

Evaluación del crecimiento de *Lactobacillus casei* en un cultivo semicontinuo

Llelysmar Crespo

Gabriel Cravo

Universidad Nacional Experimental
de los Llanos Occidentales "Ezequiel Zamora"
llely.crespo@gmail.com
Venezuela

Fecha de recepción: 08 - 09 - 2015 Fecha de aceptación: 25- 11- 2015

Resumen

La *Lactobacillus casei* es una bacteria probiótica conocida por tener excelentes bondades nutricionales y un efecto promotor de la salud, específicamente en la microflora intestinal. Se ha demostrado que esta genera cambios positivos en las enfermedades gastrointestinales patógenas y que es resistente a amplios rangos de pH y temperatura; es por ello que cuando es cultivada en presencia de oxígeno (régimen aeróbico) da origen a la producción de biomasa, tomando

en cuenta las condiciones ambientales óptimas para el bioproceso. Con esta motivación, a través de la presente investigación se evaluó el crecimiento de cepas de la especie *Lactobacillus casei* en un proceso biotecnológico de cultivo para la producción a escala de laboratorio. El tipo de equipo utilizado para llevar a cabo el proceso y producir en forma semicontinua ("fed-batch") fue un biorreactor. Para esto se acondicionaron los sustratos y se determinaron las concentraciones óptimas a utilizar para la producción de biomasa.

Se evaluó la cinética de crecimiento mediante el estudio de turbidimetría en los diferentes sustratos y se realizaron pruebas de crecimiento en agar y caldo Den Manrogosa y Sharpe (MRS) para determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) en las diferentes concentraciones de sustrato. Se creó un software para simular el proceso, y se comprobó que reprodujera el comportamiento del proceso.

Palabras clave: *Lactobacillus casei*; biomasa; sustrato; turbidimetría; lactosuero; agua de avena.

Evaluation of growth of lactobacillus casei culture in semi

Abstract

Lactobacillus casei is a probiotic bacteria known to have excellent nutritional benefits and a health-promoting effect, specifically on the intestinal microflora. It has been demonstrated that it generates positive changes in pathogenic gastrointestinal diseases and that it is resistant to wide ranges of pH and temperature; that is why when it is cultivated in the presence of oxygen (aerobic regime) it gives rise to the production of biomass, taking into account

the optimal environmental conditions for the bioprocess. With this motivation, through the present research, the growth of strains of the Lactobacillus casei species was evaluated in a biotechnological process of cultivation for laboratory scale production. The type of equipment used to carry out the process and produce in a semi-continuous way ("fed-batch") was a bioreactor. For this purpose, the substrates were conditioned and the optimal concentrations to be used for biomass production were determined. The growth kinetics was

evaluated by means of the study of turbidimetry in the different substrates and growth tests were carried out on Den Manrogosa and Sharpe (MRS) agar and broth to determine the amount of colony forming units (CFU) in the different substrate concentrations. A software was created to simulate the process, and it was proven that it reproduced the behavior of the process.

Keywords: Lactobacillus casei; biomass; substrate; turbidimetry; whey; water oats

Introducción

Las investigaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud y otros organismos no gubernamentales contemplan que la mala nutrición y las enfermedades gastrointestinales son unas de las principales causas de muerte infantil en el mundo. Las defunciones anuales causadas por diarrea crónica y enfermedades gastrointestinales en niños menores de 5 años alcanzan cerca del 22 % (Balam *et al.*, 2002; Forsberg *et al.*, 2007). Actualmente, la medicina moderna utiliza alimentos fermentados como una alternativa para la prevención y tratamiento de dichas enfermedades (Holzapfel, 2002; Vandenplas *et al.*, 2002), ya que proporcionan una ruta de entrada a los agentes biológicos que conforman la flora intestinal benéfica; estos organismos son conocidos como agentes probióticos (Fitzgerald *et al.*, 2006; Arguelles *et al.*, 2000). Los probióticos son microorganismos vivos presentes en los alimentos que al ser ingeridos en suficientes cantidades pueden ejercer una actividad fisiológica específica que resulta beneficiosa para la salud del individuo (Shah, 2001). En este mismo orden de ideas, Marín *et al.* (2010), en los resultados de su trabajo, titulado *Evaluación de la viabilidad de crecimiento de las cepas Lactobacillus plantarum LPM10 y la cepa comercial Lactobacillus casei ATCC en pulpa de uchuva y en solución isotónica de glucosa*, expuso que el consumo de la pulpa de uchuva con microorganismos probióticos podría contribuir a mejorar la salud de la población. Igualmente, la solución isotónica es un buen vehículo, ya que permite que los microorganismos se mantengan viables en el tiempo

