

CRECIMIENTO DE CEPAS PROBIÓTICAS EN RESIDUALES INDUSTRIALES LÍQUIDOS

Matilde Anaya^{1*}, Mariannys Chávez², Hilda Cobo¹, Oxalis Rodríguez¹, Aniely M' Boumba¹, Randolph Delgado³, Guillermo Barreto⁴, Arcadio Sotolongo⁵

¹Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Carretera al Guatao km 3½, La Habana, Cuba, CP 19200.

²Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

³Centro de Investigaciones de Bioalimentos. Carretera a Patria km 1½, Morón, Ciego de Ávila, Cuba.

⁴Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria. Universidad de Camagüey, Cuba.

⁵Facultad de Química. Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echeverría". Calle 114, e/ Ciclovía y Rotonda, La Habana, Cuba.

E-mail: mavillal@iia.edu.cu, matildea@quimica.cujae.edu.cu

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de cepas probióticas en residuales industriales líquidos. Se emplearon las cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* y *Kluyveromyces fragilis* en suero de leche de vaca, búfala y cabra así como *Saccharomyces cerevisiae* var. bouldardii P-1 y P-2 en vinaza, melaza A y melaza B con y sin adición de urea a diferentes concentraciones. Se realizó la fermentación sin aireación de 500 mL de cada sustrato. Las variables de respuesta fueron: concentración celular viable, pH y concentración de alcohol por poder fermentativo y densimetría digital. Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) del crecimiento celular entre las cepas según el sustrato evaluado entre 8 y 10 h de fermentación. Entre las cepas capaces de degradar la lactosa, *L. acidophilus* tuvo mayor crecimiento en suero de leche de cabra (log 7,3 ufc/mL) que *K. fragilis* (log 6,8 ufc/mL) y *S. cerevisiae* P-1 superó a *S. cerevisiae* P-2 en melaza B sin urea. La adición de este nutriente aumentó la productividad de biomasa de P-1 (log 8,6 ufc/mL) con producción máxima de alcohol de 3,2 % v/v en 4 h al adicionar 0,15 % de urea. Se concluye que pueden aprovecharse estos residuales para obtener biomasa probiótica con valores en el rango establecido para su uso como alimento funcional.

Palabras clave: *Lactobacillus*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, suero de leche, melaza, vinaza, alimento funcional.

***Matilde Anaya Villalpanda:** Ingeniera Química (Cujae, 2007), Máster en Ingeniería de Alimentos (Cujae, 2012) y opta por el Grado de Doctor en Ciencias Técnicas mención Medio Ambiente. Labora en la conservación de cepas de hongos, levaduras y bacterias ácido-lácticas y su uso en fermentaciones de

ABSTRACT

Growth of probiotic strains on industrial liquid wastes

The objective of this work was to evaluate the growth of probiotic stumps on industrial liquid wastes. Probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* and *Kluyveromyces fragilis* in cow, buffalo and goat milk whey as well as *Saccharomyces cerevisiae* var. bouldardii P-1 and P-2 in distillery wastes, molasses A and molasses B with and without addition of different urea concentrations were used. The fermentation was carried out without aeration of 500 mL of each substrate. The response variables were: viable cellular concentration, pH and alcohol concentration by fermentative capacity and digital densimetry. Significant differences ($p \leq 0.05$) of the cellular growth were found among the strains according to the evaluated substrate between 8 and 10 hours of fermentation. Among the strains able to degrade the lactose, *L. acidophilus* had greater growth in goat milk whey (log 7.3 cfu/mL) that *K. fragilis* (log 6.8 cfu /mL) and *S. cerevisiae* P-1 highlighted *S. cerevisiae* P-2 in molasses B without urea. The addition of this nutrient increased the productivity of biomass of P-1 (log 8.6 cfu/mL) with maximum alcohol production of 3.2 % v/v in 4 hours when adding 0.15 % of urea. It was concluded that these residuals could be used to obtain probiotic biomass with values in the established range to use as functional food.

Keywords: *Lactobacillus*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, milk whey, molasses, distillery wastes, functional food.

INTRODUCCIÓN

La inseguridad alimentaria que prevalece a nivel mundial hace imprescindible la necesidad de elevar los índices de productividad y eficiencia. Los subproductos agroindustriales y los residuos de cosechas representan en los países agrícolas una fuente importante de alimento y en la mayoría de los casos, por falta de conocimiento y voluntad técnica, no se aprovechan de manera adecuada (1). Estos constituyen sustratos para los microorganismos de interés, como los probióticos, ya que son una fuente de prebióticos (2) en forma de oligosacáridos no digeribles (NODs) como inulina, lactulosa, ácidos grasos volátiles, fructoligosacáridos (FOS), galactoligosacáridos (GOS) (3). Su uso permitiría disminuir los costos de los procesos fermentativos por empleo de materia prima barata y aumento de la conversión del sustrato en biomasa probiótica que constituye un alimento funcional (4, 5).

