

INVESTIGACIÓN

Elaboration of a bioprepared with probiotic effect from a mixed culture of lactic bacteria and yeasts

Elaboración de un biopreparado con efecto probiótico a partir de un cultivo mixto de bacterias lácticas y levaduras

Miranda Yuquilema J.E.^{1*}, Marín Cárdenas A¹, Baño Ayala D².

DOI. 10.21931/RB/2017.02.01.6

ABSTRACT

The use of bacteria as beneficial biological agents being used as food ingredients or as active components of food supplements dates back to the early 1900s. The objective of this study was elaboration a bioprepared whit probiotic effect from a mixed culture of lactic bacteria and yeasts. The bioprepared substrate contained 57.5% orange vinasse and 30% Sugar cane molasses. The strains *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Kluyveromyces fragilis* L-4uclv and *Saccharomyces cerevisiae*, it was grown in sterilized milk. Were in oculated 12.5% in the substratum molasses-vinasse. Finally incubated during 24h at 37°C. The results of the biopreparation was 18% Dry matter, 3.3% ash, 19% Crude protein, 12% True protein and 3.2% Ether extract. The microorganism counts were 9x10⁹ cfu/mL, 0.75% organic acids and 95% viability was. Color was, in the CIELab* system: L*31.85, a*11.48, b*24.52, C*27.08 and H64.91, similar to the HTML code #61382B. pH initial was 4.4 and after 72h it was established in 3.86 the value maintained for 90 d, at a temperature 12 ±2°C. There were no differences in physical characteristics. The parameters bromatology and microbiology there was difference (P<0.05). The results showed that by-products as vinasse and molasses are good and economic substrates feed for probiotic grow and obtain an acceptable probiotic for animal feed.

Key words: Bioprepared, Mixed crop, Molasses, Probiotic, Vinasse.

RESUMEN

El uso de microorganismos benéficos adicionados en la alimentación viene desarrollándose desde los años 1900. El presente trabajo tiene el objetivo de elaborar un biopreparado a partir de un cultivo mixto de bacterias lácticas y levaduras. El sustrato del biopreparado contenía 57,5% vinaza de naranja y 30% melaza de caña de azúcar. Las cepas *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Kluyveromyces fragilis* L-4uclv y *Saccharomyces cerevisiae* se cultivó en leche esterilizada. Posteriormente se inoculó el 12,5% en el sustrato melaza-vinaza. Finalmente se incubó a 37°C por 24 h. Los resultados del biopreparado fue 18% Materia seca, 3,3% Ceniza, 19% Proteína cruda, 12% Proteína verdadera y 3,2% Extracto etéreo. La concentración microbiana 9x10⁹ UFC/mL, 0,75% ácido láctico y 95% viabilidad. Color mediante CIELab* System: L*31,85; a*11,48; b*24,52; C*27,08 y H64,91 y similar al código HTML # 61382B. El pH inicial del biopreparado fue 4,4, transcurrido 72 h se estabilizó en 3,86 manteniendo ese valor hasta 90 días pos elaborado a 12 ±2°C. No hubo diferencia en las características físicas, pero si se mostraron diferencias (P<0,05) en los parámetros bromatológicos y microbiológicos. Los resultados mostraron que los subproductos agroindustriales como la vinaza y la melaza son buenos y económicos para desarrollar biopreparado y obtener un probiótico aceptable para la alimentación animal

Palabras claves: Biopreparado, Cultivo Mixto, Melazas, Probiótico, Vinazas.

Introducción

Los biopreparados probióticos han sido elaborados con uno o varios tipos de microorganismos⁶. Esos biopreparados se utilizan como suplementos dietéticos en la producción animal³. Algunos estudios reportan las bondades que presentan los biopreparados, tales como reducción de los enteropatógenos, favorecen cambios en la mucosa intestinal y mejoran el comportamiento productivo con raciones bajas en proteínas¹³. Han sido, además, promotores de crecimiento, estimuladores del sistema inmune y correctores del balance de la población microbiana⁵. El presente trabajo tuvo como objetivo elaborar un biopreparado a partir de un cultivo mixto de bacterias lácticas y levaduras desarrolladas en el sustrato melaza-vinaza.

Materiales y Métodos

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio bromatológico y microbiológico de la Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y Laboratorio de microbiología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Cuba.

Característica de la materia prima: Vinaza naranja: Materia seca (MS), Ceniza (Cz), Proteína cruda (PC), Proteína verdadera (PV) de 20; 2,5; 19 y 10% v/v respectivamente, pH 3,56. Melaza: MS, PC, PV, Cz: 85; 2,7; 0,8 y 1,1% v/v, pH 5,8 y grados Brix 72%.