y por lo tanto puede ser utilizada como solución de incorporación en diferentes matrices alimentarias. Por su parte, Aguirre *et al.* (2009), en su trabajo titulado *Producción de proteína y biomasa probiótica de Lactobacillus casei liofilizada a partir de suero de leche de cabra*, determinó que en el proceso de ultrafiltración del suero sin adición de otra fuente de carbono o nitrógeno era posible lograr un crecimiento apropiado de biomasa; los resultados de un análisis cinético muestran los perfiles de biomasa producida.

En los experimentos se varió la concentración inicial del inóculo en el rango (0.5 a 1.0 g/l), en los mismos se recuperaron valores finales de concentración de biomasa liofilizada (producto de la fermentación) en el rango de 3.7 a 4.4 g/l de biomasa probiótica del microorganismo.

Partiendo de estas premisas, el objetivo de esta investigación es evaluar el crecimiento del *Lactobacillus casei* utilizando sustratos de origen agroindustrial. Esto con la finalidad de aprovechar de forma directa un tipo de subproducto generado de la elaboración de quesos, uno de los procesos más comunes en nuestra región llanera. El suero de leche no es aprovechado adecuadamente y en algunos casos puede generar una contaminación biológica considerable debido a la característica natural que posee. Este subproducto, considerado un desecho de origen animal, económico y de fácil acceso, cuenta con condiciones nutricionales (aminoácidos, vitaminas, minerales, carbohidratos) aprovechables por parte de los microorganismos, por lo que puede ser utilizado en la producción de biomasa probiótica.

Esta investigación se centra en la producción de biomasa en un proceso biotecnológico de cultivo a escala de laboratorio de cepas de la especie *Lactobacillus casei*, porque pueden crecer a grandes velocidades, y son de gran utilidad para la industria alimentaria y farmacéutica. El equipo utilizado para llevar a cabo el proceso es un biorreactor para producir en forma semicontinua; durante el proceso el cultivo semicontinuo uno o más nutrientes son suplidos al biorreactor durante el transcurso de cada corrida hasta el final de la operación. Debido a que la sobrealimentación de nutrientes perjudica el crecimiento de las células y la formación del producto (biomasa), el desarrollo de una estrategia de alimentación es crítica en los cultivos semicontinuos. Por lo tanto, se tomó en cuenta el control de las variables manipulables reversibles que también influyen en el bioproceso. En consecuencia, la investigación contribuye a la solución del problema causado por la mala nutrición, las enfermedades gastrointestinales y sus consecuencias, mediante la generación de probióticos que pueden ser incorporados en alimentos o aplicados en el tratamiento de dichas enfermedades.

Materiales y métodos

Debido a las características que presenta esta investigación y a sus objetivos, la misma se encuentra dentro de la modalidad de investigación proyectiva, pues pretende evaluar las condiciones óptimas de crecimiento del *Lactobacillus casei* a partir de métodos de estudio de espectrofotometría de absorción (turbidimetría), técnica de cuantificación de microorganismos

(Ufc) y simulación el comportamiento de la cinética de crecimiento (Simulink de Matlab). Esto permitirá mejorar la producción y la calidad de biomasa a obtener.

Este holotipo es el que abarca el campo de la tecnología ya que aborda problemas prácticos, se centra en aplicaciones concretas y propone una metodología específica inspirada en los procesos de investigación (Hurtado, 2012).

El trabajo se desarrolló en las siguientes fases:

En la fase I, se realizó un estudio bibliográfico referente al tema a investigar y se determinaron los parámetros y las variables que afectan directa e indirectamente al sistema de producción de biomasa.

