

Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos¹

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Henry Jurado-Gómez^{2, 3}, Fredy Calpa-Yamá³, Aura Chaspuengal-Tulcán³

¹Financiado por la Vicerrectoría de Posgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI), Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

²Programa de Zootecnia, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Facultad de Ciencias Pecuarias, Universidad de Nariño, Pasto, Colombia.

³Grupo de investigación en Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal - Fisiología y Etología Animal (PROBIOTEC-FISE), Pasto, Colombia.

henryjugam@gmail.com

(Recibido: 2 de Mayo de 2014 Aprobado: 21 de Agosto de 2014 Actualizado: 25 de junio de 2015)

DOI: 10.17151/vetzo.2014.8.2.2

RESUMEN: El objetivo de la presente investigación fue evaluar las mejores condiciones de la cinética de fermentación de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos (MRS y Pro). En cada medio se evaluó el máximo crecimiento en relación con producción de biomasa, conteo de microorganismos viables en placa (UFC/ml), determinación de pH, consumo de azúcares totales (mg/L) y producción de ácido láctico (%). Se usó un diseño de bloques al azar con dos tratamientos (medios Pro y MRS), 11 bloques correspondientes a los tiempos de evaluación y 2 réplicas por cada uno. La prueba se efectuó cada 2:24 horas durante un día; se obtuvo la fase exponencial de crecimiento (UFC/ml) al tiempo 7 (16:48 horas) y tiempo 6 (14:24 horas) de la cinética, alcanzando valores de $3,0 \times 10^{11}$ y $7,3 \times 10^8$ UFC/ml respectivamente, y una concentración de proteínas de 46,95 g/L y 45,83 g/L para el tiempo 7 y 6 respectivamente. Los resultados estadísticos no encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$). La prueba por HPLC indicó que las cepas de *L. casei* eran homofermentivas, presentando una producción de ácido láctico superior al 80%. En la muestra P (*L. casei*), el pico No. 9 (tr – tiempo de retención– = 12,1 min), presenta un tiempo de retención similar al del pico No. 2 del estándar de calibración, por lo que posiblemente el péptido de esta muestra presente una cadena de aminoácidos compuesta por VAL-TIR-VAL (PM = 379,5). El pico No. 3 del estándar, que corresponde al péptido metionina encefalina acetato, de composición (TIR-GLI-GLI-FA-MET) M6638 (PM = 573,7 para la base libre), presenta un tiempo de retención similar al del pico No. 12 de la muestra

P (*L. casei*). Los valores en los dos medios indican ser adecuados para la preparación de inóculos probióticos.

Palabras clave: bacteria, biomasa, salud, fermentación

Determination of kinetic parameters of *Lactobacillus casei* in two probiotics media

ABSTRACT: The objective of this investigation was to evaluate the best conditions of the kinetic fermentation of *Lactobacillus casei* in two probiotic media (MRS and Pro). In each media maximal growth related to biomass production, counting of viable microorganisms in plaque (CFU/ml), determination of pH, total sugar consumption (mg/L) and lactic acid production (%) was evaluated. A randomized blocks design with two treatments (media Pro and MRS), eleven blocks corresponding to the time of the evaluation and 2 replicas for each one, was used. The test was carried out every 2:24 hours during one day; the exponential phase of growth (CFU/ml) was obtained at period 7 (16:48 hours) and period 6 (14:24 hours) of kinetics, reaching values of 3.0×10^{11} and 7.3×10^8 CFU/ml respectively, and a protein concentration of 46.95g/L and 45.83g/L for the period 7 and 6 respectively. Statistical results did not show significant differences ($P > 0.05$). The HPL C test indicated that *L. casei* strains were homofermentative presenting a lactic acid production higher than 80%. In sample P (*L. casei*), peak No. 9 (rt= retention time= 12.1min), has a similar retention time to the peak No 2 from the calibration standard, reason why possibly, the peptides of this sample show an amino acids chain composed of VAL-TIR-VAL (MW =379.5). The peak No. 3, of the standard which corresponds to the peptide methionine enkephalin acetate, composition (TIR-GLY-GLY-FA-MET) M6638 (MW = 573.7 for the free base) has a retention time similar to that of peak No. 12 from sample P (*L. casei*). The values in the two media indicate they are suitable for the preparation of inoculum probiotic.

Key words: bacterium, biomass, health, fermentation

Introducción

Lactobacillus casei es una bacteria ácido-láctica que posee el estatus de Generalmente Reconocida como Segura (GRAS), además, de catalogarse como probiótico; este último corresponde al cultivo de microorganismos vivos (bacterias, hongos y levaduras) que actúan directa o indirectamente sobre bacterias patógenas Gram-negativas en el tubo digestivo, actuando por competición física o de nutrientes, por secreción de bacteriocinas, producción de ácidos o por inmunidad cruzada (Susamo & Ocampo, 2006). La importancia de su uso en la alimentación de animales de granja se basa en las propiedades que se

les atribuyen para mejorar la eficiencia de conversión alimenticia y como promotores del crecimiento (Rosmini et al., 2004).

Lactobacillus casei ha sido ampliamente estudiada y utilizada en la industria en procesos de fermentación a partir de varios sustratos como harinas, leche, carnes, conservas. Este microorganismo se encuentra de forma natural en vegetales fermentados, leche, carne, intestino, boca y ambiente (Collins et al., 1989). En estudios previos se ha reportado el uso de *L. casei* para la fermentación de suero de leche y la optimización en la producción de biomasa a partir de este sustrato (Ruales & Vallejo, 2007). Estudios *in vivo* e *in vitro* sobre sustratos como suero de leche han demostrado su capacidad probiótica al aprovechar los nutrientes y generar productos o metabolitos de interés (Escobar, 2008).

La investigación tuvo como objetivos: evaluar las mejores condiciones de la cinética de fermentación de *Lactobacillus casei* en un medio probiótico comparado con el comercial MRS; y determinar el máximo crecimiento de microorganismos viables en placa (UFC/ml, expresado como la fase logarítmica de crecimiento), determinar el consumo de azúcares totales, pH y producción de ácido láctico en los periodos evaluados.

