



Diseño de medios de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus pentosus* LB-31 como probiótico para la producción animal

Design of culture media for the growth of *Lactobacillus pentosus* LB-31 as a probiotic for animal production

Dailyn Sosa-Cossio^{1*} ; Yaneisy García-Hernández¹ ; Julio C. Dustet-Mendoza² ; Maryen Alberto Vázquez³ ; Nereyda Albelo-Dorta³ ; Dania Ortega-de-la-Paz³ 

¹Instituto de Ciencia Animal, Grupo de Alimentos y Aditivos. Mayabeque, Cuba; email: dailyn.sosa@gmail.com; yaneisyg@gmail.com

²Universidad Tecnológica de la Habana "José Antonio Echeverría", Facultad de Ingeniería Química. La Habana, Cuba; email: jcdm@quimica.cujae.edu.cu

³Instituto de Ciencia Animal, Unidad Central de Laboratorios. Mayabeque, Cuba; email: maryne4e@gmail.com; nereydaalbelo@gmail.com; danyfaby2607@gmail.com

*autor para correspondencia: dailyn.sosa@gmail.com

Cómo citar: Sosa-Cossio, D.; García-Hernández, Y.; Dustet-Mendoza, J.C.; Vázquez, M.A.; Albelo-Dorta, N.; Ortega-de-la-Paz, D. 2025. Diseño de medios de cultivo para el crecimiento de *Lactobacillus pentosus* LB-31 como probiótico para la producción animal. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 28(1):e2644. <http://doi.org/10.31910/rudca.v28.n1.2025.2644>

Artículo de acceso abierto publicado por Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, bajo una Licencia Creative Commons CC BY-NC 4.0

Publicación oficial de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Institución de Educación Superior Acreditada en Alta Calidad por el Ministerio de Educación Nacional

Recibido: abril 26 de 2024

Aceptado: junio 3 de 2025

Editado por: Helber Adrián Arévalo Maldonado

RESUMEN

El diseño de medios de cultivo simples y económicos es uno de los aspectos más importantes para el proceso de obtención de probióticos a escalas industriales. El objetivo de la presente investigación fue diseñar medios de cultivo económicos para el crecimiento de *Lactobacillus pentosus* LB-31. Se diseñaron cinco medios (M2, M3, M4, M5 y M6), a partir de la composición del medio tradicional MRS para el crecimiento de lactobacilos, donde se sustituyeron las fuentes de carbono y de nitrógeno por melaza de caña y urea, respectivamente. Las cinéticas de crecimiento se realizaron a 37 °C durante 24 h y se determinó concentración microbiana, pH, velocidad específica máxima de crecimiento, tiempo de duplicación de la biomasa, concentración máxima de biomasa y concentraciones de ácido láctico, acético y fórmico. Los resultados mostraron que LB-31 tuvo su mayor concentración a las 12 h, con 8,72 log ufc/mL, en el medio M4, sin diferencias con el medio control. Las velocidades específicas máximas de crecimiento fueron inferiores en todos los medios con respecto al control y, consecuentemente, el tiempo de duplicación de la biomasa fue superior. El pH disminuyó en todos los medios hasta valores inferiores a 3,9 y LB-31 fue capaz de producir ácido láctico, acético y fórmico en el medio M4 (6,61, 2,51 y 14,87 g/L, respectivamente). Se concluye que los medios de cultivo con melaza de caña de azúcar pueden ser una alternativa económica para la obtención del probiótico con *Lactobacillus pentosus* LB-31.

Palabras clave: Ácido acético; Ácido fórmico; Ácido láctico; Crecimiento microbiano; Melaza de caña de azúcar.

ABSTRACT

Designing economical and straightforward culture media is one of the most essential aspects to obtaining probiotics at industrial scales. This research aimed to design economical culture media for the growth of *Lactobacillus pentosus* LB-31. Five media (M2, M3, M4, M5 and M6) were designed based on the composition of the traditional MRS medium for the growth of lactobacilli where the carbon and nitrogen sources were replaced by cane molasses and urea, respectively. Growth kinetics were carried out at 37 °C for 24 h, and microbial concentration, pH, maximum specific growth rate, biomass doubling time, maximum biomass concentration, and lactic, acetic, and formic acid concentrations were determined. The results showed that LB-31 had its highest concentration at 12 h with 8.72 log cfu/mL in the M4 medium, with no differences from the control medium. The maximum specific growth rates were lower in all media than in the control, and the biomass doubling time was higher. The pH decreased in all media to values lower than 3.9, and LB-31 was able to produce lactic, acetic, and formic acid in M4 medium (6.61, 2.51, and 14.87 g/L, respectively). It is concluded that culture media with sugar cane molasses could be an economical alternative to obtain the probiotic with *Lactobacillus pentosus* LB-31.

Keywords: Acetic acid; Formic acid; Lactic acid; Microbial growth; Sugar cane molasses.

INTRODUCCIÓN

En la obtención industrial de probióticos uno de los aspectos de mayor interés es el medio de cultivo, ya que este debe ser lo más simple y económico posible (Fenster *et al.* 2019). Generalmente, estos se consideran apropiados cuando incluyen extracto de levadura, péptidos, azúcares y magnesio y manganeso en concentraciones óptimas. Además, se deben tener en cuenta los requerimientos nutricionales de la cepa de interés (Vera Mejía *et al.* 2021).

Tradicionalmente, el medio De Man, Rogosa y Sharpe (MRS pH 6,2±0,2), diseñado por De Man *et al.* (1960), se utiliza para el crecimiento de bacterias ácido láctica a escala de laboratorio. Este medio puede ser más selectivo si se disminuye el pH, se reemplaza la fuente de carbono y nitrógeno o se realizan cambios en las condiciones de incubación (Santos *et al.* 2016). Otro medio para el cultivo de *Lactobacillus* fue el propuesto por Rogosa *et al.* (1951), el cual, posee mayor acidez (pH 5,4±0,2), debido a la presencia de altas concentraciones de acetato de sodio (Reuter, 1985).

Los medios mencionados con anterioridad se usan ampliamente para el crecimiento de cepas probióticas en el laboratorio. Varias investigaciones en esta etapa se centran en optimizar cada componente y sus concentraciones, según la cepa en estudio; sin embargo, la mayoría de ellos son muy complejos por lo que no es factible su utilización, a escala industrial.

