



**TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO**



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA**

**INGENIERIA BIOQUÍMICA**

**REPORTE DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

**NOMBRE DEL PROYECTO**

**PRODUCCIÓN DE PROBIÓTICOS MEDIANTE EL COCULTIVO DE *L. plantarum* BAL-03 Y *L. fermentum* BAL-21**

**PRESENTA**

**KARINA OSORIO GUTIÉRREZ**

**ASESORA**

**M.C LUCIA MARÍA CRISTINA VENTURA CANSECO**

**TUXTLA GUTIÉRREZ CHIAPAS, MÉXICO ENERO 2018**

## Resumen

Los probióticos son microorganismo Gram positivos, fermentadores de carbohidratos, que producen especialmente ácido láctico razón por la cual se les considera bacterias ácido lácticas (BAL), siendo *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* las de mayor importancia en la actualidad. En este trabajo se estudiaron 2 cepas de microorganismo probióticos *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21 aislados a partir de la taberna (bebida obtenida de la savia fermentada de la palma *Acrocomia aculeata*, producida en el Sureste de México). Debido a que los probióticos han tenido una gran demanda en los últimos años por sus efectos benéficos en la salud, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad probiótica de *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21 de forma independiente y en cocultivo, la cinética de crecimiento de BAL-03 y BAL-21 fue evaluada en caldo MRS a 37°C durante 12 horas de monitoreo, las variables evaluadas durante la cinética fueron: determinación de D.O a 620 nm, cuenta viable en placa (UFC/ml) y determinación de peso seco (g/L) para la evaluación de la producción de biomasa, se realizó la cuantificación de azúcares reductores mediante el método de DNS y la producción de ácido láctico por acidez titulable. La concentración celular de *L. plantarum* BAL-03 es de  $7.95 \times 10^9$  UFC/mL y la de *L. fermentum* BAL-21 es de  $4.05 \times 10^9$  UFC/mL, al finalizar su respectiva fase exponencial. La glucosa total consumida y la producción de ácido láctico para *L. plantarum* BAL-03 presentó valores de 15.1670 g/L y de 17.0151 g/L respectivamente. Para *L. fermentum* BAL-21 presentó valores de 14.7409 g/L y de 15.9586 g/L respectivamente. En cuanto la velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación *L. plantarum* BAL-03 posee un  $\mu = 0.46 \text{ h}^{-1}$  y un  $t_d = 1.50$  horas, mientras que *L. fermentum* tienen un  $\mu = 0.41 \text{ h}^{-1}$  y un  $t_d = 1.69$ . Los rendimientos de ácido láctico fueron para *L. plantarum*  $Y_{p/s} = 1.121 \text{ gg}^{-1}$  y *L. fermentum*  $Y_{p/s} = 1.082 \text{ gg}^{-1}$ .

# ÍNDICE

Titulo	Página
Capitulo I. Introducción	1
Capítulo II. Descripción de la empresa u organización y del puesto o área de trabajo del estudiante.	3
Capitulo III. Problemas a resolver y delimitaciones	4
Capitulo IV. Objetivos	5
4.1 Objetivo general	5
4.2 Objetivos específicos	5
Capitulo V. Justificación	6
Capítulo VI. Marco teórico	7
6.1 Definición de probióticos	7
6.2 Bacterias ácido lácticas	7
6.2.1 Hábitat	7
6.2.2 Características morfológicas y bioquímicas	8
6.2.3 Morfología colonial	8
6.2.4 Nutrición y condiciones de crecimiento en medios del cultivo	9
6.2.5 pH	10
6.2.6 Necesidades de Oxígeno	10
6.2.7 Temperatura de crecimiento	11
6.2.8 Metabolismo	11
6.2.9 Metabolitos producidos	14
6.2.10 Función de BAL en el organismo	14
6.3 Selección de microorganismos para ser utilizados como probióticos.	16
6.4 Cultivo de probióticos	16
6.4.1 Condiciones y factores que afectan el cultivo de probióticos BAL	16
6.4.2 Cultivos de monocepa y multicepa	17

6.4.3 Beneficios de cultivo multicépa	18
6.5 Características de <i>L. plantarum</i>	21
6.6 Características de <i>L. fermentum</i>	23
Capítulo VII. METODOLOGÍA	25
7.1 Reactivación y conservación de las cepas	25
7.2 Cinética de crecimiento de <i>L. plantarum</i> BAL-03 y <i>L. fermentum</i> BAL-21 a nivel matraz	25
7.2.1 Medición del crecimiento mediante densidad óptica	27
7.2.2 Medición del crecimiento siembra en placa	27
7.2.3 Medición del crecimiento mediante peso seco	28
7.2.4 Cuantificación de azúcares reductores por el método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)	29
7.2.5 Cuantificación de ácido láctico por el método de Acidez titulable	30
7.2.6 Estequiometría de crecimiento bacteriano	32
7.3 Resistencia gastrointestinal	33
Capítulo VIII. Resultados y discusiones	36
8.1 Cinética de <i>L. plantarum</i> BAL-03 y <i>L. fermentum</i> BAL-21 a nivel matraz	36
8.1.1 Medición del crecimiento mediante densidad óptica	36
8.1.2 Medición del crecimiento mediante siembra en placa	38
8.1.3 Medición del crecimiento mediante peso seco	42
8.1.4 Curvas de correlación para determinación de biomasa	44
8.1.4.1 Curvas de correlación para BAL-03	44
8.1.4.2 Curvas de correlación para BAL-21	47
8.1.5 Cuantificación de Azúcares por método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)	50
8.1.6 Cuantificación de ácido láctico por acidez titulable	53
8.1.7 Estequiometría de crecimiento bacteriano	56
8.2 Resistencia gastrointestinal	58
Capítulo IX. Conclusiones	60

**Índice de tablas**

Tabla 1. Constituyentes del caldo MRS	9
Tabla 2. Ejemplo de cepas probióticas en productos comerciales	19
Tabla 3. Resultados de densidad óptica 620 nm de BAL-03 y BAL-21	36
Tabla 4. Resultados de cuenta viable (UFC/mL) de BAL-03 y BAL-21	38
Tabla 5. Resultados de peso seco (g/L) de BAL-03 Y BAL-21	42
Tabla 6. Curva patrón de Azúcares reductores	50
Tabla 7. Datos de azúcares reductores de BAL-03 y BAL-21	51
Tabla 8. Curva patrón de ácido láctico	53
Tabla 9. Cuantificación de ácido láctico de BAL-03 y BAL-21	54
Tabla 10. Rendimientos de BAL-03 y BAL-21	57
Tabla 11. Supervivencia de BAL-03 y BAL-21 a resistencia gastrointestinal simulada.	58

**Índice de figuras**

Figura 1. Diferentes vías metabólicas a partir de glucosa en bacterias ácido lácticas	13
Figura 2. Efectos benéficos de los probióticos sobre la salud	15
Figura 3. Imagen micro-morfológica de <i>Lactobacillus plantarum</i>	22
Figura 4. Morfología celular de <i>Lactobacillus plantarum</i>	22
Figura 5. Morfología colonial de <i>Lactobacillus plantarum</i>	22
Figura 6. <i>Lactobacillus fermentum</i>	24
Figura 7. Imagen micro-morfológica de <i>Lactobacillus fermentum</i>	24
Figura 8. Morfología colonial de <i>Lactobacillus fermentum</i>	24
Figura 9. Curva de D.O en medio MRS de <i>L. plantarum</i> BAL-03 y <i>L.</i>	37

*fermentum* BAL-21.

Figura 10. Curvas de crecimiento de *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21 (UFC/mL) en función del tiempo 39

Figura 11. Curva de Ln de UFC/mL vs tiempo 40

Figura 12. Comparación del crecimiento de BAL-03 y BAL-21 (UFC/mL) en función del tiempo 41

Figura 13. Peso seco de BAL-03 y BAL-21 en función del tiempo 43

Figura 14. Curva de correlación entre Absorbancia y UFC/mL de BAL-03 44

Figura 15. Curva de correlación entre Abs y Peso seco BAL-03 45

Figura 16. Curva de correlación entre Peso seco y UFC/mL de BAL-03 46

Figura 17. Curva de correlación entre Absorbancia y UFC/mL de BAL-21 47

Figura 18. Curva de correlación entre Abs y Peso seco BAL-21 48

Figura 19. Curva de correlación entre Peso seco y UFC/mL de BAL-21 49

Figura 20. Curva patrón de Azúcares reductores 50

Figura 21. Curva de consumo de sustrato de BAL-03 y BAL-21 51

Figura 22. Curva patrón de ácido láctico 53

Figura 23. Curva de formación de ácido láctico BAL-03 y BAL-21 54

Figura 24. Desarrollo de crecimiento microbiano, que ilustra el crecimiento de biomasa [X], consumo de sustrato [S] y producción de ácido láctico [P] debido al metabolismo de BAL-03 y BAL-21. 56

## Capítulo I. introducción

La presente investigación se refiere al estudio de la producción de probióticos mediante el cocultivo de *Lactobacillus plantarum* BAL-03 y *Lactobacillus fermentum* BAL-21 aislados a partir de la taberna (bebida obtenida de la savia fermentada de la palma *Acrocomia aculeata*, producida en el Sureste de México).

Los probióticos son microorganismos que pertenecen al grupo de las bacterias ácido láctico (BAL), predominando los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Las BAL se clasifican con base en sus propiedades morfológicas, crecimiento a diferentes temperaturas, capacidad de fermentación de carbohidratos y la configuración de ácido láctico producido, estos son microorganismos en forma de bacilos o cocabacilos Gram positivos, no esporulados que tienen la propiedad de fermentar carbohidratos para producir compuestos de menor peso molecular como ácido láctico, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido acético, CO<sub>2</sub>, diacetilo, H<sub>2</sub>O, bacteriocinas, entre otros metabolitos. Estos compuestos antimicrobianos producidos por las BAL, inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos y productores de toxinas contribuyendo a mejorar los procesos digestivos.

Para que estos microorganismos sean considerados un potencial probiótico debe ser resistente a la acidez gástrica, capacidad de hidrolizar sales biliares, adherencia al mucus y a las células epiteliales del tracto gastrointestinal, habilidad para reducir la adhesión de otros microorganismos. En el caso de alimentos funcionales el requisito básico para los probióticos es que los productos deben contener suficiente concentración de microorganismos hasta la fecha de caducidad y permanecer viables durante todo el tiempo de conservación del producto. Los probióticos se encuentran disponibles en el mercado en forma de tabletas, cápsulas, en polvo y adicionado a alimentos, estos probióticos se encuentran como cultivos únicos (monocepa) o mezclados (multicepa o cocultivo) que al ser ingeridos por humanos o animales, mejoran el balance de la microbiota intestinal, evitando la adhesión de patógenos, contribuyen en la biopreservación de los alimentos, mejoran las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva, los microorganismos probióticos en cocultivo pueden mejorar las características probióticas como el crecimiento o actividad metabólica de las cepas, incrementar el rendimiento del

producto con respecto al cultivo puro, tener una mejor eficacia antimicrobiana, entre otros, el consumo de estos productos con microorganismos probióticos tiene una gran variedad de efectos beneficios sobre la salud y pueden reducir el riesgo de enfermedades, sin embargo son pocos los estudios que se enfocan en el cocultivo de microorganismos probióticos, por lo tanto el objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad probiótica de *L. plantarum* y *L. fermentum* de forma independiente y en cocultivo.



## **Capítulo II. Descripción de la empresa u organización y del puesto o área de trabajo del estudiante.**

El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Microbiología No. 3 ubicado en el edificio que ocupa el POLO TECNOLÓGICO, también se ocupó el laboratorio de Investigación ubicado en el edificio D, ambas instalaciones se encuentran en el Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez ubicado en KM 29020, Carr. Panamericana 1080, Boulevares, Tuxtla Gutiérrez, Chis.



### **Misión**

Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

### **Visión**

Ser una Institución de Excelencia en la Educación Superior Tecnológica del Sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

### **Capítulo III. Problemas a resolver y delimitaciones**

**3.1** *Lactobacillus plantarum* BAL-03 y *Lactobacillus fermentum* BAL-21 son bacterias que pertenecen al mismo género y tienen características similares debido a esto se busca realizar la formulación y optimización de un medio de cultivo selectivo en el que únicamente se desarrolle *Lactobacillus plantarum* BAL-03 o *Lactobacillus fermentum* BAL-21 con el fin de identificar el porcentaje que representa cada BAL en el cocultivo, empleando diferentes tipos de carbohidratos y la aplicación de antibióticos.

**3.2** Estandarización de métodos analíticos y microbiológicos para poder diseñar metodologías con condiciones óptimas, y así minimizar los errores al realizar las pruebas de los microorganismos en estudio, debido a que un proceso que mantiene condiciones óptimas produce mejores resultados.

**3.3** Estandarización de la técnica de resistencia gastrointestinal simulada, debido a que durante este proceso se debe controlar el pH y así mantener todas las condiciones estériles para evitar contaminación.

#### **3.4 Delimitaciones**

Debido a la suspensión de actividades en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez por las afectaciones en las instalaciones, del pasado terremoto en Chiapas y al tiempo invertido para encontrar el medio selectivo diferencial para la identificación de las bacterias probióticas en cocultivo, no se lograron cumplir todos los objetivos establecidos en el cronograma de actividades.

A la fecha aún no se logra encontrar el medio de cultivo selectivo razón por la cual no se pudo realizar los parámetros cinéticos en cocultivo de las BAL, y debido al límite de tiempo tampoco se pudo realizar la prueba de degradación de colesterol, razón por la cual estos no forma parte del reporte.

## Capítulo IV. Objetivos

### 4.1 Objetivo general:

- Evaluar la capacidad probiótica de *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21 en monocultivo y en cocultivo.

### 4.2 Objetivos específicos:

- Determinar los parámetros cinéticos de *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21 en monocultivo.
- Desarrollar un medio de cultivo diferencial que permita evidenciar el crecimiento de una BAL a expensas de la otra.
- Determinar los parámetros cinéticos del cocultivo de *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21.
- Evaluar la producción de ácido láctico, resistencia gastrointestinal simulada y degradación de colesterol de *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21 en monocultivo y cocultivo.

## Capítulo V. Justificación

Los avances científicos de los últimos años en relación a las propiedades beneficiosas de los probióticos han aumentado significativamente, mostrando grandes avances en su efecto sobre diferentes funciones fisiológicas, esto avala la necesidad de desarrollar un gran interés por la producción, comercialización, consumo y el efecto beneficioso de los probióticos como parte de los alimentos funcionales, suplementos dietéticos y formulaciones farmacéuticas, el consumo de estos productos que contienen bacterias probióticas son conocidos por proporcionar una serie de beneficios en la salud que incluyen una mejora de la microbiota humana, como el control y disminución de infecciones gastrointestinales, control de infecciones en el tracto urogenital, reducción a la intolerancia a la lactosa, reducción del riesgo de cáncer de colon (y otros órganos), disminución de colesterol sérico, enfermedades cardíacas, entre otros. Los principales microorganismos del grupo de las bacterias ácido láctico considerados como probióticos son del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, estos microorganismos son utilizados por la industria alimentaria para la elaboración de productos fermentados. Los probióticos del género *Lactobacillus* representaron el 61,9% de las ventas totales en 2007. Es por esta razón que este proyecto tiene la finalidad de estudiar la capacidad probiótica de dos microorganismos *L. plantarum* BAL- 03 y *L. fermentum* BAL-21 en cocultivo. El desarrollo de fermentación en cocultivo (multicepa), podría ser más eficaz y consistente que el de un probiótico (monocepa), debido a que las preparaciones probióticas que contienen bacterias de sólo una cepa tienen pocas posibilidades de colonizar con éxito el tracto gastrointestinal, la finalidad de los cocultivos y cultivos mixtos es que pueden contener bacterias que complementen el efecto de cada uno en la salud, hoy en día se estudian bioprocesos con cocultivo y cultivos mixtos con la finalidad de producir una correcta proporción de microorganismos viables.

## Capítulo VI. Marco teórico

### 6.1 Definición de probióticos

El término probiótico proviene del griego (pro= a favor de; biótico= vida), las cepas más comúnmente utilizadas como probióticos son *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium* estas son miembros del grupo heterogéneo de bacterias del ácido láctico. La definición más completa y de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS o WHO en inglés) se refiere a aquellos “cultivos puros, o mezcla de cultivos de microorganismos vivos, que aplicados al hombre y los animales en cantidades adecuadas aportan efectos benéficos al huésped mejorando las propiedades de la microflora nativa y para estimular el sistema inmunológico (Torres, 2002; Barboza y col., 2004).

### 6.2 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se ubican en la familia *Lactobacillaceae* son un grupo de microorganismos de varios géneros y su clasificación se basa en la morfología, modo fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas facultativas o estrictas), el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal, tolerancia ácida o alcalina y características metabólicas en común. También se agrupan los lactobacilos en los tres grupos tradicionales establecidos por Orla-Jensen (Bergey, 1992): termobacterias, estreptobacterias y betabacterias, pero sin tener en cuenta las temperaturas de crecimiento ni la morfología; características clásicas de la clasificación de Orla-Jensen.

#### 6.2.1 Hábitat

Los lactobacilos forman parte de la flora normal de la boca, en el tracto gastrointestinal (GIT) del hombre y otros animales, en alimentos y productos lácteos, productos cárnicos, jugos vegetales fermentados (cervezas, vinos, frutas y jugos de frutas), col y otros vegetales fermentados, ensilajes, masas agrias y pulpas (Venema y col., 1996).

También pueden encontrarse en hábitats secundarios como los fertilizantes de origen orgánico. Algunas especies individuales se han adaptado a determinados nichos ecológicos, que son de hecho sus hábitats naturales, siendo muy difícil encontrarlos fuera de éstos (Bergey, 1992).

### **6.2.2 Características morfológicas y bioquímicas**

En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivas, con rara producción de pigmentos, aunque unas pocas especies los producen de color amarillo, naranja, rojo o pardo, no esporulados, algunas cepas presentan cuerpos bipolares que probablemente contengan polifosfato, no móviles, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes, no digieren la caseína, aunque muchas cepas producen pequeñas cantidades de nitrógeno soluble, no producen indol ni ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S), son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno, y no poseen enzimas superóxido dismutasas, carecen de citocromos por la ausencia de porfirinas, para ejecutar la fosforilación oxidativa, son benzidina negativa, no reducen el nitrato a nitrito, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6,0 y producen ácido láctico (a veces con ácidos volátiles), como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos, alcohol y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como subproductos. (Carr y col., 2002; Vázquez y col., 2009).