En la fase II, se realizaron, en primer lugar, varias pruebas piloto con la finalidad de seleccionar los tipos de sustratos para el microorganismo *Lactobacillus casei*. En segundo lugar, se hizo el reconocimiento de los materiales y equipos que luego se utilizaron para la investigación experimental. En tercer lugar, se seleccionó el tipo de agar para la siembra (MRS), es decir, el medio utilizado para el enriquecimiento, cultivo y aislamiento de todas las especies de *Lactobacillus*, según De Man Rogosa y Sharpe (1960). En cuarto lugar, se prepararon 180 placas de petri con 15 ml de agar, diluido por cada una, por lo tanto, se requirió un volumen total de 181 gramos de agar (MRS), seguidamente se procedió a la dilución del agar (MRS) en el volumen de agua de 2700 ml y se realizó la transferencia de calor empleando

una plancha de calentamiento como fuente, esto hasta observar un cambio de color traslúcido (amarillo), lo cual indica que se ha isuelto por completo en el volumen de disolvente. y se dejó reposar y fue vertido en porciones de 15 ml en tubos de ensayo.

Una vez llenos los tubos de ensayo, se procedió a su esterilización empleando una autoclave a 121 °C y 15 lbs de presión por 15 min.

Luego, se enfrió el medio hasta una temperatura aproximada de 45 – 50 °C, y se procedió a acondicionarlo y homogenizarlo cuidadosamente para después agregarlo acéticamente en las placas. Cuando se procedió a sembrar en superficie, se colocaron los tubos de ensayo en baño de maría a 100 °C y se dejaron enfriar a temperatura ambiente para verterlo en las placas de petri. El caldo de MRS fue usado para la preparación de las diluciones de las muestras a sembrar; esto con el objetivo de lograr cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes para cada muestra. El medio se utilizó a una concentración de 1 % (1 g/ 100 ml) de acuerdo a lo establecido en la norma COVENIN 1337 – 90.

En la fase III, se llevó acabo el acondicionamiento de los sustratos, (agua de avena 20 %, 25 % de fructosa, lactosuero 20 % y 25 % de sacarosa) y el desarrollo de las corridas experimentales por bloques, con condiciones constantes de temperatura (37 °C), pH (4,5), aireación (1,5 a 2,0 CFM), agitación (200 Rpm). Se realizaron mediciones de sólidos solubles (*°Brix*) cada 5 minutos durante el transcurso de cada proceso, se realizaron siembras en profundidad

por triplicado para cada una de las diluciones (10-1, 10-3, 10-5, 10-7), y análisis de absorbancia y transmitancia empleando un espectrofotómetro (espectronic 20D) con una longitud de onda de 650 nm a cada hora del proceso. Las placas fueron incubadas en una estufa a 37 °C por un lapso de 72 horas y luego se realizó recuento en las mismas para determinar unidades formadoras de colonias (UFC).

La validación de los resultados (fase VI) se realizó a través de simulaciones del modelo matemático del proceso con el sistema de control en lazo cerrado. Para ello se creó un software en Matlab que integra las ecuaciones, los parámetros y las condiciones del modelo. Se desarrolló un bloque de función S para Simulink siguiendo la información presentada en Co (2004) y en The Math Works Inc. (2008-b). Esto permitió visualizar el comportamiento del sistema controlado y comparar el crecimiento del *Lactobacillus casei* en presencia del sustrato lactosuero y agua de avena para verificar la mejor respuesta.

Resultados y discusión

Se presenta la simulación del comportamiento del modelo de crecimiento para el proceso de cultivo de *Lactobacillus casei*, así como el comportamiento experimental para el crecimiento del mismo y el análisis de resultados.

Simulación del comportamiento del modelo de proceso seleccionado Se desarrolló una función que representa las ecuaciones y parámetros del sistema, y una función S de Simulink. Con ellasse simuló el proceso utilizando Matlab y

Simulink. Las corridas simulan 9 horas de operación, partiendo de un volumen de 1,5 litros y con un flujo constante de 0,12 g/l.