El uso de microorganismos probióticos es antiguo, pero solo recientemente se revelan los mecanismos por los cuales ejercen efectos beneficiosos en la salud y alivian variadas patologías (4). Este es un grupo amplio de aditivos que incluye cultivos de bacterias, hongos, o incluso esporas fúngicas. Dentro de las bacterias, la mayoría de las utilizadas pertenece a las especies *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bacillus*, y entre los hongos destacan *Aspergillus oryzae* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (2). La OMS define los probióticos como "organismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador" (5).

El estudio del crecimiento de *L. acidophilus*, *L. casei* y el cocultivo con ambas cepas en suero de leche de vaca reflejó que es un medio favorable para el crecimiento de estos microorganismos (6). Estos resultados con *L. casei* en suero de vaca fueron similares a los de otros autores cuando además se comparó con jugo de naranja dulce y agua de coco (7) y con suero de leche de cabra (8).

Por tal motivo, el objetivo del siguiente trabajo fue evaluar el crecimiento de cepas probióticas en residuales industriales líquidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las cepas de microorganismos probióticos empleadas en este estudio pertenecen al cepario del Instituto de Investigaciones de la Industria Alimenticia. Entre las

bacterias ácido lácticas con características probióticas se seleccionó *Lactobacillus acidophilus* porque mostró el mayor crecimiento en el suero de leche de vaca (6) y de entre las levaduras se seleccionó *Kluyveromyces fragilis* por su capacidad de fermentar la lactosa, así como dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* P-1 y P-2 (no fermentan lactosa) por la alta resistencia a antibióticos de referencia.

El suero se obtuvo de la primera extracción de la leche fresca de vaca, búfala y cabra para la obtención de queso. Su composición fue 4,2 a 5,3 % de lactosa y 0,8 a 1,2 % de proteína. Las melazas tuvieron valores promedio de 53,03 %, 46,53 % y 6,48 % de azúcares totales, fermentables y no fermentables, respectivamente con 22,78 % de reductores libres. Los sueros (para *L. acidophilus* y *K. fragilis*) y la vinaza se emplearon sin diluir y la melaza se diluyó a 12 °Bx para *S. cerevisiae* P-1 y P-2.

Las cepas de bacteria y de levaduras se activaron en 15 mL de leche descremada en polvo (LDP) reconstituida al 10 % y de Caldo Extracto de Malta (Biocen, Cuba), respectivamente. Estos medios de cultivo se esterilizaron a 121 °C por 15 min y después de inoculados se incubaron a 32 °C por 24 h. Posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL de cada uno para inocular 15 mL de los sustratos mencionados para la propagación en proporción 1:3 hasta lograr 500 mL en frascos Erlenmeyer en condiciones estáticas y sin incorporación de aire.

Se siguió la cinética de crecimiento durante 12 h, tomando 0,1 mL de muestra de las diluciones seriadas en agua peptonada para realizar el conteo de células viables en placas de Petri que contenían agar para conteo en placa con 1 % de LDP al 10 % (9) para los microorganismos fermentadores de lactosa y agar extracto de malta para las cepas *S. cerevisiae* (10, 11). El conteo celular se expresó como el logaritmo natural de los resultados obtenidos en potencia de base 10.

Simultáneamente se realizó la determinación de la acidez por potenciometría con un medidor de pH y la producción de alcohol por la técnica de poder fermentativo (12). Para esto se ajustó el conteo celular a 20×10^6 células/mL a partir del conteo inicial

obtenido en la cámara de *Neubauer*, con un microscopio óptico (Olimpus, Alemania) y la lectura a 40x. Se emplearon las ecuaciones siguientes:

$$\text{Conteo celular ajustado} = 20 \times 10^6 \left(\frac{\text{volumen a fermentar}}{\text{conteo celular inicial}} \right)$$

$$\text{Alcohol producido} = (1,3 \times P \times 100) / V$$

Donde: 1,3 (Conversión de CO₂ desprendido a alcohol producido (v/v); P = Pi - Pf (peso inicial - peso final) y V: volumen a fermentar (mL).