Materiales y Métodos

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología y el Laboratorio especializado de la sección de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de Nariño (Torobajo) ubicado en la ciudad de Pasto, Nariño. En la investigación se utilizó *Lactobacillus casei*, una cepa de referencia ATCC® 334™* de colección American Type Culture Collection, obtenida de un laboratorio reconocido.

La reconstitución de la cepa se hizo en base a agar nutritivo (Nutrient Agar) marca Oxoid CM0003 de 500 g, elaborado por Oxoid Ltd (Basingstoke, Hampshire, England). A las 24 horas se realizó la reconstitución de la cepa de acuerdo a las instrucciones para microorganismos KWIK-STIK™. Inmediatamente después, se verificó su crecimiento y se repicó en agar MRS comercial, incubándose por 24 horas a 35°C. Este procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar tipo II, para evitar contaminación del medio. Enseguida, se verificó el crecimiento, morfología (macroscópica y microscópica) y la pureza mediante tinción de Gram. Para la conservación de la cepa, se realizó repique cada cinco días en medio sólido (agar MRS) y cada ocho días en medio líquido (caldo MRS), estos preservados se incubaron por 20-24 horas a 35-37°C y se almacenaron refrigerados en nevera a 4°C. Asimismo, cada vez que se realizó un nuevo repique o siembra se confirmó su pureza mediante tinción de Gram.

Posterior a este procedimiento, se inoculó una alícuota con la cepa en un Erlenmeyer que contenía 40 ml de caldo MRS comercial estéril. La incubación tuvo un tiempo de 24 horas a 37°C. Terminado este periodo

se realizó un repique de 4 ml y se colocó en otros 40 ml de caldo MRS con las condiciones mencionadas anteriormente.

El porcentaje de inóculo fue ajustado a un 10% v/v al inicio de la fermentación (Crueger & Crueger, 1993), esto se logró preparando 90 ml de caldo MRS, en el cual se adicionaron 10 ml del inóculo probiótico con aplicación de la regla. Después se calculó el número de bacterias por ml.

Se tomó 1 ml del caldo comercial MRS para realizar una lectura directa en espectrofotómetro a 625 nm, se adicionó caldo estéril cuando la población encontrada fue mayor a la establecida; esto se realizó a través del cálculo matemático propuesto por Guerrero (apud Montes et al., 2003).

Para ello se realizó el siguiente cálculo:

$$M_1 \dots\dots\dots M_2$$

$$M_2 \dots\dots\dots X_1$$

$$X_1 = \left(\frac{M_2 * V_1}{M_1} \right)$$

Se tomó como M1 a la población o densidad celular que se debe ajustar, M2 como la densidad utilizada en la primera fermentación (0,125 densidad óptica equivalente a 1,50 x 10⁸ bact/ml), V1 es 1 ml proveniente del inóculo total (10/90), X1 fue la cantidad que contenía M2, V2 es el valor que se agrega a 1 ml, para ajustar a 1,50 x 10⁸ bact/ml, V3 equivale a 100 ml de inóculo total, X2 cantidad de caldo MRS comercial estéril que se agrega a V3 para ajustar la población al valor de M2.

Se utilizaron dos medios de cultivo, medio MRS comercial y medio Pro (Tabla 1).

Tabla 1. Medios de cultivo

Medio	Composición
MRS	D-glucosa 20 g/L; extracto de carne 8 g/L; extracto de levadura 4 g/L
Pro	10 g/L azúcar blanco; 15 g/L leche de soya; 150 g/L leche en polvo; 15 g/L salvado de trigo

La cinética de fermentación se efectuó en un Erlenmeyer con 600 ml del medio y la bacteria probiótica ajustada (540 ml del medio y 60 ml del inóculo) a 32°C, en agitación constante en incubadora shaker a 100 rpm a 32°C.

La técnica de conteo en placa propicia la información del número de células viables durante el proceso en términos de UFC/ml, permitiendo determinar la evolución de la producción de biomasa. Las medidas por peso seco y turbidimetría no se efectuaron debido una elevada cantidad de sólidos en suspensión del medio de cultivo. Se diluyó 1 ml de muestra en 9 ml de agua peptonada al 0,1%, para realizar los conteos. Luego se hicieron diluciones decimales en las cuales se sembraron 100 µl en cajas de Petri con MRS más azul de anilina. Estas cajas fueron incubadas a 32°C y se observaron entre las 24 y las 48 horas. Únicamente fueron consideradas las cajas que presentaron conteos de 30 a 300 UFC/ml observadas durante el periodo de 24 a 48 horas; el número de colonias encontradas se multiplicó por el inverso de la dilución y por 10 con el fin de obtener su valor en UFC/ml formadas (LANARA, 1981), finalmente fueron trabajadas en transformación a logaritmo natural para los análisis estadísticos.

La evolución del pH se valoró mediante la medición con un pHmetro digital Jenco® Vision Plus (San Diego, California, Norte América).

La determinación de azúcares se realizó por el método de Dubois (Antrona), para ello se preparó previamente una curva patrón con diversas concentraciones de la solución usada como patrón (Figura 1). Los resultados de la lectura de densidad óptica fueron graficados contra la concentración en mg/L, para obtener la ecuación de la recta. Obtenidas las muestras de los diferentes tiempos de la cinética se procedió a realizar las lecturas de absorbancia a las muestras en espectrofotómetro a 625 nm, y se procedió a aplicar la fórmula despejando los valores de X para cada tiempo, teniendo en cuenta que se trabajó en base a una dilución de 1/100 y 1/1000 para MRS y Pro, respectivamente.

