

Acción fermentativa de *Bacillus Subtilis* en la bioconversión de sustratos orgánicos

Fermentative action of Bacillus subtilis in the bioconversion of organic substrates

Jesús de Israel Rocafuerte Peña*
Instituto Tecnológico de Orizaba
Orizaba, Veracruz.
isrocafuerte@hotmail.com

Diana Ibeth Romero Mota
Instituto Tecnológico de Orizaba
Orizaba, Veracruz.
mrid_14@hotmail.com

Juan Manuel Méndez Contreras
Instituto Tecnológico de Orizaba
Orizaba, Veracruz.
jmendez@orizaba.tecnm.mx

Recibido 14, diciembre, 2021

Aceptado 22, abril, 2022

Resumen

De acuerdo con la Organización Internacional del Café, para el periodo de octubre de 2019 a septiembre de 2020 fueron producidos 168.9 millones de sacos de 60 kg de café en el mundo; de los cuales, México es acreedor del noveno lugar con una producción de 4.7 millones de sacos. Su producción genera grandes cantidades de residuos en la industria cafetalera. Estos mismos residuos pueden ser tomados para su bioconversión y, de esta manera aprovechar sus nutrientes para el cultivo y propagación de bacterias probióticas. La finalidad del presente trabajo fue llevar a cabo el proceso fermentativo a partir de residuos de café en presencia de *Bacillus subtilis* y así evaluar la producción de ácido láctico, el consumo del sustrato y la generación de biomasa, variando la concentración de inóculo transferido de la cepa *Bacillus subtilis* cepa QST 713.

Palabras clave: Residuos de café, fermentación, *Bacillus subtilis*.

Abstract

*According to the International Coffee Organization, for the period from October 2019 to September 2020, 168.9 million bags of 60 kg of coffee were produced in the world; Mexico is creditor of the ninth place with a production of 4.7 million bags of 60 kg. Its production generates large amounts of waste in the coffee industry. These same residues can be taken for bioconversion and therefore take advantage of their nutrients for the cultivation and propagation of probiotic bacteria. The purpose of this work was to carry out the fermentation process from coffee residues in the presence of *Bacillus subtilis* and thus evaluate the production of lactic acid, the consumption of the substrate and the generation of biomass, varying the concentration of inoculum transferred from the strain *Bacillus subtilis* strain QST 713.*

Keywords: *Coffee wastes, fermentation, Bacillus subtilis.*

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Internacional del Café (OIC, 2020), en el periodo que abarca entre octubre de 2019 y septiembre de 2020, se produjeron 168.9 millones de sacos de 60 kg de café a nivel mundial. El café es considerado como una de las bebidas más consumidas en el mundo, está compuesto de carbohidratos solubles, lípidos, polisacáridos insolubles, cafeína, componentes nitrogenados y minerales. Durante el proceso de extracción del grano de café se generan residuos, los cuales se consideran tóxicos y podrían dar origen a severos problemas ambientales. Más del 50% del peso total del café es considerado un residuo, el cual no posee ningún interés comercial. No obstante, los componentes hallados en los residuos podrían ser explotados para la producción de insumos y energía (Pérez-Sariñana y Saldaña-Trinidad, 2017).

Los residuos de café son de naturaleza orgánica, los cuales pueden ser transformados en productos con alto potencial alimenticio en dietas para animales (Ramírez N. et al., 2017).

Tomando en cuenta los nutrientes de los residuos de procesamiento de café, la fermentación anaerobia es considerada una alternativa para su tratamiento y, de esta manera, reducir o eliminar su impacto en contra del medio ambiente. Una alternativa para el tratamiento de estos residuos es la fermentación anaerobia, la cual es un proceso biológico encargado de la degradación de la materia orgánica en ausencia de oxígeno mediante la acción fermentativa de los microorganismos. Durante la fermentación son generados intermediarios de menor complejidad como etanol, ácido acético, 2-3-butanodiol, butanol, acetona y ácido láctico y, al mismo tiempo, son sintetizados otros como aminoácidos, enzimas, ácido cítrico y ácidos nucleicos (Okafor y Okeke, 2018).

