

Preparado microbiano con actividad ácido láctica como acelerante biológico en los procesos de fermentación para alimento animal

Microbial preparation with lactic acid activity (lab) as biological accelerant in the fermentation process to feed cattle

Fecha de recepción: 18 de junio de 2016
Fecha de aprobación: 23 de noviembre de 2016

Luis Miguel Borrás-Sandoval¹
Elaine Cristina Valiño-Cabrera²
Carlos Eduardo Rodríguez-Molano³

Resumen

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un preparado microbiano a partir de un yogurt elaborado con base en un cultivo de bacterias ácido lácticas (BAL) heterofermentativas de mediana y rápida acidificación (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*), provenientes de un cultivo comercial liofilizado (Liofast Y452B, SACCO[®]). Para el pH del preparado microbiano se realizó análisis de ANOVA, medido en 6 tiempos de fermentación (0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas) con tres repeticiones. La elaboración del inóculo parte de la elaboración del yogurt; se preparó con leche entera de vaca, se calentó a 45 °C y se inoculó con el cultivo de bacterias lácticas; el producto final de este presentó un pH de 4,63 a las 48 h ($p < 0,0001$), el cual controló el crecimiento bacteriano de patógenos y permitió un crecimiento final de bacterias ácido lácticas de 99×10^6 UFC/mL, para su uso como aditivo microbiano, como acelerante biológico en los procesos de fermentación y, posiblemente, como probiótico para la alimentación animal.

Palabras clave: aditivos microbianos; bacterias ácido lácticas; inoculantes; preparados microbianos.

1 Ph.D.(c) Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (Tunja-Boyacá, Colombia). luis.borras@uptc.edu.co.

2 Ph.D. Instituto de Ciencia Animal (Mayabeque, Cuba). evalino@ica.cu.

3 Mg. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (Tunja-Boyacá, Colombia). carlos.rodriguez@uptc.edu.co.

Abstract

The objective of this study was to develop a microbial preparation, starting from an elaborated yogurt, based on a lactic acid bacteria (BAL) culture of medium and fast acidification, *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, from a commercial lyophilized culture (Liofast Y452B, SACCO®). For the pH microbial preparation, an ANOVA analysis was carried out, by dividing the fermentation in 6 time intervals (0, 6, 12, 24, 36 and 48 hours) with three replicates. The inoculum preparation started from the elaboration of the yogurt, which was prepared with whole cow's milk, heated to 45 °C, and inoculated with lactic acid bacteria culture. The final product showed a pH of 4.63 at 48 h, ($p < 0.0001$); this product controlled the bacterial pathogens growth, and allowed a lactic acid bacteria final growth of 99×10^6 UFC/mL, to be used as microbial additive and as biological accelerator in fermentation processes, and possibly as a probiotic use for animal feed.

Keywords: inoculants; lactic acid bacteria; microbial additives; microbial preparations.

Cómo citar este artículo:

Borrás-Sandoval LM, Valiño-Cabrera EC, Rodríguez-Molano CE. Preparado microbiano con actividad ácido láctica como acelerante biológico en los procesos de fermentación para alimento animal. Rev. Cien. Agri. 2017; 14(1): 7-13.

I. Introducción

Mediante la adición de preparados microbianos ricos en bacterias ácido lácticas (BAL) es posible modificar o alterar los procesos fermentativos sólidos, con el fin de mejorar la calidad e inocuidad de estos. Al respecto, se presenta el desarrollo de un producto biológicamente activo, denominado VITAFER®, que está compuesto por lactobacilos, levaduras, ácidos orgánicos de cadena corta y pH bajo, y es capaz de controlar el desarrollo de patógenos como *Escherichia Coli* y de reducir apreciablemente la incidencia de diarreas, aumentar la ganancia de peso vivo e incrementar la retención de energía y nitrógeno en los animales (1).

Se han aislado y caracterizado cepas de BAL a partir de preparados microbianos nativos elaborados a base de residuos agroindustriales (como suero de leche, estiércol bovino y contenido ruminal) y diseñados como inoculantes biológicos para procesos de ensilaje de residuales orgánicos; además, se ha propuesto que podrían ser estudiados otros residuos de cosechas con este tipo de inoculantes (2).

La mayoría de las BAL son mesofílicas, aunque algunas son capaces de crecer a temperaturas de 5 °C y otras a 45 °C; toleran bien concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de bacterias; algunas pueden crecer a pH de 3, otras entre 6 y 9, pero la mayoría crece a un pH entre 4 y 4,5, por lo que pueden ser desplazadas de los hábitats que colonizan (3).