### **6.2.3 Morfología colonial**

Las colonias de *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza. Algunas especies forman colonias rugosas. Generalmente no presentan actividad proteolítica ni lipolítica que pueda apreciarse mediante halos claros formados en medios sólidos que contengan proteínas o grasas. Sin embargo, muchas cepas presentan ligera actividad proteolítica debido a proteasas y peptidasas ligadas a la pared celular o liberadas por ésta, así como una débil actividad

lipolítica debido a la acción de lipasas intracelulares (Law y Kolstad, 1983; citados por Bergey, 1992)

#### 6.2.4 Nutrición y condiciones de crecimiento en medios del cultivo.

Los lactobacilos presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales complejos, para su multiplicación requieren no sólo carbohidratos fermentables (glucosa y lactosa), como fuentes de carbono y energía, sino también: péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos, generalmente estos requerimientos variados suelen suplirse cuando el medio de cultivo de los lactobacilos contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, especialmente Tween 80, resulta estimulador y hasta esencial para muchas especies, estos requerimientos de nutrientes se muestran en la tabla 1, incluidos en el medio MRS.

Tabla1. Constituyentes del caldo MRS

Fórmula para 1L	
Proteasa peptona No.3	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	5 g
Dextrosa	20 g
Tween 80	1 g
Citrato de amonio*	2 g
Acetato de sodio	5 g
Sulfato de magnesio*	0.1 g
Sulfato de manganeso*	0.05 g
Fosfato dipotásico *	2 g
pH 6.5 ± 0.2	
* Componentes que forman parte de las sales (micronutrientes) del medio de cultivo MRS	

Las BAL en su crecimiento en medio líquido sus células precipitan rápidamente después que el crecimiento cesa; dando lugar a un sedimento suave y homogéneo, sin

formación de películas. En raras ocasiones este sedimento es granular o viscoso (Bergey, 1992). Los lactobacilos no desarrollan olores típicos al crecer en medios comunes, pero contribuyen a modificar el sabor de alimentos fermentados, produciendo compuestos volátiles como diacetilo y sus derivados y hasta sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y aminas en el queso (Law y Kolstad, 1983; citados por Bergey, 1992).

Debido a la alta variabilidad entre especies, se emplea desde hace algunos años un método eficiente para la identificación y detección específica de bacterias ácido-lácticas probióticas, el cual resulta útil para una mejor caracterización de las mismas, denominado PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Castellanos y col., 1996). El método de PCR por detección molecular es ventajoso para la identificación rápida y selección de nuevos cultivos probióticos en comparación con métodos microbiológicos convencionales que son laboriosos y tediosos.

### **6.2.5 pH**

Las BAL crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4-4,5 y con un óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3,6 en dependencia de especies y cepas y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos. Los lactobacilos son capaces de disminuir el pH del sustrato donde se encuentran por debajo del valor 4,0 mediante la formación de ácido láctico. De esta forma evitan el crecimiento de casi todos los otros microorganismos competidores (Bergey, 1992).

### **6.2.6 Necesidades de Oxígeno**

La relación de las BAL con el oxígeno es compleja: por su incapacidad de sintetizar porfirinas hémicas, son consideradas como anaerobias. Sin embargo, su sensibilidad al oxígeno puede ser muy variable según las cepas: desde anaerobia estricta, aerotolerante e insensible. La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO<sub>2</sub> (de



aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos (Bergey, 1992). En general las BAL son capaces de transformar el oxígeno molecular ( $O_2$ ) en superóxido ( $O_2^\bullet$ ), en  $H_2O_2$  o en agua ( $H_2O$ ).

### **6.2.7 Temperatura de crecimiento**

La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C, algunos crecen por debajo de 15°C y hay cepas que crecen por debajo de 5°C. Otros crecen a temperaturas bajas, cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados).

Los llamados lactobacilos “termófilos” pueden tener un límite superior de temperatura de 55°C y no crecen por debajo de 15°C. Aún no se conocen los verdaderos lactobacilos termófilos que crezcan por encima de 55°C (Bergey, 1992).

### **6.2.8 Metabolismo**

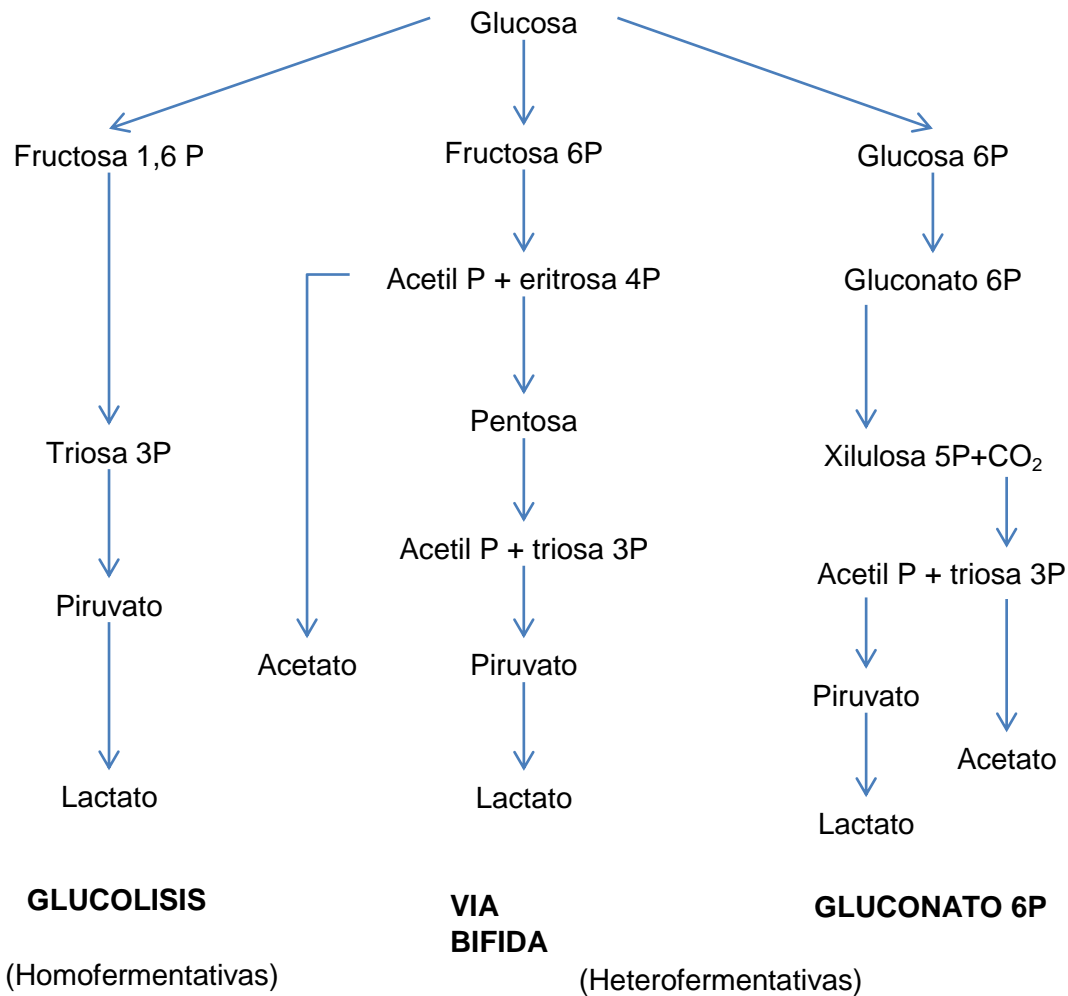
Las BAL pueden ser homofermentativas o heterofermentativas, dependiendo de la fermentación de azúcares (hexosas y pentosas) en condiciones de crecimiento no limitadas.

Las BAL homofermentativas usan la glucólisis vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), resultando el ácido láctico como el producto final.

Las BAL heterofermentativas usan la vía 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa (6-PG/PK) o vía de las pentosas fosfato produciendo cantidades equimolares de ácido láctico, dióxido de carbono  $CO_2$  y etanol (o ácido acético) como productos principales. En base a estas dos vías de fermentación, las BAL han sido divididas en tres categorías metabólicas: homofermentativas estrictas, heterofermentativas estrictas y heterofermentativas facultativas, las vías metabólicas de cada categoría se muestran en la figura 1.

Las homofermentativas estrictas sólo pueden fermentar hexosas por la glucólisis, mientras que las heterofermentativas estrictas usan solamente la vía 6-PG/PK y las heterofermentativas facultativas tienen la capacidad de utilizar ambas vías, siendo homofermentativo su metabolismo principal; si se modifican algunas condiciones de cultivo, como la concentración de glucosa, pH y la restricción de nutrientes, se induce la vía 6-PG/PK causando la fermentación heteroláctica (Jay, 2000; Axelsson, 2004).

La diferencia de una vía a otra viene marcada por la presencia o ausencia de la enzima aldolasa, enzima clave en la glucólisis. Las heterofermentativas, carecen de esta aldolasa y no pueden romper la fructosa 1,6-difosfato. En su lugar, oxidan la glucosa 6-fosfato hasta 6-fosfogluconato y después lo descarboxilan hasta xilulosa 5-fosfato que se escinde hasta gliceraldehído 3-fosfato y acetil-fosfato por medio de la fosfoacetolasa, el gliceraldehído 3-fosfato se convierte en ácido láctico con la producción de una molécula de ATP (Adenosina trifosfato), mientras que el acetil-fosfato acepta electrones del NADH (Nicotinamida adenina dinucleótido, forma reducida) que se ha generado durante la formación de xilulosa 5-fosfato, dando lugar directamente a etanol sin producir ATP. Por ello, las heterofermentativas producen solamente 1 mol de ATP de la glucosa en lugar de 2 como hacen las homofermentativas. Como las heterofermentativas descarboxilan el 6-fosfogluconato, producen CO<sub>2</sub> como producto de fermentación (Prescott y *col.*, 1999).



**Figura 1.** Diferentes vías metabólicas a partir de glucosa en bacterias ácido lácticas (SURIDERP, Chahal., 1995)

Para el microorganismo, el producto importante es el ATP, que se usa en multitud de reacciones que requieren energía, la fermentación no es sólo un proceso que produce energía, sino un medio para obtener productos naturales que son de utilidad para el consumo humano (Madigan y col., 2004).

### **6.2.9 Metabolitos producidos**

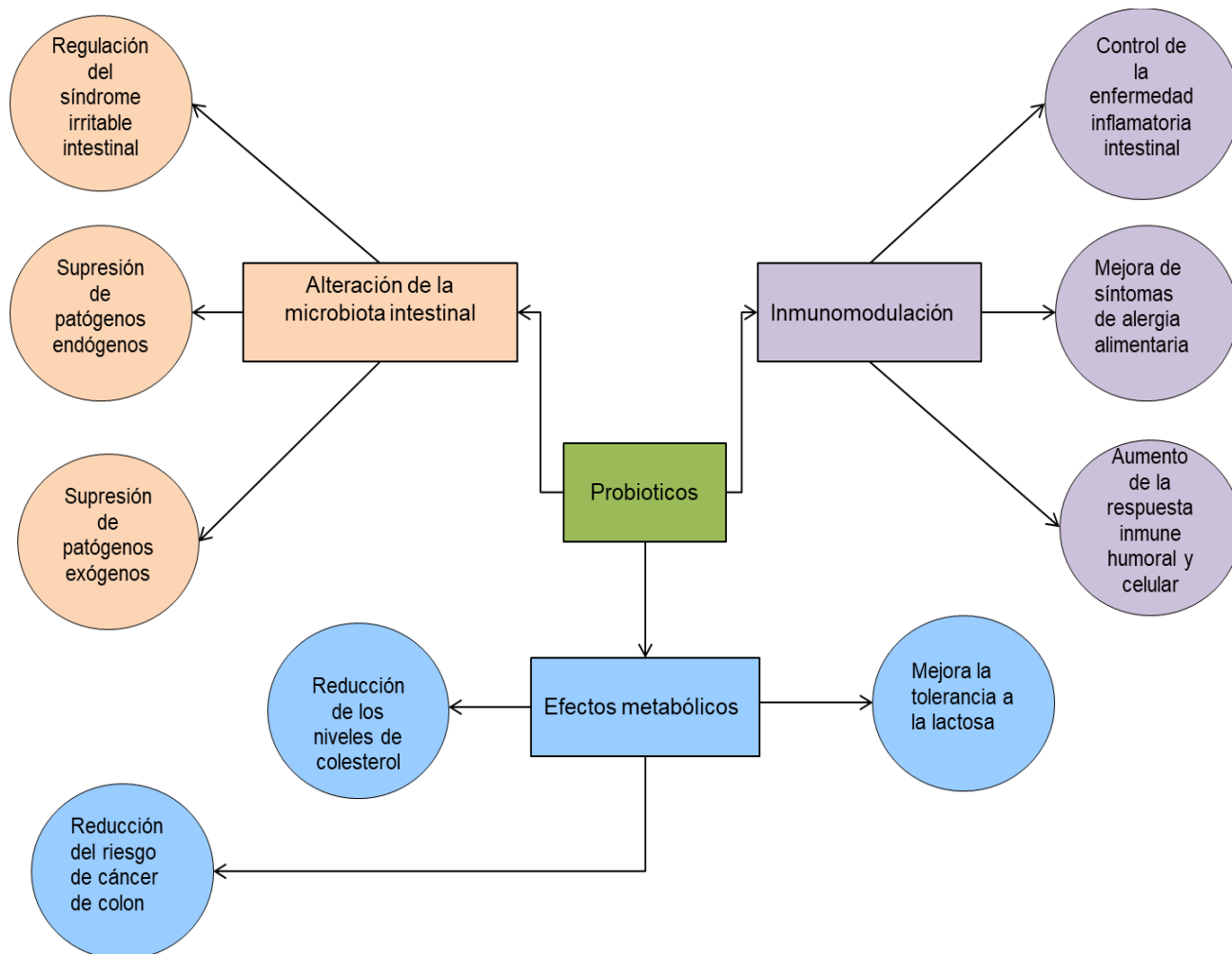
Los *Lactobacillus*, por su capacidad antagónica, se basan en la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, estos compuestos antimicrobianos producidos por las BAL que intervienen en la fermentación, inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos y productores de toxinas (Jay, 2000; Barboza y col., 2004). Estas sustancias son ácidos láctico, acético, peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y otros derivados del metabolismo del oxígeno, así como compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas, productos secundarios generados por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocianato (Shirai y col., 1996).

### **6.2.10 Función de BAL en el organismo**

Las BAL en el organismo desarrollan tres tipos de funciones básicas: metabólica (descomposición de alimentos), barrera (protección contra el exterior) e interacción con el huésped (a través del sistema inmunológico). Así por ejemplo, la presencia de bacterias en el colon aporta al hombre distintas actividades metabólicas que no sería capaz de llevar a cabo por sí solo (Gibson y Macfarlane, 1995). Los probióticos tienen resistencia a la bilis-sal, baja tolerancia a pH, potencial de la adhesión a células epiteliales y propiedades especialmente funcionales, incluyendo la producción de sustancias antimicrobianas, hidrolasa de sales biliares (BSH) y actividad amilolítica.

Los probióticos tienen efecto sobre el control de infecciones en el intestino por patógenos entéricos, control de infecciones en el tracto urogenital, así como sobre la intolerancia a la lactosa. Para reducir, infecciones diarreicas, reducción del riesgo de cáncer de colon (y otros órganos), antihipertensivo; antidiabético e inmunomodulación, disminución de colesterol sérico (las BAL producen esteroides a partir del colesterol en el colon y esto ayuda a reducir los niveles circulantes de colesterol) y enfermedades cardiacas. Para estimular el sistema inmune, movimiento intestinal, como antioxidante esto puede ser debido a la producción de enzimas o compuestos de superficie celular, el aumento de utilización de los nutrientes y la disminución del uso de antibióticos.

Ciertos componentes celulares de las bacterias probióticas actúan como inmunomoduladores, es decir que promueven el ataque inmunológico en contra de células malignas. Diversos estudios han demostrado que los probióticos poseen la habilidad de activar los macrófagos y linfocitos mejorando los niveles de IgA y producción de gama interferón (Reid y *col.*, 2003)



**Figura 2.** Efectos benéficos de los probióticos sobre la salud (Puertollano y *col.*, 2008)

### **6.3 Selección de microorganismos para ser utilizados como probióticos.**

Los criterios de selección de las BAL para ser utilizadas como probióticos potenciales es que deben ser capaces de ejercer un efecto beneficioso sobre la salud, perdurar en un producto alimenticio a altas concentraciones (una cepa probiótica tiene que alcanzar el intestino grueso en una concentración de aproximadamente  $10^7$  células viables / g (Stanton y *col.*, 2001). El requisito básico para los probióticos es que los productos deben contener concentración de microorganismos hasta la fecha de caducidad (Fasoli y *col.*, 2003), y permanecer viables durante todo el tiempo de conservación del producto, sobrevivir durante el paso a través del GIT y deben ser metabólicamente activos dentro del GIT, adherirse al mucus y a las células epiteliales del tracto gastrointestinal, producir sustancias antimicrobianas, habilidad para reducir la adhesión de microorganismos patógenos cancerígenos, estabilizar la micro flora intestinal y proporcionar varios beneficios de salud, deben ser capaces de hidrolizar sales biliares, soportar acidez gástrica y enzimas digestivas. La evaluación de la seguridad debe asegurar que es no patógeno, no tóxico, no alérgico y no debe llevar a resistencia a los antibióticos transmisibles (Mattila y Saarela 2000; Parvez y *col.*, 2006; Tumola y *col.*, 2001). Sobre la base de estos criterios, una cepa probiótica debe ser seleccionada. (Godward y *col.*, 2000; Mattila y Saarela, 2000; Talwalkar y Kailasapathy, 2004).