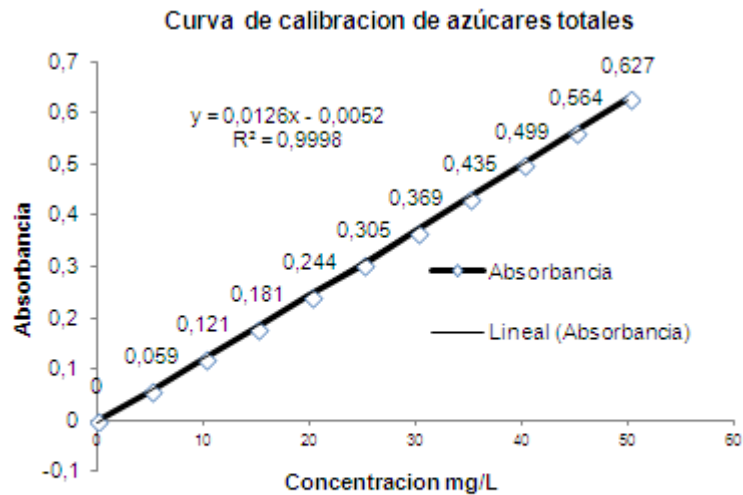


Figura 1. Curva patrón para determinación de azúcares totales (método de antrona)

La determinación de proteínas se realizó por el método de Lowry modificado. Las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un complejo color azul. La intensidad del color depende del número de aminoácidos presentes y enlaces peptídicos y cambiará según la clase de proteína; la solución azul muestra una absorbancia máxima a 750 nm. Rango de linealidad entre 0-300 mg/L.

Procedimiento: Se ajustó 1 ml de patrones de la curva estándar y muestras por duplicado, enseguida se adicionó 0,5 ml de NaOH 2 N a todos los tubos, se colocó en baño María a temperatura de ebullición durante 10 minutos. Se dejó reposar en baño de agua fría, para adicionar 0,5 ml de H₂SO₄ 2,6 N. A continuación se adicionó 0,9 ml de solución A y se llevó por 10 minutos a baño María a 50°C, luego se dejó reposar en baño de agua fría; después se adicionó 0,1 ml de solución B y se colocó por 10 minutos en la oscuridad, para finalmente adicionar 3 ml de la solución C.

Reactivos:

Solución A: Diluir 0,5 g de tartrato de sodio y potasio, 25 g de carbonato de sodio, 125 ml de hidróxido de sodio 1 N en 125 ml de agua destilada.

Solución B: Diluir 2 g de tartrato de sodio y potasio, 1 g de sulfato de cobre en 10 ml de hidróxido de sodio 1 N.

Solución C: Preparar una solución de agua destilada y reactivo de Folin-Ciocalteu en proporción 14:1 (preparar al momento de usar).

Solución estándar de seroalbúmina bovina: Disolver 15 mg en 50 ml de agua destilada, el resto se almacena en congelador (concentración final 300 mg/L).

La determinación de producción de ácido láctico se realizó aplicando el método de titulación con hidróxido de sodio 0,1 N.

Los resultados obtenidos permitieron determinar si la cepa resulta ser la más adecuada en términos tiempo-tasa de crecimiento durante el proceso de fermentación para establecer el tiempo de duración en la producción de biomasa.

Los cálculos de fermentación para las cinéticas se definieron de acuerdo con Crueger & Crueger (1993) y Rodríguez et al. (2003). Siendo la velocidad específica de crecimiento definida por la ecuación:

$$v_{\max} = \frac{d\ln X}{dt}$$

El tiempo de duplicación celular:

$$td = \frac{\ln 2}{v_{\max}}$$

El análisis de producción de ácidos orgánicos se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), permitiendo caracterizar las bacterias en homo o heterofermentativas, estableciendo un perfil característico para cada especie (Brizuela, 2003), descartando fácilmente cepas con perfiles idénticos. El caldo de crecimiento se centrifugó a 8500 rpm, filtrando el sobrenadante por membrana de 0,45 micras. Los ácidos orgánicos fueron determinados por HPLC así: solvente de fase móvil, ácido sulfúrico a pH 1,5; presión 800-900 PSI; volumen inyectado: 20 L; temperatura del horno: 65°C; columna BIORAD Aminex HPX87 H con soporte de resina trasplantada H⁺ (copolímero de estireno y bisulfato de divinilbenzeno).

Para la identificación de los péptidos posibles presentes en el sobrenadante de *L. casei*, la muestra para análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se preparó de la siguiente forma:

- La cepa se cultivó en caldo MRS por 24 horas a 32°C, posteriormente se ajustó por espectrofotometría a una densidad óptica 0,125 en escala McFarland patrón 0,5 equivalente a una concentración de 1,5 x 10⁸ bacterias/ml.
- Se transfirieron muestras en tubos Eppendorf y se centrifugaron a 18000 rpm, durante 30 minutos a 4°C.
- El sobrenadante se filtró utilizando membranas PVDF de 0,2 micras y se llevó a lectura.

Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

Equipo: Cromatógrafo Líquido HPLC Waters – Bomba Binaria 1525.
Columna: C18 300A (Jupiter, Phenomenex 150 mm x 4,6 mm).
Detector: PDA 2998 a 214 y 280 nm Scan (200-350 nm).
Inyector: Rheodyne Loop de 20 μ L.
Fase móvil: Modo de separación gradiente.
Composición: A (Agua: TFA 0,1%) B (Agua: Acetonitrilo: TFA, 0,1%).

Para el conteo de microorganismos viables en placa UFC/ml obtenidos durante la cinética de fermentación se adoptó un diseño en bloques al azar (DBA) dado el número de datos utilizados, los medios se consideraron como los dos tratamientos y las horas de evaluación correspondieron a los bloques (11 tiempos), se evaluó el comportamiento desde el tiempo 0 (cero horas), hasta el tiempo 11 (24 horas); se consideraron dos réplicas para cada medio y tiempo.

Para analizar pH, consumo de azúcar total (mg/L) y % de ácido láctico resultado de la cinética, se aplicó un análisis de regresión tomando como variable dependiente las UFC/ml formadas; el modelo usado fue el siguiente:

Los datos obtenidos se analizaron en SAS 9.1.3 versión 2007 y fueron sometidos a un análisis de varianza ANDEVA y prueba de significancia de Tukey para comparar variaciones que resulten estadísticamente significativas ($P < 0,05$) (Solarte et al., 2009).

Resultados y Discusión

En la *Figura 2* se observa el crecimiento de la cepa probiótica cada 2:24 horas durante 24 horas en 11 tiempos de evaluación. El medio Pro alcanza su fase exponencial más rápido que el medio MRS, con una caída después de las 14:24 horas de iniciado el proceso.