¹ Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Cuba. 2 Escuela Superior Politécnica De Chimborazo. Ecuador

Autor de correspondencia: efra_miranda@outlook.com

Selección y activación de las cepas: Las cepas seleccionadas para la obtención del biopreparado fue: *Kluyveromyces fragilis* (L-4 UCLV) proveniente del Banco de Microorganismos de la Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba y cuatro cepas ATCC (American Type Cultures Collection, USA), *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Las cepas, en formato liofilizados, fueron activadas individualmente en 120 mL de caldo soya trip-tona a 37 °C para el caso de bacterias y 30 °C para las levaduras, en una estufa con zaranda 60 rpm durante 6 h. Seguidamente fueron cultivadas en placa con medio de cultivo Agar MRS y Nutritivo para *L. acidophilo*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, respectivamente. Para las levaduras fueron utilizadas Agar Sabouraud. Los *lactobacillus* fueron cultivados en condiciones anaerobias utilizando jarra GasPak Plus™.

Obtención de la biomasa: Las cepas *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*. *S. cerevisiae* y *K. fragilis* L-4 UCLV fueron inoculados con 5 mg cada uno (balanza analítica, Radwag™ AS 220/3Y). La mezcla de estos cultivos fue inoculada en 250 mL de leche descremada a 30 ± 2 °C y se incubó a 37 °C durante 24 h. Se realizó recuento inicial en placa para verificar viabilidad de las cepas.

Obtención de los Biopreparados: En un sustrato de 300 g (30%) melaza de caña de azúcar estéril y 875 mL (57,5%) de vinaza de naranja, homogenizado a 150 rpm en un agitador magnético (JOAN o OEM MS001) a 30 °C durante 10 min, se inocularon 125 mL (12,5 %) de biomasa previamente obtenidas. Tras la incubación a 37°C durante 24 h, se tomaron muestras del biopreparado para la caracterización. Dicho procedimiento se repitió por 5 veces.

Caracterización física y química de los Biopreparados: Color sistema CIELab* se midió con un colorímetro (CR-400, Konika Minolta) y también se comparó con código HTML, el sabor y el olor fueron evaluados por los sentidos sensoriales del investigador. La determinación de PC y PV se realizó siguiendo la metodología de normas INEN⁷. MS, Cz y extracto etéreo (EE), mediante la metodología descrita por AOAC².

Determinación microbiológica: El recuento celular, viabilidad, y ácido láctico se midieron siguiendo las técnicas

descritas por Sourav y Arijit,¹² Marin,⁹ y Rodríguez¹⁰ respectivamente. El biopreparado fue inoculado en 50 mL de suero fisiológico e incubado por 24 h a 37°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras (BD DYNAC™ III) a 600 rpm por 5 min. Así mismo se prepararon diferentes concentraciones hasta la escala 0,5 del esquema MacFarland para la viabilidad, utilizando la técnica descrita por Rodríguez⁹.

Valoración económica: No se tuvieron en cuenta los gastos de salario, energía, amortización por ser iguales. Los costos de la materia prima fueron recomendados por Ministerio de Agricultura Ganadería Acuicultor y pesca^{5,4}.

Análisis Estadístico: Se utilizó un diseño completamente aleatorizado, con el empleo del paquete estadístico Statgraphic plus v 15.1 para Windows (Company, City, EEUU). En el caso de los conteos de microorganismos, los datos se transformaron según log_x para garantizar la normalidad de varianza.

Resultados y Discusión

No se observaron cambios en las características físicas del biopreparado durante el tiempo de conservación (tabla 1).

Similares resultados fueron presentados en melaza de caña más leche fermentada¹⁰, suero de leche más melaza⁵ y en levadura de torula más melaza¹¹. Durante el tiempo de conservación se presentaron cambios (P<0,05) en los parámetros de MS, PC y PV, (ver tabla 2).

Similares resultados fueron reportados por Jurado *et al.*⁸ Los resultados obtenidos en el presente estudio son coincidentes con los reportados por otros autores^{13,1 y 3}.

Los resultados obtenidos en cuanto a las características microbiológicas se reflejan en la tabla 3. La media de la concentración microbiana se mantuvo en 9x10⁹ (UFC/mL) hasta el final del experimento. La viabilidad, la concentración de ácido láctico y el pH se redujeron (P<0,05) a los 90 días con relación con la etapa inicial. Resultados semejantes a los nuestros fueron reportados por otros autores^{12, 8}.

Se elaboró 10 L del biopreparado, cantidad suficiente para tratar a mil lechones, al suplementar 1 mL/animal cada tres días en la etapa neonato y crías¹⁰. Esto pudiera significar el ahorro de aproximadamente de \$ 293,50, por sustitución de antibióticos por probióticos (datos no mostrados en la tabla)

Parámetros	Tiempo de conservación					
	Inicio		45		90	
Color (CIELab* System)	L* 31.85	a* 11.48	L* 31.93	a* 11.42	L* 41.93	a* 13.44
	C* 27.08	b* 24.52	C* 26.41	b* 23.81	C* 26.44	b* 23.80
	H 64.91		H 65.31		H 63.87	
Color código (HTML)	#603E13B		#613E73B		#603513B	
Sabor	Ácido dulzón agradable		Ácido dulzón agradable		Ácido dulzón agradable	
Olor	Ácido dulzón		Ácido dulzón		Ácido dulzón	
Textura	Líquido		Líquido		Líquido	

L*a*b*C*H valores mediante espectrofotómetro de absorbancia atómica, HTML, comparación de color.