### **6.4 Cultivo de probióticos**

#### **6.4.1 Condiciones y factores que afectan el cultivo de probióticos BAL**

Dentro de los factores extrínsecos más importantes que afectan la viabilidad y sobrevivencia de las células se encuentran: el pH (condiciones de acidez derivadas del proceso de fermentación), debido a que la acidez produce la inactivación de enzimas importantes para el metabolismo de los probióticos y disminuye su sobrevivencia debido al efecto bactericida de las concentraciones de ácido en el medio (Cruz y *col.*, 2009). El oxígeno disuelto (especialmente para bifidobacterias), las interacciones antagónicas entre especies, la composición química del medio de cultivo, la concentración final de

azúcares (aumento de la presión osmótica), las prácticas de inoculación (es importante conocer el momento adecuado para el agregado del cultivo probiótico), la temperatura y duración de la fermentación, y las condiciones de almacenamiento del producto, etc. (Vinderola y col., 2000; Kristo y col., 2003).

#### **6.4.2 Cultivos de monocepa y multicepa.**

Un probiótico monocepa se define como aquel contiene una cepa de una determinada especie en consecuencia un probióticos multicepa contiene más de una cepa de la misma especie o especies estrechamente relacionadas, por ejemplo *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*. Los probióticos de múltiples especies se definen como cepas que contienen diferentes especies probióticas que pertenecen a uno o preferentemente a más géneros, p. *Lb. acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium* y *Lactococcus lactis*.

La producción de probióticos multicepa consiste en el cultivo y el secado de cultivos puros por separado, y luego mezclarlos para conseguir una formulación deseada. El desarrollo de una fermentación en cocultivo para producir tales productos en una correcta proporción de microorganismos viables, puede reducir las operaciones múltiples, y podría ser rentable. Varios intentos se han hecho en el pasado para desarrollar bioprocesos-cultivo mixto, la funcionalidad de un probiótico multicepa podría ser más eficaz y más consistente que el de un probiótico monocepa, debido a que las preparaciones probióticas que contienen bacterias de sólo una cepa tienen pocas posibilidades de colonizar con éxito el TGI. Además, se espera que los probióticos controlen las enfermedades multifactoriales que demandan una variedad de propiedades probióticas, mientras que tales propiedades son específicas de la cepa (Sanders y Huis in't Veld, 1999). Por lo tanto, Dunne y col. (1999) ha sugerido que los probióticos deberían consistir en una combinación de cepas, debido a que los cultivos mixtos pueden contener bacterias que complementan el efecto de salud del otro y, por lo tanto, tienen propiedades probióticas sinérgicas.

### 6.4.3 Beneficios de cultivo multicepa

En los últimos años, un gran número de estudios han confirmado los efectos beneficiosos de las preparaciones con una única cepa probiótica (cultivo monocepa) (Nayak, 2010). Sin embargo, varios estudios han puesto de manifiesto que el empleo de preparaciones con varias cepas probióticas de la misma especie o de especies diferentes (cultivos multicepas/multiespecíficas) pueden ser más eficaces que los probióticos monocepa, el aumento de la eficacia de los probióticos multicepa contra patógenos puede ser causada por la gran variedad de capacidades antimicrobianas asociados con preparaciones mixtas, tales como la producción de ácidos débiles orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, mejorar ciertas características como el crecimiento o actividad metabólica de las cepas, estos cultivos mixtos pueden contener bacterias que complementan el efecto de cada uno y tener propiedades probióticas sinérgicas.

La razón de una mayor eficacia por los probióticos multicepa radica en dos aspectos:

- Los probióticos multicepa tienen más posibilidades de colonización exitosa en el GIT que los probióticos monocepa.
- Los probióticos multicepa deben mostrar una mejor eficacia debido a su gran variedad de propiedades probióticas.

Las mezclas de probióticos que contienen diferentes cepas tienen una mayor probabilidad de supervivencia (al menos parcial) bajo las condiciones digestivas como un ambiente ácido en el estómago, los ácidos biliares y las enzimas pancreáticas en el duodeno. Las tasas de supervivencia se encuentra en un rango de 20-40%, (Bezkorovainy, 2001). Los probióticos multicepa pueden ser capaces de crear un nicho probiótico que mejora la colonización de las cepas dañadas, ciertas especies probióticas son dependientes de otras cepas para su suministro de hidratos de carbono. Por ejemplo, *Lactobacillus* produce principalmente lactato que se cataboliza por bacterias propiónicas en ácido propiónico (Frohlich-Wyder y col., 2002). Los datos *in*



*in vitro* indican dos mecanismos diferentes que pueden ser beneficiosos para especies múltiples probióticos en la creación de su propio nicho probiótico.

La ventaja de los probióticos multicepa es que tienen un gran número de características favorables que se combinan en una sola preparación (Campieri y Gionchetti, 1999). La investigación *in vitro* busca combinaciones que muestran actividades sinérgicas y simbióticas uno hacia el otro. Una de sus desventajas es que las combinaciones probióticas muestran propiedades inhibidoras y que no sean compatibles.

Los probióticos tienen gran importancia en la industria, en el mercado se encuentran productos probióticos monocepa y multicepa, algunos productos comerciales se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Ejemplos de cepas probióticas en productos comerciales. (Guarner y col., 2008)

Cepa (designaciones alternativas)	Nombre del producto	Fabricante
<i>Bifidobacterium animalis</i> DN 173 010	Activia	Danone/Dannon
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb-12		Chr. Hansen
<i>Bifidobacterium breve</i> Yakult	Bifiene	Yakult
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	Align Howaru™ Bifido	Procter y
<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019 (DR10)		Gamble
<i>Bifidobacterium longum</i> BB536		Danisco Morinaga Milk Industry
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM		Danisco
<i>Lactobacillus casei</i> DN-114 001	Actimel, DanActive Cultura	Danone/Dannon
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431		Chr. Hansen
<i>Lactobacillus casei</i> F19		Arla Foods
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Yakult	Yakult
<i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (Lj1)	LC1	Nestlé

<p><i>Lactococcus lactis</i> L1A <i>Lactobacillus plantarum</i> 299V</p>	<p>Norrmejerier GoodBelly, ProViva</p>	<p>NextFoods Probi</p>
<p>Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 y <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14 Analizado como mezcla: VSL#3 (mezcla de 1 cepa de <i>Streptococcus thermophilus</i>, cuatro <i>Lactobacillus</i> spp y tres cepas de <i>Bifidobacterium</i> spp</p>	<p>FemDophilus  VSL#3</p>	<p>Chr. Hansen  Sigma-Tau Pharmaceuticals, Inc.</p>
<p>Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus acidophilus</i> CUL60 y <i>Bifidobacterium bifidum</i> CUL 20 Analizado como mezcla: <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 y <i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011</p>	<p>A'Biotica y otros</p>	<p>Institut Rosell</p>
<p>Analizado como mezcla: <i>Bacillus clausii</i> cepas O/C, NR, SIN, y T</p>	<p>Enterogermina</p>	<p>Sanofi-Aventis</p>

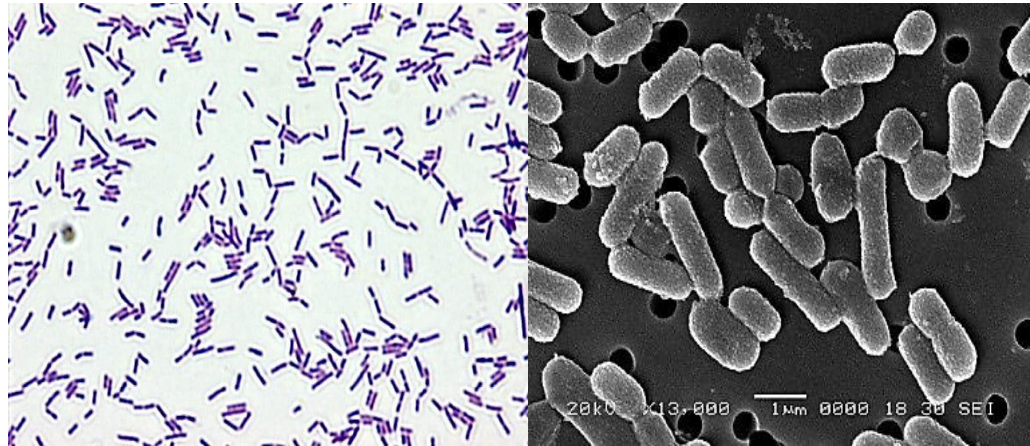
## 6.5 Características de *L. plantarum*

*Lactobacillus plantarum* es una bacteria ácido láctico homofermentativa (Jay, 2000), anaerobia facultativa, con configuración de ácido láctico (DL), usualmente metabolizan la glucosa por la vía Embden- Meyerhof y se caracterizan por degradar fructosa –1,6– difosfato aldosa en dos triosasfosfatos, los cuales son convertidos en lactato (Kandler, 1983; Hiyama y col., 1968). Con un rendimiento mayor a 0,9 gg-1.

*L. plantarum* es un probiótico único, dada su capacidad para tolerar valores de pH más bajos que la mayoría de otros microorganismos (Mc Donald y col., 1990), razón por la cual esta especie se presenta comúnmente en alimentos fermentados naturalmente, en vegetales, en pescados y en carnes. Es la cepa más frecuentemente productora de bacteriocinas, lo cual explica su habilidad para controlar otros microorganismos incluyendo los patógenos (Olesupo y col., 1995). Estos componentes antimicrobianos inhiben el crecimiento de bacterias aeróbicas, algunas enterobacteriáceas y *Staphylococcus aureus*.

Esta bacteria es Gram positiva, sus células tiene forma de varilla recta con extremos redondeados y dimensiones de (0,5 - 1,2 x 1,0 – 10 µm) se encuentran aislados o en cadenas cortas, su crecimiento en medio liquido es disperso y las colonias en los medios sólidos se caracterizan por tener margen puntiforme, convexas, enteras (Block, 2017), son catalasa negativa, su crecimiento se da entre 15° a 45° con una temperatura óptima de 34- 37°C y un pH óptimo es de 5.5-6.5. Sus características morfológicas se muestran en las figuras 3,4 y 5.

Utilizan como sustrato ácido málico, ácido tartárico, glucosa y algunos azúcares pentosas, teniendo como producto principal ácido láctico, también producen ácido acético, ácido succínico, etanol, dióxido de carbono, aminas biogénicas y precursores del carbamato de etilo, (G + C) %: 36-47%. Estudios realizados a *L. plantarum* afirman que es la única cepa inhibida por fosfomicina, tiene susceptibilidad al ciertos antibióticos como cloranfenicol, penicilina, amoxicilina, cefoxitina., ampicilina, clindamicina, eritromicina y gentamicina.



**Figura 3.** Imagen micro-morfológica de *Lactobacillus plantarum*



**Figura 4.** Morfología celular de *L. plantarum*



**Figura 5.** Morfología colonial de *L. plantarum*

*Lactobacillus plantarum* es una de las bacterias más utilizadas en la industria alimentaria debido a que se han encontrado una gran cantidad de bacteriocinas producidas por diferentes cepas de *L. plantarum* (van Reenen y col., 1998; Ruiz y Piard, 1991; Kato y col., 1994). Aporta importantes enzimas de la fermentación y contribuye a la biopreservación de los alimentos (Nes, 1984) *L. plantarum* inhibe la adherencia de *E. coli* enteropatógena, eliminando patógenos de las células epiteliales del intestino por aumento de la mucina intestinal. (Dunne y col., 2001)

## 6.6 Características de *L. fermentum*

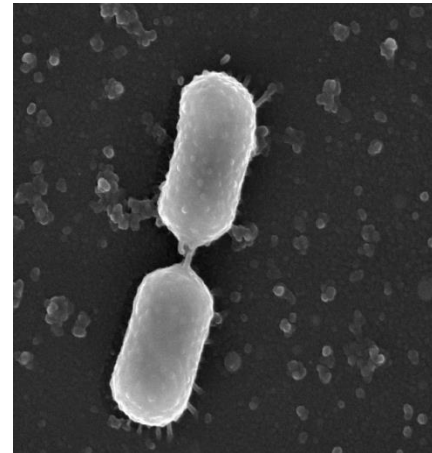
*Lactobacillus fermentum* es una bacteria ácido láctico perteneciente a la familia *Lactobacillaceae*, heterofermentativa estricta (Jay, 2000). Oxida la glucosa – 6 – fosfato a 6 – fosfogluconato y el producto final de su metabolismo es una mezcla equimolar de lactato, CO<sub>2</sub> y etanol o acetato (Kandler, 1983). *L. fermentum* es la principal especie de *Lactobacillus* heterofermentativa del intestino humano. También se encuentra en la fermentación de productos lácteos, plantas y material animal, la forma de su célula es con forma de barra, es Gram-positiva, su metabolismo es anaerobio, son aerotolerantes, con configuración de ácido láctico es DL (25% al 75% del ácido láctico es de la configuración L) (Jay, 2000). En los medios de cultivo forman colonias pequeñas, enteras, convexas, puntiforme, blancas-grisáceas, son catalasa negativo, no esporulados, no móviles, Las células microbianas son en forma de barras, de forma regular ubicada en cadenas paralelas, no esporas, de espesor medio y longitud diferente  $2 > < 3-5 \mu\text{m}$ , su temperatura de crecimiento óptima es 37 ° C, se multiplica también a 45 ° C, pero no crece a 15 ° C y su pH óptimo es de 6.5. (Mikelsaar y col., 2002). Sus características morfológicas se muestran en la figura 6,7 y 8.

Es capaz de fermentar la D-ribosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, D-lactosa, D- maltosa, D-melibiosa, D-sacarosa y D-rafinosa. (Block, 2017) Se ha encontrado que algunas cepas de *Lactobacillus fermentum* tienen propiedades resistentes a ciertos antibióticos, otros estudios han demostrado que *Lactobacillus fermentum* es sensible a algunos antibióticos comunes, tales como gentamicina, cefazolina, penicilina, trimetoprim / sulfametoxazol, ampicilina, carbenicilina, eritromicina, amikacina, y cloranfenicol (Zeng y col., 2010). *L. fermentum* es tolerante al ácido gástrico y la bilis, sobrevive bien en el complejo y hostil entorno del estómago y del tracto intestinal de los animales y los humanos, lo cual es uno de los requisitos principales de funcionalidad probiótico, tiene una supervivencia en el fluido gástrico del 93% al 95% y tiene gran capacidad de supervivencia en condiciones de fluido simulados, muestran una serie de rasgos probióticos y funcionales como hidrofobicidad de la superficie celular, la adhesión a las proteínas de la superficie celular, la actividad BSH, la reducción del colesterol, potencial antioxidante, produce lisozima, gas a partir

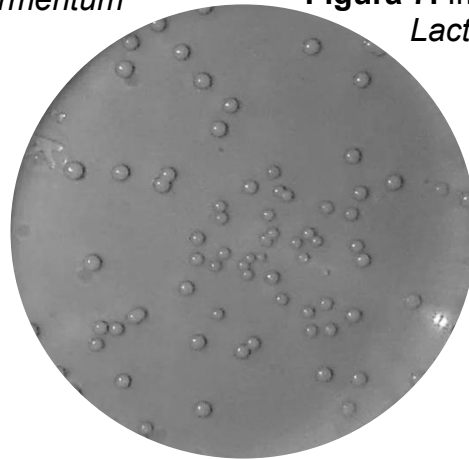
de glucosa,  $\text{NH}_3$  a partir de arginina, tiene actividad antimicrobiana contra varios patógenos gastrointestinales: *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*; *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y actividad moderada contra las cepas de *Helicobacter pylori*. ( Mikelsaar y col., 2002). Estas propiedades antimicrobianas se correlacionan con la producción de ácido láctico, ácido acético y ácido succínico.



**Figura 6.** *Lactobacillus fermentum*



**Figura 7.** Imagen micro-morfológica de *Lactobacillus fermentum*



**Figura 8.** Morfología colonial de *L. fermentum*

Las especies de este género se utilizan para una amplia variedad de aplicaciones, como la fermentación de alimentos y piensos, otra de sus aplicaciones es como agente farmacológico, *L. fermentum* ha mostrado ser segura y reducir el riesgo de infecciones del tracto urinario, vaginosis bacteriana y enfermedades de transmisión sexual causadas por *Neisseria gonorrhoeae* y *Chlamydia trachomatis* (Reid y Bocking, 2003)

## Capítulo VII. METODOLOGÍA

### 7.1 Reactivación y conservación de las cepas

Se emplearon las cepas *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21, proporcionadas por la colección de cultivos del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, las cepas se cultivaron en caldo MRS (Difco®) con un inóculo del 10% (v/v), a pH de  $6.4 \pm 0.2$ , a temperatura ambiente (30- 37°C) y se mantuvo con una agitación de 100 rpm durante 8 horas, después las cepas reactivadas se mantuvieron en refrigeración a 5°C, estas cepas fueron sembradas en agar MRS con el fin de verificar la pureza de los microorganismos mediante sus características morfológicas. Para la conservación de la cepa, se resembraron cada 15 días en tubos que contenían 9 mL de caldo MRS con un inóculo de 1mL, con el fin de mantener fresca y lista las cepas para su posterior uso.

### 7.2 Cinética de crecimiento de *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21 a nivel matraz

A fin de comparar las propiedades probióticas de las mono-cepas, se realizó la cinética de crecimiento de *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21, utilizando por cada monitoreo un matraz Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen de operación de 50 mL de caldo de cultivo MRS con su respectivo duplicado y un inóculo de la cepa correspondiente del 10% v/v para iniciar la fermentación (Crueger & Crueger, 1993), los matraces se sometieron a agitación constante durante 12h (agitación a 100 rpm) a una temperatura de 37°C, seguidamente se analizó la evolución del crecimiento bacteriano tomando muestra a distintos tiempos, midiendo densidad óptica (D.O) a 620 nm, cuenta viable en placa (UFC/mL), peso seco (g/L), cuantificación de azúcares reductores por el método de DNS y cuantificación de ácido láctico por acidez titulable. Los ensayos para la determinación de la curva de crecimiento para cada parámetro se realizaron por duplicado y con dichos datos se obtuvieron las desviaciones estándar para cada uno de los puntos de la curva de crecimiento y correlación existente entre D.O vs UFC/mL, D.O vs peso seco y peso seco vs UFC/mL de las bacterias en estudio.

Los cálculos de fermentación para las cinéticas son los definidos por Crueger & Crueger (1993) y Rodríguez y col. (2004). La velocidad específica de crecimiento definida por la ecuación tiempo de duplicación celular.

