

## Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque

### *Formulation and optimization of an economic broth culture for Lactobacillus with probiotic potential isolated from pulque*

Dante Israel León-de la O, Bárbara Calderón-Yépez, Abril Martínez-Ballinas, Eugenia María Sánchez-Herrera, Ana Carolina Zulatto-Lobato, Israel Camacho-Hernández, Ana Laura Arredondo-Villanueva y Rosa Salgado-Brito  
Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Simón Bolívar, México

dleon@bolivar.usb.mx  
barbaracyl2004@gmail.com  
abril\_mayo15@hotmail.com  
mashe\_13@hotmail.com  
hannahokina@gmail.com  
camacho\_hernandez\_israel@hotmail.com  
anataz\_1840@hotmail.com  
dirqfb@bolivar.usb.mx

Recepción: 18 de junio de 2013

Aceptación: 25 de septiembre de 2013

(pp. 133 - 144)

#### Resumen

*El pulque es una bebida prehispánica obtenida de la fermentación del aguamiel del agave. A partir de esta bebida es posible aislar levaduras y bacterias. Anteriormente, se realizó el aislamiento y la identificación de bacterias con potencial probiótico en varias muestras de pulque distribuido en la Ciudad de México; entre los microorganismos aislados se obtuvo una*

*cepa del género Lactobacillus la cual tiene potencial probiótico en el tracto digestivo, lo que permite la posibilidad de desarrollo de productos de consumo con Lactobacillus (probióticos) que sean típicos y autóctonos de la cultura mexicana. Sin embargo, para el establecimiento de la cepa a un producto de consumo, es necesario realizar la formulación, la optimización del medio de cultivo y la determinación de las condiciones de incubación con base en las necesidades del lactobacilo para obtener un buen rendimiento, así como la formulación de un medio de cultivo que sea económico y propicie el crecimiento de la cepa. Se realizaron estudios cinéticos de crecimiento con diferentes formulaciones para la cepa de lactobacilo. Los estudios cinéticos realizados fueron los siguientes: Agua peptonada como control negativo, medio de cultivo MRS (DeMan, Rogosa y Sharpe) como control positivo, formulaciones de leche y suero de leche, con diferentes concentraciones de nutrientes del medio MRS. Se observó el mayor crecimiento del lactobacilo en el medio de leche con sales del medio MRS al 10% p/v, pH 6.4, 7% p/v lactosa, 29°C a las 18 h de cultivo.*

**Palabras clave:** Pulque, probiótico, medio de cultivo económico

#### Abstract

*Pulque is a pre-Hispanic beverage obtained from the fermentation of the agave mead. From this drink is possible to isolate yeasts and bacteria. Previously, the work team performed*

*the isolation and identification of potential probiotic bacteria in several samples of pulque distributed in Mexico City, among the isolates, a strain of the genus Lactobacillus which has probiotic potential in the digestive tract was obtained, allowing the possibility of development of products with Lactobacillus (probiotics) that are typical and indigenous from Mexican culture. However, for the establishment of the strain to a product, is necessary the formulation, optimization of culture medium and incubation conditions based on the needs of the strain to obtain a good performance and a broth culture that is economical and conducive to the growth of the strain. Kinetics studies were performed with different formulations for the strain of Lactobacillus. Kinetic studies performed were: peptone water as negative control, MRS medium (DeMan, Rogosa & Sharpe) as positive control, formulations of milk and whey, with different concentrations of nutrients in the medium MRS. Further growth of Lactobacillus was observed in the broth culture: milk with MRS medium salts at 10% w/v, pH 6.4, 7% w/v lactose, 29 ° C at 18 h of culture.*

**Keywords:** Pulque. Probiotic, economic broth culture

## Introducción

El género *Lactobacillus* es altamente apreciado por la capacidad que tienen las bacterias lácticas de fermentar diversas fuentes de carbono simples y producir ácido láctico. Muchas de las bacterias del género *Lactobacillus* pueden sobrevivir las condiciones de acidez y alcalinidad así como a las enzimas del tracto digestivo en diversos animales, incluyendo al hombre (Boyle, Robins-Browne y Tang; 2006). Cuando las bacterias lácticas llegan a los intestinos, empiezan a producir ácido láctico, el cual acidifica la región intestinal haciendo que la flora patógena disminuya. Esta característica confiere a los lactobacilos propiedades probióticas.

En este trabajo se define como probiótico a un cultivo puro o mezcla de microorganismo vivos, bacterias o levaduras, los cuales pueden tener alguna o varias de las siguientes funciones: reducir la colonización de patógenos, disminuir o suprimir la producción de factores de virulencia, estimular la respuesta inmunológica (producción y secreción de factores antiinflamatorios), producir compuestos con actividad antimicrobiana y antiviral en el intestino, bronquios, aparato genital urinario y glándulas mamarias, es decir que pueden tener efectos sobre todo en mucosas (Boyle et. al. 2006, Gotteland M., et. al., 2006; Maldonado y Llanca, 2007; Cervantes-Contreras y Pedroza, 2007; DuPont, Ericsson y Farthing, 2009; Eaton, Honkala, Auchtung y Britton, 2010).

En un trabajo previo, se aisló e identificó bacterias del pulque distribuido en la Ciudad de México, lo que permitió obtener una cepa del género *Lactobacillus*, a

la cual se le realizaron pruebas simulando la digestión estomacal (acidez, alcalinidad y resistencia a la pepsina) para comprobar su potencial probiótico (León-de la O, Méndez-Colín, Rodríguez-Padilla, Puente-Hurle, García-Sorrondegui y Salgado-Brito., 2012).

La cepa nativa de *Lactobacillus* permite la posibilidad de desarrollo de productos de consumo con probióticos que sean típicos y autóctonos de la cultura mexicana al incorporar la nueva cepa aislada del pulque. Esta cepa fue aislada en el medio de cultivo MRS (DeMan, Rogosa y Sharpe, 1960) el cual se considera un medio de cultivo específico para el crecimiento de lactobacilos ya que contiene macro y microelementos específicos tales como extracto enzimáticamente digerido de carne y concentraciones específicas de sales como el citrato de amonio. Sin embargo, para la producción de los lactobacilos, el medio MRS no resulta rentable, por lo que surge la necesidad de buscar otras fuentes económicas de materia prima para la producción de lactobacilos.

