



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA
GUTIERREZ**

UNIDAD DE INVESTIGACION Y DESARROLLO

EN ALIMENTOS

RESIDENCIA PROFESIONAL

**“EVALUACION *IN VITRO* DEL EFECTO DE PREBIÓTICOS
SOBRE EL CRECIMIENTO Y CARACTERÍSTICAS
PROBIÓTICAS DE BIFIDOBACTERIAS Y BACTERIAS
LÁCTICAS”**

PRESENTA:

JUDITH GUADALUPE CONSTANTINO ALCAZAR

ASESOR EXTERNO

DRA. MADELEINE HIDALGO MORALES

ASESOR INTERNO

DR. MIGUEL ABUD ARCHILA

H. VERACRUZ, VER

JUNIO 2013

INDICE

INTRODUCCION	4
JUSTIFICACION	6
OBJETIVOS	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVO ESPECIFICO	7
CARACTERIZACION DEL AREA EN LA QUE SE PARTICIPO	7
PROBLEMAS A RESOLVER	8
FUNDAMENTO TEORICO	8
PROBIOTICOS	8
EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS PROBIÓTICOS	10
ANTECEDENTES HISTÓRICOS BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS	11
GÉNERO LACTOBACILLUS	12
GÉNERO BIFIDOBACTERIUM	14
PREBIOTICOS	15
ACIDOS GRASOS DE CADENA CORTA	16
INULINA Y FRUCTOOLIGOSACARIDOS	17
LACTULOSA	18
MATERIALES Y METODOS	19
Reactivación de Cepas	19
Prebióticos	19
Estandarización del inculo	19
Tindalización de los prebióticos (Fructooligosacaridos e Inulina)	20
Preparación de lactulosa	20

Ensayos de fermentación con prebióticos	20
Determinación de pH	21
Determinación de Azúcares Totales	21
Determinación de Azúcares Reductores	21
Determinación de Ácidos grasos de cadena corta	21
RESULTADOS	22
Cinéticas de crecimiento en presencia de prebióticos	22
Efecto del pH sobre los prebióticos (Inulina, Lactulosa y FOS).....	24
Cuantificación de Azúcares Reductores (A.R).....	25
Cuantificación de Azúcares Totales (A.T).....	27
CONCLUSIONES	29
BIBLIOGRAFIA	30
ANEXOS	33
ANEXO A. Determinación de pH	33
ANEXO B. Cuantificación de Azúcares Totales.....	33
ANEXO C. Cuantificación de Azúcares Reductores.....	34
ANEXO D. Técnica de Cuantificación de AGCC por cromatografía de gases	35

INTRODUCCIÓN

Los prebióticos y probióticos a lo largo de los últimos años se han hecho más importantes en nuestra sociedad debido a las altas propiedades benéficas que tienen para la salud del ser humano.

Existen una gran diversidad de bacterias ácido lácticas que tienen propiedades benéficas para la salud por lo cual son consideradas como microorganismos probióticos, dentro de las cuales podemos mencionar a ***Lactobacillus acidophilus***, ***Lactobacillus casei***, ***Lactobacillus reuteri***, así como ***Bifidobacterium animalis*** y ***Pediococcus acidilactici***. Estas bacterias son definidas como microorganismos vivos que se adicionan a un alimento para que después de ser ingeridos permanezcan activos en el intestino, los cuales ejercen importantes efectos fisiológicos, a su vez también contribuyen al equilibrio de la flora bacteriana intestinal del huésped y potencializan el sistema inmunológico.

Se ha reportado que el consumo de algunos polímeros de fructosa, llamados prebióticos que son ingredientes alimentarios que poseen un efecto favorable en la flora intestinal y estimula selectivamente el crecimiento de bacterias benéficas que se localizan en el colon (Roberfroid, 2009). Dentro de los prebióticos más importantes encontramos lactulosa y los fructooligosacáridos como los fructanos e inulinas. Los prebióticos deberán ser fermentados únicamente por bacterias del colon, promoviendo algunas funciones fisiológicas específicas a través de la liberación de metabolitos por las bacterias, en especial los ácidos grasos de cadena corta al lumen intestinal (Stanbury PF, 1995). Las bacterias del colon presentan diferentes grados de fermentación dependiendo de los carbohidratos que vayan a metabolizar, donde aquellos carbohidratos con un bajo nivel de polimerización son metabolizados de una forma más efectiva aun por encima de azúcares como la glucosa (Manderson, 2005).

La inulina y los oligosacáridos han destacado porque son capaces de aumentar la absorción de calcio o de reducir el colesterol; propiedades que dependen de sus características estructurales. Por otro lado, el concepto de que el uso de determinados alimentos o sus componentes pueden influir en las características fisiológicas del tracto gastrointestinal y tener efectos beneficiosos para el individuo.

La ingesta de estos carbohidratos, además de permitir el aumento de las comunidades bacterianas localizadas en el colon también se encuentra relacionada con la prevención de enfermedades como el cáncer, la disminución del colesterol y mejora de la salud del tracto digestivo en caso de colitis (Collins, 1999).

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* el efecto de prebióticos como lactulosa, inulina y fructooligosacáridos sobre el crecimiento y la producción de ácidos grasos de cadena corta (acetato, butirato, propionato) en las bacterias probióticas *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium animalis*, ya que se ha relacionado la producción de estos ácidos con la capacidad de disminuir niveles de colesterol en suero sanguíneo, que es una característica probiótica de algunas bacterias.

JUSTIFICACIÓN

La implementación de probióticos en simbiosis con prebióticos en la industria alimentaria, ha permitido el desarrollo de productos con gran impacto social gracias a los efectos benéficos en la salud gastrointestinal al mismo tiempo por el efecto hipoglucémico e hipocolesterolémico de los prebióticos.

Teniendo como problema social actual, los desórdenes de alimentación mundial, que favorecen los altos índices de obesidad y diabetes, el desarrollo de nuevas tecnologías alimentarias permitirá el descenso del porcentaje de los problemas antes mencionados. Por lo que el estudio de los mecanismos a través de los cuales los productos simbióticos pueden ejercer sus efectos benéficos sobre la salud resulta de relevancia para el desarrollo de mejores productos con mejores efectos.

De lo anterior surge la propuesta de investigar unos de los productos de la simbiosis entre probióticos y prebióticos, como son los ácidos grasos de cadena corta ya que se ha relacionado la producción de estos ácidos con la capacidad de disminuir niveles de colesterol en suero sanguíneo y otras características de las bacterias probióticas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de crecimiento de bacterias probióticas utilizando prebióticos como fuente de carbono y el efecto de éstos sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta (acetato, butirato, propionato) por estas bacterias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la capacidad de crecimiento de *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium animalis* en medio de cultivo MRS adicionando los prebióticos inulina, fructooligosacáridos y lactulosa como fuente de carbono.

Evaluar el efecto de prebióticos sobre la capacidad de *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium animalis* para producir ácidos grasos de cadena corta.

CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN LA QUE SE PARTICIPÓ

Este proyecto se realizó en la UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN ALIMENTOS (UNIDA), del Instituto Tecnológico de Veracruz, en los laboratorios de Microbiología, Enzimología y Bioquímica.

PROBLEMAS A RESOLVER

Debido al aumento en los problemas digestivos, se propone una simbiosis entre prebióticos y bacterias probióticas para mejorar la supervivencia de las bacterias y su producción de ácidos grasos de cadena corta, ya que estos causan un efecto favorable en la disminución de colesterol en la sangre.

FUNDAMENTO TEÓRICO

PROBIOTICOS

Los probióticos son definidos por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) como microorganismos vivos que administrados en adecuadas cantidades ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped. La mayoría de los probióticos son bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aunque también se emplean algunos otros géneros como *Enterococcus*, *Streptococcus*, y *Saccharomyces* (Araya, 2002).

El término “probiótico”, derivado de bios, palabra griega que significa “vida”, nació a mediados del siglo pasado a partir de la observación de la influencia positiva de determinados microorganismos en la flora intestinal. El término probiótico fue usado por primera vez en el año 1965 por *Lilly y Stillwell*, para describir a aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otros, en contraposición al término antibiótico. La palabra fue aplicada posteriormente para referirse a extractos de tejidos que estimulaban el crecimiento bacteriano sin embargo, fue el primero en usar el término probiótico de acuerdo con el sentido que hoy conocemos, es decir, organismos o sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal. Más adelante, Fuller (1999) acotó más este concepto y redefinió a los probióticos como aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan de forma

beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana del intestino. Por otra parte, Saavedra (1994) propuso una definición más general, señalando a los probióticos como microorganismos viables que, ingeridos con la alimentación, pueden tener un efecto positivo en la prevención o en el tratamiento de estados patológicos específicos. Fuller (1999) redefinió el concepto de probióticos como suplementos de origen microbiano que afectan beneficiosamente la fisiología del huésped, modulando la inmunidad y mejorando, además, el balance microbiano y nutricional del tracto gastrointestinal. Salminen (2001) definió los probióticos como preparaciones de células microbianas o componentes de células que tiene un efecto beneficioso sobre la salud de quien los ingiere. Esta definición no implica que los probióticos deban ser viables, ya que se sugiere que las formas no viables también pueden mostrar efectos beneficiosos (Salminen, 1999). En la actualidad, la definición que se suele emplear es la elaborada por la FAO/OMS en 2001 con los siguientes términos: los probióticos son microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción beneficiosa sobre la salud del huésped.