Dichos mediadores en la degradación de residuos podrían ser los probióticos, los cuales se definen como cepas de microorganismos vivos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, influyen beneficiosamente en la salud del huésped mejorando la microbiota intestinal (Markowiak y Ślizewska, 2017). Los probióticos tienen la capacidad de digerir proteínas, carbohidratos y lípidos de los alimentos, lo cuales permiten la absorción de nutrientes como vitaminas, minerales y aminoácidos. Los probióticos son usados en varios tratamientos como la profilaxis de la diarrea asociada a antibióticos, enfermedades diarreicas agudas, control de la presión arterial, metabolismo de la lactosa, reducción del nivel sérico de colesterol, reducción en la incidencia en casos de cáncer y soporte de la microbiota vaginal (Puppala et al., 2018). En estudios recientes, *Bacillus subtilis* ha sido utilizado como aditivo probiótico en el ganado porcino y avícola (Medina-Saavedra et al., 2017).

Objetivos

- Caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente los residuos de café.
- Propagar la bacteria *Bacillus subtilis* en medio MRS.
- Cuantificar la producción de ácido láctico y el consumo del sustrato utilizando residuos de café mediante la acción fermentativa de *Bacillus subtilis*.
- Evaluar la generación de biomasa en el proceso fermentativo de *Bacillus subtilis* en residuos de café.

Marco teórico

El café es considerado uno de los productos más importantes a nivel mundial, teniendo en cuenta que cerca de 80 países de Latinoamérica, Asia y África lo cultivan (Peñaranda Gonzalez *et al.*, 2017). Durante la producción de café, la única parte que se utiliza es el grano, y todas las demás partes, conocidas como subproductos, se descartan y pueden contaminar el medio ambiente (Santos *et al.*, 2021). Por lo tanto, existe la necesidad de crear alternativas para la utilización de residuos como fuente de componentes químicos a fin de evitar la generación de sustancias nocivas que contaminen el suelo, el agua o el aire (Pérez-Sariñana y Saldaña-Trinidad, 2017). Los residuos provenientes del sector agrícola, como de la industria cafetalera, poseen características como su rentabilidad y abundancia, los cuales son fuente de carbono en la obtención de azúcares y otros productos químicos. Los residuos agrícolas se componen de celulosa (30-50%), hemicelulosa (20-40%) y lignina (15-25%). La celulosa y la hemicelulosa son considerados polisacáridos fermentables y, por lo tanto, pueden ser transformados en azúcares fermentables; sin embargo, la lignina es un compuesto fenólico no fermentable. La celulosa es el componente principal en la estructura de la pared celular de las plantas, y sus fibras se encuentran asociadas con la hemicelulosa que forman una gran red de polisacáridos y, que al mismo tiempo, tiene lignina incrustada (Tamariz-Angeles *et al.*, 2020).

Debido al incremento en la población y a la industrialización, numerosas cantidades de residuos provenientes de sector agrícola e industrial se originan en el procesamiento de alimentos. La agroindustria del café ha provocado la generación de residuos como la pulpa de café, el mucílago, el pergamino y la película plateada, los cuales dañan el medio ambiente debido a la degradabilidad de las moléculas orgánicas (Cho *et al.*, 2020).

Solo el 5% del peso seco del café es aprovechado en la preparación de la bebida, el resto representa el residuo. El procesamiento de café genera residuos, los cuales son tóxicos y causan graves problemas ambientales que tienen efectos adversos en los suelos, la biodiversidad, las fuentes hídricas y la sociedad (Fernández Cortés *et al.*, 2020).

