

T / BSA

T  
479

84306

T  
132

OPTIMIZACION DEL MEDIO DE CULTIVO TPYG PARA LA  
PRODUCCION DE BIOMASA ACTIVA DE *Bifidobacterium infantis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

P R E S E N T A :

ALEJANDRO ALBERTO AZAOLA ESPINOSA

EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA ESTÁ INCLUIDO EN EL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL CONACyT Y ADEMÁS CUENTA CON APOYO DEL MISMO CONSEJO, CON EL CONVENIO PFP-200-93

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad  
Xochimilco aprobó la tesis que presentó

ALEJANDRO ALBERTO AZAOLA ESPINOSA

El día 8 de marzo de 2000.

Comité Tutorial:

Tutor: DRA. SUSANA SAVAL BOHORQUEZ

Asesor: DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

Asesor: DR. SERGIO HUERTA OCHOA

Sinodal: DR. GUSTAVO GUTIERREZ LÓPEZ

Sinodal: DR. FRANCISCO RUIZ TERAN

## INDICE

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	6
Productos fermentados	7
Lactobacilos y bifidobacterias como probióticos	8
Efectos de las bifidobacterias en la salud	12
Consideraciones tecnológicas deseables para las bifidobacterias	15
Metabolismo de las bifidobacterias	16
Requisitos nutricionales y de cultivo	17
Producción	23
Metodología de Superficie de Respuesta	25
Diseño estadístico ortogonal central con puntos estrella ( $\alpha$ )	29
Aplicaciones biotecnológicas	31
Justificación	33
Objetivo	35
Objetivos particulares	35
Metodología	36
Microorganismo	36
Medio de cultivo	36
Conservación de la cepa	36
Elaboración de la curva estándar de peso seco vs. absorbancia	37
Fermentación	38
Adaptación de la cepa	38
Cultivo	38
Métodos analíticos	38
Células viables o activas	39
Diseños experimentales	39
Resultados	40
Producción de células	40
Efecto de los componentes del medio TPYG	40
Ausencia de un ingrediente	40
Ausencia de sales minerales	43
Ausencia de aminoácidos	46
Análisis factorial de los ingredientes que aportan nitrógeno	48
Diseño ortogonal central con puntos estrella	50
Medio M-1	54
Medio M-2	56
Medio M-3	56
Medio optimizado	65
Medio optimizado con amortiguador	68
Discusión	76
Conclusiones	86
Bibliografía	88
Anexos	99

## Resumen

El tracto gastrointestinal de los humanos es habitado por una compleja colección de microorganismos, conocida como microflora normal. Las especies predominantes son anaerobios obligados y entre ellos destaca el género de las bifidobacterias o microflora benéfica. Este género coloniza el colon poco después del nacimiento y está presente en gran número en infantes amamantados, pero los cambios en la alimentación disminuyen la presencia de este género. Recientemente las bifidobacterias tienen importancia debido al incremento en el mercado de productos lácteos y probióticos.

Para la producción de bifidobacterias, la literatura menciona algunas condiciones, principalmente ambientales y de los medios de cultivo, pero no explican el papel de los componentes de los medios de cultivo o de sus interacciones en la producción de biomasa y en los medios complejos no se conoce el efecto de los ingredientes o de sus interacciones

Se han desarrollado diseños experimentales factoriales y modelos matemáticos para analizar el crecimiento bacteriano. El desarrollo de estos modelos estadísticos permite a los microbiólogos elaborar predicciones confiables y rápidas del papel de los componentes de los medios de cultivo sobre el crecimiento celular.

El objetivo de este trabajo es la optimización del medio de cultivo TPYG para la producción de biomasa activa de *Bifidobacterium infantis*. La literatura reporta que los medios de cultivo

mas usuales son de composicion compleja pero no se conoce el efecto de los componentes ni sus interacciones en la obtencion de biomasa

En este estudio se realizo primero un diseño factorial de los componentes nitrogenados del medio de cultivo TPYG. peptona de caseina, peptona de soya y extracto de levadura. los resultados muestran que es necesaria la presencia de estos sustratos

Para evaluar el efecto de los ingredientes que aportan nitrógeno y de la glucosa en la obtencion de biomasa de *B. infantis*, se realizo un diseño ortogonal central con puntos estrella. los resultados no permitieron optimizar el medio de cultivo, por lo que se diseñaron tres medios donde se variaron las concentraciones de los cuatro ingredientes. Estos medios se denominaron como M-1, M-2 y M-3. En este ultimo y en las corridas correspondientes a los valores maximos (+1) del diseño factorial, fue donde se obtuvo la mayor produccion de biomasa, 4 g l

A partir de los resultados anteriores, se realizo un diseño experimental ortogonal con puntos estrella. Las concentraciones en el punto central fueron de 7.5 g l de peptona de caseina, 4 g l de peptona de soya, 15 g l de extracto de levadura y 10 g l de glucosa

El analisis matemático de este experimento pronostico un crecimiento de biomasa de 11 g l. Al realizar el analisis experimental se logró obtener 8 g l de células. Por lo que la diferencia en el resultado podria deberse a la disminucion del pH del medio de cultivo

evitar el efecto del pH en el medio de cultivo, este se preparo con un amortiguador de fosfatos 0.2M pH 7. Bajo estas condiciones se logro igualar la obtencion de biomasa entre el valor teorico y el experimental.

## Abstract

The large intestine of humans is inhabited by a complex collection of microbes, mostly bacterial species, known collectively as the normal microflora. The predominant species are obligatory anaerobes, and among them its possible to find members of the genus *Bifidobacterium*, known as beneficial microflora. These species colonize the intestinal tract soon after birth and are present in large populations in breastfed infants. Changes in nutritional habits tend to diminish the number of these bacteria. Bifidobacteria have recently received much attention because of the increasing demand for new dairy products as probiotics in the international market.

Some authors have mentioned optimal conditions for growth of bifidobacteria, but they do not explain the influence of the media components or their interactions in the biomass production. Little attention has been paid to the effect of complex media and their role in biomass production remain unclear.



Factorial design and mathematical models have been developed to analyze bacterial growth. The development of statistical models allows the microbiologist to make an accurate prediction of the composition of the growth media with speed and confidence.

The objective of this work is the optimization of a culture media for the production of bifidobacterium bioactive mass. The literature reports that most common culture media have a complex composition, but the components effects as well as their interactions for the biomass production are unknown.

A factorial design of the three nitrogenated components; casein peptone, soja peptone and yeast extract has been performed. The results show that at first the presence of all the ingredients was necessary.

In order to observe the effect of all the ingredients, a central orthogonal design was performed. The result did not allow the optimization of the culture medium, therefore three culture media with a variation of their ingredients were outlined. These culture media were named M-1, M-2 and M-3. The highest biomass production was 4 g/l in the M-3 medium and this also was observed in the subsequent runs to the factorial design maximum values.

A new orthogonal design was performed from the previous results. The concentrations were 7.5 g/l caseine-peptone, 4 g/l de soybean-peptone, 15 g/l de yeast extract and 10 g/l glucose.

The mathematical analysis of the experiment predicts 11 g/l. of biomass. In the experimental analysis 8 g/l of cells were obtained. The difference was caused by a diminution of pH.

In order to avoid the acidity or pH effect, this media culture was prepared with a phosphate buffer 0.2M pH 7. Under this conditions, the biomass obtained was equal between the theoretical and experimental values.

## **Introducción**

La fermentación es uno de los métodos más antiguos y utilizados para la conservación de alimentos. Prácticamente, todas las naciones tienen y conservan algún tipo de alimento tradicional fermentado principalmente por la acción de bacterias lácticas puras o en consorcios con otros microorganismos.

Los alimentos fermentados terapéuticos o probióticos, son productos que utilizan un tipo especial de microorganismos, que tienen la propiedad de sobrevivir durante su paso por el intestino, produciendo compuestos probióticos que pueden ser preventivos o protectores del huésped, animal o humano. Existe un gran número de productos que se han desarrollado recientemente que usan bacterias ácido lácticas (BAL) seleccionadas o modificadas genéticamente, los cuales son insuficientes para cubrir la demanda de la industria de alimentos, consumidores humanos y productores de ganado (Fuller, 1989; Ishibashi y Shimamura, 1993).

El hombre primitivo no tenía el concepto de los mecanismos que envuelven a la fermentación y del papel de los lactobacilos. Fue hasta hace 300 años que Leeuwenhoek describió los microbios y solo 116 años que Pasteur desarrolló el concepto de deterioro de los alimentos y fermentación. Al mismo tiempo, Koch demostró que los microbios pueden causar enfermedades específicas. Así, mucho de lo que ahora se conoce sobre los microorganismos y las fermentaciones, ha sido comprendido en los últimos 100 años (1-http).

## **Productos fermentados**

Desde principios de siglo se ha presentado un marcado incremento en la producción industrial de alimentos lácteos fermentados. La tecnología ha ayudado a incrementar el tamaño de esta rama de la industria al disminuir los tiempos de producción y maduración, al prolongar los tiempos de almacenamiento y preservación y por la presentación de gran diversidad de productos, así como también al desarrollo de alimentos fermentados derivados de cereales, vegetales y frutas.

Los productos fermentados han sido y son fuentes de energía y nutrientes en todas las culturas antiguas y actuales, es decir, se han desarrollado con la civilización. Este tipo de alimentos han ayudado a sostener la población humana y pueden ser producidos y distribuidos a costos relativamente bajos. Los alimentos fermentados son generalmente seguros para su consumo, altamente nutritivos ya que proveen calorías, proteínas, vitaminas, minerales y sustancias prebióticas.

Ante el considerable aumento de la población, la malnutrición y hambre en los países en desarrollo, aunado a la mala distribución de la riqueza y el uso de los alimentos como fuente de poder y el agotamiento de la biosfera, obliga y dá razón para el desarrollo de procesos para mejorar las condiciones de vida de la sociedad.

Aún cuando los microorganismos pueden afectar a los alimentos hasta el grado de hacerlos totalmente inaceptables para el consumo humano, el conocimiento de los microorganismos y

de sus mecanismos de control de crecimiento y de sus vías metabólicas, pueden jugar un papel importante en la preservación de alimentos fermentados con BAL. Estas bacterias convierten los azúcares en ácidos orgánicos como el láctico y acético, que provocan la disminución del pH, producen peróxido de hidrógeno y metabolitos secundarios como las biocinas, que ayudan a prevenir la posible contaminación por bacterias patógenas o enterotoxigénicas.

Los probióticos generalmente se refieren a microorganismos viables, cultivados en productos lácteos o suplementos alimenticios con BAL; y de pocos años a la fecha, de bifidobacterias. Los probióticos tienen un efecto benéfico en el huésped por mejorar la integridad de la flora intestinal normal. Estos productos probióticos incluyen alimentos congelados, tabletas o cápsulas y recientemente, diferentes productos lácteos fermentados. Aunque la primera leche fermentada con bifidobacterias fue introducida al mercado hace más de 50 años, es a partir de la década de los 70's que se encuentran en el mercado más de 70 productos en varias presentaciones y aproximadamente la mitad de ellos son manufacturados en Japón (Tamime y col., 1995).

### **Lactobacilos y Bifidobacterias como probióticos**

Iljia Metschnikoff en 1908 (1-<http>) fue el primero que propuso el consumo de lactobacilos para evitar y contrarrestar intoxicaciones internas (autointoxicación) causadas por un tipo maligno de componentes en la flora intestinal y para prevenir distintos tipos de enfermedades. Hoy en día, se encuentra en la bibliografía una gran cantidad de investigaciones y protocolos

clínicos, enfocados a demostrar los efectos terapéuticos y preventivos de lactobacilos y bifidobacterias administrados en humanos, cuando existen efectos colaterales por el uso de antibióticos o por infecciones virales en niños y también, cuando son agregados como suplementos en animales. Sin embargo, la interacción de la microflora intestinal con la fisiología, nutrición y metabolismo de animales superiores, así como su papel en enfermedades y en la salud sigue siendo un área muy controversial, por lo que es necesario realizar más estudios y protocolos clínicos amplios y rigurosos (Elmer y col., 1996).

Las bifidobacterias son habitantes normales del tracto gastrointestinal de especies animales y humanas. Son una de las especies predominantes junto con los géneros *Peptococcaceae*, *Eubacteriaceae*, *Clostridia*, y *Bacteroides*, los cuales se encuentran en cantidades de  $10^8$ - $10^{11}$  bacterias/g de materia fecal. (Salminen y col., 1995; Mitsuoka, 1990). Las bifidobacterias constituyen el 95% de la población total de la microflora intestinal en recién nacidos y el 25% en adultos (Gibson y Roberfroid, 1995), su número declina conforme la edad avanza y los hábitos alimenticios cambian (Mitsuoka, 1990) y se les considera como microorganismos no patógenos benéficos para la salud humana y animal (Fuller, 1989; Gibson y Wang, 1994).

Las bifidobacterias difieren de las bacterias lácticas en que producen como productos finales de la fermentación de la glucosa los ácidos láctico y acético (Scardovi, 1981). Su clasificación ha cambiado con el tiempo desde que fueron descubiertas. A la fecha se conocen aproximadamente 32 especies distintas (Kaufmann y col., 1997). Este género es uno de los predominantes en el intestino durante el ciclo de vida y es uno de los grupos predominantes en el intestino de niños amamantados con leche materna, aunque la función de estas bacterias en

el colon no ha sido bien entendida. En estudios realizados con niños alimentados con leche materna, se encontró que el riesgo de infecciones y diarreas es bajo, comparado con niños alimentados con leches de fórmula (Heinig y Dewey, 1996), esta diferencia parece estar muy relacionada con la presencia de bifidobacterias.

Para que las bifidobacterias puedan ejercer su efecto probiótico, primero deben resistir la acidez del tracto gastrointestinal. Estudios en adultos (Bouhnik y col., 1996; Hove y col., 1994) y en niños (Langhendries y col., 1995; Hudault y col., 1994) confirman que algunas cepas de bifidobacterias son capaces de sobrevivir el paso por el tracto gastrointestinal. Para asegurar su sobrevivencia, se recomienda una ingesta tal que produzca un número de bifidobacterias en heces de  $10^6$  a  $10^7$  células viables por gramo de materia fecal. (Sanders y col., 1996) Para lograrlo, los productos comerciales deben tener altas concentraciones de células viables.

Algunos productos comerciales son combinaciones de bifidobacterias con otras bacterias lácticas (BAL), principalmente con *Lactobacillus acidophilus*, pero la acidez producida por los lactobacilos durante la fermentación, promueve una baja sobrevivencia de las primeras, lo que no permite tener una concentración recomendada para consumo humano de  $10^6$  a  $10^8$  células de bifidobacterias por gramo de producto final (Blanchette y col., 1996). Las futuras formulaciones de probióticos deberán contener concentraciones altas de células, para que el consumidor pueda mantener una dosis de  $10^9$  a  $10^{10}$  células por día y muestre efectos benéficos (Sanders y col., 1996).

Otro aspecto que deben contemplar los probióticos, es la sobrevivencia en anaquel de las cepas utilizadas, principalmente al bajo pH producido por la actividad metabólica y la permeabilidad al oxígeno que permiten los empaques. En un estudio con productos lácteos fermentados con *Bifidobacterium bifidum* se observó que estas bacterias no sobreviven a pH de almacenamiento de 3.9 a 4.6, pero a un pH de 5.6 a 5.8, sobrevivieron el 50% de las células (UFC) después de 8 semanas de almacenamiento en congelación a -20°C. (Laoria y Martin, 1991).