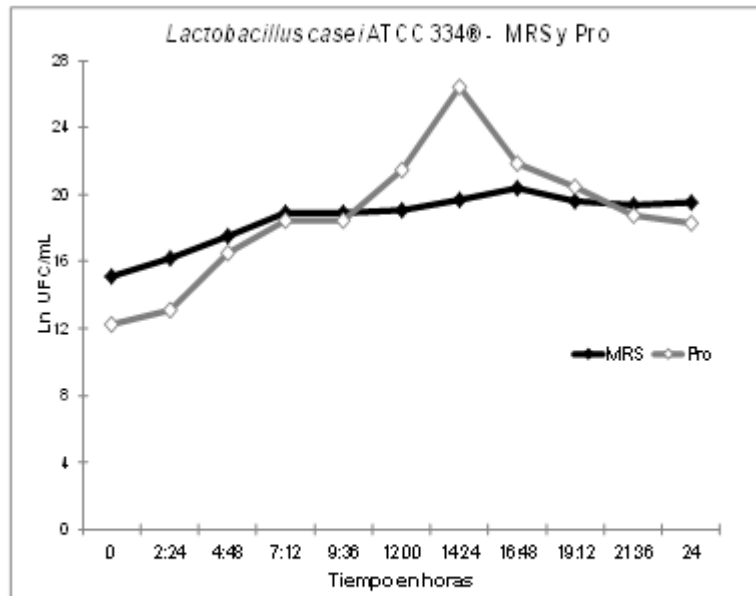


Figura 2. UFC/ml de la cepa probiótica cultivada en los medios MRS y Pro durante 24 horas

El máximo crecimiento (UFC/ml) para *L. casei* en los medios MRS y Pro, se obtuvo al tiempo 7 (16:48 horas) y tiempo 6 (14:24 horas) de la cinética, es decir, al alcanzar la fase exponencial de crecimiento, con valores de $7,3 \times 10^8$ UFC/ml y de $3,0 \times 10^{11}$ UFC/ml respectivamente, mostrándose así una mayor ventaja con 2:24 horas anticipadas para el medio Pro, respuesta positiva ya que se facilita la generación de inóculos probióticos con menor tiempo y menores costos de producción (Tabla 2). La concentración de proteínas fue de 46,95 g/L y 45,83 g/L para el tiempo 7 y 6 respectivamente. Posteriormente se presenta una disminución de estos parámetros.

Estos resultados son importantes por cuanto indican que la formación de la biomasa por parte de *L. casei* en los dos medios (MRS y Pro) en los dos tiempos de mayor crecimiento hacen que presenten un adecuado consumo de proteínas, y así el medio Pro puede ser adecuado para el desarrollo de este microorganismo en la fase exponencial. De igual manera, al comparar estos resultados se puede observar que no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre los efectos de los medios Pro y MRS.

De igual manera, se permite observar que no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre los medios de cultivo, no obstante, al considerar los periodos de evaluación tomando diferentes tiempos, estadísticamente sí existe diferencia entre las horas de evaluación ($P < 0,05$), de esta manera el efecto producido por el tiempo fue bloqueado y permitió un mejor análisis de los tratamientos. El error estándar no fue considerado dentro del análisis estadístico ya que el R cuadrado alcanzó un valor considerablemente alto (73%).

Tabla 2. Valores de logaritmo natural (Ln) UFC/ml obtenidos para *Lactobacillus casei* en los medios de cultivo

Tipo de bacteria	<i>Lactobacillus casei</i>											
	Horas	0	2:24	4:48	7:12	9:36	12:00	14:24	16:48	19:12	21:36	24
Medio MRS		15,07	16,21	17,50	18,89	18,92	19,06	19,66	20,40	19,57	19,34	19,52
de Pro		12,21	13,12	16,49	18,42	18,42	21,49	26,40	21,82	20,44	18,72	18,30

Finalmente, el análisis de ANOVA revela que los dos tipos de medios no presentan diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$), por consiguiente, ambos pueden ser usados como medio de cultivo en laboratorio, aunque a favor del medio Pro se debe considerar su mayor producción de biomasa y menor costo de producción para la elaboración de inóculos probióticos en futuros estudios para el suministro a animales *in vivo*.

De esta manera, los valores obtenidos en la prueba expresan ser adecuados para ser utilizados en la preparación de inóculos con propiedades probióticas, ya que al alcanzar poblaciones elevadas permitirá hacer una competencia frente al microorganismo patógeno, facilitando la colonización del tracto gastrointestinal (Zamudio & Zabaleta, 2003).

Con la cinética efectuada se determinó tiempo requerido para obtener el máximo crecimiento microbiano en los medios MRS y Pro, siendo de 16:48 horas (tiempo 7) y 14:24 horas (tiempo 6) respectivamente. Estos resultados tienen relación con los encontrados por Ramírez (2005), en un medio similar a base de azúcar blanco, leche de soya, suero de leche y salvado de trigo con un cultivo de una cepa probiótica asilada de un probiótico comercial, la cual alcanzó el máximo crecimiento a las 15 horas (tiempo 5) del proceso con $6,2 \times 10^{11}$ UFC/ml. Asimismo, Montes et al. (2003) indicaron que en la fermentación por 12 horas en medio elaborado a base de melaza y leche en polvo con cultivo de *Lactobacillus casei* subsp. *raihannosus* se presentó el pico máximo de crecimiento de la bacteria en el tiempo 10 (11 horas), determinándose así el tiempo de cosecha con una biomasa de $9,3 \times 10^{11}$ UFC/ml. Finalmente, se debe tener en cuenta que la curva de cinética de fermentación dependerá de los siguientes factores: tipo de cepa probiótica, tiempo y periodos de evaluación, medio y condiciones de cultivo.

Para que se presenten efectos beneficiosos, los *Lactobacillus* deben sobrevivir y adherirse a la pared del tubo digestivo en número suficiente, como indican los resultados de la viabilidad (UFC/ml) para *L. casei*, y que al mismo tiempo le permitirán una eficiente colonización en la mucosa intestinal. Uno de los criterios de selección más importantes para determinar qué microorganismos serán utilizados como potenciales probióticos, es la habilidad de adherirse a la mucosa

intestinal debido a que es un prerequisite para poder colonizar el intestino (León, 2012).

