



ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE ASPECTOS TECNOLÓGICOS SOBRE LA SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS COMO PROBIÓTICOS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2016/2017

Alumno: José Aladino Payacán Castillo
Tutor: Elena Hidlago

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid

Contenido

ABSTRACT Y RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 DEFINICIÓN DE PROBIÓTICOS.....	4
1.2 PRESENCIA EN ALIMENTOS Y PRODUCTOS COMERCIALES	4
1.3 EL MERCADO MUNDIAL DE PROBIÓTICOS	6
1.4. EFECTOS DE LOS PROBIÓTICOS SOBRE LA SALUD HUMANA.	8
1.4.1. Efectos beneficiosos de los probióticos.....	8
1.4.2. Los requisitos reglamentarios.....	9
1.5. ASPECTOS TECNOLÓGICOS.....	9
1.5.1. Inestabilidad de los probióticos	9
1.5.2. Procesos industriales y su efecto sobre los probióticos.....	10
1.6. PRODUCCIÓN DE PROBIOTICOS COMO INGREDIENTES.....	11
1.6.1. Condiciones de Crecimiento.....	11
1.6.2. Técnicas de concentración de probióticos	12
1.6.3. Estabilización.	12
1.7. EFECTO DE LA MATRIZ FINAL.....	14
1.7.1. Productos lácteos	14
1.7.2. Bebidas fermentadas de soja	15
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
5. CONCLUSIONES	27
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28
7. AGRADECIMIENTOS	30

ABSTRACT

Today, the high demand for natural foods, especially those that confer specific benefits for the health of the consumer, called "probiotic products", keep the food industry developing new technologies to meet these needs in the population. In this context, it is not enough to produce probiotic ingredients to confer functional, nutritional and technological characteristics to the products that contain them, but also to ensure that these microorganisms are viable in the final product when they are consumed and can have certain stability against the stress caused during technological processes. As a result of this, the objective of this work is to assay the influence of technological processes on the stability and viability of probiotic bacteria. The first part consists of a bibliographic review of what these microorganisms are, their presence in food, the tendency in the market, probiotic effects on health and technological aspects; The second part is a report on the practical section in which the growth curve of several strains of probiotic bacteria have been studied on three different media: the strain showing the best growth will be considered a good candidate to be tested as a probiotic ingredient.

RESUMEN

Hoy en día la alta demanda por alimentos naturales en especial aquellos que al consumirlos confieren beneficios específicos para la salud del consumidor, entre los que se encuentran los denominados "productos probióticos", mantienen a la industria de los alimentos desarrollando nuevas tecnologías para satisfacer estas necesidades en la población. En este contexto, no solo basta con producir ingredientes probióticos para conferir características funcionales, nutricionales y tecnológicas a los productos que los contengan, sino que además se debe garantizar que estos microorganismos sean viables en el producto final al momento de ser consumidos y puedan tener cierta estabilidad frente al estrés provocado en los procesos tecnológicos. A raíz de esto, el objetivo de este trabajo es ver qué influencia tienen los procesos tecnológicos en la estabilidad y viabilidad de las bacterias probióticas. La primera parte consta de una revisión bibliográfica sobre qué son estos microorganismos, su presencia en los alimentos, la tendencia en el mercado, los efectos que poseen los probióticos en la salud y aspectos tecnológicos. La segunda parte es un informe sobre el crecimiento de diversas cepas de bacterias probióticas en tres medios de cultivo diferentes, de tal manera que la cepa que desarrolle el mejor crecimiento sea candidata como ingrediente probiótico.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIÓN DE PROBIÓTICOS

El término probiótico, derivado del griego y significando “para la vida”, fue usado por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell para describir “substancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otro” y contrastado con el término antibiótico. Posteriormente el término se utilizó en otras materias y ganó un sentido más general. En 1971, Sperti aplicó el término a extractos de tejido que estimulaban el crecimiento microbiano.

Parker (1974) fue el primero en usar el término probiótico en el sentido que se le da actualmente. Definió probióticos como “organismos y sustancias que contribuyen al balance microbiano intestinal”. Desde entonces el término ha experimentado diversas revisiones y ampliaciones, quizás la definición de probiótico que podemos considerar más completa y adecuada es “una preparación de, o un producto conteniendo, unos microorganismos definidos, viables y en suficiente cantidad para alterar la microbiota de un compartimento del huésped y ejercer efectos beneficiosos para la salud de este huésped” (Schrezenmeir et al., 2001).

A medida que su uso se fue generalizando, fue necesario consensuar el significado del término, por lo que, en 2002, la FAO, junto con la OMS, y teniendo en cuenta las aportaciones de investigadores, industriales y especialistas en comunicación (Marteau, 2006), establecieron una definición para el término probiótico: “organismos vivos que, ingeridos a dosis definidas ejercen efectos beneficiosos para la salud del hospedador” (<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/es/>).

En cuanto a su uso en las industrias lácteas, durante las últimas décadas, las bacterias probióticas, se han incluido progresivamente en productos como los yogures y leches fermentadas, debido a los beneficios percibidos para la salud que se describen en numerosas publicaciones, y en particular en un informe de la FAO de 2001 (<http://www.fao.org/3/a-a0512.pdf>). Entre los microorganismos utilizados por las industrias lácteas por sus efectos probióticos, destacan los lactobacilos, como *Lactobacillus acidophilus* y bifidobacterias comúnmente llamadas *bifidus* (Daly y Davis, 1998).

1.2 PRESENCIA EN ALIMENTOS Y PRODUCTOS COMERCIALES

La disponibilidad y familiaridad del consumidor con el concepto “probióticos” ha ido creciendo al mismo tiempo que lo ha ido realizando la investigación de estos productos. En el 2006 se utilizó el término probiótico para más de 600 productos alimenticios lanzados por la

industria lechera (Sveje, 2007). Los más conocidos en esta línea de productos probióticos son leches fermentadas y yogures, los cuales son consumidos en días o semanas después de su fabricación (Nagpal et al., 2007).

Los efectos esperados y que traerán beneficios al organismo dependerán de la cepa o especie específica, además de la dosis y la viabilidad de las bacterias ingeridas (Hill et al., 2014). La Federación Internacional de Lechería (IDF) sugiere un mínimo de 10^7 UFC/g o UFC/ml de células bacterianas probióticas vivas en el producto al momento del consumo (Corona-Hernández et al., 2013). Por consiguiente, es imprescindible mantener un nivel adecuado de células viables y garantizar sus propiedades a lo largo de la vida útil del producto.

Varios estudios han puesto en evidencia que las mejores matrices para proveer probióticos son productos fermentados con productos lácteos como son las leches fermentadas y yogur, que por lo demás son los productos probióticos más comercializados. Por otra parte, ahora está la necesidad de trabajar con nuevos probióticos no lácteos y se ha encontrado que los alimentos fermentados de manera tradicional pueden ser la base de trabajo para el desarrollo de alimentos funcionales de tipo probiótico (De Vuyst *et al.*, 2008; Ruiz-Moyano *et al.*, 2008; Ruiz -Moyano *et al.*, 2011). Según Granato *et al.*, (2010), las personas que no incluyen en su dieta productos derivados de animales, como la leche, ya sea por filosofía (vegetarianismo) o por intolerancias (a la lactosa) o por prescripción facultativa (hipercolesterolemia), también eliminan de su dieta, sin ser conscientes de ello, los probióticos asociados a los productos lácteos. Asimismo, estudios previos han informado sobre el uso de bacterias probióticas en zumos de frutas, batidos de fruta, frutas mínimamente procesadas, verduras fermentadas, productos de aperitivos, aceitunas y bebidas de cereales para suministrar alimentos probióticos libres de colesterol, lactosa y alérgenos presentes en productos lácteos (Martins *et al.*, 2013). Siguiendo en esta línea, se han utilizado con éxito para producir bebidas probióticas, el zumo de anacardo (Pereira *et al.*, 2011), jugo de melón cantalupo (Fonteles *et al.*, 2011) y jugo de piña (Costa *et al.*, 2013), esto utilizando varios tipos de matrices no lácteas. A pesar de ello, los jugos de fruta al presentar una gran cantidad de agua hacen que aumente el costo de transporte. Los jugos de fruta no estériles deben almacenarse bajo temperaturas de refrigeración para velar por su inocuidad. El secado es una forma de reducir los costos en transporte y almacenamiento del producto (Krishnaiah *et al.*, 2014), además permite que pueda almacenarse bajo condiciones ambientales (Rocha *et al.*, 2011).

Las bacterias ácido-lácticas que participan en la elaboración de numerosos alimentos de consumo humano, mediante la fermentación (Estrada *et al.*, 2005). Suelen presentar

capacidades antagónicas frente al crecimiento de otros microorganismos potencialmente perjudiciales, además de aportar mejoras en las cualidades organolépticas y/o reológicas de los alimentos, por lo que su potencial biotecnológico es de suma importancia (Lopez et al., 2007).