Ecuación 1. Velocidad específica de crecimiento

$$\mu = \frac{d \ln X}{dt}$$

Ecuación 2. Tiempo de duplicación

$$td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Ecuación 3. Eficiencia de conversión de sustrato

$$p = \frac{S_o - S_f}{S_o} X 100$$

Ecuación 4. Rendimiento de Biomasa / sustrato ( $Y_{x/s}$ )

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_o}{S_o - S_f}$$

Ecuación 5. Rendimiento de producto/sustrato ( $Y_{p/s}$ )

$$Y_{p/s} = \frac{P_{max} - P_o}{S_o - S_f}$$

Ecuación 6. Rendimiento de producto/Biomasa ( $Y_{p/x}$ )

$$Y_{p/x} = \frac{P_{max} - P_o}{X_f - X_o}$$



### **7.2.1 Medición del crecimiento mediante densidad óptica**

#### Fundamento

La turbidez se define por la Organización Internacional de Normalización (ISO), como la reducción de la transparencia de un líquido causada por la presencia de partículas no disueltas de material distinto al propio líquido. En un cultivo bacteriano, la luz es absorbida de manera directamente proporcional a la concentración de células que hay en el cultivo (Acebo D y Hernández A; 2012). Para evitar errores en la lectura, la D.O no deben ser mayor a 1, es ese caso es necesario realizar diluciones, para obtener un intervalo de lectura menor a 1 (Day & Underwood, 1989).

#### Metodología

Una muestra homogénea de caldo de cultivo fue evaluada cada 1.5 h aproximadamente, mediante su lectura a 620 nm en espectrofotómetro marca Cole-Parmer, modelo UV-2100. Cuando la turbidez del cultivo lo requerían las muestras fueron diluidas y la lectura obtenida fue posteriormente multiplicada por el factor de dilución respectivo. Previamente el equipo fue calibrado con el blanco (caldo MRS). Con los datos de la densidad óptica se construyó la curva de crecimiento.

### **7.2.2 Medición del crecimiento mediante siembra en placa**

#### Fundamento

La técnica se basa en contar las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que se desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra. (Camacho y col., 2009)

## Metodología

Para el recuento en placa se diluyó 0.5 mL del cultivo respectivo en 4.5 mL de agua peptonada y se realizaron diluciones decimales de ( $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^{-8}$ ); de cada dilución se sembró un volumen 100  $\mu$ L en placas de Petri con agar MRS, las cajas se incubaron a temperatura entre 30-37°C y se observaron a las 24 y 48 h. Se consideraron las placas de Petri con un recuento de UFC entre 30 y 300 colonias. El número de colonias se multiplicó por el inverso de la dilución y por 10 para así obtener los UFC/mL (Larana, 1981).

### **7.2.3 Medición del crecimiento mediante peso seco**

## Fundamento

La cantidad total de biomasa presente en una muestra puede medirse en términos de peso seco por unidad de volumen, ya sea como sólidos en suspensión totales (SST) o sólidos en suspensión volátiles (SSV). Las células se separan del líquido bien por centrifugación o por filtración. Se expresan en g.m.s/mL. (Arnáiz C y col., 2000)

## Metodología

Se determinó la concentración microbiana del inóculo por medio del método de peso seco celular (Pirt, 1975).

Una muestra de 40 mL de caldo de cultivo fue depositada en tubos Falcon y centrifugada a 4000 rpm a temperatura de 25°C, por un tiempo de 20 minutos, empleando una centrifuga marca HERMELE, modelo Z-326-K. Posteriormente se eliminó parte del sobrenadante de los tubos Falcon (parte del sobrenadante se guardó para su posterior uso en otras pruebas), dejando aproximadamente 5 mL de sobrenadante más el pellet, se agitaron los tubos en un vortex, para homogenizar la suspensión microbiana. La suspensión microbiana se depositó en su respectivo tubo de ensaye (a peso constante) se centrifugaron los tubos a 4000 rpm a temperatura de

25°C por un tiempo de 20 minutos y se decantaron para eliminar todo el sobrenadante, posteriormente se llevaron los tubos a la estufa, a una temperatura de 80°C por un tiempo promedio de 4 horas, hasta peso constante. Para calcular el peso seco en g/L se utilizó la siguiente formula.

$$\text{peso seco g/L} = \frac{(\text{Peso del tubo} + \text{Muestra seca}) - (\text{Peso inicial del tubo})}{\text{Volumen de la muestra}}$$

#### **7.2.4 Cuantificación de azúcares reductores por el método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)**

##### Fundamento

El método DNS es una técnica colorimétrica que emplea 3,5 - ácido dinitrosalicílico, determina la presencia de grupos carbónicos libres (C=O) de los azúcares reductores. El procedimiento se basa en una reacción redox para provocar la oxidación de los azúcares y al mismo tiempo su propia reducción endotérmica. Un mol de azúcar reacciona con un mol de ácido 3,5 dinitrosalicílico, dando lugar a una reacción estequiométrica que permite conocer la cantidad de azúcares reductores presentes en la muestra. (Miller G, 1959)

##### Preparación del reactivo DNS (James M. Lee, 1992)

Se disolvió 0.74 g de ácido 3.5 dinitrosalicílico y 1.39 g de NaOH en 100 mL de agua destilada en un vaso de precipitado, luego se agregó 21.61 g de tartrato de Na y K, 0.53 mL (0.57g) fenol y 0.58g metabisulfito de sodio.

Para valorar la solución de DNS se tituló 3 mL con fenolftaleína al 1% y HCl al 0.1 N. el gasto de HCl 0.1 N de ser entre 5-6 mL.

### Preparación de la curva patrón

Se utilizó una solución estándar de glucosa a diferentes concentraciones (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 g/L), se tomó 0.5 mL de cada muestra, se agregaron 1.5 mL del reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico). Con los datos de concentración de glucosa y su respectiva absorbancia se construyó una curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta.

### Preparación de la muestra

Se tomó 1 mL del sobrenadante que se guardó en la prueba de peso seco y dependiendo de la concentración se realizaron diluciones seriadas ( $1 \times 10^{-1}$  hasta  $1 \times 10^{-2}$ ) para que la concentración esté dentro del rango de la curva de calibración.

### Procedimiento

Se tomó 0.5 mL de muestra (solución de glucosa o muestra diluida), se colocó en un tubo de ensaye y se añadió 1.5 mL de solución DNS, se agitó para homogenizar la muestra, posteriormente se colocaron los tubos en baño de agua hirviendo durante 5 minutos, se enfrió en baño de hielo, después se adicionó 8 mL de agua destilada y se agitó, finalmente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Cole-Parmer, UV-2100 a 550 nm, frente al blanco preparado igualmente (James M. Lee, 1992). Las concentraciones de azúcares reductores presentes en las muestras se calcularon por la ecuación de la recta, obtenidos en la curva patrón y multiplicados por el factor de dilución.

## **7.2.5 Cuantificación de ácido láctico por el método de Acidez titulable**

### Fundamento

La titulación es un procedimiento cuantitativo analítico, que se basa en una reacción entre un analito y un reactivo patrón, conocido como valorante. La reacción tiene una

estequiometría conocida y reproducible. En una valoración, se determina el volumen (o masa) del valorante necesario para reaccionar de manera completa con el analito y se emplea dicho volumen para obtener la cantidad o concentración del analito (Harris D, 2001)

### Metodología

Se realizó una curva patrón empleando diferentes concentraciones de ácido láctico (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 y 20 g/L) para posteriormente determinar la concentración de ácido láctico en el caldo de cultivo, de acuerdo a la siguiente metodología.

Se tomó una alícuota de 10 mL del sobrenadante del caldo de cultivo y se depositó en un matraz Erlenmeyer, se le agregó 1mL del indicador fenolftaleína al 1% y posteriormente se tituló con solución NaOH 0.1 N, hasta la aparición de un color rosa. (Day R. y Underwood A, 1989)

La acidez en la muestra expresada como ácido láctico se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{Acidez g/L (ácido láctico)} = \frac{V \times N \times 90 \text{ g/L}}{M}$$

En donde:

V = Volumen de solución de NaOH gastado en la titulación de la muestra, en mL.

N = Normalidad de la solución de NaOH.

M = Volumen de la muestra, en mL

90 g/L =Equivalente del ácido láctico.

NOTA: 1 mL de NaOH 0.1 N es igual a 0.0090 g de ácido láctico.

## 7.2.6 Estequiometria de crecimiento bacteriano

### Fundamento

Estudia las relaciones aritméticas entre las masas o volúmenes de los reactantes y los productos en una reacción química llevada a cabo por los microorganismos.

Los cálculos estequiométricos permiten determinar las relaciones másicas y molares entre los reactantes y los productos finales en los procesos fermentativos, el crecimiento celular obedece a la ley de la conservación de la masa de LAVOISIER, 1785 argumentando que las sustancias químicas se combinan para formar otras, (Luna R, 1999)

### Planteamiento de la ecuación de crecimiento celular

Podemos escribir la siguiente ecuación para expresar el crecimiento celular.



Balance de **C**:  $w = c + d + e$

Balance de **H**:  $x + bg = c\alpha + dk + 2f$

Balance de **O**:  $y + 2a + bh = c\beta + dl + 2e + f$

Balance de **N**:  $z + bi = c\gamma + dm$

La biomasa es representada por la formula  $CH_\alpha O_\beta N_\gamma$  que es una reflexión de la composición de la biomasa microbiana. Los microorganismos contienen un amplio rango de elementos, Sin embargo 90 – 95 % de la biomasa puede estar constituida por 4 elementos mayores: C, H, O, N.

$C H_{1.79} O_{0.5} N_{0.20}$ , Puede ser usado como una formula general cuando el análisis de composición bacteriana no es disponible.

### **7.3 Resistencia gastrointestinal**

#### Fundamento

Las pruebas de acidez gástricas son imprescindibles para la determinación de actividad probiótica de los microorganismos. El pH del estómago es de 1.5 y según Chou y Weimer (1999) el tiempo promedio de tránsito del alimento, desde que entra hasta que sale del estómago, es de 90 minutos. En las pruebas de resistencia gastrointestinal, los microorganismos susceptibles de ser catalogados como probióticos deben verificar que estos sean capaces de resistir estas condiciones sin perder viabilidad (González y González-Martínez, 2006).

#### Preparación de soluciones para la simulación gastrointestinal

Para la resistencia gastrointestinal se preparó la solución de pepsina (1:10,000, 155, HYCEL)

- Se disolvió 0.26g/L de pepsina en agua destilada ajustando el pH a 1.9 con una solución de HCl (0.1N) y se esterilizo por filtración de membranas.

Para la preparación de los jugos intestinales se utilizó una solución de sales biliares (extractos biliares, 305-D, DIBICO) y pancreatina 4X (Porcino, 608, HYCEL).

- Se disolvió 3g/L de sales biliares disolviendo el polvo en agua destilada y se esterilizo por filtración.
- Se preparan una solución buffer de fosfato de sodio 0.25 M a pH 7.5.
- Para la preparación de la solución pancreática, se preparó disolviendo la pancreatina disolviendo en una solución buffer de fosfato de sodio estéril al 0.02M y pH 7.5, teniendo una concentración final de 1.95 g/L, la solución se esterilizo por filtración.

Todas las soluciones se prepararon al momento de realizar la prueba.

## Metodología

Se evaluó la resistencia gastrointestinal, de acuerdo a Picot y Lacroix (2004), se utilizó un matraz Erlenmeyer con 100 mL de caldo MRS con un inóculo del 10 % de la respectiva cepa y se incubó a 37°C , 80 rpm durante 8 horas, pasado el tiempo se cosecho aproximadamente 1g de biomasa, se colocó el cultivo en tubos Falcon estéril y se centrifugó a 4000 rpm a 4°C por un tiempo de 20 minutos y se eliminó el sobrenadante, se lavó dos veces el pellet con una solución salina al 0.9%, y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones antes mencionadas y se incubó a 37°C por 48 horas.

### Primera etapa

El pellet se suspendió en tubos falcón con 9 mL de pepsina (0.26g/L, pH 1.9) se tomó una muestra de 0.5 mL de la suspensión bacteriana para realizar diluciones seriadas en 4.5 mL de agua peptona y se realizó cuenta en placa para determinar las células viables (tiempo cero).

### Segunda etapa

La suspensión bacteriana se incubó durante 1 hora a 37°C a 80 rpm, después de ese tiempo, se ajustó el pH a 7.5 con una solución de NaOH al 1 N, y nuevamente se retiró 0.5 mL de muestra para realizar cuenta en placa y se incubó a 37°C por 48 horas.

### Tercera etapa

Seguidamente se adicionó 1.2 mL de solución buffer de fosfato de sodio (0.25 M, pH 7.5) y 2 mL de solución de sales biliares, se ajustó el pH a 7.5 con una solución de NaOH al 1N y llevo a un volumen de 14 mL con agua destilada estéril, finalmente se agregó un 1 mL de solución de pancreatina (1.95 g/L) y se incubó a durante un tiempo de 6 horas, al finalizar el tiempo se tomó 0.5 mL de la suspensión bacteriana y se



realizó cuenta en placa y se incubo a 37°C por 48 horas. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Para determinar el porcentaje de supervivencia de las cepas se emplearon las siguientes ecuaciones.

Ecuación 7. Porcentaje de simulación gástrica

$$(\%) = \frac{\text{Log UFC G}}{\text{Log UFC N0}} \times 100$$

Donde G representa el final de la etapa gástrica (etapa 2) y N0 representa los UFC iniciales (etapa 1)

Ecuación 8. Porcentaje de resistencia a simulación intestinal

$$(\%) = \frac{\text{Log UFC I}}{\text{Log UFC G}} \times 100$$

Donde I representa porcentaje de células al final de la etapa intestinal (etapa 3) y G representa el final de la etapa gástrica (etapa 2)

Ecuación 9. Porcentaje de resistencia a simulación gastrointestinal (simulación global)

$$(\%) = \frac{\text{Log UFC N1}}{\text{Log UFC N0}} \times 100$$

Donde N1 representa el porcentaje total de células viables al final de la etapa intestinal (etapa 3) y N0 representa el número inicial de las BAL (etapa 1)

## Capítulo VIII. Resultados y discusiones

### 8.1 Cinética de *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21 a nivel matraz

Se realizó la cinética de crecimiento de las cepas *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21 cultivadas en medio MRS, esta nos permitió evaluar la capacidad de crecimiento y producción de ácido láctico de cada una de las cepas, aspectos de suma importancia en la selección de cepas de posible actividad probiótica.

#### 8.1.1 Medición del crecimiento mediante densidad óptica

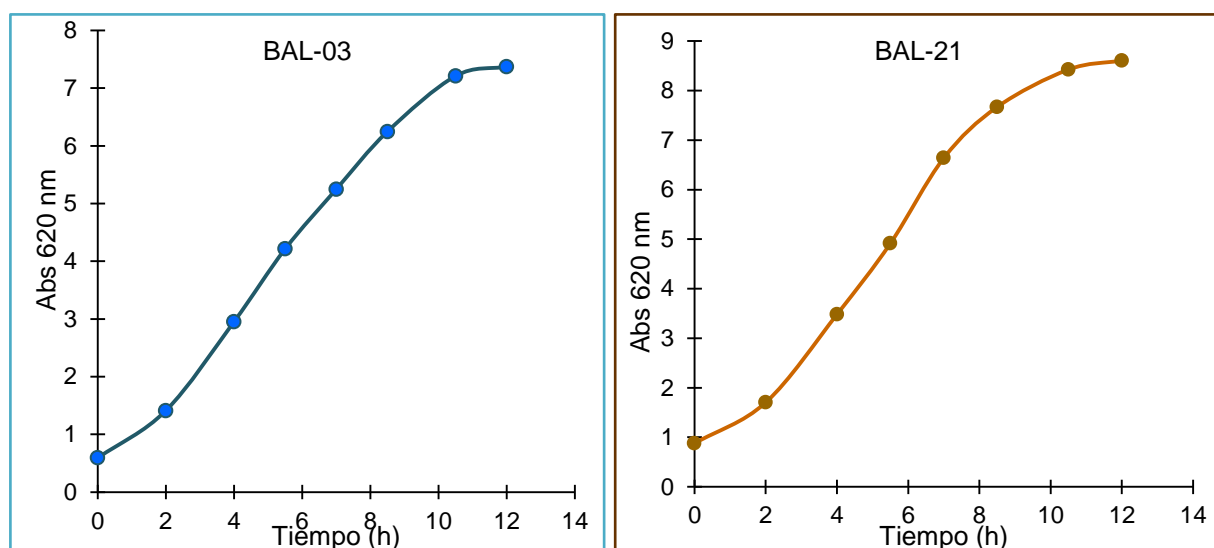
Se evaluó el crecimiento celular mediante la densidad óptica ( $D.O_{620}$ ) de las cepas. En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de la absorbancia multiplicadas por el factor de dilución para obtener el valor real de la turbidez del cultivo de cada una de las cepas.

**Tabla 3.** Resultados de densidad óptica a 620 nm de BAL-03 y BAL-21

Tiempo (h)	Densidad óptica ( $D.O_{620}$ )	
	BAL-03	BAL-21
0	0.592±0.011	0.8775±0.017
2	1.4125±0.023	1.7035±0.005
4	2.953±0.021	3.481±0.008
5.5	4.21375±0.010	4.914±0.002
7	5.248±0.010	6.638±0.004
8.5	6.246±0.007	7.67±0.013
10.5	7.21±0.009	8.425±0.005
12	7.3725±0.003	8.6075±0.013

Los resultados se expresan como medias,  $\pm$  es el error estándar de las medias; cada punto de datos es el promedio de dos réplicas de manera independiente y cada replica por duplicado.

*L. plantarum* BAL-03 alcanzó una biomasa microbiana máxima expresada en valores de densidad óptica a 620nm de  $7.377.3725 \pm 0.003$  y para *L. fermentum* BAL-21 fue de  $8.6075 \pm 0.013$  ambas obtenidas a las 12 horas de fermentación, los resultados obtenidos evidencian un ligero incremento significativo en los valores de densidad óptica de BAL-21 en comparación de BAL-03 en todos los tiempos de monitoreo, aunque *L. fermentum* es una bacteria heterofermentativa estricta, a diferencia de *L. plantarum* que presenta un comportamiento homofermentativo, tiende a tener una mejor capacidad metabólica (Agudelo y col., 2010;), y una mejor adaptación en medios abundantes en nutrientes y fuentes energéticas (Georgieva y col., 2009) .



