



## Artículo

# **Determinación de las condiciones de crecimiento *in vitro* de una cepa probiótica (*Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*) aislada del tracto intestinal de terneros (*Bos taurus*)**

Determination *in vitro* growth conditions of a probiotic strain (*Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*) isolate from intestinal tract of calves (*Bos taurus*)

José Ávila<sup>1\*</sup>, Manuel Ávila<sup>2</sup>, Belkys Tovar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioprocesos, División de Biotecnología, Fundación Centro de Investigaciones del Estado para la Producción Experimental Agroindustrial (Fundación CIEPE).

Avenida Principal, Zona Industrial Agustín Rivero, Municipio Independencia, Apartado 100, San Felipe, Estado Yaracuy, Venezuela.

<sup>2</sup>Laboratorio de Calidad de Granos y Semillas, Fundación para la Investigación Agrícola DANAC. Parroquia San Javier, Municipio San Felipe, Estado Yaracuy, Venezuela.

\*Autor para correspondencia: josegavila@cantv.net

Aceptado 10-Julio-2010

## **Resumen**

El objetivo de este estudio fue conocer el efecto de la temperatura, pH y la concentración de inóculo sobre el crecimiento *in vitro* de una cepa probiótica (*Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*) aislada del intestino delgado de terneros. Para ello se utilizó en el primer caso, el método de superficie de respuesta para determinar las condiciones de pH y temperatura óptimas de la cepa, y en el segundo, un diseño experimental completamente aleatorizado considerando el factor concentración de inóculo inicial a seis niveles, donde el crecimiento (en medio De Man, Rogosa y Sharpe) expresado en unidades de Absorbancia, constituyó la variable respuesta; presentándose una máxima respuesta

(0,806 uA) para 5 % de concentración inicial de inóculo. Los valores de pH y temperatura utilizados permitieron el establecimiento de una zona óptima de crecimiento *in vitro* en los siguientes intervalos, pH entre 5,1 y 5,6; y temperatura entre 38,0 y 41,5 °C, donde el máximo crecimiento se obtuvo a pH 5,31 y a 39,38 °C. Por otro lado se encontraron incrementos significativos del crecimiento *in vitro* ( $p < 0,05$ ) a medida que se utiliza menor concentración de inóculo inicial. Con la información obtenida se espera incrementar los rendimientos de la cepa y así promover la producción de productos probióticos para el consumo animal en Venezuela.

**Palabras claves:** aditivos alimentarios probióticos, bacterias ácido lácticas, *Lactobacillus*.

### Abstract

This study used a statistics methodology for determining the effect of pH, temperature and starter inoculation concentration on *in vitro* growth of a probiotic strain (*Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*) isolate from intestinal tract of calves. A response surface method was used for optimization of *in vitro* growth conditions pH and temperature of strain and hazardous experimental design was obtained from combination in six levels of starter concentration inoculation factor, where the growth expressed in Absorbance units was the effect measurement. The values pH and temperature used estimated a optimum growth zone, in the pH range 5.1 to 5.6; and temperature 38.0 to 41.5 °C and the maximum growth was obtained from pH 5.31 and 39.38 °C. In other side was found that different levels showed significant effects ( $p < 0.05$ ) with a maximum values estimated growth of 0.806 Au obtained from 5 % inoculation. Information obtained found increases the yields of the strain, promoting the production of probiotics cultures for animal feeding in Venezuela.

**Key words:** acid lactic bacteria, *Lactobacillus*, probiotic feed additive.

## INTRODUCCIÓN

El término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “para la vida” definido internacionalmente como “microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero, más allá de la inherente a la nutrición en general” (FAO/WHO, 2002). En cuanto a los beneficios se incluyen mejoría en enfermedades infecciosas y enfermedades crónicas intestinales (Marteau *et al.*, 2001), inmunomodulación (Isolauri *et al.*, 2001), biodisponibilidad de nutrientes, enfermedades cardiovasculares y diabetes (Drisko *et al.*, 2003), alergias de origen alimentario (Zubillaga *et al.*, 2001) y cáncer (Hirayama y Rafter,

2000). Por otro lado, las enfermedades entéricas son de mucha importancia en lo que concierne a la industria pecuaria, debido a la pérdida de productividad, incremento de mortalidad y la contaminación asociada a los productos para consumo humano. Ante este hecho, las bacterias probióticas en la actualidad se emplean como aditivos en la alimentación de animales de granja, específicamente como suplementos alternativos al uso terapéutico de antibióticos y como promotores del crecimiento (Doyle, 2001; Patterson y Burkholder, 2003).