Se terminó el experimento cuando se observó la disminución del conteo celular y para el caso de las cepas *S. cerevisiae* al final se determinó el contenido de alcohol (13) con un densímetro digital.

El análisis estadístico de los datos se hizo con el programa *Statgraphics Centurion XV*, mediante análisis de varianza y rangos múltiples por método de mínima diferencia significativa de Fisher.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Fig. 1 puede observarse el comportamiento de cada cepa probiótica en el sustrato correspondiente que superó Log 7 ufc/mL aceptado como terapéutico (5). Los resultados tuvieron una distribución normal y no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). En sentido general, el suero de leche de cabra y la melaza B (Fig. 1 a y c) fueron los sustratos que posibilitaron el mayor crecimiento de las cepas probióticas estudiadas siendo *L. acidophilus* y *S. cerevisiae* P-1 las que tuvieron mayor concentración celular (Fig. 1 b y d).

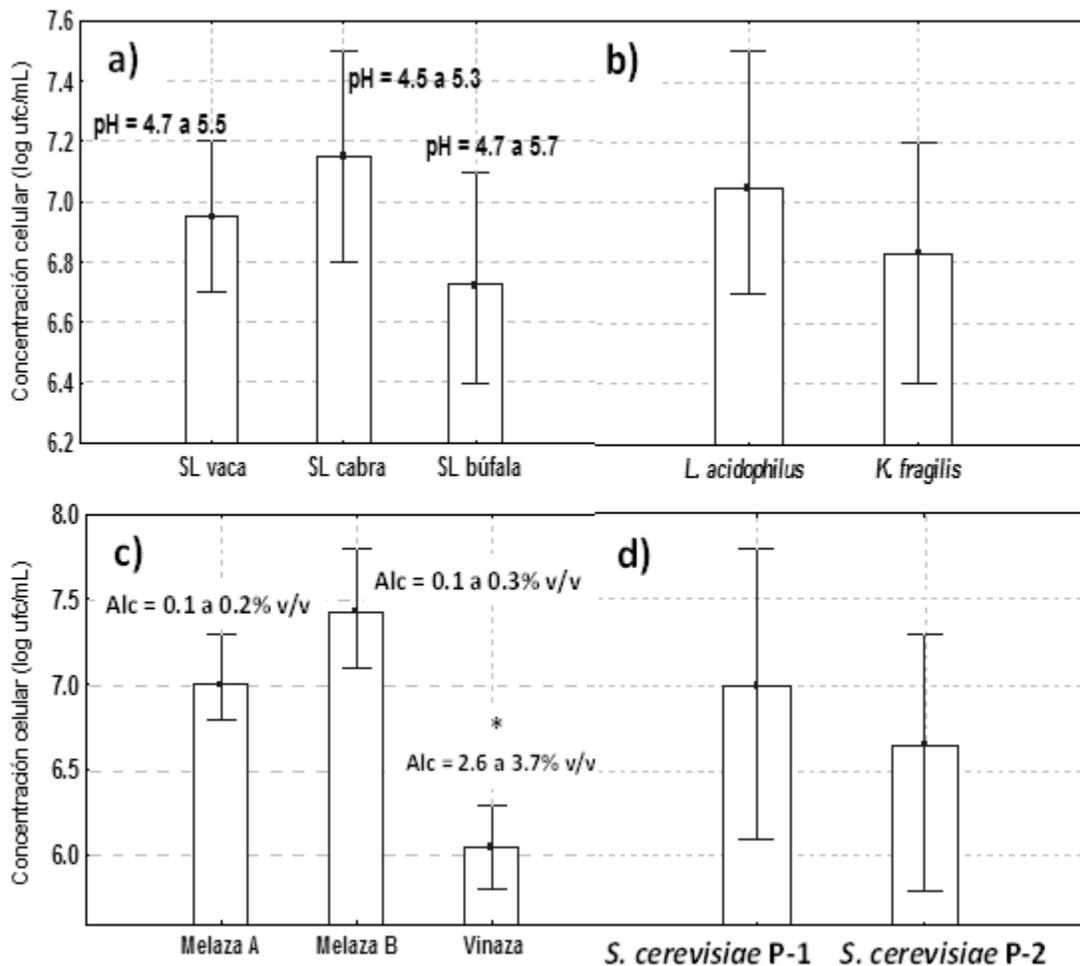


Fig. 1. Concentración celular de cepas probióticas en diferentes sustratos. Crecimiento entre 8 y 10 h después de inoculadas. Promedio para n=3. *Alcohol inicial en la vinaza; SL: suero de leche, melaza a 12 °Bx y pH al final del proceso.