**Figura 9.** Curva de D.O en medio MRS de *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21.

Los resultados reportados en la figura 9 muestran el comportamiento de la concentración de biomasa, durante las 12 horas de fermentación de cada una de las cepas estudiadas. Independientemente de que la cepa BAL-21 haya presentado mayor absorbancia, se observa que a las 10.5 horas la curva de BAL-03 se aproxima a la fase estacionaria y para *L. fermentum* esta fase comienza desde las 8.5 horas, esto nos indica que existe una mejor adaptación de BAL-03 en el medio de cultivo, el incremento de la densidad óptica de BAL-21 puede deberse a la presencia de algunos metabolitos que generan mayor turbidez en el caldo de cultivo, debido a que la densidad óptica al

ser un método indirecto, mide tanto las células viables como las no viables, estos absorben una longitud de onda específica y como resultado dan el valor de la densidad óptica. (Acebo D y Hernández A; 2012).

### 8.1.2 Medición del crecimiento mediante siembra en placa

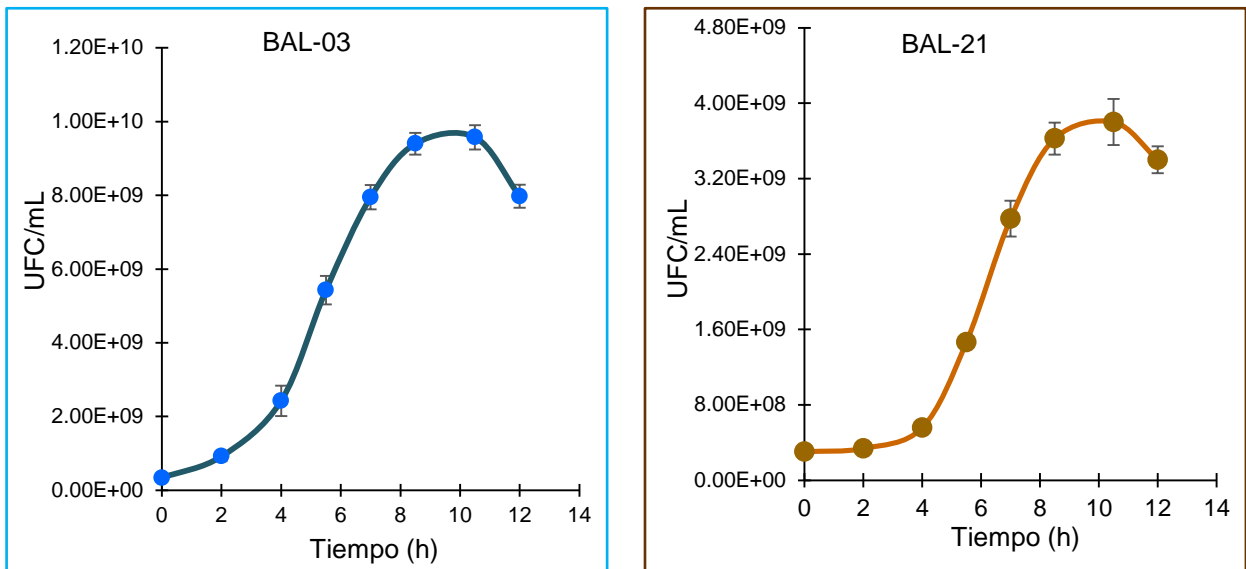
Se avaluó el crecimiento de *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21 mediante cuenta viable, esto nos permitió establecer el número de microorganismos presentes en la muestra, en la tabla 4 se muestra los datos de crecimiento de células viables (UFC/mL), en el cultivo a lo largo del tiempo y sus respectivos datos a escala logarítmica de cada cepa.

**Tabla 4.** Resultados de cuenta viable (UFC/mL) de BAL-03 y BAL-21

Tiempo (h)	BAL-03		BAL-21	
	UFC/mL	Ln X	UFC/mL	Ln x
0	3.38E+08±3.50E+07	19.63707607	3.03E+08±1.89E+07	19.52759184
2	9.20E+08±1.30E+08	20.63988423	3.38E+08±1.50E+07	19.63707607
4	2.43E+09±4.11E+08	21.60909736	5.58E+08±2.22E+07	20.13897306
5.5	5.43E+09±3.86E+08	22.41428374	1.47E+09±5.97E+07	21.10512108
7	7.95E+09±3.32E+08	22.79643777	3.03E+09±1.89E+08	21.83017693
8.5	9.40E+09±2.94E+08	22.96397553	4.05E+09±1.71E+08	22.12198272
10.5	9.58E+09±3.30E+08	22.79957749	3.80E+09±2.45E+08	22.0582669
12	7.98E+09±3.10E+08	22.80020425	3.10E+09±1.41E+08	21.85466795

Los resultados se expresan como medias, ± es el error estándar de las medias; cada punto de datos es el promedio de dos réplicas de manera independiente y cada replica por duplicado.

En la tabla 4 se muestran el conteo de UFC, que complementan las curvas de crecimiento. Se observa que la población inicial de *L. plantarum* BAL-03 presente en el caldo de cultivo fue de  $3.38 \times 10^8 \pm 3.50 \times 10^7$  UFC/mL y para *L. fermentum* BAL-21 fue de  $3.03 \times 10^8 \pm 1.89 \times 10^7$  UFC/mL, ambas cepas iniciaron la cinética con altos valores de células viables, característica de suma importancia para la selección de microorganismos probióticos.

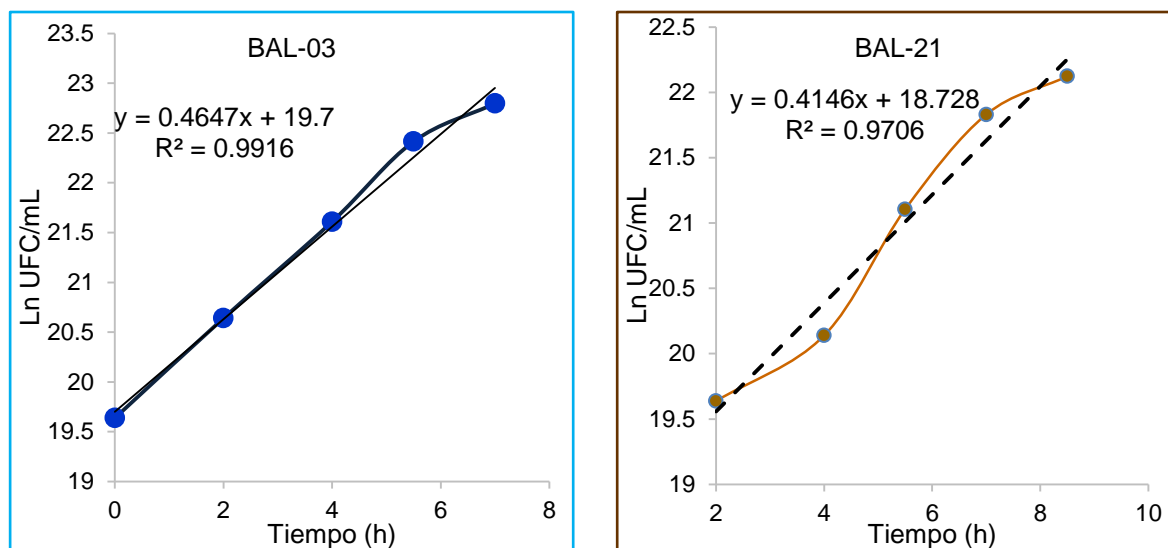


**Figura 10.** Curvas de crecimiento de *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21 (UFC/mL) en función del tiempo

En la figura 10 se puede observar las diferentes fases cinéticas de las cepas estudiadas, para BAL-03 en la gráfica no es posible observar una fase clara de adaptación (fase lag), es probable que sea una fase corta producida en los primeros minutos de fermentación, es casi nula, debido al tamaño de su genoma que es de 50% más grande que la mayoría de BAL, su capacidad metabólica le permite utilizar una gran variedad de fuentes de carbono (Ljungh & Wadstrom, 2009) tiene una mayor capacidad de establecerse y multiplicarse, también la cantidad de inóculo del 10% reduce el tiempo de lactancia (Soto y col., 2006), empezando su fase log desde la hora 0 y se mantiene en ella hasta las 7 horas, alcanzando la fase estacionaria desde las 7 hasta las 10.5 horas aproximadamente y finalmente la fase de muerte celular se presentó después de las 10 horas hasta las 12 horas, la curva de crecimiento de BAL-21 tiene una primera fase de adaptación, en la cual los microorganismos, adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones del cultivo, su fase lag corresponde a las primeras 2 horas de fermentación, esta es más prolongada, debido a que es más exigente referente a sus condiciones nutrimentales, inició su fase exponencial desde las 2 horas hasta las 8.5 horas de fermentación, en la cual las BAL consumieron a

velocidad máxima los nutrientes del medio, posteriormente inician su fase estacionaria de las 8.5 horas hasta las 10.5 horas en donde aún se ve aumento significativo de las bacterias y finalmente la fase de muerte celular, que se presentó desde las 10.5 hasta las 12 horas.

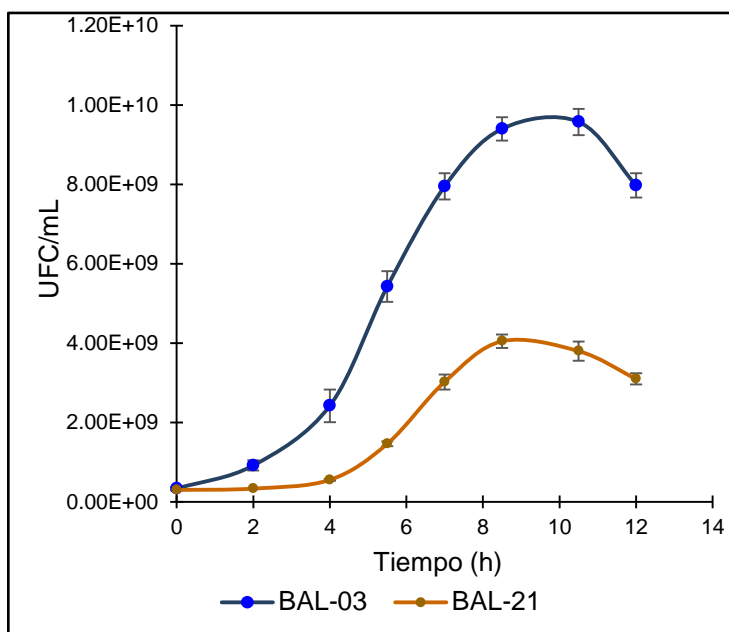
Datos reportados por Mendoza C. (2015) quien realizó cinéticas de cada una de las BAL empleando matraces Erlenmeyer con 150 mL de MRS a 36°C y 120 rpm durante 12 horas, para *L. plantarum* su fase exponencial corresponde desde las 2 hasta las 9 horas de fermentación y para *L. fermentum* corresponde desde las 5 hasta las 11 horas de fermentación.



**Figura 11.** Curva de Ln de UFC/mL vs tiempo

En la figura 11 se expresa la gráfica lineal de cada cepa, donde podemos observar la fase exponencial, en esta fase las células se reproducen sin limitación de sustancias nutritivas a velocidad máxima ( $\mu$ ), estas cepas pueden multiplicarse rápidamente en caldo MRS debido a que su formulación permite el adecuado desarrollo de *Lactobacillus* y otras bacterias lácticas (De Man J, Rogosa M y Sharpe M, 1960). Para BAL-03 la velocidad específica ( $\mu$ ) corresponde a  $\mu = 0.46 \text{ h}^{-1}$  (Ecuación 1), con  $t_d = 1.50 \text{ h}$  (ecuación 2). Estudios realizados por Agudelo C y col. (2010), para una cepa de *L. plantarum* A6 reportan una  $\mu = 0.53 \text{ h}^{-1}$ ; Mendoza C. (2015) reporta una velocidad

específica de crecimiento de  $0.50 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de  $1.40 \pm 0.01 \text{ h}$ . Para la cepa BAL-21 la velocidad específica ( $\mu$ ) durante su fase exponencial corresponde a  $\mu = 0.41 \text{ h}^{-1}$  y con un  $t_d = 1.69 \text{ h}$ . Experimentos realizados para *Lactobacillus fermentum* se han encontrado velocidades específicas de crecimiento de  $0.72\text{-}0.81 \text{ h}^{-1}$  con tiempos de duplicación de  $0.92\text{-}0.85 \text{ h}$  (Vrancken y col.,2009). Esta velocidad depende de la concentración de nutrientes, así a altas concentraciones la velocidad específica alcanza valores máximos fijados por la cinética intrínseca de las reacciones intracelulares (Orozco M y Solarte J, 2003), y se mide por los cambios a través del tiempo de las concentraciones de la biomasa de microorganismos, del sustrato y los ácidos de los productos.



**Figura 12.** Comparación del crecimiento de BAL-03 y BAL-21 (UFC/mL) en función del tiempo

En la figura 12 se presenta el crecimiento de la población celular de las diferentes cepas aisladas de la taberna, ambas cepas se mantuvieron bajo las mismas condiciones de cultivo, sin embargo *Lactobacillus plantarum* BAL-03 se caracterizó por tener una mejor adaptación a las condiciones del cultivo, logrando un mayor crecimiento celular. La capacidad de crecimiento de las cepas seleccionadas alcanzó altos valores, propiedad que debe caracterizar a las cepas probióticas, ya que deben presentarse en cantidades suficientes para llegar al TGI y ser capaces de establecerse para lograr una

buena colonización de la mucosa y el contenido intestinal (Salminen y col., 1996). Las bacterias del genero *Lactobacillus*, han sido las más utilizadas hasta el momento para la obtención de biopreparados con propiedades probióticas, ya sea de forma individual o en combinación con otros microorganismos y/o metabolitos (Salminen y col., 1993; Sobel, 1999; Vinderola y Reinheimer, 2003; Pennacchia, 2004). La cepa BAL-03 tuvo una concentración bacteriana para de  $7.95 \times 10^9 \pm 3.32 \times 10^8$  UFC/mL (9.90 log UFC/mL) y BAL-21 una concentración de  $4.05 \times 10^9 \pm 1.71 \times 10^8$  UFC/mL (9.60 log UFC/mL), al finalizar su fase exponencial, ambas cepas mantienen una viabilidad alta en el tiempo, puesto que el nivel de bacterias mínimas para ser consideradas como probióticos debe ser  $10^6$  UFC/mL y otros señalan que debe tener una cantidad necesaria para que se ingiera una cantidad de  $10^9$  UFC/mL (Ouwehand y col., 2002). En investigaciones realizadas por Siragusa *et al.* (2014) para la cepa de *Lactobacillus plantarum* reportaron densidades poblacionales que van de 9.45-9.60 log UFC/mL y para *L. fermentum* se han encontrando densidades poblacionales de 9.2-9.4 log UFC/mL (Vrancken y col., 2009).

### 8.1.3 Medición del crecimiento mediante peso seco

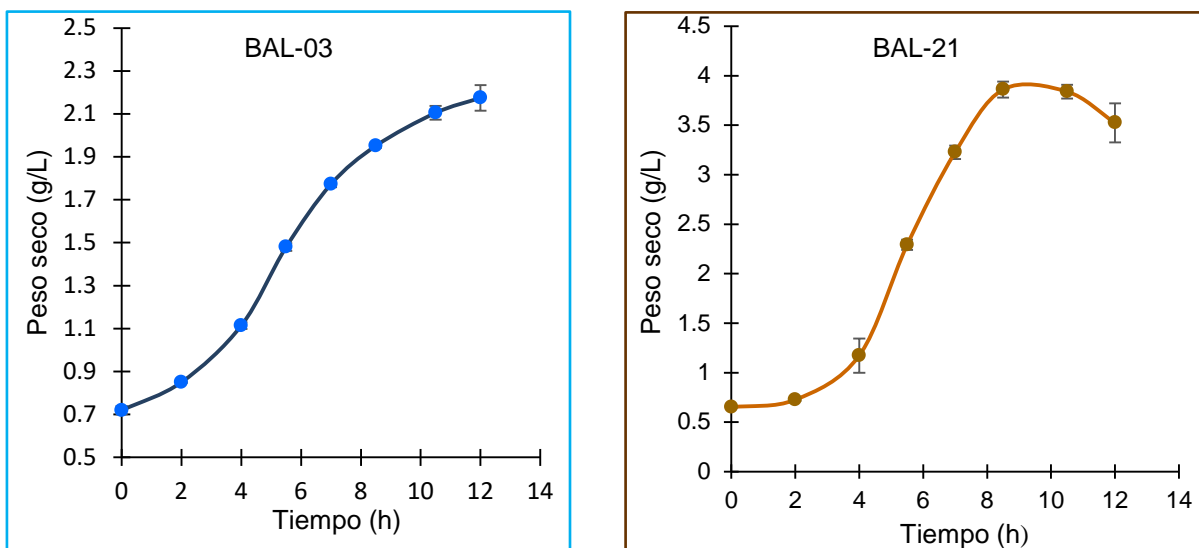
Se determinó la concentración de la Biomasa mediante el peso seco expresado en g/L para cada una de las cepas, en la tabla 5 se muestran los datos obtenidos de peso seco durante la cinética.

**Tabla 5.** Resultados de peso seco (g/L) de BAL-03 y BAL-21

Tiempo (h)	BAL-03	BAL-21
	Peso seco (g/L)	Peso seco (g/L)
0	0.71875±0.019	0.65±0.003
2	0.85±0.003	0.72625±0.012
4	1.11375±0.015	1.1725±0.173
5.5	1.48±0.017	2.29125±0.051
7	1.7725±0.014	3.22625±0.068
8.5	1.95125±0.008	3.86±0.081
10.5	2.105±0.031	3.83875±0.068
12	2.175±0.060	3.52375±0.196

Los resultados se expresan como medias, ± es el error estándar de las medias; cada punto de datos es el promedio de dos réplicas de manera independiente y cada replica por duplicado.