Para la formulación de un medio de cultivo de tipo industrial es necesario que éste cumpla con todos los requerimientos nutricionales necesarios para el buen crecimiento del microorganismo, los cuales estén biodisponibles en materia prima obtenida como subproducto de algún otro proceso o en su defecto, sea abundante en el mercado y de bajo costo de producción. Los requerimientos nutricionales son característicos de cada especie, en general, para los lactobacilos es deseable que el nitrógeno sea orgánico en forma de aminoácidos o péptidos

dentro de los cuales el ácido glutámico, isoleucina y valina son considerados factores de crecimiento y deben estar presentes en el alimento o medio de cultivo (Crueger y Crueger, 1989; Karoviéová y Kohajdová, 2003). La leche y el suero de leche bovina son considerados como fuentes de nutrientes para el crecimiento de bacterias del género *Lactobacillus*, ya que contienen fuente de nitrógeno en forma orgánica, complejos vitamínicos como el complejo B, pH adecuado, y una forma coloidal que hace disponible todo tipo de nutrientes. (Escobar, Rojas, Giraldo y Padilla-Sanabria., 2010) Sin embargo, es necesario realizar la formulación del medio de cultivo y determinar las condiciones de incubación con base en las necesidades específicas del lactobacilo aislado del pulque para optimizar y obtener un buen rendimiento del crecimiento del microorganismo y que el medio resulte rentable.

## Objetivo

Formular y optimizar un medio de cultivo con materia prima de bajo costo que permita el buen crecimiento de la cepa de *Lactobacillus* obtenida del pulque.

## Método

**Microorganismo.** Se empleó la cepa del género *Lactobacillus* aislado del pulque proveniente del área metropolitana de la Ciudad de México. La cepa se cultivó en agar MRS (DeMan, Rogosa y Sharpe, 1960) en condiciones de microaerobiosis, en un pH de  $6.4 \pm 0.2$  a  $29^\circ\text{C}$  por 48 horas, se mantuvo en refrigeración a  $4^\circ\text{C}$  y se resembró cada 7 días.

**Preparación de inóculos.** Se partió de un cultivo puro de *Lactobacillus* sembrado en caja Petri con agar MRS por la técnica de estría masiva con aplicador de algodón estéril (césped). Se recolectó todo el contenido de la caja Petri y se vertió en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapón de algodón con 100 mL de caldo modificado MRS (ver tabla 1); el cual consta de las sales y micronutrientes del Cultivo MRS, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de extracto de carne, 5 g/L de acetato de sodio, 1 g/L de polisorbato 80, 10 g/L de peptona de carne y 6% p/v de lactosa. El cultivo se incubó con pH inicial de  $6.4 \pm 0.2$ ,  $29^\circ\text{C} \pm 1$  por 48 h sin agitación. Se determinó la concentración microbiana del inóculo por medio del método de peso seco celular (Prit, 1975). En esterilidad, se

tomaron 5 mL de muestra por duplicado cada 2 horas durante un periodo de 34 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 8 minutos en una centrífuga Zeigen centrifuge Model 80-25. El paquete celular se filtró al vacío, se lavó con agua destilada y se puso a secar a  $45^\circ\text{C}$  en estufa por 24 h o hasta que se registró peso constante.

**Tabla 1.** Formula del medio de cultivo MRS modificado

Componente	Concentración g/L
Extracto de carne	10
Peptona de carne	10
Extracto de levadura.	5
Lactosa	60
Acetato de sodio	5
Polisorbato 80	1
Fosfato de potasio*	2
Citrato de amonio*	2
Sulfato de magnesio*	0.1
Sulfato de manganeso*	0.05

\* Componentes que forman parte de las sales (micronutrientes) del medio de cultivo MRS

**Influencia de la temperatura en el crecimiento de la cepa de lactobacilos.** Se evaluaron tres temperaturas:  $23^\circ\text{C}$ ,  $29^\circ\text{C}$  y  $37^\circ\text{C}$ . La tendencia estudio cinético de crecimiento fue evaluada en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de caldo MRS modificado con 7% lactosa con pH inicial de  $6.4 \pm 2$  sin agitación con un inóculo de 2% p/v (peso-volumen).

La biomasa se determinó por el peso seco celular (Prit, 1975). En esterilidad, se tomaron 5 mL de muestra por duplicado cada 2 horas durante un periodo de 34 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm durante 8 minutos en una centrífuga Zeigen centrifuge Model 80-25. El paquete celular se filtró al vacío, se lavó con agua destilada y se puso a secar a  $45^\circ\text{C}$  en estufa por 24 h o hasta que se registró peso constante.

**Influencia del tamaño de inóculo en el crecimiento de la cepa de lactobacilos.** Se evaluaron dos concentraciones de inoculación: 2 y 5% p/v. Se realizaron Los estudios cinéticos de cultivo en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL de caldo MRS modificado con 7% lactosa con pH inicial de  $6.4 \pm 0.2$  sin agitación. En esterilidad, se tomaron 5 mL de muestra por duplicado en un rango de 2 a 4 horas durante 34 horas. Se utilizó el método del peso seco celular en la determinación de la biomasa bacteriana.

**Efecto de diferentes formulaciones en el crecimiento de la cepa de lactobacilos.** Se evaluaron seis formulaciones diseñadas a partir de materia prima de bajo costo: 1) leche entera ultrapasteurizada comercial con concentración final 7% p/v lactosa; 2) Leche entera ultrapasteurizada comercial con concentración final 7% p/v lactosa y concentración 100% p/v sales MRS; 3) Suero de leche con concentración final 7% p/v lactosa, 4) Suero de leche con concentración final 7% p/v lactosa, concentración 100% p/v sales MRS 5) Suero de leche con concentración final 7% p/v lactosa, concentración 100% p/v sales MRS y 0.25% p/v de extracto de levadura y 6) Suero de leche con concentración final 7% p/v lactosa, concentración 100% p/v sales MRS y 5 g/L de extracto de levadura. Todos los estudios cinéticos fueron realizados a 29°C, pH inicial de 6.4, en microaerobiosis y sin agitación, con un inóculo de 5% p/v. Como referencia del crecimiento se utilizó los estudios cinéticos que utilizan 5% inóculo a 29°C en caldo MRS con 7% lactosa y como control negativo se utilizó el agua peptonada sin fuente de carbono. Los matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL del caldo respectivo, se inocularon al 5% p/v desde el mismo matraz Erlenmeyer semilla de 250 mL, el cual contenía 100 mL de caldo MRS modificado y la cepa adaptada de *Lactobacillus*. Los estudios cinéticos de cultivo se inocularon al 5% p/v con el contenido del matraz semilla. Todos los matraces para los estudio cinéticos de crecimiento así como el matraz semilla se incubaron en las mismas condiciones: 29°C ± 1, en microaerobiosis, sin agitación, pH inicial de 6.4 ± 0.4 durante 34 horas.