Entre las cepas fermentadoras de lactosa, *L. acidophilus* tuvo mayor crecimiento (log 7,3 ufc/mL) en suero de leche de cabra que *K. fragilis* (log 6,8 ufc/mL), lo que justifica la mayor producción de ácidos orgánicos atendiendo a los valores de pH (4,5 y 5,3; respectivamente). Para el tiempo evaluado (8 a 10 h) la acidez producida por la bacteria ácido láctica (BAL) en los tres sueros estudiados estuvo en un rango de pH similar al informado solo para suero de leche de vaca en 12 h (6) lo que indica que este es el comportamiento característico de dicha cepa. Se plantea que las BAL desdoblan la lactosa en galactosa y glucosa la cual metabolizan para producir biomasa excretando ácido láctico que finalmente afecta su crecimiento aunque haya sustrato disponible (7).

De las dos especies de *S. cerevisiae* la cepa P-1 tuvo mayor crecimiento (log 7,3 y 7,8 ufc/mL) que P-2 (log 6,9 y 7,1 ufc/mL) en melaza A y B, respectivamente. Consecuente con esto, P-1 produce mayor cantidad de alcohol (0,2 a 0,3 % v/v) que P-2 (0,1 % v/v).

En el tiempo evaluado el crecimiento en vinaza fue menor para ambas cepas lo cual pudiera explicarse por el contenido de alcohol inicial presente en el sustrato (2,6 a 3,7 % v/v) que pudiera afectar el metabolismo celular indicando que no son resistentes al estrés provocado por el alcohol inicial o a otras sustancias que pudieran estar presentes en mayor concentración después de la destilación del mosto fermentado. Esta explicación se sustenta en resultados similares en melaza a 12 °Bx con una cepa de levadura *S. sake* resistente al alcohol (2,6 % v/v) producido en 12 h (14).

En este sentido, el comportamiento de los metabolitos de interés (formación de ácidos orgánicos y alcohol) al final del proceso implica que deben monitorearse simultáneamente con el crecimiento celular. La concentración de alcohol tuvo mayor significación sobre este parámetro. Por tanto, se analizó la cinética de crecimiento de la cepa P-1 con diferentes concentraciones de urea (Fig. 2).

En melaza A entre 2 y 4 h el crecimiento celular no aumentó considerablemente en todas las proporciones de urea, aparejado de un pico máximo de alcohol entre 3 y 4 h que también se detectó en melaza B donde el crecimiento ocurrió de forma moderada. En ese tiempo en dicho sustrato hubo un solapamiento de las curvas

de alcohol que indican la correcta asimilación de la urea por la levadura (máx. log 7,59 ufc/mL) con un valor máximo de este metabolito (2,8 % v/v) para 0,2 % de urea. Sin embargo, en melaza A se obtuvo mayor concentración celular (log 8,36 ufc/mL) para un contenido de alcohol máximo de 2,3 % v/v similar que acumulado no excede 3,5 % v/v. Esto puede deberse a que desde el comienzo del proceso, dicho nutriente estimula el metabolismo celular desviándolo hacia la fermentación alcohólica en detrimento de la formación de biomasa.

Es decir, la melaza A fue más adecuada que la melaza B para obtener biomasa de la cepa P-1, contrario al comportamiento sin urea (control) que ilustra la Fig. 1. Sin el empleo de este nutriente se obtuvo log 7 ufc/mL en 8 h (Fig. 1) y al añadirlo se logró log 8,36 ufc/mL en 2 h. Por tanto, la adición de urea aumentó la productividad de biomasa probiótica.

CONCLUSIONES

Estos residuales industriales pueden emplearse para obtener biomasa probiótica en fermentación estática sin aireación, lo cual no afecta su crecimiento característico.