Los requisitos que deben cumplir los alimentos probióticos son:

- Sinergismo entre los cultivos de microorganismos y los iniciadores de la fermentación (fermentos, cultivos iniciadores), para obtener un producto fermentado con óptimas características sensoriales.

- Los microorganismos probióticos deben permanecer viables y activos en el alimento y durante el tránsito gastrointestinal, para garantizar su potencial efecto benéfico en el huésped.

En este aspecto, son importantes el pH derivado del proceso de fermentación, el oxígeno disuelto (especialmente para las bifidobacterias), el antagonismo entre especies, la composición química del medio de cultivo, la concentración de azúcares, las prácticas de inoculación del cultivo probiótico, la temperatura y duración de la fermentación, y las condiciones de almacenamiento del producto.

Hasta hace poco tiempo se consideraba esencial que las cepas probióticas permanecieran vivas después de atravesar el tracto gastrointestinal para poder expresar sus propiedades beneficiosas sobre la salud. Por ello se consideraba necesario demostrar la presencia de un número suficiente de bacterias viables en las heces y su capacidad de adhesión a la mucosidad o a las células epiteliales intestinales. En la actualidad se está poniendo en duda este criterio, puesto que aún sigue sin comprenderse con exactitud cuáles son los mecanismos implicados en los efectos beneficiosos observados, y se ha demostrado *in vitro* que componentes de la pared celular o metabolitos resultantes de la fermentación también exhiben propiedades reguladoras sobre la actividad de células epiteliales e inmunitarias (Blanco, 2010).

EFFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS PROBIÓTICOS

Los probióticos afectan a la composición de la flora intestinal y son capaces de modular el sistema inmune con beneficios sobre la salud (Mattila-Sandholm, 2000). Entre los beneficios estudiados se incluyen:

-Intolerancia a la lactosa

La intolerancia congénita a la lactosa es causada por una deficiencia en la enzima β -galactosidasa, o lactasa, a nivel intestinal, resultando así en la imposibilidad de digerir este azúcar. En estos casos la lactosa llega intacta al colon donde es fermentada por las bacterias de la flora colónica con producción de agua, gas metano e hidrógeno, lo que da lugar a la sintomatología típica de mala absorción de azúcares: flatulencia, dolor abdominal y diarrea acuosa. Generalmente las personas que no toleran la leche toleran, sin embargo, el yogurt. Esto se debe, entre otras causas, a que el yogurt contiene probióticos, principalmente lactobacilos, los que transforman la lactosa en ácidos orgánicos como el láctico y el acético. Además, algunos probióticos producen lactasa después de ser ingeridos oralmente y podrían facilitar la digestión de lactosa en tramos altos del intestino

delgado. Sin embargo, existe controversia en relación a la real utilidad de los probióticos en el problema de la intolerancia a la lactosa.

-Prevención del cáncer

Estudios epidemiológicos recientes aportan evidencias de que el consumo de probióticos puede reducir el riesgo de sufrir cáncer de colon (Salminen, 1999).

-Reducción en las alergias

La intervención de los probióticos puede ayudar a reducir y aliviar los síntomas de alergias alimentarias mediante la modulación del sistema inmune a través de la modificación de la flora intestinal (Mattila-Sandholm, 2000).

-Reducción del colesterol

Elevados niveles sanguíneos de ciertos lípidos son un factor de riesgo para problemas cardiovasculares. El efecto de los probióticos en la reducción de los niveles de colesterol y los mecanismos de acción de estos efectos son desconocidos pero algunas hipótesis sugieren que ciertas cepas pueden asimilar la molécula de colesterol (Salminen, 1999).

ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS

El espectro de microorganismos empleados como probióticos en humanos es muy amplio e incluye nuevas especies de muchos géneros diferentes como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y algunas levaduras del género *Saccharomyces*. Los más utilizados pertenecen al grupo de las Bacterias del Ácido Láctico (BAL), incluyendo en un sentido amplio a las bifidobacterias.

Las BAL, ya mencionadas en los postulados de Metchnikoff en 1907, son miembros habituales de la microbiota intestinal normal del hombre y de otros

muchos animales. Además, forman parte de la dieta a través de diversos productos fermentados, entre los que incluyen muchos productos lácteos. Por estas razones poseen un privilegiado status de microorganismos saludables (GRAS, "Generally Recognized As safe") y sus efectos positivos sobre la salud se admiten de un modo generalizado. La utilización de las BAL como probióticos se remonta a principios del siglo XX (Rettger, 1935). Desde entonces, ha aparecido un interés creciente por productos probióticos elaborados con estos microorganismos, sobre todo de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Las bacterias acidolácticas (LAB) son un grupo de bacterias Gram-positivas agrupadas por una gran cantidad de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general de este grupo de bacterias se incluye en el grupo de Gram-positivos, no esporulados, cocos o bacilos que producen ácido láctico como producto de la fermentación de carbohidratos.

GÉNERO LACTOBACILLUS

Los *lactobacillus* son bacilos o coco-bacilos Gram-positivos que frecuentemente forman cadenas. Son catalasa negativos, no esporulados y en general inmóviles (unas pocas especies presentan flagelos peritricos). Es un género muy amplio en el que se incluyen más de 100 especies con propiedades heterogéneas

Esta diversidad se ve reflejada en el contenido en G+C de sus miembros, que varía desde un 32% hasta un 52%. En cuanto a su temperatura óptima de crecimiento, pueden ser mesófilos o termófilos. El pH óptimo de crecimiento oscila entre 5.5 y 6.2. Son anaerobios aerotolerables y su crecimiento se ve favorecido en atmósfera microaerófila con un 5-10% de CO₂. Desde el punto de vista fenotípico y atendiendo a sus características metabólicas, se pueden clasificar en tres grupos en función de la presencia o ausencia de las enzimas fructosa-1,6-difosfato aldolasa y fosfoacetolasa (Kandler, 1986).

Los lactobacilos se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, carnes y pescados. Forman parte de la flora normal de la boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales. No son considerados patógenos (excepto algunas especies que parecen intervenir en la caries dental).

Tienen una gran importancia industrial, pues se utilizan en diversos procesos de fermentación láctica (yogur, quesos). Intervienen también, en la fabricación de productos derivados de los vegetales (pepinillos, aceituna, etc).

Requieren medios nutricionales complejos, con aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables. El medio de cultivo más empleado es el medio MRS descrito por Man, Rogosa y Sharpe en 1960, este medio contiene además, magnesio, manganeso acetato y polisorbato 80 (Tween 80) que facilitan de gran forma el crecimiento de los bacilos lácticos, incluso de las especies más exigentes, como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermenti*. El medio MRS está especialmente recomendado para la enumeración y mantenimiento de bacilos lácticos, ya sea por la técnica del número más probable (NMP) en caldo o por siembra en masa. El problema de este medio es que con frecuencia se suelen presentar contaminantes, con lo cual se precisa una mayor selectividad y por ello se desarrolló el medio MRS modificado (mLSM) al que se le adiciona ácido acético como agente selectivo.

También se emplea para el aislamiento de los microorganismos del yogur el medio LS- agar diferencial formulado por la CeNAN Centro Nacional de Alimentación y Nutrición (1982) está concebido para la enumeración simultánea de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. A la mezcla base que contiene triptona, peptonas, extractos de carne y levadura, cisteína y cloruro sódico, se le adiciona leche descremada y la solución estéril de TTC (cloruro de trifeniltetrazolio) al 1%. En este medio *Lactobacillus delbrueckii* crece en forma de colonias lobuladas rojas de 1-1,5 mm de diámetro rodeadas de una zona blanca opaca y *Streptococcus thermophilus*

crece en este medio formando colonias ovales o redondas rojas de aproximadamente 0,5 mm de diámetro con un pequeño halo claro a su alrededor. El CeNAN ha adoptado este medio de forma alternativa al recuento con dos medios, MRS y M-17.

GÉNERO BIFIDOBACTERIUM

Las bifidobacterias son microorganismos Gram-positivos, anaerobios estrictos (aunque el grado de sensibilidad al oxígeno depende de la especie), inmóviles, no esporulados y catalasa negativos. Presentan una gran variedad de formas. Coccoides, con protuberancias y/o bifurcaciones, con extremos espatulados o cadenas estrelladas. Su nombre hace referencia a las formas bífidas con dos ramas en Y o V que presentan en ocasiones (Axelsson, 1998).