Entre los procesos utilizados para la el tratamiento de residuos se encuentra la bioconversión, denominado como el proceso encargado de la conversión de residuos orgánicos que no poseen valor, en productos con alto valor agregado. Dichos residuos pueden ser restos de comida y de cosecha, y subproductos en el procesamiento de alimentos. El potencial del uso de residuos que provienen de actividades agrícolas, forestales e industriales, puede producir productos químicos de alta importancia como los monosacáridos, oligosacáridos, moléculas bioactivas, biocombustibles, celulosa y lignina (Cho *et al.*, 2020). La conversión de biomasa lignocelulósica proveniente de residuos agrícolas se ha convertido en una importante alternativa para cumplir con varios objetivos estratégicos en el mundo tales como combatir el cambio climático, la seguridad energética y el desenvolvimiento de la economía (Nanda *et al.*, 2015).

Mediante la fermentación anaerobia es posible degradar materia orgánica en ausencia de oxígeno mediada por un microorganismo como *Bacillus subtilis* (BS), del cual se han encontrado hallazgos como probiótico trayendo beneficios en la salud intestinal y en el bienestar del huésped que lo ingiere. Dichos beneficios podrían ser bajar el pH intestinal del huésped a través de la fermentación de ácido, estimular el sistema inmunológico asociado con el intestino, aumentar la capacidad antioxidante intestinal, y estimular los linfocitos intraepiteliales intestinales (Bai *et al.*, 2017).

MATERIALES O MÉTODOS

- Pretratamiento y caracterización del residuo

La obtención de la muestra se realizó en un beneficio cafetalero ubicado en la localidad de Potrero Nuevo, municipio de Atoyac, Veracruz, México. Se tomó muestra de los residuos de café (*Coffea arabica*), que consiste en pergamino seco, el cual fue obtenido al ser separado de la semilla después de haber sido secado al sol durante 5 a 7 días. De la muestra obtenida se retiró toda la materia extraña presente. El pergamino se preservó en un lugar seco y fresco. La muestra de pergamino fue pulverizada en un molino de café y después fue tamizada en una malla del número 50 (<0.297 mm). Se realizó una dilución 1:10 de pergamino en agua destilada, y posteriormente fue sometida a tratamiento térmico a 90 °C durante 30 minutos.

La caracterización física constó de la determinación de pH por el método potenciométrico, sólidos totales (ST) mediante 2540 B Standard Methods y sólidos totales volátiles (SV) por 2540 E Standard Methods. En cuanto a los parámetros químicos, se cuantificaron carbohidratos mediante el método antrona-sulfúrico, proteínas por método MicroKjeldahl y nitrógeno total por el método 4500-NTK C M. También se cuantificaron los coliformes fecales según el método de la NOM-004-SEMARNAT-2002.

- Propagación de *Bacillus subtilis*

Se adquirió el producto fungicida “SERENADE ASO”, fabricado por Bayer CropScience, que posee la bacteria *Bacillus subtilis* cepa QST 713 con un equivalente de 1×10^9 UFC (unidades formadoras de colonias) por gramo de producto y otros ingredientes inertes.

BS en primer lugar fue sembrado por estriado en cajas Petri con AN (agar nutritivo) en condiciones estériles, las cajas fueron almacenadas en una estufa de cultivo marca Felisa a temperatura de 36°C durante 72 horas. Para formar el inóculo a partir de las colonias que crecieron en AN, la bacteria fue propagada en un volumen de 20 mL de caldo MRS y fue puesto en agitación a 110 rpm (revoluciones por minuto) a 36 °C durante 72 horas. Con la finalidad de hacer un recuento en placa vertida, dado en UFC/mL, se realizaron diluciones en serie base 10 del cultivo de BS propagado en el caldo MRS.

- Proceso fermentativo

El experimento fue llevado a cabo en matraces ErlenMeyer de 250 mL con un volumen útil de 200 mL. Se utilizó una dilución 1:10 de pergamino como sustrato en el proceso fermentativo, variando el porcentaje de inóculo. La temperatura a la que se realizó el experimento fueron 36 °C con agitación en una incubadora modelo ZHWY-100B. Las cinéticas duraron 72 horas. Se sustrajo muestra por periodo de 4 h.