Para el diseño y selección de medios de cultivo se deben considerar factores, como el método de fermentación, la obtención de un gran número de células y los costos (Santos *et al.* 2016). Se plantea que el costo del medio de cultivo es, aproximadamente, el 30 % del costo total del proceso de fermentación (Rodrigues *et al.* 2006).

Al tener en cuenta los aspectos anteriores es necesario explorar fuentes de nutrientes económicas para la producción de biomasa probiótica, a escalas industriales (Chin *et al.* 2024); entre estas, se encuentran el uso de residuos agroindustriales, ya que suministra fuentes de carbono y nitrógeno que permiten disminuir los costos de producción, además de utilizar desechos que pudieran tener un efecto negativo para el medio ambiente.

La melaza de caña de azúcar, el salvado de trigo y arroz, el bagazo de caña de azúcar o yuca, los materiales vegetales lignocelulósicos y los residuos de cosechas de frutas son los subproductos agroindustriales más utilizados para la preparación de medios de cultivo (Santos *et al.* 2016). En este sentido, Pyar *et al.* (2014) utilizaron residuos de piña como medios de fermentación, para cultivar cepas probióticas de lactobacilos. Asimismo, Romero-Mota *et al.* (2023) emplearon estiércol bovino y melaza de caña para producir biomasa probiótica y ácido láctico, a partir de cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum* y *Bacillus subtilis*, mientras que Wan Mansor *et al.* (2024) investigaron las potencialidades de *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 y *Lactobacillus casei* Shirota, para fermentar el jugo de caña roja y obtener una bebida probiótica funcional.

García-Hernández *et al.* (2016) seleccionaron a *Lactobacillus pentosus* LB-31 con potencialidades probióticas para su uso en la producción animal. Su efecto positivo se demostró en pollos de ceba (García-Hernández *et al.* 2016), truchas arco iris (García Hernández & Pérez Sánchez, 2015), cerdos en crecimiento (Ayala *et al.* 2014) y corderos pelibuey (Gutiérrez González *et al.* 2020); sin embargo, hasta la fecha, las investigaciones con este microorganismo estuvieron encaminadas a demostrar las potencialidades de la cepa, sin tener en cuenta el proceso de obtención del aditivo, a escalas productivas, que permita su posterior comercialización y empleo en los sistemas de producción animal.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue diseñar un medio de cultivo económico para el crecimiento de *Lactobacillus pentosus* LB-31, como probiótico para la producción animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo: se utilizó la cepa *Lactobacillus pentosus* LB-31, con número de acceso FR717464 en el GenBank (García-Hernández *et al.* 2016) y perteneciente al Banco de Microorganismos para la Producción Animal (BAMIPA) del Instituto de Ciencia Animal (Mayabeque, Cuba). La cepa conservada por congelación (-70 °C) en medio LEL (leche extracto de levadura) y glicerol (20 %, v/v), se activó mediante dos subcultivos en Erlenmeyer con 30 mL de caldo MRS (Oxoid, UK), a 37 °C, en condiciones estáticas y 18-24 h de incubación.

Medios de cultivos: se evaluaron cinco medios de cultivo (M2, M3, M4, M5 y M6), que se diseñaron a partir de la composición del medio MRS (De Man *et al.* 1960), donde se sustituyeron las fuentes de carbono y nitrógeno por melaza de caña de azúcar y urea. La melaza utilizada contiene un 60 % de azúcares reductores totales; 59,79 % de materia seca y 11,13 % de cenizas. Las composiciones de todos los medios se muestran en la tabla 1 y se utilizó el medio MRS como control.

Fermentación: se utilizaron Erlenmeyer con 45 mL de medio de cultivo (100 mL de capacidad total), que se inocularon al 10 % (v/v) y se incubaron a 37 °C sin agitación. Se realizaron diluciones seriadas y siembras del cultivo en placas Petri con agar Rogosa en todos los horarios de muestreo, las que se incubaron de 24-48 h, para determinar crecimiento microbiano, a través del conteo visual de las colonias (ufc/mL). Además, se determinó la concentración máxima de biomasa, la velocidad específica máxima de crecimiento ($\mu_{m\acute{a}x}$) por regresión lineal del \ln ufc/mL vs tiempo y se calculó el tiempo de duplicación de la biomasa (t_d), de acuerdo con la ecuación 1.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{m\acute{a}x}} \quad \text{ecuación 1}$$

Se realizó un balance estequiométrico del medio de cultivo, donde el crecimiento de la cepa LB-31 fue similar al medio control, ya que los medios se diseñaron variando los componentes y no las concentraciones de cada uno de ellos. A través del rendimiento biomasa/sustrato (ecuación 2), se determinó la cantidad necesaria de fuente de carbono

en el medio de cultivo; el resto de los componentes se calcularon por balance de masa (ecuación 3). Se ajustó un modelo por regresión no lineal, que relaciona el peso seco de la biomasa de LB-31 con las ufc/mL, para determinar la concentración microbiana en g/L. Se utilizó la composición elemental promedio de un microorganismo ($CH_{1,79}O_{0,50}N_{0,20}$), reportado por Doran (2013), con una desviación estándar del 3 %.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad \text{ecuación 2}$$

Donde: $Y_{X/S}$ es el rendimiento biomasa/sustrato, X_f-X_0 las concentraciones finales e iniciales de biomasa, S_0-S_f las concentraciones iniciales y finales sustrato.

$$m_i^0 = w_i \cdot m_x \quad \text{ecuación 3}$$

Donde: m_i^0 la masa inicial del elemento i en el medio de cultivo, w_i la fracción másica del elemento i en la célula y m_x la masa celular.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo diseñados para el crecimiento de *Lactobacillus pentosus* LB-31.

Componentes	Medios de cultivo					
	MRS	M2	M3	M4	M5	M6
Glucosa (g/L)	20	-	-	-	-	-
Melaza de caña de azúcar con 60 % ART(g/L)	-	20	20	20	20	20
Peptona (g/L)	10	-	-	-	-	-
Extracto de carne (g/L)	8	-	-	-	-	-
Extracto de levadura (g/L)	4	-	-	-	-	-
Urea (g/L)	-	10	10	10	10	-
Acetato de Sodio (g/L)	5	5	-	5	-	-
Citrato de amonio (g/L)	2	2	-	2	-	-
K ₂ HPO ₄ (g/L)	2	2	2	-	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O (g/L)	0,2	0,2	0,2	-	-	-
Mn SO ₄ ·4H ₂ O (g/L)	0,08	0,08	0,08	-	-	-
Tween 80 (mL/L)	1	-	-	-	-	-

ART: azúcares reductores totales.