En 1899, en el Instituto Pasteur, Tissier observó y aisló de bebés una bacteria con una morfología inusual y desconocida, en forma de Y. Entonces se planteó el problema de la ubicación de esta bacteria en la clasificación contemporánea. A principios de siglo, la taxonomía estaba basada por completo en el criterio morfológico y Tissier (1900) denominó a esta bacteria "*Bacillus bifidus*". En ese mismo tiempo, en Italia, Moro descubrió en condiciones similares una bacteria que reconoció como diferente de la que Tissier había observado, y la identificó como perteneciente al género *Lactobacillus*. A pesar de las diferencias entre esas dos bacterias, Holland en 1920, propuso un nombre común "*Lactobacillus bifidus*", que fue desarrollándose y ganando precisión a lo largo del tiempo en paralelo con el progreso científico.

El metabolismo de los azúcares difiere también del de las verdaderas bacterias lácticas ya que las bifidobacterias carecen de aldosa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Las hexosas son degradadas exclusivamente por la ruta de la fructosa-6-fosfato, caracterizada por la presencia de la enzima fructosa-6-fosfato (F6PPK) típica de este género. Esta vía metabólica de fermentación de carbohidratos conduce a la formación de ácido láctico y ácido acético en una

proporción 2:3, sin producción de CO₂. Además, las bifidobacterias no pueden utilizar los ácidos grasos u otros ácidos orgánicos como fuente de carbono y son negativos en la reducción de nitrato, la formación de indol, la licuefacción de gelatina y la fermentación de glicerol (Scardovi, 1986).

Las bifidobacterias son habitantes normales del tracto gastrointestinal humano y de diversos animales y están presentes durante toda la vida pero en distintas cantidades, apareciendo a los pocos días después del nacimiento. Constituyen una de las especies predominantes de la microflora del colon, junto con *Peptostreptococcus*, Eubacterias, Clostridia y Bacteroides, las cuales se encuentran presentes en niveles que van desde 10⁸ a 10¹¹ bacterias por gramo de material del colon.

La flora intestinal beneficiosa, representada principalmente por los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, contribuye de forma significativa al estado de salud del huésped, por sus funciones: metabólicas, interviniendo en la asimilación de nutrientes de la dieta; protectoras, contribuyendo al efecto barrera y al desplazamiento de microorganismos patógenos, y tróficas, interviniendo en la modulación del sistema inmune y en el desarrollo y la proliferación celular (Collins, 1999) (Guarner, 2003).

PREBIÓTICOS

El término prebiótico fue introducido por Gibson y Roberfroid, quienes definieron los prebióticos como ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al hospedador por una estimulación selectiva del crecimiento o la actividad de una bacteria o un limitado grupo de bacterias en el colon (Paralla, 2002)

Los prebióticos son generalmente hidratos de carbono de cadena corta, que pueden ser fermentados a lo largo del tracto gastrointestinal y estimular el crecimiento de bacterias ácido lácticas potencialmente beneficiosas. Por esta razón un requisito clave para que un ingrediente pueda ser clasificado como

prebiótico es el que no sea hidrolizado ni absorbido en la parte alta del tracto gastrointestinal, de forma que una cantidad significativa llegue intacta al colon. Entre los prebióticos más empleados podemos citar a los fructooligosacaridos (FOS), la inulina y la lactulosa. La inulina es en realidad un polisacárido que por la hidrólisis enzimática se transforma en oligofructosa. Los prebióticos que actualmente gozan del acuerdo científico en cuanto al cumplimiento de las características que se exigen serían solo los FOS, la inulina y los transgalactooligosacaridos (TOS/GOS). Los prebióticos desempeñan un papel importante en el mantenimiento y desarrollo de la microbiota bacteriana intestinal, la cual facilita diversos mecanismos de defensa del individuo. Su inclusión en la ingesta puede prevenir o incluso evitar la translocación bacteriana.

La translocación bacteriana se define como el paso de gérmenes de origen gastrointestinal hacia tejidos normalmente estériles, como los ganglios mesentéricos, el hígado, el bazo y el pulmón. Este movimiento de las bacterias fuera de su lugar habitualmente puede comprometer seriamente el sistema inmunitario del individuo. Los productos finales de la fermentación de la fibra son tróficos para las células epiteliales intestinales; de este modo se mantiene el equilibrio de la microbiota intestinal, mediante la fermentación y la producción bacteriana de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), especialmente acetato, butirato y propionato.

ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA

Los ácidos grasos de cadena corta (acetato, butirato y propionato) son normalmente producidos en el ciego y colon de herbívoros y omnívoros por fermentación bacteriana. El mayor sustrato para la fermentación bacteriana es la fibra dietaria con contribuciones menores de las proteínas que llegan al ciego; la fermentación anaerobia de los polisacáridos de la fibra produce metano, bióxido de carbono, agua y ácidos grasos de cadena corta de los cuales el 85% corresponde a acetato, propionato y butirato (APHA, 1998).

Los ácidos grasos de cadena corta son el combustible más importante para el colon y ejercen acción trófica sobre el intestino delgado y colon. El orden preferencial de utilización de los combustibles de la mucosa colónica estudiados *in vitro* son: ácidos grasos de cadena corta, cuerpos cetónicos, glutamina y glucosa (Rafael, 2002).

Con la ingesta de prebióticos se ha observado una mejora en la microbiota intestinal, con aumento del número de anaerobios, como ***Bifidobacterium*** y ***Lactobacillus***, y disminución de ***Clostridium***. Estas modificaciones de la microbiota intestinal resultan beneficiosas tanto para la salud local cólica como para la sistemática.

Aparte de su función de estimulación selectiva de las bifidobacterias, los prebióticos tienen repercusiones sobre la absorción de ciertos minerales. Diversos estudios científicos han demostrado un incremento de la disponibilidad de calcio, magnesio, hierro y zinc con la ingesta de alimentos que contienen prebióticos. Estos efectos parecen ser resultado del tipo de hidrato de carbono, del grado de fermentación provocada por la microbiota intestinal y de la dosis ingerida. También pueden poseer un efecto beneficioso sobre el metabolismo de los lípidos y sobre el tránsito intestinal.

Estas acciones beneficiosas explican su potencial uso en el control de los niveles de insulina y triglicéridos, y en la prevención de la osteoporosis, al mejorar la biodisponibilidad del calcio. Se ha sugerido que pueden tener un papel prometedor frente al cáncer al favorecer un microambiente menos tóxico en el colon.

INULINA Y FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS

Los fructanos son considerados como oligo y polisacáridos resistentes, que contienen como unidad monomérica, fructosa (Englyst, 1996). Los podemos dividir en dos clases (Van Dokkun, 1995):

Levanos: son fructanos unidos por enlaces β 2-6, con varios grados de enlaces o ramificaciones β 2-1. Son producidos por una variedad de bacterias como: *B. subtilis*, *B. circulans*, *Lactobacillus reuteri*, *Pseudomonas siringe*, entre otras.

Inulinas: Son producidas por la mayoría de las plantas dicotiledóneas como carbohidratos de reserva. Se obtiene de manera industrial de la raíz de Achicoria, por extracción con agua caliente, seguida de una refinación y un secado por aspersion. Es la mezcla polidispersa de moléculas lineales, todas ellas bajo la estructura química simbolizada como G-Fn (G= glucosa terminal, Fn= n-número de fructosas unidas entre sí mediante enlaces β 2-1 o Fn sin glucosa terminal).

Los fructooligosacáridos (FOS), son producidos por la hidrólisis enzimática de la inulina o transfructosilación de la sacarosa. Los FOS se diferencian de los fructo-polisacáridos (inulina), solo por el grado de polimerización, los FOS poseen 3-10 unidades monoméricas, mientras que la inulina llega a poseer de 10-60 (Baghurst, 1996).

LACTULOSA

La lactulosa es un disacárido sintético utilizado como medicamento, para el tratamiento de la constipación y la encefalopatía de causa hepática (Guarmer, 2008).

Los nuevos carbohidratos prebióticos se obtienen mediante una reacción de transgalactosilación directa de la lactulosa catalizada por una β -galactosidasa, por lo cual podemos denominarlos galacto-oligosacáridos derivados de lactulosa (GOS-Lactulosa). La enzima que cataliza la reacción procede del hongo *Aspergillus orizae* y determina una proporción concreta de diferentes oligosacáridos.

Estos galacto-oligosacáridos también pueden obtenerse mediante otro procedimiento alternativo de síntesis, partiendo de lactosa y empleando la misma enzima en la transgalactosilación, para posteriormente isomerizar los galactooligosacáridos obtenidos a GOS-lactulosa mediante isomerización química con aluminato sódico (Junco, 2010).

MATERIALES Y MÉTODOS

REACTIVACIÓN DE CEPAS

La cepa *Bifidobacterium animalis* (BLCI CO5486IA) se adquirió a la empresa *Lyofast* en forma liofilizada. Se tomó una azada del liofilizado y se reactivó en 10 mL de caldo MRS, se incubó a 30°C por 6 horas

La cepa *Lactobacillus reuteri* (NRRL B-14171) fue donada por el Agricultural Research Service del USDA, se tomó una azada del stock y se reactivó en 10 mL de caldo MRS, se incubó a 30°C por 8 horas.

