

Evaluación del crecimiento de *Xanthomonas campestris* en tres diferentes residuos alimentarios

Ramírez Zapata, E. L., Delgado Portales, R. E., Moscosa Santillán, M., Loredó Becerra, A., Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Dr. Manuel Nava # 6, Zona Universitaria, 78210, San Luis Potosí, S. L. P., México. Tel:(444) 826-2440 al 46, Ext. 6546
Correo: elsa.ramirez@uaslp.mx

Palabras clave: Goma xantana, Miles & Misra, residuos alimentarios.

Introducción

La goma xantana es un importante biopolímero producido por la bacteria *Xanthomonas campestris* a través de una fermentación. Sus usos en el área de alimentos son principalmente como agente estabilizador y espesante en aderezos y ensaladas, ya que evita la separación del aceite y de partículas sólidas insolubles [1]. Para producir la goma xantana, es necesario proveer a *Xanthomonas campestris* de diferentes macronutrientes como carbono (glucosa y sacarosa son los más utilizados) y nitrógeno, así como micronutrientes (por ejemplo, potasio, hierro y sales de calcio). De acuerdo con López-Munguía y col. [2], son preferibles concentraciones de carbono de 2 a 4%, ya que concentraciones superiores inhiben el crecimiento.

Además del medio de cultivo, el proceso de elaboración de la goma xantana involucra altos costos como la compra del sustrato y la adquisición de la infraestructura necesaria para la fermentación, así como el mantenimiento de la asepsia. Debido a ello, la implementación de estrategias adecuadas para la optimización del bioproceso ha sido adoptadas. Una de estas técnicas consiste en utilizar otro tipo de sustratos que sean más económicos y que permitan obtener altos rendimientos del producto, a la vez que minimicen los costos. En este sentido, se han estudiado diferentes residuos de la industria alimentaria para la producción de diferentes polisacáridos, tales como la remolacha azucarera, la pulpa de melocotón, la cáscara de piña, el suero lácteo, entre otros [3].

Otros residuos que pudieran ser prometedores para su aprovechamiento en la generación de productos con alto valor agregado son 1) tomates en mal estado, ya que de acuerdo con la FAOSTAT [4], se desperdician cerca del 50 % de la cosecha de tomates, debido principalmente a daños mecánicos y fisiológicos y a menudo no existe un mercado alternativo para este tipo de productos; 2) mucílago de nopal generado durante las etapas de procesamiento de nopal verdura, ya que este residuo posee un elevado contenido de carbohidratos y fibra y 3) suero lácteo, el cual, al ser descargado en sistemas acuáticos puede provocar la muerte de la fauna en el ecosistema y al descargarlo en los suelos puede contaminar aguas freáticas, convirtiéndose en una amenaza para la salud de los animales y los humanos.

Cada uno de los sustratos mencionados, pueden ser aprovechados para la generación de otros productos, tales como la goma xantana, sin embargo, antes de optimizar el proceso de fermentación, es necesario evaluar la viabilidad de crecimiento de *Xanthomonas campestris* en diferentes sustratos, para conocer la factibilidad de producción a una escala piloto o industrial. Debido lo anterior, el objetivo de este trabajo es evaluar el crecimiento de *Xanthomonas campestris* en tres residuos de la industria alimentaria: tomates en mal estado, mucílago de nopal y suero lácteo en fermentaciones a nivel laboratorio y a nivel piloto.

Metodología

Se elaboraron 3 medios de cultivo: caldo de tomate, caldo de nopal y suero lácteo. Para el primero, se adquirieron en mercados locales tomates tipo bola (*Lycopersicon esculentum*) que tuvieran defectos de calidad como golpes, magulladuras, defectos de coloración, protuberancias, etc. pero que no tuvieran desarrollo microbiano. Los tomates fueron lavados con agua y jabón para retirar tierra y/o materia extraña. Posteriormente, fueron cocidos con agua destilada en una relación 1:2 (peso del tomate: volumen de agua destilada) a 80-85°C durante 30 minutos. Una vez cocidos, se prensaron y se maceraron, esto se realizó con el objetivo de extraer las partes solubles del tomate. Posteriormente se recuperó el líquido filtrando y se ajustó el pH (pH-metro ThermoScientific, OrionStar A211, USA) a 7 utilizando NaOH 1N (Reactivo analítico, Analytika, México). Para separar partículas sólidas que quedaron suspendidas y que no interfirieran en el

proceso, el caldo fue centrifugado (Thermo Fisher Scientific Legend RT+, USA) a 10 000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, el caldo se esterilizó a 121°C por 15 minutos.