La inclusión y viabilidad de las bacterias probióticas en los alimentos a lo largo de su procesamiento y su almacenamiento, en beneficio para la salud del consumidor, son un reto constante para la industria de los alimentos, por lo que se requiere comprender los factores tanto extrínsecos como intrínsecos del procesamiento (Granato, Branco, Cruz, Faria & Sha, 2010). Particularmente en el caso de los yogures, los microorganismos añadidos como probióticos pueden interactuar con los cultivos de iniciadores (*starters*) añadidos y se almacenan, después de la acidificación, en condiciones de baja actividad proteolítica con la presencia de oxígeno y de bajas temperaturas, todo lo cual puede impactar negativamente en la supervivencia de dichos microorganismos. Por consiguiente, podría ocurrir que los productos finalmente comercializados sean incapaces de proporcionar los beneficios esperados en la salud del consumidor incluso cuando se respetan los tiempos de vida útil del producto y la ingesta diaria recomendada (Granato, Branco, Cruz, Faria & Shah, 2010).

Numerosos estudios (Klein et al, 1998, Hamilton-Miller et al., 1999, Shah, 2000, Hamilton – Miller y Shah, 2002, Temmerman et al., 2002) muestran que la identidad, cantidad y tipo de especies recuperadas de productos destinados a consumo humano no siempre se corresponden con los indicados en las etiquetas. Recientemente, y como parte del proyecto de la Comunidad Europea SMT4 CT98-2235, se han desarrollado y validado métodos para el control oficial de los microorganismos probióticos utilizados como aditivos en los piensos destinados a la alimentación animal (Leuchschnner *et al*, 2002 a y b, 2003 a, b, c, d, y e) incluyendo reglas para la numeración y tipificación de los mismos. Sin embargo, aún no existen métodos oficiales europeos para el control de los productos destinados a la alimentación humana.

1.3 EL MERCADO MUNDIAL DE PROBIÓTICOS

En la actualidad, debido a la gran competencia que existe en el mercado de los productos lácteos, la industria láctea en su afán de satisfacer las necesidades del consumidor se ha orientado a proveer componentes funcionales y/o para satisfacer necesidades nutricionales específicas como en casos de obesidad e hipertensión (Ferrao et al., 2016). Por este motivo, y dado que los productos lácteos poseen la capacidad de mejorar la vida de

millones de personas en el mundo, el mercado de los productos probióticos está marcando una tendencia sin precedentes.

Existe una tendencia mundial sobre el desarrollo y consumo de productos alimenticios que contienen probióticos y que significa una mayor demanda por parte del consumidor lo que puede significar un aumento considerable en el mercado de alimentos funcionales (Khan et al., 2011).

Hacia el año 2011 el mercado mundial de probióticos fue de 27,9 Billones de USD y se estima alcance los 44,9 Billones de USD en el 2018 (Transparency Market Research, 2013) 1]. Hacia fines de la década de 1980 unas pocas bacterias probióticas tenían predominio en el mercado, incluyendo *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei* Shirota, y *Bifidobacterium animalis lactis* (BB12). A pesar de que los productos probióticos son comercializados en todo el mundo, y sus beneficios son demandados por personas de todo género, raza, edad, ubicación geográfica y estado de salud, la disponibilidad de estos productos se limita a personas de países más desarrollados quienes se permiten comprar productos probióticos *premium*. Se sostiene que cinco factores guiarán el desarrollo y aumentarán el acceso a una nueva generación de probióticos de origen local. Estos cinco factores son: diferencias en la composición de la microbiota intestinal, desarrollos tecnológicos, viabilidad de los probióticos en matrices alimentarias locales, valorización de la propiedad de los probióticos de origen local y requisitos nutricionales y de salud específicos. (Figura 1).

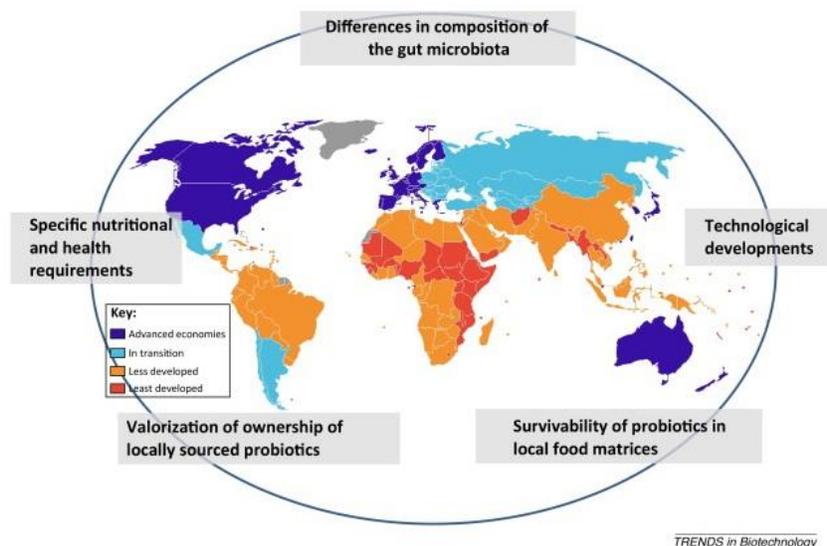


Figura 1: Factores que guiarán el desarrollo de probióticos de origen local a una nueva generación, beneficiando particularmente a las subpoblaciones de los países en desarrollo (Fondo Monetario Internacional, 2009).

Estos microbios beneficiarán a personas de países en vías de desarrollo que generalmente poseen un escaso poder adquisitivo y por ende acceso restringido a los probióticos, pero que, sin embargo, están expuestos a malas condiciones de higiene, compuestos tóxicos, malnutrición e infecciones entéricas crónicas. Estas oportunidades anteriormente descritas podrían justificar e incentivar la financiación de más investigación sobre estos productos (Sybesna, et al., 2015).

1.4. EFECTOS DE LOS PROBIÓTICOS SOBRE LA SALUD HUMANA. REGLAMENTACIÓN OFICIAL.

1.4.1. Efectos beneficiosos de los probióticos

Entre los beneficios para la salud que se adjudican a los probióticos se incluye el alivio de ciertas intolerancias, como la intolerancia a la lactosa; la mejora de la biodisponibilidad de nutrientes y la prevención o disminución de su prevalencia para ciertas alergias en personas susceptibles (Isolauri, 2001; Jahreis *et al.*, 2002; Chiang and Pan, 2012). Los probióticos además pueden tener efectos antimutagénicos, anticancerígenos, hipocolesterolémicos, antihipertensivos, previenen la osteoporosis y pueden funcionar como inmunomodulares (Chiang y Pan, 2012). Así mismo, está descrito que pueden mitigar los síntomas de las patologías inflamatorias intestinales, síndrome del intestino irritable, colitis, enfermedad hepática alcohólica o estreñimiento y pueden atenuar el riesgo de padecer cáncer de colon, hígado y mama (Prado et al., 2008).

Las únicas afirmaciones de salud relativas a cultivo de bacterias lácticas (LAB) aprobadas por la EFSA en virtud del artículo 13 del Reglamento R1924/2006 dice relación con los cultivos tradicionales de yogur y su capacidad para mejorar la tolerancia a la lactosa (EFSA, 2010). La EFSA estima que no hay suficiente evidencia científica hasta la fecha que sustente la demanda relativa a los probióticos. Por lo tanto, en lo inmediato se debe informar a los consumidores y autoridades sobre: (1) identificación del género, especie y cepa del probiótico presente en el producto; (2) citas sobre la efectividad de la cepa probiótica publicados en estudios humanos; y (3) el respaldo de que el producto contiene el nivel suficiente y necesario del probiótico hasta el final de su vida útil como se estableció en las publicaciones realizadas (Douglas y Sanders, 2008).

Sin embargo, muchos de estos beneficios potenciales no están suficientemente documentados científicamente, por lo cual, a partir del 2006 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha establecido reglamentos en relación con las declaraciones sobre las propiedades saludables relacionadas con los probióticos. Este Organismo no acepta declaraciones que

afirmen que la salud se ve mejorada en sí debido al aumento de bacterias benéficas en el intestino, debido a la falta de apoyo científico específico aún no demostrado. Todo manifiesto sobre propiedades saludables debe tener sustento por evidencias que demuestren beneficios específicos para la salud.

1.4.2. Los requisitos reglamentarios

En los últimos años los requisitos reguladores mundiales han afectado en gran medida al mercado de los probióticos (Burgain *et al.*, 2011). En realidad, las declaraciones de propiedades saludables se deben basar en la viabilidad celular y en la función probiótica (Jankovic *et al.*, 2010, Burgain *et al.*, 2011). En el caso de Europa, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria ha rechazado innumerables solicitudes de declaraciones de propiedades saludables de los probióticos, el cual declara que la palabra “probióticos” lleva consigo un efecto implícito en la salud (Marsh *et al.*, 2014). En este punto, a pesar de existir estudios que apoyan la eficacia probiótica, las condiciones regulatorias, en particular en la UE, han reducido las demandas que los fabricantes pueden hacer sobre sus productos (Olivo, 2014). Por otro lado, en los Estados Unidos, la Agencia de alimento y fármacos (FDA) permite el uso de las reivindicaciones en la promoción de la salud en general debido al valor nutritivo. No obstante, la ley actual no permite el uso de reclamos que tengan relación con el tratamiento de enfermedades (Olivo, 2014).