Para que un organismo sea considerado probiótico debe cumplir, primero, una caracterización *in vitro*, la cual contemplará estabilidad fenotípica y genotípica, seguida de patrones de utilización de carbohidratos y proteínas, tales como resistencia a la acidez gástrica y a la bilis, adhesión al epitelio intestinal, resistencia a lisozima y capacidad de

utilizar prebióticos; estos dos últimos pueden ser opcionales. Además, pruebas o ensayos *in vivo* e *in vitro* que demuestren el o los efectos probióticos adjudicados, y no presentar resistencia a antibióticos ni determinantes de patogenicidad (4).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un preparado microbiano a partir de un yogurt elaborado con base en un cultivo de bacterias ácido lácticas (BAL). El Grupo de investigación pretende con el presente trabajo dar inicio a una línea de investigación en desarrollo de preparados microbianos con potencial uso en la alimentación animal.

II. Materiales y métodos

A. Microorganismos

Basado en un cultivo de BAL heterofermentativas de mediana y rápida acidificación: *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (comercial liofilizado, Liofast Y452B, SACCO®).

B. Preparación del inóculo

La preparación del inóculo parte de la elaboración del yogurt, que se hizo con leche entera de vaca, se calentó a 45 °C y se inoculó con el cultivo de BAL, llevándose a una cava de poliespuma (icopor) para el mantenimiento de la temperatura durante 6-8 h.

C. Preparado microbiano

Una vez obtenido el yogurt se procedió a mezclarlo con los componentes descritos en la Tabla I, se llevó a un volumen final con agua corriente (solvente del sistema) y se incubó a una temperatura ambiente promedio de 15 °C durante 48 horas, hasta alcanzar estabilización del pH a 4,5, con agitación 3 veces al día por 20 minutos.

Tabla I. Componentes del preparado microbiano con actividad ácido láctica.

Componentes del preparado microbiano	Aportes de los componentes
Melaza	Fuente de azúcares fermentables
Harina de maíz	Fuente de energía
Harina de fíijol	Fuente de proteína
Urea	Fuente NNP* para la fermentación
Sulfato de Mg	Fuente de azufre
Premezcla mineral (bovinos)	Fuente de elementos inorgánicos y minerales
Inóculo (Yogurt)	Fuente de BAL
Agua	Solvente del sistema

*Nitrógeno no proteico.

D. Análisis microbiológico

Se le realizó análisis microbiológico al preparado microbiano a las 48 h de fermentación en un laboratorio certificado de Control Microbiológico ubicado en Boyacá, Colombia; para aerobios mesófilos (UFC/mL), (AOAC 966.23.C: 2001); coliformes totales (NMP), (ICMSF NMP: 2000); coliformes totales y fecales (NMP), (ICMSF NMP: 2000); esporas de *Clostridium* Sulfito reductor (UFC/ml), (ISO 15213: 2003); hongos y levaduras (UFC/g), (ISO 7954: 1987); *Salmonella* (AS 5013.10: 2009), y bacterias ácido lácticas (NTC 5034: 2002).

E. Análisis estadístico

Para el pH del preparado microbiano se realizó análisis de ANOVA, medido en 6 tiempos de fermentación (0, 6, 12, 24, 36 y 48 horas), con tres

repeticiones a temperatura ambiente. El paquete estadístico utilizado fue INFOSTAT, versión 2012 (5).

III. Resultados y discusión

Las BAL están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos ambientes (6). En la Tabla II se muestran los resultados del análisis microbiológico realizado al preparado microbiano; como se observa, existe una alta concentración de BAL. Las BAL empleadas para este estudio son del género *Lactobacillus* y *Streptococcus*; para su multiplicación requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento. La leche es el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL, excelentes medio de crecimiento y producción de metabolitos (7). Estas bacterias son generalmente consideradas sanitariamente seguras; es por ello que se escogieron como cultivos iniciadores del inóculo para el preparado microbiano.

Tabla II. Análisis microbiológico preparado microbiano con actividad ácido láctica.

Análisis microbiológico	Conteo microbiano
Aerobios mesófilos	50x10 ⁶ UFC/mL
Coliformes totales	> 1.100 NMP*
Coliformes fecales	23 NMP
Esporas <i>Clostridium</i> Sulfito reductor	< 10 UFC/ml
Hongos y levaduras	Hongos: 20 Levaduras: 11x10 ³ UFC/g
<i>Salmonella</i>	Ausente
Bacterias ácido lácticas	99x10 ⁶ UFC/ml

*Número más probable

Se observan en estos resultados recuentos de bacterias aerobias mesófilas, que en un proceso de fermentación expresan la carga total de microorganismos en presencia de oxígeno y a temperaturas que oscilan entre 15 y 45 °C; su importancia radica en que expresan la actividad microbiana total en un proceso de tipo biológico (8).