Para la preparación del segundo caldo se utilizó nopal (*Opuntia ficus-indica*) cortado en trozos en un centro comercial de la localidad. Se coció con agua destilada (80-85°C durante 45 minutos) en una relación 1:2 (peso del nopal: volumen de agua destilada), se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se separó el nopal del caldo pasándolo por un filtro. Debido al pH ácido del nopal, se ajustó su pH (pH-metro ThermoScientific, OrionStar A211, USA) a 7 con NaOH 1N (Reactivo analítico, Analytyka, México). Posteriormente, se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos para separar sólidos suspendidos en el mismo y que no interfirieran durante los experimentos. Finalmente, el caldo se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

Para el tercer medio de cultivo, se utilizó suero lácteo ácido procedente de la elaboración de queso Oaxaca producido en la región. Para separar restos de queso y de requesón que pudiera tener el lactosuero y que pudiera afectar posteriormente, se coagularon las proteínas sometiendo el suero a un proceso térmico, calentándolo a 80°C durante 20 minutos. Una vez coaguladas las proteínas, el suero fue filtrado a vacío utilizando filtros de diferente tamaño de poro, separando así el requesón y el suero lácteo. Posteriormente, debido a su carácter ácido, se tuvo que ajustar el pH (pH-metro ThermoScientific, OrionStar A211, USA) del suero a 7, con NaOH 1N (Reactivo analítico, Analytyka, México). Finalmente, el suero fue esterilizado a 10 psi (115°C) durante 20 minutos.

La esterilidad de todos los medios de cultivo fue verificada por recuentos de: Organismos Mesófilos Aerobios (NOM-092-SSA1-1994), Organismos Coliformes Totales (NOM-113-SSA1-1994) y Mohos y Levaduras (NOM-111-SSA1-1994) [5]. Además, se analizó la composición química de los medios de cultivo (tabla 1).

Tabla 1. Métodos utilizados para los análisis fisicoquímicos de los medios de cultivo

<i>Determinación</i>	<i>Método</i>	<i>Referencia</i>
Humedad	Estufa	A.O.A.C. 934.06 [6]
Proteína	Kjeldahl (Ajustado a micro-escala)	A.O.A.C. 920.152 [6]
Grasa	Soxhlet (Ajustado a micro-escala)	A.O.A.C. 963.15 [6]
Carbohidratos totales	Fehling-Soxhlet (Ajustado a micro-escala)	A.O.A.C. 923.09 [6]

Para la preparación del inóculo, primero se preparó una suspensión bacteriana basada en la escala de McFarland, suspendiendo colonias de una estria cruzada previamente obtenida en agar YM (DIFCO, Becton Dickinson Company, USA) y transfiriéndolas a tubos con solución salina al 0.85 % (reactivo analítico, Monterrey, México), hasta alcanzar una turbidez aproximada de 5 en la escala de McFarland. Para conocer la concentración celular de la suspensión bacteriana, se realizó una siembra utilizando el método Miles y Misra [7].

Posteriormente, se determinó la concentración celular inicial en dicha suspensión bacteriana, sembrándola en placas de Agar YM (DIFCO, Becton Dickinson Company, USA), utilizando la técnica de siembra de Miles & Misra [7] y el método de preparación de diluciones señalado en la NOM-110-SSA1-1994, utilizando peptona de caseína (BIOXON, Becton Dickinson de México, México) como diluyen. Una vez conocida la concentración celular, se realizaron los cálculos pertinentes para diluir esta concentración hasta 1×10^8 UFC/mL, utilizando como diluyente agua con peptona de caseína (BIOXON, Becton Dickinson de México, México) al 0.1%.

La fermentación se llevó a cabo a dos niveles: a escala laboratorio y a nivel piloto. Para el estudio a nivel laboratorio se utilizó un matraz Erlenmeyer de 500 mL estéril, en el cual se agregaron 90 mL del medio de cultivo a probar y 10 mL del inóculo previamente estandarizado a la concentración celular inicial. El medio de cultivo se mezcló con el inóculo, agitándolos manualmente y una vez homogenizado el caldo, se realizó una siembra de este utilizando la técnica de siembra Miles y Misra [7], para verificar la concentración celular inicial. La fermentación se llevó a cabo a 28 °C por 72 horas en una incubadora (Environmental Shaker Incubator, Modelo SI-45).

Para la fermentación a nivel piloto se utilizó un matraz Kitasato estéril de 2 L de capacidad, se agregaron 900 mL del medio de cultivo a probar y 100 mL del inóculo previamente estandarizado. La mezcla se agitó en una placa de agitación (Thermolyne Nuova II modelo SP184425) durante aproximadamente 5 minutos.