1.5. ASPECTOS TECNOLÓGICOS.

1.5.1. Inestabilidad de los probióticos

La estabilidad probiótica puede verse afectada o comprometida por tres características de los ingredientes presentes en los alimentos, dado que estos pueden ser protectores, neutros o perjudiciales (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002), por lo tanto, la compatibilidad que se desarrolle entre los probióticos y los ingredientes presentes en los alimentos determinan su supervivencia. En estudios realizados, se evidencia que existen aditivos tales como algunos tipos de azúcares, edulcorantes, sales, compuestos aromáticos (diacetil, acetaldehído y acetoin), aromatizantes o colorantes naturales y artificiales, nisina, natamicina, lisozima o nitrito, que ponen en peligro el crecimiento y viabilidad de las bacterias probióticas utilizadas para productos fermentados y no fermentados (Vinderola, costa, Regenhardt y Reinheimer, 2002). Se tiene evidencia de que durante el proceso de almacenamiento, suelen darse niveles altos de ciertos ingredientes pueden afectar el crecimiento de los probióticos y por consiguiente su viabilidad en el producto (Boylston *et al.*, 2004; Lee, Salminen, 2009).

Debido a la alta demanda de productos probióticos en el mercado actual, las industrias dan preferencia a los productos probióticos deshidratados, esto debido a su estabilidad durante el almacenamiento y la facilidad en cuanto a la operación para ser transportado e incorporado en varios alimentos. Ahora bien, para que exista una actividad funcional óptima de las cepas probióticas esta dependerá de la dosis a ingerir (Johansson et al., 2015, Zhu et al., 2014).

Por otro lado, son innumerables los factores que podrían tener efectos adversos en la viabilidad de los probióticos en los alimentos, incluyendo: ambiente ácido o pH bajo, producción de peróxido de hidrógeno, disponibilidad de nutrientes, presencia de oxígeno disuelto, actividad del agua, temperatura de procesamiento y de almacenamiento y posible interacción con otras cepas microbianas e inhibidores competitivos, entre otros (Coman et al., 2012; Kailasapathy, 2002). Por tal motivo, para evitar la variabilidad entre lotes y optimizar la viabilidad de la cepa probiótica en el producto final deben estar bien definidas y controladas su línea de procesamiento y almacenamiento posterior.

1.5.2. Procesos industriales y su efecto sobre los probióticos

Condiciones de fermentación

Para que se den las condiciones que resulten de un óptimo crecimiento y asegure la viabilidad de las bacterias probióticas, la temperatura de fermentación, que es uno de los factores más importantes en el proceso productivo de productos probióticos, debe darse en el intervalo de 37 – 43°C (Boylston et al., 2004; Korbekandi et al, 2011; Lee, Salminen, 2009). A pesar de que existen cepas de bacterias ácido lácticas como *Lactobocillus acidophilus* cuyo crecimiento es compatible con los 45°C, su crecimiento óptimo se da entre 40 – 42°C, generalmente temperaturas por encima de los 45 – 50°C durante el procesamiento resultan nocivos y terminan afectando a la viabilidad probiótica, esto debido a que las altas temperaturas pueden provocar en las bacterias probióticas un daño irreversible lo que puede traer como consecuencias la pérdida de la viabilidad y funcionalidad debido a la posible desnaturalización de las proteínas en su estructura (Bustamante, Villarroel, Rubilar & Shene, 2015).

Por otro lado, la presencia de oxígeno durante el proceso de fermentación trae consigo la pérdida de viabilidad de las bacterias probióticas, especialmente cuando nos referimos a bifidobacterias que tienen características de anaerobios estrictos (Gaudreau, Champagne, Remondetto, Bazinet y Subirade, 2013). Dentro de los métodos que se han conseguido para eliminar el contenido de oxígeno durante la fermentación, la fermentación a vacío es el más importante (Cruz, Faria, & Van Dender, 2007).

Operaciones de congelación/descongelación

A pesar de que las bacterias probióticas presentan mayor tiempo de supervivencia en los productos congelados, el daño que causa este proceso en las membranas celulares de estos microorganismos, a causa de las tensiones mecánicas provocadas por cristales de hielo, ya sea a nivel intercelular como intracelular es bastante dañino, dado que condensan los solutos en el medio y las células sufren deshidratación durante el proceso de congelación, por lo tanto las actividades metabólicas que hacen posible la viabilidad de la célula se ve reducida o interrumpida (Akin, akin, & Kirmaci, 2007). Por otro lado, si bien la congelación incide en la viabilidad de las bacterias probióticas debido al efecto antes señalado, el proceso de congelación lento provoca un mejor mantenimiento de los probióticos en el producto (Fowler, Toner, 2005; Mohammadi et al, 2011).

Contenido de oxígeno y potencial redox

Durante el período de almacenamiento de productos probióticos, uno de los factores que tienen mayor incidencia sobre la viabilidad y estabilidad de estas bacterias son el contenido de oxígeno y el potencial redox (Lee y Salminen, 2009). Existen al menos 3 maneras en que el oxígeno puede afectar a los siguientes factores (Korbekandi et al., 2011):

1. Viabilidad de los probióticos;
2. Causa toxicidad para algunas células en presencia de oxígeno ciertos cultivos producen peróxidos y,
3. La oxidación de componentes lipídicos producen radicales libres que resultan ser tóxicos para las bacterias probióticas.

Ahora bien, para evitar toxicidad y la consecuente pérdida de funcionalidad o viabilidad de las bacterias probióticas es necesario que el nivel de oxígeno en el interior del envase que contiene el producto sea lo más bajo posible.

1.6. PRODUCCIÓN DE PROBIOTICOS COMO INGREDIENTES

1.6.1. Condiciones de Crecimiento

Una de las características que destacan en las bacterias ácido lácticas es su capacidad para sobrevivir en ambiente ácido como el jugo gástrico, la cual las hace idóneas como probióticas, ya que se deben asimilar, crecer y finalmente adaptarse a las condiciones del tracto intestinal (Holzapfel y Schillinger, 2002). En estudios previos, se ha evidenciado que el tiempo necesario para que las bacterias lácticas alcancen su sitio en el intestino y poder así desarrollar

sus propiedades funcionales es de 90 minutos (Fernandez y col., 2003), de un total de 10 cepas 8 resistieron 90 minutos y 2 solo resistieron 60 minutos.

Considerando que tanto *Lactobacillos* como *Bifidobacterium* suelen encontrarse naturalmente en el tracto digestivo de algunos animales y en la leche materna, las condiciones óptimas de crecimiento para *Lactobacillos* se sitúa en torno a los 37°C, con características de anaerobiosis facultativa (Colombo et al., 2014) y para *Bifidobacterium*, cuya característica de crecimiento es anaerobio estricto, posee tolerancia a los medios ácidos con pH que fluctúan entre 4,5 y 5, y también se desarrollan a concentraciones elevadas de sales biliares (Gomez & Malcata, 1999).

Las *Bifidobacterium* son bacilos Gram-positivos, anaeróbicos estrictos, que no poseen la capacidad de generar esporas, y suelen crecer de forma ramificada. Estas bacterias son uno de los pocos microorganismos que se asientan de forma natural en el tracto gastrointestinal de los recién nacidos (Turnbaugh et al., 2009). Hasta el momento han sido identificadas más de 30 especies diferentes de *Bifidobacterium* que no presentan grandes diferencias genéticas entre sí. El ambiente natural donde estos microorganismos se desarrollan en forma óptima son el tracto gastrointestinal humano, la cavidad oral, el tracto genitourinario femenino y la vagina (Turnbaugh et al, 2009; Turrioni et al., 2008).

1.6.2. Técnicas de concentración de probióticos

La centrifugación se ha considerado desde hace mucho tiempo la técnica más común para obtener un concentrado celular. La temperatura a la cual opera esta técnica suele ser 4°C. No obstante, existen muy pocos estudios respecto del efecto que pudiese tener este proceso sobre la viabilidad de las bacterias probióticas posterior al secado. Por otro lado, otra técnica utilizada para estos efectos es la filtración por membrana, sin embargo, esta técnica no se ha ensayado en el contexto de la pulverización o secado bacteriano.