Los estudios de medios y condiciones de cultivo que permitan la obtención de altas concentraciones de microorganismos ($>10^7$ UFC/ml), han sido el objetivo fundamental cuando se trabaja con bacterias ácido-lácticas, como microorganismos iniciadores y como aditivos probióticos para aumentar el valor nutritivo de los productos. De esta forma, la biomasa de estos microorganismos ha adquirido un mayor valor y una mayor demanda. Infortunadamente, los métodos de cultivo industrial de probióticos se caracterizan por sufrir de la inhibición del crecimiento celular debido a la producción de ácido láctico, un producto primario de su metabolismo (Mack et al., 2003).

En este sentido es difícil proponer una cantidad precisada, ya que depende de la normatividad y legislación de cada país, pero se ha propuesto que deben contar con una población mínima de 10^6 UFC/ml, mientras que Ouwehand et al. (2002) y otros autores denotan que debe tener la cantidad necesaria para que se ingiera 10^9 UFC/ml.

En la Figura 3 se observa cómo en la fase exponencial hay mayor producción de biomasa a pH de 5,94 y 6,01 en el medio MRS y Pro respectivamente, y finaliza con valores de 5,74 y 5,57 a las 24 horas de la cinética.

Los *Lactobacillus* como microorganismos acidúricos, pueden crecer a pH inferiores a 5 (Kandler & Weiss, 1986). Estudios revelan cómo diferentes pH influyen sobre el crecimiento de *L. casei*, encontrando que la bacteria probiótica no crece adecuadamente cuando es inoculada en un medio de cultivo a pH de 5, comparada con otros pH de 6 y 7 en donde hubo un mayor crecimiento (García & Jerez, 2004).

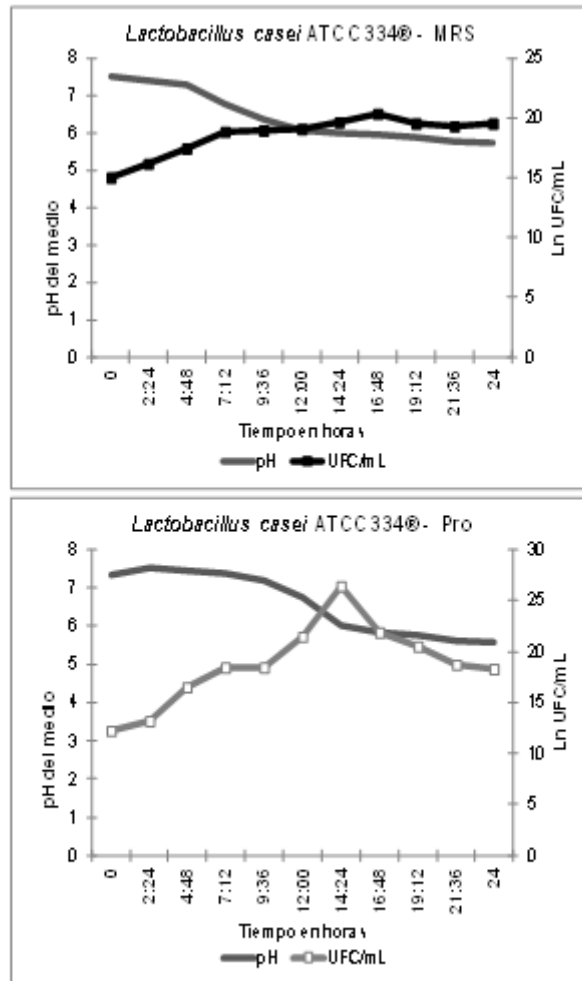


Figura 3. pH de los medios MRS y Pro y UFC/ml de la cepa probiótica cultivada durante 24 horas

Haga clic sobre la imagen para ampliarla

Los valores de pH encontrados en los tiempos de cinética favorecen los procesos de fermentación, en la producción de inóculos; entre las cepas que soportan pH de 2,5 se encuentran *Lactobacillus casei* (ATCC 27139, FAGRO 98, FAGRO 98LP) y *Lactobacillus rhamnosus* (FAGRO 36,5 y FAGRO 53,1), indicando que son capaces de sobrevivir al ambiente del tracto gastrointestinal, no son afectadas por pH ácidos y a concentraciones altas de sales biliares (León, 2012). Por lo anterior, estas cepas serían capaces de soportar la acidez que se presenta en el estómago de especies como el cuy y el cerdo (alrededor de 4,0), siendo uno de los principales obstáculos para el paso a través del tracto gastrointestinal.

La evolución del pH fue relacionado con el incremento en cada unidad Ln UFC/ml mediante análisis de regresión, siendo el pH la variable independiente que presenta un valor de B1, -0,32244 en el medio MRS y de -0,15537 en el medio Pro, lo que significa que por cada unidad logarítmica del crecimiento de colonia el pH disminuye en -0,32244 y -0,15537 unidades de pH para cada medio, notándose una mayor caída del pH en el medio Pro.

El consumo de azúcares totales presentó valores de 4,36 mg/L y 33,48 mg/L para los medios MRS y Pro respectivamente, a las 16:48 horas y 14:24 horas de efectuada la cinética, respectivamente (Figura 4).

Mediante el análisis de regresión se relacionó el consumo de azúcares totales y la formación de UFC/ml hasta la fase logarítmica de crecimiento a través del tiempo durante el proceso fermentativo. La pendiente de la recta (B1, -0,4355) en el medio MRS indica que, en promedio a cada incremento de una unidad logarítmica de UFC/ml, se consume el azúcar total en 0,4355 mg/L; igualmente sucede en el medio Pro que presenta un valor de B1, -1,228, significa que 1,228 mg/L de azúcar son consumidos por cada unidad Ln UFC/ml.

Comparando los dos valores de las variables independientes, se considera que el consumo de azúcar es menor en MRS, que en el medio probiótico, donde la concentración de azúcares es más significativa dadas las condiciones de las materias primas utilizadas, permitiéndole a los microorganismos contar con una mayor cantidad de nutrientes, sin que estos lleguen a ser un factor limitante para su crecimiento.