El pH se monitoreó en pHmetro digital (Sartorius, Alemania) de precisión $\pm 0,01$ unidades en todos los medios diseñados. Se determinó ácido láctico, fórmico y acético en el medio MRS y el medio, donde LB-31 tuvo un crecimiento similar al control. Para los dos primeros ácidos se utilizó cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés), en un equipo YL-9100 (Korea, 2011). Se trabajó a 25 °C en una columna Teknokroma Tracer Excel 120 ODBS 5 μ m (25x0,4). Como fase móvil se empleó una solución tamponada de fosfato de potasio (10 mmol/L, pH 3,0) y acetonitrilo de calidad HPLC (Merck), a relación de 95:5 % (v/v). El volumen de inyección fue de 20 μ L y el flujo de 0,5 mL/min. Se utilizó una longitud de onda de 210 nm para monitorear el eluyente y se emplearon estándares de ácido láctico y fórmico (Sigma Aldrich, USA). Previamente, las muestras del cultivo de 16-20 h de fermentación se colocaron en centrifuga a 14 000 min^{-1} (Centrifuga ECEN-205, MRC Ltd., Hagsvish, Israel), se filtraron al vacío con membrana de nitrocelulosa (sistema Milliporo 0,45 μ m, Irlanda) y se realizaron las diluciones correspondientes. Los datos cromatográficos se analizaron y procesaron mediante el software YL-Clarity Chromatograph Data System.

La concentración de ácido acético se determinó mediante cromatografía de gases con un equipo DANI Master GC (DANI

Instruments S.p.A, Milán, Italia), equipado con un detector FID y una columna capilar DN-FFAP de longitud 30 m, diámetro interno 0,32 mm y grosor de película 0,25 μ . Las temperaturas máximas del inyector y el detector fueron de 200 y 250 °C, respectivamente. Se empleó dihidrógeno como gas portador y dinitrógeno, como auxiliar. Las muestras se centrifugaron a 14 000 min^{-1} durante cinco minutos y luego se inyectaron 0,5 μ L de cada una.

Diseño y tratamientos experimentales. La comparación entre cada medio diseñado y el medio MRS (control) para las cinéticas de crecimiento de la cepa y el comportamiento del pH se realizó por triplicado, a través de un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial (2x10). En cada caso, los factores fueron los medios de cultivo (medio diseñado y medio MRS) y el tiempo (0, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 18, 20 y 24 h). Para comparar los parámetros de crecimiento de LB-31 en los diferentes medios se utilizó un diseño completamente aleatorizado.

Análisis estadístico. Los datos experimentales se analizaron con el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.* 2012). Se utilizó la dócima de Duncan (1955), en los casos necesarios para discriminar diferencias entre medias a $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1, se muestran las cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus pentosus* LB-31 en cada medio diseñado y comparado con el medio control (MRS). Se presentó interacción entre los factores estudiados y se observa que en los cinco medios se definen todas las fases del crecimiento microbiano. En el caso del cultivo en caldo MRS, la fase de adaptación de la cepa fue de 2 h y se obtuvo la mayor concentración a las 8 h de fermentación, con valor de 8,81 ufc/mL (incremento de dos ciclos exponenciales) y, a partir de este tiempo, comenzó la fase estacionaria. Respecto a este medio, la fase de adaptación del lactobacilo fue igual en los medios M3 y M5; en M2 y M4 se extendió hasta las 3 y 4 h de fermentación, respectivamente, mientras que en el medio M6, no estuvo presente. Se debe señalar que, para lograr altas productividades en las fermentaciones industriales, la etapa de adaptación debe ser lo más corta posible.

El tiempo de fermentación máximo en cada uno de los medios (figura 1) fue de 6 h, para los medios M3 y M6; 8 h, para M2 y M5 y de 12 h, para M4. A partir de estos tiempos comenzó la fase estacionaria en todos los medios y se extendió hasta las 24 h, excepto en M6, donde el crecimiento disminuyó a las 24 h. En este último caso, el medio M6 fue el más simple (solo contiene melaza) y donde es el único que evidencia la muerte celular, quizás por el posible agotamiento de las reservas energéticas de LB-31 o el de cualquier otro elemento, indispensable para su crecimiento o mantenimiento. Las diferencias en los tiempos de duración de cada fase del crecimiento de la bacteria se pueden deber a la composición de los medios, ya que los lactobacilos tienen requerimientos nutricionales complejos (Mozzi, 2016). Asimismo, Jurado-Gómez *et al.* (2014) señalaron que las cinéticas de crecimiento también dependen del tipo de cepa probiótica, concentración de inóculo, tiempo y condiciones de cultivo.