Una característica deseable que tienen las bifidobacterias es la producción de exopolisacáridos (EPS). Abbad y col. (1995) estudiaron la producción de EPS en *Bifidobacterium longum* y encontraron que producen más de 140 mg/l. Para la industria de las bebidas fermentadas lácticas, la producción de estos EPS es importante por que se mejora la textura, incrementa la viscosidad, el aroma y el sabor (Roberts y col., 1995). Pero por la presencia de los EPS, en productos lácteos fermentados mixtos con bifidobacterias, se presenta una tendencia de estas a agregarse al final del proceso, por lo que ha surgido la necesidad de proponer alternativas para la producción de iniciadores lácticos concentrados para ser agregados a productos finales (Boyaval y col., 1992).

Para su producción, los estudios se han encaminado a evaluar el efecto de sustratos en los medios de cultivo. La ventaja de las bifidobacterias de tener actividades proteolíticas, les permite el uso de suero de leche dulce concentrado, de peptonas y de hidrolizados de levadura. También, la adición de sustancias bifidogénicas o prebióticas no digeribles por enterobacterias a bebidas lácteas fermentadas, como los isomalto-oligosacáridos (IMO), (Kaneko y col., 1994)



y fructo-oligosacáridos (FOS) (Muramatsu y col., 1993; Dubey y Mistry, 1996) las bifidobacterias pueden crecer a partir de fuentes de carbono distintas a las que prefieren otras bacterias.

Las bifidobacterias presentan características tecnológicas complicadas para su producción a gran escala, ya que su crecimiento se presenta en ausencia de oxígeno y sus tiempos de generación son mayores que otros cultivos lácticos, además, sus requerimientos nutricionales son complejos y la baja tolerancia y sobrevivencia bajo condiciones de acidez, hace difícil su manejo y encarece su producción. (Corre y col., 1992)

### **Efectos de las bifidobacterias en la salud**

Estudios recientes sugieren que las bifidobacterias pueden ayudar a mantener las funciones normales del tracto intestinal. A este nivel, pueden actuar directamente por su actividad antibacteriana o indirectamente como activadores inmunológicos o al modificar la función de la microflora normal.

Bezkorovainy (1989) reporta que estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de las bifidobacterias para sintetizar vitamina B<sub>12</sub>, piridoxina y ácido fólico. También, las bifidobacterias estimulan la respuesta inmune en el huésped, aumentando la producción de interferon (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas IL-6 e IL-10, esto resultó en estudios con cepas vivas de *B.*

*longum* y *B. animalis* sobre leucocitos humanos *in vitro* (Miettinen y col., 1996). Otro posible mecanismo de acción es la producción de IgA humoral, Link-Amster y col. (1994) encontraron que la IgA aumentó cuando a una población de prueba se le administró bifidobacterias y compararon los resultados con una población control a la que se le administraron *Salmonella typhi* atenuada. En este mismo sentido, Schiffrin y col. (1995) reportaron que la ingestión de bifidobacterias ayudó a incrementar la actividad de fagocitos contra *E. coli*.

Otro aspecto biológico para el huésped es que estas se implanten, proliferen e interaccionen con las células de las paredes intestinales. Bernet y col. (1993) reportan la adhesión de células de *B. breve* y *B. infantis* y *L. casei* a células de colon (línea celular Caco-2) *in vitro*. Los autores proponen que las bacterias interaccionan con la superficie de la mucosa de las células de colon y sintetizan un factor protéico que las ayuda a adherirse y así, ejercen un efecto inhibitorio a la adhesión y colonización de cepas enterotoxigénicas y enteropatógenas. También, la producción de ácidos orgánicos como los ácidos acético y láctico disminuyen el pH intestinal y ayuda a prevenir la colonización de bacterias patógenas (Gibson y Roberfroid, 1995).

En ancianos, la constipación puede ser parcialmente corregida por el consumo de fibras vegetales insolubles que también disminuyen la posibilidad de que moléculas precarcinógenas actúen en el epitelio del tracto gastrointestinal (Thebaudin y col., 1997). Seki y col. (1978) reportaron que el uso de leches fermentadas con bifidobacterias ayuda a corregir la constipación. Las bifidobacterias también ayudan a reducir las sustancias precarcinogénicas y

carcinogénicas que producen cáncer de colon (Kampmann y col., 1994). En estudios realizados en humanos existen evidencias de que el consumo de productos fermentados con bifidobacterias reduce los niveles de enzimas, como la glucuronidasa, que está implicada en la conversión de compuestos precarcinógenos a carcinógenos (Bouhnik y col., 1996; Abdelali y col., 1995; Grill y col., 1995). Takiguchi y col. (1996) reportaron que metabolitos derivados de la putrefacción, como los indoles y el amonio se vieron reducidos por el consumo de probióticos con *B. longum* y *S. thermophilus*, así como aminas heterocíclicas (Orrhage y col., 1994). Sin embargo, Moore y Moore (1995) encontraron bifidobacterias asociadas a cáncer de colon, pero los autores proponen la posibilidad de un efecto benéfico a largo plazo de las bifidobacterias en la prevalencia de esta enfermedad.

En estudios con ratas, Gallaher y col. (1996) demuestran que en tumores inducidos, la administración de bifidobacterias provoca una disminución en la formación de lesiones preneoplásicas en colon.

Saavedra y col. (1994), encontraron evidencias de que infantes alimentados con fórmula adicionada con *B. bifidum* y *S. thermophilus*, disminuye la incidencia de diarreas hospitalarias producidas por rotavirus, comparados con infantes alimentados con leche de fórmula. Existen numerosos estudios *in vitro* para demostrar el efecto antagónico de las bifidobacterias contra bacterias enteropatógenas como *E.coli* (Fujiwara y col., 1997; Gibson y Wang, 1994) que proponen dos mecanismos de acción; la producción de ácidos orgánicos que disminuyen el pH y previenen la colonización de patógenos y la producción de sustancias antimicrobianas.

## **Consideraciones tecnológicas deseables para las bifidobacterias**

Existen una serie de factores tecnológicos que deben ser tomados en cuenta en la producción de productos lácteos fermentados con bifidobacterias. En particular, la pérdida de viabilidad del producto en anaquel y la baja sobrevivencia en pH cercanos a 4.5 o en condiciones aerobias. Para asegurar su efecto probiótico, deben estar presentes en número adecuado (mínimo  $10^6$  células por ml) en el momento de su consumo, pero actualmente no todos los productos en el mercado cumplen con esta condición, por lo que es necesario el desarrollo de técnicas que valoren la presencia de células vivas, especialmente en productos con mezclas de bacterias. (2-http)

Las sustancias antimicrobianas y los compuestos probióticos producidos por BAL, pueden ofrecer soluciones alternativas al desarrollo de aditivos para alimentos utilizados para control de patógenos u otro tipo de contaminantes peligrosos en alimentos. Cepas con capacidad de producir sustancias antimicrobianas (biocinas), pueden ser usadas como fuente de células viables para ser incorporadas a la flora intestinal normal.

Estudios enfocados a explorar las bases genéticas de la síntesis de biocinas, abren nuevas oportunidades y posibilidades para incrementar la producción a escala industrial. Aunque las BAL son generalmente consideradas como seguras (GRAS), estos compuestos antimicrobianos necesitan ser evaluados para usarse como aditivos seguros.

## Metabolismo de las Bifidobacterias

**Requisitos nutricionales y de cultivo.** Las bifidobacterias constituyen un grupo de microorganismos con características metabólicas muy particulares y requerimientos ambientales estrictos, que se deben considerar si se pretende aislarlas y manejarlas en el laboratorio para su estudio, producción y su uso como probióticos.

Se sabe que las cepas de lactobacilos cuyo producto final de la degradación de azúcares es el ácido láctico (homofermentadoras) degradan la glucosa a través de la vía glucolítica; en cambio, las cepas heterofermentadoras lo hacen a través de la ruta de las hexosas monofosfato (DeVries y Stouhhamer, 1967a). Aunque en un principio se consideró a las bifidobacterias en el género de los lactobacilos, su inclusión en este género no se justifica por el metabolismo de carbohidratos que presentan.

DeVries y col. (1967b, 1968) y Scardovi (1981) detectaron ácido acético, ácido láctico, ácido fórmico y etanol como productos finales del metabolismo de carbohidratos en bifidobacterias. Ellos observaron que la producción de estos metabolitos tiene lugar sin la liberación de CO<sub>2</sub>; lo cual indica que no es la ruta glucolítica donde se oxida la glucosa. De Vries y col. (1967a) en un afán de ratificar sus observaciones, buscaron la enzima aldolasa (EC.4.1.2.7), enzima típica de la glucólisis, así como la actividad de la glucosa-6-P-deshidrogenasa (EC.1.1.1.49), enzima característica de la ruta de las hexosas monofosfato. Los autores no detectaron estas actividades en ninguna de las cepas de bifidobacterias estudiadas. Pero también encontraron reportada una ruta alterna para la degradación de glucosa en *Acetobacter xilinum*. Al realizar

estudios en extractos libres de células de bífidos, localizaron actividades enzimáticas análogas a la misma vía, y la enzima clave de ésta es la fructosa-6-fosfato-fosfoacetolasa (F6PPK), que cataliza la reacción: Fructosa-6-P  $\longrightarrow$  acetil-P + eritrosa-4-P. Actualmente la detección de esta enzima se utiliza como un criterio para la identificación de bifidobacterias (Chevalier, 1990). La vía metabólica se muestra en el diagrama 1.

Como productos finales de la oxidación de la glucosa, las bifidobacterias producen 3 moles de ácido acético y dos moles de ácido láctico a partir de dos moles del azúcar (DeVries y Stouthamer, 1967b, 1968; Miller y Wolin, 1996; Wolin y col., 1998). Cuando se utiliza xilosa como fuente de carbono, se produce un mol de cada uno de los mismos productos. Esta relación puede variar con una misma fuente de carbono dependiendo de las cepas bajo estudio (Desjardins y col., 1990; DeVries y Stouthamer, 1968). Por otro lado, el lactato producido por estas bacterias es del tipo L(+), que a diferencia de bacterias lácticas como *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* que producen L(-), es metabolizado por niños menores de un año de edad, no provocando acidez (Rasic, 1989).

La producción de los ácidos orgánicos, sitúa a las bifidobacterias en condiciones ventajosas cuando compiten con las bacterias patógenas por los sitios de adhesión en las células epiteliales del intestino. Esta competencia favorece a la flora autóctona (Juven y col., 1991) al disminuir en consecuencia, la capacidad patogénica de bacterias enteroinvasivas (Hale, 1991).

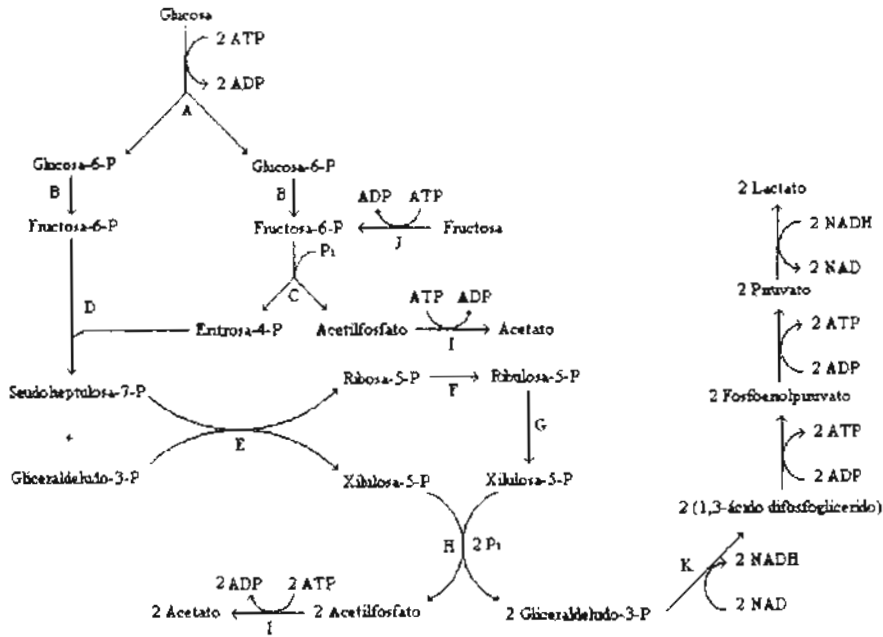


Diagrama 1 Vía metabólica de las bifidobacterias a partir de glucosa (Mitsuoka, 1990)

Una de las razones por las que estos microorganismos necesitan condiciones de estricta anaerobiosis para su desarrollo, es que la presencia del oxígeno permite la formación y la acumulación de peróxido de hidrógeno (Shimamura y col., 1991), muy tóxica por su capacidad de oxidación y que probablemente inactiva a la enzima F6PPK (Poupard y col., 1973), impidiendo así la degradación de la fuente de carbono y provocando la inhibición del crecimiento celular.

Con respecto a la fuente de nitrógeno necesaria para el crecimiento de las bifidobacterias, la información es muy variada. Hassinen y col. (1951) y Bezkorovainy y Miller-Catchpole (1989) reportan que las bifidobacterias pueden crecer en fuentes de nitrógeno simple como el

amonio. Bezkorovainy y Miller-Catchpole (1989) apuntan que el medio debe estar adicionado de cisteína, el único aminoácido necesario para su crecimiento. En otro estudio, Poch y Bezkorovainy (1988, 1991) reportan que arginina, ácido glutámico, isoleucina, leucina, triptofano, tirosina, cisteína y valina estimulan o son esenciales para el crecimiento de las bifidobacterias. Pero al igual que las bacterias ácido lácticas (Aeschlimann y von Stockar, 1990; Olmos-Dichara y col., 1997), las bifidobacterias prefieren fuentes de nitrógeno orgánico (Ballonge, 1993), como la leche descremada (Nagawa, 1988), hidrolizados de caseína (Poch y Beskorovainy, 1988), extracto de levadura, peptonas, casaminoácidos (Resnick y Levin, 1981), albúmina y soya (Fujino y Nagawa, 1989).

Entre más rica y elaborada sea la fuente de nitrógeno, mayor es el crecimiento. Este es el caso de fuentes complejas como el hidrolizado de caseína y el extracto de levadura. La posibilidad de utilizar estas fuentes complejas, radica en la capacidad de las bifidobacterias de producir enzimas proteolíticas extracelulares (Desjardins y col., 1990; Abu-Taraboush y col., 1998; Daigle y col., 1999) que le ayudan a degradar proteínas complejas para su desarrollo y le permiten crecer en medios de cultivo con ingredientes complejos como los hidrolizados de fuentes proteicas, por eso la mayoría de los medios de cultivo incluyen estos compuestos.

Con respecto a las fuentes de carbono, la literatura señala que las bifidobacterias son capaces de crecer en diferentes azúcares como glucosa, galactosa, xilosa, manosa y arabinosa. Sin embargo, arabinosa, manosa y xilosa soportan muy bajas tasas de crecimiento, mientras galactosa favorece una mayor velocidad de crecimiento que la glucosa en algunas de las cepas reportadas (Beverly y Macfarlane, 1991).