Los resultados muestran la presencia de levaduras y hongos en número permisible con efecto benéfico para el posterior proceso fermentativo. Estudios consultados manifiestan que todos los preparados microbianos evidencian la presencia de consorcios microbianos y no de especies únicas de BAL, lo cual presenta ventajas posteriores en la inoculación en los procesos fermentativos, como el ensilaje (2). En el preparado microbial desarrollado no hay presencia de esporas de *Clostridium*, al igual que no se detectó presencia de *Salmonella*, resultado que avala su inocuidad para utilizarlo como inóculo. Estudios con BAL han planteado que cuando se utilizan lactobacilos (*L. reuterii*) presentes en el tracto gastrointestinal, así como en los productos cárnicos, y se sintetiza reuterina (β -hidroxipropionaldehído) en

cantidades superiores a la que el lactobacilo es capaz de reducir, el exceso se excreta al medio (9). La reuterina es un metabolito neutro y se asocia directamente con el metabolismo del glicerol; además, tiene amplio espectro de inhibición, es activa frente a microorganismos del género *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria* y *Candida* y frente a algunos protozoos como *Trypanosoma*. Esta sustancia actúa inhibiendo la enzima ribonucleótido reductasa, que cataliza el primer paso en la síntesis de ADN, lo que explicaría su amplio espectro de actividad; además, las BAL producen una serie de sustancias antimicrobianas, entre las que se encuentran el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el diacetilo, la reuterina, los ácidos orgánicos (como el láctico y el acético), y las sustancias de naturaleza proteica conocidas como bacteriocinas (10, 11 y 12).

Durante el proceso de elaboración del preparado microbiano se midió la concentración hidrogeniónica para garantizar la estabilidad del pH hasta el final del proceso, como se observa en la Figura 1. El pH en las primeras horas se incrementó hasta valores de pH = 6,11; después de las 24 h se inicia un rápido descenso hasta valores de 4,56, a las 48 h, debido a la actividad microbiana con el predominio de las BAL.

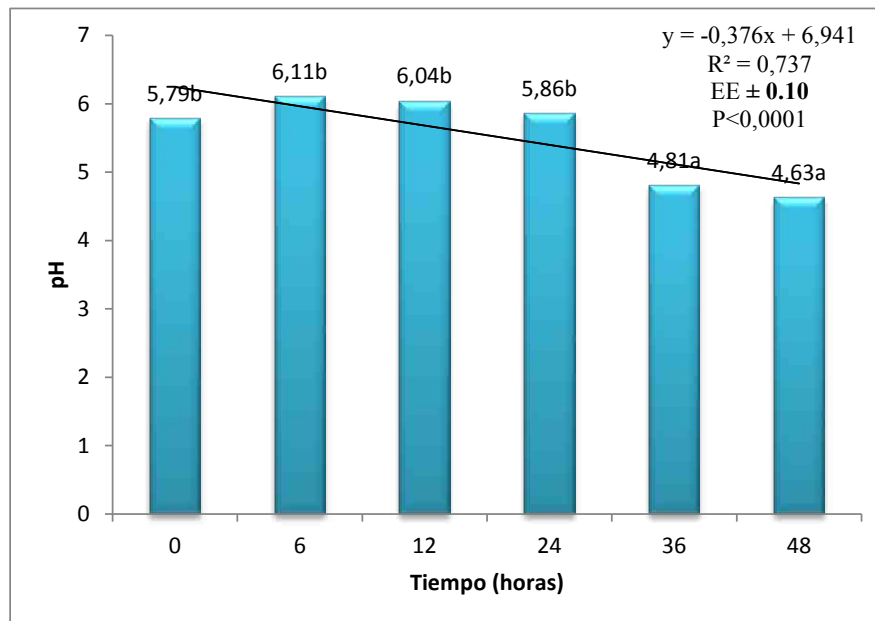


Fig. 1. Comportamiento del pH en el preparado microbial durante 48 h de estabilización del proceso.

Trabajos similares muestran varios preparados microbianos que redujeron el pH a las 48 y 96 horas, con diferentes temperaturas del lugar de la investigación: 26 °C y 16 °C, respectivamente (13, 14), comportamiento similar al presente trabajo, donde se observó el descenso del pH progresivo hasta las 48 h, cuando se estabilizó; sin embargo, en un trabajo realizado en el Ecuador encontraron una tendencia diferente, donde el pH sube inicialmente a la hora 8 del proceso, para luego descender lentamente hacia el final de la fermentación (96 h), con una temperatura ambiental de 14 °C del lugar de la investigación, condiciones similares a las descritas para este trabajo (2).