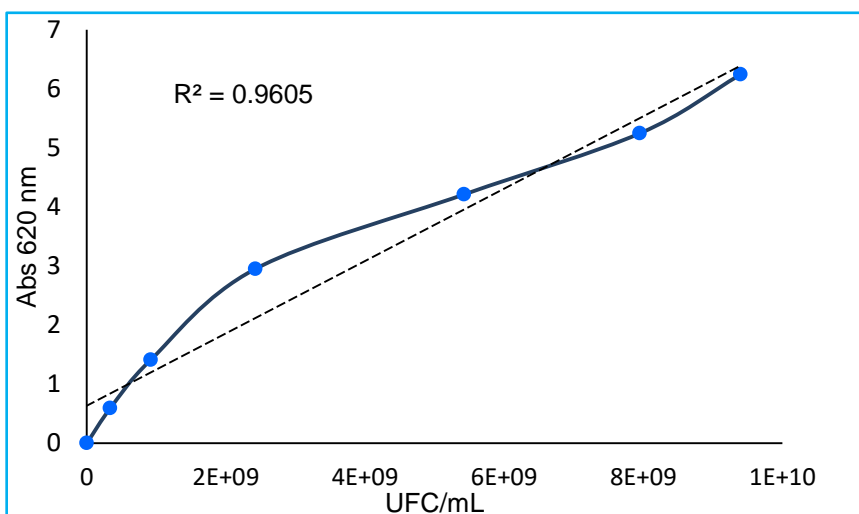
**Figura 13.** Peso seco de BAL-03 y BAL-21 en función del tiempo

La figura 13 muestra los estudios cinéticos de crecimiento de biomasa de cada cepa, para BAL-03 no se observa con claridad una fase de lactancia, coincidiendo con la curva de UFC/mL, el cultivo paso directamente a la fase de crecimiento exponencial, el tiempo en que se obtuvo la mayor concentración de biomasa fue a las 12 horas con 2.175 g/L. Valdemar y *col.* (2000) reportan una concentración de biomasa final de 2.2 g/L para *L. plantarum* realizado en un fermentador (New Brunswick Cientific, Bioflo modelo 2000) con un volumen de 35 L del medio de cultivo, con agitación de 150 rpm, temperatura de  $35 \pm 0,1$  ° C, aireación de 0,7 vvm (L de aire / L de medio / min) y tiempo de cultivo de 24 horas, en medio MRS, llevando a cabo el peso seco a una temperatura de 105°C. Para BAL-21 podemos observar una fase de latente un poco prolongada, coincidiendo con la curva de UFC/mL, la cepa BAL-21 tiene mayor cantidad de biomasa seca, con un peso seco total de  $3.52375 \pm 0.196$  g/L y para BAL-03 un peso seco total de  $2.175 \pm 0.060$  g/L, esto concuerda con los resultados de la D.O donde BAL-21 tiene mayor absorbancia, esto se debe a que la principal desventaja de estas técnicas es que su determinación incluye no sólo microorganismos activos sino microorganismos muertos, material inerte, polímeros extracelulares y materia orgánica adsorbida.

### 8.1.4 Curvas de correlación para determinación de biomasa

Uno de los propósitos de este trabajo fue encontrar un método que reemplace el método de recuento en placa por un método más práctico. Para esto, se determinaron las UFC/ml en cada punto con el fin de correlacionarlos con una medida directa que indique las células viables. La correlación permite estimar los datos del método microbiológico, en medidas de absorbancia y peso seco, estas pueden incluirse en ecuaciones cinéticas que describen el proceso.

#### 8.1.4.1 Curvas de correlación para BAL-03

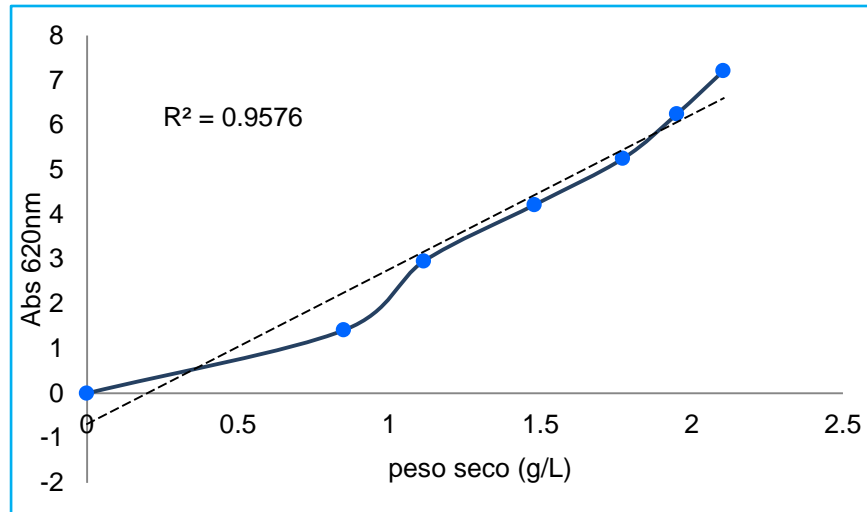


**Figura 14.** Curva de correlación entre Absorbancia y UFC/mL de BAL-03

La ecuación de la línea de mejor ajuste es:

$$Y_{\text{abs}} = 6E-10_{\text{abs/UFC.mL}^{-1}} X_{\text{UFC/mL}} + 0.6351$$

Utilizando esta ecuación puede determinarse, mediante medidas de absorbancia, el número de unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL). Así por ejemplo, para un cultivo con una absorbancia de 2.953 le correspondería  $3.8581 \times 10^9$  UFC/mL, de acuerdo a los datos obtenidos a esa absorbancia se obtuvo  $2.43 \times 10^9$  UFC/mL.

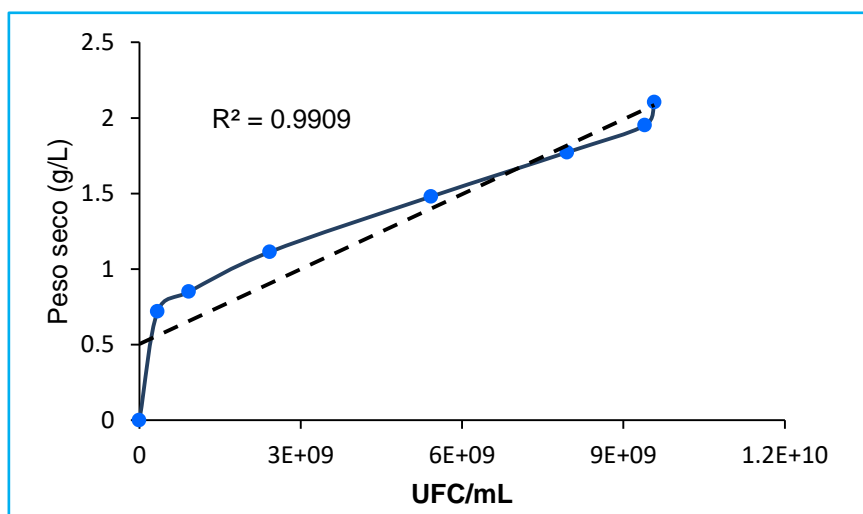


**Figura 15.** Curva de correlación entre Abs y Peso seco BAL-03

La ecuación de la línea de mejor ajuste es:

$$Y_{\text{abs}} = 3.4613 \text{ abs/g.L-1 } X_{\text{g/L}} - 0.6874$$

Utilizando esta ecuación puede determinarse, mediante medidas de absorbancia, los g/L de biomasa seca. Así por ejemplo, para un cultivo con una absorbancia de 2.953 le correspondería 1.0517 g/L, de acuerdo a los datos obtenidos a esa absorbancia se obtuvo 1.11375 g/L.



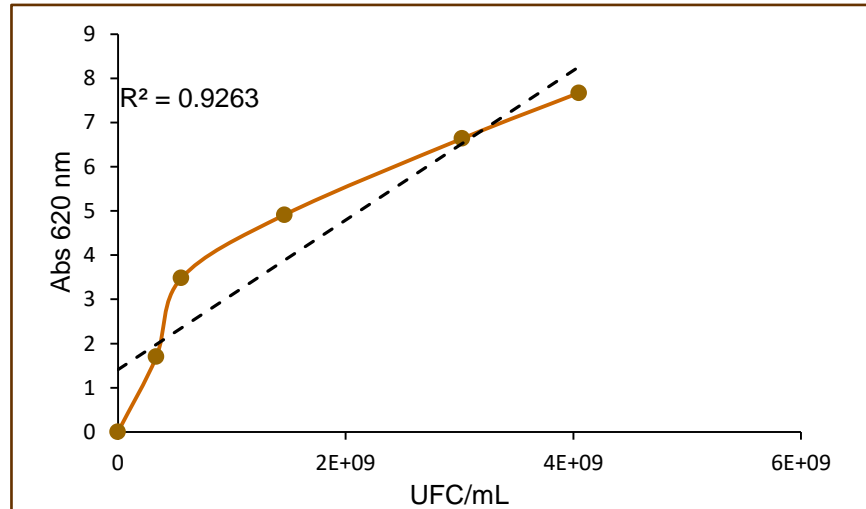
**Figura 16.** Curva de correlación entre Peso seco y UFC/mL de BAL-03

La ecuación de la línea de mejor ajuste es:

$$Y_{\text{g/L}} = 1 \times 10^{-10} \text{ g.L-1/UFC.mL-1 } X_{\text{UFC/mL}} + 0.7205$$

Utilizando esta ecuación puede determinarse, mediante medidas de peso seco, los UFC/mL. Así por ejemplo, para un cultivo con una peso seco de 1.11375 g/L le correspondería  $3.9325 \times 10^9$ , de acuerdo a los datos obtenidos a peso seco se obtuvo  $2.43 \times 10^9$  UFC/mL.

#### 8.1.4.2 Curvas de correlación para BAL-21

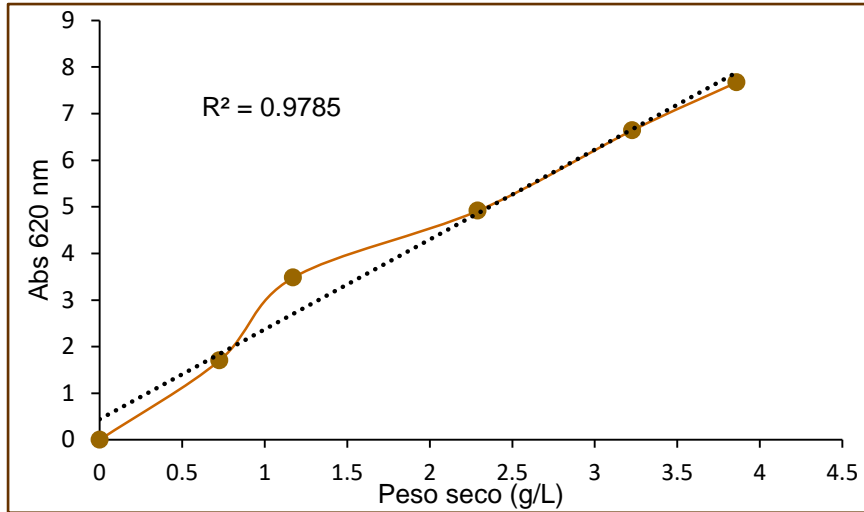


**Figura 17.** Curva de correlación entre Absorbancia y UFC/mL de BAL-21

La ecuación de la línea de mejor ajuste es:

$$Y_{\text{abs}} = 1 \times 10^{-9} \text{ abs//UFC.mL}^{-1} X_{\text{UFC/mL}} + 2.1746$$

Utilizando esta ecuación puede determinarse, mediante medidas de absorbancia, los UFC/mL. Así por ejemplo, para un cultivo con una absorbancia 3.481 le correspondería  $13.064 \times 10^8$  de acuerdo a los datos obtenidos a UFC/mL se obtuvo  $5.58 \times 10^8$  UFC/mL. Esto es debido a que la gráfica no está del todo lineal porque presenta una  $R^2$  0.9263.

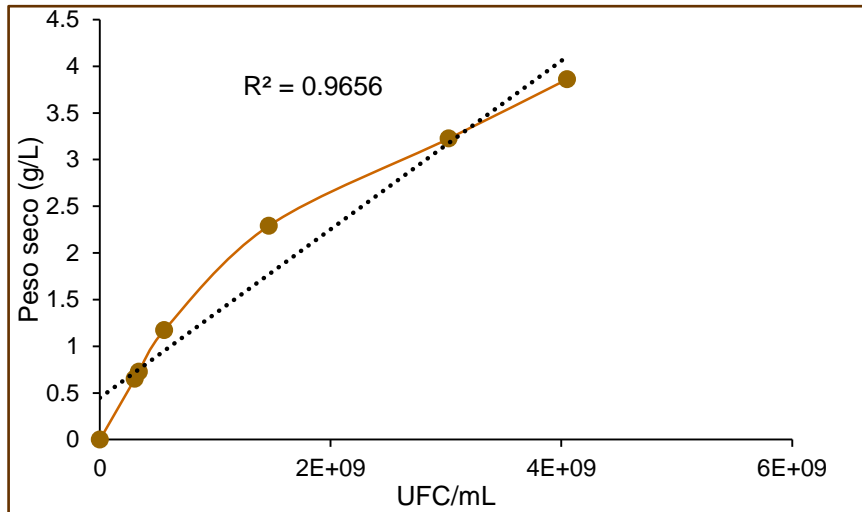


**Figura 18.** Curva de correlación entre Abs y Peso seco  
BAL-21

La ecuación de la línea de mejor ajuste es:

$$Y_{\text{abs}} = 1.7863 \text{ abs/g.L-1 } X_{\text{g/L}} + 0.8527$$

Utilizando esta ecuación puede determinarse, mediante medidas de absorbancia, el peso seco (g/L). Así por ejemplo, para un cultivo con una absorbancia 3.481 le correspondería 1.4713 g/L de acuerdo a los datos obtenidos a peso seco se obtuvo 1.1735 g/L.



**Figura 19.** Curva de correlación entre Peso seco y UFC/mL de BAL-21

La ecuación de la línea de mejor ajuste es

$$Y_{g/L} = 8 \times 10^{-10} \text{ g.L-1/UFC.mL-1 } X_{UFC/mL} + 0.7249$$

Utilizando esta ecuación puede determinarse, mediante los g/L de biomasa seca. Así por ejemplo, para un cultivo con una peso seco de 1.1725 g/L le correspondería  $5.595 \times 10^8$  UFC/mL de acuerdo a los datos obtenidos a peso seco se obtuvo  $5.58 \times 10^8$  UFC/mL.

### 8.1.5 Cuantificación de Azúcares por método de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)

Tabla 6. Curva patrón de Azúcares reductores

Glucosa g/L	Abs 550nm
0	0.0
0.2	0.044±0.001
0.4	0.173±0.001
0.6	0.298±0.0009
0.8	0.421±0.002
1	0.57±0.004

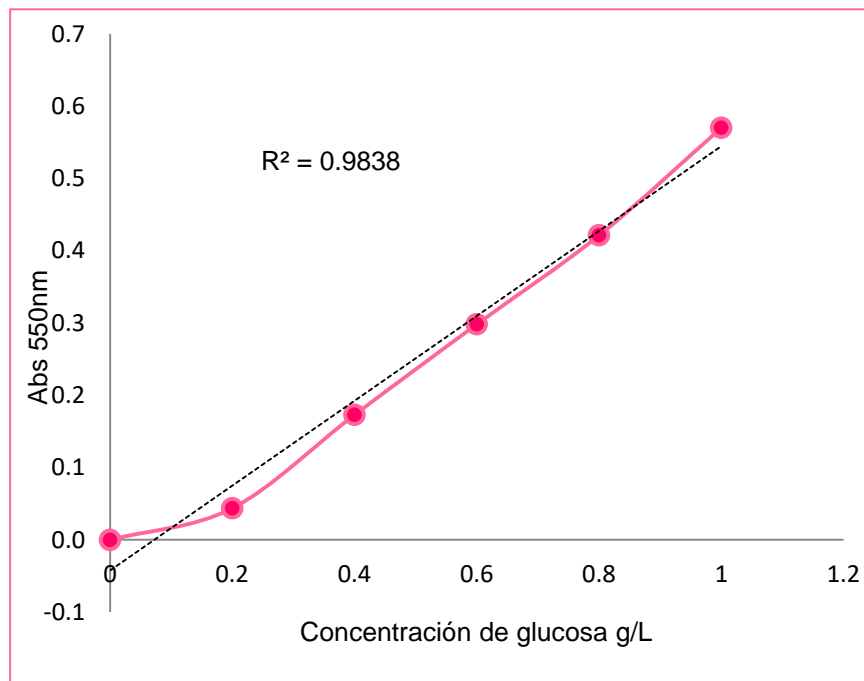


Figura 20. Curva patrón de Azúcares reductores

De acuerdo a la figura 20, la ecuación de la línea de mejor ajuste es:

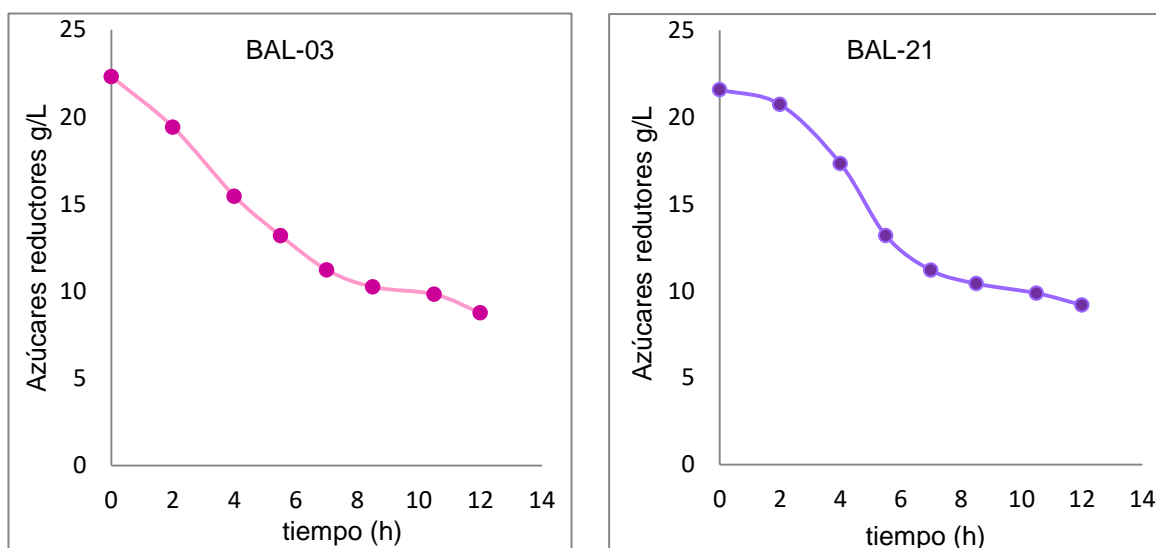
$$Y_{\text{abs}} = 0.5868 \text{ abs/g.L}^{-1} X_{\text{g/L}} - 0.0424$$



**Tabla 7.** Datos de azúcares reductores de BAL-03 y BAL-21

tiempo (h)	BAL-03		BAL-21	
	Abs	Azúcares reductores g/L	Abs	Azúcares reductores g/L
0	0.0885±0.005	22.30743013	0.08425±0.003	21.58316
2	0.0715±0.007	19.41036128	0.07925±0.002	20.73108
4	0.04825±0.002	15.44819359	0.05925±0.016	17.32277
5.5	0.035±0.003	13.19018405	0.035±0.004	13.19018
7	0.0235±0.002	11.23040218	0.02325±0.003	11.1878
8.5	0.01775±0.002	10.25051125	0.01875±0.002	10.42093
10.5	0.01525±0.001	9.824471711	0.0155±0.002	9.867076
12	0.009±0.001	8.75937287	0.0115±0.002	9.185412

Los resultados se expresan como medias, ± es el error estándar de las medias; cada punto de datos es el promedio de dos réplicas de manera independiente.