PREBIÓTICOS

La inulina, los fructooligosacáridos y la lactulosa (SIGMA) fueron proporcionados por el laboratorio de microbiología de la UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN ALIMENTOS (UNIDA).

ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO

Lactobacillus reuteri de la cepa obtenida mediante incubación, se inoculó el 1% en 50 mL de caldo MRS por ocho horas, a continuación se inoculó por estría en placas de agar MRS para la purificación de la cepa seleccionando una de las mejores colonias estas placas se dejaron incubar por doce horas. Después de haber seleccionado la colonia esta fue inoculada en 10 mL de caldo MRS por ocho horas.

Bifidobacterium animalis (*Lyofast* BLCI CO5486IA) de la cepa obtenida mediante incubación, se inoculó el 1% en 50 mL de caldo MRS por seis horas, luego se inoculó por estría en placas con agar MRS incubándose por 24 horas a 30°C, a continuación se seleccionó una de las mejores colonias para inocular en 10 mL de caldo MRS por seis horas.

Para cada una de estas cepas se realizaron cinéticas de crecimiento en 50 mL de caldo MRS inoculados con el 1% de inóculo, determinando densidad óptica (DO) a 640 nm en un espectrofotómetro (Espectro BIO-RAD Smartspec 300) y unidades formadoras de colonias (UFC) por vaciado en placa con medio MRS, para estandarizar los inóculos. Las tomas de muestra se realizaron cada dos horas.

TINDALIZACIÓN DE LOS PREBIÓTICOS (FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS E INULINA)

Se pesó el 2% de fructooligosacárido e inulina respectivamente en un vaso de precipitado previamente esterilizado y se preparó con agua estéril, se llevó a cabo el proceso de tindalización que consiste en calentarlo hasta que alcance una temperatura de 80°C por 30 minutos y posteriormente colocarlo en un baño de hielo (tratamiento de choque térmico), después colocarlo en la incubadora durante dos horas y posteriormente repetir el tratamiento y dejar incubar por 24 horas después de esto se siembra en MRS para comprobar que no haya ningún tipo de crecimiento y se guarda en el refrigerador.

PREPARACIÓN DE LACTULOSA

Se pesó 3 gramos de lactulosa en un vaso de precipitado previamente esterilizado, se aforó a 10 mL con agua estéril y se esterilizó por filtración (0.22 μm) se colocó en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

ENSAYOS DE FERMENTACIÓN CON PREBIÓTICOS

A un volumen de 100 mL de caldo MRS se le adicionó la solución de prebiótico para obtener una concentración de 2%. Posteriormente se le adicionó 1 mL de inóculo previamente estandarizado y se incubó a 37°C. Se tomaron muestras

cada 2 horas durante 24 horas, a cada muestra se le determinó densidad óptica (DO) A 640 nm. Los resultados se expresaron en Log DO/DO₀ con respecto al tiempo.

DETERMINACIÓN DE PH

El pH se midió en muestras de 6 mL con la ayuda de un potenciómetro, se detalla en el ANEXO A.

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES

El método utilizado para esta determinación fue reportado por Dubois (1956) y se detalla en el ANEXO C.

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

El método utilizado para la determinación de azúcares reductores fue reportado por Miller (1959) comúnmente conocido como método del ácido dinitrosalicílico o DNS y se detalla en el ANEXO B.

DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA

El método empleado para la determinación de AGCC fue el de cromatografía de gases y se detalla en el ANEXO D.

RESULTADOS

CINÉTICAS DE CRECIMIENTO EN PRESENCIA DE PREBIÓTICOS

La capacidad de *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium animalis* para fermentar prebióticos se analizó a través de su capacidad para crecer en presencia de estos como única fuente de carbono. Las Figuras 1 y 2 muestran las cinéticas de crecimiento de estas dos cepas con diferentes prebióticos.

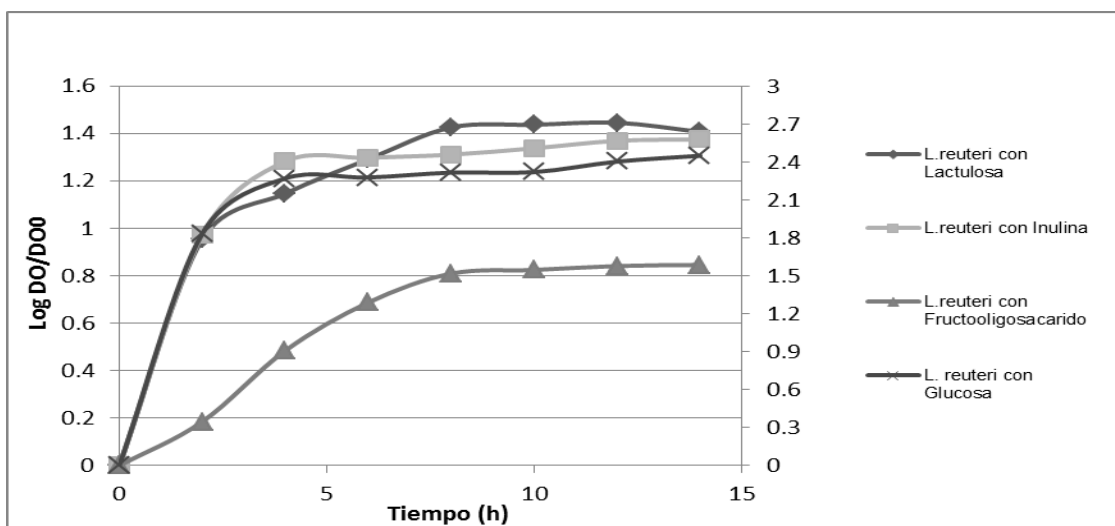


Figura 1 Cinética de crecimiento de *Lactobacillus reuteri* NRRL B-14171 en 100 mL de caldo MRS con glucosa y caldo MRS (sin glucosa) adicionando inulina, lactulosa y fructooligosacaridos.

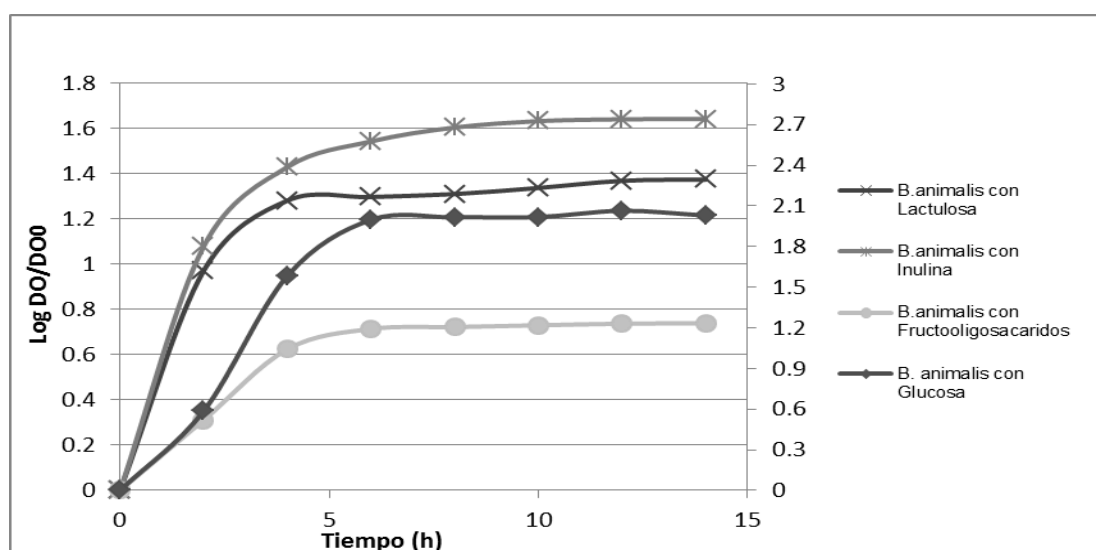


Figura 2. Cinética de crecimiento de *Bifidobacterium animalis* BLCl CO5486IA en 100 mL de caldo MRS con glucosa y caldo MRS (sin glucosa) adicionando inulina, lactulosa y fructooligosacaridos.

	Lactulosa	Inulina	FOS
<i>L. reuteri</i>	0.5836 h ⁻¹	0.502 h ⁻¹	0.2883 h ⁻¹
<i>B. animalis</i>	1.043 h ⁻¹	0.6975 h ⁻¹	0.4249 h ⁻¹

Tabla 1. Velocidad de Crecimiento de *L. reuteri* y *B. animalis*

Los resultados mostraron que *B. animalis* y *L. reuteri* son capaces de crecer en presencia de fructooligosacáridos, Inulina y Lactulosa. Ambas cepas crecieron sin mostrar fase de adaptación en presencia de Inulina y Lactulosa al emplearlas como fuente de carbono diferente a la glucosa, lo cual nos indica la degradación de los compuestos disponibles: Inulina y Lactulosa, mientras que en presencia de fructooligosacáridos si presento fase de adaptación.