En esterilidad, se tomaron 5 mL de muestra por duplicado en un rango de 2 a 4 horas durante 34 horas. Se utilizó el método del peso seco celular en la determinación de crecimiento microbiano.

**Optimización del nuevo medio de cultivo.** Después de seleccionar las dos mejores formulaciones que fueron los dos estudios cinéticos con la mayor concentración de biomasa: 1) leche entera ultrapasteurizada comercial con concentración final 7% p/v lactosa y concentración 100% p/v sales del medio de cultivo MRS y 2) suero de leche con concentración final 7% p/v lactosa y concentración 100% p/v sales del medio de cultivo MRS, se procedió a la optimización de la formulación. Se observó que la concentración de las sales MRS afectaban positivamente el crecimiento de la cepa por lo que se desarrolló una matriz experimental con las formulaciones seleccionadas con diferentes concentraciones de sales MRS: 10, 50 y 100% (ver tabla 2).

Los estudios cinéticos fueron realizados a 29°C ± 1, pH inicial de 6.4 ± 0.4, sin agitación, en microaerobiosis durante 34 horas. Se utilizó el método de peso seco celular en la determinación de biomasa bacteriana.

**Tabla 2.** Matriz experimental para la optimización de dos medios de cultivo para la cepa de *Lactobacillus*. Los estudios cinéticos fueron realizados con diferentes concentraciones de sales del medio de cultivo MRS

Formulaciones	Concentración de micronutrientes del medio de cultivo MRS		
	10%	50%	100%
Leche entera con 7% p/v lactosa	E1	E3	E5
Suero de leche con 7% p/v lactosa	E2	E4	E6

**pH y determinación de azúcares totales en el medio de cultivo.** Esta determinación se hizo por el método de antrona, descrito por Witham, Blaydes, y Devlin, (1971) al medio de cultivo optimizado. Se realizó la determinación en g/L en los tiempos 0, 4, 8, 18 y 30. A cada muestra de sobrenadante se le realizaron diluciones decimales hasta 10<sup>-06</sup>, y a la última dilución se le agregó resbalándolo por las paredes el reactivo de antrona y se dejó reaccionar durante 5 minutos en agua hirviendo, después de este tiempo, la muestra se enfrió en un baño con hielos para detener la reacción. La absorbencia se leyó a 600 nm en un espectrofotómetro Genesis Modelo 58. Cada muestra se trabajó por duplicado y la concentración de azúcares se estimó a partir de una curva patrón que contenía de 20 a 200 µg de lactosa/mL.

El pH fue medido en los mismos tiempos en que se realizó la determinación de azúcares totales, por medio de un potenciómetro manual Hanna previamente calibrado.

**Determinación del rendimiento Biomasa-sustrato, velocidad de crecimiento y tiempo de generación de la cepa de *Lactobacillus* en los estudios cinéticos de crecimiento de referencia y los estudios cinéticos con formulación optimizada.** Se calculó el rendimiento Biomasa-sustrato ( $Y_{(x/s)}$ ), Velocidad de crecimiento específica ( $\mu$ ) y Tiempo de generación ( $t_{gen}$ ) de la cepa *Lactobacillus* en el estudio cinético de referencia (Caldo MRS 7% lactosa) y el estudio cinético que obtuvo la mayor concentración de biomasa, que fue la formulación de leche con 7% p/v lactosa y 10% p/v sales minerales. Las ecuaciones utilizadas son las siguientes:

$$\text{Rendimiento biomasa-sustrato: } Y\left(\frac{x}{s}\right) = \frac{X-X_0}{S_0-S}$$

Ecuación 1.

Donde  $Y\left(\frac{x}{s}\right)$  (g biomasa/ g sustrato) es el rendimiento Biomasa-sustrato, X es la concentración final de biomasa (g/L);  $X_0$  es la concentración inicial de biomasa (g/L), S es la concentración final de sustrato (g/L);  $S_0$  es la concentración inicial de sustrato (g/L).

$$\text{Velocidad de crecimiento específica: } \mu = \frac{\text{LN}\left(\frac{X}{X_0}\right)}{t}$$

Ecuación 2.

Donde  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ ); X es la concentración final de biomasa (g/L);  $X_0$  es la concentración inicial de biomasa (g/L) y t es el tiempo expresado en horas (h).

$$\text{Tiempo de generación: } t_{gen} = \frac{\text{LN}2}{\mu}$$

Ecuación 3.

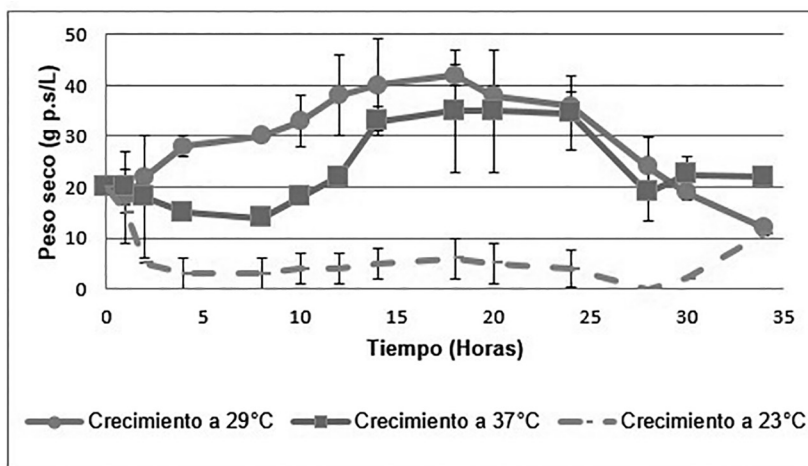
Donde ( $t_{gen}$ ) es el tiempo de generación expresado en horas (h) y  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento ( $h^{-1}$ )

## Resultados

**Efecto de la temperatura en el crecimiento de la cepa *Lactobacillus*.** La figura 1 muestra los estudios cinéticos con diferentes temperaturas de incubación de la cepa de *Lactobacillus* aislada de pulque. La mayor concentración bacteriana de *Lactobacillus* se presentó a las 18 horas con 42 g/L en el estudio cinético realizado a 29°C, seguida por la máxima concentración de 35 g/L en el estudio cinético realizado a 37°C. Ambos estudios cinéticos se consideran que no tienen diferencias estadísticamente significativas entre sí ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, ambas presentan diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al estudio cinético realizado a 23°C, que tuvo como concentración máxima la concentración inicial de inóculo (20 g/L), ya que, desde el principio del estudio cinético las concentraciones fueron decayendo.