Wang y Gibson (1993) reportan la producción de varias cepas de bifidobacterias en medio comercial (PYG) adicionado de oligofruktósidos, inulina, pectinas, almidón o polidextrosa como fuentes de carbono. Ellos observaron que el cultivo en oligofruktósidos induce una mayor velocidad de crecimiento ( $0.27 \text{ h}^{-1}$ ) comparado con la glucosa ( $0.18 \text{ h}^{-1}$ ). En el mismo sentido, McKellar y Modler (1989) y McKellar y col. (1993) reportaron la adición de fructooligosacáridos (FOS, neosugars) e inulina al medio TPY, obteniendo resultados semejantes a los de Wang y Gibson (1993) y concluyen que el uso de este tipo de azúcares tiene un considerable valor comercial como fuente de carbono para las bifidobacterias y como fuente de edulcorantes no calóricos para la industria de alimentos.

Desjardins y col. (1990) reportaron el perfil de enzimas de las bifidobacterias y su capacidad de degradar carbohidratos complejos, ya que este género tiene entre sus enzimas la  $\alpha$ -galactosidasa y  $\beta$ -galactosidasa (Gobbetti y col., 1998), necesarias para la degradación de los azúcares derivados de la leche. Scalabrini y col. (1998) caracterizaron cepas de bifidobacterias con capacidad de utilizar azúcares complejos como rafinosa, estaquirosa y sacarosa, así como derivados de la degradación de ácidos grasos, como n-pentano y n-hexano presentes en hidrolizados de soya, que le dan el sabor y aroma característicos a los derivados de esta planta.

Existen varios estudios sobre el crecimiento de bifidobacterias en azúcares complejos como los fructanos. Hopkins y col. (1998) estudiaron el crecimiento de varias especies de bifidobacterias en oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos. Los autores reportaron que los mejores crecimientos se observan en oligogalactosidos y oligofruktósidos y que las tasas de crecimiento

más altas se encuentran en oligosacáridos como los fructanos y oligogalactosa, así como en azúcares simples. Sghir y col. (1998) y Hartemink y col. (1997) reportaron la utilización de fructooligosacáridos derivados de la inulina como buenos inductores del crecimiento y con capacidad de ser utilizados como sustancias prebióticas. Esto les ayuda a poblar el tracto intestinal de humanos y animales, e incluso dominar sobre otras bacterias de la flora intestinal que no pueden utilizar los sustratos complejos antes mencionados.

Son diversos los medios de cultivo que se emplean para el aislamiento y el crecimiento de bifidobacterias. Estos medios tienen como característica que son ricos en fuentes de proteínas complejas. Bezkorovainy y Miller (1989) reportaron que el primer medio de cultivo empleado para el aislamiento de bifidobacterias fue propuesto por Norris en 1950 y 5 años más tarde György y Rose añadieron leche materna descremada al medio, ambos reportes se trabajaron con *L. bifidus* var. *Pensilvannicus* actualmente conocido como *Bifidobacterium bifidum*. Petschow y Talbot (1990) reportaron que para la misma especie de bifidobacteria, la leche humana es importante, ya que le proporciona derivados de N-acetil-D-glucosamina, que la cepa no produce en cantidades suficientes para el crecimiento.

Como se mencionó anteriormente, las bifidobacterias prefieren sustratos nitrogenados complejos y los medios de cultivo más utilizados para su estudio y producción los contienen. El Medio Comercial Columbia (Difco) propuesto por Beerens (1990) para estudios con este género, contiene entre sus componentes Bacto peptona, Bacto fitona, Peptona de carne y cisteína. El medio TPY (Scardovi, 1981), es un medio de enriquecimiento empleado para la proliferación de los bifidos con el fin de identificarlos por un método enzimático. Este medio fue usado por

Chevalier (1990) y demostró que después de cuatro días se obtiene una cantidad aceptable de bacterias para aislar e identificar la enzima F6PPK.

Otro medio de cultivo es el BL, los componentes de este medio son extracto de carne, extracto de hígado, extracto de levadura, peptona de caseína, peptona de soya, glucosa, almidón soluble, Tween 80 y sales minerales. Los medios de cultivo más usados para la producción de bifidos en investigación son los medios Lactobacilli MRS (Difco) usado por la marca de productos Biogarde<sup>MR</sup> (Wijsman y col., 1989), el medio MRS (Difco) utilizado por Blanchette y col. (1996) en reactores de 110 litros y el medio TPY, pero estos son muy costosos para usarlos en la producción a mayor escala. El medio más reportado por la literatura es el medio TPY. El medio MRS (Difco) contiene básicamente los mismos componentes del medio TPY, solo cambia la fitona por extracto de carne. Payne y col. (1999) evaluaron varios medios de cultivo y reportaron que para el crecimiento de este género son necesarios los ingredientes complejos.

Los bifidos prefieren condiciones donde el potencial de óxido-reducción es bajo, lo que se logra con la adición de compuestos como la cisteína (Desjardins y col., 1990; Poch y Bezkorovainy, 1988) y el ácido ascórbico (Poupard y col., 1973) y sales de estos mismos como agentes antioxidantes, los cuales generan un potencial de óxido-reducción favorable para el crecimiento. A nivel de laboratorio, su producción generalmente se realiza en condiciones anaerobias mediante el uso del sistema Gas-Pack (BBL). En estas condiciones el crecimiento es lento y limitado, puede tomar hasta 72 horas y resulta en un bajo rendimiento de células.

## Producción

Existen pocos reportes para la producción de bifidobacterias en escala comercial. La mayor parte de estos utilizan leches completas y fracciones de suero y caseína de leche de origen animal y humano. Petschow y Talbot (1990) reportaron que la leche completa es buen promotor del crecimiento, sin embargo, después de 24 horas de proceso, las cuentas de células (UFC) caen debido al bajo pH que se genera. Las fracciones de leche utilizadas indican que el crecimiento se debe en gran parte por la presencia de N-acetil-D-glucosamina, siendo la leche humana un mejor promotor que la de origen animal. En el caso de *B. infantis*, *B. breve* y *B. bifidum*, los constituyentes del suero de leche y de la caseína son los que promueven el crecimiento.

Corre y col. (1992) reportaron la producción de *B. bifidum* con suero de leche adicionado de extracto de levadura, caseína y ácido ascórbico en un proceso continuo acoplado a un sistema de ultrafiltración para concentrar las células.

Ventling y Mistry (1993) reportaron la producción de bifidobacterias utilizando leche descremada con un 10% de sólidos totales y concentrada (x5) por ultrafiltración teniendo tiempos de generación de 30 minutos en promedio para *B. longum* y de 1 a 2 horas para *B. infantis*. Los autores reportaron que el sustrato concentrado aumenta la capacidad amortiguadora del medio de cultivo, y que con el control continuo del pH permite mejores condiciones para el crecimiento, no siendo afectado por la producción de ácidos orgánicos.

Desjardins y col. (1990) reportaron el uso de suero de leche con un 10% de sólidos totales para la producción *B. breve*, *B. longum* y *B. infantis* con tiempos de generación de hasta aproximadamente 2 horas. Estos autores observaron que el crecimiento disminuyó por la producción de ácido acético y láctico, siendo más afectado *B. breve* y el menos afectado *B. infantis*. Los autores reportaron también que estos ácidos se producen hasta en un 70% durante la fase estacionaria, inhibiendo con esto el crecimiento después de 12 horas de fermentación (Desjardins y col., 1990). Gomes y col. (1998) utilizaron hidrolizados de leche descremada con un contenido de 60 g/kg de proteína para la producción de *B.lactis* y *L. acidophilus*, obteniendo después de 30 h  $10^9$  UFC en cultivos estáticos. Blanchette y col (1996) reportan la producción a nivel fermentador de 110 litros de bifidobacterias utilizando el medio MRS adicionado de lactosa al 2.5%.

En conclusión, los medios de cultivo reportados en la literatura para la producción de bifidobacterias no permite concluir cuál de ellos es el mejor, sin embargo, el medio TPYG es el que más se encuentra reportado, pero los reportes no examinan la función de los componentes de los medios de cultivo. El uso de métodos estadísticos podrían permitir analizar el papel de cada componente de los medios de cultivo en la producción de biomasa de bifidobacterias.

## **Metodología de Superficie de Respuesta**

La experimentación ha sido la mejor herramienta para resolver problemas prácticos y probar hipótesis teóricas en las ciencias básicas y aplicadas, así como para entender las relaciones entre las variables o factores de entrada y las respuestas, de tal manera que ayuden a comprender mejor los resultados y a mejorar los procesos en estudio. Una forma efectiva de incrementar el valor y calidad de una investigación es seleccionar las respuestas y acotar el proceso experimental en tiempo y costos por medio de técnicas estadísticas bien diseñadas (Sejong y col., 1995).

Si un experimento es una prueba, un diseño es usualmente una serie de pruebas en las cuales los cambios en las condiciones de trabajo son utilizadas como variables de entrada, de tal manera que algún cambio en estas variables pueda ser identificado con facilidad en la respuesta o salida del sistema (Montgomery, 1991).

El método clásico de estudio de la influencia de una variable a un tiempo es poco práctico y no garantiza la determinación de las condiciones óptimas de trabajo (Kalaimahan y Panda, 1995; Hounsa y col., 1996). También, es incapaz de detectar las interacciones que ocurren con frecuencia entre las variables en estudio (Sen y Swaminathan, 1977; Box y col., 1978; Sejong y col., 1995). Por otro lado, el diseño experimental estadístico es una herramienta eficiente para tratar problemas con un gran número de variables (Box y col., 1988) y proporciona la información necesaria sobre la forma y longitud de la respuesta. Además, es eficiente porque

disminuye el número de experimentos y para evaluar la significancia de los factores con un grado de certeza.

En particular, el diseño factorial completo puede ser utilizado cuando la presencia de interacciones complejas es esperada (Box y col., 1978; Hounsa, 1996) o bien, como diseño inicial para seleccionar los factores que realmente afectan la respuesta. Un diseño factorial completo (Box y col., 1978; Montgomery, 1991) incluye todas las posibles combinaciones de los factores en estudio (de aquí el término factorial) y para describir las interacciones de los factores involucrados en sistemas multifactoriales, es una forma de entender los mecanismos detallados de procesos complejos que no son conocidos. Esta metodología permite también, identificar la respuesta como una función de las variables a través de una superficie en un espacio experimental (Hounsa y col., 1996).

La metodología de superficie de respuesta (MSR), que incluye diseños factoriales y análisis de regresión, es una herramienta ideal para estudios de optimización de más de dos variables (Sejong y col., 1995). MSR es una colección de técnicas estadísticas para el diseño, construcción y evaluación de los efectos en estudios multifactoriales, así como para encontrar las mejores condiciones de trabajo para cada respuesta seleccionada (Montgomery, 1991; Saval y col., 1993).

Se ha utilizado la técnica de superficie de respuesta para varias aplicaciones industriales. Esta metodología es utilizada generalmente para determinar las mejores condiciones de cada

variable en estudio y las interacciones de los factores que tienen influencia en los procesos. Todo lo anterior se puede evaluar con un mínimo número de experimentos.

La metodología de superficie de respuesta (Montgomery, 1991) es una técnica estadística de análisis de regresión múltiple en la que utilizando datos cuantitativos generados en experimentos diseñados, resuelve ecuaciones simultáneas multivariadas para asignar nuevos valores a los factores en estudio. La representación gráfica de estas ecuaciones son las superficies de respuesta, que son usadas para describir los efectos individuales y acumulativos de las variables de prueba en la respuesta y para determinar las interacciones entre estas variables de prueba y los subsecuentes efectos en las respuestas. Un diseño central compuesto acoplado a un modelo polinomial cuadrático completo es una combinación poderosa que proporciona representaciones eficientes y adecuadas de superficies continuas de respuesta, mediante el uso de pocos recursos, aunado a una mejor comprensión del efecto de las variables que intervienen para describir el modelo del proceso de manera más real.

En los procesos de fermentación, donde las variables de operación interactúan e influyen en la respuesta, es importante que el método de optimización sea capaz de detectar las variables significativas y sus interacciones en distintas condiciones experimentales. Por ejemplo, un aumento en la concentración de un sustrato tendrá un efecto directo en la tasa de crecimiento del microorganismo, pero además puede alterar la viscosidad del medio de cultivo y en consecuencia, puede reducir la tasa de transferencia de oxígeno del medio. Un incremento en temperatura puede incrementar las tasas de reacción pero reducir la solubilidad de oxígeno (Sen y Swaminathan, 1997).



La aplicación del diseño experimental estadístico en procesos de fermentación, puede dar como resultado una mejora en el rendimiento, la reducción de costos y también el grado de variación del proceso y la optimización, que consiste en medir los efectos cuando cambian las condiciones de operación, así como las interacciones entre las variables de operación, es una opción importante de estudio.

La combinación de los niveles o concentraciones de cada factor, permite que la respuesta óptima pueda ser descubierta por esta metodología. Los tres principios básicos del diseño experimental estadístico son: que sea reproducible, que sea aleatorio y que pueda ser trabajado en bloques. Las repeticiones proporcionan un estimado del error experimental, incrementa la precisión porque reduce el error estándar y así apuntala las bases para identificar las fuentes de variación de las interferencias. La aleatoriedad elimina errores por tratar todos los experimentos de manera similar, eliminando factores ajenos y asegura la independencia entre las observaciones o errores. El bloqueo o hacer el experimento por partes que tengan las mismas características, sirve para incrementar la precisión del experimento y la cantidad de información que este puede proporcionar. Un diseño experimental puede considerarse como poderoso si contempla los tres puntos anteriores.

### Diseño estadístico ortogonal central con puntos estrella ( $\alpha$ )

El diseño experimental central compuesto consiste en un diseño experimental completo  $A^k$  con puntos centrales  $n_0$  y puntos estrella ( $\alpha$ ), donde  $A$  son los niveles,  $k$  es el número de variables,  $n_0$  los puntos centrales o controles donde ( $n_0 \geq 1$ ) y  $\alpha$  son los puntos axiales (puntos estrella) que dan la ortogonalidad al sistema en los extremos de cada variable a una distancia.

El valor de los puntos estrella ( $\alpha$ ) se calcula con la ecuación (1)

$$\alpha = N^{0.25} \quad (1)$$

donde  $N$  es el número de variables. Para calcular el valor de la concentración a utilizar en cada punto  $\alpha$ , el valor de  $\alpha$  se multiplica por la distancia, que se define como la diferencia entre el punto central y los límites superior e inferior del dominio experimental, para cada variable (Myers, 1971; Saval y col., 1993). Así encontramos que

$$+ \alpha = (\text{distancia} \times \alpha) + \text{punto central} \quad (2)$$

$$- \alpha = \text{punto central} - (\text{distancia} \times \alpha) \quad (3)$$

El número total de puntos de estudio es

$$N_t = A^k + n_0 + \text{puntos } \alpha \quad (4)$$

Un diseño factorial ortogonal central compuesto es usualmente utilizado para generar datos que ajusten el proceso a un modelo polinomial de segundo orden. Este diseño experimental es una herramienta que proporciona una representación adecuada de la continuidad de una superficie de respuesta sobre un amplio intervalo de trabajo experimental (Montgomery, 1991).