**Figura 21.** Curva de consumo de sustrato de BAL-03 y BAL-21

El cultivo se llevó a cabo en caldo MRS con un contenido de glucosa total de 20 g/L, al evaluar la cantidad de azúcares totales al caldo MRS dio una concentración de 23.926 g/L, esto puede deberse a que ciertos compuestos como la proteosa peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura nitrógeno y carbono (De Man J, Rogosa M y Sharpe M, 1960), aumenta la cantidad de azúcares del medio.

Los resultados reportados en la figura 21 en cuanto al consumo de sustrato durante el proceso de fermentación para las dos cepas, demostraron que hubo un buen consumo de la fuente de carbono, esto evidenciado por la velocidad de crecimiento, en el cual el número de células se multiplica a la misma velocidad, se puede observar que *L. plantarum* BAL-03 consumió alrededor del 53.06 % de la fuente energética disponible, en la fase exponencial y al finalizar el proceso fermentativo hubo un consumo total (eficiencia de sustrato) de 63.39%, el azúcar total en el medio presento valores de 8.759 g/L a las 12 horas de efectuada la cinética, algunos autores reportan un consumo de sustrato desde 8.90 hasta 10.8 g/L (Gámez y col., 2013). *L. plantarum* permite el empleo de una gran cantidad de fuentes de carbono, propiedad de los genes involucrados en el transporte y utilización de azúcar produciendo principalmente ácido láctico (Agudelo y col., 2010). El rendimiento de biomasa respecto al sustrato  $Y_{x/s}$  fue de  $0.096 \text{ gg}^{-1}$  este rendimiento obtenido es muy cercano a los reportados por algunos autores quienes obtuvieron en experimentos rendimientos desde  $0.143 \text{ gg}^{-1}$  tras 48 horas de fermentación en medio MRS (Georgieva y col., 2009).

Para la cepa BAL-21, en las primeras cuatro horas de fermentación los microorganismos consumieron el 27.59 % de la fuente energética disponible, en la fase exponencial, aprovecharon alrededor del 56.44% de los azúcares totales y al finalizar el proceso fermentativo hubo un consumo total de 61.60%. La determinación de azúcar total, permitió determinar el consumo para el crecimiento de los microorganismos y establecer la relación de consumo/crecimiento celular. Mendoza C. (2015) reporta una eficiencia de sustrato para *L. fermentum* de  $98.30 \pm 1.01$  hasta  $51.98 \pm 6.09\%$  en diferentes tratamientos en el caldo MRS modificando el pH inicial, inulina y Tween-80. El rendimiento de biomasa/ sustrato fue de  $0.2376 \text{ gg}^{-1}$ , cabe destacar que la mayor parte del consumo del sustrato está dirigido al crecimiento celular consecuentemente con la producción de ácido láctico, sin embargo tanto *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21 también utilizan la fuente de carbono para sintetizar otro tipo de productos como exopolisacáridos durante la fase estacionaria y de crecimiento, los cuales contribuyen a la viscosidad, textura y propiedades reológicas deseables del cultivo fermentado.

### 8.1.6 Cuantificación de ácido láctico por acidez titulable

Tabla 8. Curva patrón de ácido láctico

ácido láctico g/L	mL NaOH
0	0
2.5	2.6±0.14
5	4.6±0.14
7.5	6.85±0.07
10	9.4±0.14
12.5	11.5
15	13.55±0.07
20	18.1±0.28

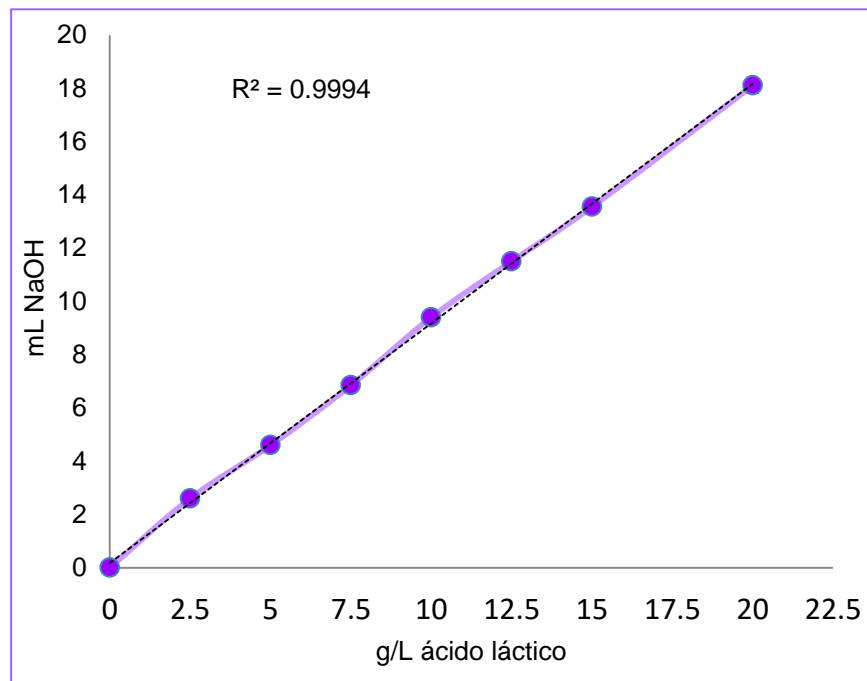


Figura 22. Curva patrón de ácido láctico

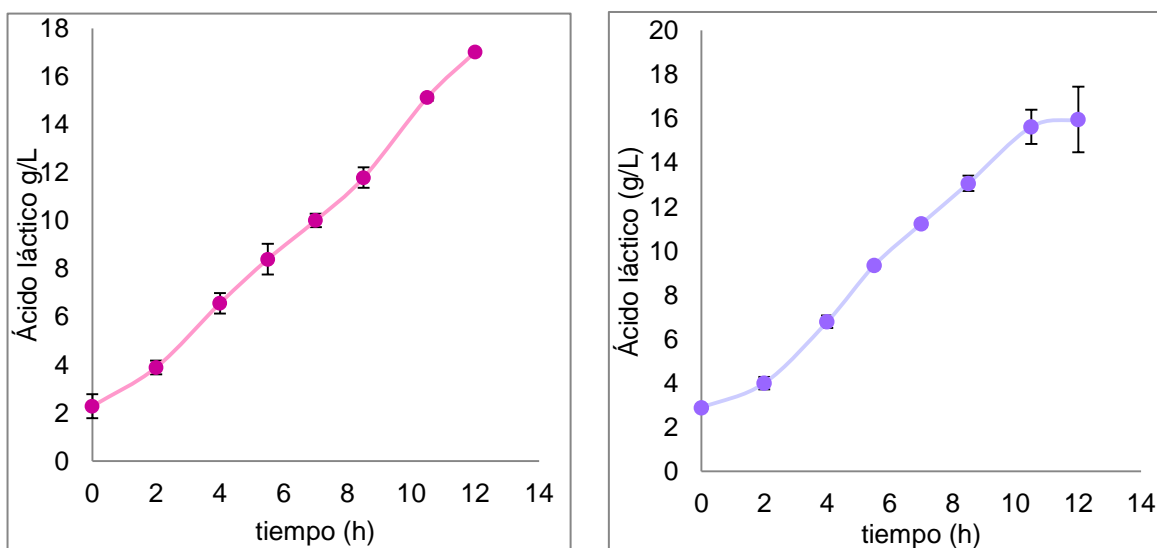
La ecuación de la línea de mejor ajuste es:

$$Y_{\text{mL NaOH}} = 0.8992 \text{ mL NaOH/g.L}^{-1} X_{\text{g/L}} + 0.1756$$

**Tabla 9.** Cuantificación de ácido láctico de BAL-03 y BAL-21

Tiempo (h)	BAL-03		BAL-21	
	NaOH gastado (mL)	Ácido láctico g/L	NaOH gastado (mL)	Ácido láctico g/L
0	4.55±0.49	2.27980427	5.1±0.14	2.891459075
2	6±0.28	3.892348754	6.1±0.28	4.003558719
4	8.4±0.42	6.5613879	8.6±0.28	6.783807829
5.5	10.05±0.63	8.396352313	10.9±0.14	9.341637011
7	11.5±0.28	10.0088968	12.6±0.14	11.23220641
8.5	13.1±0.42	11.78825623	14.25±0.35	13.06717082
10.5	16.1±0.14	15.12455516	16.55±0.77	15.625
12	17.8	17.01512456	16.85±1.48	15.95862989

Los resultados se expresan como medias, ± es el error estándar de las medias; cada punto de datos es el promedio de dos réplicas de manera independiente.



**Figura 23.** Curva de formación de ácido láctico BAL-03 y BAL-21

El ácido láctico es uno de los más importantes mecanismos por el cual las BAL inhiben a sus competidores se da por la producción de ácido láctico, es un factor importante debido a que posee un efecto inhibitorio y esto se relaciona con la estructura no disociada de la molécula, siendo esta capaz de difundirse a través de la membrana celular y disociarse en su interior para provocar la muerte de bacterias patógenas. En la figura 23 se muestra la producción de ácido láctico durante el proceso de fermentación,

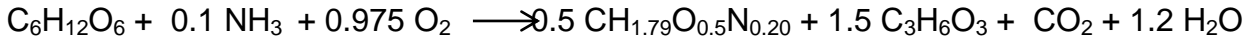
para BAL-03 de los 63.39% de azúcares consumido generaron 17.015 g/L de ácido láctico. Los valores de producción de ácido láctico son muy cercanos a los reportados por algunos autores quienes obtuvieron en experimentos una producción desde 17.09 g/L hasta 16.13 g/L bajo condiciones óptimas (Gámez y col., 2013). Bajo estos resultados se obtuvo un rendimiento de producto vs sustrato  $Y_{p/s}$  de  $1.121 \text{ gg}^{-1}$ , este dato es mayor al reportado por algunos autores, quienes obtuvieron valores entre  $0.7 \text{ gg}^{-1}$  y  $0.9 \text{ gg}^{-1}$  sin embargo cabe destacar que este parámetro está sujeto a factores importantes como temperatura y pH óptimos, los cuales influyen en la característica de crecimiento microbiano e incide notablemente en la velocidad y rendimientos asociados (Agudelo y col., 2010) y un  $Y_{p/x}$  de 11.6842.

Respectivamente para BAL-21 de los 61.60% de azúcares consumidos generaron 15.958 g/L de ácido láctico, bajo estos resultados se obtuvo un rendimiento del producto  $Y_{p/s}$  de  $1.082 \text{ gg}^{-1}$  y un  $Y_{p/x}$  de  $5.553 \text{ gg}^{-1}$ , para esta misma Mendoza C. (2015) cepa reporta una producción de ácido láctico de  $16.41 \pm 1.60$  hasta  $11.54 \pm 0.51$  y un  $Y_{p/s}$  de  $1.12 \pm 0.17$  hasta  $0.83 \pm 0.08$ . Es conocido que la fermentación con el género *Lactobacillus* da como resultado la acidificación del medio de cultivo al producirse ácido láctico a partir de la fuente de carbono (Buruleanu y col., 2013) esto podría explicar la relación directamente proporcional entre la disminución del pH y la concentración de glucosa.

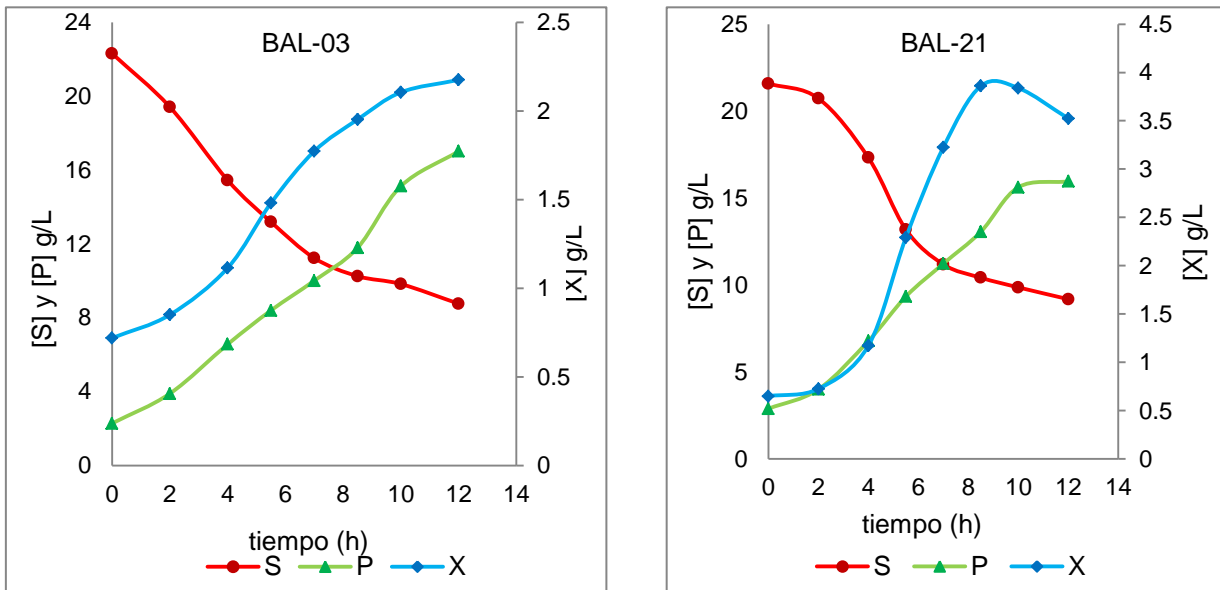
### 8.1.7 Estequiometría de crecimiento bacteriano

El proceso de crecimiento bacteriano implica que se lleven a cabo reacciones de generación de energía y de biosíntesis. La siguiente estequiometría describe un sistema de crecimiento microbiano a base de glucosa como sustrato:

Estequiometría global de la oxidación de la glucosa



En los procesos biológicos aerobios, el sustrato sirve como fuente de energía y de carbono para la generación de biomasa y consumo de oxígeno.

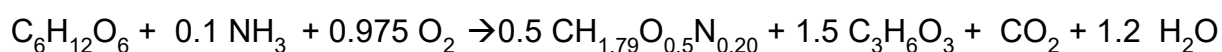


**Figura 24.** Desarrollo de crecimiento microbiano, que ilustra el crecimiento de biomasa [X], consumo de sustrato [S] y producción de ácido láctico [P] debido al metabolismo de BAL-03 y BAL-21.

En la figura 24, al comparar los resultados obtenidos de ambas cepas, se observa que BAL-03 presenta un mayor desarrollo cinético en el medio a comparación de BAL-21 mostrando una concentración de biomasa seca de 2.175 g/L de un mayor consumo de sustrato 63.39% y una mayor 17.0151 g/L producción de ácido láctico y Para BAL-21 produciendo 3.52375 g/L de biomasa, una eficiencia de conversión del 61.60% y 15.9586 g/L de ácido láctico. Con estos datos podemos establecer una relación

estequiométrica de la biomasa, sustrato y producto, determinado sus coeficientes estequiométricos del proceso de fermentación. En las reacciones la estequiometría puede no conocerse con exactitud pueden que los reactantes no se alimentan en las proporciones exactas indicadas por la ecuación de la reacción y también los reactantes que se consumen forman productos no descritos en la reacción principal; estos subproductos forman parte también de la mezcla final de la reacción.

La ecuación estequiométrica es:



De acuerdo a la ecuación estequiométrica se puede obtener los resultados del consumo de  $O_2$  y producción de  $CO_2$  y  $H_2O$ , empleando una concentración inicial de azúcares de 23.926 g/L.

En base a los resultados obtenidos durante la cinética para BAL-03 se tuvo una eficiencia de conversión de sustrato del 63.39%, una concentración de biomasa seca de 2.175 g (0.08 mol) y una producción de ácido láctico de 17.015 g (0.18 mol) en base a estos resultados, se pudo calcular el consumo de  $O_2$  que fue de 9.505 g (0.3 mol), una producción de  $CO_2$  de 3.701 g (0.08 mol) y  $H_2O$  de 1.818 g (0.1 mol)

Para BAL-21 se tuvo una eficiencia de conversión del 61.60%, una concentración de biomasa seca de 3.523 g (0.14 mol) y una producción de ácido láctico de 15.958 (0.17 mol) g/L de ácido láctico, en base a esto se obtuvo un consumo de  $O_2$  del 12.623 g (0.39 mol), una producción de  $CO_2$  de 3.599 g (0.08 mol) y  $H_2O$  DE 1.767 g (0.098 mol)

De acuerdo a la ecuación estequiométrica podemos obtener los rendimientos en  $gg^{-1}$  y  $molmol^{-1}$  como se muestra en la tabla.