- Determinación de biomasa

Se centrifugaron 10 mL de muestra a 10000 rpm por 10 minutos, se retiró el líquido y se volvió a suspender los sólidos con agua destilada, se repitió el mismo procedimiento por segunda vez y se filtró el contenido en papel filtro (con peso previamente registrado al igual que el crisol contenedor a peso constante), se pusieron a secar a 95° durante 4 horas. El resultado fue dado en g/L.

- Determinación de ácido láctico

Se determinó la producción de ácido láctico mediante la metodología descrita en la NMX-F-716-COFOCALEC-2014 que consiste en la titulación de la muestra con NaOH 0.1 N.

RESULTADOS

- Caracterización del residuo

Se preparó una solución acuosa de pergamino en proporción 1:10. Los resultados de la caracterización fisicoquímica y microbiológica que se llevó a cabo en los residuos de café proveniente del beneficio cafetalero de la localidad de Potrero Nuevo, municipio de Atoyac en el Estado de Veracruz, son expuestos en la Tabla 1.

Tabla 1. Caracterización del pergamino crudo y tratado térmicamente (TT).

Físicos	Pergamino Crudo	Pergamino TT
pH	5.5	5.5
Sólidos Totales (% m/m)	8.16 ± 0.15	8.45 ± 0.14
Sólidos Totales Volátiles (% m/m)	88.18 ± 0.11	89.03 ± 0.44
Químicos		
Nitrógeno Total (%)	0.229	0.227
Carbohidratos (g/L)	26.28	26.55
Proteínas (%)	1.43	1.42
Microbiológicos		
Coliformes fecales (NMP/q ST)	2.4 × 103	6.1 × 102

NMP = Número más probable

- Proceso fermentativo

En la figura 1, se observa el efecto de la variación del inóculo transferido a 5, 10 y 15% del cultivo de BS en el consumo de carbohidratos y la producción de ácido láctico durante el proceso fermentativo del residuo de café. El mayor consumo de carbohidratos y generación de ácido láctico se encontraron al transferir 15% del inóculo de BS. Para esta cinética, la concentración de carbohidratos descendió de 27.12 g/L hasta 4.21 g/L y se generaron 4.75 g/L de ácido láctico.

Se encontró una variación de pH entre 4.5 y 5.5 a lo largo del proceso fermentativo.