Un buen agente probiótico necesita ser no patógeno, no tóxico, resistente al ácido gástrico, poseer adherencia al tejido epitelial intestinal y producir sustancias antibacterianas, entre otras propiedades. Los probióticos pueden ser bacterias, mohos y levaduras, pero la mayo-

ría son bacterias. Entre las bacterias ácido lácticas comúnmente usadas se encuentran: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. salivarius*, *L. plantrum*, *L. bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *L. fermentum* y *L. delbrueckii*. (Suvarna y Bobby, 2005).

*Lactobacillus delbrueckii* es una especie que incluye tres subespecies: *delbrueckii*, *bulgaricus* y *lactis*. El principal interés de estas bacterias ácido lácticas proviene de la importancia de las subespecies *bulgaricus* y *lactis* en la industria láctea (la subespecie *delbrueckii* no fermenta lactosa ni degrada caseína). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es Gram-positiva, inmóvil, no formadora de esporas, homofermentativa obligada con exclusiva producción de ácido D-(-)-láctico y con una temperatura óptima de crecimiento de entre 40 y 44 °C (Germond *et al.*, 2003).

*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es tradicionalmente empleada en combinación con *Streptococcus thermophilus* para la elaboración de yogur, en protooperación y esto a menudo resulta en tasas de acidificación más altas, un pH final más bajo, estimulación de la producción de compuestos aromáticos y mejora de la estabilidad del producto final, en comparación a cuando se utilizan monocultivos (Herve-Jimenez *et al.*, 2009).

El efecto del yogur comercial preparado con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* sobre lactobacilos nativos en el ciego del intestino grueso de cerdos fue evaluado por Ohashi *et al.* (2007) quienes demostraron que la administración de yogur con *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* estimuló el crecimiento de ciertos *Lactobacillus* nativos para modificar la composición de lactobacilos del apéndice cecal en cerdos.

Toda potencial cepa probiótica debe ser plenamente identificada y evaluada en sus características fisiológicas, tolerancia a las condiciones gastrointestinales, adhesión al epitelio intestinal, producción de compuestos

antimicrobianos, viabilidad y seguridad para el consumo humano (Gueimonde y Salminen, 2006). Por otra parte, los factores de producción del probiótico tales como el tipo de crecimiento, la composición del caldo de crecimiento, las condiciones de crecimiento *in vitro* y la concentración de inóculo inicial tienen también una gran influencia sobre dichas características, y junto a los subsiguientes procesos de extracción y de elaboración inciden en la calidad final del alimento probiótico (Del Piano *et al.*, 2006). Ávila *et al.* (2010) extrajeron cepas del intestino delgado de terneros (*Bos taurus*) caracterizadas por presentar alto potencial probiótico, sin embargo no se tuvo conocimiento acerca de las condiciones fisiológicas de crecimiento ni de la concentración de inóculo adecuadas para maximizar su producción a escala piloto. Por lo anterior, en el presente trabajo se planteó como objetivo establecer diseños experimentales para determinar el efecto de las variables pH, temperatura y concentración de inóculo sobre la producción de una cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aislada del intestino delgado de terneros de la misma especie.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

Se extrajeron muestras del intestino delgado de cinco (5) terneros por medio de una intervención quirúrgica (enterotomía) en un período de 45 días, posteriormente los animales fueron monitoreados en su recuperación. Todo ello se llevó a cabo en el Hospital Universitario de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA), ubicado en Tarabana, Estado Lara, Venezuela.

### Aislamiento, selección e identificación de las cepas

De las muestras extraídas se aislaron

las cepas características de bacilos acidolácticos, las cuales fueron incubadas en condiciones de microaerobiosis (5-7 % v/v de oxígeno) en jarras herméticas Anaerocult® (Merck, Alemania). Luego estas cepas fueron sometidas a una serie de pruebas bioquímicas de identificación y selección, según la metodología utilizada por Brizuela *et al.* (2001), entre ellas: crecimiento en agar De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) teñido con verde de bromocresol para determinar la producción de ácido láctico, tinción de Gram y de esporas, observación de la morfología celular en Microscopio (Olympus, CX41, Japón) a 40X y las pruebas de producción de enzimas citocromo-c-oxidasa empleando el reactivo de Kovacs; y de la enzima catalasa utilizando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estabilizado al 30 % (Riedel-de Haën®, Alemania). Las pruebas anteriores permitieron la selección de una cepa que posteriormente fue identificada por medio del kit API® 50 CHL (bioMérieux, Francia).

