

UTILIZACIÓN DE PLASMA SANGUÍNEO DE BOVINO COMO FUENTE PROTEICA EN LA FORMULACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA LACTOBACILOS

Use of bovine plasma as a protein source in the formulation of a lactobacillus media

Yasmina Barboza de M.

Enrique Márquez S.

Beatriz Arias de M.

José Faría

Osiris Castejón

Unidad de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

RESUMEN

Un medio a base de plasma de bovino, como fuente de proteína fue desarrollado y usado para la propagación de cepas de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y *Lactobacillus casei* ATCC 7469. El porcentaje óptimo de plasma de bovino esterilizado por filtración fue determinado. El mejoramiento del medio debido a la adición de dextrosa, sacarosa, extracto de levadura y minerales fue evaluado. Finalmente, se comparó la eficiencia del medio recién formulado con un medio comercial (MRS). Los resultados mostraron que el plasma de bovino estéril con la sola adición de sacarosa o dextrosa, es suficiente para soportar un crecimiento adecuado del *L. plantarum* y *L. casei*. El crecimiento fue mayor a medida que el porcentaje de plasma se aumentó de 25 a 75%; sin embargo, no se observó diferencias en el crecimiento cuando se usó 25 ó 50% de plasma. Debido a estos resultados se utilizó 25% de plasma como fuente de proteína en la formulación del medio. No se observó diferencias en el crecimiento de los microorganismos debido al tipo de azúcar empleado. La adición de 0.5% de extracto de levadura al medio no mejoró el crecimiento de los lactobacilos. La adición de minerales mejoró el crecimiento del *L. plantarum* pero no del *L. casei*. Se obtuvo un crecimiento máximo cuando se adicionaron ambos: extracto de levadura y minerales. El nuevo medio dió resultados comparables al medio comercial (MRS).

Palabras claves: Plasma de bovino, medio de cultivo, lactobacilos.

ABSTRACT

A medium based on bovine plasma, as a protein source has been developed and was used for propagating strains of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 and *Lactobacillus casei* ATCC 7469. Optimal percent of filtered sterile bovine plasma in the formulation was determined. Improvements due to the addition of dextrose, sucrose, yeast extract, minerals and a combination of all of them were tested. A comparison was made using commercial medium (MRS) and the new developed medium. Results shown that filtered sterile plasma with the addition of either sucrose or dextrose was good enough to support a growth of *L. plantarum* and *L. casei*. The growth increased as the plasma percent was increased from 25 to 75%; however, no differences in growth were observed when 25% or 50% sterilized plasma was used as a media. Because of this results 25% of sterilized plasma was used as a source of protein to formulate the medium. No differences in growth were observed when either sucrose or dextrose were used as a source of carbohydrate. The addition of 0.5% yeast extract to the medium did not improve the growth of *Lactobacillus*. The addition of minerals to the medium, improve the growth of *L. plantarum* but not of *L. casei*. Maximum growth was obtained when both, yeast extract and minerals were added at the same time. The new medium gave results comparable with commercial MRS medium.

Key words: Bovine plasma, medium, lactobacillus.

INTRODUCCIÓN

La aplicación industrial de las bacterias lácticas en la fermentación de productos cárnicos y lácteos es de considerable importancia, y ha sido objeto de un amplio rango de estudios bioquímicos, biofísicos y genéticos. Los medios usados para la propagación de estas bacterias, especialmente para los lactobacilos, deben suplir una variedad de nutrientes, ya que estos tienen requerimientos característicos por cierto número de aminoácidos, vitaminas y otros nutrientes. Se ha determinado que la mayoría de los genes esenciales para la biosíntesis de los aminoácidos y de otros nutrientes están presentes en los lactobacilos, pero ellos a menudo no producen las proteínas activas, debido a pequeñas lesiones tales como: mutaciones de sustitución de bases [16,17]. En el transcurso de los años se han sugerido diferentes medios de cultivo para lactobacilos; entre estos tenemos el agar tomate dextrosa [4] y el medio APT* recomendados por Evans y Niven [10] así como por Deibel y col. [8]. Los estudios continuaron y en 1960 Man, Rogosa y Sharpe [15] desarrollaron el MRS** para los lactobacilos en general. Por otra parte, también se han reportado muchos medios a base de suero filtrado de queso para propagar cultivos iniciadores [2,6,18] pero probablemente este suero no sea una fuente completa de nutrientes para bacterias lácticas [7].

