



XL CONVENCIÓN y EXPOATAM 2018

"Enrique Luna Flores"

12, 13 y 14 de Septiembre

WTC Boca del Río, Veracruz México

ATAM

CONDICIONES DE DESARROLLO DE *LEUCONOSTOC* SP EN DIFERENTES SUSTRATOS
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA

DEVELOPMENT CONDITIONS OF *LEUCONOSTOC* SP IN DIFERENT SUBSTRATES FOR
BIOMASS PRODUCTION

Castilla-Marroquín Jesús David¹, Muñoz-Quintana Mariela², González-Vázquez Gloria T. ¹, Cruz-Tobón Marisol¹, Hernández-Rosas Francisco¹

Colegio de Postgraduados Campus Córdoba, km 348 carretera federal Córdoba Veracruz,
Congregación Manuel León, Amatlán de los Reyes Veracruz, Código Postal 94946¹
Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz UTCV Cuitláhuac, Veracruz²
Autor de correspondencia: fhrosas@colpos.mx

Resumen

En México la principal industria agroalimentaria es la azucarera, se extiende en quince estados del país y entrega rendimientos de producción de 6, 117,048 toneladas de azúcar, siendo esta capaz de generar excedentes por 1.7 millones de toneladas que podrían ser utilizados para el desarrollo de nuevas industrias. Este excedente podría ser aprovechado para el desarrollo de biopolímeros a partir de bacterias ácido-lácticas (BAL). El presente trabajo tiene por objetivo establecer las condiciones para la obtención de exopolisacáridos (EPS) a partir de la cepa *Leuconostoc* sp, y conocer su potencial. Las BAL han sido estudiadas ampliamente por su capacidad para producir EPS, de estas, las pertenecientes al género *Leuconostoc* han demostrado ser buenas productoras de EPS. Para el experimento se contó con cinco aislamientos obtenidos a partir de jugo de caña, de acuerdo con su morfología Q1 y Q2 presentaron características propias del microorganismo de *Leuconostoc*. Para producir el EPS se prepararon caldos de cultivo con diferentes fuentes de sacarosa. Se inocularon con tres discos de 1 cm de diámetro de cada aislamiento, los matraces se pusieron en agitación a 150 rpm a 37°C para conocer la curva de crecimiento-producción de EPS. Los resultados indicaron que la cepa Q2 tiene un rendimiento mayor en la producción del polímero, además la fuente de sacarosa que tuvo mayor impacto en el rendimiento fue el jugo de caña, que produjo 0.5 g de EPS por cada 10 ml de caldo MY en 24 h.

Abstract

In Mexico, the main agri-food industry is the sugar industry, it extends in fifteen states of the country and delivers production yields of 6, 117,048 tons of sugar, being able to generate surpluses for 1.7 million tons that could be used for the development of new industries. This surplus could be used for the development of biopolymers from lactic acid bacteria (LAB). The objective of this work is to establish the conditions for obtaining exopolysaccharides (EPS) from the *Leuconostoc* sp strain, and to know its potential. The BAL have been studied extensively for their ability to produce EPS, of these, those belonging to the genus *Leuconostoc* have proven to be good producers of EPS. For the experiment there were five isolates obtained from cane juice, according to their morphology Q1 and Q2 presented characteristics of the *Leuconostoc* microorganism. Culture broths with different sources



of sucrose were prepared to produce the EPS. They were inoculated with three 1 cm diameter disks of each isolation, the flasks were placed under agitation at 150 rpm at 37°C to know the growth curve-EPS production. The results indicated that the strain Q2 has a higher yield in the production of the polymer, in addition the source of sucrose that had greater impact on the yield was the cane juice, which produced 0.5 g of EPS for each 10 ml of MY broth in 24 h.

Palabras clave

Exopolisacáridos, bacterias ácido-lácticas, biomasa.