La figura 1 muestra el diagrama en Simulink del sistema simulado, en él se observa la aplicación de un escalón de flujo a un bloque de función S que simula el proceso y produce como salidas las concentraciones (en g/l) de biomasa (X), sustrato (S), etanol (E), oxígeno (O) y dióxido de carbono (CO₂), así como el volumen (V), en litros, del material dentro del biorreactor.

Figura 1. Diagrama en Simulink del sistema simulado

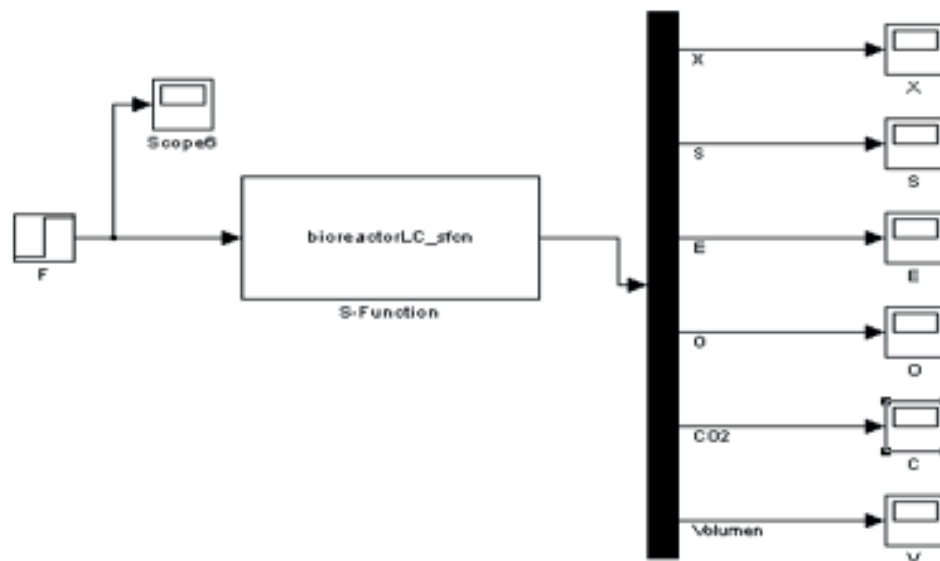


Figura 2. Concentración de biomasa (UFC) vs. tiempo (h)

Las figuras que se muestran a continuación representan el sistema de crecimiento simulado, donde la máxima concentración de biomasa de agua de avena se logra en un tiempo de 9 h con un rango cercano a $1,3 \times 10^{-3}$ UFC (figura 2); la concentración del sustrato agua de avena comienza a agotarse de manera abrupta a las 6 h (figura 3); la máxima concentración de biomasa de lactosuero experimenta su máximo valor alrededor de las 6,2 h con un rango cercano a $1,32 \times 10^9$ UFC (figura 4); la concentración del sustrato lactosuero comienza agotarse alrededor de las 6,4 h (figura 5) y el volumen máximo obtenido en el biorreactor es de aproximadamente 3 litros (figura 6).