Para cuatro factores de estudio y considerando las interacciones con posibilidad de ser explicadas, el modelo tiene la siguiente forma (5):

$$\hat{y}_i = b_0 + b_1x_{1i} + b_2x_{2i} + b_3x_{3i} + b_4x_{4i} + b_{11}x_{1i}^2 + b_{22}x_{2i}^2 + b_{33}x_{3i}^2 + b_{44}x_{4i}^2 + b_{12}x_{1i}x_{2i} + b_{13}x_{1i}x_{3i} + b_{14}x_{1i}x_{4i} + b_{23}x_{2i}x_{3i} + b_{24}x_{2i}x_{4i} + b_{34}x_{3i}x_{4i} + E_i \quad (5)$$

El coeficiente  $b_0$  es el intercepto y los términos  $i$  son los efectos de los factores principales. La regresión múltiple puede ser estimada para calcular el contorno de la elíptica en una superficie constante.

Así, un diseño factorial completo  $2^4$  con puntos centrales para cuatro variables de prueba a dos niveles con ocho puntos estrella, indica que no se requieren más de 30 experimentos para completar el estudio.

## Aplicaciones en biotecnología

La literatura muestra gran cantidad de ejemplos sobre el uso específico de esta metodología que ha sido utilizada de manera muy amplia en el área de la biología. Así encontramos que Saval y col. (1993) reportan que el uso de esta metodología permitió desarrollar un medio de cultivo para optimizar la producción de estreptomicina. Zhang y col. (1996) desarrollaron un medio de cultivo desde la fase de laboratorio hasta la de producción a 800 litros de fisioestigmina, un alcaloide producido por *Streptomyces grisoufuscus* con un aumento en la producción de 44 veces. Hoon-Ahn y col. (1997) utilizando esta metodología, estudiaron las condiciones químicas y físicas para la recuperación de una lipasa recombinante de *Pseudomonas fluorescens*, mejorando en un 30% la recuperación de la proteína sobre el método tradicional. Achary y col. (1997) optimizaron la producción de biomasa y de la enzima hidantoinasa de *Agrobacterium radiobacter* en un medio complejo. Roberto y col. (1995), Witjitra y col. (1996), Taillander y col. (1996) y Kimmel y col. (1998) estudiaron con ésta metodología la influencia de componentes del medio de cultivo y de variables físicas como pH y temperatura en la producción de biomasa, células viables y exopolisacaridos de *Candida guilliermondii*, *Clostridium thermoaceticum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* respectivamente, en medios de cultivo complejos.

Este modelo de superficie de respuesta ha sido utilizado también para describir las condiciones que favorecen la presencia de bacterias contaminantes en la producción de bebidas y alimentos fermentados (Waitier y col., 1996; Tien Meng y Schaffner, 1997), en la producción de anticuerpos monoclonales (Stoll y col., 1996), cultivo de células recombinantes de hamster (Rössler y col., 1996), en la inducción y estabilización de enzimas (Stecher y col., 1997), en la producción de metano (Bretler y Marison, 1996) y en procesos de producción de células de

*Lactococcus lactis* por cultivo continuo (Ishizaki y Vonkaveesuk, 1996) entre otros estudios. En general, se puede ver que el potencial de la metodología puede ser diversa cuando se entienden sus limitaciones, principalmente cuando las variables de estudio son complejas, se produce un error alto (Sejong y col., 1995 ) y el error es bajo cuando se estudian variables simples o definidas (Kalaimahan y Panda, 1995; Sen y Swaminathan, 1997). Aunque se reporta que es una metodología para ser utilizada solamente con variables físicas como pueden ser efectos de variables ambientales en procesos de fermentación, también puede aplicarse para estudios metabólicos, ya que permite observar las condiciones en que una o más variables de estudio interaccionan para dar una respuesta específica.

## JUSTIFICACIÓN

La producción de bifidobacterias ha recibido últimamente gran atención debido a su potencial como probiótico para consumo humano y animal. Sin embargo, ésta se ve limitada por las condiciones de producción y por los requerimientos nutricionales complejos con respecto a sus necesidades de fuentes de nitrógeno (McKellar y Modler, 1989; Wang y Gibson, 1994) y de carbono (Beverly y Macfarlane, 1991), así como las condiciones de oxido-reducción y de anaerobiosis (Bezkorovainy y Miller Catchpole, 1989) requeridas durante el proceso de fermentación. Otra limitante es la escasa información que existe sobre el proceso de producción. Existen estudios que analizan algunas fuentes nutricionales como sustitutos para medios comerciales, también alternativas para la producción de productos lácteos fermentados utilizando cepas con características deseables, pero es necesario plantear alternativas de estudio y desarrollo de procesos atractivos para la producción masiva de bifidobacterias.

Algunos autores han descrito algunas condiciones para el crecimiento de las bifidobacterias, pero no explican la influencia de los componentes del medio de cultivo o sus interacciones (Tien-Meng y Schaffner, 1997). Poca atención se ha dedicado al estudio de medios complejos y su papel aún no es muy claro (Bibal y col., 1989). Para compensar ésto, se han desarrollado herramientas como el diseño factorial y modelos matemáticos (Waitier y col., 1996) que ayudan a estudiar y a entender el papel de los medios complejos. El desarrollo de modelos estadísticos permite a los microbiólogos hacer predicciones correctas de la composición de los

medios de cultivo y obtener mejores rendimientos de biomasa celular (Baird-Parker y Kirsby, 1987; Saval y col., 1993).

Los antecedentes anteriores dejan ver la necesidad de desarrollar procesos para la producción de bifidobacterias y en particular sobre el desarrollo y optimización de los medios de cultivo.

## **OBJETIVO**

Estudiar el proceso de fermentación para la producción de bifidobacterias activas, para establecer la composición del medio de cultivo que permita un alto rendimiento celular en la producción, con miras a definir en un futuro un proceso comercial.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Establecer las condiciones de cultivo y de obtención de biomasa en medio TPYG líquido en frascos con atmósfera de CO<sub>2</sub>.
2. Estudiar el efecto de las fuentes de carbono (glucosa) y de nitrógeno (peptona de caseína, paptona de soya y extracto de levadura) en la obtención de la biomasa.
3. Estudiar el efecto de las sales minerales y de aditivos en la obtención de biomasa.
4. Seleccionar y diseñar un medio de cultivo que favorezca la obtención de biomasa.
5. Optimizar las concentraciones de los ingredientes del medio de cultivo por medio de la metodología de superficie de respuesta.



## METODOLOGÍA

**Microorganismo.** La cepa utilizada fue *Bifidobacterium infantis* ATCC 17930, especie característica del tracto intestinal de niños. La cepa se conservó en una solución de leche descremada al 10% y glicerol al 80% a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Para su activación se sembró la bacteria en medio líquido TPY sometido a un flujo de  $\text{CO}_2$  y con resazurina como indicador de anaerobiosis. La bacteria puede ser también activada en medio TPY sólido.

**Medio de cultivo.** El medio utilizado fue el TPYG que contiene (g/l), peptona de caseína (Bioxon) (10), peptona de soya (Bioxon) (5), extracto de levadura (Bioxon) (2.5), glucosa (J. T. Baker) (5), cisteína (Merk) (0.5),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2.0),  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.5),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.25),  $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.15),  $\text{FeCl}_3$  (0.03) y Tween 80 (Merk) (1 ml/l), pH 6.9-7.0. A este medio se le adicionaron 4 ml/l de una solución de resazurina (Sigma) 0.025% para observar las condiciones de anaerobiosis. El medio se colocó en frascos viales de 50 ml con 35 ml de medio de cultivo gaseados con  $\text{CO}_2$  durante un minuto para desalojar el oxígeno y mantener una atmósfera anaerobia. Los frascos se sellaron con tapones de hule y anillos de aluminio. Se esterilizaron a 15 libras de presión por 15 minutos.

**Conservación de la cepa.** La cepa original ATCC, se creció en el medio de cultivo TPYG, después de 12 horas, el caldo se centrifugó a 10,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el paquete celular fue resuspendido en la solución de leche

descremada-glicerol descrita. Se colocó 1 ml de ésta suspensión en tubos eppendorf estériles y se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Elaboración de la curva estándar de peso seco celular vs Absorbancia.** Después de crecer las células 12 horas en medio líquido, 35 ml del caldo se centrifugó a 10,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el paquete celular se lavó con 10 ml solución salina isotónica estéril. Este proceso se repitió x 3 para quitar residuos del medio de cultivo. Del paquete celular se tomó 1 ml con pipeta esteril y se resuspendió en 1 ml de solución salina al 0.85%. Se hicieron diluciones de 1:2 hasta 1:256 en la solución salina isotónica por triplicado para leer a 660 nm. Cada tubo con las diluciones se filtraron en una membrana Millipore de  $0.22\ \mu$  de diámetro que se dejó secar a  $55^{\circ}\text{C}$  en estufa por 24-48 horas hasta obtener un peso constante en una balanza analítica (Sartorius). La absorbancia se graficó contra el peso seco. En la Figura 1 se muestra la gráfica.

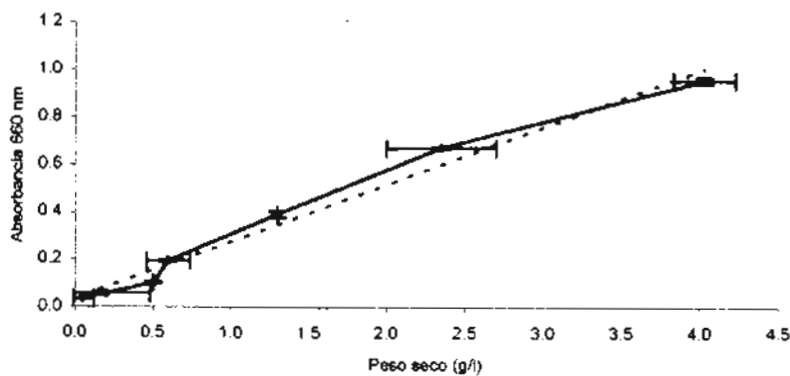


Figura 1. Curva de peso seco vs. Absorbancia a una longitud de onda de 660 nm. Las líneas punteadas son las tendencias. La ecuación del gráfico es  $y = 0.274x + 0.0136$ , y el coeficiente es  $R^2 = 0.979$

## **Fermentación**

**Adaptación de la cepa.** Un tubo Eppendorf conteniendo la cepa congelada se sembró en los frascos viales sellados con medio TPYG. La inoculación se realizó con 1 ml de la cepa con jeringa estéril desechable. Los frascos se incubaron en una cámara de crecimiento con agitación rotatoria a una velocidad de agitación de 200 rpm a 37°C durante 12 horas. De aquí se tomó una alícuota de 2 ml para inocular los frascos semilla donde se dejó crecer por 12 horas.

**Cultivo.** Después de 12 h de crecimiento a 37°C., de los frascos semilla se tomó una alícuota con la cantidad necesaria para inocular a los frascos de fermentación una concentración de células de 0.15-0.20 mg por ml de medio de cultivo. La fermentación se realizó a 37°C por 12 h en una cámara de crecimiento con agitación rotatoria a una velocidad de agitación de 200 rpm.

## **Métodos analíticos**

**Análisis de peso seco celular:** A partir del tiempo 0 y hasta las 12 horas, se tomó en condiciones estériles una alícuota de 1 ml de cada frasco de fermentación, se midió el pH en un potenciómetro (Corning 21) y la concentración de biomasa celular se calculó a partir de la curva estándar previamente construida.

**Células viables o activas.** Para la cuenta de células activas o viables (UFC), se tomó una alícuota (0.1 ml) que se adicionó a 0.9 ml de agua en frascos de 3 ml en condiciones de esterilidad. Las diluciones fueron de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-12}$ . De cada dilución se tomó 0.1 ml y se sembró por triplicado en cajas Petri con medio de cultivo Lactobacilli (Difco) adicionado de 0.5 g/l de cisteína, 0.1 g/l de  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 g/l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y agar al 1.5%. Las cajas se incubaron en jarras anaerobias con el sistema generador de anaerobiosis Gas-Pack (BBL) por 48 horas a 37 °C. Se contaron las colonias y se calculó el número de células (UFC) por ml de medio de cultivo.

**Diseños experimentales.** Los diseños factoriales (Box y col., 1978; Montgomery, 1991) fueron evaluados a un nivel bajo (-1) y alto (+1), que es un nivel 50% arriba y debajo de los puntos centrales. En todos los casos la respuesta fue la biomasa expresada en peso seco. Los datos experimentales fueron analizados por el programa *Statgraphics* software 6.0 (Statistical Graphics Co.)

## **Resultados**

**Producción de células.** Los primeros experimentos se realizaron en matraces de 250 ml con 200 ml de medio TPYG colocados en una jarra anaerobia y se incubaron a 37°C en una estufa microbiológica. Después de 72 horas de cultivo, el crecimiento que se obtuvo fue 0.58 mg/ml de células (promedio por triplicado). Es preciso hacer notar que a las pocas horas de haber iniciado el cultivo, las células se encontraban sedimentadas, lo que provocó un gradiente de concentración de los nutrientes y gran parte de ellos quedaron sin consumir.

Para evitar lo anterior y a partir de este momento, los cultivos se llevaron a cabo en frascos viales con 35 ml de medio de cultivo, gaseados con CO<sub>2</sub> (Linde, grado puro), a 37°C en una cámara con agitación orbital a 200 rpm. A las 12 horas se obtuvo un crecimiento de 2.3 mg/ml en promedio del triplicado.

### **Efecto de los componentes del medio TPYG.**

**Ausencia de un ingrediente.** Con el propósito de evaluar el efecto de cada componente del medio TPYG en el crecimiento de *Bifidobacterium infantis*, se realizaron cultivos en las condiciones descritas anteriormente. En estos experimentos se eliminó un componente cada vez. Cada experimento se realizó por triplicado con su control que fue el medio TPYG completo. Para hacer más fácil el trabajo y reducir el error experimental por la cantidad de frascos, se trabajó en dos bloques, el primero con los ingredientes orgánicos y también con la ausencia de

todas las sales. En el segundo bloque, se estudió la ausencia de cada una de las sales minerales más un experimento adicional donde se estudió la ausencia de la fuente de cisteína y del extracto de levadura que aporta también este sustrato y que es necesario para mantener las condiciones reductoras del medio. En las Tablas 1 y 2 se muestra el análisis estadístico de homogeneidad de grupos y en las Figuras 2 y 3 los gráficos de crecimiento.

En la Tabla 1 y la Figura 2 se observa como la ausencia de los sustratos afecta la obtención de biomasa celular y la falta de glucosa tiene el efecto más importante en la disminución del crecimiento. Aunque las peptonas proporcionan azúcares al medio de cultivo, su concentración y tal vez la calidad de los azúcares es insuficiente para soportar un buen crecimiento.