Actualmente en Venezuela estos medios de cultivo no se producen, siendo entonces importante destacar la sustitución de importaciones que adelanta nuestro país como política económica, lo que constituye un reto para todos los centros de investigación.

La sangre de bovinos es una solución de proteínas que contiene tres fracciones principales: plasma, células rojas y plaquetas. La sangre completa contiene un 20% de sólidos totales del cual el 18% son proteínas y un 2% sales [13].

En un estudio donde se evaluaron las propiedades funcionales de las proteínas aisladas del plasma mediante un proceso continuo, se señala que es una fuente de proteínas, que contiene todos los aminoácidos esenciales y sirve como un nutriente potencial en alimento para humanos [21].

Durante el sacrificio industrial de los animales, la sangre es descartada. El plasma constituye una fuente proteica importante por su alto contenido en albúmina, lo que hace del plasma sanguíneo una posible fuente de nutrientes para los organismos vivos. En consecuencia, se dispondría de una materia prima de muy bajo costo para ser usada como fuente proteica en medios de cultivos. El objeto de este trabajo fue evaluar el uso del plasma sanguíneo de bovino como fuente proteica en la elaboración de medios de cultivo para bacterias acidolácticas, específicamente lactobacilos empleados como iniciadores en la fabricación de productos cárnicos fermentados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de la muestra y preparación del plasma de bovino

La sangre fresca de bovino fue obtenida de un matadero de la localidad (Frigorífico Industrial Bolívar C.A.) al momento de ser sacrificado el animal y recolectada en envases plásticos a la cual, se le agregó 100 ml/lit de sangre de una solución de citrato de sodio al 2% (p/v). Una vez en el laboratorio, se mantuvo la mezcla a 5°C. Se separó el mismo día en plasma y en fracción de glóbulos rojos por centrifugación a 2.500 rpm durante 20 minutos. Al plasma se le determinó el contenido de proteína mediante el método de Biuret.

Microorganismos de prueba

Cepas de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y *Lactobacillus casei* ATCC 7469, fueron utilizadas para probar la eficiencia del medio a base de plasma de bovino. Los cultivos fueron conservados en agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y subcultivados tres veces en caldo MRS antes de ser usados experimentalmente.

Preparación del MPB*

Con el objeto de determinar la cantidad de proteína plasmática conveniente para lograr un buen crecimiento de los microorganismos de prueba, se prepararon soluciones de plasma al 25, 50 y 75%. Luego a cada dilución se le agregó dextrosa o sacarosa al 1%. El pH fue ajustado en todos los casos hasta 6.2 con ácido acético.

Esterilización del MPB

Debido a la tendencia del medio a base de plasma a solidificarse por efecto del calor, la esterilización se realizó por filtración al vacío utilizando un filtro SEITZ colocado en un Kitasato.

Inoculación en MPB y enumeración de los lactobacilos

Los microorganismos fueron sembrados en el medio e incubados durante 18 h a 37°C en atmósfera de 10% de CO₂ utilizando campana de Gas Pak. La enumeración se realizó mediante el método estándar de contaje en placa. Las placas se incubaron a 37°C por 48 horas en atmósfera de 10% de CO₂.

Enriquecimiento del MPB con minerales y extracto de levadura

El medio con 25% de plasma y sacarosa fue suplementado con extracto de levadura y minerales de acuerdo a la TABLA I. Los lactobacilos se sembraron y enumeraron utilizando el procedimiento señalado anteriormente.

* All purpose medium with tween.

** Medio comercial: Man, Rogosa y Sharpe.

* Medio a base del plasma de bovino.