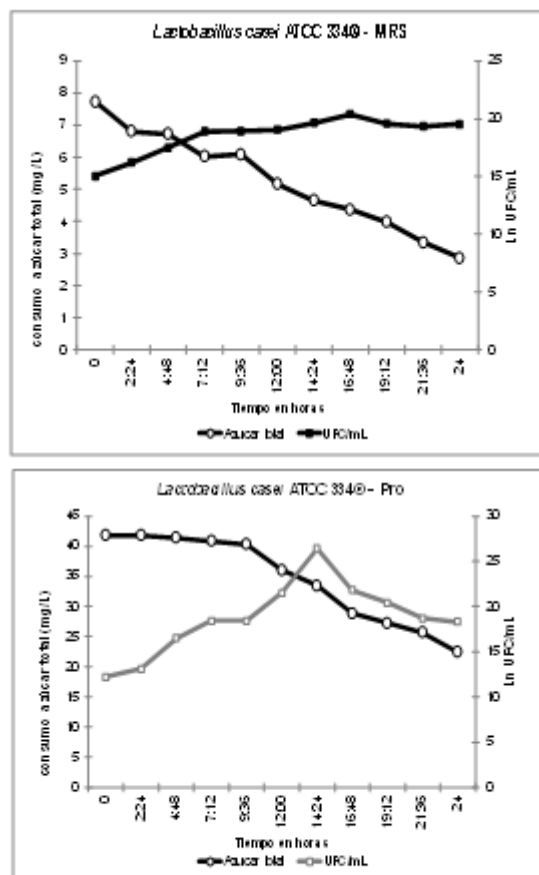


Figura 4. Consumo de azúcar total (mg/L) y crecimiento UFC/ml medio MRS y Pro

Haga clic sobre la imagen para ampliarla

Según Jurado (2009) y Ramírez et al. (2011), las BAL (bacterias ácido lácticas) requieren para su multiplicación de azúcares como lactosa y glucosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento; no obstante, la leche constituye un medio especial y satisfactorio para la proliferación de este tipo de bacterias, mientras la mayoría de las especies necesitan además varios aminoácidos (Parra, 2010) y vitaminas del grupo B (lactoflavina, tiamina, biotina, ácido nicotínico, ácido pantotéico, ácido fólico).

En general, para que *L. casei* se implante y colonice dentro del tracto del animal, es indispensable que disponga de una dieta rica en sustratos prebióticos, algunos de estos son de naturaleza lignocelulósica (oligosacáridos, fructooligosacáridos, fibra, cereales), derivados de la lactosa (galactooligosacáridos, lactulosa, lactitol), inulina entre otros; para este caso, la función como prebiótico la cumple el salvado de trigo (fibra insoluble) (Jurado, 2009).

La leche de soya es una buena fuente de hidratos de carbono, principalmente sacarosa, rafinosa y estaquiosa, así como proteínas y magnesio; durante la fermentación, más del 60% del contenido inicial de estaquiosa, rafinosa y sacarosa en la leche de soya se metaboliza por las bacterias. El azúcar es otra fuente importante de carbono, que favorece la producción de energía y la producción del ácido láctico.

Los medios MRS y Pro presentaron 0,36% y 0,71% de ácido láctico al tiempo 7 y 6, respectivamente. Los resultados valorados mediante el método de titulación se muestran en la **Figura 5**.

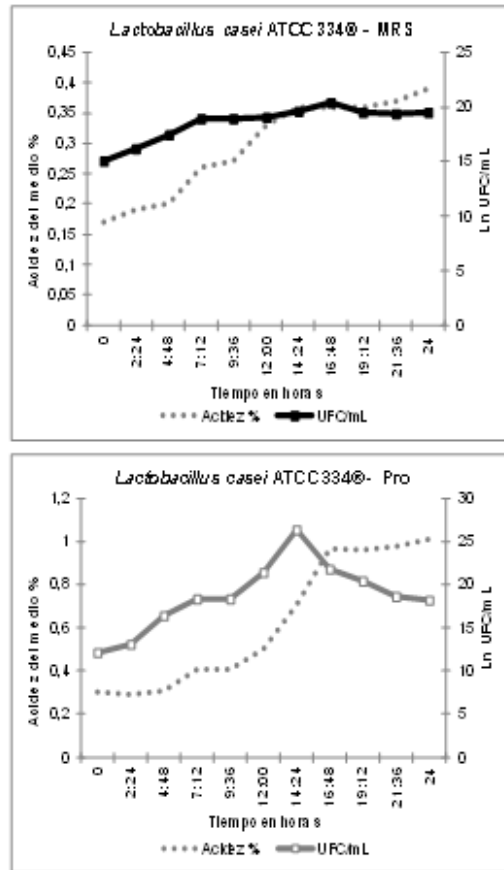


Figura 5. Acidez (%) de los medios MRS y Pro y UFC/ml de la cepa probiótica cultivada durante 24 horas

Haga clic sobre la imagen para ampliarla

La producción de ácido láctico se ve reflejada como producto de la fermentación de azúcares por BAL, y es considerado un metabolito generado por ciertos microorganismos y es clasificado como GRAS (generalmente reconocido como seguro) para su empleo como aditivo alimenticio por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos) (Parra, 2010). La producción de ácido láctico se da a partir de la fermentación de las hexosas a ácido láctico por la vía Embden-Meyerhof (Samaniego & Sosa, 2012). Además, el potencial de la producción de ácido láctico así como peróxido de hidrógeno y bacteriocinas principalmente de las cepas probióticas se ve reflejado por su papel bactericida, su acción se da por atacar el metabolismo de las bacterias patógenas o atacar sus estructuras como, por ejemplo, la membrana citoplasmática (González et al., 2003).

La producción de ácido láctico fue valorada mediante análisis de regresión, determinando el efecto del ácido láctico sobre el número de colonias, la variación positiva de 0,03846 % de ácido láctico incrementa en una unidad Ln UFC/ml para MRS. En el medio Pro los resultados fueron similares, por cada incremento en una unidad de Ln UFC/ml la acidez se incrementa en 0,01929%, un estado muy favorable debido al hecho de que durante la cinética tal evento marca cierta

diferencia para establecer el punto exacto para la cosecha del cultivo probiótico.