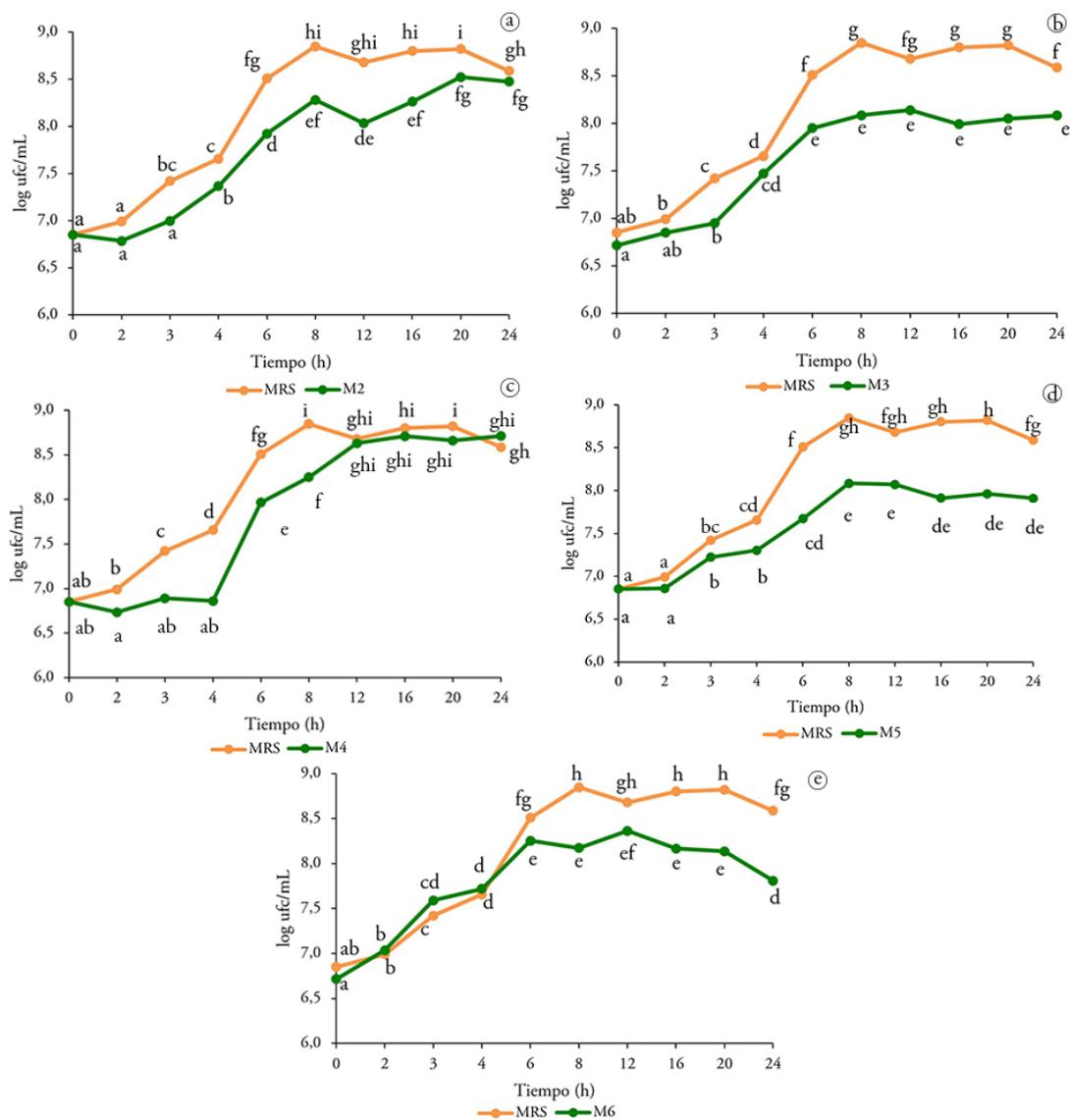


Figura 1. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus pentosus* LB-31 en los medios M2 ($EE \pm 0,08$; $p = 0,0033$), M3 ($EE \pm 0,07$; $p < 0,0001$), M4 ($EE \pm 0,08$; $p < 0,0001$), M5 ($EE \pm 0,09$; $p < 0,0001$) y M6 ($EE \pm 0,08$; $p < 0,0001$), cada uno comparado con el medio control (MRS), a 37 °C, durante 24 h. a) MRS vs. M2; b) MRS vs. M3; c) MRS vs. M4; d) MRS vs. M5; MRS vs. M6.

Las letras en el gráfico indican diferencias estadísticas a $p < 0,05$.

Se debe destacar que, respecto al control, LB-31 tuvo su mayor concentración en M4, con valor de 8,72 log ufc/mL (incremento de dos ciclos exponenciales). Este medio, además de las fuentes de carbono y nitrógeno, contiene acetato de sodio y citrato de amonio, que parecen tener un papel fundamental en el crecimiento de la cepa en estudio. Chiang *et al.* (2015) demostraron que el acetato de sodio promueve el crecimiento de cepas probióticas de *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus mucosae*, mientras que Zayed & Winter (1995) recomiendan incorporar sales de amonio en el medio, ya que pueden aumentar el rendimiento de la biomasa. Además, el uso de citrato, como ingrediente, podría resultar en un aumento de la velocidad específica de crecimiento, según Amrane & Prigent (1998).

Los resultados anteriores tienen relación con varios estudios donde utilizaron la melaza de caña de azúcar para el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos probióticos; entre ellos, se encuentran los reportes de Montes *et al.* (2003), quienes diseñaron un medio elaborado con melaza y leche en polvo, reportando el máximo crecimiento de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* a las 11 h, con valor de $9,3 \times 10^{11}$ ufc/mL. Asimismo, Ossa *et al.* (2010) y Vera Mejía *et al.* (2021) evaluaron la melaza en la misma concentración que el presente estudio, para obtener biomasa de diferentes cepas de *Lactobacillus plantarum* y alcanzaron concentraciones de 10^{10} y 10^{12} ufc/mL, respectivamente.

Por su parte, Acosta-Piantini *et al.* (2023) utilizaron la melaza de caña de azúcar pretratada como medio de fermentación para producir biomasa de la cepa probiótica *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19 (LPPF19), encontrando una viabilidad celular de

9,58 log ufc/mL y demostraron que es un medio económico para producir este microorganismo, a escalas productivas. Chin *et al.* (2024) también obtuvieron altas concentraciones de una cepa de *Lactobacillus acidophilus* en un medio optimizado, a base de melaza de caña y de extracto de levadura.

Todas las investigaciones anteriores evidencian que la melaza de caña de azúcar favorece el crecimiento de bacterias ácido lácticas, ya que es rica en azúcares fermentables, vitaminas y minerales. Esta composición no solo le permite sustituir la fuente de carbono en medios tradicionales, sino, también, otros componentes necesarios, como por ejemplo, algunos aminoácidos; sin embargo, Coelho *et al.* (2011) plantearon que se debe tener en cuenta que su composición puede ser muy variable porque depende de la madurez de la caña de azúcar, la cantidad de azúcar extraída y el método de extracción.

La tabla 2 muestra los parámetros de crecimiento de *L. pentosus* LB-31 en los medios evaluados. En todos los casos, la cepa mostró elevada velocidad específica máxima de crecimiento, aunque fue menor en los medios diseñados respecto al control, excepto para el M3. Estas diferencias se pudieran deber a que la fuente de carbono presente en el MRS es la glucosa que es de más fácil fermentación que la sacarosa, disponible en la melaza de caña de azúcar. Consecuentemente, el tiempo de duplicación de la biomasa fue superior en los medios donde la velocidad específica máxima fue inferior. Respecto a la concentración máxima de biomasa, LB-31 alcanzó valores superiores a 10^8 ufc/mL en todos los medios (incrementos de dos ciclos exponenciales), sin diferencias entre el MRS y M4.