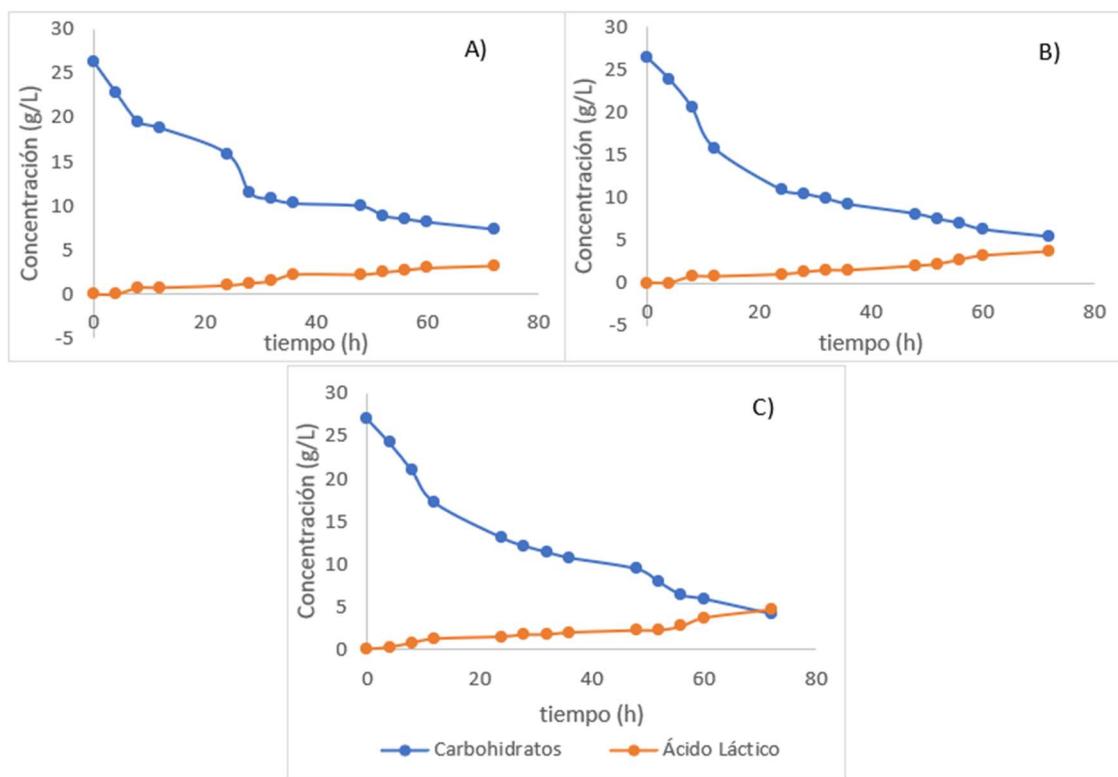


Figura 1. Cinéticas de consumo de carbohidratos y producción de ácido láctico utilizando *Bacillus subtilis* en pergамино de café. A) 5% inóculo, B) 10% inóculo, C) 15% inóculo

- Generación de biomasa

Las concentraciones finales obtenidas para el 5, 10 y 15% de inóculo en el proceso fermentativo fueron 2.26, 2.66 y 3.44 g/L, cuyos rendimientos en la generación de biomasa fueron 0.121, 0.143 y 185 g / L·g ST, respectivamente.

Discusión de resultados

El pH medido fue de 5.5 para la muestra del pergамино de café. Este pH medido se considerada óptimo para el cultivo de la bacteria BS, puesto que en un estudio de Jiménez-Delgadillo *et al.* (2018), establecieron que las condiciones óptimas para el desarrollo de *BS* fueron 28 °C y pH 5.

Como consecuencia del tratamiento térmico llevado a cabo a 90 °C durante 30 minutos, la muestra tratada obtuvo una gran diminución de la proliferación de coliformes fecales, lo cual da cumplimiento a las especificaciones mencionada de la NOM-004-SEMARNAT-2002 en un lodo de la clase A según el indicador bacteriológico de contaminación de los coliformes fecales, siendo este inferior a 1000 NMP/g ST.

En el proceso fermentativo, se mostró que, a mayor concentración de carbohidratos, mayor generación de ácido láctico.

Puesto que BS es considerada una bacteria heterofermentativa, la cual además de ácido láctico también produce CO₂, ácido acético y etanol (Okafor y Okeke, 2018), la variación en el pH durante las cinéticas no fue significativa.

La mayor generación de biomasa obtenida en este trabajo (3.44 g/L) es similar a la obtenida por Carrillo Inungaray *et al.* (2011), quienes reportan una concentración de 3.83 g/L de biomasa al utilizar pergamino de café como materia prima en el crecimiento de la levadura *Candida utilis* ATCC-9256.

CONCLUSIONES

Se llegó a la conclusión de que el pergamino de café es apto para ser utilizado en la propagación de BS, puesto que consiguió disminuir la concentración de carbohidratos desde 27.12 g/L hasta 4.21 g/L en el tratamiento llevado a cabo durante 72 horas con un 15% de inóculo transferido de BS. Se consiguió generar 4.75 g/L de ácido láctico durante el mismo proceso fermentativo. El probiótico *Bacillus subtilis* ha probado ser capaz de digerir carbohidratos, y también sintetizar ácido láctico. El ácido láctico posee un alto valor comercial y es usado como bactericida. La fermentación anaerobia posibilitó la degradación de residuos de café y, al mismo tiempo, generar productos con alto valor alimenticio. También, se logró genera una concentración de 3.44 g/L de biomasa.