La prueba por HPLC indicó que las cepas de *L. casei* eran homofermentivas, presentando una producción de ácido láctico superior al 80% (Tabla 4), el cual podría contribuir a disminuir el pH del medio y actuar como inhibidor de microorganismos patógenos (Ramírez, 2005). El 20% restante se evidenció que correspondía a ácido cítrico, ácido succínico, ácido acético y etanol (Tabla 3).

Tabla 3. Perfil característico de la producción de ácidos orgánicos, concentración gramos/litro para *L. casei*

Bacteria	Acido cítrico	Acido succínico	Acido láctico	Acido acético	Etanol
<i>L. casei</i>	3,50 (g/L) 11,92%	0,61 (g/L) 1,97%	30,21 (g/L) 80,01%	1,11 (g/L) 3,76%	0,69 (g/L) 2,34%

La identificación tentativa de los péptidos se realizó por análisis de los picos de los espectros UV integrados por el sistema de detección de PDA. Se utiliza como una mezcla de referencia estándar de péptido (Sigma H2016) utilizado en las mismas condiciones (Tabla 4 y Figura 6a).

Tabla 4. Composición de péptidos estándar

No. pico	Nombre	Tiempo de retención	Area	Cantidad relativa %
1	GLY-TYR	8,160	13535508	17,28
2	VAL-TYR-VAL	11,954	15309120	19,01
3	Methionine enkephalin acetate	14,933	16168580	20,53
4	Leucine enkephalin	16,328	15150611	19,40
5	Angiotensin II acetate	16525	17656755	22,74

Los resultados reportados para el análisis de las muestras, con el uso de HPLC (espectro UV 214 nm), se observan en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis de los péptidos en la muestra de *L. casei* de HPLC-PDA a 214 nm

No. pico	Tiempo de retardo	Cantidad media relativa %
1	2,511	9,52
2	2,695	5,30
3	2,984	2,63
4	3,145	9,50
5	3,506	2,57
6	7,403	0,67
7	7,572	13,66
8	9,595	16,99
9	12,100	27,52
10	13,856	0,51
11	14,618	0,81
12	14,932	1,83

En la muestra P (*L. casei*), el pico No. 9 ($t_r = 12,1$ min) presenta un tiempo de retención similar al del pico No. 2 del estándar de calibración, por lo que posiblemente el péptido de esta muestra presente una cadena de aminoácidos compuesta por VAL-TIR-VAL (PM = 379,5). Los espectros UV presentan longitudes similares de máxima absorción.

El pico No. 3 del estándar, que corresponde al péptido metionina encefalina acetato, de composición (TIR-GLI-GLI-FA-MET)M6638 (PM = 573,7 para la base libre), presenta un tiempo de retención similar al del pico No. 12 de la muestra P (*L. casei*). Los máximos de absorbancia de los espectros presentan longitudes de máxima absorción muy cercanas, sin que se evidencie una diferencia marcada.

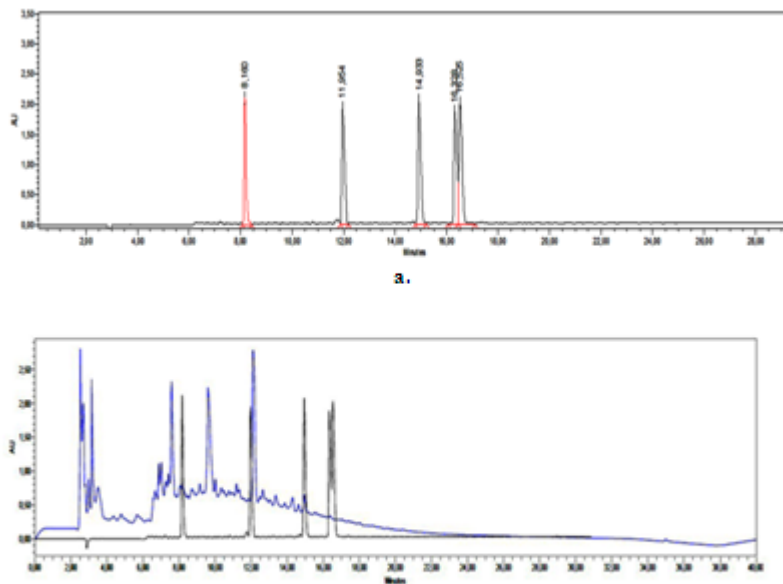


Figura 6. a. Cromatograma que representa la mezcla de péptidos estándar; b. Cromatograma de la muestra a 214 nm y el patrón de calibración de péptido (color negro de la muestra-el color azul estándar).

Haga clic sobre la imagen para ampliarla

Los resultados de la producción de biomasa relacionada con distintos factores aparecen en la Tabla 6.

Tabla 6. Datos cinéticos del crecimiento bacteriano de *Lactobacillus casei* en dos medios de cultivo

<i>Lactobacillus casei</i>	Medio	
	MRS	Pro
Fase latencia	0	0
Velocidad específica de crecimiento (μh^{-1})	0,705	2,187
Fin fase log (h)	16:48	14:24
Tiempo de duplicación (min)	59	19
Incremento cel. total	3E+08	8,9E+07
Incremento cel. fin fase log	7,3E+08	3,0E+11
% azúcares consumidos totales	62,99	46,32
% azúcares consumidos fin fase log	48,52	31,00
Coefficiente de determinación R ²	0,910	0,938

De acuerdo a los resultados obtenidos en la cinética, el medio Pro resultó ser el más adecuado, alcanzó el valor mayor de μh^{-1} , y por lo tanto el tiempo de duplicación celular es menor, lo que se ve reflejado al haber alcanzado una mayor concentración celular en la fase logarítmica a las 14:24 horas. Como se puede observar en los resultados encontrados, el medio MRS presenta desventajas debido a que presentaría un tiempo de duplicación celular muy elevado y esto implica que al llegar a la fase logarítmica la concentración celular será mucho menor, con respecto al medio Pro.

