

OBTENCIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO LÍQUIDO EXPERIMENTAL AUTÓCTONO DE ENRIQUECIMIENTO PARA *Lactobacillus plantarum*

OBTAINING AN AUTOCTONOUS EXPERIMENTAL LIQUID CULTURE ENRICHMENT MEDIUM FOR *Lactobacillus plantarum*

Recibido: 15-11-2008 / Aceptado: 16-03-2009

Víctor E. Pérez Guaina

Profesor (MSc., U.C.V-Caracas), adscrito al Programa Ciencias del Agro y del Mar del Vicerrectorado de Infraestructura y Procesos Industriales, UNELLEZ-San Carlos, estado Cojedes, Venezuela. Email: victorguaina@cantv.net

RESUMEN

En la producción de alimentos fermentados se utilizan especialmente cultivos de bacterias acidolácticas y, actualmente, para la obtención de estos grupos de microorganismos se necesita del uso de medios de cultivo altamente costosos disponibles en el mercado comercial. En el presente trabajo se diseñó un medio de enriquecimiento experimental con utilización de sustratos baratos y disponibles en la población de San Carlos, Estado Cojedes, con el cual se podrá producir biomasa de estas bacterias. La investigación se rigió con un Diseño Compuesto Central Ortogonal para tres factores y cinco niveles de experimentación en cada factor, además se evaluó el crecimiento en este medio de enriquecimiento de una especie de lactobacilo más ampliamente utilizado en el proceso de fermentación de los alimentos (*Lactobacillus plantarum*). Los factores experimentales evaluados en la presente investigación fueron X1 (volumen de leche pasteurizada), X2 (gramos de peptona) y X3 (gramos de extracto de levadura). El recuento de la biomasa después de 3-4 días de incubación fue del orden de 10^6 y que es suficiente para inocular cualquier sustrato láctico o cárnico. Las cantidades de extracto de levadura no influyeron de manera significativa en la respuesta (biomasa), mientras que las cantidades de peptona y leche pasteurizada sí influyeron significativamente en la variable respuesta. Según la gráfica de superficie de respuesta, la leche pasteurizada influye más que la peptona en la población del microorganismo evaluado. Según el análisis de varianza, se observa una alta significación para los efectos del tratamiento y regresión del modelo, a excepción del factor independiente "extracto de levadura".

Palabras clave: Bacterias acidolácticas, medio de cultivo, biomasa

SUMMARY

Acido-lactic bacterial cultures are mainly utilized during the production of fermented food, and currently, in order to obtain such microorganism groups it is necessary to utilize highly expensive culture media from commerce. An experimental enrichment medium was designed in this research by implementing the use of inexpensive substrate materials currently available in the San Carlos, Cojedes state area, by means of which it will be possible to produce biomass of these bacteria. An Orthogonal Central Compound Design for three factors and five experimental levels for each factor was used in this research; additionally, the growth of a more widely used species of lactobacillus used in the food fermentation process (*Lactobacillus plantarum*) in this enrichment medium was also evaluated. The present's investigation evaluated experimental factors were X1 (pasteurized milk volume), X2 (number of peptone grams) and X3 (number of yeast extract grams). The biomass count after 3-4 days was in the 10^6 order of magnitude which is sufficient enough to inoculate any dairy or meat-based substrate. The actual amount of yeast extract did not influence the response (biomass) in a significant way, whereas the amount of peptone and pasteurized milk did significantly influence the response. The surface response graph indicates that the amount of pasteurized milk has more influence than the peptone amount on the evaluated microbial population. Variance analysis indicates a high significance for the treatment effects as well as the model regression, except for the independent factor "yeast amount".