### Medios de cultivo y almacenamiento

La cepa identificada fue almacenada en un congelador de ultra baja temperatura (Nuair, ILS-DF8, Corea) para su posterior uso a - 86 °C en tubos Eppendorf de 2 mL. Para el aislamiento de las cepas se utilizó agar MRS (HiMedia, India) el cual es un medio de mantenimiento específico para el género *Lactobacillus*. El medio de crecimiento y de mantenimiento fue caldo MRS con pH ajustado a 6,5 en el primer caso y con 30 % de glicerol como crioprotector, en el caso del almacenamiento de la cepa.

### Inóculo

El inóculo inicial para las pruebas se preparó a partir de las muestras congeladas, tomando 1 mL de la muestra, sembrando en 9 mL de MRS (10 % v/v) a pH 6,5 e incubando por 48 horas, para luego repicar 1 mL de este caldo a otros 9 mL de MRS incubando a su vez

por 16 horas. Posteriormente se tomó este como inóculo inicial, sembrando al 10 % para las pruebas de pH y temperatura, y a diferentes concentraciones según el diseño experimental para la determinación del efecto de la concentración de inóculo.

### Diseño Experimental

El crecimiento ( $Y$ ) de la cepa *Lactobacillus*  $T_{\text{seleccionada}}$  ( $T_S$ ) constituyó la variable respuesta y fue determinada bajo la influencia de dos condiciones fisiológicas de crecimiento: pH ( $X_1$ ) y temperatura ( $X_2$ ); dichos factores se establecieron en un diseño experimental con arreglo factorial  $3^2$  obtenido de la combinación de dos factores a tres niveles (pH inicial: 4; 5 y 6; y Temperatura de incubación: 35; 40 y 45 °C) los cuales se definieron a partir de las condiciones fisiológicas de crecimiento observadas en evaluaciones previas de la capacidad probiótica de la cepa (datos no mostrados) y, finalmente, fueron codificados de acuerdo a la Ec. 1.

$$\text{Ecuación (1)} \quad x_i = \frac{X_i - X_o}{\Delta X_i} \quad (i = 1, 2, 3),$$

donde  $x_i$  es el valor codificado del factor en el nivel  $i$ ;  $X_i$  es el valor real del factor en el nivel  $i$ ;  $X_o$  es el valor real del factor en el nivel intermedio y  $\Delta X_i$  es la diferencia en el valor real del factor de un nivel a otro. La combinación factorial fue repetida en dos bloques que correspondieron al experimento realizado en dos semanas diferentes lo cual generó un total de 18 corridas, cuyos resultados fueron obtenidos a partir de los promedios de tres réplicas por corrida. Del mismo modo el crecimiento constituyó la respuesta en el caso de la segunda prueba y fue determinada bajo la influencia de la concentración de inóculo, creciéndose en condiciones fisiológicas de pH 5,3 y temperatura 40 °C; dichos factores se establecieron en un diseño experimental com-

pletamente aleatorizado con seis observaciones por tratamiento, los cuales estuvieron definidos por la concentración de inóculo inicial de la cepa T<sub>S</sub> a seis niveles (5, 10, 15, 20, 25 y 30 %).

### Pruebas de crecimiento

En el caso de la evaluación de pH y temperatura, el estudio se realizó en tubos de ensayo de 15 mL a los cuales se le adicionó 9 mL de caldo MRS. Inicialmente los tubos fueron ajustados para los diferentes niveles de pH con HCl 6N y se autoclavaron a 121 °C por 15 min. Posteriormente fueron inoculados con 1 mL de cultivo fresco (10 % v/v) e incubados por 24 horas a las diferentes temperaturas conforme al diseño experimental. Los niveles de pH no fueron controlados durante el crecimiento. Finalmente se midió el crecimiento celular por Absorbancia a 600 nm ( $Abs_{600\text{ nm}}$ ) con el uso de un espectrofotómetro (JENWAY 6405, Essex, Inglaterra) para la hora inicial ( $H_0$ ) luego de inocular y la hora final ( $H_f$ ) a 24 horas de incubación. El crecimiento fue calculado por la diferencia de Abs entre  $H_f$  y  $H_0$ . Para la segunda evaluación la experiencia se realizó en tubos de ensayo de 15 mL con caldo MRS a las diferentes concentraciones del diseño. Inicialmente fue ajustado el pH a 5,3 con HCl 6N y se autoclavaron a 121 °C por 15 min. Posteriormente fueron inoculados con los volúmenes determinados de cultivo fresco e incubados por 24 horas a 40 °C. Seguidamente se midió el crecimiento celular a  $Abs_{600\text{ nm}}$  por diferencia entre  $H_f$  y  $H_0$ .

### Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron conforme al diseño experimental establecido para ambas pruebas, utilizando para ello el software Statgraphic® Plus, versión 5.0 (Statistical Graphics Corporation, Warrenton, VA, USA), utilizando la herramienta de superficie de respuesta para la presentación y el

análisis de los datos. En el primer caso se determinaron los factores en su efecto lineal y cuadrático y su interacción en el modelo de regresión múltiple, considerando una probabilidad de error tipo  $I$  de 0,05 y se determinaron los valores de pH y temperatura para la respuesta optimizada. Para la segunda evaluación se determinaron las diferencias significativas entre las concentraciones de inóculo usadas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Identificación de la cepa

De las muestras extraídas se aisló una cepa de bacilo productor de ácido láctico, Gram positivo, catalasa y oxidasa negativo, no formador de esporas e identificado por medio del kit de pruebas bioquímicas como *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* (T<sub>S</sub>).

### Crecimiento de la cepa

#### Variables del diseño experimental

Los resultados del crecimiento *in vitro* de acuerdo al diseño experimental establecido para la primera prueba se presentan en el Cuadro 1. El modelo de segundo orden que explica el crecimiento de la cepa T<sub>S</sub> fue definido en la Ec. 2.

El análisis de varianza del modelo de regresión obtenido se presenta en el Cuadro 2. Este mostró un alto coeficiente de determinación ( $R^2$ ) que explica más del 90 % de la variabilidad en la respuesta. Al estudiar la significación de las fuentes de variación en el modelo, se encontraron efectos significativos ( $p < 0,05$ ) para el pH, en primer y segundo orden ( $X_1$  y  $X_1^2$ ), la temperatura, en segundo orden ( $X_2^2$ ); y la interacción pH y temperatura ( $X_1 \cdot X_2$ ). Los bloques no presentaron diferencias estadísticas, lo cual es indicativo de una adecuada reproducibilidad del experimento. En

**Cuadro 1.-** Matriz de datos del diseño factorial  $3^2$  para optimización de condiciones de crecimiento de *Lactobacillus* ( $T_S$ ).

Corridas	Bloque	Variables normales		Variables codificadas		Crecimiento ( $uA_{600}^*$ ) (Y)
		pH ( $X_1$ )	Temperatura ( $^{\circ}C$ ) ( $X_2$ )	pH	Temperatura	
1	1	4	35	-1	-1	0,0470
2	1	5	35	0	-1	0,1800
3	1	6	35	1	-1	0,1255
4	1	4	40	-1	0	0,0655
5	1	5	40	0	0	0,1990
6	1	6	40	1	0	0,1910
7	1	4	45	-1	1	0,0080
8	1	5	45	0	1	0,1240
9	1	6	45	1	1	0,1645
10	2	4	35	-1	-1	0,0445
11	2	5	35	0	-1	0,1955
12	2	6	35	1	-1	0,1050
13	2	4	40	-1	0	0,0575
14	2	5	40	0	0	0,2490
15	2	6	40	1	0	0,1595
16	2	4	45	-1	1	0,0045
17	2	5	45	0	1	0,1320
18	2	6	45	1	1	0,1465

\* Absorbancia: expresada en unidades adimensionales ( $uA$ ) medidas a 600 nm.

Ecuación (2):

$$\text{Absorbancia} = 0,211444 + 0,0554167X_1 - 0,00983333X_2 - 0,0864167X_1^2 + 0,02X_1X_2 - 0,0471667X_2^2$$

**Cuadro 2.-** Análisis de varianza para crecimiento.

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	F	Probabilidad (p)
$X_1$	0,036	1	74,42	0,0000
$X_2$	0,001	1	2,34	0,1541
$X_1^2$	0,030	1	60,67	0,0000
$X_1 \cdot X_2$	0,003	1	6,42	0,0278
$X_2^2$	0,008	1	17,97	0,0014
Bloques	0,000	1	0,01	0,9134
Residual	0,005	11	-	-
Total (corregida)	0,085	17	-	-

$R^2$  (ajustado a los grados de libertad) = 90,98 %.