TABLA I

INGREDIENTES NECESARIOS PARA PREPARAR 1 LITRO DEL MEDIO A BASE DE PLASMA DE BOVINO

Ingredientes	Cantidad
Plasma	250 ml/lt
Agua destilada	750 ml/lt
Glucosa o sacarosa	10 g/lt
FeSO ₄ 7H ₂ O*	0.02 g/lt
Acetato de Sodio	6 g/lt
Citrato de Amonio	1 g/lt
KH ₂ PO ₄ *	3 g/lt
K ₂ HPO ₄ *	3 g/lt
MgSO ₄ 7H ₂ O*	0.5 g/lt
MnSO ₄ 7H ₂ O*	0.05 g/lt
Extracto de levadura	5 g/lt

* Las cantidades de minerales utilizados fueron de acuerdo a las recomendaciones de Morishita y col. (1981).

TABLA II

VALORES PROMEDIOS* DEL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus plantarum* Y *Lactobacillus casei* DEBIDO A LA CONCENTRACIÓN DE PLASMA Y TIPO DE AZÚCAR

Característica	Concentración de plasma (%)			Tipo de azúcar	
	25	50	75	D	S
Crecimiento	7.23 ^a	7.38 ^{ab}	7.42 ^b	7.35	7.36

* Valores promedios del crecimiento fueron expresados en log₁₀ UFC/ML.

^{a,b} medias con diferentes superíndices y dentro del mismo tratamiento difieren significativamente.

Preparación de agar a base de plasma de bovino

Se prepararon placas de agar a base de plasma de bovino, las cuales fueron sembradas con los organismos de prueba con el objeto de examinar el crecimiento y la morfología de las colonias. Para ello los microorganismos fueron previamente sembrados en caldo a base de plasma de bovino suplementado, siguiendo el procedimiento estándar para contar en placas. El otro medio usado con propósitos comparativos fue el medio comercial MRS.

Análisis estadístico

El análisis estadístico, para medir el efecto de la concentración de plasma, tipo de azúcar y tipo de microorganismo sobre el crecimiento bacteriano, consistió en un arreglo factorial

de tratamiento 3x2x2, siendo los factores tres concentraciones de plasma (25%, 50%, 75%), dos tipos de azúcar (sacarosa y glucosa) y dos tipos de microorganismos (*Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*). El efecto del agregado de minerales y extracto de levadura sobre la eficiencia del medio formulado se midió mediante un arreglo factorial de tratamiento 2x2 (dos niveles de minerales y dos niveles de extracto de levadura). Los datos obtenidos se evaluaron mediante el análisis de varianza, usando SAS PROC GLM [19]. Las diferencias entre medias se determinaron con la prueba de Scheffe y la instrucción LSMEANS del SAS.

Se aceptaron diferencias a un P<0.01.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla II se presentan los valores promedios del crecimiento del *L. plantarum* y *L. casei* debido a la concentración de plasma y tipo de azúcar. Se observó un mayor crecimiento de los microorganismos en los medios formulados con 75% y 50% de plasma, no encontrándose diferencias entre los medios formulados con 50% y 25% de plasma pero sí entre 25% y 75%.

Para seleccionar la concentración de plasma a utilizar en la formulación del MPB, se tomaron en cuenta factores tales como: tendencia del plasma a gelificarse a temperaturas de refrigeración y concentración de plasma de la cual se obtuvo un buen crecimiento.

La concentración de plasma seleccionada para la formulación del MPB fue del 25%, ya que a esta concentración no se le formó geles a temperatura de refrigeración y se observó un crecimiento adecuado de los microorganismos, aun cuando fue menor, comparándolo con el medio formulado a 75% de plasma. El contenido proteico para esta concentración de plasma fue de 1.7 g/100.

En la TABLA II, se muestra también los resultados del crecimiento del *L. plantarum* y *L. casei* cuando la dextrosa o sacarosa fueron utilizadas como los azúcares a fermentar. Se observa que no hubo diferencia significativa en el crecimiento de los lactobacilos debido al tipo de azúcar empleado.

Urbaniak y Pezacki [22] reportaron que todas las bacterias lácticas fermentan la glucosa y que muchas de ellas fermentan también la sacarosa.

Acton y col. [1] investigaron acerca de la reducción del pH en la fermentación de salchichones utilizando glucosa y sacarosa como carbohidratos a fermentar, demostrando que en ambos casos el pH disminuyó en la misma proporción. Similares resultados reportaron Duarte y col. [9].

