

Evaluación de melaza como medio de cultivo para la producción de bacterias ácido-lácticas

Evaluation of molasses as a culture medium for the production of lactic acid bacteria

Cárdenas C, Laura Marcela*; Gómez S, Javier Andrés* ,Arenas A, Mateol y Serna-Jiménez, Johanna**.

*Estudiante del Programa de Ingeniería Agroindustrial

** Docente Programa de Ingeniería Agroindustrial

Resumen

Los bioprocesos son aquellos procesos que involucran la manipulación de organismos vivos o sus componentes celulares como sustratos, con el fin de obtener una biomasa o producto para proveer bienes o servicios, por ejemplo, el uso de bacterias ácido lácticas en biopreservación, por esto se propuso como objetivo producir bacterias ácido lácticas en un biorreactor aerobio a través de una fuente de carbono convencional como la melaza y comprobar el desarrollo del microorganismo como biomasa, para realizar esto se realizó en dos diferentes birreactores con volúmenes de 7,5L y 0,5L utilizando el mismo sustrato e inóculo, evaluando variables químicas como lo son el pH, acidez, °Brix, azúcares reductores y absorbancia. Los resultados mostraron un correcto desarrollo del metabolismo de la bacteria ácido láctica observando una acidificación del medio evidenciándose en la disminución del pH y el aumento de la acidez titulable, mostrando también una disminución en los azúcares reductores; interpretando esto, como el consumo de la fuente de carbono del microorganismo y la realización de un proceso fermentativo y verificando un crecimiento de la biomasa a través de las unidades de absorbancia y el peso de la biomasa producida, concluyendo que hubo un correcto desarrollo de la bacteria ácido láctica, demostrando que la melaza es una fuente de carbono y medio de cultivo apto para la producción de esta bacteria.

Palabras clave: Acidificación, biomasa, biorreactor, pH, fuente de carbono.

Abstract

Bioprocesses are those processes that involve the manipulation of living organisms or their cellular components as substrates in order to obtain a biomass or product to provide goods or services as an example, the use of bacteria acid lactic acid in biopreservacion, this was proposed as target bacteria produce acid lactic acid in an aerobic bioreactor through a conventional molasses as carbon source and check the development of the micro-organism as biomass, to accomplish this was carried out in two different twinjet

Recibido: 20/01/2018

Revisado: 17/03/2018

Aceptado: 10/12/2018

Correspondencia de autor:
sernajimjohanna@miugca.
edu.co

© 2018 Universidad La Gran Colombia. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el autor original y la fuente se acrediten.

Cómo citar:

Cardenas, L.M., Gómez, J.A., Arenas, M., Serna-Jiménez, J. (2018) Evaluación de melaza como medio de cultivo para la producción de bacterias ácido-lácticas. *UGciencia* 23, 17-22.



with volumes of 7, 5L, 0, 5 L using the same substrate and inoculum I, evaluating chemical variables such as pH, acidity, °brix, reducing sugars and absorbance . The results show a correct development of the bacteria metabolism lactic acid observing one acidification of the environment demonstrating in the pH decrease and increase of titrable acidity, also seeing a decrease in sugars reducers interpreting this as the consumption of the carbon of the micro-organism and the realization of a process source fermentation and verifying the biomass growth through units of absorbance and the weight of the produced biomass, and may conclude that there was a proper acid development of bacteria lactic demonstrating that molasses is a source of carbon and a half of crop suitable for the production of this bacterium.

Keywords: Bioreactor, pH, acidification, carbon source, biomass.

Introducción

Los bioprocesos son una parte esencial de muchas industrias de alimentos, químicas y farmacéuticas. En ellos se usan células, por eso puede decirse que consisten en un cultivo de células en un biorreactor, el cual es un proceso capaz de crear un ambiente de crecimiento o uso óptimo del material celular (Ortega, Álvarez y Botero, 2017). Por lo tanto, los lactobacilos son bacterias ácido lácticas que se caracterizan por los diferentes usos e importancia a nivel industrial y es utilizada en fermentadores de alimentos como cárnicos, lácteos y vegetales, además, del uso en biopreservación que consiste en incrementar la vida útil de los productos o como potencial probiótico en la industria (Ossa, Vanegas y Badillo, 2010) Es por esto que en los procesos de fermentación aeróbicos es necesario un suministro adecuado de oxígeno que satisfaga los requerimientos metabólicos de los organismos empleados; ya que, la oxidación de la fuente de carbono y su transformación en células, establece una demanda de oxígeno que es esencial para satisfacer a través de la aireación y mezclado del cultivo, el oxígeno es el receptor final de los electrones producidos en las reacciones de oxidación, fenómeno conocido como respiración aerobia (López, Quintero y Garcés, 2008). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es producir bacterias ácido lácticas en un biorreactor aerobio a través de una fuente de carbono convencional como la melaza y comprobar el desarrollo del microorganismo como biomasa.