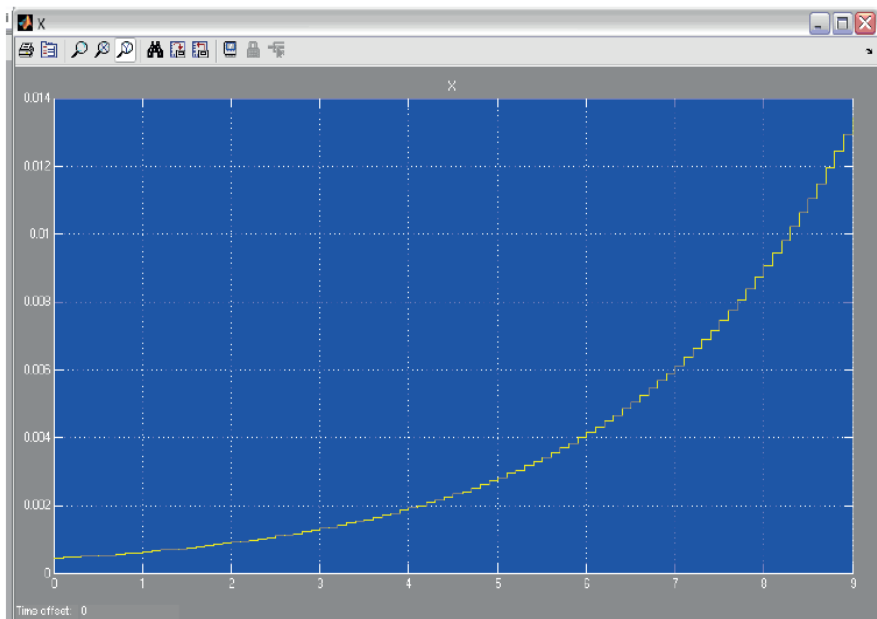


Figura 3. Concentración de sustrato (g/l) vs. tiempo (h)

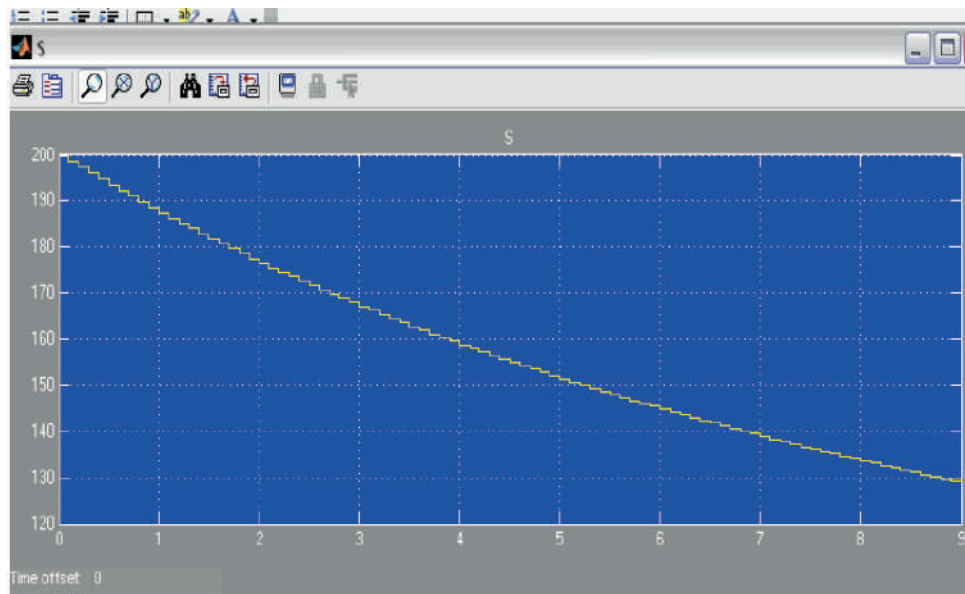


Figura 4. Concentración de biomasa (ufc) vs. tiempo (h)