Error estándar de la estimación = 0,022.

cuanto a los coeficientes del modelo, el pH inicial, en sus términos lineales y cuadráticos, presentaron los máximos valores de todos los factores evaluados y, en consecuencia, esta variable presentó los mayores efectos sobre el crecimiento *in vitro* de la cepa probiótica.

### Condiciones de pH y temperatura

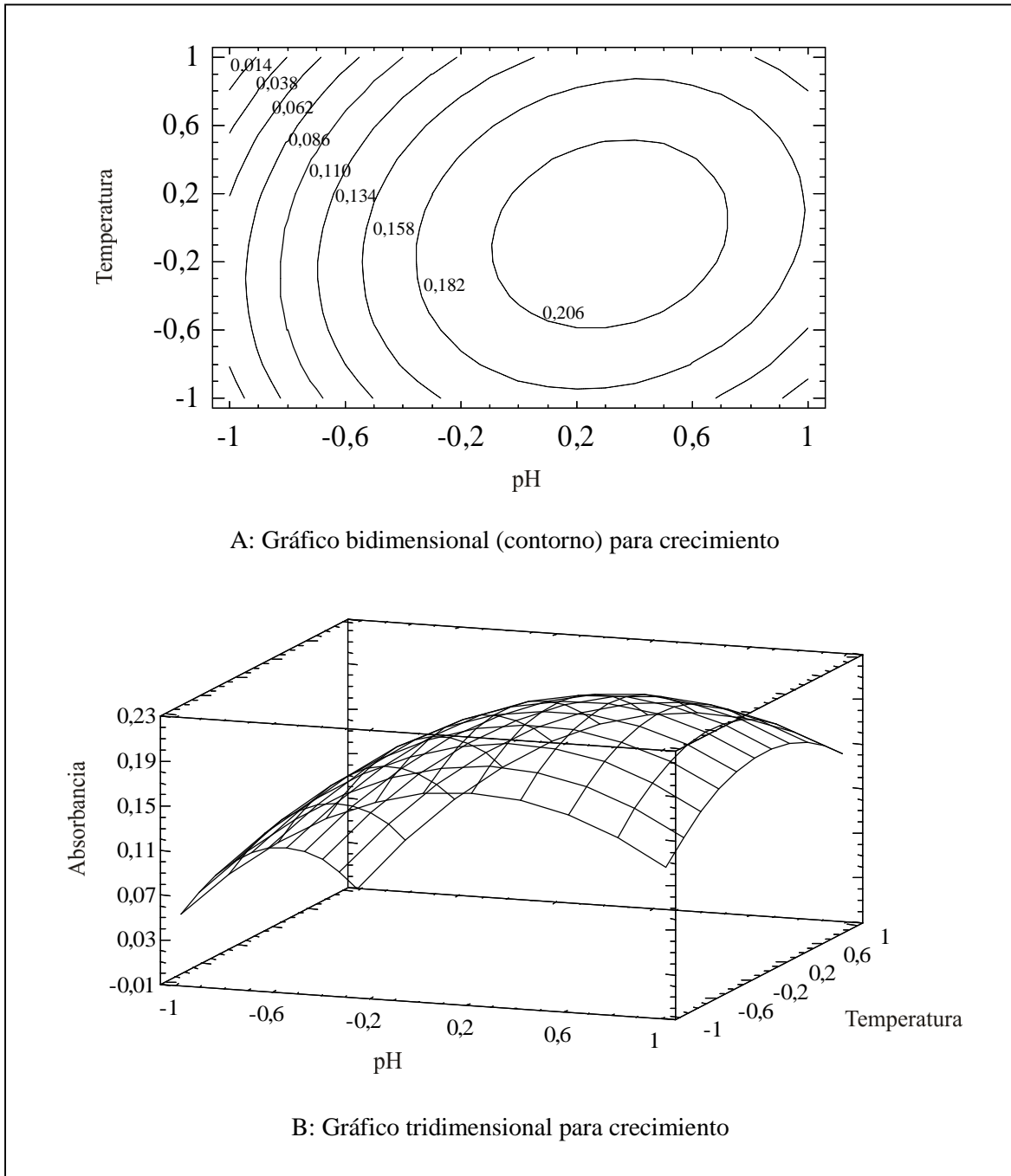
La superficie de respuesta fue aplicada para determinar las condiciones de pH y temperatura donde se alcanza el mayor crecimiento *in vitro* de la cepa T<sub>S</sub> de *L. delbruekii*. El modelo de regresión cuadrático se presenta gráficamente de forma bidimensional (Fig. 1A) y tridimensional (Fig. 1B). En el gráfico bidimensional se observan líneas de contorno como resultado de las interacciones significativas entre las variables independientes obtenidas. Dichos contornos se reducen a una elipse dentro del gráfico. Esto indica que los niveles de pH y temperatura seleccionados en el estudio permitieron el establecimiento de una región óptima, en la cual se enmarca el máximo crecimiento de la cepa. La región en cuestión permitió la estimación de un intervalo de trabajo que estuvo comprendido entre valores de pH de 5,1 a 5,6 y a temperaturas de 38,0 a 41,5 °C, para lo cual se obtuvo un crecimiento de 0,206 uA. Los intervalos de trabajo resultan de mucha utilidad para garantizar las condiciones de crecimiento fisiológico adecuadas durante la experiencia, debido a que algunos equipos operan bajo amplios intervalos de pH y temperatura.