Tabla 2. Parámetros de crecimiento de *Lactobacillus pentosus* LB-31 en los medios de cultivo diseñados.

	MRS	M2	M3	M4	M5	M6	±EE Sign
Fase exponencial (h)	2-8	3-8	2-6	4-12	2-8	0-6	---
$\mu_{m\acute{a}x}$ (h⁻¹)	0,73 ^d	0,59 ^{bc}	0,64 ^{cd}	0,48 ^{ab}	0,45 ^a	0,59 ^{bc}	0,04 p=0,0015
t_d (h)	0,95 ^a	1,19 ^{ab}	1,10 ^a	1,48 ^{bc}	1,57 ^c	1,18 ^{ab}	0,10 p=0,0070
log $X_{m\acute{a}x}$ ($X_{m\acute{a}x} \cdot 10^8$ ufc/mL)	8,80 ^e (6,47)	8,52 ^{cd} (4,52)	8,14 ^{ab} (1,45)	8,71 ^{de} (5,22)	8,08 ^a (1,25)	8,36 ^{bc} (2,33)	0,08 p=0,0002

Las letras indican diferencias estadísticas a $p < 0,05$.

Los resultados anteriores coinciden con estudios informados para otras cepas de lactobacilos, que son microorganismos que tienen altas velocidades específicas de crecimiento y el tiempo de duplicación de la biomasa se encuentra entre 0,5-1,5 h, en condiciones óptimas (Sosa Cossio *et al.* 2018). En este sentido, Jurado-Gómez *et al.* (2013) obtuvieron una velocidad específica máxima de crecimiento de $0,65 \text{ h}^{-1}$ para *Lactobacillus plantarum* 1 H2, mientras que James *et al.* (2017) lograron valores de 0,78 y $0,31 \text{ h}^{-1}$, para *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, respectivamente.

Una de las características deseadas en la selección de microorganismos probióticos es que presenten altas velocidades de crecimiento en condiciones óptimas para que tengan mayores probabilidades de colonizar el tracto gastrointestinal y se puedan duplicar rápidamente (Rojas Mogollón *et al.* 2021). Los resultados que se presentan para LB-31 en los medios de cultivo diseñados (concentraciones mayores a 10^8 ufc/mL y alta velocidad de crecimiento) permiten ratificar sus potencialidades probióticas y son comparables con otros estudios de especies y cepas de bacterias ácido lácticas.

Las investigaciones encaminadas al diseño de medios de cultivo que alcancen elevadas concentraciones microbianas ($>10^7$ ufc/mL) son elementos importantes en el desarrollo de bacterias lácticas como probióticos. A nivel industrial, la obtención de biomasa probiótica se caracteriza por la inhibición del crecimiento celular, debido a la disminución del pH, fundamentalmente, por la producción de ácido láctico.

El comportamiento del pH durante el crecimiento de LB-31 se presenta en la figura 2. Después de la inoculación, esta variable

difirió entre tratamientos, debido a la composición de los medios de cultivo. En los casos donde se incluyó la urea, los valores estuvieron por encima de 7,0, debido a que este compuesto posee carácter básico; no obstante, durante el crecimiento de la bacteria, el pH de todos los medios disminuyó en 24 h hasta valores inferiores a 3,9. En este sentido, Sawatari & Yokota (2007) demostraron que cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus pentosus* pueden crecer en pH de 8,2-8,7.