Keywords: Lactic acid bacteria, culture media, biomass

INTRODUCTION

En la producción de alimentos se utilizan especialmente cultivos de bacterias acidolácticas, de acuerdo con los objetivos perseguidos. El repertorio de microorganismos utilizables se ha ido ampliando paso a paso en la esfera de la industria de los alimentos tras la detallada comprobación de su inocuidad sanitaria. La producción de cultivos de gérmenes, especialmente *Lactobacillus plantarum* y otras bacterias acidolácticas, puede efectuarse de manera tanto continua como discontinua. El procedimiento a elegir depende de la cantidad de biomasa a producir y de la especie del microorganismo. En último extremo decide la economía de la producción sobre la elección del procedimiento (Benno, 1986).

La optimización de estos medios en la mayoría de los casos ha sido efectuada mediante procedimientos de prueba y error, no sólo en la formulación del medio de cultivo, sino también en las condiciones de operación. Por todo ello, se detecta la necesidad de obtener una formulación racional, uso de materias primas de bajo costo, que sea económica y sencilla la producción de un medio que sirva para el aumento de la población de la flora láctica que posteriormente se vaya a utilizar en la producción de alimentos fermentados en general.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del trabajo se utilizaron los siguientes sustratos para la formulación del medio líquido experimental de enriquecimiento y que fueron adquiridos en el mercado comercial de la población de San Carlos Edo. Cojedes: materiales vegetales como repollo (*Brassica oleracea*) y hojas de lechuga fresca (*Lactuca sativa L.*); zumo de tomates (*Lycopersicum esculentum*) cultivar perita, híbrido Allegro, totalmente maduros, de color rojo intenso; cloruro de sodio (sal común comestible), grado consumo humano, granulado fino grado 2, marca

BAHIA; sorbato de potasio de la marca comercial MERCK, grado técnico con una pureza de 98,5%; extracto de levadura de la marca comercial Himedia; peptona del tipo universal de la casa comercial MERCK; Nitrito de sodio al 99% de pureza; leche pasteurizada y homogenizada.

Cuadro 1. Formulación base para elaborar el medio de enriquecimiento experimental para *Lactobacillus plantarum* (Biomasa).

INGREDIENTES	PESO (g).
Zumo de tomates.	250 g (11,5%).
Sal (NaCl).	50 g (2%).
Sorbato de potasio.	5 g (0,25%).
Hojas de repollo frescos.	815 g (40%).
Hojas de lechuga fresca.	715 g (35%).
Extracto de levadura.	7 g (0,35%).
Peptona.	3 g (0,15%).
Nitrito de sodio.	300 mg (150 ppm).
Leche pasteurizada.	150 ml (10,75%).
TOTAL DE MEDIO LÍQUIDO.	2 kg

Fuente: Obtenido de la prueba piloto en el laboratorio con el mejor resultado en biomasa y de los valores obtenidos por Ávila (2005).

El repollo y la lechuga se lavaron con agua de chorro filtrada, se trocó en trizas de sección mínima con un cuchillo. El zumo de tomate se preparó en un homogenizador "Osterizer" (licuadora) por 3 minutos a máxima velocidad incluyendo las semillas, al zumo se le adicionó la sal (NaCl comercial), sorbato de potasio, nitrito de sodio, extracto de levadura, peptona y la leche pasteurizada fría en las cantidades especificadas en el cuadro anterior. Todos los componentes se homogenizaron por 3 minutos adicionales a máxima velocidad en la licuadora junto con el jugo de tomate para facilitar su disolución. El zumo enriquecido se adicionó al repollo y lechuga y continuamente se mezcló hasta que se observó salida

abundante de líquido celular y vascular de los vegetales de manera tal que los componentes estuvieron totalmente disueltos y bien mezclados (3 minutos de mezcla adicional). Una vez logrado este paso de la preparación, se procedió a la esterilización por autoclave del líquido de enriquecimiento para posteriormente ser inoculado, una vez frío, por *Lactobacillus plantarum* procedente de la Escuela de Biología de la UCV, ubicada en Caracas Venezuela. Se hizo el procedimiento correspondiente para desarrollar la biomasa partiendo de un inóculo inicial pequeño en tubos de ensayo (de capacidad 10 ml con medio de enriquecimiento experimental) hasta su culminación en frascos de erlenmeyer más grandes de hasta 2 litros de capacidad. De esta manera se pretendió lograr aumentar la biomasa a una población final del orden de 10^7 células/ml.