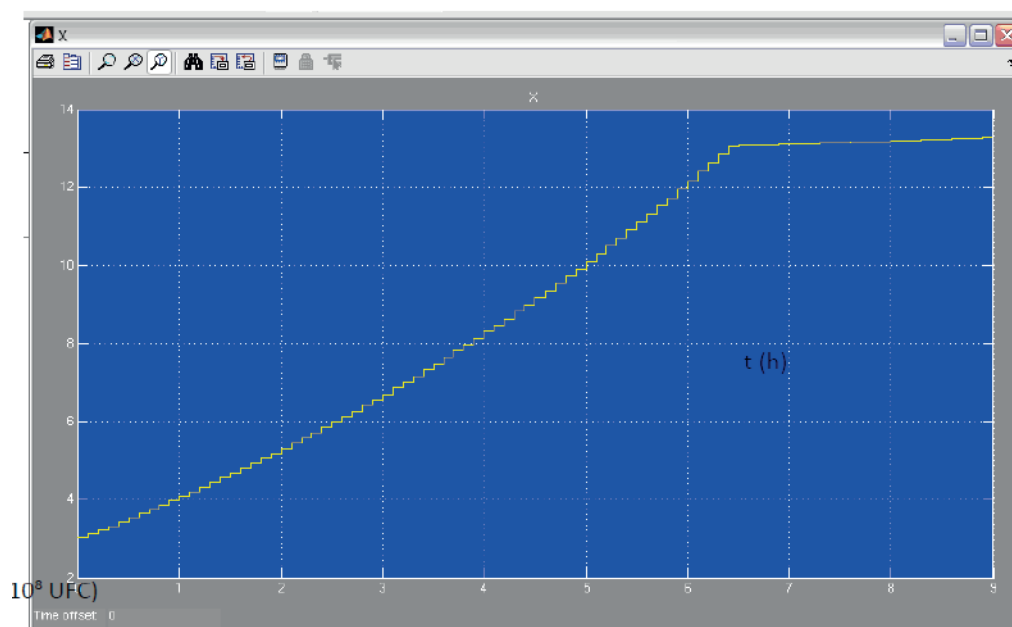


Figura 4. Concentración de biomasa (ufc) vs. tiempo (h)

Figura 5. Concentración de sustrato (g/l) vs. tiempo (h)

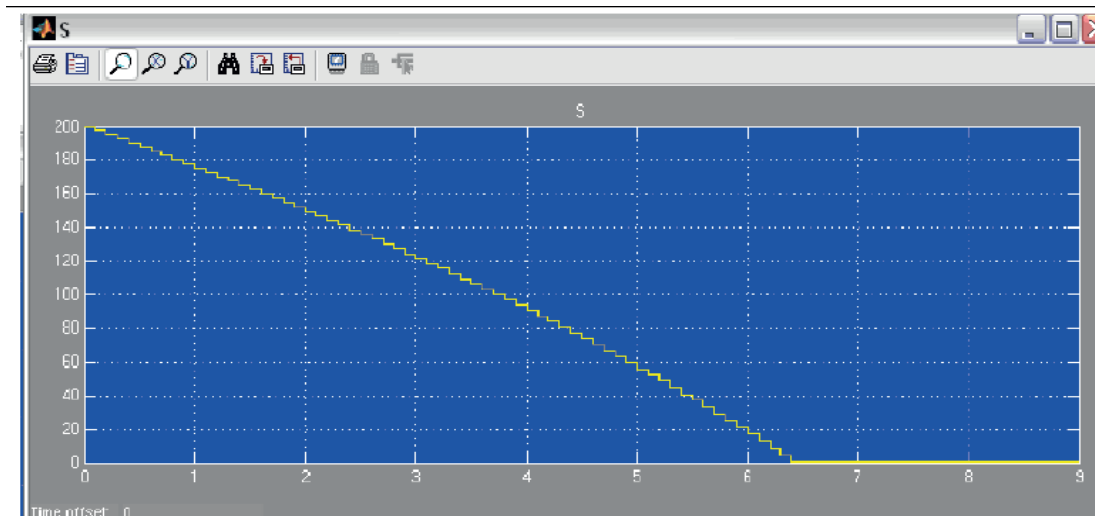
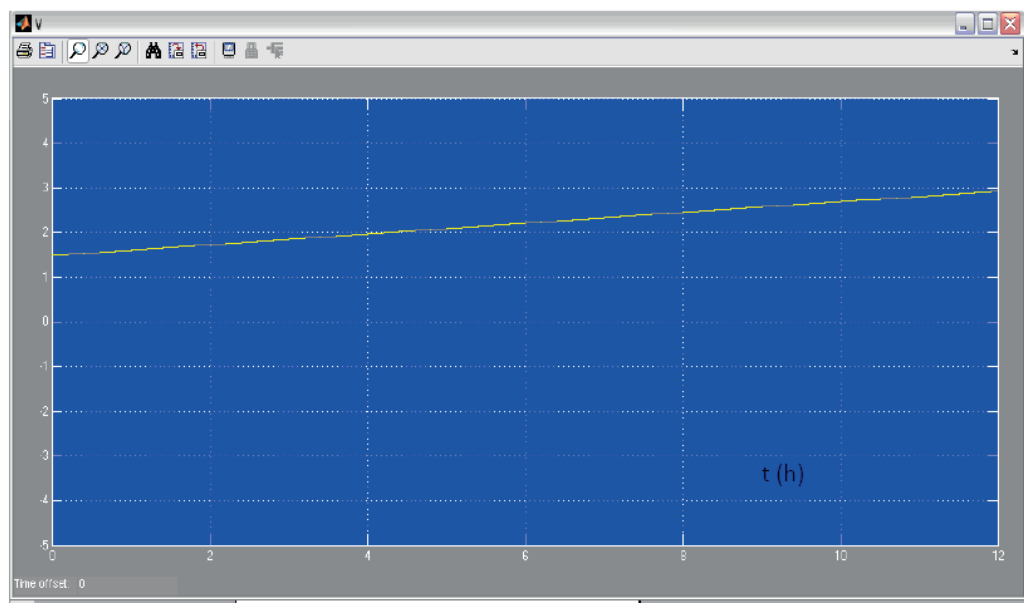
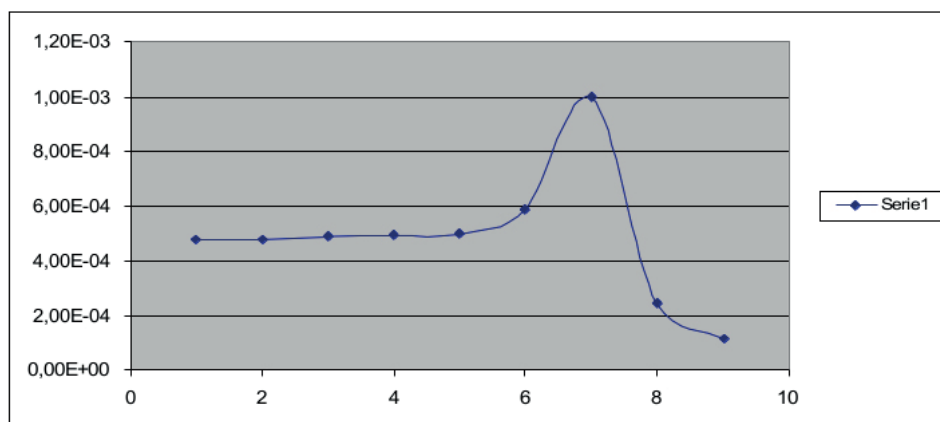