Tabla 1 Análisis de grupos homogéneos por la ausencia de un ingrediente orgánico y de las sales inorgánicas en el medio TPYG cada vez

Ingrediente ausente	Repeticiones	Crecimiento (mg/ml)	Grupos homogéneos*
Glucosa	3	1.35	X
Tween 80	3	1.94	X
P. caseína	3	2.15	X
Sales	3	2.53	X
P. soya	3	2.64	X
E. levadura	3	3.18	X
Cisteína	3	3.25	X X
Control	3	3.36	X

\* Tukey P=0.05

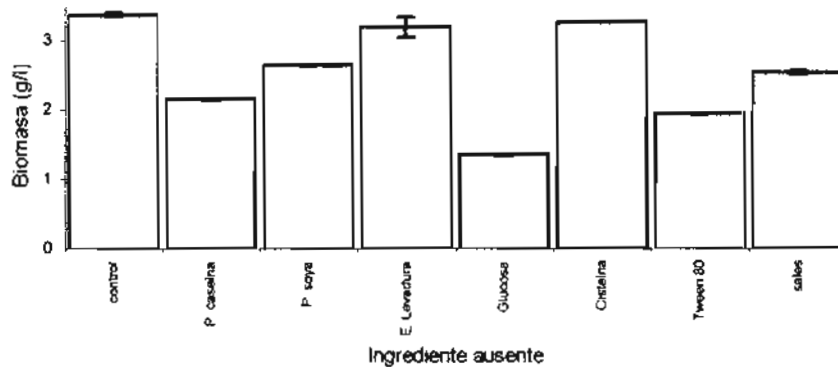


Figura 2. Efecto de la ausencia de un ingrediente del medio TPYG cada vez sobre el crecimiento de *Bifidobacterium infantis*. El crecimiento se muestra después de 12 h de cultivo

La ausencia de los ingredientes que aportan principalmente nitrógeno, como son peptonas de caseína y de soja así como extracto de levadura, también afectan la obtención de biomasa de manera significativa. Estos microorganismos están muy bien adaptados a crecer en leche, por lo que posiblemente la ausencia de algunos componentes de la peptona de caseína afectan el crecimiento, no así en el caso de la peptona de soja y extracto de levadura. Petschow y Tabot (1990; 1991) y Ventlig y Mistry (1993) reportaron que la leche completa es un promotor del crecimiento en la producción de bifidobacterias y Ventlig y Mistry (1993) cuando usaron leche descremada con un 10% de sólidos totales y concentrada (3x) aumentaron la producción de biomasa de *B. infantis*.

Con respecto a la ausencia de Tween, el crecimiento también se vio reducido. Bezkorovainy (1989) reportó que *B. bifidum* carece de la capacidad de sintetizar ácidos grasos de cadena larga, por lo que prefiere utilizar ácidos grasos exógenos. Así, cuando el autor adicionó Tween 20 (monoláurico) en lugar de Tween 80 (monooléico), aumentaron drásticamente los niveles de iso-12:0, 12:0, iso-14:0 y 14:0 y decrecieron los ácidos grasos de 16:1, 18:0, 18:1 y 19:0. Cuando se agregó Tween 60 (palmitato y estearato), se incrementaron los niveles de 16:0 y 18:0, con una caída drástica de los insaturados. También cuando el autor cultivó las células a 27°C, decrecieron los ácidos grasos de 18 carbonos y se incrementaron los de cadena corta.

En el primer bloque de experimentos, la ausencia de todas las sales afectó también el crecimiento. Aunque las tres peptonas que componen el medio las aportan, no se encuentran en la concentración adecuada para el desarrollo de la bacteria

Con respecto a la ausencia de cisteína, Beskorovainy y Miller-Catchpole (1989) reportaron que entre las fuentes de nitrógeno orgánico más importante para *B. bifidum*, la cisteína es indispensable para su crecimiento. También, la falta del aminoácido afecta la condición reductora necesaria para lograr la anaerobiosis, aunque bajo las condiciones del presente estudio parece no afectar porque el medio fue gaseado con CO<sub>2</sub>.

**Ausencia de sales minerales.** En la Tabla 2 y Figura 3 se observa el efecto de la ausencia de los compuestos inorgánicos en el medio TPYG. Como puede verse, la ausencia de zinc no afecta el crecimiento, pero la falta de cualquier otra sal lo afecta significativamente.



En el segundo bloque experimental, se estudió la ausencia del extracto de levadura y cisteína juntas. Como se puede observar, su ausencia afecta el crecimiento con respecto al control con el medio completo, obteniéndose una biomasa total a las 12 horas significativamente más pequeña. La literatura indica que este género de bacterias necesitan pequeñas cantidades de cisteína. Las peptonas presentes en el medio aportan este aminoácido, pero su concentración es pequeña (máximo 0.5%) y en el extracto de levadura la concentración es el 1.6% (Tabla 12) de su composición total de aminoácidos, por lo que es necesario la presencia del aminoácido o de la levadura en el medio de cultivo para la producción de biomasa de *B. infantis*.

Tabla 2. Análisis de grupos homogéneos por la ausencia de un ingrediente inorgánico en el medio TPYG cada vez

Ingrediente ausente	Repeticiones	Crecimiento (mg/ml)	Grupos homogéneos*
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3	1.97	X
CaCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3	2.11	X
E. levadura y Cisteína	3	2.27	X
MgCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3	2.35	X
FeCl <sub>3</sub>	3	2.48	X
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3	2.81	X
Control	3	2.83	X

\* Tukey P=0.05

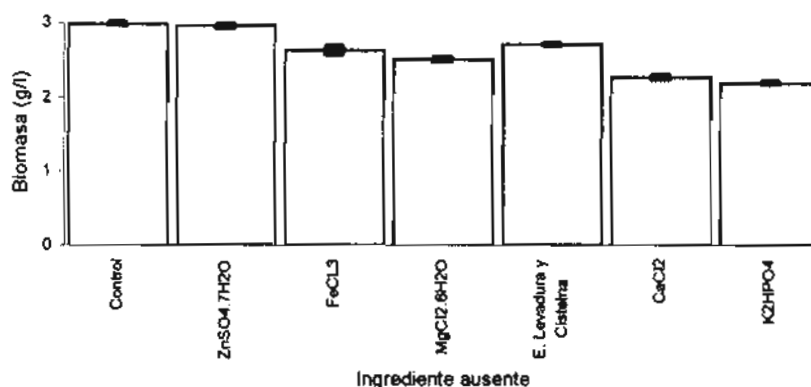


Figura 3. Biomasa de *Bifidobacterium infantis* en medio TPYG con ausencia de sales inorgánicas. El crecimiento se muestra a las 12 h de cultivo

Las observaciones al microscopio mostraron que la falta de alguno de los tres compuestos orgánicos nitrogenados no afecta la morfología microscópica. Se observaron células semejantes a la del medio control, siendo células Gram positivas, de buen tamaño y alargadas, bifurcadas o en forma de bacilos curvos en su mayor parte. El mismo comportamiento se muestra con la falta de cisteína y de sales. La falta de glucosa produce en *B. infantis* una morfología Gram variable, con un importante porcentaje de células Gram negativas (30%), delgadas y pequeñas y la falta de Tween 80, muestra células muy pequeñas y delgadas, aunque la mayoría son Gram positivas. En estos dos últimos casos, no se observaron células bifurcadas sino todas en forma de bacilos rectos.

En la Figura 4 se muestran las tasas de crecimiento en las primeras seis horas de cultivo para cada medio estudiado. Se observa que la tasa de crecimiento disminuye entre el medio control y los medios con la ausencia de un ingrediente cada vez y es una manera de ver la calidad del

medio de cultivo, por lo que los resultados parecen indicar que las condiciones químicas para un buen crecimiento no han sido establecidas.

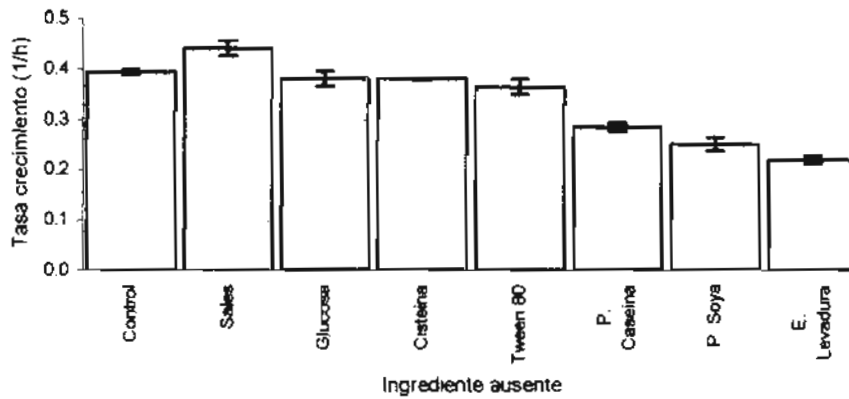


Figura 4. Tasas de crecimiento de *Bifidobacterium infantis* en medio TPYG con ausencia de un ingrediente. El valor de  $\mu$  es entre las 0 y 6 h de cultivo.  
Modelo:  $dx/dt = \mu x$

**Ausencia de aminoácidos.** Como se observa en la Figura 2 y en la Tabla 1, donde la ausencia de uno de los tres ingredientes que aportan nitrógeno orgánico afectan la obtención de biomasa de *B. infantis*, y para analizar con mayor precisión, si es la carencia o la baja concentración de un aminoácido en particular, se realizó un estudio para analizar el efecto de la ausencia de un aminoácido. Los medios utilizados fueron: medio mínimo con los 20 aminoácidos como fuente de nitrógeno; medio mínimo con cloruro de amonio como fuente de nitrógeno y medio mínimo con ausencia de un aminoácido a la vez. Los medios de cultivo para este estudio se elaboraron de acuerdo al medio propuesto por Nuraida y col. (1992). Cada frasco con el medio

de cultivo fue sometido a un flujo de CO<sub>2</sub> como se describe en material y métodos. Los resultados mostraron que este microorganismo crece en medios simples con todos los aminoácidos pero también puede crecer en un medio con amonio como fuente de nitrógeno, pero adicionado de cisteína.

La Figura 5 intenta mostrar de forma resumida los resultados de este experimento. Como se puede observar en la Figura, el gráfico que representa la ausencia de un aminoácido a la vez es un agregado general de la ausencia de cada aminoácido y la desviación estándar muestra los límites entre los crecimientos obtenidos. Estos valores se comparan con los cultivos control en medio mínimo con la presencia y la ausencia de los 20 aminoácidos. El análisis estadístico muestra que no existe diferencia significativa ( $P = 0.05$ ) entre el medio control con los 20 aminoácidos, el medio control con cloruro de amonio como fuente de nitrógeno y el agregado de la ausencia de un aminoácido a la vez, pero si existen diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el control con todos los aminoácidos y el control con amonio como fuente de nitrógeno.

Estos resultados no permiten concluir si en los ingredientes utilizados en este estudio, es la ausencia o la baja concentración de un aminoácido lo que afecta el crecimiento de *B. infantis*.

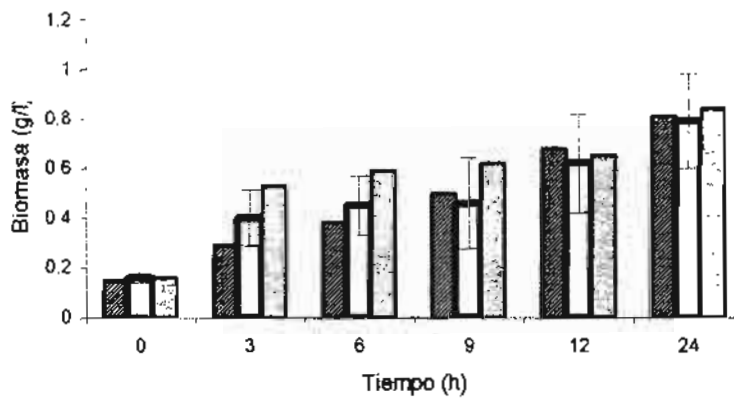


Figura 5. Efecto de la presencia y ausencia de aminoácidos en medio mínimo para la obtención de biomasa de *B. infantis*. Barras diagonales; medio mínimo con cloruro de amonio como fuente de nitrógeno. Barras vacías; ausencia de un aminoácido a la vez. Barras con puntos puntos; presencia de los 20 aminoácidos

Los estudios anteriores solo permiten analizar el efecto de la ausencia de un componente, pero no permite analizar si existen interacciones entre los componentes que probablemente ejercen un efecto acumulativo o sinérgico en la variable de respuesta. El análisis factorial y de superficie de respuesta probablemente permitirá examinar estos efectos.

#### Análisis factorial de los ingredientes que aportan nitrógeno orgánico.

Para evaluar el efecto y las interacciones de los tres ingredientes complejos en el medio de cultivo, se realizó un diseño factorial  $2^3$  con los ingredientes peptona de caseína ( $x_1$ ), peptona de soya ( $x_2$ ) y extracto de levadura ( $x_3$ ), cada ingrediente fue evaluado a un nivel alto (+1) y

bajo (-1) respecto a un punto central (0), las fermentaciones se hicieron por triplicado y el crecimiento después de 12 horas de cultivo se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Diseño factorial y obtención de biomasa del experimento con los tres ingredientes que aportan nitrógeno orgánico

Run	Ingrediente			Biomasa* g l <sup>-1</sup>
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	
1	-	-	-	0.48
2	+	-	-	2.07
3	-	+	-	2.32
4	+	+	-	2.54
5	-	-	+	1.19
6	+	-	+	1.72
7	-	+	+	1.26
8	+	+	+	2.74
9	0	0	0	1.83

\* peso seco celular después de 12 h de cultivo

El ANOVA del diseño factorial indica que los efectos significativos corresponden a los ingredientes  $x_1$  ( $P = 0.016$ ),  $x_2$  ( $P = 0.018$ ) y para la interacción  $x_1x_2x_3$  ( $P = 0.027$ ), con un valor de  $R^2$  de 0.99. La respuesta para el crecimiento en este experimento está dado por la ecuación  $\hat{y} = -2.94 + x_1 (0.34) + x_2 (0.801) + x_3 (1.085) + x_1x_2x_3 (0.018)$ . El coeficiente de regresión de la variable  $x_3$  se toma en cuenta en la ecuación del crecimiento ya que es un modelo jerárquico. Esto quiere decir que de los tres factores en estudio, Peptona de caseína y Peptona de soya tienen una influencia importante en el crecimiento, y el valor de la interacción

$x_1, x_2, x_3$ , indica que la presencia de los tres componentes es necesaria aunque la variable  $x_3$  sola no interviene de manera significativa. Los resultados anteriores indican la importancia de los tres ingredientes para favorecer la producción de la biomasa.

### **Diseño Ortogonal Central con Puntos Estrella.**

Los resultados anteriores indican la necesidad en principio de estudiar y optimizar las concentraciones de los ingredientes que aportan nitrógeno y carbono. Para esto, cada ingrediente se estudió a dos niveles; 50% menor y mayor con respecto al medio control (punto central, PC) y las distancias de los puntos estrella ( $\alpha$ ) 1.414 arriba y abajo del punto central para cada ingrediente. Los ingredientes del medio de cultivo fueron identificados de la siguiente forma; peptona de caseína como  $x_1$ , peptona de soya como  $x_2$ , extracto de levadura como  $x_3$  y glucosa como  $x_4$ .

