



Developing a culture medium suitable for the production of lactic acid bacteria from agro-industrial waste

Formulación de un medio de cultivo idóneo para la producción de bacterias acido lácticas a partir de desechos agroindustriales

Karla Yasmin Galindo-Rodríguez^{1*}, Guillermo Cruz-Nicolas¹

Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Ex-Hacienda San Juan Molino Carretera Estatal Tecuexcomac-Tepetitla Km 1.5, Tlaxcala C.P. 90700, México¹.

* kar_yas.gr14@hotmail.com

ABSTRACT

The importance of lactic acid bacteria (LAB) in the world, whether in food, necessary to optimize methods and develop a suitable environment for the growth of these microorganisms, using different substrates from agroindustrial wastes for development. Molasses, whey, mead and apple juice from cider production as a substrate of BAL (Pediococcus, Lactobacillus, Lactococcus) was used. Conditions and variables influencing microbial growth were evaluated. Four means of various growth for each of the aforementioned substrates from a MRS broth medium based modifying its carbon source were prepared. were inoculated with 10 strains BAL a media control (substrate only inoculated) and supplemented medium (substrate with the addition of mineral salts) at different concentrations of molasses, whey, mead and juice sterile cider adjusting its pH to 6.4 + - 0.2. Two variables were handled without agitation. Biomass production was determined using direct counting on MRS agar plate. The interpretation of results was performed from the count of CFU per mL according to the microbiological count. The optimal environment for the growth and biomass production of BAL medium mead was 12.3 ° Brix supplemented with mineral salts, in an agitated. Mead was concluded that can be used as substrate for the growth of LAB.

Key words: agro-industrial waste, biomass, LAB, mead, substrate, variables.

RESUMEN

Las bacterias acido lácticas (BAL), tienen gran importancia en la alimentación por lo que es necesario formular un medio adecuado para el crecimiento de dichos microorganismos, utilizando diferentes sustratos para su desarrollo a partir de desechos agroindustriales. Se

utilizó melaza de caña, suero de leche, aguamiel y jugo de manzana proveniente de la producción de sidra como sustrato para las BAL (*pediococcus*, *lactobacillus*, *lactococcus*). Se evaluaron condiciones y variables que influyen en el crecimiento. Se prepararon cuatro medios diferentes por cada uno de los sustratos antes mencionados a partir de un medio comercial MRS modificando su fuente de carbono. Se inocularon con 10 cepas de BAL, un medio control (sustrato solo inoculado) y medio suplementado (sustrato con la adición de sales minerales) a diferentes concentraciones de melaza, suero, aguamiel y jugo de sidra ajustando su pH a 6.4+- 0.2. Se manejaron dos variables con y sin agitación, La producción de biomasa se determinó por conteo de UFC. El medio óptimo para el crecimiento o producción de biomasa de BAL fue el medio de aguamiel a 12.3 °Brix suplementado con sales minerales, en estado agitado. Se concluyó que el aguamiel puede ser utilizado como sustrato para el crecimiento de las BAL.

Palabras clave: Aguamiel, BAL, biomasa, desechos agroindustriales, sustrato, variables.

1. INTRODUCCION

1.1 BAL

Las bacterias ácido lácticas, son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos no esporulados, anaeróbicos o aerotolerantes, oxidasa, catalasa y benzidina negativas, y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr & Chill 2002; Vázquez *et al.*, 2009).

La leche es el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL (Vázquez *et al.*, 2009).

Medios para promover el crecimiento de las BAL son: desechos agroindustriales como melazas, bagazos, sueros de la industria láctea, cárnicos y desechos vegetales. Se han estudiado diferentes fuentes de carbono para la producción de biomasa, tales como la harina de maíz, harina de avena, cebada, arroz, yuca, azúcar, melaza, suero de leche; entre los distintos organismos productores de ácido láctico, se encuentran : *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* (Vinodh *et al.*, 2011).