Figura 6. Volumen de material en el biorreactor (en litros)



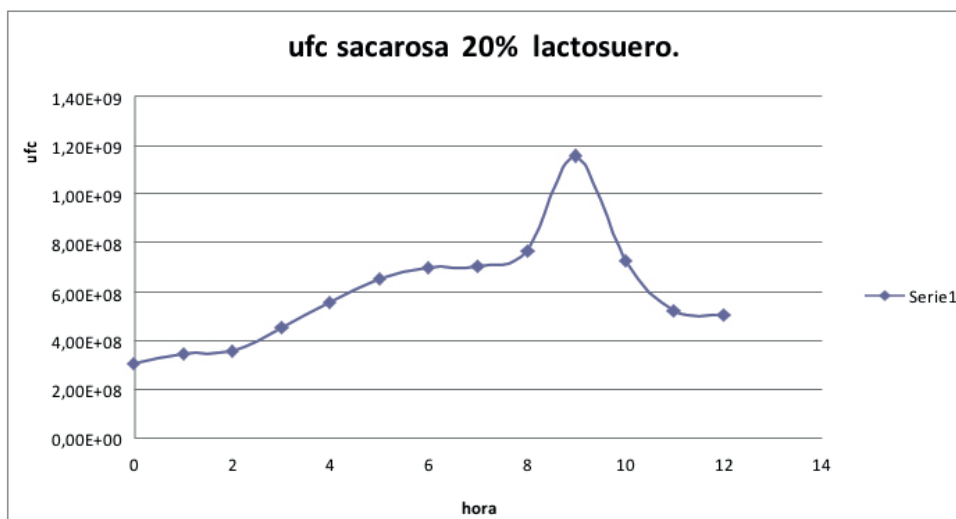
En la figura 7 se observa el crecimiento del microorganismo con el sustrato agua de avena, 20 % de fructosa, 1 ml de vitamina A y 2 ml de complejo B. Se obtuvo un máximo de 1×10^{-3} ufc aproximadamente en la hora 7 de la corrida, a partir de ese momento comienza la etapa de declive o muerte.