Diseño del experimento.

La investigación proyectada fue de carácter experimental y exploratoria, bajo condiciones de laboratorio controladas y organizadas en un diseño estadístico de superficie de respuesta. Los datos obtenidos se utilizaron en la obtención de modelos lineales de segundo orden.

Para la determinación del pH y la acidez, se cuantificaron de acuerdo con las técnicas recomendadas a continuación:

Acidez	COVENIN 1151-77
pH	COVENIN 1315-79
Recuento de mohos y levaduras	COVENIN 1337-90
Aerobios totales	COVENIN 902 78
Sólidos solubles	COVENIN 974-77

Cuadro 2. Niveles o dosis naturales de los tratamientos para tres factores experimentales.

Factores Experimentales	Niveles codificados/naturales				
	-1.47119	-1	0	+1	+1.47119
X ₁ : [mililitros de leche]	50	66,02	100	133,98	150
X ₂ : [gramos de peptona]	1	1,64	3	4,36	5
X ₃ : [gramos de extracto de levadura]	4	4,96	7	9,04	10

Análisis estadísticos de los datos

Los análisis estadísticos se realizaron con el software SAS v.08, Statistica v.06 y JMP v.04. El procedimiento de modelos lineales generales (PROC GLM), se utilizó en la determinación de las sumas de cuadrados de las fuentes de variación y PROC RSREG para el análisis canónico y Ridge (Draper y Smith, 1981). PROC ORTHOREG (transformación Gentleman-Givens) para contrastar la calidad de los coeficientes regresores del modelo (Dempster y col., 1977; Jennrich y col., 1976).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La prueba piloto realizada en el laboratorio de Microbiología de la UNELLEZ arrojó una población de *Lactobacillus plantarum* del orden de 10⁷ UFC/ml en el medio experimental usando la formulación especificada en el cuadro N° 2 en aproximadamente 4 días de incubación, en condiciones normales de laboratorio (37°C).

Cuadro 3. Análisis de Varianza para las variables evaluadas.

	SS	df	MS	F	P	
(1)X1(L)	0,048178	1	0,048178	197,3394	0,000000	**
X1((Q)	0,011755	1	0,011755	48,1416	0,000068	**
(2)X2(L)	0,000293	1	0,000293	1,2004	0,301686	n.s.
X2(Q)	0,001440	1	0,001440	5,8974	0,038078	*
(3)X3(L)	0,000105	1	0,000105	0,4306	0,528091	n.s.
X3(Q)	0,000694	1	0,000694	2,8444	0,125970	n.s.
1L by 2L	0,000002	1	0,000002	0,0100	0,922716	n.s.
1L by 3L	0,000002	1	0,000002	0,0100	0,922716	n.s.
2L by 3L	0,000162	1	0,000162	0,6635	0,436357	n.s.
Error	0,002197	9	0,000244			
Total SS	0,064832	18				

SS: Suma de cuadrados, **df:** Grados de libertad, **MS:** Cuadrado medio, **F:** Estadístico de Fischer, **P:** Nivel de significación, ****:** Muy significativo, *****: Significativo. Tomando como significativo los valores de P 0,05, **n.s:** No significativo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los distintos tratamientos estudiados a través del análisis de varianza para la variable respuesta (biomasa ó población), se observa una alta significación para los efectos del tratamiento y regresión del modelo, a excepción del factor independiente “extracto de

levadura (X3)", ya que al separar los efectos de los términos de regresión, se determina que sólo la variable "extracto de levadura" y todas sus interacciones son no significativas estadísticamente. La variable X3 (extracto de levadura) no ejerce influencia significativa sobre los resultados, en cambio X1 (leche pasteurizada) y X2 (peptona) sí tienen influencia sobre el valor de la variable dependiente (biomasa). La variable X1 (leche pasteurizada) tiene mayor influencia significativa sobre el valor de biomasa en comparación con la variable X2 (peptona); de hecho, al trabajar con una formulación distinta a la arrojada por el diseño (prueba piloto) aumentando sólo la cantidad de leche pasteurizada (215 ml), se logró aumentar la biomasa de *Lactobacillus plantarum* en una unidad logarítmica más (orden de 10^7), lo que significa que este sustrato (leche) contiene nutrientes esenciales, no sólo para el microorganismo evaluado, sino para otras bacterias pertenecientes al grupo de los lactobacilos.