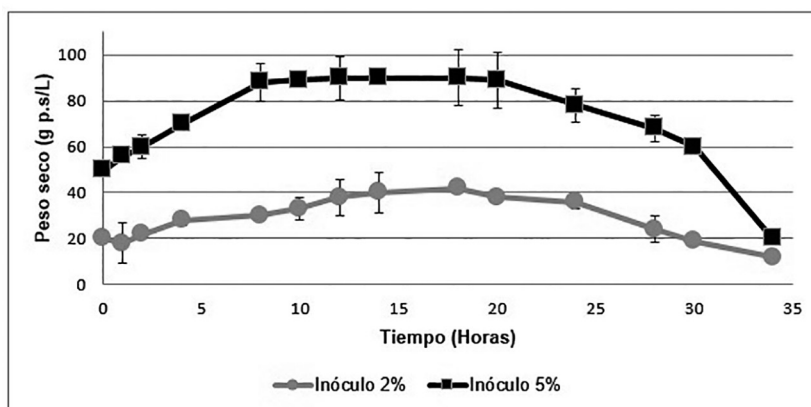
Se seleccionó en los estudios cinéticos, la temperatura de 29°C como la temperatura ideal para realizar las demás estudio cinéticos, aunque no es diferente significativamente con respecto al estudio cinético realizado a 37°C, se observa en el estudio cinético realizado a 37°C una fase de adaptación del cultivo demasiado extensa (10 horas) mientras que en el estudios cinético realizado a 29°C el tiempo de adaptación del cultivo fue corto (2 horas).

**Figura 1.** Estudios cinéticos de la cepa *Lactobacillus* aislada de pulque en caldo MRS con temperaturas diferentes: (■) Caldo MRS 7% p/v lactosa a 37°C; (●) Caldo MRS 7% p/v lactosa a 29°C; (○) Caldo MRS 7% p/v lactosa a 23°C. Las barras indican desviaciones estándar (Desvest)



**Efecto de la concentración de inóculo en el crecimiento de la cepa *Lactobacillus*.** En la figura 2 se muestran los estudios cinéticos utilizando diferentes concentraciones de inóculo. En ambos estudios se observa una tendencia de crecimiento similar, ambas tienen la mayor concentración de biomasa a las 18 horas. Sin embargo, en los estudios cinéticos con inoculación al 5% p/v se reduce el tiempo de la fase de latencia y logarítmica, llegando al estado estacionario a las 8 horas, mientras que en los estudios cinéticos al 2% p/v de inóculo se llega a la fase estacionaria a las 12 horas. Por lo que se estableció utilizar un tamaño de inóculo para los siguientes estudios cinéticos de 5% p/v.

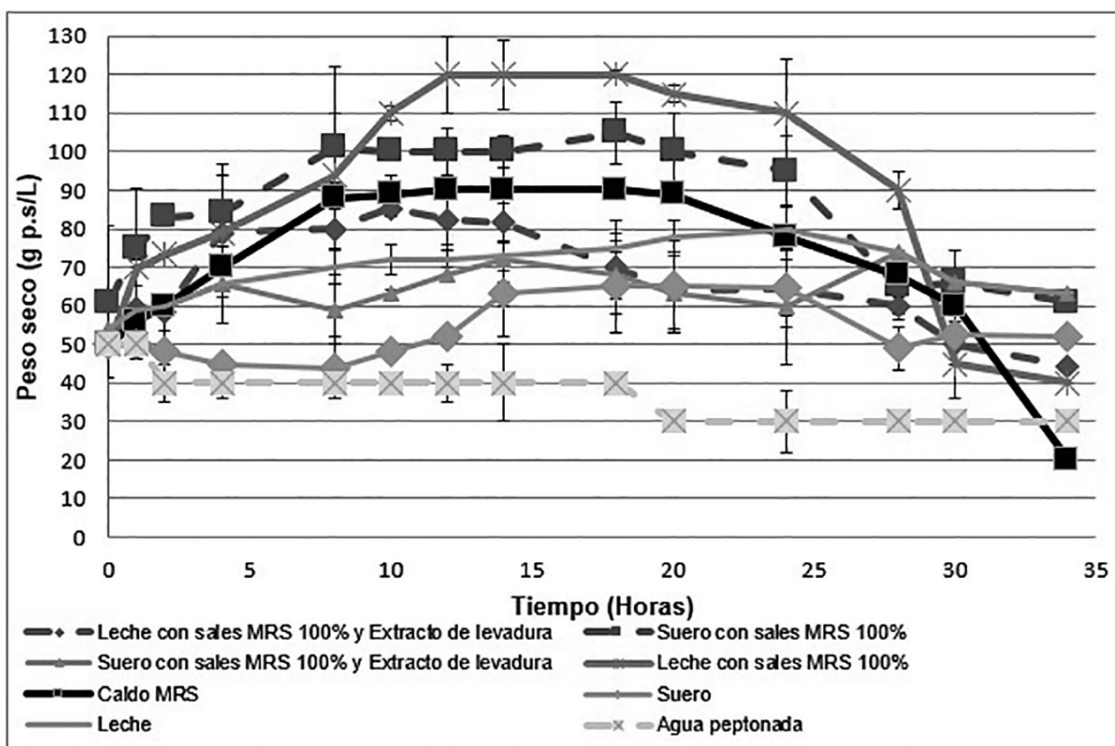
**Figura 2.** Estudios cinéticos de la cepa *Lactobacillus* aislada de pulque en caldo MRS utilizando diferentes tamaños de inóculo. (■) Inóculo del 5% p/v en caldo MRS 7% p/v lactosa a 29°C; (●) Inóculo del 2% p/v p/v en caldo MRS 7% p/v lactosa a 29°C con sus respectivas Desvest



**Formulación del medio de cultivo para la cepa *Lactobacillus*.** En la figura 3 se muestran los diferentes estudios cinéticos de crecimiento de biomasa en diferentes formulaciones de la cepa de *Lactobacillus*. El estudio cinético en que se utilizó la formulación de leche con sales MRS al 100% presentó la mayor concentración de biomasa; la menor, como se esperaba, fue el estudio cinético con agua peptonada, ya que ésta no tenía ninguna fuente de carbono aprovechable por el lactobacilo. Todos los estudios cinéticos en los que se utilizó la leche tuvieron mayor concentración de biomasa que sus contrapartes con suero. Al contrario de lo que se esperaba, los estudios cinéticos de crecimiento a los que la formulación se suplementó con 0.25% p/v de extracto de levadura, presentaron un crecimiento menor que sus contrapartes que no tenían presente el extracto de levadura.