Metodología

Preparación medio de cultivo

Para la preparación del medio de cultivo en el biorreactor de 7,5 L se agregaron 3,5 L de agua con 968 g de melaza, agregando también extracto de levadura; para el biorreactor de 0,5 L se utilizaron 0,35 L de agua y 98 g de melaza agregando extracto de levadura. Los medios fueron llevados a esterilización.

Inóculo

Se inocularon al 20% los medios de cultivo con una bacteria ácido láctica, se llevó a agitación 120rpm y temperatura de incubación de 37°C durante un lapso de 147,5 h.

Determinación titulación ácido-base

Para la determinación de acidez titulable del medio de cultivo se procede a llenar una bureta con solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 0,1N. Por otro lado, se toman 2mL de muestra del medio de cultivo a evaluar en un matraz Erlenmeyer y se le adicionan 18 mL de agua destilada, a continuación, se adicionan 3 gotas de fenolftaleína al 1% como indicador. Para la titulación se adiciona gota a gota la solución de NaOH, esto a la vez de estar agitando lentamente el Erlenmeyer. La titulación se da por terminada cuando en la muestra persista un color rosa-tenué. Se debe tomar la lectura de los mililitros usados de NaOH con el fin de calcular la acidez presente en la muestra, usando la ecuación 1.

$$ATT=(V1*C*100)/V2*Meq$$

Donde:

V1: ml NaoH usados

V2: ml muestra

C: concentración solución NaOH

Meq: Miliequivalente ácido predominante en la muestra

Determinación pH

La determinación del pH se realizó con el pH-metro (Atago, Japón), en cada uno del medio de cultivo de melaza, el cual se sumergía el electrodo en el extracto problema puro por un periodo de tiempo de 1 minuto y la herramienta de medición producía resultados cuantificables de forma digital.

Unidades de absorbancia

La determinación de unidades de absorbancia en el medio de cultivo de melaza son indicativas de la densidad celular presente; se tomaron muestras en el tiempo cero, se realizó una disolución del inóculo de los biorreactores de 7,5L y 0,5L en agua destilada en una proporción de 1:9 respectivamente haciéndolo por duplicado con el inóculo de cada biorreactor, próximo a esto se llevó el inóculo diluido de ambos biorreactores a un espectrofotómetro midiendo en este la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.

Determinación azúcares reductores

Para la determinación de azúcares reductores, se utilizó el método DNS ácido 3,5 dinitrosalicílico (técnica de Miller); se adicionó 0,25mL de la muestra en un tubo de ensayo más 0,25mL de reactivo de DNS, posteriormente se homogenizaron las muestras, se colocaron al baño maría a 100°C por 5 minutos, se realizó choque térmico en baño de hielo y se adiciono 1mL de agua destilada. La lectura de absorbancia se realizó a 540nm contra el blanco (agua destilada más DNS).

Para la determinación de azúcares se realizó el gráfico de concentración versus absorbancia de la curva patrón, en la que los datos se sometieron a regresión lineal obteniendo de esta forma la ecuación de la recta, con la que se cuantificó la concentración de azúcares, teniendo en cuenta la ecuación 2.

$$Y=m(C \text{ Azúcares})+b; \text{ siendo } C=(Y-b)/m$$

; siendo

Sólidos solubles (°Brix)

La determinación de Brix se realizó utilizando refractómetros digitales (Jemwey, República Popular China), en cada uno de los medios de cultivo; en el cual se agregaron 2 gotas del extracto problema con la finalidad de que la herramienta implementada presentara un valor cuantitativo de forma digital.