Tabla 1. Características físicas del biopreparado

Parámetros (%)	Tiempo de conservación			
	Inicio	45 días	90 días	EE ±
Materia seca	15.12 ^a	16.12 ^b	18.10 ^a	0.12
Ceniza	4.36 ^b	4.37 ^a	4.36 ^b	0.01
Estrato etéreo	3.22 ^b	3.25 ^a	3.25 ^a	0.25
Proteína cruda	19.23 ^b	19.51 ^b	20.70 ^a	0.34
Proteína verdadera	12.20 ^a	12.60 ^b	12.84 ^a	0.31

*** Letras desiguales en la misma fila, las medias difieren a $P < 0.05$ (Duncan 1955).

Tabla 2. Parámetros bromatológicos del biopreparado.

Parámetros	Tiempo de conservación			
	Inicio	45 días	90 días	EE ±
Concentración microbiana (ufc/mL)	9×10^8	9×10^8	9×10^8	-
Viabilidad (%)	95 ^a	94 ^b	93 ^a	0.01
Ácido láctico (mmol/mL)	0.65 ^a	0.64 ^a	0.64 ^b	0.12
pH	4.41 ^a	3.85 ^b	3.85 ^b	0.03

*** Letras desiguales en la misma fila, las medias difieren a $P < 0.05$ (Duncan 1955).

Tabla 3. Característica microbiológica del biopreparado.

Conclusiones

Es factible producir un biopreparado con efecto probiótico a partir de cultivos mixtos de bacterias y levaduras desarrollados en melaza de caña de azúcar y vinaza de naranja, conservados durante 90 días.

Referencias bibliográficas

- Ana S Mendoza Gardeazábal, (2013). Caracterización de la levadura *Kluyveromyces marxianus* como microorganismo probiótico. Tesis en opción al grado científico Maestría. Universidad Autónoma Del Estado De Hidalgo. Estado De Hidalgo. Mexico. URL: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/biblioteca/digital/handle/231104/1862>
- AOAC. (2014). Official Method of Analysis 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gathersburg, MD.
- Ayala L., García-Hernández Y., Savón L.L., Boucourt R., Castro M., Herrera M. (2014). Actividad probiótica de *Lactobacillus pentosus* en cerditos destetados. Revista Computadorizada de Producción Porcina. 21 (3). 130-133. URL: http://www.iip.co.cu/RCP/213/213_artLAyala.pdf
- Catálogo de Bayer (2015): <http://vademecumsani.com/index.php>
- Duncan, D.B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11:1. URL: <http://dx.doi.org/10.2307/3001478>
- Flores L., Elías A., Proaño F., Granizo G., Medina Y., López S., Herrera F. (2015). Effects of a microbial preparation, a probiotic and commercial antibiotic on the productive performance and pigs health in post-weaning period. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49, 3: 357-369. URL: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193042629011>
- Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x/abstract>
- INEN 0016 (1984). Control Microbiológico de los Alimentos. Quito. Ecuador. URL: <https://law.resource.org/pub/ec/ibr/ec.nte.0016.1984.pdf>
- Jurado H., Ramírez C., Martínez J. (2013). Evaluación in vivo de *Lactobacillus plantarum* como alternativa al uso de antibióticos en lechones. *Rev. MVZ Córdoba*, 18, 3648-3657. URL: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69329148008>
- María Rodríguez González (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis en opción al grado científico de doctor en ciencias. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España. URL: <http://es.slideshare.net/valdivia1314/tesisaislamiento-de-cepas-de-lactobacillus-con-capacidad-probiotica>
- Marín Cárdenas A. (2008). Desarrollo de la tecnología de producción del BIOPRANAL. Tesis en opción al grado científico de doctor en ciencias. Universidad Central de Las Villas, Villa Clara, Cuba.
- Pavan R., Jain S., Kumar A. (2012). Properties and therapeutic application of bromelain: a review. *Biotechnol. Res. Int.* 2012, 6. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/976203>
- Roque N. (2015). Uso de un aditivo probiótico en la alimentación cunícola. Tesis en opción al grado científico de Master en ciencias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara, Cuba.
- Sourav B, Arijit D. (2010). Study of physical and culture parameters on the bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional indian fermented food. *American Journal of Food Technology* 5 (2): 111-120. URL: <http://www.scialert.net/qredirect.php?doi=ajft.2010.111.120&linkid=pdf>
- Zhao R., Sun J., Torley P., Wang D., Niu S. (2008). Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: pp. 1349-1354. DOI:10.1007/s11274-007-9615-0

Recibido: diciembre 2016

Aprobado: febrero 2017