En el caso de Fructooligosacáridos, presento un mejor efecto en *B. animalis* debido a que su crecimiento fue mayor que con *L. reuteri*. En presencia de Inulina, ambas cepas crecieron sin fase de adaptación, nada más que *B. animalis* un mayor crecimiento en comparación con *L. reuteri*; mientras que con Lactulosa *B. animalis* presento una μ_{max} mayor que *L. reuteri*.

Cuando se empleó Glucosa como fuente de carbono se observó que *B. animalis* presento fase de adaptación mientras que *L. reuteri* no la presento. Esto se debe a que la glucosa a que la glucosa se encuentra presente en el medio como un monosacárido y no en cadenas ramificadas como es el caso de los prebióticos. Sin embargo con esto se puede comprobar el efecto bifidogénico de la Inulina, Lactulosa y Fructooligosacáridos para el crecimiento de estas bacterias (*L. reuteri* y *B. animalis*).

Por otro lado *L. reuteri* y *B. animalis* mostraron una μ_{max} mayor en presencia de Lactulosa e Inulina que en presencia de Fosfooligosacáridos, lo cual nos muestra que crece mejor en presencia de prebióticos con un grado de polimerización menor.

La continuidad de las curvas de crecimiento muestran una fase exponencial sin transiciones que indiquen un crecimiento diáxico, esto nos indica la continuidad en el consumo de sustrato para la producción de biomasa según lo reporta Rossi (2005).

Al no haber fase de adaptación con estos prebióticos (Inulina y Lactulosa), se demuestra una óptima adaptación al medio de cultivo tanto con *L. reuteri* y *B.*

animalis, resaltando una diferencia entre ambas cepas con respecto a la velocidad de crecimiento, esto se relaciona con lo reportado por Kaplan y Hutkins (2000), donde muestran que existe una diferencia entre el crecimiento bacteriano de *L. reuteri* y *B. animalis*.

Como se menciona en la bibliografía la mayoría de los prebióticos estimulan el crecimiento de las bacterias, así como observamos en las Figuras 1 y 2. Esto logra que la microbiota intestinal logre tener un mejor efecto en el metabolismo lipídico que apoyan la producción de AGCC.

EVALUACIÓN DEL CAMBIO DE PH DEL MEDIO EN PRESENCIA DE PREBIÓTICOS (INULINA, LACTULOSA Y FOS)

En lo referente al pH (Figura 3 y 4), se observó que ninguna de las dos cepas fue capaz de acidificar el medio de crecimiento al emplear inulina, lactulosa y fructooligosacáridos como fuente de carbono.

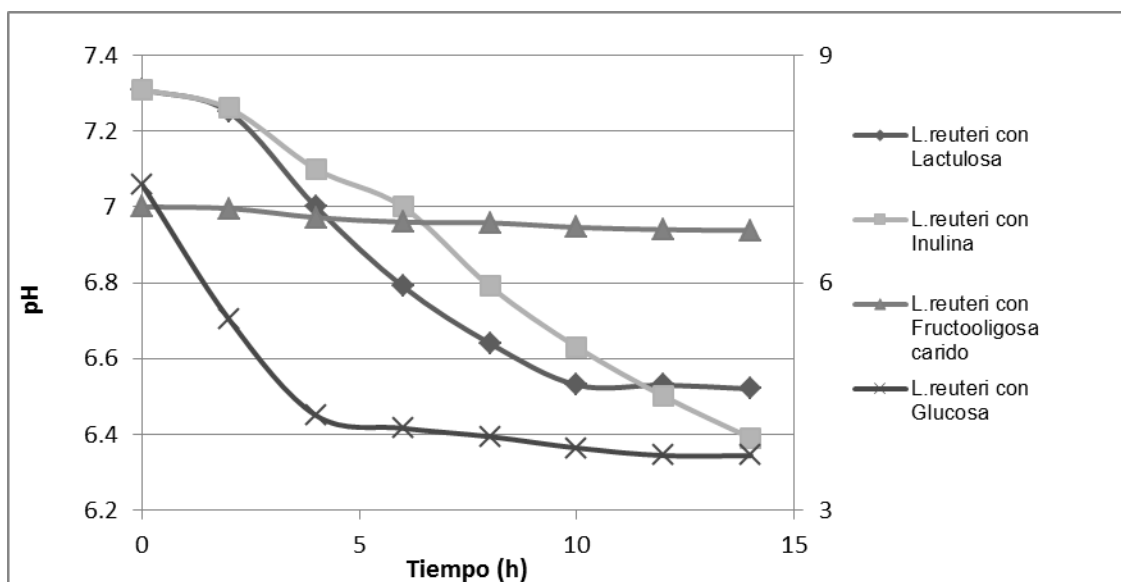


Figura 3. Evaluación de pH de *L. reuteri* con prebióticos y *L. reuteri* con Glucosa

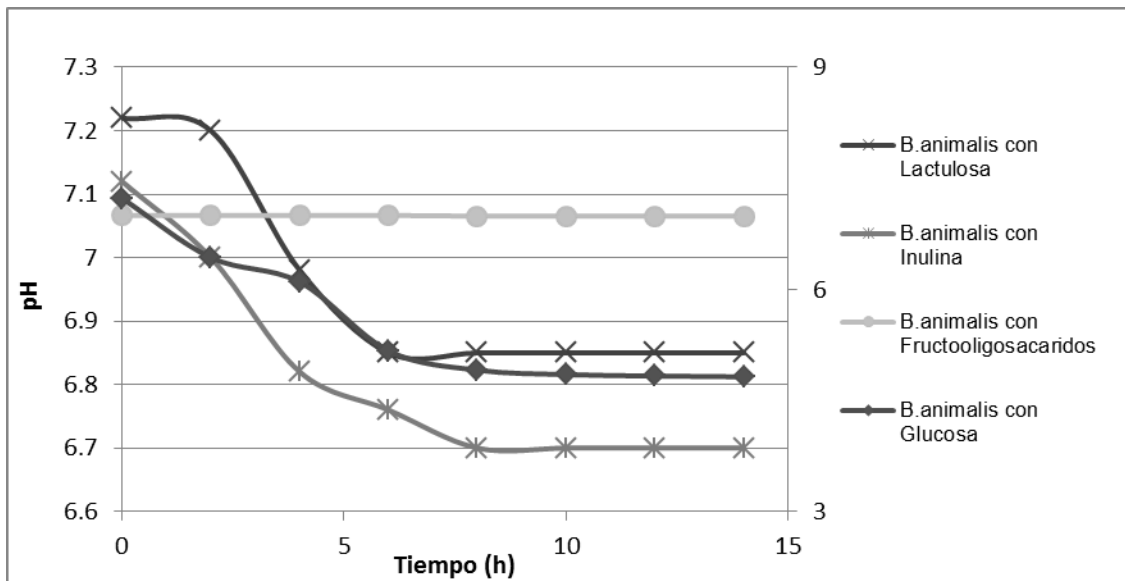


Figura 4. Evaluación de pH de *B. animalis* con prebióticos y *B. animalis* con Glucosa

El pH permaneció alrededor de 6 para *reuteri* y 7 para *B. animalis* con prebióticos (Inulina, Lactulosa y FOS). Mientras que cuando se empleó glucosa como fuente de carbono el medio acidifico hasta un valor de pH 4 para *L. reuteri* y 3 para *B. animalis*.

En el caso de Lactulosa e Inulina el pH disminuyo con *L. reuteri* que *B. animalis*. Mientras que con Fructooligosacáridos el pH se mantuvo constante *B. animalis*.

El hecho de que estas cepas no acidificaran el medio se debe a que estas bacterias ácido lácticas emplean otras rutas metabólicas para metabolizar su fuente de carbono o bien también se puede deber a que estas BAL no poseen las enzimas necesarias para romper los enlaces β de las secciones lineales de las cadenas de estos prebióticos, pero que a su vez carece de las enzimas necesarias para hidrolizar los enlaces en los puntos de ramificación.

CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES (A.R)

En lo que respecta a la cuantificación de azúcares reductores se puede observar que estos prebióticos son buenos para mejorar las deficiencias que se presentan en la microbiota intestinal. En cuanto al consumo del sustrato (Figura

4), se esquematiza el agotamiento sucesivo de la fuente de carbono durante el transcurso de la fermentación para las dos cepas.