De la misma, la variable X1 (leche pasteurizada) tiene mayor influencia significativa sobre la variable respuesta (biomasa) en comparación con la variable X2 (peptona) y que la variable X3 (extracto de levadura) no ejerce ninguna influencia significativa sobre los resultados; habría que ensayarse con otros valores de extracto de levadura para observar alguna influencia sobre el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, o en su defecto, no sería necesario usar este ingrediente en la formulación y, de esta manera, se abarataría aún más los costos en la elaboración de este medio de enriquecimiento (recomendación para trabajos similares). La población microbiana o biomasa de *Lactobacillus plantarum* lograda fue del orden de 10^6 UFC/ml (6 seis unidades logarítmicas) con las diferentes formulaciones de las variables. Este valor fue inferior al esperado si se compara con la biomasa obtenida en el medio experimental sin esterilizar por calor (autoclave), debido a que probablemente algunos componentes nutricionales naturales de los ingredientes se destruyen por el calor. Sin embargo, este valor ya se considera como biomasa microbiana por estar por encima de una población del orden de 10^5 UFC/ml.

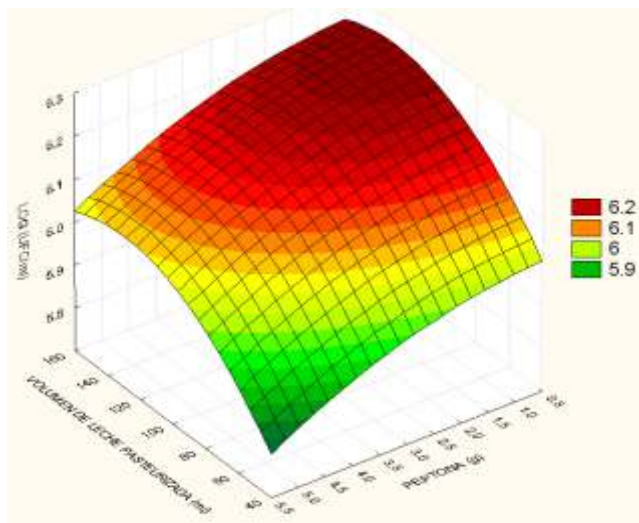


Figura 1. Superficie de respuesta.

SUPERFICIE DE RESPUESTA

$$\text{LOG}(y) = 5.731462 + 0.008065 * X1 - 0.000031 * X1^2 - 0.006706 * X2^2$$

MINIMO DE LA SUPERFICIE:

$$5.889562000, \{ \{ x1 = 50., x2 = 5. \}, 5.889562000 \}$$

MÁXIMO DE LA SUPERFICIE:

$$6.249306202, \{ \{ x1 = 130.0806452, x2 = 1. \}, 6.249306202 \}$$

La figura anterior muestra el efecto que tienen las variables "leche pasteurizada" y "peptona" sobre la respuesta de rendimiento, no considerando la variable "extracto de levadura" debido a la poca contribución que presenta este factor a la variabilidad de la respuesta rendimiento. De la figura de respuesta generada se observa que a medida que se aumenta el volumen de leche pasteurizada también aumenta la población del microorganismo objeto de estudio; de igual manera sucede con la variable "peptona" cuyo comportamiento es similar. También se observa que el óptimo está cerca de 160 ml de leche y 0,5 g de peptona, indicando que no es necesaria la adición de alta cantidad de peptona para lograr una buena biomasa de este microorganismo en particular; una vez más la variable "leche pasteurizada" es la que está determinando un aumento de la población bacteriana a medida que se aumenta su cantidad. También la gráfica está mostrando el mínimo y el máximo de la superficie.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Por los resultados en el recuento de la biomasa al cabo del tiempo de incubación (de 3 a 4 días por cada volumen creciente de medio de enriquecimiento), se concluye que se obtuvo una cantidad de población de *Lactobacillus plantarum* aceptable (del orden de 10^6) y que es suficiente para inocular cualquier sustrato láctico o cárnico para un proceso de fermentación.
- El proceso de esterilización del medio de enriquecimiento experimental fue eficiente por cuanto no se detectó flora fúngica ni aerobios después de valorarlo según el procedimiento establecido por la norma COVENIN para cada caso.
- Los recuentos o biomasa de *Lactobacillus plantarum* en el medio esterilizado por autoclave fueron menores (10^6) que la biomasa de flora acidoláctica natural (especies de lactobacilos y estreptococos) obtenida en el medio no esterilizado (orden de 10^7) debido a que probablemente el calor destruye algunos componentes nutricionales básicos que necesitan para el metabolismo respiratorio. Es importante destacar que los microorganismos lácticos se encuentran naturalmente presentes en los productos lácteos y vegetales (flora epifítica) donde naturalmente utilizan los nutrientes de esos sustratos y se sobreponen en población a la flora microbiana competitiva existente.
- Las cantidades de peptona y leche pasteurizada sí influyeron significativamente en la variable respuesta, como se observa en la gráfica de Superficie de Respuesta y, de estos dos componentes, la leche pasteurizada influye mayor que la peptona en la población del microorganismo evaluado. También se observó, en un experimento adicional y fuera de la formulación arrojada por el diseño, que aumentando sólo la cantidad de leche pasteurizada en la formulación (215 ml) la población de *Lactobacillus plantarum* aumentó una unidad logarítmica más (orden de 10^7); lo que se demuestra la eficiencia de estos sustratos lácticos en el desarrollo de microorganismos pertenecientes a este grupo, posiblemente también por la presencia de factores esenciales de crecimiento que probablemente se destruyan por el uso de la esterilización por autoclave.
- Se recomienda realizar este estudio, en otro trabajo relacionado, usando el medio de enriquecimiento pero sin esterilización con calor en autoclave para observar si existe diferencia en cuanto al desarrollo de la biomasa con *Lactobacillus plantarum* y otras bacterias lácticas. Para ello, podría usarse otros inhibidores de mohos, levaduras y bacterias indeseables, además del sorbato de potasio en diferentes cantidades y ver cuál es el efecto sobre la biomasa a obtener.
- Este estudio se podría ampliar variando otras condiciones de trabajo como la temperatura de incubación para la formación de la biomasa, o la cantidad de repollo y lechuga, de manera tal de observar si hay influencia sobre la cantidad de microorganismos formados (biomasa). Para este trabajo se usó la temperatura normal del Laboratorio de Microbiología (37°C) para la incubación. También se podría variar el tiempo de exposición a diferentes temperaturas (tiempo de incubación en horas o días) para determinar si hay variación en los resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila, 2005. "Utilización de un diseño de superficie de respuesta de Lucas en la optimización del proceso de producción de biomasa acidoláctica.
- Benno K. 1986. Cultivo de microorganismos para la producción de alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza - España. COVENIN. 1990. Norma Venezolana 1337 - 90. Método para recuento de mohos y levaduras. Ministerio de Fomento, Caracas. 6 p.
- COVENIN. 1987. Norma venezolana 902 - 87. Método para recuento de microorganismos aerobios en placas de Petri. Comisión

Venezolana de Normas Industriales. Caracas.
4 p. Dempster, A. P., Laird, N. M., & Rubin, D.
B. 1977. Maximum likelihood from
incomplete data via the EM algorithm.
Journal of the Royal Statistical Society, 39, 1-
38.

Draper, N, and Smith. 1981. Applied regression
analysis. 2da Ed, John Wiley and Sons. New
York. USA.