En conclusión, el pH bajo encontrado, 4,63, fue capaz de limitar el crecimiento de patógenos; además de las características descritas de alta concentración de BAL, una población menor de 106 UFC.mL⁻¹ de hongos y levaduras son características por las cuales se previó un buen rendimiento como inoculantes microbianos especialmente para procesos fermentativos.

Por otro lado, el preparado microbiano presenta una población final de 99x10⁶ UFC/mL de BAL a las 48 h, lo cual expresa un potencial inoculante probiótico; esto se puede inferir de la respuesta obtenida en un trabajo de preparados microbianos con dosis de 15 ml por animal por kg/pv, correspondiente a 6,0x10⁷ de UFC de BAL, que incrementó su eficacia en la respuesta productiva y sanitaria durante la etapa de posdestete porcino (15).

IV. Conclusión

El preparado microbiano desarrollado tiene efecto benéfico para el proceso de fermentación y ausencia de patógenos potenciales producto de la acidez del medio, características que avalan su calidad para utilizarlo como inóculo. Las características anteriores podrían dar un posible potencial probiótico, todo esto aplicado en la alimentación animal.

Referencias

- (1) Elías A., Herrera FR. Producción de alimentos para animales a través de procesos biotecnológicos sencillos con el empleo de microorganismos beneficiosos activados (MEBA). *Rev. Cuban Journal of Agricultural Science*. 2008; 41(1): 8-13.
- (2) Díaz B., Elías A., Valiño E. Consorcios microbianos con actividad ácido-láctica promisorios aislados desde inoculantes bacterianos nativos para ensilajes. *Rev. Ciencia y Agricultura*. 2014; 11(1): 17-25. DOI: <http://doi.org/10.19053/01228420.3484>.
- (3) Jay JM. *Modern food microbiology*, 6th edition. Aspen publication. Gaithersburg, Maryland, USA. 2000; 45-46. DOI: <http://doi.org/10.1007/978-1-4615-4427-2>.
- (4) FAO. Los Probióticos-Agents beneficiosos para la salud. CERELA. Disponible en <http://www.cerela.org.ar/ciencia/probioticos.htm>. [Consultado en diciembre 2015]. 2001.
- (5) Di Rienzo JA, Casanoves F., Balzarini MG, Gonzalez L., Tablada M., Robledo CW. *InfoStat versión 2012*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- (6) Azadnia P., Zamani MH, Shah G., Khalegh M., Karimi M., Taarof N. Isolation and identification of thermophilic Lactobacilli from traditional yogurts of tribes of Kaserum. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2011; 10: 774-776. DOI: <http://doi.org/10.3923/javaa.2011.774.776>.
- (7) Vásquez S., Suárez H., Zapata S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*. 2009; 36: 64-71.
- (8) Nkosi B., Meeske R. Effects of ensiling totally mixed potato hash ration with or without a heterofermentative bacterial inoculant on silage fermentation, aerobic stability, growth performance and digestibility in lambs. *Animal Feed Science and Technology*. 2010; 161: 38-48. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.07.015>.
- (9) Requena T., Peláez C. Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Rev. Española Cienc. Tecnol. Alimentos*. 1995; 35: 19-44.
- (10) Ávila FA, Paulillo AC, Schocken RP, Lucas FA, Orgaz A., Quintana J. A comparative study of the efficiency of a probiotic and the anti-K99 and anti-A14 vaccines in the control of diarrhea in calves

- in Brazil. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* 1995; 48: 239-243.
- (11) Rolfe R. The role of probiotic cultures in the control of gastroint. *J Nutr.* 2000; 130: 396-402.
- (12) González B., Gómez M., Jiménez Z. Bacteriocinas de probióticos. *RESPYN.* 2003; 4(2): 396-402.
- (13) Auquilla R. Aprovechamiento biotecnológico de residuos agroindustriales para alimentación de rumiantes. Tesis de grado. ESPOCH. Riobamba, Ecuador. 2002.
- (14) Veloz V. Evaluación de ensilaje de residuos agroindustriales en bovinos de carne. Tesis de grado. ESPOCH, Riobamba, Ecuador. 2004.
- (15) Flores L., García Y., Proaño F., Caicedo W. Evaluación de tres dosis de un preparado microbiano, obtenido en Ecuador, en la respuesta productiva y sanitaria de cerdos en posdestete. *Rev. Ciencia y Agricultura.* 2015; 12(2): 59-70. DOI: <http://doi.org/10.19053/01228420.4392>.