., Lin M., Zhou Y., Yang S.T. (2017). Production of poly (malic acid) from sugarcane juice in fermentation by *Aureobasidium pullulans*: kinetics and process economics. *Bioresource Technology* **224**:581–589.
5. Miles A., Misra S., Irwin J. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology and Infection* **38**(6):732-749.
6. Liu S., Steinbüchel A. (1996). Investigation of poly(b-L- malic acid) production by strains of *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**:273-278.

7. Gostinčar C., Ohm R., Kogej T. (2014) Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species. *BMC Genomics* **15**:549