Keywords

Exopolysaccharides, lactic acid bacteria, biomass

Introducción

La industria azucarera en México es una de las más importantes debido a su relevancia económica y social en el campo mexicano. Además, cuenta con la capacidad de abastecer la demanda nacional y es capaz de generar excedentes que se destinan al mercado regional de América del Norte. Desde la zafra 2012/2013 el excedente de producción ha llevado a la necesidad de incursionar en nuevos mercados; sin embargo, ante la disminución de los precios internacionales del azúcar, se han considerado alternativas tales como: destinar la caña a la producción sustentable de biocombustibles para el mercado nacional, para la producción de alcohol, así como la obtención de productos y subproductos, con los que se aprovecharían los altos niveles de producción alcanzados (FIRA, 2015). Para la zafra 2015-2016 se obtuvo una producción de 6,117,048 toneladas de azúcar, de los cuales se estimó un consumo nacional de 4.4 millones de toneladas, lo que nos da como resultado un excedente en la producción de 1.7 millones de toneladas (CONADESUCA, 2017). Estos excedentes se podrían utilizar como sustrato para la obtención de EPS, a partir de la cepa *Leuconostoc* sp (Lsp_Bioma1). Lo que nos permitirá estar acorde a la Agenda Nacional de Investigación, Innovación y Tránsito de Tecnología, donde se requiere la generación y aplicación de biopelículas a partir de biomoléculas (SNITT, 2016).

La calidad del jugo de caña en la cosecha se determina por la mayor concentración de sacarosa y los componentes que no son sacarosa, que deberían ser bajos. El deterioro por microorganismos es causado en gran medida, por la infección con *Leuconostoc mesenteroides*, especialmente en condiciones donde prevalecen la humedad y temperaturas cálidas. El mecanismo de degradación por parte de este microorganismo inicia al estar en contacto con la sacarosa, por un lado, la fosfoctolasa actúa sobre la glucosa en condiciones aerobias (O₂) que produce ácido láctico y en condiciones anaerobias produce ácido láctico y etanol. En presencia de la fructosa por acción del manitol deshidrogenasa forma manitol, ácido láctico, ácido acético y CO₂. Y en presencia de sacarosa por acción de la dextranosucrasa en medio acuoso se da la formación de dextrano y fructosa. Las dextranas son polisacáridos, moléculas de gran tamaño formadas por la unión de unidades de glucosa. Estos forman una cadena lineal de gran longitud, con pequeñas ramificaciones. Para las dextranas se describe un uso extenso en la industria, debido a su falta de toxicidad, se utilizan como pegamentos solubles en agua, como agentes emulsificantes en la transformación de los alimentos, y como agentes aglutinantes en productos farmacéuticos. Entre los sustratos para la producción de biomasa en el que pueden reproducirse los microorganismos se encuentran algunos productos y desechos agroindustriales ricos en carbohidratos, tales como los extractos obtenidos de caña de azúcar, por otra parte, la cachaza, el bagazo y la melaza, se han usado también para el crecimiento de microorganismos. El presente trabajo tiene como objetivo establecer las condiciones para la obtención de exopolisacáridos (EPS) a partir de la cepa *Leuconostoc* sp. y conocer su potencial.



Materiales y Métodos

Se utilizó caldo de cultivo Mayeux modificado (MY), una vez preparado el caldo de cultivo se esterilizó en autoclave.

Obtención y aislamiento del microorganismo: Se realizó un muestreo en el Ingenio San José de Abajo, donde se colectaron cinco muestras de jugo de caña con diferentes características, los jugos fueron identificados (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación de las muestras de jugo de caña

Aislamiento	Origen	Tiempo de corte
Q1	Caña corte quemada	Más de 48 horas
Q2	Caña corte quemada	Menos de 48 horas
Q3	Caña corte en verde	5 horas de corte
Q4	Caña corte en verde	5 horas de corte
Q5	Caña corte en verde y lavada	1 hora de corte

Las muestras de jugo se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo MY con el método Drigalsky para promover el crecimiento de los microorganismos con capacidad de metabolizar sacarosa de estas muestras. Las cajas Petri con MY se incubaron a 37°C por 24 h. Cumplido este tiempo se realizó la identificación morfológica para seleccionar y aislar las colonias más semejantes o parecidas a la morfología de *Leuconostoc*. A los aislados se les realizó la prueba de tinción de Gram.

Producción de biomasa: Los aislamientos se inocularon en caldo MY colocando tres discos de 1 cm de diámetro de la placa de cultivo y se dejaron en el agitador IKA KS-260® a 150 rpm a 37°C, las muestras se tomaron inicialmente a las 8 h de incubación y posteriormente se tomaron a las 12 h, las muestras sucesivas se tomaron a 24, 36, 48 y 60 h en incubación. Se realizaron tres pruebas más con diferentes fuentes de sustrato para evaluar las condiciones de desarrollo de *Leuconostoc* sp, se utilizó caldo MY con azúcar refinada 10% p/v, caldo MY con jugo de caña al 10% v/v y jugo de caña 100%.