Sólo dos estudios cinéticos tuvieron una concentración de biomasa mayor o igual a la de referencia formulada con caldo MRS; el estudio cinético formulado a partir de leche con 100% p/v de sales MRS y el de suero con 100% p/v de sales MRS; de estas dos estudio cinéticos de crecimiento, sólo el estudio cinético con formulación a partir de leche con 100% p/v de sales MRS tiene una diferencia estadísticamente significativa con respecto al estudio cinético de referencia.

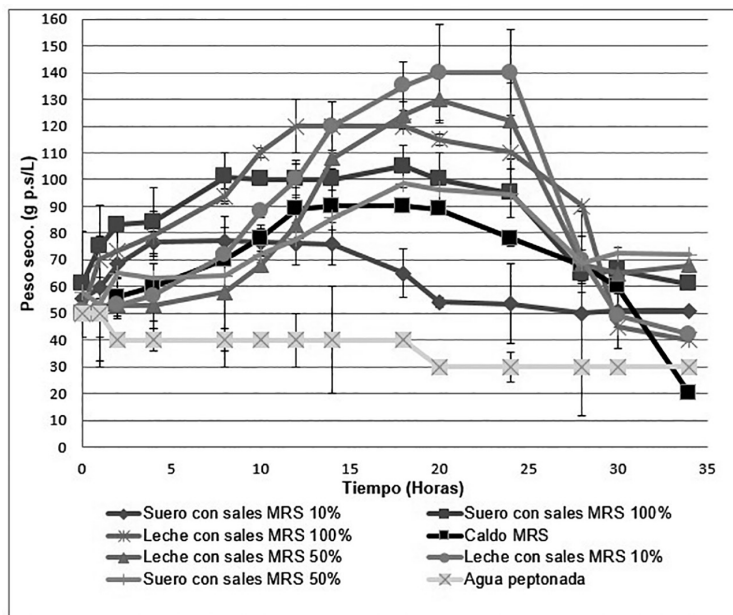
**Figura 3.** Estudios cinéticos de crecimiento de biomasa de distintas formulaciones de medios de cultivo para la cepa de *Lactobacillus* aislada del pulque. Todos fueron realizados simultáneamente con las mismas condiciones: 29°C, 6.4 pH inicial, en microaerobiosis, sin agitación, 5% p/v inóculo, 6% p/v concentración final de lactosa (Excepto para el agua peptonada sin fuente de carbono la cual se usó como control negativo). Se muestran barras Desvest



**Optimización del medio de cultivo para la cepa *Lactobacillus*.** La figura 4 muestran los diferentes estudios cinéticos a partir de dos formulaciones: Suero de leche con 7% p/v lactosa y leche entera con 7% p/v lactosa, cada una con 10, 50 y 100% p/v de concentración de las sales del caldo MRS. Se puede observar que las formulaciones con leche entera son las que mayor concentración de biomasa obtuvieron (135 g/L en el estudio cinético con 10% p/v de sales MRS), otra característica en común que tienen es que no se presentó (o fue mínima) la fase de latencia, el cultivo pasó directamente a la fase de crecimiento exponencial. El tiempo en que se obtuvo la mayor concentración de biomasa fue alrededor de las 16-20 horas y el tiempo donde los estudios cinéticos pasan al estado de muerte es a partir de las 22 horas; no existe diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) entre los estudios cinéticos de leche con las concentraciones de sales MRS de 10, 50 y 100% p/v.

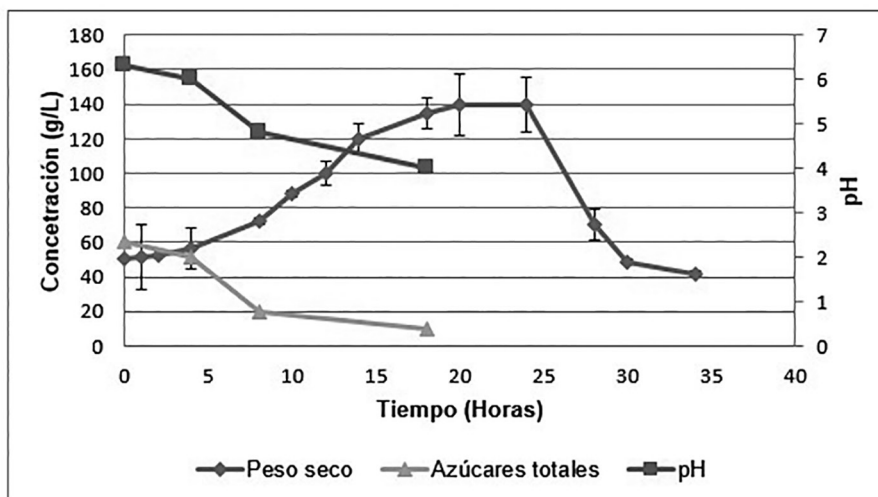
En los estudios cinéticos con suero de leche, el crecimiento de biomasa disminuye drásticamente al disminuir la concentración de sales MRS, teniendo incluso una disminución en la concentración de biomasa hasta un nivel inferior al del inóculo. No existe diferencia alguna en los estudios cinéticos que utilizan 50 y 100% p/v de sales MRS en comparación con la referencia con caldo MRS.

**Figura 4.** Matriz experimental de dos formulaciones: Suero de leche con 7% p/v lactosa y leche entera con 7% p/v lactosa, cada una con 10, 50 y 100% p/v de concentración de las sales del caldo MRS con sus respectivas barras Desvest. Los estudios cinéticos de crecimiento se realizaron simultáneamente con las mismas condiciones: 29°C, 6.4 pH inicial, en microaerobiosis, sin agitación, 5% p/v inóculo, 6% p/v concentración final de lactosa excepto para el agua peptonada (Sin fuente de carbono) la cual se usó como control negativo



**Relación entre la concentración de biomasa, pH y concentración de azúcares totales en los estudios cinéticos de crecimiento de la cepa *Lactobacillus*.** En la figura 5, se observa la tendencia cinética del crecimiento bacteriano, las variaciones resultantes del pH y el cambio de concentración de sustrato a lo largo del tiempo. Existe una relación directa entre la acidificación del medio con respecto a la disminución de concentración de sustrato. Tras 20 horas de iniciado el experimento, el suministro de la fuente de carbono se ha visto agotado. En dicho momento, la tendencia de crecimiento bacteriano demostró un comportamiento típico de la parte inicial de la fase estacionaria. No obstante, el comportamiento cinético en la gráfica demostró asimismo, una entrada abrupta en la fase de muerte en poco tiempo después de la fase exponencial, la concentración de azúcares totales permanece constante al igual que el pH. Una vez iniciado el crecimiento, la concentración de azúcares totales disminuye de forma proporcional.