Una vez homogenizado el caldo, se realizó una siembra de este utilizando la técnica Miles y Misra [7], para verificar la concentración celular al inicio de la fermentación. Posteriormente, en un ambiente estéril, se vertió el caldo en el biorreactor (Bioreactor MBF-500ME, Wheaton, Japón) de 5 litros previamente esterilizado. La fermentación se llevó a cabo a 28 °C por 72 horas y con una velocidad de agitación de 150 rpm.

Una vez concluida la fermentación, se realizó una siembra del medio de cultivo fermentado utilizando nuevamente la técnica de Miles y Misra [7] en Agar YM (DIFCO, Becton Dickinson Company, USA), con el objetivo de conocer la concentración celular al final de la fermentación.

Resultados y discusión

En la tabla 2 se muestran los resultados del análisis de la calidad sanitaria de los medios de cultivo. Como se puede apreciar, los tres medios de cultivo propuestos eran estériles, asegurando con esto que durante la fermentación no crecieran otros microorganismos distintos a *Xanthomonas campestris*.

Tabla 2. Resultados del análisis de la calidad sanitaria de los medios de cultivo

Determinación	Caldo de tomate	Caldo de nopal	Suero lácteo
Organismos Mesofílicos Aerobios	<1 UFC/g	<1 UFC/g	<1 UFC/g
Organismos Coliformes Totales	<1 UFC/g	<1 UFC/g	<1 UFC/g
Mohos y Levaduras	<1 UFC/g	<1 UFC/g	<1 UFC/g

En cuanto a la composición química de los medios de cultivo, mostrada en la tabla 3, se puede apreciar que en los tres medios destaca el elevado contenido de agua y que, en carbohidratos totales, el suero lácteo fue el que mostró tener un mayor contenido. Sin embargo, dicho porcentaje podría corresponder meramente a la lactosa, en cambio, en el caso del caldo de tomate, probablemente el contenido de carbohidratos corresponde a azúcares solubles, como la glucosa y la fructosa.

Tabla 3. Resultados del fisicoquímico de los medios de cultivo

Determinación	Caldo de tomate	Caldo de nopal	Suero lácteo
Agua	98.02 %	99.13 %	94.55 %
Cenizas	1.11 %	0.21 %	0.52 %
Carbohidratos Totales	0.53 %	0.30 %	4.40 %
Proteína (N X 5.83)	0.22 %	0.33 %	0.36 %
Grasa Total	0.12 %	0.03 %	0.17 %

En cuanto al crecimiento microbiano, en la tabla 4 se puede apreciar que la cepa utilizada *Xanthomonas campestris* fue capaz de crecer en los tres medios de cultivo. El mayor crecimiento celular se encontró en el caldo de nopal, con una diferencia entre el conteo inicial y el conteo final celular de 2.22 ciclos logarítmicos. Esto puede deberse a que el mucílago de nopal (constituido por diferentes carbohidratos) puede ser asimilado y utilizado como fuente de carbono. Por otra parte, el contenido de nitrógeno y las sales presentes en este medio de cultivo pudieron favorecer significativamente el crecimiento celular.

El segundo medio de cultivo con mayor crecimiento celular es el caldo de tomate, en donde se obtuvo un incremento de 1.65 log UFC/mL. Este medio era donde se esperaba el mayor crecimiento celular, ya que los carbohidratos presentes (glucosa y fructosa principalmente) se encontraban disponibles de forma libre, y no unidos a una cadena que requiriera romperse mediante el uso de enzimas específicas, como en el caso del mucílago del nopal. Además, en todos los componentes determinados (carbohidratos totales, proteínas, grasa total y cenizas), el caldo de tomate presentaba valores superiores a los del caldo de nopal, por lo tanto, era un medio de cultivo más nutritivo para la bacteria.

En cuanto al suero lácteo, existen estudios donde se ha demostrado que *Xanthomonas campestris* es capaz de utilizar este como sustrato [8]. Sin embargo, en este trabajo se observó que la cepa utilizada presentó dificultades para crecer en dicho medio de cultivo, lo cual se podría deber a una capacidad limitada para asimilar la lactosa por la carencia de la enzima β -galactosidasa.

Tabla 4. Crecimiento celular en los medios de cultivo propuestos a nivel laboratorio

Medio de cultivo	Cc _o (Log UFC/mL)	Cc _f (Log UFC/mL)	Δ celular (Log UFC/mL)
Suero lácteo	6.98	8.22	1.24
Caldo de tomate	6.97	8.62	1.65
Caldo de nopal	7.01	9.23	2.22

Cc_o= Concentración celular inicial (Log UFC/mL); Cc_f= Concentración celular final (Log UFC/mL); Δ celular= diferencia entre la Cc_f y la Cc_o (Log UFC/mL).