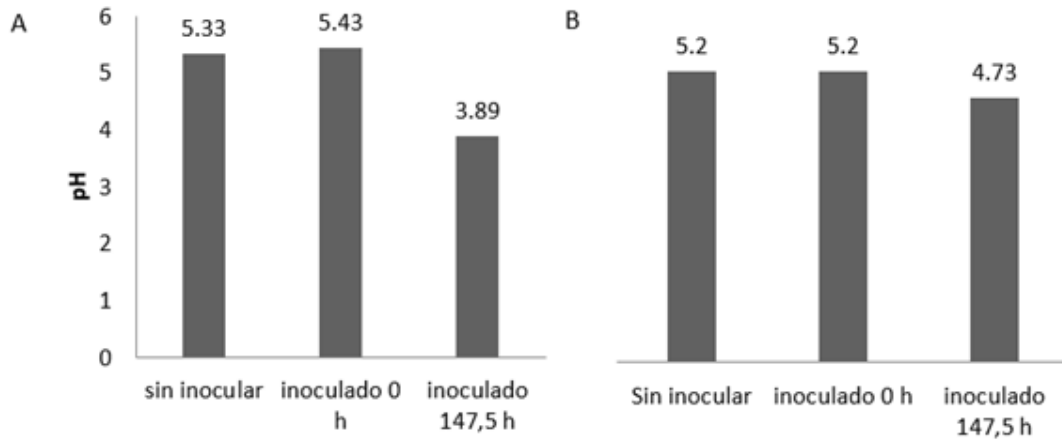
Biomasa celular

Las muestras de ambos biorreactores se llevaron a centrifugar a 4000 rpm durante un lapso de 10 min con el fin de obtener los gramos por litro de biomasa producida.

Resultados y discusión

En el caso de la melaza el pH de la muestra sin inocular y la inoculada a las 0 h estuvieron conformes a los valores teóricos dados por Fajardo y Sarmiento (2007) estos en su investigación reportan que el pH de la melaza puede variar dentro del rango de 5 a 6,1 teniendo valores de pH de 5,33; 5,43. En el tiempo, se observa una disminución del pH, esto debido a la acción metabólica de las bacterias ácido lácticas y la producción de ácido láctico (Ossa, Vanegas y Badillo, 2010).

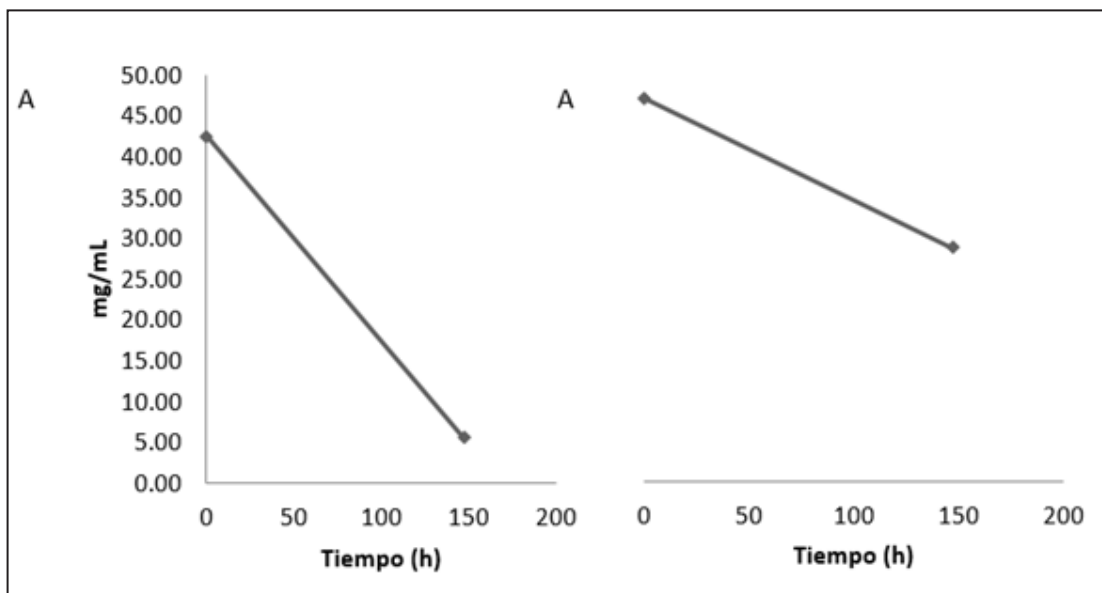
Gráfica 1. a. Evolución de pH reactor de 7,5L. **B:** evolución de pH reactor 0,5L.