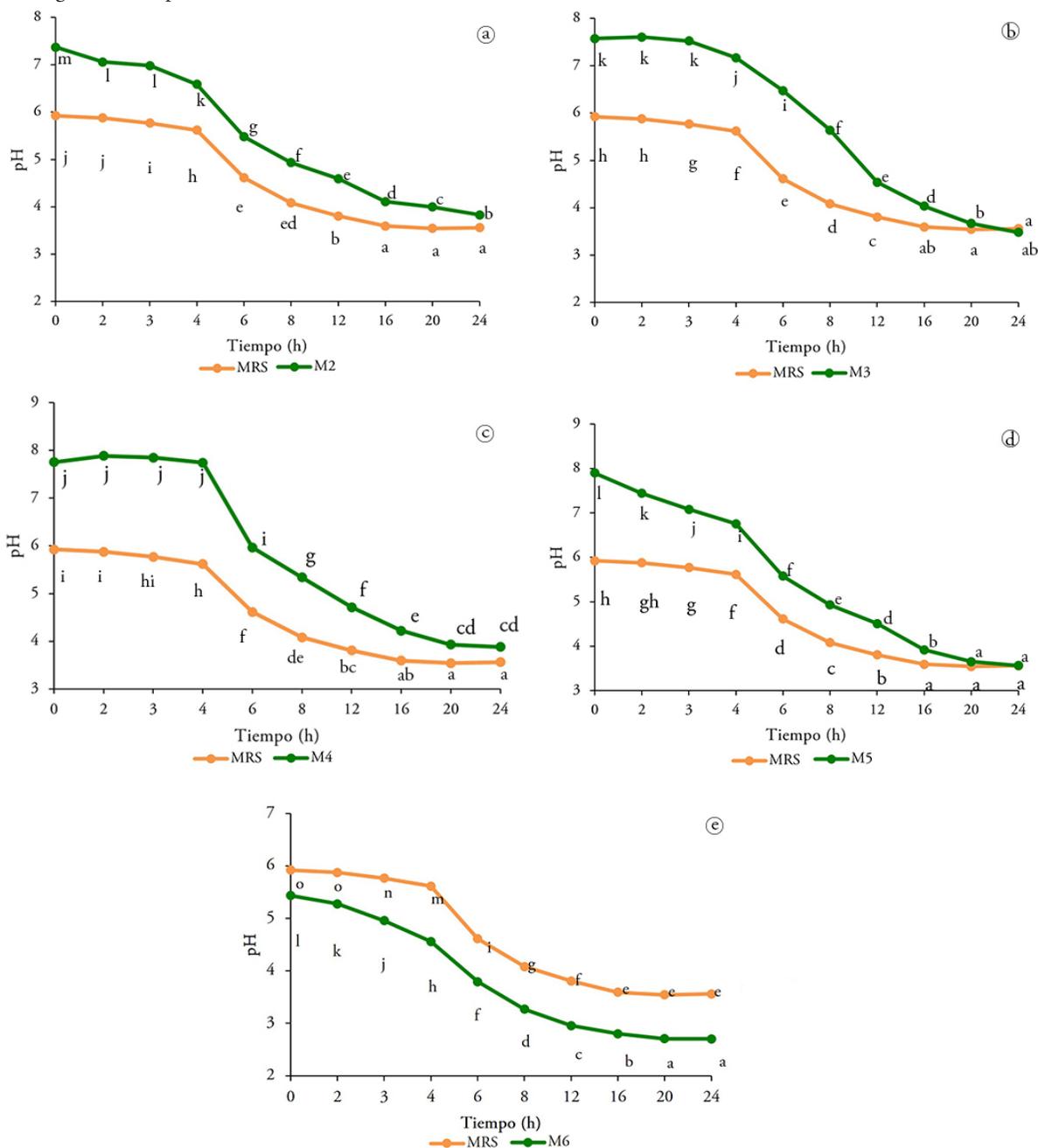


Figura 2. Comportamiento del pH del cultivo de *Lactobacillus pentosus* LB-31 en los medios M2 (EE±0,08; p=0,0033), M3 (EE±0,04; p<0,0001), M4 (EE±0,08; p<0,0001), M5 (EE±0,09; p<0,0001) y M6 (EE±0,02; p<0,0001), cada uno comparado con el medio control (MRS), a 37 °C, durante 24 h. a) MRS vs. M2; b) MRS vs. M3; c) MRS vs. M4; d) MRS vs. M5; MRS vs. M6.

Las letras en el gráfico indican diferencias estadísticas a p<0,05.

Al tener en cuenta todos los resultados anteriores se puede plantear que el medio M4 es la mejor opción para la producción de LB-31 como probiótico en la alimentación animal. En este caso, además de ser uno de los medios donde se obtuvieron los mejores parámetros de crecimiento, incluye menos componentes en su preparación, comparado con los medios M2 y M3, lo que tiene ventajas tecnológicas y económicas para la obtención del probiótico, a escalas productivas. En este sentido, se evidencia que la urea favoreció el crecimiento de LB-31, debido, fundamentalmente, a la naturaleza de esta fuente, donde el nitrógeno no proteico es de más fácil aprovechamiento por la bacteria. Además, los requerimientos nutricionales de los microorganismos pueden variar según la cepa y especie microbiana. La posibilidad de utilizar la urea en el medio de cultivo ofrece beneficios económicos, ya que es una fuente menos costosa (Sánchez *et al.* 2007), en comparación con otras fuentes de nitrógeno, como el extracto de levadura, que se utilizan en las fermentaciones industriales (Benaissa *et al.* 2017; Wang *et al.* 2020).

A pesar de las ventajas que tiene la urea como fuente de nitrógeno en el crecimiento de *L. pentosus* LB-31 es recomendable ajustar y controlar el pH dentro del intervalo óptimo para bacterias ácido lácticas, ya que se conoce que uno de los mayores inconvenientes

para la obtención de biomasa probiótica, a escalas productivas, es la inhibición del crecimiento celular, debido a la producción de ácidos.

Las bacterias ácido lácticas crecen adecuadamente en medios ligeramente ácidos y algunas de ellas son capaces de mantener su viabilidad, a valores muy bajos de pH. Esta característica les permite sobrevivir al ambiente del tracto gastrointestinal, donde predomina pH ácido y altas concentraciones de sales biliares. La tabla 3 muestra las concentraciones de ácidos que produce LB-31 durante su crecimiento en los medios MRS y M4. Se aprecia que la bacteria produjo ácido láctico, acético y fórmico en los dos medios de cultivo y que los valores de las concentraciones fueron superiores en el MRS. Los resultados indican que el metabolismo de LB-31 puede variar en función del medio que se utilice para su crecimiento y ratifican que es una bacteria heterofermentativa facultativa, según lo planteado por Bintsis (2018). De forma general, las bacterias ácido lácticas son altas productoras de ácido, fundamentalmente, láctico. En este sentido, Saavedra *et al.* (2021) obtuvieron altas concentraciones de ácido láctico a partir del crecimiento de *Lactobacillus plantarum* Hui1, en un medio con melaza de caña de azúcar.

Tabla 3. Concentraciones de ácidos que produce *Lactobacillus pentosus* LB-31 en medio MRS y M4 entre las 16-20 h a 37 °C.

Ácidos	Concentración (g/L)		±EE Sign
	MRS	M4	
Ácido láctico	11,77	6,61	1,16 p=0,0348
Ácido acético	3,97	2,51	0,04 p<0,0001
Ácido fórmico	16,85	14,87	0,38 p=0,0203

Los resultados de la presente investigación sugieren que el medio de cultivo diseñado cubre las necesidades nutricionales de la cepa al utilizar los nutrientes presentes en la melaza, así como el nitrógeno que aporta la urea. En este caso, el balance estequiométrico indicó que un litro de medio de cultivo debe contener 6,26 g de azúcares reductores totales (10,4 g/L de melaza de caña), 0,37 g de urea, 1 g de citrato de amonio y 0,056 g de acetato de sodio, para producir la mayor concentración de LB-31 alcanzada en este estudio, que fue de $5,22 \times 10^8$ ufc/mL (1,57 g biomasa seca/L). De ahí, que el medio M4 tiene potencialidades para obtener 3 g biomasa seca/L (10^{10} ufc/mL) de LB-31, por lo que no existe limitación de nutrientes; no obstante, la concentración microbiana solo aumentó de 10^6 a 10^8 ufc/mL (incremento de dos ciclos exponenciales), debido, quizás, al metabolismo característico de la cepa que es, además de la obtención de biomasa, la producción de diferentes ácidos orgánicos. Escobar-Ramírez *et al.* (2020), también obtuvieron aumentos en dos ciclos exponenciales de la concentración microbiana de *L. pentosus* ABHEAU-05, cultivado en una solución de leche desnatada en polvo al 12 % (p/v) y 2 % de inulina (E NATURE®), a 37 °C y 28 h.

Diferentes autores coinciden en que el medio de cultivo tradicional para el crecimiento de lactobacilos (MRS) es eficaz, a escala de laboratorio, pero muy costoso para producciones industriales (Hanoune *et al.* 2015; Santos *et al.* 2016; Benaissa *et al.* 2017). También, Grattepanche & Lacroix (2013) señalaron entre otras desventajas, su complejidad y la presencia de compuestos de origen animal, como el extracto de carne. El medio de cultivo M4, propuesto en el presente estudio, tiene beneficios económicos para el proceso de obtención del aditivo con *L. pentosus* LB-31, a escalas productivas y esto se debe a que la melaza es un subproducto de la industria azucarera que tiene un costo menor que la glucosa. Además, tiene una composición simple comparada con otras, que se informan en la literatura, para el crecimiento de cepas de *Lactobacillus*, lo que constituye un aspecto necesario en las fermentaciones industriales.