En el gráfico tridimensional se puede apreciar un valor máximo de la respuesta donde los valores de pH y temperatura estimados fueron de 5,31 y 39,38 °C, respectivamente. Para estas condiciones fisiológicas se obtuvo un crecimiento de 0,222 uA. Los intervalos de temperatura óptima de crecimiento *in vitro* estimados para la cepa del *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* son inferiores a los señalados por Kandler y Weiss (1986) para este género (48 a 52 °C) y resultan similares a los valores de tem-

peratura indicados para la misma especie pero subsp. *delbruekii*; por otra parte superan los valores de 37 °C señalados por Rönkä *et al.* (2003) para la producción dos cepas *L. delbruekii* cultivadas en medio MRS. En cuanto a los bajos valores de pH estimados para la respuesta optimizada se atribuye al medio ambiente ácido típico del tracto intestinal de los terneros de donde es originaria la cepa. El pH resultó inferior a los valores señalados por Silva *et al.* (2005) para *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* aislado de yogur, en dicho estudio el crecimiento fue realizado a un pH controlado de 6,5 que es el nivel normalmente usado en el crecimiento de cultivos iniciadores para la producción de yogur. Como ya se mencionó, el pH del medio de crecimiento fue ajustado inicialmente pero no fue controlado durante el crecimiento. Ante este hecho, la auto-acidificación de la cepa por la producción de ácido láctico de la misma probablemente resultó en una reducción del pH del medio que permitió a la cepa probiótica lograr los mayores niveles de crecimiento *in vitro* (Brizuela *et al.*, 2001).

### Concentración de inóculo

En la evaluación de la concentración de inóculo el análisis de varianza reveló diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) en la concentración del inóculo inicial sobre el crecimiento de la cepa probiótica T<sub>S</sub> presentados en el Cuadro 3. La comparación de medias presentó el establecimiento de 6 grupos diferentes ( $p < 0,05$ ) correspondientes a cada uno de los niveles de concentración inicial establecidos por disminuciones marcadas del crecimiento con el incremento de la concentración del inóculo inicial de la cepa T<sub>S</sub> donde el máximo valor de crecimiento se alcanzó a 5 % de concentración según lo muestra la Figura 2. En el análisis de regresión el crecimiento de la cepa T<sub>S</sub> fue explicado por la ecuación  $y = - 0,0209x + 0,899$  la cual presentó un ajuste adecuado ( $R^2 = 0,98$ ).