Fuente: elaboración propia

En el caso del pH del biorreactor de 0,5 L se encontraron valores similares al valor teórico nombrado anteriormente el cual variaba de 5 a 6,1 dando un pH de 5,2 en la muestra sin inocular y el inoculado a las 0 horas; sin embargo, difirió en el pH de la muestra inoculada después del periodo 147,5 horas esto siendo de nueva cuenta debido a la reducción del pH a través del tiempo debido a la acción metabólica de la bacteria acidificando el medio. El valor de pH es indicativo de la producción de ácido láctico, por lo tanto, de la actividad metabólica del microorganismo, es así como, el reactor de 7,5L muestra un delta de descenso mayor que el de 0,5L alcanzando valores de pH menores, posiblemente, asociado a una mayor cantidad de células por mL.

Gráfico. 2. Azúcares reductores



Fuente: Elaboración propia

La gráfica 2 muestra el comportamiento y el consumo de azúcares en el proceso de fermentación de la melaza con bacterias ácido lácticas, en él se puede evidenciar que hay un consumo significativo en ambos biorreactores, lo que indica que el microorganismo está utilizando los azúcares presentes en el medio como fuente de carbono y a su vez realizando un proceso de fermentación (Osorio, Gómez y Sánchez, 2008), siendo el de mayor consumo el biorreactor de 7,5 litros, esto teniendo en cuenta que ambos biorreactores se sometieron a la misma temperatura de incubación y durante el mismo tiempo.

Sólidos solubles - °Brix

Los sólidos solubles se miden por refractometría, basada en los cambios del índice de refracción que sufre una sustancia cuando otra está disuelta en ella. Estos están compuestos por azúcares, ácidos, sales y otros compuestos solubles en agua (Rojas y Viera 2014). Dicho lo anterior se puede observar en la tabla 1 que el contenido de sólidos solubles en ambos reactores es de 22, 3 y en la hora 147,5 hay un aumento de estos en los diferentes biorreactores.

Tabla 1. Contenidos sólidos solubles antes de inocular y después de inocular en el proceso de fermentación con melaza y bacterias ácido lácticas.

Tiempo (horas)	Biorreactor 0,5 l	Biorreactor 7,5 l
Sin inocular	22,2	22,3
0 inoculado	22,2	19,3
147,5	30,5	21,1

Fuente: elaboración propia

El proceso de consumo de azúcares como fuente de carbono influye en la producción de biomasa (Zapata, y otros, 2007) por lo tanto la toma de ° Brix por refractometría no sería una técnica confiable,

ya que al existir una producción de biomasa estos serían tomados, también como sólidos solubles dando de esta forma resultados erróneos.

Unidades de absorbancia

Los resultados de unidades de absorbancia están asociados al crecimiento de los microorganismos, encontrando valores mayores en el reactor de 7,5L 2,430UA y en el de 0,5L 1,870, esto está asociado a los resultados encontrados en las otras variables como densidad celular, en la que, el reactor de 7,5L tuvo un rendimiento de 4,8g/L y el de 0,5 de 3,8g/L. El reactor de 7,5L tiene todos los mecanismos de control y monitoreo de las variables, adicionalmente en comparación con los resultados encontrados en medios estándar e evidencia que la melaza es una alternativa de fuente de carbono, nitrógeno y minerales, necesarios para el crecimiento de los microorganismos (Ossa, Vanegas y Badillo, 2010).

Conclusión

Se puede concluir que la concentración de la fuente de carbono; la cual es la melaza en la concentración del 20% es apto para la producción de las bacterias ácido lácticas; además, las condiciones a las cuales fueron sometidos los biorreactores permitieron que el microorganismo se adaptara, de esta forma tuviera una producción de biomasa y fermentación. Los resultados obtenidos, permiten definir que la melaza es un medio alternativo, de bajo costo para la producción de biomasa a partir de bacterias ácido lácticas.

Referencias bibliográficas

Fajardo, E y Sarmiento, S. (2007). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. (Tesis doctoral). Universidad Pontificia Javeriana, Bogotá, Colombia. Recuperado de: <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis26.pdf>

Ortega, A Q., Álvarez, H y Botero, H. (2017). Enfrentando el modelado de bioprocesos: una revisión de las metodologías de modelado. Recuperado de: <https://doi.org/10.18273/revion.v30n1-2017006>.

Ossa, J., Vanegas, María C. y Badillo, Ángela M. (2010). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Divulgación Científica*, 13(1), 97–104. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v13n1/v13n1a11.pdf>.