El estudio se dividió en dos bloques. En el primero se realizó el diseño factorial completo y en el segundo los experimentos para los puntos estrella; para ambos casos, siempre se corrieron controles (puntos centrales). En las Tablas 4 y 5 se muestran el diseño experimental ortogonal central con puntos estrella y los códigos, concentraciones y distancias de los ingredientes en estudio. Todos estos experimentos se realizaron por triplicado para evaluar la reproducibilidad y confiabilidad del trabajo experimental así como la variabilidad intrínseca del sistema.

Tabla 4. Diseño ortogonal central con puntos estrella

exp	Observaciones $2^4$																P.C.		Puntos estrella ( $\alpha$ )							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17 a 20	21	22	23	24	25	26	27	28	
$\lambda_1$	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1.41	-1.41	0	0	0	0	0	0	
$\lambda_2$	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	0	0	0	1.41	-1.41	0	0	0	0	
$\lambda_3$	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	0	0	0	0	0	1.41	-1.41	0	0	
$\lambda_4$	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	1.41	-1.41	

Tabla 5. Códigos, concentraciones y distancia del diseño experimental

Código	$x_1$ (g/l)	$x_2$ (g/l)	$x_3$ (g/l)	$x_4$ (g/l)
$-\alpha$	2.95	1.48	0.74	1.48
-	5	2.5	1.25	2.5
0	10	5	2.5	5
+	15	7.5	3.75	7.5
$+\alpha$	17.05	8.53	4.26	8.53
Distancia	5	2.5	1.25	2.5

$$\alpha = 1.414$$

La Tabla 5 muestra que la concentración en el punto central para el factor  $x_1$  fue de  $10 \text{ gl}^{-1}$  y los niveles (-1) y (+1) fueron  $5 \text{ gl}^{-1}$  y  $15 \text{ gl}^{-1}$ , respectivamente, para el factor  $x_2$  la concentración en el punto central fue de  $5 \text{ gl}^{-1}$  y para los niveles (-1) y (+1)  $2.5 \text{ gl}^{-1}$  y  $7.5 \text{ gl}^{-1}$ . Para el factor  $x_3$ , la concentración en el punto central fue de  $2.5 \text{ gl}^{-1}$  y para los niveles (-1) y (+1)  $1.25$  y  $3.75 \text{ gl}^{-1}$ , respectivamente. El factor  $x_4$ , con una concentración en el punto central de  $5 \text{ gl}^{-1}$  y para los niveles (-1) y (+1) de  $2.5$  y  $7.5 \text{ gl}^{-1}$ , respectivamente.



Posteriormente se realizó un diseño experimental ortogonal central con puntos estrella con el medio de cultivo completo y la Tabla 6 muestra los códigos y los resultados en la concentración de células después de 12 h de cultivo.

**Tabla 6.** Diseño experimental y biomasa obtenida para cada combinación del medio TPYG

Corrida	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	Biomasa (g/l)
1	-	-	-	-	0.62
2	+	-	-	-	1.09
3	-	+	-	-	0.92
4	+	+	-	-	1.42
5	-	-	+	-	0.81
6	+	-	+	-	1.25
7	-	+	+	-	1.10
8	+	-	+	-	1.35
9	-	-	-	+	0.67
10	+	-	-	+	1.19
11	-	+	-	+	0.96
12	+	+	-	+	1.47
13	-	-	+	+	0.89
14	+	-	+	+	1.35
15	-	+	+	+	1.14
16	+	+	+	+	1.52
17	$+\alpha$	0	0	0	1.50
18	$-\alpha$	0	0	0	1.02
19	0	$+\alpha$	0	0	1.34
20	0	$-\alpha$	0	0	0.99
21	0	0	$+\alpha$	0	1.37
22	0	0	$-\alpha$	0	0.86
23	0	0	0	$+\alpha$	1.60
24	0	0	0	$-\alpha$	1.37
25	0	0	0	0	1.42
26	0	0	0	0	1.40

$$r^2 = .925$$

Los resultados de regresión múltiple de este experimento muestran que las variables significativas ( $P < 0.05$ ) son  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ,  $x_4$ ,  $x_1^2$ ,  $x_2^2$  y  $x_3^3$ , y la ecuación que define el crecimiento es la ecuación (6) y en la ecuación (6') con los valores de los coeficientes:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^3 \quad (6)$$

$$\hat{y} = 1.407 + 0.211x_1 + 0.125x_2 + 0.09x_3 + 0.048x_4 - 0.072x_1^2 - 0.120x_2^2 - 0.145x_3^3 \quad (6')$$

El cálculo de las nuevas concentraciones de los ingredientes en estudio dio como resultado las siguientes concentraciones en g/l; Para  $x_1$  11.29; para  $x_2$  5.43; para  $x_3$  3.10 y para  $x_4$  5.33, que son concentraciones muy semejantes al medio original. Con estos nuevos valores se calculó el crecimiento teórico, dando un valor de  $\hat{y} = -11.67$  mg células en peso seco por ml. Por ser ilógico el resultado, se calculó la nueva matriz incluyendo los valores de los coeficientes de los datos no significativos pero no hay solución única por ser un comportamiento no simétrico.

Las gráficas de superficie de respuesta para este experimento (anexo 1) indicaron la necesidad de aumentar la concentración de los ingredientes que aportan nitrógeno, y los valores de los coeficientes obtenidos indicaron que los ingredientes más importantes que afectan la obtención de biomasa fueron las peptonas de caseína y de soya (0.211 y 0.126) respectivamente.

Considerando los resultados del primer experimento con el medio TPYG normal y que las fuentes de nitrógeno resultaron ser significativas en la obtención de biomasa, se programaron

una serie de experimentos, definidos como medios M-1, M-2 y M-3. En la Tabla 7 se muestran las concentraciones de los ingredientes para cada medio y en la tabla 8 las corridas de cada experimento y los resultados obtenidos.

Tabla 7. Puntos centrales para los factores en los medios de cultivo modificados.

Ingrediente	Código	Concentración en punto central $g l^{-1}$		
		Medio		
		M-1	M-2	M-3
P. caseina	$x_1$	15	15	5
P. soya	$x_2$	10	5	3
Extracto levadura	$x_3$	2.5	2.5	10
Glucosa	$x_4$	5.0	15	5

**Medio M-1.** En el medio M-1, se aumentó en un 50% la concentración de los ingredientes  $x_1$  y  $x_2$  y la concentración de  $x_3$  y  $x_4$  permanecieron constantes de acuerdo al medio TPYG descrito en la literatura. Los resultados de biomasa obtenidos con el medio M-1 se muestran en la Tabla 8 en la columna correspondiente al medio M-1. El análisis estadístico muestra que las variables significativas ( $P < 0.05$ ) corresponden a los ingredientes  $x_1$  y  $x_2$ .

A partir de los coeficientes obtenidos por la regresión múltiple para el medio M-1, se diseñó la matriz que se resolvió por ecuaciones simultáneas y su resultado debe dar los nuevos valores de concentración de los ingredientes  $x_1$  y  $x_2$ . La matriz se diseñó como a continuación se describe en la ecuación (7):

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0.4179 \\ 0.3205 \end{bmatrix} \quad (7)$$

Los valores de la matriz derecha corresponden a los coeficientes y los valores de la matriz izquierda corresponden a las variables significativas, que en este caso no hay y que se obtienen de la regresión múltiple. El programa que se utilizó para los cálculos fue Statgraphics 6.0. obteniéndose que para esta matriz no hay solución única.

Tabla 8. Diseño factorial y resultados obtenidos con los medios modificados. Los puntos centrales (0,0,0,0) corresponden a los medios de cultivo descritos en la Tabla 7

Run	Factores				Biomasa (g l <sup>-1</sup> ) *		
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	x <sub>4</sub>	M-1	M-2	M-3
1	-	-	-	-	1.69	1.69	1.88
2	-	-	-	+	1.71	1.59	2.11
3	-	-	+	-	1.81	1.74	2.84
4	-	-	+	+	1.96	1.84	3.10
5	-	+	-	-	2.32	2.30	2.63
6	-	+	-	+	2.37	2.10	2.42
7	-	+	+	-	2.56	2.10	2.98
8	-	+	+	+	2.58	2.43	3.25
9	+	-	-	-	2.54	2.84	2.08
10	+	-	-	+	2.58	2.66	2.97
11	+	-	+	-	2.60	2.58	4.20
12	+	-	+	+	2.67	2.23	3.45
13	+	+	-	-	3.18	2.72	2.49
14	+	+	-	+	3.31	2.64	2.72
15	+	+	+	-	3.58	2.90	4.27
16	+	+	+	+	3.76	2.89	4.11
17	+α	0	0	0	2.95	2.58	4.06
18	-α	0	0	0	2.14	1.80	3.06
19	0	+α	0	0	2.89	2.17	2.93
20	0	-α	0	0	2.69	1.72	2.60
21	0	0	+α	0	2.73	1.64	3.78
22	0	0	-α	0	2.77	1.99	2.96
23	0	0	0	+α	2.73	2.17	2.93
24	0	0	0	-α	2.16	2.30	2.97
25	0	0	0	0	2.58	2.80	3.15
26	0	0	0	0	2.50	2.49	3.12

(\*) peso seco después 12 h de cultivo

x<sub>1</sub> peptona de caseína; x<sub>2</sub> peptona de soya; x<sub>3</sub> extracto de levadura; x<sub>4</sub> glucosa

**Medio M-2.** El medio M-2 se diseñó para observar si el factor que limita el crecimiento es la glucosa, ya que la relación carbono/nitrógeno en el medio TPYG difiere de la relación ( $10^{-2}/10^{-3}$  M) que normalmente se encuentra en los medios de cultivo (Dunn, 1985). La Tabla 7 muestra las concentraciones en los puntos centrales para el medio M-2 y los resultados del crecimiento a las 12 h se muestra en la Tabla 8.

Para este medio, los ingredientes significativos fueron  $x_1$  ( $P = 0.0004$ ) y  $x_2$  ( $P = 0.0273$ ) y el tratamiento matemático no mostró una solución única para los nuevos valores de las concentraciones de los ingredientes. Las gráficas de superficie de respuesta (anexo 2) muestran la necesidad de aumentar los ingredientes y no se observa un aumento significativo en la obtención de biomasa.

**Medio M-3.** Si la glucosa no parece ser un factor que limita del crecimiento y los ingredientes que aportan el nitrógeno orgánico parece que no satisfacen las necesidades de la bacteria, se diseñó el medio M-3, en donde se incremento 4 veces la concentración del extracto de levadura ( $x_3$ ) por considerarlo un ingrediente de alta calidad por su aporte en aminoácidos y otros compuestos como vitaminas y N-acetil-D-glucosamina (Petschow y Talbot, 1990), mientras que las concentraciones de la Peptona de caseína ( $x_1$ ) y la de Peptona de soya ( $x_2$ ) se disminuyeron a la mitad. La concentración de glucosa ( $x_4$ ) se mantuvo constante al nivel del medio TPYG original.

Los resultados obtenidos con este medio se muestran en la Tabla 8 y el análisis estadístico mostró que los ingredientes significativos fueron  $x_1$  ( $P = 0.0006$ ),  $x_3$  ( $P = 0.0000$ ),  $x_2^2$  ( $P =$

0.0445), con menor grado de significancia pero suficiente para ser tomada en cuenta, el coeficiente de  $x_4^2$  ( $P = 0.062$ ) y la interacción  $x_1x_3$  ( $P = 0.050$ ). La ecuación que describe el crecimiento es la (8) y con los valores de los coeficientes en la ecuación (8').

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_3x_3 + b_{22}x_2^2 + b_{44}x_4^2 + b_{13}x_1x_3 \quad (8)$$

$$\hat{y} = 3.202 + 0.326x_1 + 0.501x_3 - 0.236x_2^2 - 0.2166x_4^2 + 0.167x_1x_3 \quad (8')$$

Con base en los valores significativos de los ingredientes y a sus coeficientes, se diseñó la matriz (9) para calcular las nuevas concentraciones de los ingredientes.

$$\begin{bmatrix} 0 & 0 & 0.0834 & 0 \\ 0 & -0.236 & 0 & 0 \\ 0.0834 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -0.2106 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 0.3362 \\ 0 \\ 0.5015 \\ 0 \end{bmatrix} \quad (9)$$

Por ecuaciones simultáneas se resolvió la matriz y se obtuvieron los nuevos valores para los ingredientes que fueron en g/l:

$$x_1 = 6.013 \quad x_2 = 0 \quad x_3 = 3.911 \quad x_4 = 0$$

sustituyendo los valores en la ecuación (8),  $\hat{\gamma}$  toma un valor de

$$\hat{\gamma} = - 8.525$$

que es un valor de crecimiento negativo. Sin embargo, el medio M-3 mostró en las corridas 15 y 16 (Tabla 8) del diseño factorial, concentraciones de biomasa mayor a los 4 g/l a las 12 h. Estas corridas corresponden a concentraciones de peptona de caseína ( $x_1$ ) 7.5 g/l; peptona de soya ( $x_2$ ) 4.5 g/l; extracto de levadura ( $x_3$ ) 15 g/l y glucosa ( $x_4$ ) 2.5 y 7.5 g/l. Lo interesante de estas nuevas concentraciones es que no varía la relación en peso de la fuente de carbono y de las fuentes de nitrógeno, que para el medio TPYG la relación C:N es de 1:3.5 y para estas corridas la relación C:N es 1:3.6. Con base en estas concentraciones se diseñó un nuevo experimento factorial central con puntos estrella, siendo los puntos centrales las concentraciones anteriores, pero para la glucosa, la concentración se ajustó a 10 g/l. El diseño factorial se trabajó a niveles de 50% abajo y arriba de los puntos centrales y los puntos estrella a un valor de 1.414. En la Tabla 9 se muestran las concentraciones de los ingredientes para cada corrida y las concentraciones de biomasa a las 12 h de cultivo. Este nuevo medio de cultivo se le denominó M-3E

Tabla 9. Código, concentraciones de sustrato y obtención de biomasa en el medio de cultivo

M-3E después de 12 h de fermentación

Run	Código				Concentraciones (g/l)				Biomasa (mg/ml)
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	
1	-	-	-	-	3.75	2	7.5	5	4.11
2	+	-	-	-	11.25	2	7.5	5	5.33
3	-	+	-	-	3.75	6	7.5	5	4.00
4	+	+	-	-	11.25	6	7.5	5	5.70
5	-	-	+	-	3.75	2	22.5	5	3.88
6	+	-	+	-	11.25	2	22.5	5	4.64
7	-	+	+	-	3.75	6	22.5	5	3.98
8	+	+	+	-	11.25	6	22.5	5	4.83
9	-	-	-	+	3.75	2	7.5	15	4.62
10	+	-	-	+	11.25	2	7.5	15	6.03
11	-	+	-	+	3.75	6	7.5	15	5.02
12	+	+	-	+	11.25	6	7.5	15	6.61
13	-	-	+	+	3.75	2	22.5	15	3.40
14	+	-	+	+	11.25	2	22.5	15	4.79
15	-	+	+	+	3.75	6	22.5	15	2.64
16	+	+	+	+	11.25	6	22.5	15	5.26
17	$+\alpha$	0	0	0	12.8	4	15	10	6.71
18	$-\alpha$	0	0	0	2.19	4	15	10	4.89
19	0	$+\alpha$	0	0	7.5	6.82	15	10	5.64
20	0	$-\alpha$	0	0	7.5	1.17	15	10	5.06
21	0	0	$+\alpha$	0	7.5	4	25.6	10	5.47
22	0	0	$-\alpha$	0	7.5	4	4.4	10	5.80
23	0	0	0	$+\alpha$	7.5	4	15	17	5.84
24	0	0	0	$-\alpha$	7.5	4	15	2.93	3.84
25	0	0	0	0	7.5	4	15	10	6.01
26	0	0	0	0	7.5	4	15	10	5.95
27	0	0	0	0	7.5	4	15	10	5.99
28	0	0	0	0	7.5	4	15	10	5.86