Por otro lado, se deben tener en cuenta los costos de producción, ya que estos son de gran interés en el proceso de producción a nivel industrial

en la elaboración de inóculos. De acuerdo con Jurado (2009), el costo de 500 g del medio MRS es aproximadamente \$210.000 (USD 108,46), y el costo de elaboración de un litro de este medio comercial es \$27.142,86 (USD 14,02); comparado con el medio Pro elaborado con azúcar blanco, leche de soya, salvado de trigo y leche en polvo el costo por litro del medio probiótico asciende a únicamente a \$2.775 (USD 1,42).

El tiempo requerido para alcanzar la fase logarítmica en los medios MRS y Pro, fue a las 16:48 horas (tiempo 7) y 14:24 horas (tiempo 6) respectivamente. El crecimiento bacteriano expresado como UFC/ml demostró valores de $7,3 \times 10^8$ UFC/ml para MRS y $3,0 \times 10^{11}$ UFC/ml para Pro. Los valores obtenidos en los dos medios indican ser adecuados para ser utilizados en la preparación de inóculos con propiedades probióticas, que posteriormente podrían ser utilizados en ensayos *in vivo* en especies de gran importancia zootécnica como los son cuyes, cerdos y aves, que ayudarían a obtener una mejoría en la producción y salud animal.

Agradecimientos

Al personal de los Laboratorios Especializados y Laboratorio de Microbiología de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño, y a todas las personas que de una u otra manera colaboraron en el desarrollo del proyecto.

Referencias Bibliográficas

- Brizuela, M.; **Selección de cepas de bacterias lácticas para la obtención de un preparado con propiedades probióticas y su evaluación en cerdos**. La Habana, Cuba: Universidad de la Habana, 2005. 110p. Tesis (Doctoral).
- Collins, M.; Phillips, B.; Zaroni, P. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.39, n.2, p.105-108, 1989.
- Crueger, W.; Crueger, A. **Biología: Manual de Microbiología Industrial**. 3. ed. Madrid, España: Editorial Acribia, 1993. 413p.
- Escobar, A. **Comportamiento poblacional de *Lactobacillus casei* en un medio a base de suero de leche**. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, 2008. 75p. Trabajo de Grado (Programa de Biología).
- García, D.; Jerez, J. **Modelamiento del efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento y producción de BLIS del *Lactobacillus casei* y optimización de los parámetros propuestos**. Chía, Cundinamarca:

- Universidad de la Sabana, 2004. 82p. Trabajo de Grado (Programa de Ingeniería de Producción Agroindustrial e Ingeniería Industrial).
- González, B.; Gómez, M.; Jiménez, Z. Bacteriocinas de probióticos. **Revista Salud Pública y Nutrición**, v.4, n.2, p.99-106, 2003.
 - Jurado, H. **Evaluación de bacterias ácido-lácticas con características probióticas en la alimentación de lechones en fase de precebo como alternativa al uso de antibióticos**. Valle del Cauca, Colombia: Universidad del Valle, 2009. 170p. Tesis (Doctorado en Ingeniería de Alimentos).
 - Kandler, O.; Weiss N. **Regular, Nosporing Gram-positive Rods. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 1. ed. Baltimore, USA: Williams & Wilkins, 1986. 1235p.
 - LANARA. **Laboratorio de Referencia Animal. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II- Métodos Físicos e Químicos**, v.2, n.25, p.1-15, 1981.
 - León, M. **Evaluación *in vitro* de cepas de bacterias ácido lácticas nativas con potencial probiótico**. Montevideo-Uruguay: Universidad de la República, 2012. 54p. Tesis (Licenciatura en Bioquímica).
 - Mack, D.; Ahrné, S.; Hyde, L. et al. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Journal of Gastroenterology and Hepatology GUT**, v.52, n.6, p.827-833, 2003.
 - Montes, A.; Santacruz, A.; Sañudo, J. **Efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori***. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño. 2003. 85p. Trabajo de Grado (Programa de Biología).
 - Ouwehand, A.; Salminen, S; Isolauri, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.82, n.1-4, p.279-289, 2002.
 - Parra, R. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. **Facultad de Ciencias Agropecuarias**, v.8, n.1, p.93-105, 2010.
 - Ramírez, C. **Uso de bacterias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microorganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**. Curitiba, Brasil: Universidade Federal do Paraná, 2005. 173p. Tesis (Doutorado em Processos Biotecnológicos).
 - Ramírez, J.; Rosas, P.; Velásquez, M. et al. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. **Revista Fuente**, v.2, n.7, p.1-16, 2011.
 - Rodríguez, L.; Bueno, G.; Rodríguez, D. et al. True and apparent yields and maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics. **New Horizons Biotechnology**, v.2, n.2, p.163-172, 2003.
 - Rosmini, M.; Sequeira, G.; Guerrero, I. et al. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v.3, n.2, p.181-191, 2004.
 - Ruales, B.; Vallejo, V. **Producción de Biomasa de *Lactobacillus casei* empleando diferentes tipos de sustratos**. Pasto, Colombia: Universidad de Nariño, 2007. 147p. Tesis (Programa de Ingeniería Agroindustrial).

- Solarte, C.; García, H.; Imues, M. **Bioestadística. Aplicaciones en producción y salud animal**. 1. ed. Pasto, Colombia: Centro Editorial Universidad de Nariño, 2009. 304p.
- SAMANIEGO, Luz y SOSA, Maryla. **Lactobacillus spp.: Importantes promotores de actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora, Reseña**. Córdoba, Colombia: Universidad de Córdoba, 2010. 120 p. Tesis (Programa de Zootecnia)
- Sumano, H.; Ocampo, L. **Farmacología Veterinaria**. 3. ed. Madrid, España: McGraw-Hill, 2006. 1082p.
- Zamudio, K.; Zavaleta, A. Estudio del potencial probiótico de lactobacilos aislados de fuentes naturales. **Ciencia e Investigación**, v.6, n.1, p.30-35, 2003.

Jurado-Gómez, H.; Calpa-Yamá, F.; Chaspuengal-Tulcán, A.
Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos. **Veterinaria y Zootecnia**, v.8, n.2, p.15-35, 2014.
Disponible en:

<http://vetzootec.ucaldas.edu.co/index.php?option=com_content&task=view&id=166>