**Figura 5.** Relación entre el consumo de sustrato-biomasa y su efecto en el pH del medio de cultivo con sus respectivas barras Desvest





**Cálculo del rendimiento Biomasa-Sustrato, velocidad específica de crecimiento y el tiempo de generación en estudio cinético de referencia y formulación optimizada.** Se tomaron los datos obtenidos del estudio cinético de referencia con el caldo MRS y la nueva formulación optimizada de leche con 7% p/v lactosa y 10% p/v de las sales MRS y se sustituyeron en las ecuaciones para el cálculo de rendimiento biomasa-sustrato, velocidad específica del lactobacilo y su tiempo de generación. En la tabla 3 se muestran los resultados.

**Tabla 3.** Cálculo del rendimiento Biomasa-sustrato, velocidad de crecimiento y tiempo de generación a partir del estudio cinético de referencia con el caldo MRS y la nueva formulación optimizada de leche con 7% p/v lactosa y 10% p/v de las sales MRS. Junto, se encuentran otras cepas de *Lactobacillus* encontradas en la bibliografía

	Medio optimizado	Medio de referencia	Medio basal optimizado. <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. lactis</i> y <i>L. delbrucki</i>	Medio basal: <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. lactis</i> y <i>L. delbrucki</i>
Rendimiento biomasa $y \left( \frac{x}{s} \right)$	0.90 g/g	0.35 g/g	-----	-----
Velocidad de crecimiento específica. $\mu (h^{-1})$	0.056 $h^{-1}$	0.042 $h^{-1}$	0.24 $h^{-1}$ , 0.30 $h^{-1}$ , 0.22 $h^{-1}$ y 0.32 $h^{-1}$	0.16 $h^{-1}$ , 0.13 $h^{-1}$ , 0.07 $h^{-1}$ y 0.20 $h^{-1}$
Tiempo de generación. $T_{gen} (h)$	12.5 h	16.3 h	2.9 h, 2.3 h, 3.15 h, 2.16 h	4.3 h, 5.4 h, 9.9 h y 3.4 h

Medio optimizado: Leche con 7% p/v lactosa y 10% p/v de las sales MRS., Medio de referencia: Caldo MRS con 7% p/v lactosa. Ambos estudio cinéticos fueron realizados en las mismas condiciones de cultivo. (Zacharof, Lovitt y Ratanapongleka, 2009)

Se puede observar aumento en el rendimiento de biomasa del estudio cinético optimizado con respecto al estudio cinético de referencia, lo que demuestra un aprovechamiento óptimo de la cepa con respecto a la fuente de carbono. La velocidad de crecimiento fue mayor para el estudio cinético optimizado que para el de referencia.

## Discusión

**Condiciones de incubación para la cepa de *Lactobacillus*.** Se sabe que la temperatura es un factor importante en el desarrollo de los cultivos bacterianos (Ratkowsky, Oley, McMeekin y Ball, 1982). En las especies del género *Lactobacillus* se ha observado que el rango óptimo de temperatura para su crecimiento es de 29-50°C (Beal, Louvet y Corrien, 1989; Baati, Roux, Dahhou y Uribelarrea, 2004; Luwihana, Yulianto y Nugraheni, 2008). La cepa de lactobacilo encontrado en el pulque se desarrolla óptimamente entre los 29 y 37°C, rango de temperatura considerada cómo óptima para el crecimiento de este género, por lo que la cepa al ser incubada a 23°C no mostró un crecimiento favorable, sino más bien estuvo en un estado latente. La cepa al ser procedente de una bebida fermentada (pulque), la cual no es sometida en ningún momento a condiciones de alta temperatura (Cervantes-Contreras y Pedroza-Rodríguez, 2008), es posible que no desarrolle una afinidad a temperaturas mayores a las que normalmente se encuentra en su hábitat natural, la meseta central de México en donde las temperaturas oscilan entre 20-35°C (Servicio Meteorológico Nacional SMN; 2013); mientras que otras cepas del género de *Lactobacillus* que normalmente son encontradas y utilizadas en bebidas que utilizan temperaturas mayores a los 40°C (como en la fabricación industrial de yogurt), pueden llegar a tener una temperatura óptima de 45°C tal es el caso de *Lactobacillus bulgaricus* (Radke-Mitchell y Sandine, 1986) o 35°C para *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus fermentum* (Riaz, Kashif y Hasnain, 2010).

**Criterios en la formulación del medio de cultivo para la cepa de *Lactobacillus***

**Concentración de inóculo en los medios de cultivo.** Se sabe que la concentración de inóculo puede afectar el tiempo en que pasa un cultivo de la fase de adaptación (Lag) a la fase de crecimiento logarítmico (Log) en cualquier estudio cinético de crecimiento (Monod, 1949 y Okpokwasili y Nweke, 2005). En el caso de la cepa de lactobacilos aislados del pulque, el incremento del 2 al 5% p/v del inóculo hizo que se redujera en 2 horas el tiempo de la fase de latencia. El mismo efecto tiene el incremento de la concentración de inóculo en la fermentación maloláctica en el vino con *Lactobacillus plantarum* (López, López, Santamarina, Torres y Ruiz-Larrea, 2008). La concentración de inóculo varía entre cada especie de microorganismo que se desee cultivar, siendo el 4% p/v o v/v una concentración utilizada en el caso del género *Lactobacillus* (Lim, Rahim, Ho y Arbakariya, 2007 y Gupta, Abu-Ghannam y Scannell, 2010).

**Formulación del medio de cultivo.** Se utilizó como fuente económica de nutrientes en las diferentes formulaciones a la leche y al suero de leche, los cuales han sido ampliamente reportados como una buena fuente de nutrientes para el género *Lactobacillus* (Perry y Sharpe, 1960; Christensen y Steele, 2010; Escobar, Rojas, Giraldo y Padila-Sanabria, 2010; etcétera) al tener como fuente principal de carbono a la lactosa, así como complejos vitamínicos importantes para el crecimiento de los lactobacilos, tal es el caso del complejo B (Jensen, 1995). En algunas formulaciones se utilizó el extracto de levadura para mejorar la calidad y cantidad proteica en las formulaciones ya que 70% de su composición son proteínas y contiene vitaminas del complejo B (Acumedia, 2013), y por último, a otras formulaciones se agregó extracto de levadura y la mezcla de sales RMS (ver tabla 1.) para aportar todos los micronutrientes en la formulación (DeMan, Rogosa y Sharpe, 1960). Todas las formulaciones tuvieron crecimiento de la cepa del lactobacilo aislado del pulque. Contrario a lo que se esperaba, las formulaciones que tuvieron mayor crecimiento fueron aquellas suplementadas con la mezcla de sales MRS sin levadura, siendo las formulaciones con levadura las que menor concentración de biomasa presentaron. El medio MRS está formulado para satisfacer las necesidades nutricionales del género *Lactobacillus*, por lo que el aumento de la masa celular al usar las sales MRS como complemento de la formulación era esperado.