Para la preparación del MPB se seleccionó la sacarosa por ser fermentada por los dos microorganismos utilizados y por ser la más económica.

Las TABLAS III Y IV presentan los valores promedios del

crecimiento de *L. plantarum* y *L. casei* respectivamente, en el MPB suplementado con la combinación de extracto de levaduras y minerales. Los resultados indican que el crecimiento de ambos lactobacilos fue mayor cuando el medio fue suplementado con la combinación de minerales y extracto de levadura. El menor crecimiento, para ambos lactobacilos, se obtuvo cuando no se adicionó ni minerales ni extracto de levadura.

En la TABLA III se muestra que para el *L. plantarum* el agregado de minerales fue más importante que el agregado de extracto de levadura. Cuando sólo se agregó al medio minerales, el crecimiento fue significativamente mayor que cuando se agregó extracto de levadura.

En la TABLA IV se observa que el *L. casei* sólo respondió cuando al medio se agregó minerales y extracto de levadura. Ni la presencia de minerales ni la de extracto de levadura por sí solos incrementaron el crecimiento del *L. casei*.

El efecto estimulador del agregado de extracto de levadura y/o minerales sobre el crecimiento de bacterias acidolácticas ha sido reportado por otros investigadores [3,5,10,11,12,14,20].

Los resultados también muestran que, a pesar de que el menor crecimiento se obtuvo cuando se utilizó el plasma sin adición de minerales y extracto de levadura, el crecimiento fue bastante significativo, indicando que el plasma con sacarosa posee los ingredientes necesarios para soportar un crecimiento importante de los lactobacilos y que este crecimiento puede ser mejorado con la adición de minerales principalmente. El medio fue más eficiente para el *L. plantarum*.

La TABLA V nos muestra los valores promedios del crecimiento y pH final debido al tipo de microorganismo y tipo de medio utilizado. Se observa también que independientemente del tipo de medio, el *L. plantarum* tuvo un crecimiento mayor (8.49) que el *L. casei* (7.71).

No se observó diferencias significativas al comparar el

TABLA III

VALORES PROMEDIO* DEL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus plantarum* EN EL MEDIO A BASE DE PLASMA CON O SIN EL AGREGADO DE EXTRACTO DE LEVADURA Y MINERALES

Minerales	Extracto de levadura	
	Sí	No
Sí	9.49 ^a	9.29 ^b
No	8.55 ^c	8.45 ^c

* Valores promedios del crecimiento fueron expresados en log 10 UFC/ml.
a,b,c medias con diferentes superíndices difieren significativamente.

TABLA IV

VALORES PROMEDIO* DEL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus casei* EN EL MEDIO A BASE DE PLASMA CON O SIN EL AGREGADO DE EXTRACTO DE LEVADURA Y MINERALES

Minerales	Extracto de levadura	
	Sí	No
Sí	8.70 ^a	8.35 ^b
No	8.35 ^b	8.24 ^b

* Valores promedios del crecimiento fueron expresados en log 10 UFC/ml.
a,b,c medias con diferentes superíndices difieren significativamente.

TABLA V

VALORES PROMEDIOS DEL CRECIMIENTO* Y pH DEBIDO AL TIPO DE MICROORGANISMO Y TIPO DE MEDIO

Características	Tipo de medio					
	Lactobacilos		Caldo		Agar	
	L.P	L.C.	MPB	MRS	MPB	MRS
Crecimiento	8.49 ^a	7.71 ^b	8.11	8.08	8.10	8.08
pH Final ^c	4.1	4.3	4.2	4.4		

* Valores promedios del crecimiento fueron expresados en log 10 UFC/ml.

a,b medias con diferentes superíndices difieren significativamente.

^c El pH se midió a las 28 hr.

L.P.= *Lactobacillus plantarum*.

L.C.= *Lactobacillus casei*.

MPB= Medio a base de plasma de bovino.

MRS= Man, Rogosa y Sharpe.

crecimiento en relación a los medios. La reducción del pH a las 18 horas debido al tipo de microorganismos y al tipo de caldo estuvo alrededor de 4.2, no observándose diferencias significativas.