La melaza es un subproducto de las industrias de la caña de azúcar y el azúcar de remolacha y tiene una materia seca (MS) de contenido de 700 a 750 g / kg y un contenido de carbohidratos solubles de aproximadamente 650 g / kg MS, de la que la sacarosa es el componente principal.

Muchos investigadores informaron que la adición de melaza podría estimular la fermentación mediante el suministro de sustratos para el crecimiento de las BAL. Durante el ensilado, las LAB han sido utilizados como aditivos para aumentar la preservación del valor nutritivo de los forrajes mediante la reducción de respiración de la planta y la actividad enzimática y mediante la inhibición de las poblaciones microbianas (Xianjun *et al.*, 2015)

1.1.1 Caña de azúcar

La caña de azúcar es una gramínea tropical, un pasto gigante emparentado con el sorgo y el maíz, en cuyo tallo se forma y acumula jugo de sacarosa, compuesto que al ser extraído y cristalizado forma el azúcar (Fajardo & Sarmiento 2007).

La miel o también llamada melaza es un subproducto de la caña de azúcar, este es un líquido denso y viscoso de color oscuro, es un producto final de la fabricación o refinación de la sacarosa procedente de la caña de azúcar. Este subproducto se usa para alimentos concentrados para animales y como suplemento alimenticio para el hombre (Fajardo *et al.*, 2007).

La melaza es una mezcla compleja que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles en álcali que normalmente están presentes en el jugo de la caña localizado, así como los formados durante el proceso de manufactura de azúcar. Además de la sacarosa, glucosa, fructosa y rafinosa los cuales son fermentables, las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables (Fajardo *et al.*, 2007).

1.1.2 Suero de leche

El suero es el líquido remanente de la coagulación de la leche durante la elaboración de quesos. Se obtiene tras la separación de proteínas (caseínas) y de la grasa. El suero constituye aproximadamente el 90% del volumen de la leche y contiene la mayor parte de sus componentes solubles en agua: carbohidratos, minerales, vitaminas hidrosolubles y proteínas solubles.

1.1.3 Aguamiel

El aguamiel es un líquido dulce (7 a 14° Baumé), éste puede ser ácido o ligeramente alcalino, incoloro y transparente. Posee un ligero olor herbáceo y contiene diversos minerales, además de ser rico en carbohidratos y proteínas.

El contenido de sacarosa en el jugo de la planta adulta (penca o piña) es apreciable y por tanto, se trata de un substrato que puede ser empleado como materia prima en la industria de la fermentación, para la obtención de proteína de levadura; obtención de vitaminas mediante microorganismos; obtención de dextrans para uso alimenticio o clínico; mieles y jarabes de fructosa y producción de ácidos orgánicos mediante microorganismos

1.1.4 Jugo de sidra

La sidra natural es una bebida alcohólica resultante de la fermentación total o parcial del mosto de manzanas.

Es una fermentación espontánea, se utiliza la microbiota indígena presente en el medio líquido para realizar la doble fermentación necesaria a la hora de obtener la sidra: la fermentación alcohólica o tumultuosa, realizada por levaduras del género *Saccharomyces*, y la fermentación maloláctica o lenta, realizada por bacterias lácticas.

La manzana presenta varias características nutricionales importantes, especialmente en la cascara. Con esta fruta se elaboran varios productos tales como: mermeladas, pasteles; de la fermentación de su jugo de obtiene la sidra (Sánchez, 2004).

Dentro de los principales componentes presentes en la manzana están los azúcares comunes, es su mayor parte fructosa, que al ser consumidos constituyen un elemento energético para el organismo. También se encuentran diversos ácidos, entre los principales: el ácido tartárico, el ácido cítrico y el ácido málico. En su composición están presentes flavonoides y quercitina que actúan como antioxidantes (Torres, 1980).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Activación de BAL

Las BAL aisladas y caracterizadas (Bárcenas, 2014) se activaron en agar MRS (DIFCO). 10 cepas se inocularon en caldo MRS para producción de biomasa (Ossa *et al.*, 2010).