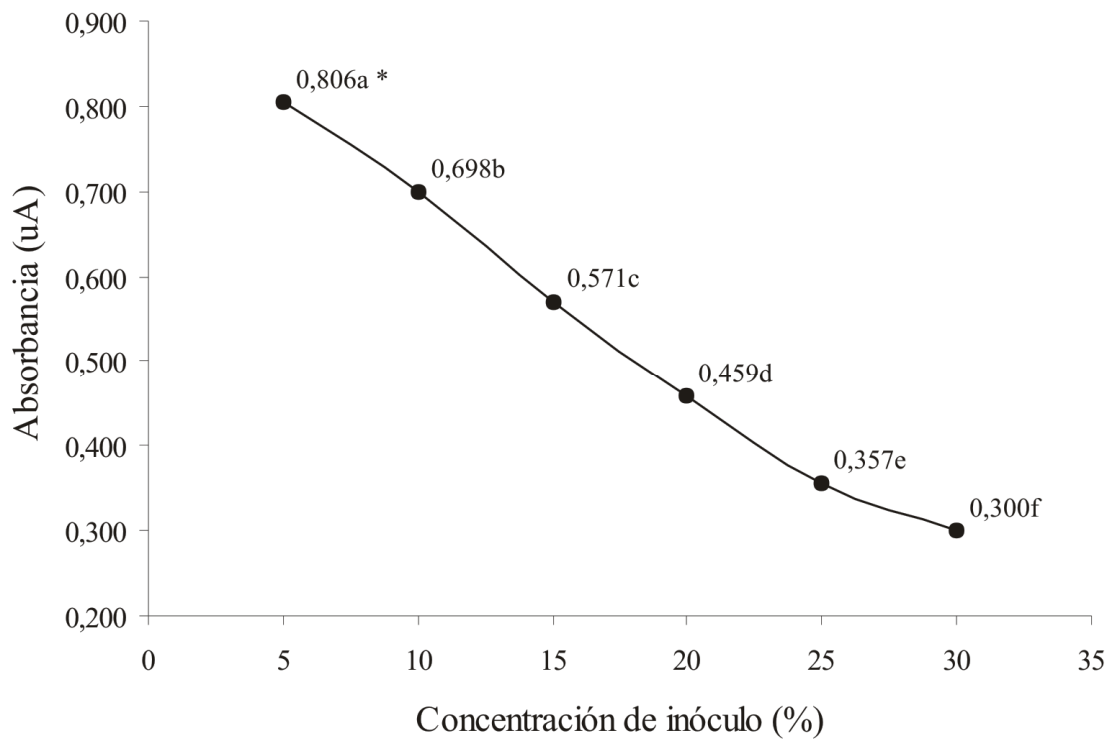
**Figura 1.-** Gráficos de crecimiento *in vitro* de la cepa probiótica *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* para variables codificadas.



**Cuadro 3.-** Análisis de varianza para crecimiento por concentración de inóculo.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio	Valor de $F_{\text{calculado}}$	Valor de $F_{\text{tabulado}}$	Sig.
Entre grupos	0,776	5	0,1552	1552	0,05 = 2,77	*
Dentro de grupos	0,002	18	0,0001		0,01 = 4,25	**
Total (corregida)	0,779	23				

Sig.: significancia, \* = diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), \*\* = diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ).



\* Valores seguidos de letras diferentes presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).  
uA: unidades de Absorbancia (adimensional) medidas a 600 nm.

**Figura 2.-** Gráfico de crecimiento *in vitro* de la cepa probiótica *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*.

La pendiente negativa corroboró que el crecimiento disminuye al aumentar la cantidad de inóculo en el intervalo estudiado, el cual resultó en una tasa de - 0,0209 uA por cada punto porcentual de incremento de la concentración de inóculo inicial.

La disminución marcada del crecimiento *in vitro* con el aumento de la concentración inicial del inóculo puede ser atribuida al metabolismo de duplicación celular propio de la cepa T<sub>S</sub>, donde al aumentar la concentración de células viables disminuye la disponibilidad de los nutrientes presentes en el medio de crecimiento, por ello el metabolismo celular probablemente se regula a dichas condiciones de disponibilidad y responde en una disminución del crecimiento. Estos fenómenos de supervivencia celular son similares a los que ocurren durante la formación de biopelículas (biofilms) y en el retardo de la fase de latencia según lo describen Lacroix y Yildirim (2007).

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- El modelo de superficie de respuesta empleado para determinar las condiciones fisiológicas óptimas de crecimiento de la cepa probiótica *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* (T<sub>S</sub>) *in vitro* presentó un ajuste adecuado ( $R^2 = 0,90$ ) y permitió la identificación de las condiciones de pH (5,31) y temperatura (39,38 °C) para maximizar el crecimiento.
- El aumento de la concentración de inóculo inicial considerado en este estudio redujo significativamente el crecimiento de la cepa *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* (T<sub>S</sub>) *in vitro*. Niveles de 5 % de concentración de inóculo inicial produjeron los mayores valores de crecimiento de la cepa.
- El empleo de las condiciones fisiológicas y de concentración de inóculo determinadas, constituye el pun-

to de partida para estudiar el efecto de otros parámetros de proceso tales como agitación, concentración de oxígeno y formulación de medio de crecimiento alternativo a escala piloto e industrial para la producción de esta cepa probiótica con fines comerciales, es por ello que con la información generada se espera ampliar las posibilidades de producción cepas probióticas a escala piloto e industrial en Venezuela, específicamente para alimentación animal.