En cepas como *Lactobacillus casei* (Escobar, et.al., 2010), *Lactobacillus acidóphilus* (Schär-Zammaretti, Dillmann, D'Amico, Affolter y Ubbink, 2005), *Lactobacillus helveticus* (Schepers, Thibault y Lacroix, 2002) y *Lactobacillus salivarius* (Lim, et.al., 2007) se observa una relación directa entre la concentración proteínas/carbohidratos y el crecimiento de las diferentes cepas de *Lactobacillus*. Analizando el origen de las cepas, todas ellas provienen de ambientes donde abunda el contenido de proteínas (intestinos, boca, heces y ductos mamarios de animales) mientras que en cepas como *Lactobacillus rhamnosus* (Bustos, Models, Cruz y Domínguez, 2004) y *Lactobacillus plantarum* (González, Domínguez-Espinosa y Alcocer, 2008) provenientes de ambientes con escasa disponibilidad de proteínas (vino y plantas varias) presentan un crecimiento óptimo sin necesidad de adicionar extracto de levadura, por lo que la cepa de *Lactobacillus* aislada del pulque presenta la misma tendencia por su origen vegetal (planta del agave).

**Optimización del medio de cultivo para la cepa de *Lactobacillus*.** La cepa de *Lactobacillus* no presentó diferencias en la concentración de biomasa cuando se usó leche con las concentraciones de sales MRS, cuando van del 10 al 100% de la concentración del medio MRS. En un estudio anterior, cuando se aisló la cepa de *Lactobacillus* junto con otras bacterias con propiedad probiótica del pulque, se analizó bromatológicamente la composición del pulque y se comparó con el producto comercial Yakult. El pulque mostró tener muy poco valor nutricional en cuanto a micronutrientes (expresados en cenizas totales), carbohidratos y proteínas (León-de la O, et.al., 2012) por lo que la cepa de *Lactobacillus* aislada del pulque puede tener la concentración óptima de micronutrientes con el 10% p/v de la concentración del medio MRS cuando se utiliza la leche como fuente de nutrientes, mientras que la misma concentración de sales puede ser insuficiente cuando se usa el suero de leche al tener un medio de cultivo limitado proteicamente. El mismo efecto sobre la disminución de la concentración de sales MRS se observó (Lim, et.al., 2007) al utilizar 2% de concentración de algunas sales del medio MRS como concentración óptima en la formulación del medio de cultivo para la cepa de *Lactobacillus salivarius*.

**Relación Biomasa-sustrato-pH en la formulación optimizada para la cepa de *Lactobacillus* aislado del pulque y datos cinéticos.** Es conocido que la fermentación con el género *Lactobacillus* da

como resultado la acidificación del medio de cultivo al producirse ácido láctico a partir de la fuente de carbono (Buruleanu, Bratu, Manea, Avram y Nicolescu, 2013) esto podría explicar la relación directamente proporcional entre la disminución del pH y la concentración de lactosa como se muestra en la figura 5.

En el caso de la cepa estudiada crecida con la formulación optimizada, el pH del medio disminuyó de 6.4 a 4.1, lo cual coincide con los valores reportados por diferentes autores cuando el cultivo llega a la fase de desaceleración o estacionaria en el estudio cinético de crecimiento (Lim, *et.al.*, 2007; González, *et.al.*, 2008; Buruleanu, *et.al.*, 2013; etcétera). Es reportado que cuando el pH es menor a 4.0 tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento del género de *Lactobacillus* (Rao, Pintado, Stevens y Guyot, 2004; Nicolescu y Buruleanu, 2010) por lo que la fase de muerte se presentó a las cuatro horas cuando el cultivo alcanzó un pH inferior a 4.0.


En cuanto a los parámetros cinéticos, se obtuvo un rendimiento biomasa-sustrato de 0.90 g/g en la formulación optimizada en comparación con la formulación de referencia (MRS) con 0.35 g/g. Relaciones similares se presentan al optimizar medios de cultivo los cuales pueden ir en un incremento del rendimiento de dos hasta seis veces mayor (Rao, *et.al.*, 2004).

En cuanto a la velocidad específica de crecimiento, se obtuvo un incremento de 33% en comparación con la velocidad de crecimiento del medio de cultivo de referencia, por lo que el tiempo de generación disminuye de 16.3 h a 12.5 h. Lo mismo sucede con la velocidad específica de crecimiento cuando se optimizan los medios de cultivo de otras cepas del género *Lactobacillus*, como en el caso de lo conseguido por Zacharof, Lovitt y Ratanapongleka (2009), quienes reportan incrementos de hasta el 300% en las diferentes cepas estudiadas (ver tabla 3).

## Conclusión

La cepa de *Lactobacillus* con propiedad probiótica obtenida del pulque se desarrolla óptimamente en leche entera con sales micronutrientes de la formulación MRS al 10% p/v, 7% p/v lactosa, pH de  $6.4 \pm 2$  a  $29^\circ\text{C} \pm 1$ , en microaerobiosis. Todos los estudios cinéticos se realizaron sin agitación y no se compararon en las mismas condiciones con agitación.

## Agradecimientos

Quiero agradecer el financiamiento y apoyo de la Universidad Simón Bolívar; la ayuda de la coordinadora de laboratorios M en C. Rosalba Santiago Reyes y la C. Alejandra Barba, así como las coordinaciones de BQC, BT y QFB y de investigación de la Universidad Simón Bolívar. 