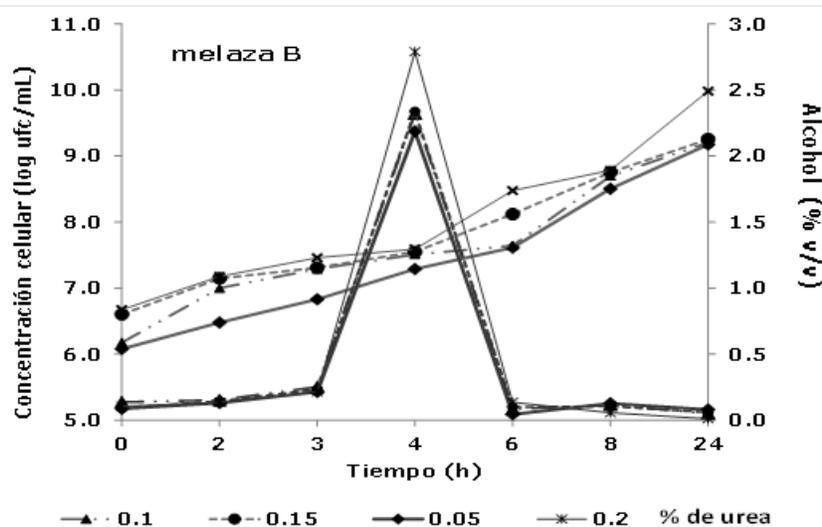
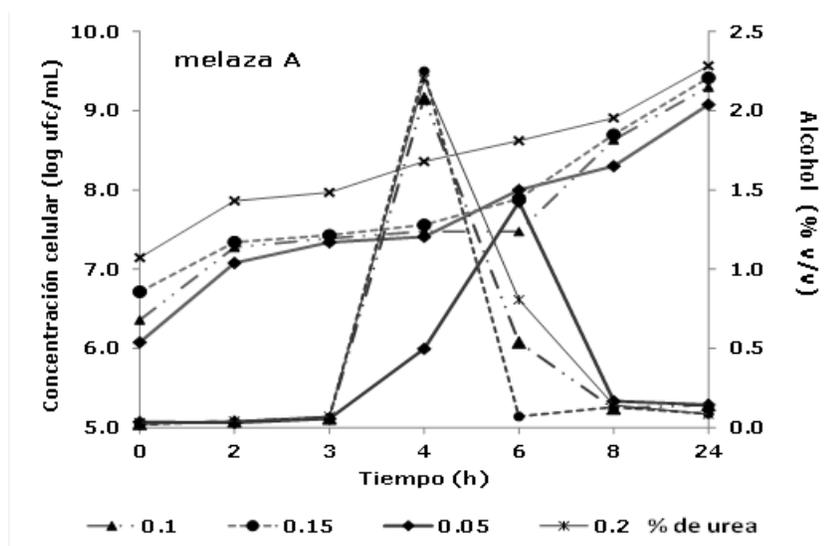


Fig. 2. Cinética de crecimiento y producción de alcohol de la levadura *S. cerevisiae* var. *bouardii* P-1 en melaza a 12 °Bx con urea a diferentes concentraciones.

REFERENCIAS

- Ojeda, F.; Cáceres, O. *Pastos y Forrajes* 25 (1):21-30, 2002.
- Mason, P. *Pharm. J.* 4:115-118, 2001.
- Castañeda, C. y del Monte, A. *Prebióticos. Obtención y Repercusión en la Salud*, Ambato, Universidad Regional Autónoma de los Andes, 2014, pp. 159.
- Biricik, H. y Türkmen, I.I. *J. Fac. Vet. Med.* 20:29, 2001.
- World Health Organization (WHO). *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria* [en línea]. Consultado 15 junio 2015 en http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf

6. Rodríguez, O.; Perea, J.; Cortada, A.; Padrón, I.; Fernández, M. y Núñez de Villavicencio, M. *Cienc. Technol. Alim.* 21(1):8-12, 2011.
7. Jiménez, R.; González, N.; Magaña, A.; Chab, C.L. y Zetina, Z.K. Crecimiento de biomasa probiótica en sustratos naturales. En: *Semana de Divulgación y Video Científico*, Tabasco, 2008, pp. 864-869.
8. Aguirre, E.J.; Ramírez, A.; Aguilar, J.M. y Álvarez, M.M. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 8(1):67-76, 2009.
9. NRIAL 065: *Iniciadores lácticos. Métodos de ensayo*. Cuba, 2008.
10. NC ISO 4833: *Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de microorganismos. Técnica de placa vertida a 30 °C*. Cuba, 2002.
11. NC ISO 7954: *Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de levaduras y mohos. Técnica de placa vertida a 25 °C*. Cuba, 2002.
12. Abad, E. *Selección de levaduras autóctonas para la elaboración de vinos tintos para bodegas y Viñedos de Trujillo S.L*, Madrid, Universidad Politécnica de Madrid, 2006. P. 59-60.
13. NC- 290. *Bebidas alcohólicas. Determinación del grado alcohólico*. Cuba, 2007.
14. Anaya, M.; Guzmán, T.; Vivar, A.; Cobo, H. y Acea, C. *Tsafiqui* 4(4):21-27, 2013.