**Tabla 10.** Rendimientos de BAL-03 y BAL-21

Rendimiento	BAL-03		BAL-21	
	$Y_{x/s}$	0.096 $gg^{-1}$	0.7031 $mol.mol^{-1}$	0.2376 $gg^{-1}$
$Y_{p/s}$	1.121 $gg^{-1}$	2.2258 $mol.mol^{-1}$	1.082 $gg^{-1}$	2.1479 $mol.mol^{-1}$
$Y_{p/x}$	11.684 $gg^{-1}$	3.1655 $mol.mol^{-1}$	5.553 $gg^{-1}$	1.5045 $mol.mol^{-1}$

## 8.2 Resistencia gastrointestinal

Se determinó la actividad probiótica mediante pruebas de resistencia gastrointestinal, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11.

**Tabla 11.** Supervivencia de BAL-03 y BAL-21 a resistencia gastrointestinal simulada.

Supervivencia %			
Cepa	Simulación gástrica 1h pH 1.9	Simulación intestinal 6h Sales biliares	Global
<i>L. plantarum</i> BAL-03	88.95±1.20	95.8±1.06	84.55±2.05
<i>L. fermentum</i> BAL-21	73±0.14	85.35±5.44	62.35±3.88

Los resultados se expresan como medias,  $\pm$  es el error estándar de las medias; cada punto de datos es el promedio de dos réplicas del cultivo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, *L. plantarum* BAL-03 tuvo una supervivencia global por arriba del 80% en condiciones estrictas a pH de 1.9 y una concentración de sales biliares de 3 g/L y *L. fermentum* BAL-21 tuvo una supervivencia global por arriba del 60%, las dos cepas son capaces de sobrevivir a estas concentraciones gástricas pudiendo desarrollar sus actividades metabólicas sin verse completamente inhibidas, manteniendo una alta viabilidad de  $10^8$  UFC/mL, la capacidad de crecimiento es una propiedad que debe caracterizar a las cepas probióticas, ya que deben presentarse en cantidades suficientes para llegar al tracto gastrointestinal TGI, resistir los impedimentos químicos y ser capaces de establecerse para lograr una buena colonización de la mucosa y el contenido intestinal (Salminen *et al*; 1996). Por lo tanto estas BAL poseen características de resistencia gastrointestinal que les permitiría llegar viables hasta el intestino delgado. En el intestino delgado el obstáculo más importante para los microorganismos son las sales biliares, para que los probióticos puedan ejercer sus efectos benéficos deberán resistir la acción de este bactericida natural. La concentración de sales biliares en el intestino humano es variable y difícil de predecir (Chou y Weimer, 1999; Gonzáles y González-Martínez, 2006). Uno de los principales



mecanismos de defensa a sales biliares, utilizado por algunas *Lactobacillus*, entre ellas *L. plantarum* es la hidrolasa sal biliar (HSB), la cual hidroliza las sales biliares conjugadas y evita los daños a la membrana (De Angelis y Gobbetti, 2004). La hidrólisis de sales biliares y los cambios en la composición de la membrana celular son los mecanismos más prevalentes que participan en la resistencia a sales biliares. *Lactobacillus plantarum* BAL-03 y *Lactobacillus fermentum* BAL-21 tienen porcentajes de resistencia a simulación del 80-90%, por lo que es posible que ambas cepas cuenten con algunos de estos mecanismos de defensa a sales biliares. Estudios reportados por González (2013) para la cepa BAL-03 obtuvo una supervivencia de 81.59% y para BAL-21 una supervivencia de 61.94%, otros estudios realizados por Mendoza (2015) reporta para *L. plantarum* BAL-05 una supervivencia de resistencia gastrointestinal de 67.39 % y para *L. fermentum* BAL-21 una supervivencia de 87.91 %.

## Capítulo IX. Conclusiones

Se evaluó la capacidad probiótica de las 2 BAL seleccionadas en monocultivo, *L. plantarum* BAL-03 y *L. fermentum* BAL-21 mostraron alta capacidad de crecimiento alcanzando altas concentraciones de UFC/mL con tiempos de duplicación cortos (1.50, 1.69 h) y una alta producción de ácido láctico (15.95, 17.01 g/L), lo que favorece un ambiente hostil para los microorganismos patógenos. *Lactobacillus plantarum* BAL-03 presentó mayor capacidad metabólica y de adaptación al medio, lo cual le permite obtener rendimientos mayores en la producción de ácido láctico.

En base a la simulación de las condiciones gastrointestinales, las 2 BAL mantuvieron una alta viabilidad de supervivencia (84.55, 60.35%), siendo capaces de tolerar las condiciones de estrés a la que fueron sometidas.

Todas estas estas características las convierten en cepas con propiedades probióticas con un gran potencial biotecnológico.

## Capítulo X. Bibliografía

- Acebo D y Hernández A. (2012). Los métodos turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida Revista CENIC. Ciencias biológicas. Volumen 44, núm. 1. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. La Habana, Cuba
- Agudelo C, Ortega R, Hoyos JL, (2010) Determinación De Parámetros Cinéticos de dos inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y bacterias ácido lácticas de yogurt. Facultad De Ciencias Agropecuarias. Volumen 8
- Arnáiz C., Isac, L. y Lebrato, J. 2000. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Sevilla.
- Axelsson, L. T. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. En: Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd rev, and exp. Ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp.1-66.
- Barboza, J.E., Vázquez, H., Salcedo, R y Bautista, M. (2004). Probióticos y conservadores naturales en alimentos. *Acta Universitaria*. 14(3):32-38.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1992. Tenth Edition. The Williams & Wilkins Co. Baltimore, U.S.A.
- Bezkorovainy, A., 2001. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 399S–405S.
- Block D. (March 16, 2017), *L. fermentum*, Viticulture & Enology, University of California, Davis campus, recuperado de: [http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/winebacteria/lactobacillus\\_fermentum.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/winebacteria/lactobacillus_fermentum.html)
- Block D. (March 16, 2017), *L. plantarum*, Viticulture & Enology, University of California, Davis campus, recuperado de: [http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/winebacteria/lactobacillus\\_plantarum.html](http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/winebacteria/lactobacillus_plantarum.html)
- Buruleanu, L. C., Bratu, M. G., Manea, I., Avram, D. y Leane Nicolescu, C. (2013). "Fermentation of Vegetable Juices by *Lactobacillus Acidophilus* LA-5". En: Biochemistry, Genetics and Molecular Biology. Lactic Acid Bacteria R & D for Food, Health and Livestock Purposes. 213-138.

- California Dairy Research Foundation (CDRF). Probiotics Basics. 2011. [Internet] [Citado 2013 octubre 9]. Disponible en: <http://cdrf.org/home/checkoff/investments/usprobiotics/probiotics-basics/>
- Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
- Campieri, M., Gionchetti, P., 1999. Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative? *Gastroenterology* 116, 1246– 1249.
- Castellanos, María Inés; Chauvet, A; Deschamps, A. and Barreau, C. 1996. PCR methods for specification and specific detection of probiotic acid lactic bacteria. *Current Microbiology*. Vol. 33:100-103.
- Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*.28 (4):281-370.
- Chou, Ch. y Weimer, B, 1999. Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus* *Journal Dairy Science*, 82:23-11.
- Crueger, W.; Crueger, A. *Biología: Manual de Microbiología Industrial*. 3a ed. Madrid: Acribia, 1993.
- Cruz, A. G., Antunes, A. E. C., Sousa, A. L.C. O. P., Faria, J. A. F. y Saad, S. M. I. 2009. Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*. 42(9): 1233-1239.
- Day R. y Underwood A. (1989). *Química analítica cuantitativa*. 5ª edición. PRENTICE-HALL HISPANOAMERICA, S.A. (pág.: 57, 71-73,192)
- De Angelis M y Gobbetti M (2004). Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*, 4(1), 106-122.
- De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960). A Medium for the Cultivation of *Lactobacillus*. *J. Appl. Bacteriol.*, 23 (1), 130.
- Dunne C, O'Mahony L, Murphy E, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, *et al.* *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (Suppl): 386-392

- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F., Collins, J.K., 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 279– 292
- Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzoti, L., Rossi, F., Dellaglio, F., & Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 59–70.
- Frohlich-Wyder, M.T., Bachmann, H.P., Casey, M.G., 2002. Interaction between propionibacteria and starter/non-starter lactic acid bacteria in Swiss-type cheeses. *Lait* 82, 1 –15.
- Gómez H, Ramírez C, Aguirre D. Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico (2013). Universidad del Valle, Escuela de Ingeniería de Alimentos, Grupo de Investigación en Ingeniería de los Procesos Agroalimentarios y Biotecnológicos GIPAB. Cali, Colombia.
- Georgieva et al. Growth parameters of probiotic strain *Lactobacillus plantarum*, isolated from traditional white cheese. *Biotechnol. & Biotechnol. Special edition/on-line*. EQ. 23/2009/SE.
- Gibson G.R., Glenn R. y Macfarlane G.T .1995. *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology*. Boca Raton, FL: CRC Press.75-100 pp.
- Godward, G., Sultana, K., Kailasapathy, K., Peiris, P., Arumugaswamy, R., & Reynolds, N. (2000). The importance of strain selection on the viability of probiotic bacteria in dairy foods. *Milchwissenschaft*, 55, 441–445.
- González J. Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de una bebida fermentada autóctona de Chiapas. 2013. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.
- González, R. F y González – Martínez, B.E. 2006. Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencia sobre efectos hipocolesterolémicos. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 7(1): 1-8.

- Guarner F, Khan A, Garisch J, Eliakim R, Gangl A. 2008. Organización de gastroenterología Guías prácticas: Probióticos y prebióticos. 8.
- Harris Daniel C. (2001). Análisis Químico Cuantitativo. 2ª edición. Editorial Reverté, S.A. México.
- Hiyama, T.; S. Fukui & K. Kitahara. 1968. Purification and properties of lactate racemase from *Lactobacillus sake*. *Journal of Biochemistry*, 64(1): 99 – 107
- James M. Lee. (1992) Biochemical engineering Prentice-Hall international series in the physical and chemical engineering sciences Ellis Horwood Series in Interactive Information Systems. The University of Michigan. Pág. 94 – 95.
- Jay, J. M. (2000). Microbiología moderna de los alimentos. 4ª ed. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp. 19-27, 106-108, 441-475.
- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49: 209 – 224
- Kato T, Matsuda T, Ogawa E, Ogawa H, Kato H, Doi U *et al.* Plantaricin-149, a Bacteriocin produced by plantaricin NRIC 149. *J Ferment Bioeng.* 1994; 77 (3): 277-282.
- Kristo E, Biliaderis C, Tzanetakis N, 2003. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *International Dairy Journal* 13: 517-528.
- Lanara. Laboratorio de Referencia Animal. 1981. Métodos analíticos oficiáis para controle de produtos de origen animal e sus ingredientes. Y- Métodos físico e químicos. Mel. Ministerio de Agricultura. Brasilia. 2 (25):1-15.
- Luna R. Fundamentos de Química y Estequiometria. Instituto Politécnico Nacional, México D.F. 1 ed.1999
- Ljungh, A.; Wadstrom, T. *Lactobacillus* Molecular Biology From Genomics to Probiotics. Norfolk: Caister Academic Press, 2009.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos. 10a ed. Ed. Prentice Hall. Madrid, España. pp. 122, 352, 400-402,991.
- Mattila, T., & Saarela, M. (2000). Probiotic functional foods. In Williams, & R. G. Gibson (Eds.), *Functional foods* (pp. 287–313). New York: CRC Press LLC.

- Mendoza C. Efecto de factores químicos sobre las características probióticas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* aisladas de una bebida autóctona de Chiapas (2015). Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- Mikelsaar, Zilmer, Kullisaaar y Annuk (2002). Strain of microorganism *Lactobacillus fermentum* me-3 as novel antimicrobiol and antioxidative probiotic. University of Tartu, Tartu (EE). Patente No: US 7, 244,424 B2.
- Miller G., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem. 31: 426-428
- Mc Donald, L. C; Fleming, H. P. and Hassan, H. M. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environm. Microbiol. 56: 2120-2124. McGraw, Linda. 1999. Lactic acid from alfalfa. Agricultural Research. Vol. 47. No. 5: 20.
- Nayak, S. K. 2010. Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish Shellfish Immunol., 29: 2–14
- Nes, I. F. 1984. Plasmid profiles of ten strains of *Lactobacillus plantarum*. FEMS Microbiol. Lett. 21: 359-361.
- Olesupo, N. A; Olukoya, D. K. and Odunfa, S. A. 1995. Studies on bacterocinogenic *Lactobacillus* isolates from selected Nigerian fermented foods. J. Basic. Microbiol. 35: 319-324.
- Orozco M y Solarte J. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. [Trabajo de grado para optar al título de Ingeniero químico]. [Manizales, Colombia]. Universidad Nacional de Colombia. Sede Manizales. Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Ingeniería Química. 2003.
- Ouwehand AC (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects. (S. Salminen y A. Von Wright, eds.) 2° edition. 139-160. Marcel Dekker Inc. Nueva York, USA
- Parvez, S., Malik, K. A., Kang, S. A., & Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Journal of Applied Microbiology, 100, 1171–1185.
- Pennacchia, C.; Ercolini, D.; Blaiotta, G.; Pepe, O.; Mauriello, G.; Villani, F. 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Science 67, 309-317.

- Picot A y Lacroix C (2004). Encapsulation of *Bifidobacteria* in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Dairy Journal*, 14, 505–515.
- Puertollano, E., Puertollano, M.A., Álvarez de C.G. & de Pablo, M. (2008). Probióticos. Aspectos críticos de su eficacia sobre la salud. *Actualidad*. 45:28-33.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. (1999). *Microbiología*. 4a ed., Ed. McGraw-Hill Interamericana. Zaragoza, España. pp. 515-518.
- Pirt, S.J. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. New York: Eds. John Wiley and Sons, Inc.
- Reid G, Bocking A. The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 1202-1208.
- Reid, G., Jass, J., Sebulski, M.T. y McCormick, J.K. (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*. 16:658-672
- Rodríguez, J.; Bueno, G.; Rodríguez, D. et al. True and apparent yields and maintenance coefficient and their significance on fermentation kinetics. In: Roussos, S. (Ed). *New Horizons in Biotechnology*. Marseille: Kluwer Academic Pub, 2004. p.163 172.
- Ruiz-Barba JM, Piard JC, Jiménez-Díaz R. Plasmid profiles and curing of plasmids in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from green olive fermentation. *J App Bacteriol*. 1991; 71 (5): 417-421.
- Salminen, S.; Deighton, M. A.; Gorbach, S. L. 1993. Lactic acid bacteria in health and disease, In: Salminen, S.; von Wright, A., eds. *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker Inc., pp. 199-225.
- Salminen, S.; Laine, M.; von Wright, A.; Vuopio-Varkila, I.; Korhonen, T.; Mattila Sandholm, T. 1996. Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a Nordic and European approach. *Bioscience Microflora* 15, 61-70.
- Sanders, M.E., Huis in't Veld, J.H.J., 1999. Bringing a probiotic containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 293– 315



- Siragusa S, De Angelis M, Calasso M, Campanella D, Minervini R y Gobbetti M (2014). Fermentation and proteome profiles of *Lactobacillus plantarum* strains during growth under food-like conditions. *Journal of Proteomics*, 96, 366-380.
- Sobel, J. D. 1999. Biotherapeutic agents as therapy for vaginitis. pp. 221-244. *In*: G. W. Elmer, L. McFarland and C. Surawicz (ed.), *Biotherapeutic agents and infectious diseases*, Humana Press Inc., Totowa, N. J.
- SOTO, P. Jahn, E. y ARREDONDO, S. Población y fertilización nitrogenada en un híbrido de maíz para ensilaje en el valle central regado. En: Universidad EAFIT. Biblioteca digital. Microorganismos Rumiales. [Internet]. 2006 [Consultado: 15 de Enero de 2010]. Disponible en: <http://bdigital.eafit.edu.co/bdigital/PROYECTO/P660.6CDD949/marcoTeorico.pdf>
- SURIDERP, Chahal. ULLMAN'S. encyclopedia of industrial chemistry: ácido láctico. 5 edition. De Bárbara Elvers editor. A15, (1995); p 97-104.
- Shirai, K., Guerrero, I. y Lara, P. (1996). Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*. 47:125-137.
- Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, J. K., Fitzgerald, G., Lynch, P. B., et al. (2001). Market potential for probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 4765–4835 (Suppl.).
- Talwalkar, A. I., & Kailasapathy, K. A. (2004). The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 5, 1–8
- Torres, M.R. (2002). Flora intestinal, probióticos y salud. Segunda edición, Formas finas (edit.). Guadalajara, Jal.
- Tortora G, Berdell F, Case C. (2007). *Introducción a la microbiología*. Buenos Aires: Medica Panamericana. Ed. 9ª ed.
- Tumola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., & Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 393–398.
- Valdemar F, Ernani S, Puerto A y Torres R. Producción de *Lactobacillus plantarum* en melaza. Universidad Federal de Santa Catarina / Departamento de Ciencia y

Tecnología de Alimentos. Centro Federal de Educación Tecnológica de Paraná – Brasil. Braz. Arco. Biol. Technol. vol.43 no.1 Curitiba 2000.

Van Reenen CA, Dicks LMT, Chikindas ML. Isolation, Purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. J Appl Microbiol. 1998; 84 (6): 1131-1137

Vázquez, S.M., Suárez, H. y Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*. 36(1):64-71.

Vrancken G, Rimaux T, Weckx S, De Vuyst L y Leroy F (2009). Environmental pH determines citrulline and ornithine release through the arginine deiminase pathway in *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 216-222.

Venema, G; Huis, J. H. J. and Hugenholtz, J. 1996. Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and applications. *Antonie van Leeuwenhoek*. Volumen 70. Nos. 2-4: 299-316.

Vinderola C.G., Prosello W., Ghiberto D. and Reinheimer J. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in argentinian Fresh cheese. *Journal of Dairy Science* 83: 1905-1911.

Vinderola, C. G.; Reinhermer, J. A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria. Acomparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International* 36, 895-904.

Zeng, Xian Q., Dao D. Pan, y Pei D. Zhou. "Características funcionales de *Lactobacillus fermentum* F1". *Current Microbiology* 62, no. 1 (2010): 2731