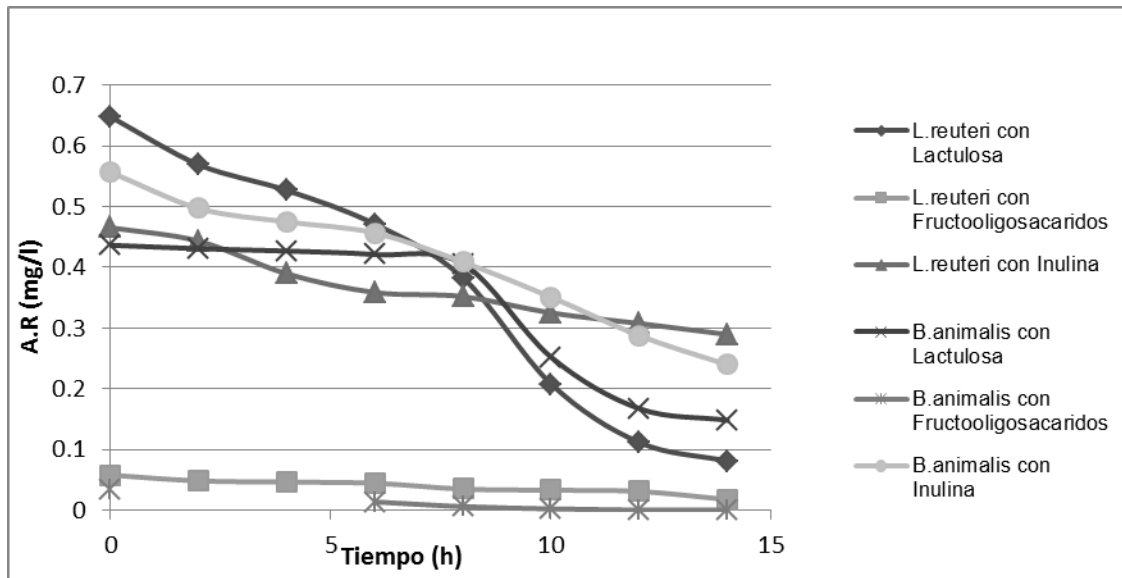


Figura 5. Cambios en el contenido de azúcares reductores durante el crecimiento de *L. reuteri* y *B. animalis* en caldo MRS (sin glucosa) con prebióticos.

Los resultados mostraron que *L. reuteri* y *B. animalis* tuvieron un mejor consumo de sustrato con Inulina y Lactulosa que con Fructooligosacáridos, ya que se puede apreciar en la Fig. 5 hay un consumo menor de sustrato en comparación con Inulina y Lactulosa.

Los fructanos de los diferentes prebióticos tuvieron el mismo efecto al estimular el mejor crecimiento de *L.reuteri* y *B.animalis* y de esta manera también mejoraron la producción de AGCC (ácido acético y propiónico), esto se debió a que tienen un mayor grado de polimerización los prebióticos como lo menciona Baghurst. La proporción de éstos varió dependiendo del sustrato utilizado por las bacterias.

Cabe remarcar que *L. reuteri* permite el empleo de una gran cantidad de fuentes de carbono, propiedad que resulta potencial para la producción de AGCC (APHA, 1998).

CUANTIFICACIÓN DE AZÚCARES TOTALES (A.T)

En la figura 5 se puede observar que en las primeras horas las bacterias consumieron una cantidad considerable de los azúcares totales disponibles.

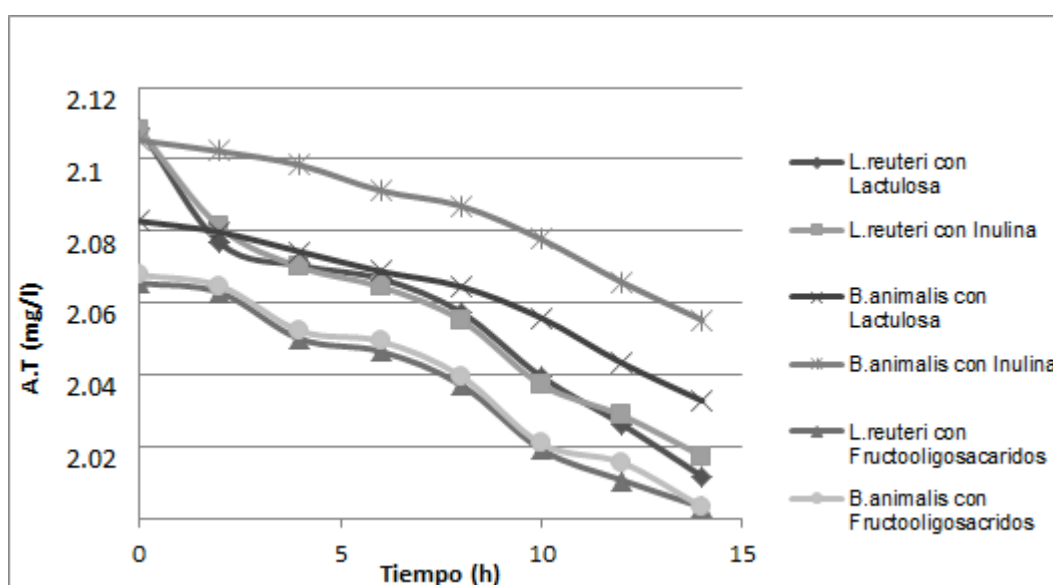


Figura 6. Cambios en el contenido de Azúcares Totales durante el crecimiento de *L.reuteri* y *B.animalis* en caldo MRS (sin glucosa) con prebióticos.

Los resultados nos indicaron que hay una mayor disponibilidad de azúcares totales con Inulina y Lactulosa en comparación con Fructooligosacáridos, logrando así un mejor crecimiento de *L. reuteri* y *B. animalis*.

También podemos observar que estos prebióticos debido a su alto grado de polimerización debieron haber puesto en marcha algún sistema hidrolítico que permitió más fácilmente el consumo de las cadenas de fructosa. Este sistema hidrolítico mejoró la producción de enlaces β 2-1 que hace posibles el desdoble de los enlaces y aprovecha a los prebióticos (inulina, FOS y lactulosa) como fuentes de carbono demostrando así lo que dijeron Wetson y Brocklenbank (1999) que los azúcares que provocan el efecto prebiótico eran los oligosacáridos y no las moléculas simples que las conforman.

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA (AGCC)

En lo que respecta a la producción de AGCC (ácido acético y ácido propiónico) en la figura 6 y 7 se muestra una mejor producción de ambas cepas con inulina, que con lactulosa y FOS.