1.6.3. Estabilización.

Para llevar a cabo el proceso de estabilización de las bacterias probióticas durante el procesamiento, la técnica que es utilizada comúnmente es el **secado**, con lo cual se logran estabilizar formulaciones de ingredientes o alimentos que contienen microorganismos como bacterias y levaduras por un período largo de tiempo (Anal & Singh, 2007; Meng, Stanton, Fitzgerald, Daly, & Ross, 2008; Peighambardoust, Tafti, Hejazi, & Hesari, 2011). En estado deshidratado, siempre y cuando las condiciones de almacenamiento de estos microorganismos sean las adecuadas, es muy probable que las bacterias permanezcan por largo períodos de tiempo incluso años conservando su viabilidad en un estado vitrificado. Ahora bien, una vez que

estos microorganismos son rehidratados, las células en su estructura se hinchan en forma rápida y retornan su estado vital, este fenómeno se denomina anhidrobiosis (Crowe, 1992), el cual puede ser traducido como “supervivencia sin agua”. Hoy en día un ejemplo práctico que se utiliza para llevar a cabo la deshidratación de levaduras y otros microorganismos es la pulverización, técnica masificada a nivel industrial (Pereira, Panek, & eleutherio, 2003). A pesar que esta técnica parece de gran utilidad, trae como consecuencia una fuerte disminución en las tasas de supervivencia de los microorganismos como los probióticos debido a que estos son sensibles al calor, y, por lo tanto, son vulnerables (Meng et al, 2008; Schutyser, Perdana, & Boom, 2012). Por este motivo, para microorganismos como los probióticos se utiliza la **liofilización**, que a pesar de ser una técnica que consume demasiada energía y que opera en forma discontinua (Saxelin et al, 1999) logra generar un producto que conserva una mejor viabilidad.

Actualmente la **microencapsulación**, como proceso estabilizador, está ganando interés en el campo de los productos probióticos dado que favorece la viabilidad de estos microorganismos en los alimentos y mejora la perspectiva nutracéutica. Desde el punto de vista operacional, es importante que la microencapsulación otorgue protección mientras se lleva a cabo el proceso de liofilización, esto durante la etapa de almacenamiento y durante el paso por el tracto gastrointestinal. Por lo mismo, el polímero a ser utilizado en este proceso ha de ser no citotóxico, cumplir una función antimicrobiana para impedir el ataque de otras bacterias que puedan atenuar las propiedades funcionales en el huésped (Capela, et al., 2006; Huq et al., 2013).

Mediante este método es posible disminuir o atenuar los efectos adversos que pueden afectar la viabilidad de las bacterias probióticas en la matriz alimentaria, como son la presencia de oxígeno, ambiente ácido o enzimas digestivas. Para llevar a cabo esta tecnología de la microencapsulación son ampliamente utilizadas las técnicas de extrusión y emulsión, específicamente para microorganismos probióticos (Rokka y Rantamaki, 2010). Otras dos técnicas a destacar, que en la actualidad se utilizan en forma amplia y que aportan protección a los probióticos, son el secado por pulverización y la liofilización (Dianawati et al., 2013a, Dianawati et al., 2016^a). No obstante, lo anterior, una de las desventajas de utilizar la técnica de secado por pulverización a altas temperaturas, que si bien es cierto elabora cápsulas de tamaño más pequeña.

La liofilización es una de las técnicas que hoy en día se utilizan en forma amplia, dado que, por su forma de operar genera en las bacterias encapsuladas o probióticas menos daño y

por lo tanto otorga al producto final un alto nivel de viabilidad celular. Se han realizado trabajos en donde probióticos tales como *Bifidobacterium longum* (Amine et al., 2014) y *Bifidobacterium animalis* (Dianawati & Shah, 2011), se han encapsulado previamente al proceso de liofilización con la finalidad de crear una forma probiótica seca que facilita el almacenamiento a largo plazo, antes de insertarlo en varios productos (Song, & wei, 2014).

1.7. EFECTO DE LA MATRIZ FINAL

Debido al avance de las nuevas tecnologías y a los nuevos conocimientos sobre las bacterias probióticas, la industria de los alimentos no sólo dirige su objetivo a alimentos lácteos, sino que también a productos no lácteos tales como los mencionados en el apartado B de la introducción, por lo tanto el reto o gran desafío que se enfrenta hoy en día la industria elaboradora de productos probióticos es cómo mantener la viabilidad de estos microorganismos cuando se encuentran en un medio que no les es habitual como lo son los productos lácteos.

1.7.1. Productos lácteos

Los productos tales como yogures y bebidas tipo yogur son los que han sido más utilizados como portadores de probióticos en Occidente, esto se explica tanto por motivos históricos como por razones tecnológicas. Los probióticos tales como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son los microorganismos comercialmente disponibles dado que su medio natural es la leche.

Generalmente los probióticos, por motivos tecnológicos y funcionales suelen desarrollarse si se les acompaña por cultivos iniciadores como *Lactobacillus delbureckii subsp. Bulgaricus* y/o *Staphylococcus thermophilus*. La razón tecnológica recae en que aportan estructura y sabor al producto, y cuando se encuentran con cultivos iniciadores desarrollan de mejor manera sus propiedades funcionales.

Otros productos donde los cultivos probióticos se suelen emplear son las leches sin fermentar “leche acidophilus dulce”, y la razón de esta denominación es por que la leche carece de amargor (Mcdonough, Hitchins, Wong, Wells, & Bodwell, 1987).

Otros productos que son de interés en los que los probióticos se desarrollan de forma óptima y otorgan características viables deseadas son los quesos, a pesar de que estos productos requieren tiempo de maduración, se ha evidenciado que en ellos los probióticos tienden a ser estables por períodos largos. Llevando a cabo una fermentación adecuada en el queso, se puede conseguir un recuento elevado de bacterias probióticas que se encuentran generalmente sobre las 10^9 UFC/g (Ibrahim et al., 2010).

1.7.2. Bebidas fermentadas de soja

En los países asiáticos, los productos como “yogures de soja” son productos probióticos fermentados que, sin embargo, no se consumen habitualmente con el propósito de aportar probióticos. En estudios realizados, se evidencia que la fermentación láctica de la leche de soja puede mejorar la disponibilidad de minerales y específicamente aumentar el nivel de vitamina B, además de aumentar la biodisponibilidad de las isoflavinas (Recka & Vijayalakshmi, 2010). A pesar de que los “yogures de soja” no se elaboran con el propósito de aportar probióticos a la dieta, la fermentación de estos productos tiene la particularidad de disminuir el sabor a soja de los productos y por otro lado la estabilidad de los probióticos de los productos fermentados a base de soja es semejante a la del yogur.

2. OBJETIVOS

Considerando los antecedentes expuestos anteriormente, y dada la importancia de las bacterias probióticas, por su aportación de funcionalidad y sus aplicaciones en el ámbito tecnológico, el objetivo principal de este trabajo es el siguiente:

Determinar en qué medio de cultivo diferentes cepas de bacterias probióticas se desarrollan de mejor manera con el fin de garantizar su viabilidad como ingredientes probióticos en el producto final.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas:

Para desarrollar este trabajo, se utilizaron 15 cepas bacterianas (Tabla 1):

Cod. Cepa	Especie
DES-0401	<i>Bifidobacterium animalis</i>
DES-0444	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
DES-0468	<i>Bifidobacterium breve</i>
DES-0428	<i>Bifidobacterium breve</i>
DES-0452	<i>Bifidobacterium breve</i>
DES-0421	<i>Bifidobacterium breve</i>
DES-0455	<i>Bifidobacterium breve</i>
DES-0451	<i>Bifidobacterium breve</i>
DES-0456	<i>Bifidobacterium breve</i>
DES-0415	<i>Bifidobacterium breve</i>
DES-0388	<i>Bifidobacterium breve</i>
DES-0039	<i>Bifidobacterium breve</i>
DES-0458	<i>Bifidobacterium longum ssp infantis</i>
DES-0448	<i>Bifidobacterium longum ssp infantis</i>
DES-0407	<i>Bifidobacterium longum ssp longum</i>

Tabla 1: Cepas bacterianas utilizadas en el presente estudio

Todas las cepas pertenecían al género *Bifidobacterium* y se agrupaban en 5 especies (*Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum ssp infantis* y *Bifidobacterium longum ssp longum*), que pertenecen a bacterias probióticas:

3.2 Medios de cultivo:

En este trabajo se han utilizado 4 medios de cultivo, con los que se ha analizado el comportamiento de crecimiento de las cepas de bacterias probióticas. 3 medios se han utilizado en estado líquido y uno se solidificó con agar:

Medios en estado líquido:

El medio **Man Rogosa Sharpe (MRS)** con 0,1 g/l de L-cisteína, está descrito como un medio idóneo para el crecimiento de bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Este medio se adquiere en estado gelificado en placas de Petri de la marca Scharlau, tiene un color marrón claro (EMD Chemicals, MRS Agar, 2002). Su composición, en g/l es la siguiente:

Peptona proteosa	: 10,0
Extracto de carne	: 8,0
Extracto de levadura	: 4,0
D(+)-Glucosa	: 20,0
Acetato de sodio	: 5,0
Citrato de triamonio	: 2,0
Sulfato de magnesio	: 0,2
Sulfato de manganeso	: 0,05
Fosfato dipotasico	: 2,0
Polisorbato 80	: 1,0

A esta formulación se añadió L-cisteína (Sigma Aldrich) a razón de 0,1 g/l

El medio **Reinforced Clostridial Medium (RCM)**. Este medio es utilizado para el crecimiento de especies bacterianas del género *Bifidobacterium*. Para el desarrollo de este trabajo se utilizó la siguiente composición:

Extracto de levadura	: 6,50 g
Peptona	: 5,03 g
Glucosa	: 2,50 g
Almidón soluble	: 0,51 g

Cloruro de sodio	: 2,50 g
Acetato de sodio	: 1,50 g
Clorhidrato de cisteína	: 0,25 g

El medio **Bifidus Selective Medium (BSM)**, es un medio idóneo para el crecimiento de bacterias *Bifidobacterium*, esto debido a que contiene todos los nutrientes que requieren estos microorganismos. En este caso, se preparó a partir de un medio comercial de la marca Sigma Aldrich, adicionando 55,5 g/l de agua destilada, y posteriormente se filtró a través de 0,2 µm de tamaño de poro para eliminación del agar. Su composición es la siguiente:

Extracto de Peptona y Carne como fuentes de carbono, nitrógeno, vitaminas y minerales. Extracto de levadura, vitaminas del complejo B que estimulan el crecimiento bacteriano. La dextrosa es la fuente de carbohidratos. Cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico. Hay un compuesto en baja concentración para desintoxicar subproductos metabólicos. Contiene agentes reductores y agentes tampón. Las sales selectivas inhiben el crecimiento de mohos, enterococos y otros.