2.2 Producción de biomasa

La producción de biomasa se hizo a partir de 10 cepas de BAL seleccionadas previamente, mediante una fermentación en caldo MRS, durante 5 días en agitación constante a 130 rpm, a 30 °C.

La fermentación resultante se centrifugó a 10000 rpm, y el pellet obtenido se re suspendió en glicerol al 30 % v/v y se mantiene a 4°C para su conservación.

2.3 Medios modificados con melaza, suero de leche, aguamiel y jugo de sidra

A partir de la biomasa obtenida de las 10 cepas de BAL, estas se inocularon en medio MRS modificando su fuente de carbono con desechos de la industria alimentaria como es el caso de la melaza y el suero de leche, así como sustratos como aguamiel y jugo de sidra. Se tienen medios modificados y medio control en los cuales solo se utilizan los sustratos y desechos.

Estos se mantuvieron en agitación y en estado estático, durante 5 días a 30 °C, la inoculación de cada cepa fue de 1000000 células formando un consorcio de las 10 cepas Ossa *et al.*, 2010).

2.4 Cuantificación por UFC

La cuantificación de la producción de biomasa se realiza a partir de UFC mediante una serie de diluciones directamente de la fermentación, las pruebas se realizaron por triplicado Ossa *et al.*, 2010).

2.5 Datos experimentales

Los datos experimentales de UFC se graficaron usando el programa Excel.

3. RESULTADOS

La producción de biomasa se cuantificó mediante UFC a partir de la fermentación realizada por los medios modificados de melaza, suero de leche, aguamiel y jugo de sidra como un medio adicionado con sales minerales y medio control (sin adición de sales minerales).

Estos medios en estática o agitada. (Tabla 1), mostrando las mejores concentraciones y condiciones de fermentación (fig.1).

El aguamiel tiene mayor producción de biomasa en comparación con los medios que se utilizaron como melaza, suero y jugo de sidra, en UFC/ml.

Tabla 1. Los mejores resultados se resumen a continuación en base a el uso de sustratos como fuentes de carbono, concentración, adición y sin adición de sales, con y sin agitación para la producción de BAL.

| MEDIO | ° BRIX | PRUEBA | UFC 10-6/mL |
|----------|------------|-------------------------|-------------|
| MELAZA | 5° Brix | CONTROL (SIN SALES M A) | 1770 |
| SUERO | 3.3° Brix | C/SALES M A | 1216.6 |
| AGUAMIEL | 12.3° Brix | C/SALES M A | 6113.3 |
| SIDRA | 5° Brix | C/SALES M A | 1207.5 |