Respecto al crecimiento del microorganismo a nivel piloto, se puede apreciar en la tabla 5 que, la utilización de un biorreactor con agitación y aireación modificó el orden de crecimiento celular, resultando totalmente desfavorable para el caldo de nopal y favorable para el caldo de tomate.

Probablemente el cambio se debe a las características del mucílago de nopal, ya que la relativamente alta viscosidad puede dificultar la agitación del medio de cultivo e impedir una adecuada distribución del tamaño de las burbujas de aire, trayendo como consecuencia un problema de absorción de oxígeno en el medio líquido. Como resultado, al no tener el oxígeno necesario, la bacteria puede sufrir una degradación celular, teniendo como consecuencia la muerte celular.

El caso contrario se encontró con el caldo de tomate, ya que al ser un medio de cultivo líquido de baja viscosidad no presenta problemas para la ruptura de las burbujas ni para la integración del aire dentro del líquido. En consecuencia, la bacteria fue capaz de crecer en cantidades incluso superiores a los valores encontrados para la fermentación a nivel laboratorio. Cabe señalar que, para el primer caso, a nivel laboratorio, el único oxígeno disponible era el que se encontraba en el matraz, en cambio, para el biorreactor el oxígeno era suministrado continuamente.

Respecto al suero lácteo, en la misma tabla se puede apreciar que, aunque su crecimiento mejoró al utilizar el biorreactor con el flujo de aire, no fue superior al crecimiento celular observado en el caldo de tomate.

Tabla 5. Crecimiento celular en los medios de cultivo propuestos a nivel piloto

Medio de cultivo	Cc _o (Log UFC/mL)	Cc _f (Log UFC/mL)	Δ celular (Log UFC/mL)
Suero lácteo	6.92	8.68	1.76
Caldo de tomate	6.97	8.86	1.89
Caldo de nopal	6.98	5.12	-1.86

Cc_o= Concentración celular inicial (Log UFC/mL); Cc_f= Concentración celular final (Log UFC/mL); Δ celular= diferencia entre la Cc_f y la Cc_o (Log UFC/mL).

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que, de los sustratos estudiados, el caldo de tomate es el que permite un mejor crecimiento microbiano y probablemente, una mayor producción de goma xantana. Además, se encontró que el lactosuero no es un medio de cultivo adecuado para la cepa utilizada, ya que no posee los sistemas enzimáticos necesarios para la fermentación de la lactosa. Por otra parte, a pesar de que el caldo de nopal es rico en carbohidratos, la fermentación a nivel piloto demostró que no es un medio de cultivo factible. Finalmente, se demostró que utilizar sistemas aireados, tales como el biorreactor, mejora notablemente el crecimiento microbiano en este tipo de fermentaciones.

Referencias

1. Katzbauer B. (1997). Properties and Applications of Xanthan Gum. *Polymer Degradation and Stability*. **59**: 81-84.

2. López-Munguía Canales A., Brito de la Fuente E., Galindo Fentanes E. Biopolímeros. En García Garibay M., Quintero Ramírez R., López-Munguía Canales A. (2005). *Biotecnología Alimentaria*. Primera Edición. 431-439. Limusa, México.
3. Kosseva M. R. (2009). Processing Food Wastes. *Advances in Food and Nutrition Research*. **58**:57-136.
4. FAOSTAT. División de estadísticas. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2014. Disponible en: faostat3.fao.org/home/E Consultado:30 Junio 2021.
5. Diario Oficial de la Federación. Catálogo de Normas Oficiales Mexicanas, Secretaria de Salud, Bienes y Servicios. [online]. <https://www.dof.gob.mx/> Consultado:30 junio 2021.
6. Official Methods of Analysis (1990) 15th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Helrich K., Method 920.152, 923.09, 934.06 y 963.15.
7. Hedges, A. J., Shannon, R., Hobbs, R. P. (1978). Comparison of the precision obtained in counting viable bacteria by the spiral plate maker, the droplette and the Miles & Misra methods. *Journal of Applied Bacteriology*. **45**: 57-65.
8. Mesomo M., Fernandes Silva M., Boni G., Ferreira Padilha F., Mazutti M., Mossi A., Oliveira D., Cansian R. L., Di Luccio M., Treichel H. 2009. Xanthan gum Produced by *Xanthomonas campestris* from Cheese Whey: Production Optimization and Rheological Characterization. *Science of Food and Agriculture*. **89**: 2440-2445.