3.3 Preparación de las muestras

Siembra en placa

Se estudiaron un total de 15 cepas bacterianas de origen humano, procesados en 3 lotes de tal manera que en cada lote se trabajó con 5 cepas. El procedimiento que se aplicó a cada lote es el que se describe a continuación:

Primer lote: DES-401, DES-444, DES-468, DES-428, DES-452

Segundo lote: DES-421, DES-455, DES-451, DES-456. DES-415

Tercer lote: DES-388, DES-039, DES-0458, DES-444, DES-407

Se realizó cultivo en placa por duplicado en medio RCA por estrías, inoculando con asa de siembra punta redonda desde el tubo eppendorf que contiene cada cepa a la placa, entre unos 10 a 15 segundos, inoculando la mitad de la placa y luego tomando el extremo derecho del barrido en placa se prosiguió con la segunda mitad de la placa, una vez inoculadas, luego que procedió a incubar en cámara a 37°C en condiciones de anaerobiosis, utilizando sobres de anaerogel de la marca oxoid.

Una vez transcurridas al menos 48 horas de incubación, y antes de proceder al cultivo en los tres medios líquidos testeados, se preparó una suspensión celular de cada cepa bacteriana. Para esta operación, se dispusieron en una gradilla 1 tubo eppendorf de 2 ml, para

cada microorganismo conteniendo 1 ml de agua peptonada y 2 colonias procedentes de las placas en medio RCA.

3.4. Siembra en medio líquido

Una vez realizada esta etapa, se procedió a realizar cultivo en medio líquido para cada cepa, por duplicado, por lo que se utilizaron 30 tubos de 15 ml que fueron inoculados con 100 μ L de las suspensiones bacterianas contenidas en los tubos eppendorf mencionados anteriormente.

Una vez dispuestos los tubos inoculados con cada cepa por duplicado, se llevaron a una cámara de incubación a una temperatura de 37°C en condiciones de anaerobiosis (sin agitación).

3.5. Determinación de la concentración bacteriana

La concentración de bacterias se midió mediante un espectrofotómetro “eppendorf BioPhotometer” a 600 nm, utilizando el siguiente procedimiento: de los tubos de 15 ml que contienen el cultivo celular se tomaron 1 ml de cada uno y se añadieron a cubetas, una para cada cepa.

La primera medición de absorbancia se realizó una vez transcurridos 24 horas de incubación de las cepas bacterianas a 37°C. posteriormente se realizaron mediciones cada 3 horas después de transcurridas 45 horas desde el inicio.

Se consideraron válidos aquellos valores situados entre 0,2 y 0,8. Los cultivos bacterianos que mostraron una DO_{600} superior a 0,8 se diluyeron 1/5 o 1/10 para obtener lecturas adecuadas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

Los valores de crecimiento de las diferentes cepas de cada lote en los cuatro medios de cultivo ensayados se recogen en las Tablas 1, 2 y 3. En dichas tablas se indica la DO_{600} obtenida para cada ensayo en las distintas fechas (a las 24, 45, 48, 51 y 70 h después de la inoculación en el lote 1; a las 24, 45, 46 y 49 h para los lotes 2 y 3).

Tabla 1: Crecimiento observado para las cepas (DES-468, DES-401, DES-452, DES-428, DES-444) del lote 1 en los medios de cultivo RCM, BSM y MRS-Cys

Lote 1									
Medio	Cepa	23-05-2017 14:00:00 (T0)	24-05-2017 14:00:00 (T1)	25-05-2017 11:00:00 (T2)	25-05-2017 14:00:00 (T3)	25-05-2017 17:00:00 (T4)	Promedio T5-T6	26-05-2017 12:00:00 (T5)	26-05-2017 12:00:00 (T6)
RCM	DES-468	0	0,012	0,533	0,771	0,994	1,270	1,240	1,30
	DES-401	0	2,287	2,335	1,614	2,294	3,650	3,790	3,51
	DES-452	0	1,405	1,123	2,150	1,815	3,145	3,040	3,25
	DES-428	0	0,474	1,403	1,742	1,712	2,400	2,370	2,43
	DES-444	0	0,043	0,265	0,391	0,367	0,655	0,540	0,77
BSM	DES-468	0	0,004	0,389	1,482	1,555	1,415	1,410	1,42
	DES-401	0	2,188	1,945	2,222	2,257	3,320	3,220	3,42
	DES-452	0	0,749	0,847	1,792	1,800	2,330	2,180	2,48
	DES-428	0	0,659	1,385	1,556	1,573	1,940	1,440	2,44
	DES-444	0	0,029	0,765	1,377	1,774	2,460	3,580	1,34
MRS-Cys	DES-468	0	-0,018	0,600	1,124	1,287	1,880	1,950	1,81
	DES-401	0	2,617	3,080	2,742	****	5,005	5,350	4,66
	DES-452	0	0,036	0,068	0,106	0,171	1,755	2,140	1,37
	DES-428	0	0,027	0,243	0,425	0,702	4,205	4,010	4,40
	DES-444	0	0,049	0,038	0,121	0,181	0,545	0,540	0,55
	Tiempo (h)	0	24	45	48	51	70	70	70

Tabla 2: Crecimiento observado para las cepas (DES-421, DES-455, DES-451, DES-456, DES-415) del lote 2 en los medios de cultivo RCM, BSM y MRS-Cys

Lote 2							
Medio	Cepa	05-06-2017 14:45:00 (T0)	06-06-2017 14:45:00 (T1)	07-06-2017 11:45:00 (T2)	Promedio T3-T4 14:45:00	07-06-2017 14:45:00 (T3)	07-06-2017 15:45:00 (T4)
RCM	DES-421	0	1,252	0,743	1,241	0,854	1,627
	DES-455	0	0,749	1,278	1,324	1,443	1,205
	DES-451	0	1,185	1,553	1,594	1,593	1,594
	DES-456	0	2,123	2,104	1,724	1,876	1,572
	DES-415	0	0,147	1,905	2,256	2,196	2,316
BSM	DES-421	0	0,874	1,705	1,662	1,721	1,603
	DES-455	0	1,102	1,567	1,562	1,553	1,57
	DES-451	0	0,96	1,186	1,123	1,176	1,069
	DES-456	0	1,342	1,479	1,495	1,479	1,511
	DES-415	0	0,029	0,994	1,141	1,121	1,161
MRS-Cys	DES-421	0	0,034	0,063	0,013	0,081	0,013
	DES-455	0	0,007	0,022	0,054	0,072	0,035
	DES-451	0	0,026	0,037	0,036	0,044	0,028
	DES-456	0	0,022	0,041	0,033	0,057	0,008
	DES-415	0	0,016	0,190	0,264	0,217	0,311
	Tiempo (hrs)	0	24	45	48	48	49

Tabla 3: Crecimiento observado para las cepas (DES-407, DES-448, DES-458, DES-39, DES-388) del lote 3 en los medios de cultivo RCM, BSM y MRS-Cys

Lote 3							
Medio	Cepa	05-06-2017 14:45:00 (T0)	06-06-2017 14:45:00 (T1)	07-06-2017 11:45:00 (T2)	Promedio T3-T4	07-06-2017 14:45:00 (T3)	07-06-2017 15:45:00 (T4)
RCM	DES-407	0	1,662	1,785	1,777	1,768	1,786
	DES-448	0	2,068	1,864	1,964	2,020	1,908
	DES-458	0	1,779	1,991	2,000	1,820	2,18
	DES-39	0	1,039	1,956	1,910	1,980	1,84
	DES-388	0	2,313	2,184	2,341	2,481	2,2
BSM	DES-407	0	1,519	1,612	1,647	1,642	1,652
	DES-448	0	2,176	1,800	2,030	2,048	2,012
	DES-458	0	2,034	1,580	1,902	1,940	1,864
	DES-39	0	0,565	1,486	1,491	1,484	1,498
	DES-388	0	1,058	1,966	1,912	2,040	1,784
MRS-Cys	DES-407	0	0,638	2,113	1,566	1,552	1,58
	DES-448	0	2,326	3,088	3,078	3,168	2,988
	DES-458	0	0,046	0,114	0,091	0,056	0,125
	DES-39	0	0,285	1,379	1,466	1,591	1,341
	DES-388	0	0,085	0,099	0,628	0,092	1,164
	Tiempo (hrs)	0	24	45	48	48	49

En las figuras 2 a la 10 se recogen los crecimientos de las bifidobacterias ensayadas en los distintos medios, de forma gráfica, lo cual permite apreciar mejor la evolución del crecimiento de las distintas cepas. Como se puede observar en dichas gráficas, el crecimiento bacteriano varió sustancialmente entre unas cepas y otras y en los distintos medios de cultivo ensayados.