## Referencias

- Acumedia. (2013). *Yeast Extract (7184)*. En: <http://www.acumedia.org>. Recuperado el 01 de junio de 2013.
- Baati, L., Roux, G., Dahhou, B. y Uribelarrea, J. L. (2004). *Unstructured modeling growth of Lactobacillus acidophilus as a function of temperature. Mathematics and computers in Simulation*. 65: 137-145.
- Beal, C., Louvet, P. y Corrien, G. (1989). "Influence of controlled pH and temperature of the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398". En: *Applied Microbiology and Biotechnology*. 32. 148-154.
- Boyle, R. J., Robins-Browne, R. M. y Tang, M. L. (2006). "Probiotic use in clinical practice: What are the risks?" En: *American Journal of Clinical Nutrition*. 83(6), 1256-1264.
- Buruleanu, L. C., Bratu, M. G., Manea, I., Avram, D. y Leane Nicolescu, C. (2013). "Fermentation of Vegetable Juices by *Lactobacillus Acidophilus* LA-5". En: *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. Lactic Acid Bacteria R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. 213-138.
- Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz J. M. y Domínguez, J. M. (2004). "Formulation of low-cost fermentative media for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus* using vinification lees as nutrients". En: *J Agric Food Chem*. 52(4): 801-8.
- Cervantes-Contreras, M. y Pedroza-Rodríguez, A. M. (2007). "El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman". En: *NOVA*. 5(8), 101-212.
- Cervantes-Contreras, M. (2008). "Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman". En: *Superficies y Vacío*. 20(3) 1-5.
- Christensen, J. E. y Steele, J. L. (2003). "Impaired Growth Rates in Milk of *Lactobacillus helveticus* Peptidase Mutants Can Be Overcome by Use of Amino Acid Supplements". En: *Journal of Bacteriology*. 85 (11): 3297-3306.
- Crueger, W. y Crueger, A. (1989). *Industrial microbiology manual*. España: Acribia.
- DuPont, H. L., Ericsson C. D. y Farthing, M. J., (2009). "Expert review of the evidence base for self-therapy of traveler diarrhea". En: *J. Travel Med*. 16, 161-71.

- Eaton, K. A., Honkala, A., Auchtung, T. A. y Britton, R. A. (2010). *Probiotic Lactobacillus reuteri Ameliorates Disease Due to Enterohemorrhagic Escherichia coli in Germfree Mice*.
- Escobar, J. C., Rojas, C. A., Giraldo, G. G. A. y Padilla-Sanabria, L. (2010). "Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* y producción de ácido láctico usando como sustrato el suero de leche vacuno". En: *Rev. Invest. Univ. Quindío*. 20: 42-49.
- González, B. A., Domínguez-Espinosa, R. y Alcocer B. R. (2008). "*Aloe vera* como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y *L. casei*". En: *Cienc. Tecnol. Aliment.* 6(2) 152-157.
- Gupta, S., Abu-Ghannam, N. y Scannell, A. G. M. (2010). "Growth and kinetics of *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of edible Irish brown seaweeds". En: *J. Food Science and Environmental Health*. 10: 1016-1027.
- Jensen, G. (1995). *Handbook of milk composition*. Elsevier Inc.
- Karoviéová, J. y Kohajdová, Z. (2003). "Lactic acid fermented vegetable juices". En: *Horticultural Science*. 30, 152-158.
- León-de la O, D. I., Méndez-Colín, D. S., Rodríguez-Padilla, D.P., Puente-Hurle, L., García-Sorrondegui, F. I. y Salgado-Brito, R. (2012). "Análisis Bromatológico y aislamiento de flora microbiana con potencial probiótico en pulque (bebida mexicana)". En: *Investigación Universitaria Multidisciplinaria USB*. 11. (1): 120-127.
- Lim, C. H., Rahim, R. A., Ho, Y. W. y Arbakariya, B. A. (2007). "Optimization of Growth medium for Efficient Cultivation of *Lactobacillus salivarius* I 24 using Response Surface Method". En: *Malaysian Journal of Microbiology*. 3(2): 41-47
- López, L., López, R., Santamaría, P., Torres, C. y Ruiz-Larrea, F. (2008). "Performance of malolactic fermentation by inoculation of selected *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains isolated from Rioja red wines". En: *Vitis*. 47 (2): 123-129.
- Luwihana, S., Yulianto, W. A. y Nugraheni, E. (2008). "Effect of temperature and pH on growth of *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0015 and acceptability of noni (*Morinda citrifolia*) probiotic drink". En: *The 3d International conference of Indonesian society for lactic acid bacteria*.
- Maldonado, R. y Llanas, L., (2007). "Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano". En: *Rev. Fac. Agron.* 33,147- 163.
- DeMan, J. D., Rogosa, M. y Sharpe, M. E. (1960). "A Medium for the Cultivation of Lactobacilli". En: *J Appl Bact.* 23. 130-135.
- Monod, J. (1949). "The growth of bacterial cultures". En: *Annual Reviews*. 3: 371.
- Nicolescu, C. L. y Buruleanu, L. C. (2010). "Correlation of some substrate parameters in growing *Lactobacillus acidophilus* on vegetable and fruit cocktail juices". En: *Bulletin UASVM agriculture*. 67(2): 112-116.
- Okpokwasili, G. C. y Nweke, C. O. (2005). "Microbial growth and substrate utilization kinetics". En: *African Journal of Biotechnology*. 5 (4): 305-317.
- Perry, A. K. D. y Sharpe, M. E. (1960). "Lactobacilli in raw milk and in Cheddar cheese". En: *Journal of Dairy Research*. 27 (02): 267-275
- Pirt, S.J. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. New York: Eds. John Wiley and Sons, Inc.
- Radke-Mitchell, L. C., Sandine, W. E. (1986). "Influence of temperature on associative growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*". En: *J Dairy Sci.* 69(10): 2558-68.
- Rao, M. S., Pintado, J., Stevens, W. F. y Guyot, J. P. (2004). "Kinetic growth parameters of different amyolytic and non-amyolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions". En: *Bioresour Technol.* 94(3): 331-7.
- Ratkowsky, D. A., Oley, J., McMeekin, T. A. y Ball, A. (1982). "Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures". En: *J. Bacteriol.* 149 (1): 1-5.
- Riaz, S., Kashif-Nawaz, S. y Hasnain, S. (2010). "Bacteriocins produced by *L. fermentum* and *L. acidophilus* can inhibit cephalosporin resistant *E. coli*. Braz". En: *J. Microbiol.* 41 (3): 157-180.
- Schär-Zammaratti, P., Dillmann, M. L., D'Amico, N., Affolter, M. y Ubbink, J. (2005). "Influence of Fermentation Medium Composition on Physicochemical Surface Properties of *Lactobacillus acidophilus*". En: *Appl Environ Microbiol.* 71 (12): 8165-8173.
- Schepers, A. W., Thibault, J. y Lacroix, C. (2002). "*Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. Multiple factor kinetic analysis". En: *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 176 - 186.
- SMN. Servicio Meteorológico Nacional (2013). *Mapa del tiempo*. En: <http://www.smn.cna.gob.mx>. Recuperado el 01 de junio de 2013.
- Witham, F. H., Blaydes, D. F. y Devlin, R. M. (1971). *Experiments in plant physiology*. New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- Zacharof, M. P., Lovitt, R. W. y Ratanapongleka, K. (2009). *Optimization of Growth Conditions for Intensive Propagation, Growth Development and Lactic Acid Production of Selected Strains of Lactobacilli*. Engineers Australia. 5: 27 - 30.