Por lo tanto, se puede concluir, que los medios de cultivo con melaza de caña de azúcar pudieran ser una alternativa económica para la obtención de probióticos, a escalas productivas. El medio M4 es la opción más adecuada para la obtención de *L. pentosus* LB-31 como aditivo probiótico, destinado a la producción animal.

Agradecimientos: Los autores agradecen la colaboración de la Unidad Central de Laboratorios del Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba. **Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existen conflicto de intereses entre ellos. **Financiamiento:** Las investigaciones se realizaron con recursos propios del Grupo de Alimentos y Aditivos del Instituto de Ciencia Animal, Mayabeque, Cuba. **Contribución de los autores:** Dailyn Sosa Cossio: conceptualización, investigación, metodología, redacción-borrador original; Yaneisy García Hernández: conceptualización, investigación, metodología, redacción-revisión y edición; Julio C. Dustet Mendoza: conceptualización, redacción-revisión y edición; Maryen Alberto Vázquez: investigación, metodología; Nereyda Albelo Dorta: investigación, curación de datos; Dania Ortega de la Paz: metodología, análisis formal.

REFERENCIAS

- ACOSTA-PIANTINI, E.; RODRÍGUEZ-DÍEZ, E.; CHAVARRI, M.; LÓPEZ-DE-ARMENTIA, I.; VILLARAN, M.C.; LOMBRAÑA, J.I. 2023. Preparation of hydrolyzed sugarcane molasses as a low-cost medium for the mass production of probiotic *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* F19. *Separations*. 10(1):33. <https://doi.org/10.3390/separations10010033>
- AMRANE, A.; PRIGENT, Y. 1998. Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 14:529-534. <https://doi.org/10.1023/A:1008828415639>
- AYALA, L.; GARCÍA, Y.; SAVÓN, L.L.; BOUCOURT, R.; CASTRO, M.; HERRERA, M. 2014. Evaluación de la actividad probiótica del *Lactobacillus pentosus* en indicadores de salud y productivos de cerditos destetados. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 21(3):130-133.
- BENAÏSSA, M.; ZADI-KARAM, H.; KARAM, N.E. 2017. Development of a sweet whey-based medium for culture of *Lactobacillus*. *African Journal of Biotechnology*. 16(30):1630-1637. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2017.16088>
- BINTSIS, T. 2018. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*. 4(4):665-684. <http://dx.doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
- CHIANG, M.L.; CHEN, H.C.; CHEN, K.N.; LIN, Y.C.; LIN, Y.T.; CHEN, M.J. 2015. Optimizing production of two potential probiotic lactobacilli strains isolated from piglet feces as feed additives for weaned piglets. *Asian Australas Journal of Animal Sciences*. 28(8):1163-1170. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.14.0780>
- CHIN, W.L.; KEE, P.E.; NG, H.S.; LAN, J.C.W.; TAN, J.S. 2024. Selective screening *Lactobacillus* spp. against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* and optimizing a cane molasses-based medium with *Lactobacillus acidophilus* as a guiding model. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 160:105197. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2023.105197>
- COELHO, L.F.; DE LIMA, C.J.B.; RODOVALHO, C.M.; BERNARDO, M.P.; CONTIERO, J. 2011. Lactic acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molasses: optimization of medium composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 28(1):27-36. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322011000100004>
- DE MAN, J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Microbiology*. 23(1):130-135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M; ROBLEDO, C.W. 2012. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible desde Internet en: <http://www.infostat.com.ar>
- DORAN, P.M. 2013. *Bioprocess engineering principles*. Segunda edición. Academic Press. London. 919p. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-22348-8>
- DUNCAN, D.E. 1955. Multiple range and multiple F. test. *Biometrics*. 11:1.
- ESCOBAR-RAMÍREZ, M.C.; JAIMEZ-ORDAZ, J.; ESCORZA-IGLESIAS, V.A.; RODRÍGUEZ-SERRANO, G.M.; CONTRERAS-LÓPEZ, E.; RAMÍREZ-GODÍNEZ, J.; CASTAÑEDA-OVANDO, A.; MORALES-ESTRADA, A.I.; FELIX-REYES, N.; GONZÁLEZ-OLIVARES, L.G. 2020. *Lactobacillus pentosus* ABHEAU-05: An *in vitro* digestion resistant lactic acid bacterium isolated from a traditional fermented Mexican beverage. *Revista Argentina de Microbiología*. 52(4):305-314. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.10.005>
- FENSTER, K.; FREEBURG, B.; HOLLARD, C.; WONG, C.; LAURSEN, R.R.; OUWEHAND, A.C. 2019. The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*. 7(3):83. <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms7030083>
- GARCÍA HERNÁNDEZ, Y.; PÉREZ SÁNCHEZ, T. 2015. Obtención de microorganismos con actividad probiótica para animales monogástricos. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*. 5(3):1-19.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y.; PÉREZ-SÁNCHEZ, T.; BOUCOURT, R.; BALCÁZAR, J.L.; NICOLI, J.R.; MOREIRA-SILVA, J.; RODRÍGUEZ, Z.; FUERTES,