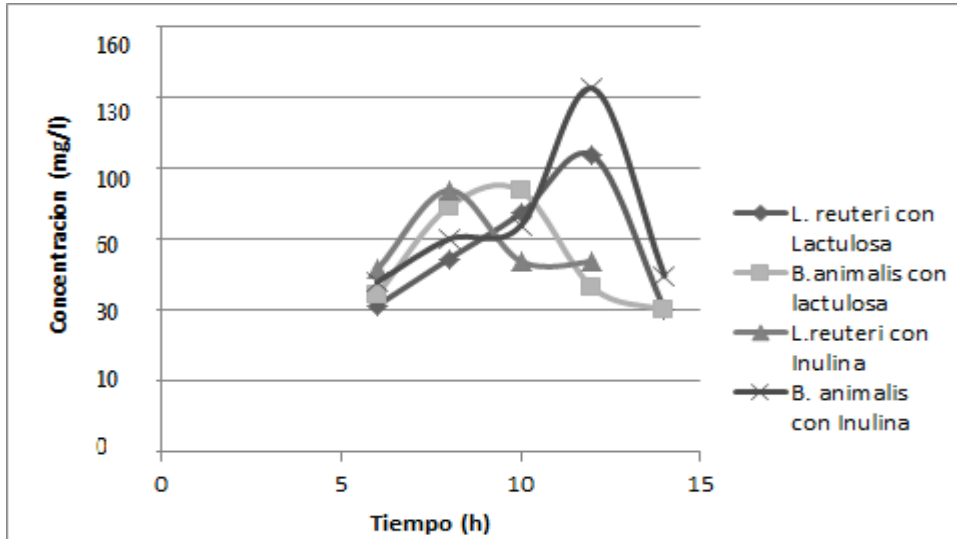


Figura 7. Producción de Ácido Acético

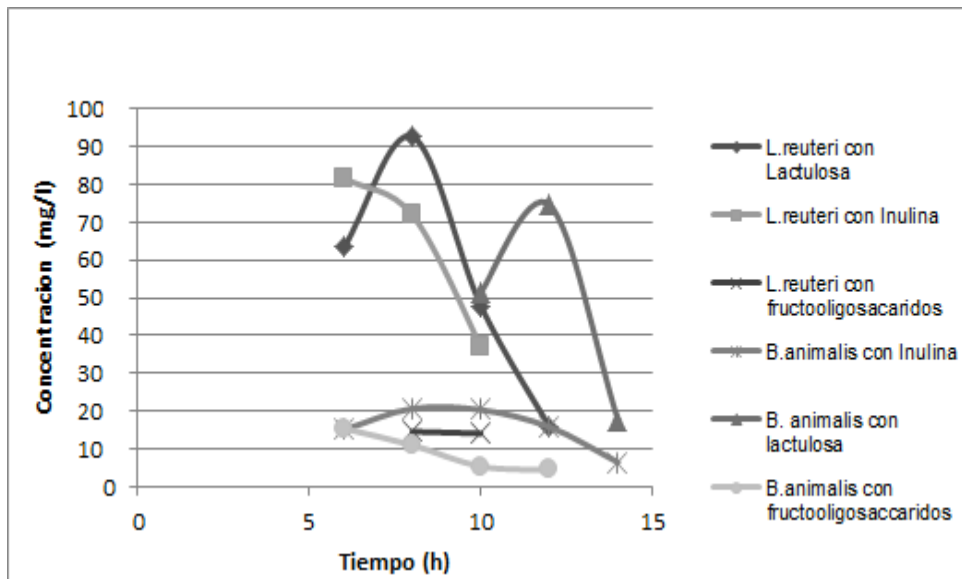


Figura 8. Producción de Ácido Propiónico

En el análisis de los cromatogramas se identificó que la producción de ácido acético fue mayor en la hora 8 en ambas cepas pero con distintos prebióticos, en el caso de *L.reuteri* con lactulosa mostro una concentración de 926.62 mg/l y *B. animalis* con Inulina mostro una concentración de 203.47 mg/l. Asi como también se identificó que la mayor producción de ácido propiónico fue mayor en la hora 8 para *L.reuteri* mostrando una concentración de 184.44 mg/ml y en la hora 12 para *B. animalis* mostrando una concentración de 256.05 mg/ml mostrando así que la mayor producción de ácido acético fue en las y propiónico

La adaptación a un medio pobre en monosacáridos confiere un metabolismo altamente adaptable al consumir oligo o polisacáridos, lo que permitió una ventaja competitiva a que *B. animalis* produjera un mejor porcentaje en la producción de ácidos grasos de cadena (AGCC), esto se debe a que *B. animalis* degrada más fácilmente y en menor tiempo las ramificaciones que presentan la inulina, lactulosa y FOS (Rossi, 2005).

Esto es bueno debido a que la utilización de estos prebióticos por las bacterias ácido lácticas conlleva en numerosos casos a la mejor producción de ácidos grasos de cadena corta y esto a su vez en el metabolismo humano provoca una mejor asimilación de nutrientes, por lo tanto también disminuyen los problemas gastrointestinales mencionados en la bibliografía.

CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados en donde se observa que estas BAL acidifican y crecen menos en presencia de inulina, lactulosa y FOS que en presencia de glucosa, se puede concluir que estos prebióticos no son los más adecuados para el crecimiento de estas bacterias como única fuente de carbono pero que en presencia de glucosa además de los prebióticos podría mejorarse el crecimiento y la producción de metabolitos.
- De los tres prebióticos empleados para la producción de AGCC, con inulina se obtiene una mejor producción, mientras que en lactulosa y FOS se presentaron de forma menos significativa.
- Se pudo observar el efecto bifidogénico de la inulina, ya que en presencia de este prebiótico se obtuvo el mejor crecimiento de *B. animalis*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aiba Y., Suzuki N. (1998). Lactic acid-mediated suppression of helicobacter, pylori by the oral administration of Lactobacillus salivarius probiotic in agnotobiotic murine model. *Am J. Gastroenterol*, 2097-2101.
- Alander, M. (1999). Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, Lactobacillus rhamnosas, after oral consumption . *Environ Microbial*, 65.
- APHA. (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association*, 1265.
- Araya M., Gopal, P. (2002). Probióticos saludables y nutricionales y directrices para la evaluación de alimentos . *Probióticos en los alimentos*.
- Baghurst P., Baghurst. K. (1996). Dietary fiber nonstarch polysaccharids and resistant start. *Food Australia* .
- Bibián L.M.E., Rojas R.M.A. (2000). *Determinación de Azúcares reductores por la técnica de Miller*.
- Blanco, A. M. (2010). Evaluación in vitro de Acción de cultivos probióticos (bifidobacteria) sobre cepas de Enterobacterias (E. coli, Klebsiella pneumoniae y Enterobacter) nosocomiales con resistencia microbiana . 21-30.
- Ouwehand C. (1999). Probiotics. *International Dairy Journal* , 42-52.
- Calderón, M. E. (2010). *Transferencia de masa de los Ácidos Volátiles durante el secado de granos de cacao*. Veracruz, México.
- Collins M.D, Gibson G.R. (1999). Probiotics, Prebiotics and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal or Clinical Nutrition*.
- Dubois M., Gilles K.A. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substains. *Analytical Chemistry*, 350-356.
- Englyst H.N., Hudson G. (1996). The classification and measurement of dietary carbohydrates . *Food Chem* , 15-21.
- Guarner F. (2000). El colon como organo: habitat de la flora bacteriana . 99-106.
- González, M. D. (2010). *Capacidad Fermentativa de Lactobacillus reuteri en medio MRS adicionado con prebióticos*. Tuxtla Gutierrez, Chiapas.

- Gonzalez, M. D. (2010). Capacidad fermentativa de *Lactobacillus reuteri* en medio MRS adicionando prebióticos .
- Guarner F., Aamir G. (2008). Guías prácticas de la OMGE. *World Gastroenterology Organisation*, 5.
- Guarner F, Malagelada G. J. (2003). Gut flora in health and disease . *Lancet* , 361.
- Aarnikunns J. (2006). Metabolic engineering of lactic acid bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially. *Tesis doctoral University of Helsinki*.
- Junco, D. (2010). *Spanish National Reserch Council*.
- Kandler O., Weiss N. (1986). Regular, nonsporing Gram-positive rods Bergey's. *Manual of systematic Bacteriology*, 1208-1234.
- Kaplan H, Hutkins RW. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Environ. Microbiol.* (págs. 2682-2684).
- Lilly, D. (1965). Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science*, 147:747-8.
- Axelsson L.T. (1998). Lactic acid bacteria: Microbiology and Functional Aspects . En *Lactic acid bacteria: classification and physiology* (págs. 1-72). Nueva York : Marcel Dekker Inc.
- Manderson K., Pinart M. (2005). In vitro determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream APP.
- Mattila-Sandholm T., Blum. S. (2000). Probiotics: towards demonstrating efficacy. *Trends Food* , 393-399.
- Miller, R. L. (1981). Mucus degradation in human colon ecosystems . *Gastroenterology*, 739-765.
- Paralla, G. (2002). Probióticos y Prebióticos en el aparato digestivo. 126.
- Fuller R. (1999). Probiotics for farm animals. In probiotic. *A critical Review* .
- Parker R.B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story . *Animal Nutri Health*, 4-8.

- Rafael, M. (2002). *Soporte Nutricional Especial*. Buenos Aires, Argentina.
- Rettger L.F., Levy. M. (1935). *Lactobacillus acidophilus and its therapeutic Application* Yale University Press.
- Rossi M., Corradini C., Amaretti A., Nicolini M., Pompei A., Zanoni S., Matteuzzi D.(2005) Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by bifidobacteria: a comparative study of pure and fecal cultures. *Environ.Microbiol.* págs 6150 - 6158.
- Salminen., S. (2001). Human studies on probiotics: Aspects of scientific documentation. 58:8-12.
- Saavedra JM, Bauman. N. (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus . *Lancet* , 344:1046-1049.
- Salminen S., Ouwehand. A. (1999). Probiotics: how should they be defined . *Trends Food Sci Technol*, 10:107-110.
- Scardovi S. (1986). Genus *Bifidobacterium*. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (págs. 1418-1434). USA.
- Stanbury P.F., Whitaker. A. (1995). *Principles of fermentation Technology*. Oxford, Inglaterra: Heinemann.
- Van Dokkun W., Van Den H. (1995). The effect of non digestible oligosaccharides (NDO) on human physiology .
- Wetson R., Brocklebank L. (1999). The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chemistry*. págs. 33-37.

ANEXOS

ANEXO A. Determinación de pH

El pH puede definirse como una medida que expresa el grado de acidez o basicidad de una solución en una escala que varía entre 0 y 14. La acidez aumenta cuando el pH disminuye. Una solución con un pH menor a 7 se dice que es ácida, mientras que si es mayor a 7 se clasifica como básica. Una solución con pH 7 será neutra.

Metodología

Se tomó 5 mL de muestra en un vaso de precipitado previamente esterilizado y se midió en el potenciómetro (Corning PH meter 440).

ANEXO B. Cuantificación de Azúcares Totales

El fenol en presencia de Ácido sulfúrico puede ser usado para la determinación colorimétrica cuantitativa de azúcares y de sus derivados metil, oligosacárido y polisacárido. Este método es excepcionalmente útil para la determinación de pequeñas cantidades de azúcar. Este método es simple, rápido y sensible y da resultados reproducibles. Los reactivos son baratos y estables (Bibián L.M.E.)

Metodología

A 2 mL de la solución de azúcar colocada en un tubo de ensayo se agregan 0.05 mL de fenol al 80% (p/p, puede permanecer en almacén 3-4 meses) y 5 mL de Ácido Sulfúrico al 95.5 % se deja reposar 10 minutos, se agita en un vortex, se coloca en baño de agua entre 5 a 39° C durante 10 a 20 min y se mide absorbencia de color característico amarillo-naranja a 490 nm.