Medio RCM:

Como se puede observar en la Fig. 2, las cepas DES 401, 452 y 428 tuvieron un crecimiento apreciable (superior a 0,5) a las 30 horas de cultivo. Sin embargo, las cepas DES-444 y DES-468 no presentaron crecimiento apreciable o lo hicieron de una manera más lenta (a partir de las 40 h). Las cepas de crecimiento lento pueden necesitar más tiempo de aclimatación al medio de cultivo.

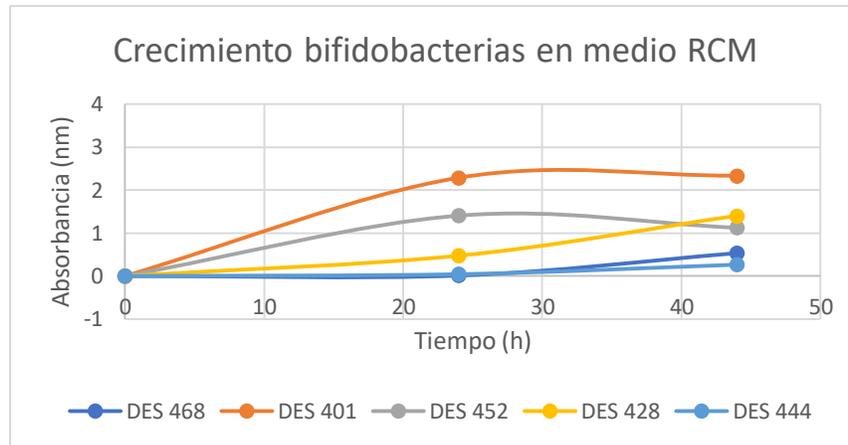


Fig 2. Representación gráfica del crecimiento medido en forma de DO_{600} frente al tiempo de incubación en horas de las cepas del primer lote en el medio RCM.

Como se puede observar en la Fig. 3, se observa un comportamiento muy similar a la del primer lote, en este caso la cepas DES-456, DES-421, DES-451 y DES-455 son las que mejor crecimiento presentan, en cambio la cepa DES-415 se desarrolla a un ritmo mas lento. Esta gran diferencia se puede deber a que el medio RCM es un medio específico para Bifidobacterias ya que presenta buena aclimatación y nutrientes necesarios para un buen crecimiento.

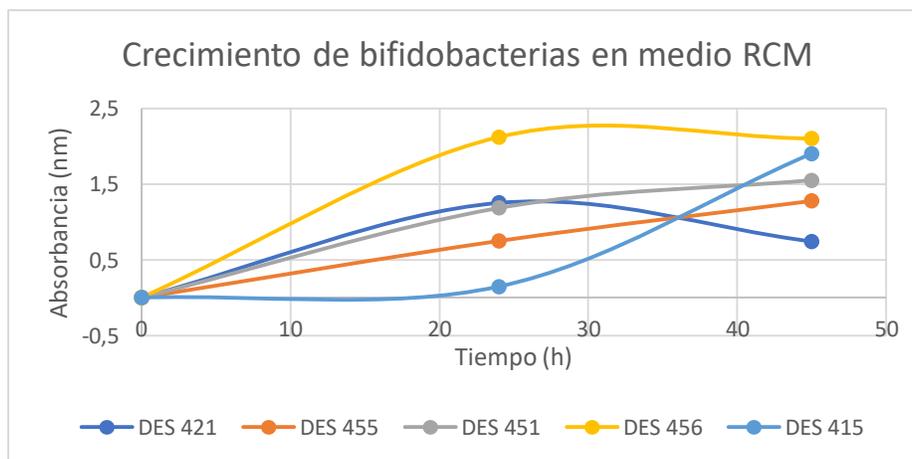


Fig 3. Representación gráfica del crecimiento medido en forma de DO_{600} frente al tiempo de incubación en horas de las cepas del segundo lote en el medio RCM.

En la siguiente gráfica (Fig.4) se observa que todas las cepas presentan buen crecimiento, alcanzando las cepas DES-407, DES-448, DES-458, DES-388 un valor de 0,5

antes de 10 horas de incubación, mientras que la cepa DES-39 crece un poco más lento pero también de forma apreciable. Se podría explicar este comportamiento debido a que el medio es específico para bifidobacterias y presenta componentes como fuentes de carbono (glucosa y almidón soluble) y nitrógeno (peptona) que podrían favorecer dicho crecimiento.

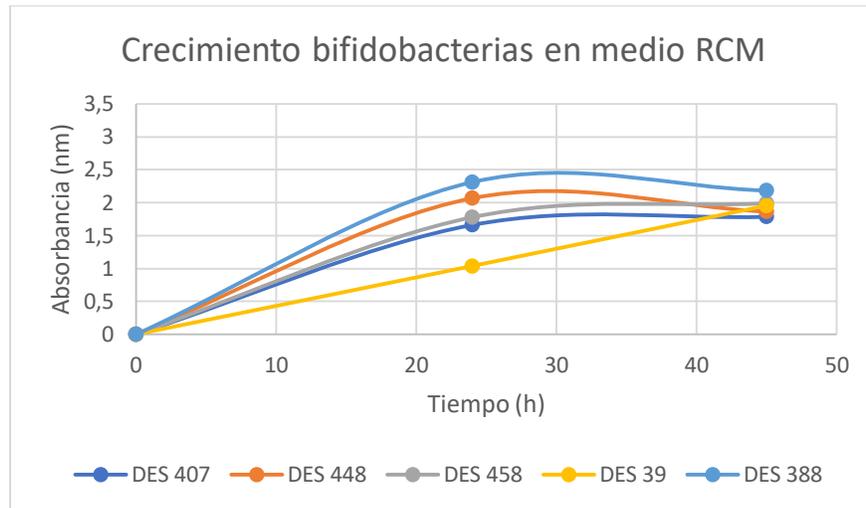


Fig 4. Representación gráfica del crecimiento medido en forma de DO_{600} frente al tiempo de incubación en horas de las cepas del tercer lote en el medio RCM.

En conjunto y tal como se aprecia en las figuras (2, 3 y 4), el medio RCM, a pesar de ser un medio para *Clostridium* permite un buen nivel de crecimiento en la mayoría de las cepas bacterianas estudiadas, en 24 horas de incubación. Así, la cepa que demostró buen crecimiento fue correspondiente al segundo lote, DES-456 de la especie *Bifidobacterium breve*.

Medio BSM:

Como se puede observar en la Fig. 5, las cepas DES 401, 452 y 428 tuvieron un crecimiento muy similar con respecto al medio RCM, (superior a 0,5) a las 30 horas de cultivo, siendo la cepa DES-452 la que desarrollo un mejor crecimiento respecto del cultivo RCM. El resto de las cepas (DES-444 y DES-468) tuvieron el mismo comportamiento que en el caso anterior, crecieron de una manera más lenta (a partir de las 40 h). Las cepas de crecimiento lento pueden necesitar más tiempo de aclimatación al medio de cultivo.

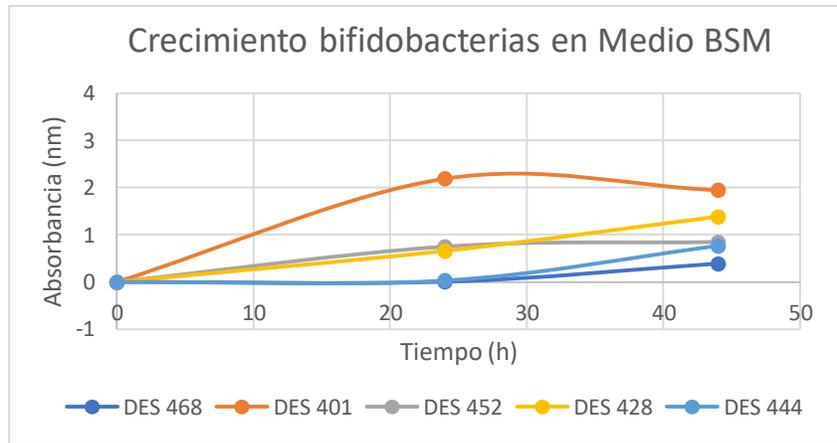


Fig 5. Representación gráfica del crecimiento medido en forma de DO_{600} frente al tiempo de incubación en horas de las cepas del primer lote en el medio BSM.

En la Figura 6 se puede observar que las cepas DES-456, DES-455, DES-451 y la DES-421, todas ellas presentan buen crecimiento, sobrepasando los 0,5 antes de 10 horas de incubación, mientras que la cepa DES-415 lo hace mucho más lento alcanzando 0,5 pasadas las 30 horas.