Extracción del EPS: Para la obtención del EPS se colocaron 10 ml de muestra de caldo MY por triplicado en tubos Corning® estériles, se colocaron en la centrifuga SAVANT SC210A® a 10,000 rpm durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo se recuperó el sobrenadante.

Resultados y Discusión

Obtención y aislamiento del microorganismo: Los resultados de la tinción de Gram indicaron que tanto en las muestras Q1 Y Q2 había presencia de aislamientos correspondientes a las características de la bacteria *Leuconostoc* de acuerdo a lo descrito por (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004) donde menciona que *Leuconostoc* es una bacteria Gram positiva con morfología de cocobacilos cortos agrupado en pares o cadenas cortas. Los resultados de la tinción de Gram indicaron que tanto en las muestras Q1 y Q2 había presencia de cepas correspondientes a las características de *Leuconostoc*, pares o cadenas cortas., además en las muestras Q3, Q4 y Q5 se encontraron aislamientos con morfología semejante, con base en este resultado se decidió utilizar los aislamientos Q1, Q2, Q3 y Q5 para la producción de EPS ya que en este caso Q4 y Q5 presentaron características semejantes.

Producción de biomasa: A las 36 h se decidió hacer pruebas preliminares en la obtención de EPS, el aislamiento Q1 presentó una separación de fase con un precipitado de consistencia viscosa, por otro lado la muestra Q2 presentó un sobrenadante de color blanco y de consistencia elástica correspondiente



a lo descrito por Paulo *et al.*, (2012) y Yang *et al.*, (2015) por presentar la morfología característica de los EPS. Las muestras Q3 y Q5 formaron un precipitado en el fondo de los tubos Corning®, al analizar el precipitado en el microscopio se observó que este estaba constituido por células y se descartaron estos aislamientos para la producción de EPS. Un segundo experimento se llevó a cabo, utilizando los aislamientos Q1 y Q2, los resultados a las 36 h fueron similares a los vistos en el primer experimento. Sin embargo, se decidió utilizar el aislamiento Q2 para las pruebas con diferentes fuentes de sacarosa como sustrato.

Extracción del EPS: A las primeras 24 h la muestra Q2 presentó una consistencia viscosa muy similar a una miel, esta consistencia correspondió a lo descrito por (Leroy y De Vuyst, 2016). En las cinéticas posteriores se determinó que el uso de diferentes fuentes de sacarosa como sustrato marca un cambio importante en el rendimiento de producción de EPS, siendo el caldo MY con jugo de caña al 10% el que presentó mejores rendimientos con 0.5 g y 0.58 g, lo que corresponde a lo descrito por Paulo *et al.*, (2012) que el máximo rendimiento en la producción de EPS fue a las 24 h. En la cinética de 96 h se presentó un rendimiento inusual en MY 100% iniciando en 0.26 g y terminando con 0.50 g.

Conclusión

La fuente de sustrato es una parte crucial en el desarrollo de biomasa, los caldos de cultivo que presentaron un rendimiento considerable fueron MY 100% y MY con jugo de caña al 10%, esto nos indica la posibilidad de utilizar como sustrato el jugo de caña para la formación de biomasa y la obtención de EPS, haciendo de este modo más sustentable y económico el proceso. La producción de la biomasa influye directamente en la obtención de EPS. El aislamiento Q2 fue el que mostró un comportamiento más uniforme y buen rendimiento en la producción de biomasa, por lo que es claramente una BAL que puede utilizarse a gran escala para la obtención de biopolímeros.

Bibliografía

- CONADESUCA, 2017. Informe Estadístico 2017 Entidad Federativa final.pdf.
- FIRA, 2015. Panorama Agroalimentario Azúcar 2015.
- Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C., 2004. Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int. Dairy J.* 14, 467–494. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.10.005>
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2016. Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health 1. *J. Dairy Sci.* 99, 3229–3238. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9936>
- Paulo, E.M., Boffo, E.F., Branco, A., Valente, Â.M., Melo, I.S., Ferreira, A.G., Roque, M.R., Assis, S.A. de, 2012. Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 84, 495–508.
- SNITT, 2016. Agenda Nacional de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología Agrícola 2016-2022.
- Yang, Y., Peng, Q., Guo, Y., Han, Y., Xiao, H., Zhou, Z., 2015. Isolation and characterization of dextran produced by *Leuconostoc citreum* NM105 from manchurian sauerkraut. *Carbohydr. Polym.* 133, 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.07.061>