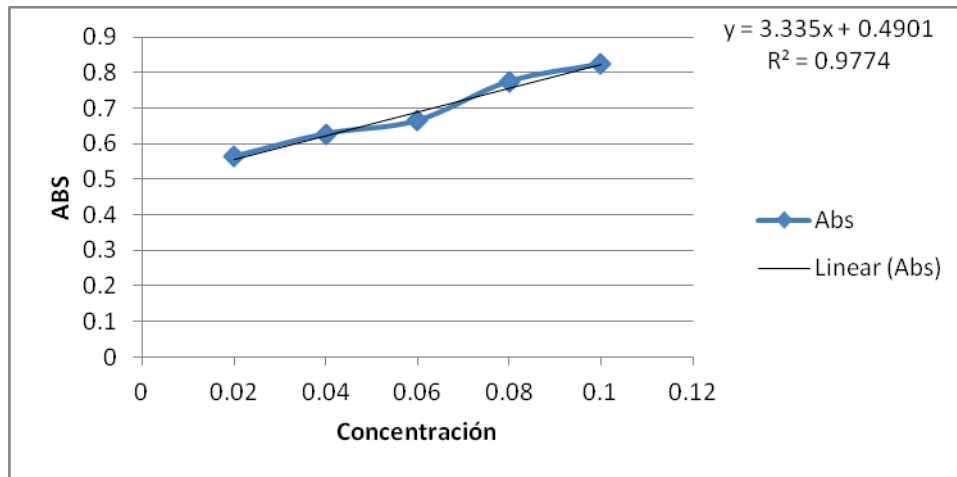


Figura 9. Curva de calibración de Azúcares Reductores

ANEXO C. Cuantificación de Azúcares Reductores

El método DNS es una técnica colorimétrica que emplea 3,5-ácidodinitrosalicílico para la hidrólisis de polisacáridos presentes en una muestra, seguido de la determinación espectrofotométrica a 550nm de los azúcares reductores.

Esta técnica sirve para cuantificar los azúcares reductores producidos durante una fermentación o para cuantificar los productos de una reacción enzimática.

Metodología

Colocar 5 gramos de Acido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS) en 100 mL de NaOH 2N. En otro recipiente disolver 150 gramos de tartrato de Na-K en 250 mL de agua. Mezclar ambos reactivos y llevar a 500 mL con agua destilada (Puede permanecer de 4 a 6 meses en refrigeración). A 0.5 mL de muestra colocada en un tubo de ensayo agregar 0.5 mL de agua destilada, posteriormente añadir 3 mL del reactivo de Acido 3,5 DNS y hervir a baño de agua por 5 minutos. Diluir en agua destilada hasta un volumen de 20 mL y leer a 550 nm.

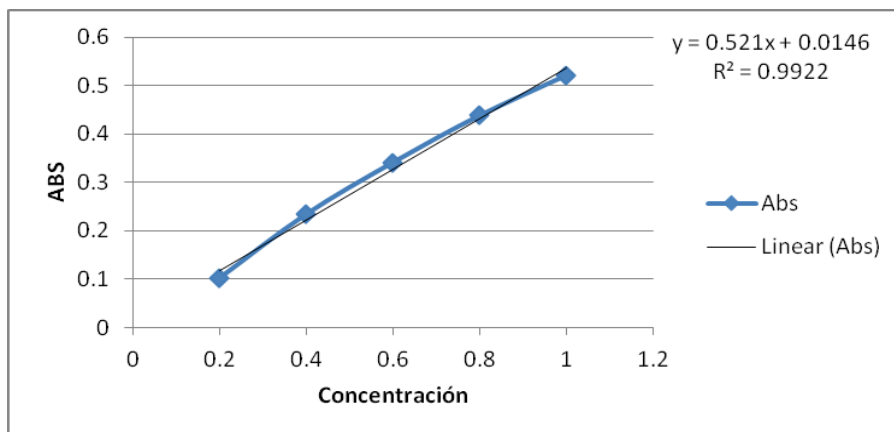


Figura 10. Curva de calibración de Azúcares Reductores

ANEXO D. Técnica de Cuantificación de AGCC por cromatografía de gases

Condiciones para el análisis por CG-FID

La determinación de ácidos grasos volátiles de cadena corta se realizó en un cromatógrafo de gases (varían modelo 3900) equipado con un detector FID, un inyector Split/splittles (varían modelo CP-8400/8410). La separación se realizó en una columna capilar de silica fundida (CP-Wax 57 CB, 50 m por 0.32 mm DI por 0.2 μm DF) empleando hidrógeno como gas acarreador a un flujo de 5mL/min y una relación Split 1:20. El programa de temperatura inicio a 70°C por 5 minutos y posteriormente la temperatura por 2 minutos; el tiempo total fue de 30 minutos. La temperatura del inyector y del detector permaneció constante a 230 y 250°C, respectivamente. El volumen de muestra inyectada fue de 1 μl (Calderón, 2010).

Curvas de Calibración

La cuantificación de los compuestos se realizó por medio de la técnica estándar externo a partir de la curva de calibración correspondiente. Se prepararon 7 niveles de concentración cubriendo un intervalo de 100-1000 mg/l para ácido acético y 6 niveles de concentración (20- 120 mg/l) para ácido propiónico.

Preparación de la muestra

La muestra concentrada se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos a 25° C, después se toma 1.5 mL de muestra, al cual se le adiciona 2 mL de H₃PO₄ 1 M. La mezcla resultante se homogenizó en un sonicador (Westprime systems modelo LR84543) durante 1 minuto y se filtró primero con papel whatman No.4 y posteriormente con un filtro de 0.22 µl. El filtrado se colocó en un vial antes de ser inyectado y analizado.

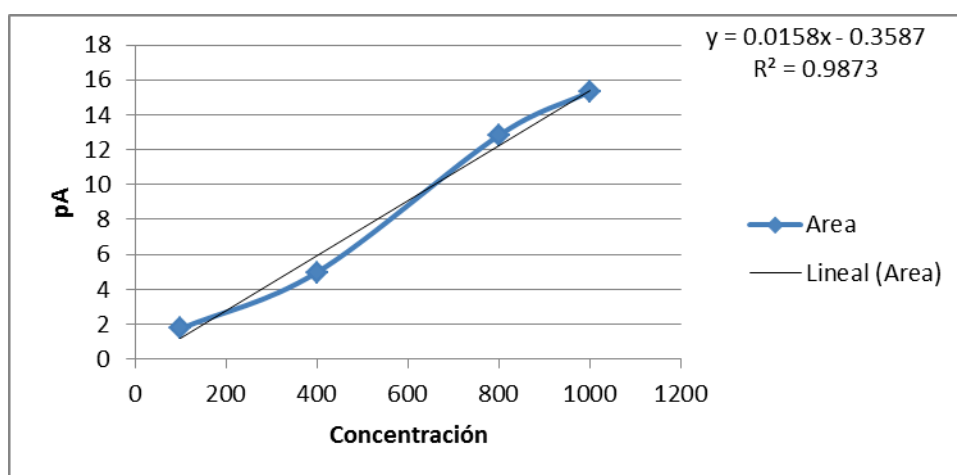


Figura 11. Curva de calibración de Ácido Acético

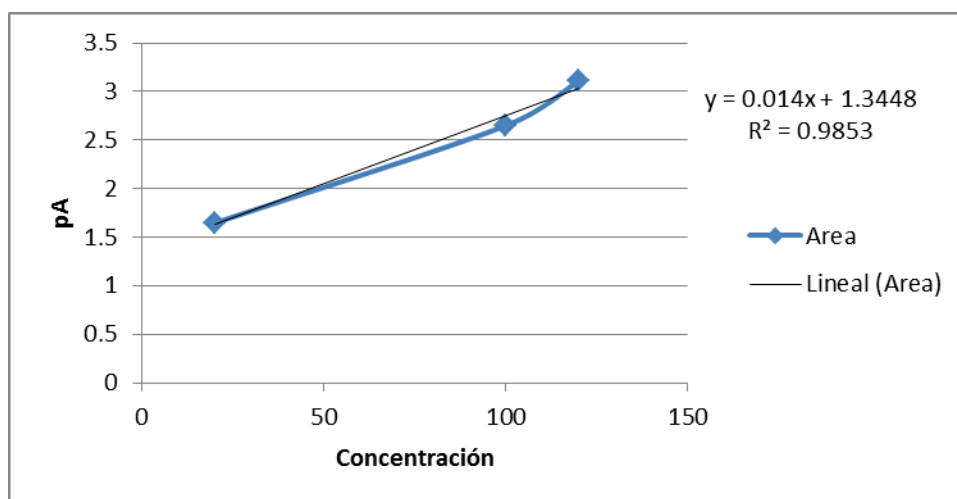


Figura 12. Curva de calibración de Ácido Propiónico