## AGRADECIMIENTOS

A los doctores Omar Verde y Helis Hernández Autoridades de la Fundación CIEPE; el doctor Eduardo Graterol de la Fundación DANAC, las profesoras María Brizuela, Gloria Bueno y Paulina Serrano del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar; la profesora Yurimaua Perazzo de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, y al ingeniero Ramón Román y las técnicas Ingrid Orozco, Yaneth Rojas, Loyda Gutiérrez y Sorangel Manto de la Fundación CIEPE.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ávila, José; Ávila, Manuel; Tovar, Belkis; Brizuela, María; Perazzo, Yurimaua y Hernández, Helis. 2010. Capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus* extraídas del tracto intestinal de animales de granja. Revista Científica (FCV-LUZ). XX(2):161-169.
- Brizuela, M.; Serrano, P. and Pérez, Y. 2001. Studies on probiotic properties of two *Lactobacillus* strains. Brazilian Archives of Biology and Technology 44(1):95-99.
- Del Piano, M.; Morelli, L.; Strozzi, G.P.; Allesina, S.; Barba, M., Deidda, F.; Lorenzini, P.; Ballaré, M.; Montino, F.; Orsello, M.; Sartori, M.; Garello, E.; Carmagnola, S.; Pagliarulo, M. and Ca-

- purso, L. 2006. Probiotics: from research to consumer. *Digestive and Liver Disease*. 38(2):S248-S255.
- Doyle, M. Ellin. 2001. Alternatives to antibiotic use for growth promotion in animal husbandry. Food Research Institute Briefings. 1-17. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA. <http://fri.wisc.edu/briefs/antibiot.pdf>
- Drisko J.A.; Giles, C.K. and Bischoff, B.J. 2003. Probiotics in health maintenance and disease prevention. *Alternative Medicine Review*. 8(2):143-155.
- FAO/WHO. 2002. Food and Agriculture Organization of the United Nations-World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Working Group Report. <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>
- Germond, Jacques-Edouard; Lapierre, Luciane; Delley, Michèle; Mollet, Beat; Felis, Giovanna E. and Dellaglio, Franco. 2003. Evolution of the bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a partial genomic study with reflections on prokaryotic species concept. *Molecular Biology and Evolution*. 20(1):93-104.
- Gueimonde, Miguel and Salminen, Seppo. 2006. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease*. 38(2):S242-S247.
- Herve-Jimenez, Luciana; Guillouard, Isabelle; Guedon, Eric; Boudebbouze, Samira; Hols, Pascal; Monnet, Véronique; Maguin, Emmanuelle and Rul, Françoise. 2009. Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(7):2062-2073.
- Hirayama, Kazuhiro and Rafter, Joseph. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection*. 2(6):681-686.
- Isolauri, Erika; Sütas, Yelda; Kankaanpää, Pasi; Arvilommi, Heikki and Salminen, Seppo. (2001). Probiotics: effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(suppl.):444S-450S.
- Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular, nonsporng, Gram-positive rods. In Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. Section 14. (pp. 1208-1260). New York, USA: Springer.
- Lacroix, Christophe and Yildirim, Selcuk. 2007. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology*. 18(2):176-183.
- Marteau, Philippe R.; de Vrese, Michael; Cellier, Christophe J. and Schrezenmeir, Jürgen. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73(suppl.):S430-S436.
- Ohashi, Yuji; Tokunaga, Makoto; Taketomo, Naoki and Ushida, Kazunari. 2007. Stimulation of indigenous lactobacilli by fermented milk prepared with probiotic bacterium, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strain 2038 in the pigs. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 53(1):82-86.
- Patterson, J.A. and Burkholder, K.M. 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science*. 82:627-631.
- Rönkä, Elina; Malinen, Erja; Saarela, Maria; Rinta-Koski, Merja; Aarnikunnasa, Johannes and Palva, Airi. 2003. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *International Journal of Food Microbiology*. 83(1):63-74.
- Silva, J.; Carvalho, A.S.; Ferreira R.; Vitorino, R.; Amado, F.; Domingues, P.; Teixeira, P. and Gibbs, P.A. 2005. Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to stress

conditions during spray-drying. *Journal of Applied Microbiology*. 98(3):775-782.

Suvarna, V.C. and Bobby, V.U. 2005. Probiotics in human health: a current assessment. *Current Science*. 88(11): 1744-1748.

Zubillaga, M.; Weill, R.; Postaire, E.; Goldman, C.; Caro, R. and Boccio, J. 2001. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrition Research*. 21(3):569-579.