- H.; NUÑEZ, O.; ALBELO, N.; HALAIHEL, N. 2016. Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Research in Veterinary Science*. 108:125-132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.08.009>
- GRATTEPANACHE, F.; LACROIX, C. 2013. 13 - Production of viable probiotic cells. En: McNeil, B.; Archer, D.; Giavasis, I.; Harvey, L. *Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*. Woodhead Publishing Limited, ETH Zürich, Switzerland. p.321-353. <http://dx.doi.org/10.1533/9780857093547.2.321>
- GUTIÉRREZ GONZÁLEZ, D.; GARCÍA HERNÁNDEZ, Y.; SOSA COSSIO, D. 2020. El efecto de *Lactobacillus pentosus* LB-31 como aditivo microbiano en la alimentación de corderos. *Livestock Research for Rural Development*. 32(3):43.
- HANOUNE, S.; DJEGHRI-HOCINE, B.; KASSAS, Z.; DERRADJI, Z.; BOUDOUR, A.; BOUKHEMIS, M. 2015. Optimization of *Lactobacillus fermentum* DSM 20049 growth on whey and lupin based medium using response surface methodology. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 9(9):679-685. <http://dx.doi.org/10.19026/ajfst.9.1759>
- JAMES, M.; VELASTEGUI, E.; CRUZ, M.A. 2017. Evaluación de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* a nivel de laboratorio, con inulina como fuente de carbono. *Bionatura*. 2(1):235-240. <http://dx.doi.org/10.21931/RB/2017.02.01.4>
- JURADO-GÁMEZ, H.; CALPA-YAMÁ, F.; CHASPUENGAL-TULCÁN, A. 2014. Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos. *Revista Veterinaria y Zootecnia*. 8(2):15-35. <http://dx.doi.org/10.17151/vetzo.2014.8.2.2>
- JURADO-GÁMEZ, H.; RAMÍREZ, C.; AGUIRRE, D. 2013. Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. *Revista Veterinaria y Zootecnia*. 7(2):37-53.
- MONTES, A.; SANTACRUZ, A.; SAÑUDO, J.; PAZOS, A. 2003. Efecto in vitro de *Lactobacillus casei subsp rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. *Revista del Centro de Estudios en Salud*. 1(4):5-12.
- MOZZI, F. 2016. Lactic acid bacteria. En: Caballero, B.; Finglas, P.M.; Toldrá, F. *Encyclopedia of food and health*. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)-CONICET, Academic Press. San Miguel de Tucumán, Argentina. p.501-508. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00414-1>
- OSSA, J.A.; VANEGAS, M.C.; BADILLO, A.M. 2010. Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 13(1):97-104. <https://doi.org/10.31910/rudca.v13.n1.2010.713>
- PYAR, H.; LIONG, M.T.; PEH, K.K. 2014. Potentials of pineapple waste as growth medium for *Lactobacillus* species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 6(1):142-145.
- REUTER, G. 1985. Elective and selective media for lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2(1-2):55-68. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(85\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(85)90057-1)
- RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. 2006. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*. 32(3):135-142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2006.09.012>
- ROGOSA, M.; MITCHELL, J.A.; WISEMANN, R.E. 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *Journal of Bacteriology*. 62(1):132-133. <https://doi.org/10.1128/jb.62.1.132-133.1951>
- ROJAS MOGOLLÓN, C.; OCHOA MOGOLLÓN, G.; ALFARO AGUILERA, R.; QUEREVALÚ ORTIZ, J.; SÁNCHEZ SUÁREZ, H. 2021. Producción y evaluación de inóculos lácteos probióticos obtenidos del tracto digestivo de lechón (*Sus scrofa domestica*) propuestos para alimentación porcina. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 12(1):120-137. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i1.5445>
- ROMERO-MOTA, D.I.; ESTRADA-GARCÍA, J.; SALES-PÉREZ, R.E.; MÉNDEZ-CONTRERAS, J.M. 2023. Valorization of bovine manure and molasses by the production of lactic acid and biomass through probiotic anaerobic cofermentation with *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, and *Bacillus subtilis*. *Journal of Environmental Engineering*. 150(2). <https://doi.org/10.1061/JOEEDU.EEENG-7542>
- SAAVEDRA, S.; ALEJANDRO-PAREDES, L.; FLORES-SANTOS, J.C.; FLORES-FERNÁNDEZ, C.N.; ARELLANO-GARCÍA, H.; ZAVALA, A.I. 2021. Optimization of lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* strain Hui1 in a medium containing sugar cane molasses. *Agronomía Colombiana*. 39(1):98-107. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v39n1.89674>
- SÁNCHEZ, M.I.; SANTOS, A.; DUSTET, J.C.; GUERRA, G.; LEÓN, T.; ARGÜELLES, J.; RAMOS-LEAL, M.; MANZANO, A.M.; CASADO, G.; GÓMEZ, B. 2007. Estudio fisiológico de una cepa de levadura con potencialidades para el enriquecimiento proteico del bagazo

- de caña de azúcar. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 38(1):39-43.
- SANTOS, M.I.; TYMCZYSZYN, E.; GOLOWCZYC, M.; MOBILI, P.; GOMEZ-ZAGLIA, A. 2016. Probiotic cell cultivation. En: London, L.E.E.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Shanahan, F.; Caplice, N.M.; Stanton; C. Advances in probiotic technology. CRC Press. p.45.
- SAWATARI, Y.; YOKOTA, A. 2007. Diversity and mechanisms of alkali tolerance in Lactobacilli. Applied and Environmental Microbiology. 73(12):3909-3915. <https://doi.org/10.1128/AEM.02834-06>
- SOSA COSSIO, D.; GARCÍA HERNÁNDEZ, Y.; DUSTET MENDOZA, J.C. 2018. Desarrollo de probióticos destinados a la producción animal: experiencias en Cuba. Cuban Journal of Agricultural Science. 52(4):357-373.
- VERA MEJÍA, R.; SÁNCHEZ MIRANDA, L.; ZAMBRANO GAVILARES, P.; RODRÍGUEZ PERDOMO, Y. 2021. Obtención de un candidato a probiótico de *Lactobacillus plantarum* 22 LMC a partir de un medio de cultivo natural con materias primas agroindustriales. Revista de Salud Animal. 43(3):1-6.
- WAN MANSOR, W.N.; MOHD ZAINI, N.S.; GENGAN, G.; ABDULLAH, A.H.; MOHD SHA'ARI, A.A.; ROSLAN, A.Z.; ABD RAHIM, M.H. 2024. Enhancing ergogenic performance and antioxidant benefits of red sugarcane juice through probiotic fermentation. Discover Food. 4:32. <https://doi.org/10.1007/s44187-024-00092-w>
- WANG, T.; LU, Y.; YAN, H.; LI, X.; WANG, X.; SHAN, Y.; YI, Y.; LIU, B.; ZHOU, Y.; LÜ, X. 2020. Fermentation optimization and kinetic model for high cell density culture of a probiotic microorganism: *Lactobacillus rhamnosus* LS-8. Bioprocess and Biosystems Engineering. 43(3):515-528. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02246-y>
- ZAYED, G.; WINTER, J. 1995. Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of lactobacilli. Applied Microbiology and Biotechnology. 44(3-4):362-366. <https://doi.org/10.1007/BF00169930>