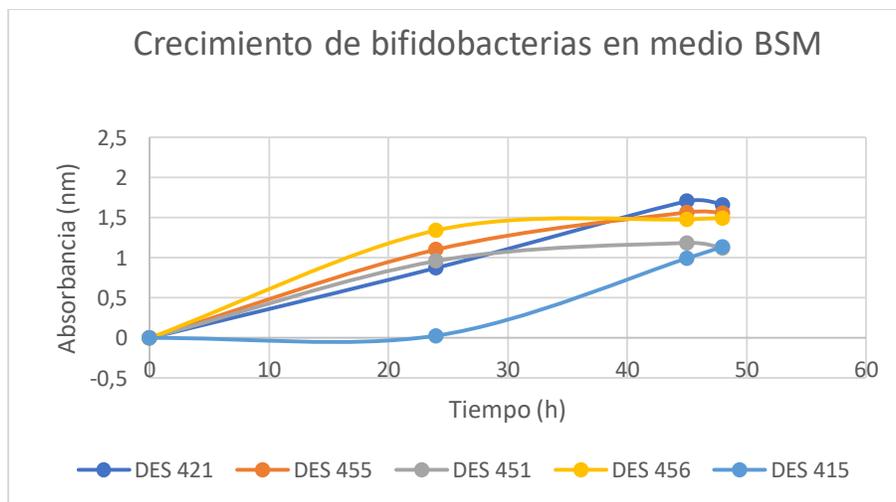


Fig 6. Representación gráfica del crecimiento medido en forma de DO_{600} frente al tiempo de incubación en horas de las cepas del segundo lote en el medio BSM.

Respecto a la gráfica correspondiente al tercer lote (Fig 7), se observa que todas las cepas presentan buen crecimiento, destacando la cepa DES-448 que presenta el máximo entre

ellas, llega a un valor entre 2 y 2,5 al tiempo de 30 horas, las demás cepas crecen a diferente ritmo siendo la más lenta la cepa DES-39.

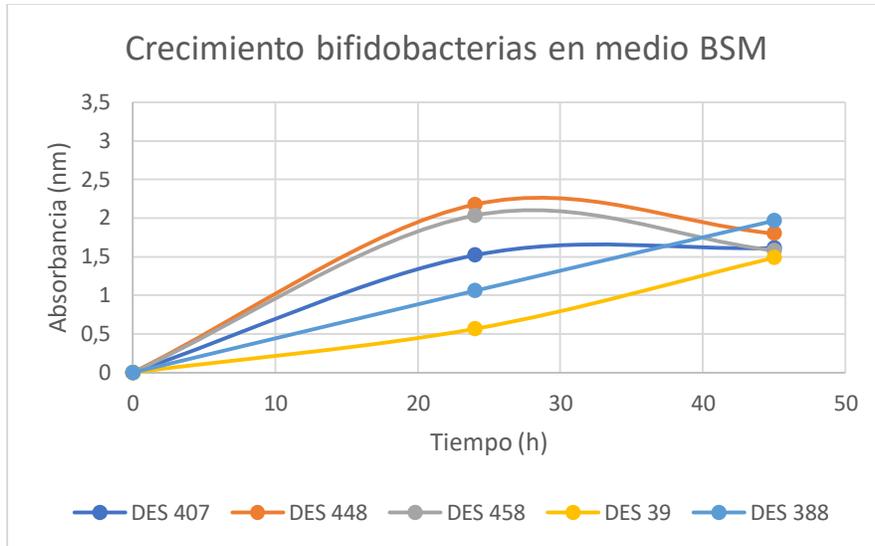


Fig 7. Representación gráfica del crecimiento medido en forma de DO_{600} frente al tiempo de incubación en horas de las cepas del tercer lote en el medio BSM.

En conjunto, y según los datos de las gráficas correspondientes a las figuras 5, 6 y 7, se observa que el comportamiento en este medio de las cepas estudiadas es muy similar a lo observado en RCM, siendo en este caso las cepas bacterianas DES-448 y la DES-458 las que mejor crecimiento tuvieron. Ambas pertenecen a la especie *Bifidubacterium longum ssp infantis*.

Medio MRS-Cys:

Como se observa en la Fig. 8, la cepa DES-401 es la única cepa que logra desarrollar un crecimiento apreciable (cerca de 3) a las 30 horas de cultivo, mientras que el resto de las cepas (DES-468, DES-428, DES-452, DES-444) mostraron un crecimiento muy escaso y lento llegando a 0,5 a las 40 horas para el caso de la cepa DES-468. Esto puede ser debido a que el medio MRS no es un medio específico para Bifidobacterias, a pesar de ser el medio más recomendado.

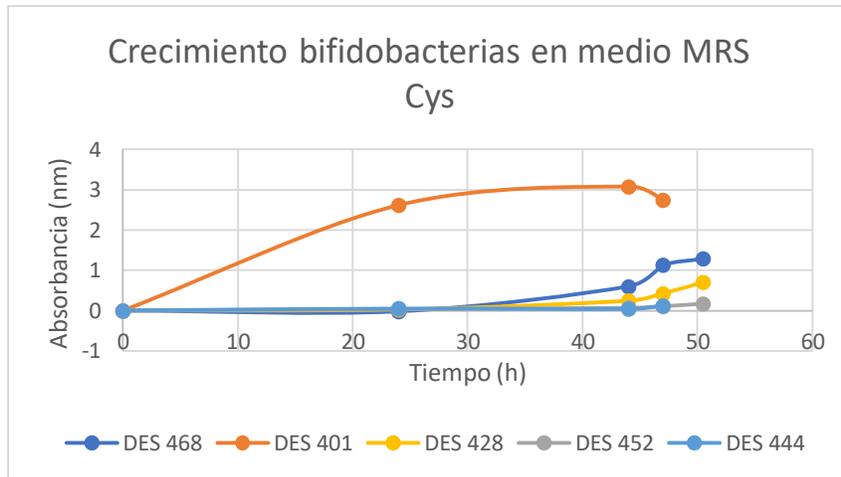


Fig 8. Representación gráfica del crecimiento medido en forma de DO_{600} frente al tiempo de incubación en horas de las cepas del primer lote en el medio MRS-Cys.

En la Figura 9 se puede observar que todas las cepas (DES-421, DES-455, DES-451, DES-456, DES-415), presentan lento y muy escaso crecimiento microbiano, escasamente la cepa DES-415 llega a 0,5 pasada las 40 horas, el cual se puede explicar a la falta de aclimatación de dichas cepas por este medio, no reúne las condiciones necesarias y es poco específico.

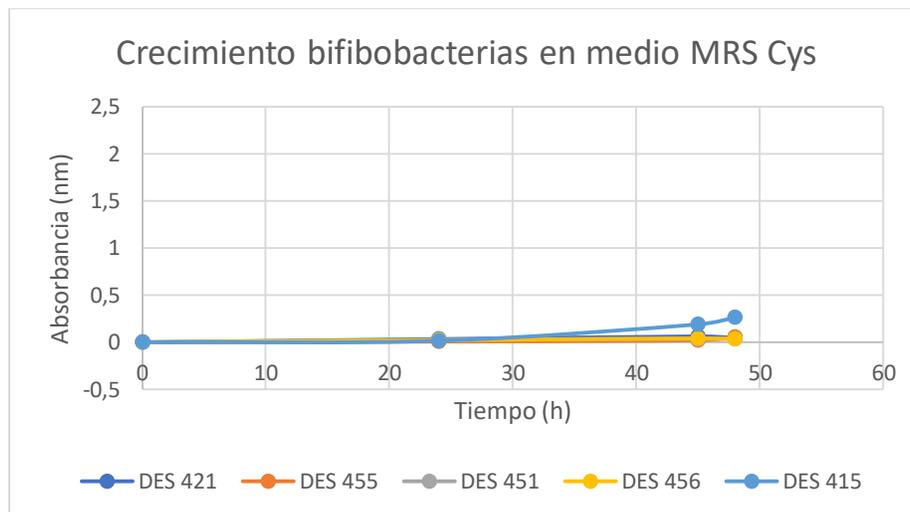


Fig 9. Representación gráfica del crecimiento medido en forma de DO_{600} frente al tiempo de incubación en horas de las cepas del segundo lote en el medio MRS-Cys.

Finalmente, en la Figura 10 se puede apreciar que la cepa DES-448 es la que mejor crecimiento presenta, alcanzando 0,5 antes de 10 horas, las demás presentan un crecimiento un poco más lento como la cepa DES-407 que alcanza 0,5 entre las 20 y 30 horas. Esto puede deberse a la poca aclimatación de algunas cepas y por que quizás requieren de nutrientes más específicos.