REFERENCIAS

- Bai, K., Huang, Q., Zhang, J., He, J., Zhang, L., & Wang, T. (2017). Supplemental effects of probiotic *Bacillus subtilis* fmbJ on growth performance, antioxidant capacity, and meat quality of broiler chickens. *Poultry Science*, 96(1), 74–82. <https://doi.org/10.3382/ps/pew246>
- Carrillo Inungaray, M. L., Zavala Cuevas, D., Alvarado Sánchez, B., Morales Reyes, K. S., & Bautista Brígido, P. (2011). Obtención de biomasa a partir de cáscara de café. *Revista Académica de Investigación*, 6(January 2011), 1–13.
- Cho, E. J., Trinh, L. T. P., Song, Y., Lee, Y. G., & Bae, H. J. (2020). Bioconversion of biomass waste into high value chemicals. *Bioresource Technology*, 298, 122386. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122386>
- Fernández Cortés, Y., Sotto Rodríguez, K. D., & Vargas Marín, L. A. (2020). Environmental impacts from coffee production and to the sustainable use of the waste generated. *Producción y Limpia*, 15(1), 93–110. <https://doi.org/10.22507/PML.V15N1A7>
- Jiménez-Delgadillo, R., Valdés-Rodríguez, S. E., Olalde-Portugal, V., Abraham-Juárez, R., & García-Hernández, J. L. (2018). Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(2), 256–275. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-3>
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Medina-Saavedra, T., Herrera-Méndez, C., & Mexicano-Santoyo, L. (2017). *Bacillus subtilis* como probiótico en avicultura: aspectos relevantes en investigaciones recientes. *Abanico Veterinario*, 7(3), 14–20. <https://doi.org/10.21929/abavet2017.73.1>
- Nanda, S., Azargohar, R., Dalai, A. K., & Kozinski, J. A. (2015). An assessment on the sustainability of lignocellulosic biomass for biorefining. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 50, 925–941. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.058>
- OIC. (2020). Informe del mercado de Café Octubre 2020. In *Informe del mercado de Café*.
- Okafor, N., & Okeke, B. C. (2018). *Modern Industrial microbiology and Biotechnology*.
- Peñaranda Gonzalez, L. V., Montenegro Gómez, S. P., & Giraldo Abad, P. A. (2017). A provechamiento de residuos agroindustriales en Colombia Exploitation of agroindustrial waste in Colombia Exploração de resíduos agroindustriais na Colômbia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(2), 141–150.
- Pérez-Sariñana, B. Y., & Saldaña-Trinidad, S. (2017). Chemistry and Biotransformation of Coffee By-Products to Biofuels. In *The Question of Caffeine* (pp. 143–161). <https://doi.org/10.5772/intechopen.68598>
- Puppala, K. R., Ravi Kumar, V., Khire, J., & Dharne, M. (2018). Dephytinizing and Probiotic Potentials of *Saccharomyces cerevisiae* (NCIM 3662) Strain for Amelioration of Nutritional Quality of Functional Foods. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(2), 604–617. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9394-y>

- Ramírez N., V. M., Peñuela S., L. M., & Pérez R., M. D. R. (2017). Los residuos orgánicos como alternativa para la alimentación en porcinos. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(2), 107–124. <https://doi.org/10.22267/rcia.173402.76>
- Santos, É. M. dos, Macedo, L. M. de, Tundisi, L. L., Ataide, J. A., Camargo, G. A., Alves, R. C., Oliveira, M. B. P. P., & Mazzola, P. G. (2021). Coffee by-products in topical formulations: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 111(October 2020), 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.064>
- Tamariz-Angeles, C., Lázaro-Palomino, J., Olivera-Gonzales, Castañeda-Barreto, A., & Villena, G. K. (2020). Sección II : Industrial and Environmetal Biotechnology Article. *Revista Peruana de Biología*, 27(1), 67–78.