$x_1$  peptona de caseína;  $x_2$  peptona de soya;  $x_3$  extracto de levadura;  $x_4$  glucosa

Para elaborar el análisis estadístico con estos resultados, se realizó el análisis de regresión múltiple cuyo modelo se muestra a continuación

#### Regresión Múltiple

variable dependiente:	biomasa
variables independientes:	$\{x_1\}, \{x_2\}, \{x_3\}, \{x_4\}, \{x_1^2\}, \{x_2^2\}, \{x_3^2\},$ $\{x_4^2\}, \{x_2, x_3\}, \{x_1, x_3\}, \{x_1, x_4\}, \{x_2, x_3\},$ $\{x_3, x_4\}, \{x_2, x_4\}$



## ajuste del modelo para la biomasa del medio M3E

variable independiente	coeficiente	error std.	t-value	significancia
constante	6.00816	0.176775	33.9877	0.0000
M3E. $x_1$	0.70671	0.095026	7.4371	0.0000
M3E. $x_2$	0.10401	0.095026	1.0946	0.2936
M3E. $x_3$	-0.4223	0.095026	-4.4446	0.0007
M3E. $x_4$	0.23741	0.095026	2.4984	0.0267
M3E. $x_1^2$	-0.1319	0.141346	-0.9335	0.3676
M3E. $x_2^2$	-0.3570	0.141346	-2.5258	0.0253
M3E. $x_3^2$	-0.2144	0.141346	-1.5173	0.1531
M3E. $x_4^2$	-0.6120	0.141346	-4.3304	0.0008
M3E. $x_1 \cdot x_2$	0.125	0.106239	1.1766	0.2605
M3E. $x_1 \cdot x_3$	-0.0175	0.106239	-0.1647	0.8717
M3E. $x_1 \cdot x_4$	0.15625	0.106239	1.4707	0.1651
M3E. $x_2 \cdot x_3$	-0.0762	0.106239	-0.7177	0.4856
M3E. $x_2 \cdot x_4$	0.01	0.106239	0.0941	0.9264
M3E. $x_3 \cdot x_4$	-0.2725	0.106239	-2.5650	0.0235

$R^2$  ajustada=0.8172

$x_1$  peptona de caseína;  $x_2$  peptona de soya;  $x_3$  extracto de levadura;  $x_4$  glucosa

A partir del análisis anterior y tomando en cuenta las variables significativas ( $P < 0.05$ ) se obtiene la ecuación (10) que describe la obtención de biomasa:

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_3x_3 + b_4x_4 + b_{22}x_2^2 + b_{44}x_4^2 + b_{34}x_3x_4 \quad (10)$$

Y el análisis de varianza que se muestra a continuación, demostró que la regresión múltiple es significativa

## Análisis de Varianza para la Regresión

fuerza	Suma de cuadrados	DF	Media <sup>2</sup>	F-prueba	valor-P
Modelo	26.3352	14	1.88109	7.9960	.0003
Error	3.05829	13	0.23525		
Total (Corregido)	29.3935	27			
$R^2 = 0.895953$	error stad estimado= 0.485029			$R^2$ (Adj para df.) = 0.783903	

Para obtener los nuevos valores de los ingredientes, se calculó la matriz (II). Los valores de los coeficientes  $b_i$  se sustituyen por los valores de los coeficientes de la regresión múltiple arriba descrita

$$\begin{bmatrix} b_{11} & \frac{1}{2} b_{12} & \frac{1}{2} b_{13} & \frac{1}{2} b_{14} \\ \frac{1}{2} b_{21} & b_{22} & \frac{1}{2} b_{23} & \frac{1}{2} b_{24} \\ \frac{1}{2} b_{31} & \frac{1}{2} b_{32} & b_{33} & \frac{1}{2} b_{34} \\ \frac{1}{2} b_{41} & \frac{1}{2} b_{42} & \frac{1}{2} b_{43} & b_{44} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \end{bmatrix} \quad (II)$$

Sustituyendo los valores de los coeficientes de la matriz obtenidos en el análisis de regresión múltiple y resolviendo la matriz por ecuaciones simultáneas, los nuevos valores de los ingredientes son las siguientes:

$$x_1 = 4.19428 \quad x_2 = -2.37073 \quad x_3 = -2.18725 \quad x_4 = -8.08307$$

Con estos valores y con el modelo propuesto por Saval y col. (1993), se calcularon las nuevas concentraciones de los ingredientes en estudio:

$$(\text{valor de la solución para cada variable } X_n) \times \text{distancia} + \text{punto central}$$

Las nuevas concentraciones para los ingredientes del medio de cultivo modificado como se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10 Concentraciones calculadas para cada ingrediente del medio de cultivo TPYG

Código del ingrediente	Concentración calculada (g/l)	Concentración a utilizar (g/l)
$x_1$	-0.3562	0.0
$x_2$	6.37	6.4
$x_3$	23.20	23.0
$x_4$	30.20	30.0

$x_1$  peptona de caseína;  $x_2$  peptona de soya;  $x_3$  extracto de levadura;  $x_4$  glucosa

Sustituyendo valores de los coeficientes en la ecuación (10), se tiene la (12):

$$\hat{y} = 6.008 + 0.706 x_1 - 0.422 x_3 + 0.237 x_4 - 0.3570 x_2^2 - 0.612 x_4^2 - 0.272 x_3 x_4 \quad (12)$$

Sustituyendo las variables  $X_n$  por los valores obtenidos en la solución de la matriz (11)

se obtiene un valor teórico de  $\hat{y} = 11.04$  g/l de biomasa.

El análisis estadístico permite predecir si las concentraciones de los ingredientes son las adecuadas para obtener bajo las condiciones actuales de estudio la producción optimizada de biomasa de *B. infantis*. Para lo anterior, con el programa de estadística Statgraphics v 6.0, se obtuvieron las gráficas de superficie de respuesta con los valores de los coeficientes de las variables que resultaron significativas. En la Figura 6 se observa que las gráficas de superficie presentan un óptimo en la respuesta de biomasa para las interacciones de cada dos ingredientes del medio de cultivo.

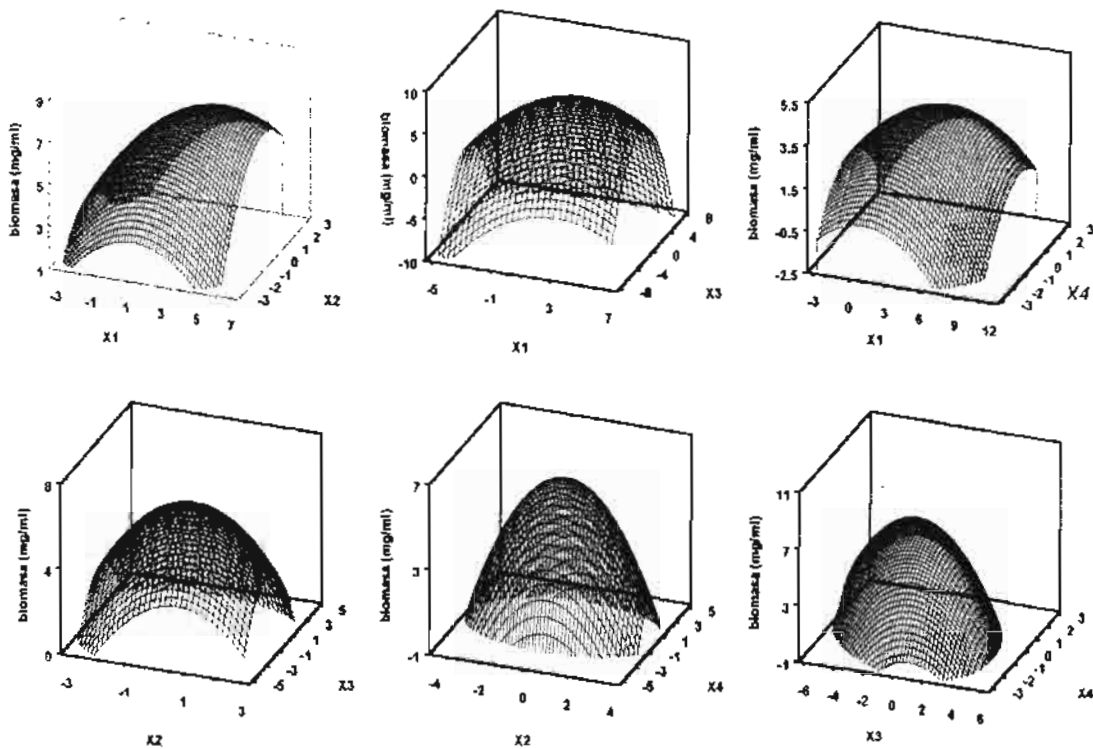


Figura 6. Superficie de respuesta para las interacciones de los ingredientes,  $x_1$  peptona de caseína;  $x_2$  peptona de soja;  $x_3$  extracto de levadura y  $x_4$  glucosa. Los valores mostrados en las escalas de los ingredientes son valores relativos que dependen de las distancias y de los puntos  $\alpha$  de cada par de ingredientes

La Figura 7 muestra las gráficas de contorno que ayudan a ubicar en un solo plano la respuesta en el crecimiento para las interacciones de cada par de variables. Para las interacciones  $x_1x_2$ ,  $x_1x_3$  y  $x_1x_4$  se observó que la respuesta máxima no se ajusta en las escalas al valor 0. Esto probablemente se debe a que para el medio de cultivo y como se indica en la nueva concentración de los ingredientes, la peptona de caseína ( $x_1$ ) no se debe agregar. En las

Figuras que muestran las interacciones  $x_2x_3$ ,  $x_2x_4$  y  $x_3x_4$ , el máximo punto de obtención de biomasa corresponde a las interacciones 0,0 en los ejes de las gráficas.

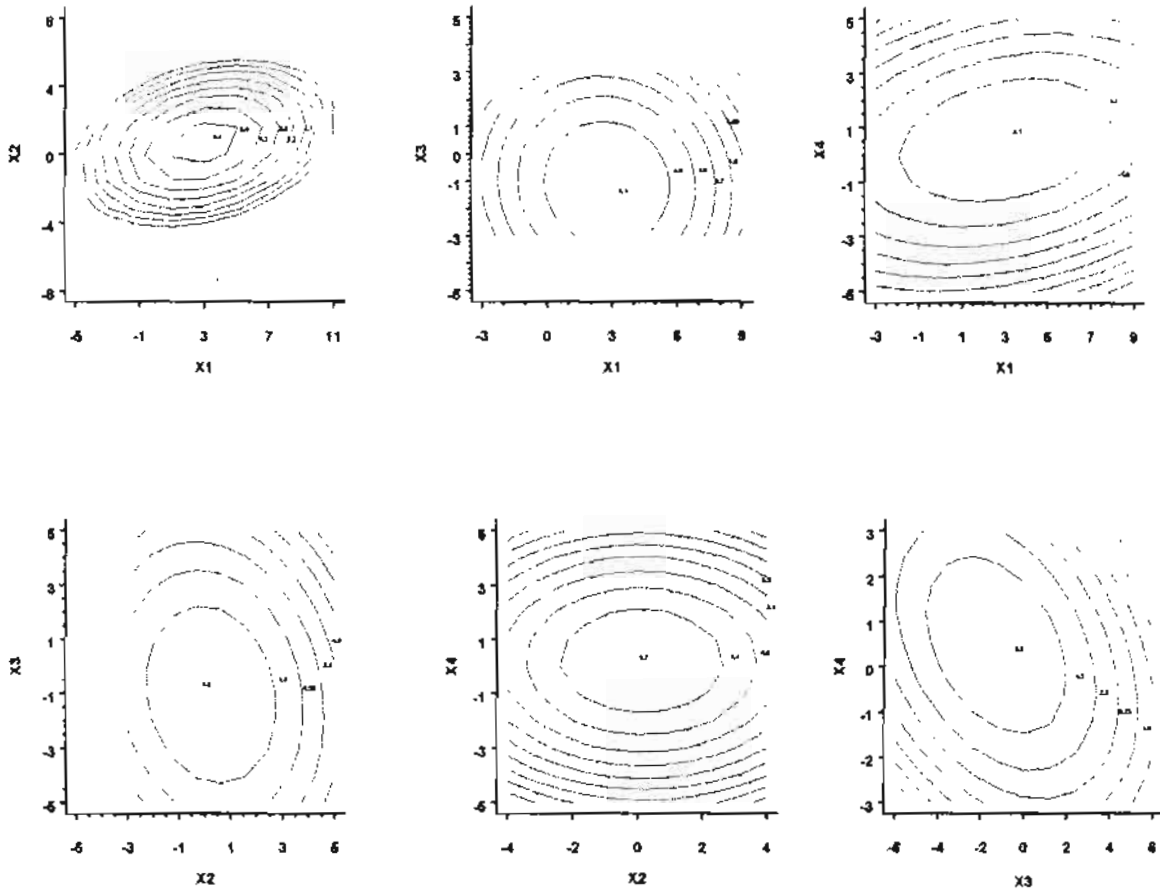


Figura 7. Gráficas de contorno para las interacciones de los ingredientes,  $x_1$  peptona de caseína;  $x_2$  peptona de soya;  $x_3$  extracto de levadura y  $x_4$  glucosa. Los valores mostrados en las escalas de los ingredientes son valores relativos. Los valores dentro de los contornos se refieren a la biomasa que se puede obtener con cada par de ingredientes

## Medio optimizado

Para comprobar los datos anteriores se cultivó *B. infantis* en las mismas condiciones a las descritas en material y métodos con el nuevo medio de cultivo y se compararon con cultivos con el medio TPYG original. Las nuevas concentraciones para los componentes del medio de cultivo se muestran en la Tabla 10.

En la Figura 8 se muestra el perfil de crecimiento celular de *B. infantis* obtenida en este experimento que se realizó por triplicado y se compara con el medio TPYG original durante 24 h de cultivo, en la Figura 9 el perfil de pH y en la Figura 10 la biomasa viable hasta las 12 horas de cultivo.