Figura 7. Concentración de biomasa (UFC) vs. tiempo (h)



En la figura 8 se observa el crecimiento del microorganismo con el sustrato lactosuero al 20 % de sacarosa, se le agrego 1 ml de vitamina A, 2 ml de complejo B y se obtuvo un pico máximo de $1,18 \times 10^9$ UFC aproximadamente en la hora 9 de la corrida. En la hora 6, se le adicionó 1 gramo de l-cisteína-clorhidrato; este compuesto logró ser un catalizador y produjo un acelerado descenso de los grados brix y un incremento de las UFC.

Figura 8. Concentración de biomasa (UFC) vs. tiempo (h)



Conclusiones

Luego de los resultados obtenidos en el desarrollo de la presente investigación, se llegó a las siguientes conclusiones: El modelo y funciones de transferencia obtenidas mediante la función S Matlab que contiene la descripción del proceso bajo estudio logran ajustarse con un grado de exactitud elevado al comportamiento de los valores presentados en la fase experimental.

Se demostró a través de la simulación, usando el Simulink de Matlab, que los sistemas obtenidos, tanto con el primer sustrato (agua de avena) como con el segundo sustrato (lactosuero), cumplen con los requerimientos del proceso.

Durante el lapso de control de 9 horas el sistema diseñado bajo el segundo sustrato (lactosuero) produjo una mejor respuesta que el primer sustrato (agua de avena), debido a los componentes nutricionales que posee el lactosuero como sustrato para la reproducción del *Lactobacillus casei*.

Agradecimientos

En primer lugar, a Dios, por amarnos tanto y regalarnos el fruto de la constancia y la perseverancia. En segundo lugar, y no por eso menos importante, agradecemos sinceramente al Ministerio del Poder Popular para Ciencia, Tecnología e Innovación (MCTI), por la oportunidad que nos brinda de participar en este Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación.

Y gracias a nuestras familias por su paciencia y comprensión durante las muchas horas que les hemos robado.

Referencias bibliográficas

Aguirre, E., Ramírez, A., Aguilar, M., y Alvarez, M. (2009).

Producción de proteína y biomasa probiótica de *Lactobacillus casei* liofilizadas a partir de suero de leche de cabra. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 8(1): 69-76.

Arguelles, M., Borovoy, J., Toussaint, G. y García-Aranda, J. (2000). Uso de prebiótico en niños. *Boletín Médico del Hospital de México*, 57: 454-463.

Balam, P., Ochoa, E. y Sonda, O. (2002). Perfil de mortalidad en el estado de Yucatán, México. *Biomédica*, 13:1-8.

Co, T. (2004). Short Tutorial on Matlab. Michigan Technological University. Recuperado de: <http://www.chem.mtu.edu/~tbco/cm416/MatlabTutorialPart5.pdf>

Fitzgerald, R. y Murray, B. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59:118-125.

Forsberg, B., Petzold, M., Tomson, G., Allebeck, P. (2007). Diarrhea Case Management in Low- and Middle- Income Countries- an Unfinished Agenda. *Bulletin of the World Health Organization*, 85: 42-50.

Holzappel, W. (2002). Appropriate Starter Cultures Technologies for Small-Scale Fermentation in Developing Countries. *International Journal of Food Microbiology*, 75: 197-213.

Hurtado, J. (2012). *Metodología de la investigación. Guía para la comprensión holística de la ciencia*. 4ta edición. Colombia: Ediciones Quirón.

Marín, A. y Cortez, R. (2010). Evaluación de la viabilidad de crecimiento de la cepa nativa *Lactobacillus plantarum* LPB M10 y la cepa comercial *Lactobacillus casei* ATCC 393 en pulpa de uchuva y en solución isotónica de glucosa. *Vitae* (17)1: 21-28.

Shah, N. (2001). Functional foods from probiotics. *Food Technology*, 55: 46-52.

Vandenplas, Y., Mayans, J., Ramírez, G. y Castañeda, C. (2002). Consenso sobre probióticos, agentes bioterapéuticos en el manejo de las diarreas. *Acta Pediátrica de México*, 23: 243-249.