Los resultados indican que el medio formulado en nuestro laboratorio es tan efectivo como el medio comercial, pudiendo deberse a que el plasma sanguíneo de bovino contiene como principal proteína la albúmina, la cual es una proteína de alto valor nutritivo, por poseer todos los aminoácidos esenciales. Este hecho garantiza en el medio, la presencia de los aminoácidos requeridos para el crecimiento de los lactobacilos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Acton, J.; Dick, R. and Norr, L. Utilization of various carbohydrates in fermented sausages. *Journal of Food Science* 42:174. 1977.
- [2] Ausavanodom, N.; White, G. and Young, R. Lactic bulk culture system utilizing whey based bacteriophage inhibitory medium and pH control. II. Reduction of phosphate requirements under pH control. *Journal of Dairy Science* 60:1245. 1977.
- [3] Bergey's. *Manual of determinative Bacteriology*. 1986.
- [4] Briggs, M. An improved medium for Lactobacilli. *Journal of Dairy Research* 20:36. 1953.
- [5] Broome, M.; Krause, D. and Hickey, M. The isolation and characterization of Lactobacilli from cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology* 60:66. 1990.
- [6] Christopherson, A. and Zottola, A. The use of whey permeates as starter media in cheese production. *Journal of Dairy Science* 72:2862. 1989.
- [7] Christopherson, A. and Zottola, A. Whey permeate as a medium for mesophilic lactic acid streptococci. *Journal of Dairy Science* 72:1701. 1989.
- [8] Deibel, R., Evans, J., Nieven, C. Microbiological assay for the thiamin using *Lactobacillus viridescens*. *Journal Bact.* 74:818. 1957.
- [9] Duarte, A.; Márquez, E., Ferrer, A. and Páez, G. Homolactic starter culture preparation to be used in Fermented Meat Products. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 11:66. 1992.
- [10] Evans, J.B. and Niven, C.F. (Jr.). Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. *Journal Bacteriology* 62:599. 1951.
- [11] Guirard, B.M. and Snell, E.E. The nutritional role of acetate for lactic acid bacteria. I. The response to substances related to acetate. *Arch. Biochem.* 9:361. 1946.
- [12] Holgado, R.; Valdez, F. and Savoy, G. Composition of the recovery medium and its influence on the survival of freeze-dried lactic acid bacteria *Milchwissenschaft.* 41:286. 1986.
- [13] Langhoff, L. Processing of sterile animal blood protein for human consumption. *Niro Atomizer, Denmark*. 1980.
- [14] MacLeod, R.A. and Snell, E.E. Some mineral requirements of the lactic acid bacteria. *Journal Biology. Chem.* 170:351. 1947.
- [15] Man, J.C.; Rogosa, M. and Sharpe, M.E. An improved medium for *Lactobacillus* cultivation. *Journal of Applied Bacteriology* 23:130. 1960.
- [16] Morishita, T.; Fukada, T.; Shirota, M. and Yura, T. Genetic basis of nutritional requirements in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* 120:1078. 1974.
- [17] Morishita, T.; Deguchi, Y.; Yajima, M.; Sakurai, T. and Yura, T. Multiple Nutritional Requirements of Lactobacilli: Genetic Lesions Affecting Amino Acid Biosynthetic Pathways. *Journal Bacteriology* 148:64. 1981.
- [18] Parente, E. and Zottola, E. Growth of Thermophilic Starters in Whey Permeate Media. *Journal of Dairy Science* 74:20. 1991.
- [19] SAS PROC G.L.M. SAS User's statistics (5th ed.) SAS Institute Inc., Carry, NC. 1985.
- [20] Snell, E.E.; Tatum, E.L. and Peterson, W.H. Growth factors for bacteria. III. Some nutritive requirements of *Lactobacillus delbrueckii*. *Journal Bacteriology* 33:207. 1937.
- [21] Tybor, P.T.; Dill, C.W. and Landmann, W. Functional properties of proteins isolated. Bovine Blood by a Continuous Pilot Process. *Journal of Food Science* 40:155. 1975.
- [22] Urbaniak, L. and Pezacki, W. The lactic acid forming microflora of dry sausage and the technologically determined changes it undergoes. *Fleischw.* 5:229. 1975.