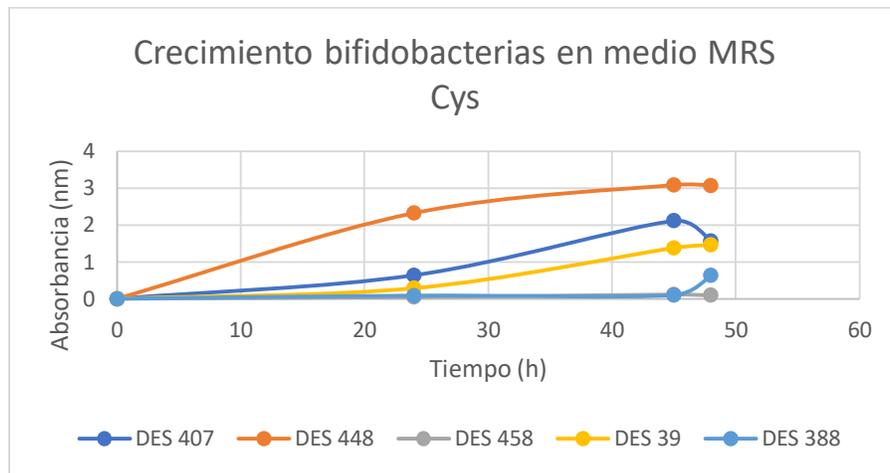


Fig 10. Representación gráfica del crecimiento medido en forma de DO_{600} frente al tiempo de incubación en horas de las cepas del tercer lote en el medio MRS-Cys

El medio MRS-Cys no es un buen medio para el crecimiento de bacterias lácticas pertenecientes al género *Bifidobacterium*, salvo para algunas cepas que no requieren de nutrientes específicos tales como las cepas bacterianas DES-401 y DES-448 correspondientes a las especies *Bifidobacterium animalis* y *Bifidobacterium longum ssp infantis*.

Se observan cepas que muestran un crecimiento lento y/o escaso en los tres medios ensayados.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio presentado indican de todas las cepas de la especie bacteriana *Bifidobacterium breve*, muestran un grado de crecimiento satisfactorio con los medios de cultivo RCM y BSM, siendo el medio RCM donde mejor crecimiento obtuvieron.

Otros microorganismos, como la cepa DES-401 perteneciente a la especie bacteriana *Bifidobacterium animalis* y la cepa DES-448 perteneciente a la especie bacteriana

Bifidobacterium longum ssp infantis tienen la particularidad de presentar crecimientos, que si bien es cierto no son elevados (no llegan a una DO_{600} de 2,5 o 3), son muy similares en los tres medios diferentes. De estos datos, podría deducirse que estas cepas no requieren nutrientes específicos para su desarrollo.

En la industria de ingredientes probióticos, considerando que tanto los medios RCM como BSM presentan condiciones de crecimiento idóneas para cepas bacterianas de bifidobacterias al ser estos medios específicos, se trabaja generalmente con el medio RCM por un tema de costos, dado que el medio BSM es mucho más caro.

Llama la atención que el medio MRS-Cys, habitualmente recomendado para el cultivo de *Bifidobacterium*, no permita alcanzar grados de crecimiento similares a los otros dos medios empleados en este trabajo. Los tres medios de cultivo son medios complejos, en los que es difícil detectar que necesidades nutricionales no se están satisfaciendo en alguno de ellos. A grandes rasgos, la fuente de carbono (dextrosa en MRS y BSM; dextrosa y almidón en RCM) no parece ser el nutriente limitante en el medio MRS. Por otro lado, la fuente de nitrógeno (en forma de peptonas, extracto de carne y de levadura) se encuentra en concentraciones comparables en los tres medios de cultivo. Es posible que otros factores, como el pH inicial o la concentración de L-cisteína (agente reductor que favorece el crecimiento de microorganismos anaerobios) puedan ser la causa del distinto nivel de crecimiento alcanzado por la mayoría de cepas estudiadas en los medios RCM y BSM por una parte, y el medio MRS-cys por otra.

5. CONCLUSIONES

Una vez finalizado este trabajo y habiendo obtenido los resultados cuyo análisis se han detallado anteriormente, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. De los cuatro medios de cultivo ensayados, los medios RCM y BSM son los medios más adecuados para el cultivo de bifidobacterias. Ya que han permitido obtener DO_{600} superiores a 2.
2. El medio MRS-Cys no es un medio eficaz para el desarrollo de bifidobacterias, ya que en ningún caso se han obtenido crecimientos correspondientes a DO_{600} superiores a 3.

3. Las únicas cepas de la especie *Bifidobacterium bifidum* estudiada, DES-444 y DES-468, han mostrado un bajo crecimiento en todos los medios ensayados, lo cual hace indicar que requieren para su crecimiento de condiciones nutricionales especiales.

6. BIBLIOGRAFÍA.

1. Lilly, D.M. & R.H. Stillwell. 1965. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147:747-8.
2. Sperti, G.S. 1971. Probiotics. West Point, CT: Avi Publishing Co.
3. Huang, S. et al., (2017) "*Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review*". *Trends in Food Science & Technology*. Pag. 1 – 17.
4. Saarela, M., et al., 2000. "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties". *Journal of Biotechnology* 197:215-84
5. Gomes, A. et al., 2009. "Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects". *Trends in Food Science & Technology*. Volume 20, Issue 8, Pages 344:354
6. López, B.; Domingo, D. 1965. "Antibioticoterapia con probióticos. *Rev. Esp. Quimioterap. XX*": 170-181.
7. Estrada, A.; Gutiérrez, L.; Montoya, O. 2005. "Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *lactobacillus* spp. Contra *salmonella* spp. y *Escherichia coli*". *Rev. FCA. LVII*: 2601-2609.
8. Batista, L.D. et al., 2015. "Quality parameters of probiotic yogurt added to glucose oxidase compared to commercial products through microbiological, physical–chemical and metabolic activity analyses". *Food Research International*. 627:635
9. Coeuret, V., et al., 2004. "Numbers and strains of *lactobacilli* in some probiotic products" Laboratoire de Microbiologie Alimentaire USC INRA, Université de Caen Basse-Normandie, Esplanade de la Paix, 14032 Caen Cedex, France Received 20 February 2003; received in revised form 2 March 2004; accepted 19 April 2004"
10. Silva, H.L.A., et al., 2017. "Effect of sodium reduction and flavor enhancer addition on probiotic Prato cheese processing". Article in press
11. M. Monachese, et al., 2011. "Probiotics and prebiotics to combat enteric infections and HIV in the developing world: a consensus report *Gut Microbes*", 198:207-2.

12. Anthoula, A.; Efstathios, Z.; Chrysoula C.; 2016. "Chapter 25 – Probiotics from the Olive Microbiota". Pp 371-389.
13. Sendra. E.; Sayas-Barberá , M., Fernández-López, J.; and Pérez-Alvarez, J.; 2016. "Effect of Food Composition on Probiotic Bacteria Viability". pp 257-269.
14. (EFSA) TEFSAEFSA on dietetic products, nutrition and allergies (NDA); Scientific opinion on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function(2010)
15. Burity, F.; Benadini, R.; & Saad, S. 2016. "Chapter 23 – Probiotic and Prebiotic Dairy Desserts"
16. Tripathi, M.; Giri, S.; 2014 "Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage" pp 225-241
17. Jiménez, M., 2010 "Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral". Universidad de Granada, Facultad de Farmacia. Recuperado de <https://hera.ugr.es/tesisugr/19121507.pdf>
18. Ramírez, L.; Pèrez, M. 2007. "CNCTC07-18. Características de bacterias lacticas termorresistentes como posibles probioticos". Memorias del Coloquio Nacional en Ciencia y Tecnología de la Carne.
19. García, E. (2015) "Estudio de la diversidad microbiana en muestras de leche humana". Universidad de Valladolid.
20. Bhaskara, M.; Kumaravelb, S. (2017) "A case of pyometocolpos with *Bifidobacterium* specie". pp 48 – 50, volumen 44.
21. Perdana, J.; et al.; (2013) "Dehydration and thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Comparing single droplet drying to spray and freeze drying". Food Research International. Pag. 1351-1359. Vol. 54.
22. Huq, T.; et al., (2017) "Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin". Pag. 61 – 69 Vol. 168.
23. Halim, M.; et al., (2017) "Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during freeze-drying and exposure to high acidity, bile salts and heat". LWT - Food Science and Technology. Pag. 210 – 216.
24. Ouwehand, A.; Röytiö, H. (2015) "1 – Probiotic fermented foods and health promotion". Avances in fermeted Foods and Beverages. Pag. 3 – 22.
25. García, E., (2014/2015) "Estudio de la diversidad microbiana en muestras de leche humana". Universidad de Valladolid. Palencia.

26. Sigma Aldrich, recuperado de: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/88517dat.pdf>

7. AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no pudo ser posible sin la ayuda y colaboración del equipo del Departamento de Investigación de la empresa Biosearch life, conformado por Oscar Bañueños Ortugüela, Roberto Luque Buitrago y Ana Sañudo Otero.

También expreso mis agradecimientos a mi tutura académica de la Universidad de Valladolid, la profesora Elena Hidalgo y a la profesora Felicidad Ronda por la colaboración con mi trabajo.

Por otro lado, agradezco el apoyo de mi familia, que siempre han estado apoyándome en todo, en especial a mi tía Cecilia Castillo Cortés y a mi madre Sabina Castillo cortés.

También dedico este trabajo a la memoria de quien en paz descansa, mi mamita Laura Cortés Plaza a quien la llevo en mi corazón.