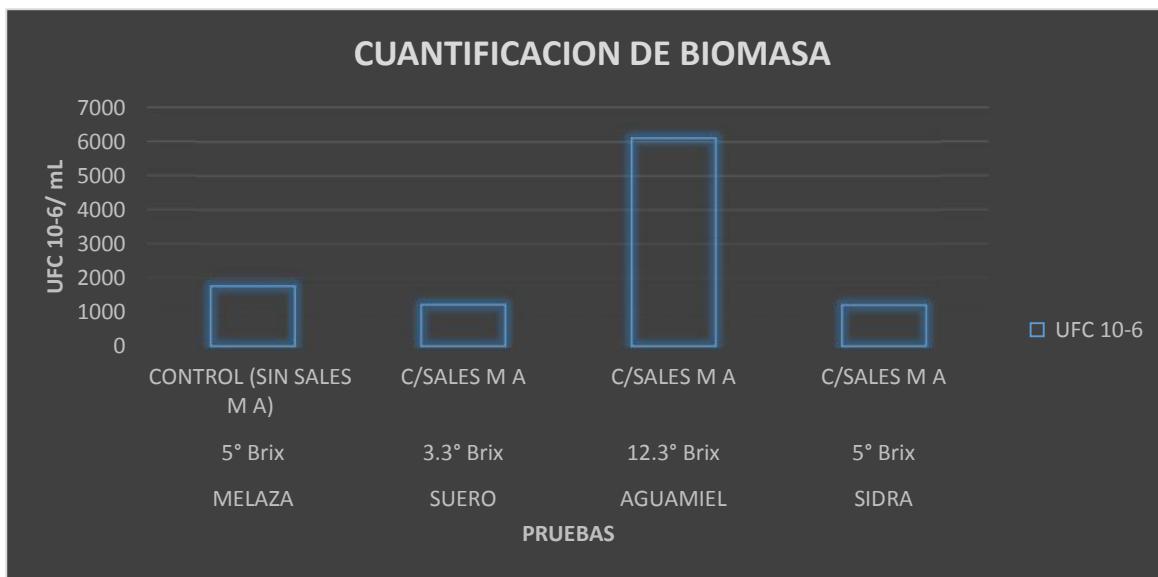


Figura 1. Cuantificación de la producción de biomasa a partir de medios modificados en sus fuentes de carbono.

4. DISCUSIONES

La adición de melaza podría estimular la fermentación mediante el suministro de sustratos para el crecimiento de las BAL. Durante el ensilado, las LAB han sido utilizados como aditivos para aumentar la preservación del valor nutritivo de los forrajes mediante la reducción de respiración de la planta y la actividad enzimática y mediante la inhibición de las poblaciones microbianas (Xianjun *et al.*, 2015).

Los resultados observados del aguamiel en combinación con sales minerales propias del medio MRS, representa un medio de crecimiento óptimo para las BAL.

Se sabe que los *Lactobacillus sp.*, *Lactobacillus casei* y la melaza son usados como los agentes más eficientes y recomendables para la producción de biomasa. (Spanopoulos *et al.* 2010).

En el caso de la melaza las pruebas realizadas por Ossa (2010) en las que utilizó diferentes concentraciones, y su óptima fue a 20% obteniendo un recuento de 4.3×10^9 UFC/mL, en *lactobacillus plantarum*. En nuestro estudio la concentración óptima de 5% obteniendo un recuento de 1.77×10^{10} UFC/mL, en consorcio de BAL, nos permite observar que a una menor concentración de biomasa se tiene un 75% más de producción de biomasa que a una concentración mayor.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la secretaría de economía y la compañía NUTEK en conjunto con CONACYT.

CONFLICTO DE INTERESES

No existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Bárcenas A. 2014. Caracterización de bacterias productoras de ácidos orgánicos en maíz forrajero. *Título de tesis para recibir el grado de maestra en ciencias.* pp. 15-30.
- Carr, F., Chill,D. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 4, pp. 281-300.
- Fajardo E. Sarmiento S. C. 2007. Evaluacion de melaza de caña como sustrato para la produccion de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis para la obtencion de grado de microbiologo industrial. Bogota D.C. *Facultad de ciencias.* pp: 22-26.
- Sanchez P. 2004. Procesos de conservacion poscosecha de productos vegetales. *AMV ediciones.* Madrid, España. pp. 65-67.
- Torres M. 1980. Procesamiento de frutas citricas: Almacenamiento y obtencion de jugo de manzana. Quito, Ecuador. pp 1-16.
- Vázquez, S., Suárez, H. y Zapata,S. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 1, pp. 64-71.
- Vinodh A. Edward, Melanie Huch, Carine Dortu, Philippe Thonart, Moutairou Egounlety, Petrus J. Van Zyl, Suren Singh, Wilhelm H. Holzapfel, Charles M.A.P. Franz. 2011. Biomass production and small-scale testing of freeze-dried lactic acid bacteria starter strains for cassava fermentations. *Food Control*, pp. 389-395.
- Xianjun Y., Gang G., AiYou W., Seare TD, Jian W., Yong W., Tao S. 2015. El efecto de diferentes aditivos en la calidad de la fermentación, en la digestibilidad in vitro y la estabilidad aeróbica del ensilaje. *Alimentación animal Ciencia y Tecnología.* pp. 41-44