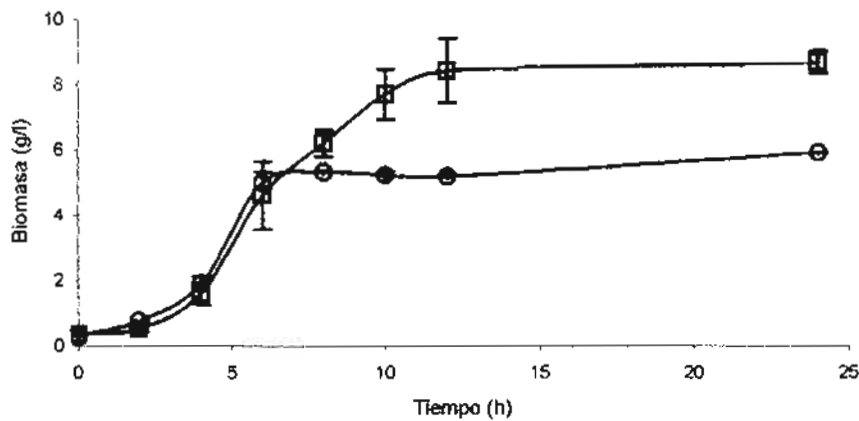


Figura 8. Cinética de crecimiento de *B. infantis* en medio TPYG original (○) y en medio optimizado (□)

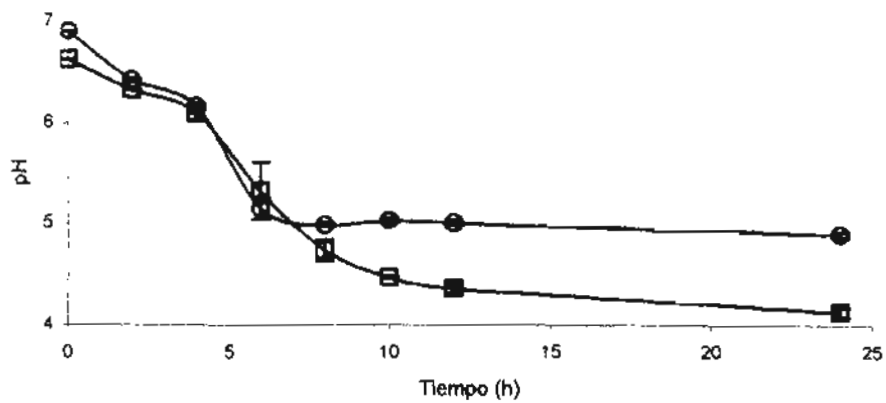


Figura 9. Perfil de pH en los cultivos de *B. infantis* en medio TPYG original (○) y en medio optimizado (□)

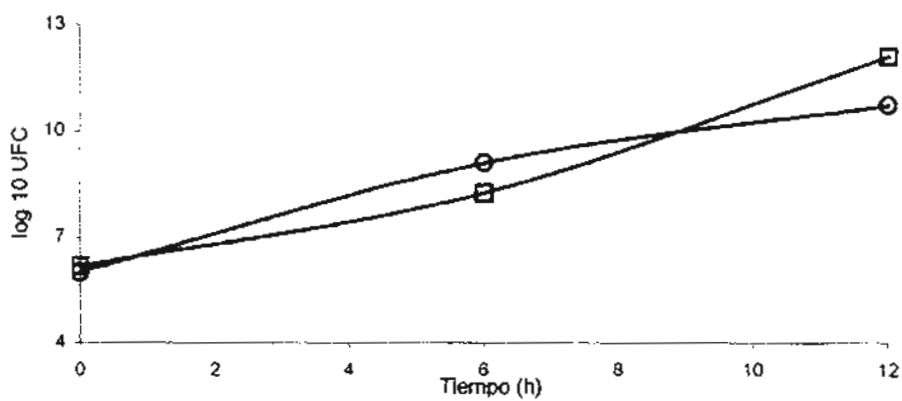


Figura 10. Producción de biomasa activa de *B. infantis* en los cultivos en medio TPYG original (○) y en medio optimizado (□)

El análisis de varianza (ANOVA) no mostró diferencias significativas en la obtención de biomasa viable entre el medio TPYG original y el medio optimizado ( $P = 0.05$ ), pero si en la obtención de biomasa a las 12 y 24 horas de fermentación ( $P < 0.05$ ).

Como se observa en la Figura 8, el crecimiento máximo que se obtuvo en el medio optimizado fue de 8 g/l en promedio a las 12 horas de cultivo, menor al crecimiento teórico esperado, que se calculó en 11 g/l. Es importante hacer notar que el pH del medio optimizado a las 10 horas de cultivo llegó a 4.46, mientras que en el medio TPYG el pH a las 10 horas fue de 5.01 en promedio. Esto probablemente es debido a la capacidad amortiguadora de los tres componentes nitrogenados del medio TPYG, y que en el medio de cultivo optimizado no existe esa capacidad de amortiguar el pH. Si en el medio TPYG la relación C:N es de 1:3.5 y en el medio optimizado la relación C:N es de 1:1, la producción de ácidos debe ser mayor y en consecuencia, se provocó una mayor disminución del pH a partir de las 10 h de cultivo. Laoria y Martin (1991) reportaron que las bifidobacterias no sobrevivieron a pH menores de 4.5 pero a pH mayores a 5.6, sobrevivió el 50% de la población de células. Esta causa es la más probable para no lograr el rendimiento teórico de biomasa.

Por otro lado, si la caída de pH no permite obtener una mayor concentración de células viables y tampoco permite igualar la cantidad de biomasa teórica, entonces, si se controla el pH con un amortiguador, debe aumentar la biomasa durante en el cultivo del medio optimizado. Por lo anterior se formuló el nuevo medio de cultivo con un amortiguador.



### Medio optimizado con amortiguador

Para comprobar la hipótesis anterior, se realizó un siguiente experimento en el cual el medio optimizado se preparó con un amortiguador de fosfatos 0.2M pH 7 donde se disolvieron todos los ingredientes. En la Figura 11 se observa el crecimiento de *B. infantis* en medio TPYG original, TPYG con amortiguador y el medio optimizado con amortiguador. En esta caso, la biomasa obtenida en el medio de cultivo optimizado fue mayor de 11 g/l de células en peso seco, el doble del medio TPYG original y del medio TPYG con amortiguador de fosfatos. La variación de pH (Figura 12) no mostró diferencias significativas en los tres casos, pero si se compara el perfil de pH del experimento anterior (Figura 9), se observa un mejor comportamiento para el medio optimizado con amortiguador, que se refleja en una mayor obtención de biomasa (Figura 11). La biomasa viable de *B. infantis*, en los tres medios de cultivo fue similar (Figura 13).

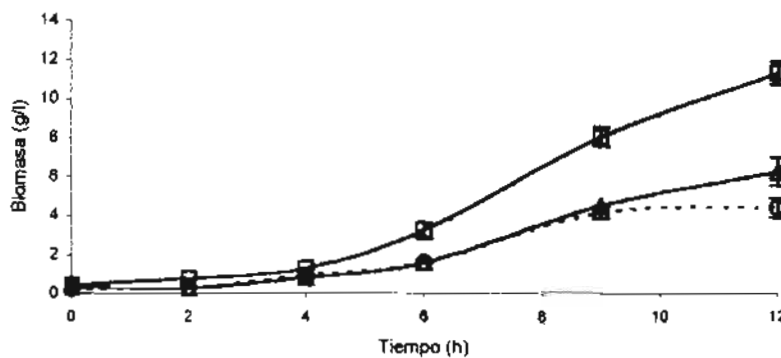


Figura 11. Cinética de crecimiento de *Bifidobacterium infantis* en medio TPYG Original (○), TPYG con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (Δ) y en medio optimizado con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (□)

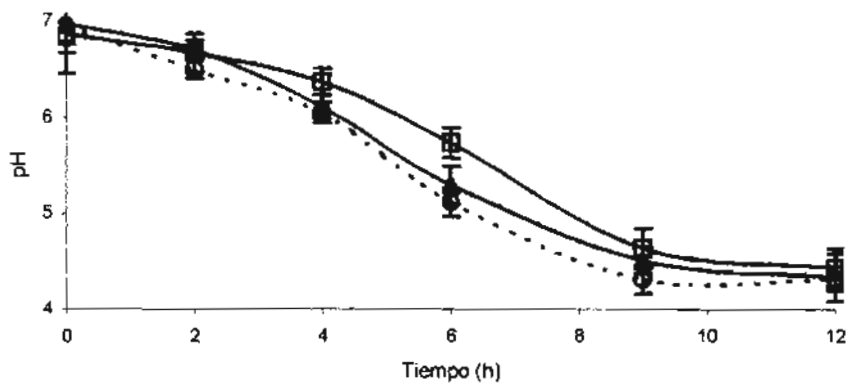


Figura 12. Perfil de pH en el crecimiento de *Bifidobacterium infantis* en medio TPYG original (○), TPYG con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (Δ) y en medio optimizado con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (◻)

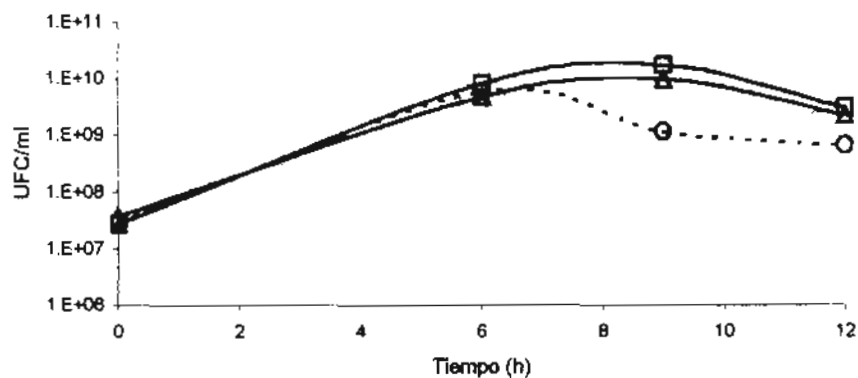


Figura 13. Biomasa viable (UFC/ml) en la fermentación de *Bifidobacterium infantis* en medio TPYG original (○), TPYG con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (Δ) y en medio optimizado con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (◻)

El análisis realizado hasta este momento no arrojó evidencias determinantes para hablar de una verdadera optimización, no obstante, se consideró necesario recurrir a otros elementos de análisis, en especial las tasas específicas de crecimiento y los rendimientos celulares, en donde se debe reflejar que en los primeros estadios del crecimiento celular, la tasa máxima de crecimiento es dirigida por la presencia en calidad y concentración de los sustratos relacionadas con las vías metabólicas primarias necesarias para la obtención de energía. (Van Hoek y col., 1998)

En la Figura 14 se graficaron las tasas de crecimiento de la biomasa celular (g células/l) y en la Figura 15 de la biomasa activa (UFC/ml). En la Figura 14 se observa un comportamiento no esperado, ya que aun siendo la mayor tasa de crecimiento para el medio optimizado a las 2 horas, a las 4 horas es menor a la de los medios TPYG original y con amortiguador de fosfatos. Su explicación es difícil, ya que por tratarse de medios muy complejos, parece ser que a las 2 horas de iniciados los cultivos, el medio optimizado tiene los sustratos necesarios para el crecimiento, sin embargo, a las 4 horas, las velocidades de crecimiento de los medios TPYG original y con amortiguador son mejores. Pero en la Figura 15 donde se muestran las tasas de crecimiento de la biomasa viable, para el medio optimizado los valores son mayores a los obtenidos con los otros dos medios de cultivo.

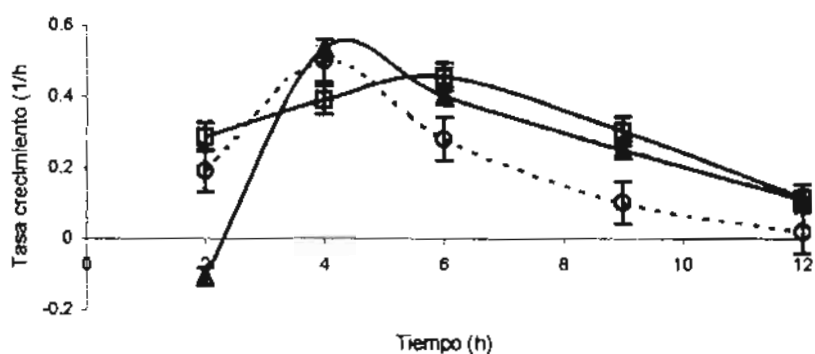


Figura. 14. Tasas de crecimiento de *B. infantis* en los cultivos con el medio TPYG original (O), TPYG con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (Δ) y en medio optimizado con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (□)

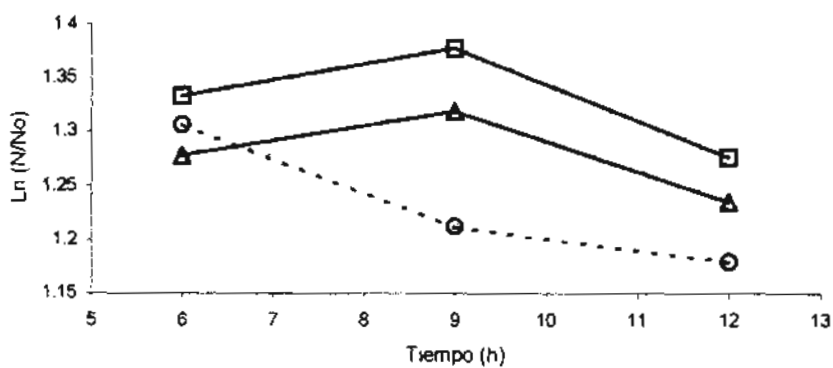


Figura. 15. Tasas de crecimiento de la biomasa activa de *B. infantis* en los cultivos con medio TPYG original (O), TPYG con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (Δ) y en medio optimizado con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (□)

La productividad volumétrica de biomasa y de células activas se muestra en las Figuras 16 y 17. En la Figura 16 se observa que la productividad celular (g/lh) a partir de las 6 horas y hasta el final, fue mayor para el medio optimizado a partir de las 4 horas y hasta el final del cultivo, con un valor máximo a las 9 horas que es significativamente mayor si se compara con el medio TPYG original y con el amortiguador. La productividad volumétrica de biomasa activa (Figura 17) muestra resultados semejantes a la productividad de biomasa con un máximo en el valor de productividad a las 9 horas. Estos resultados son un efecto del control de pH, que permitió durante las primeras horas un aumento sustancial de biomasa y de células activas.

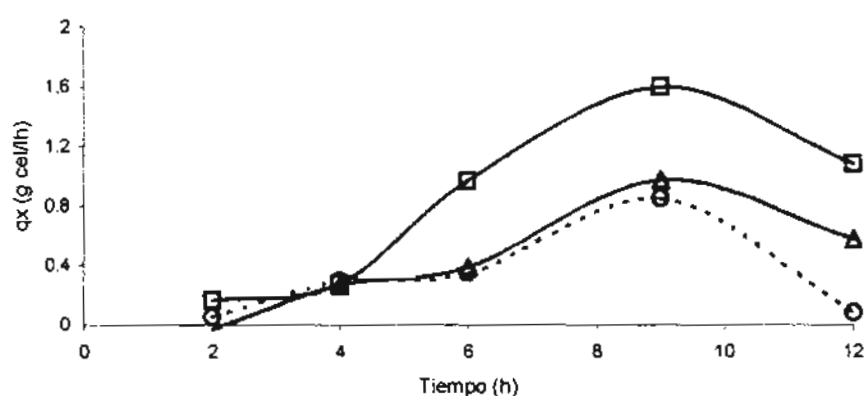


Figura 16. Productividad volumétrica de biomasa de *B. infantis* durante las fermentaciones en el medio de cultivo TPYG original (○), TPYG con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (△) y en medio optimizado con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (□)

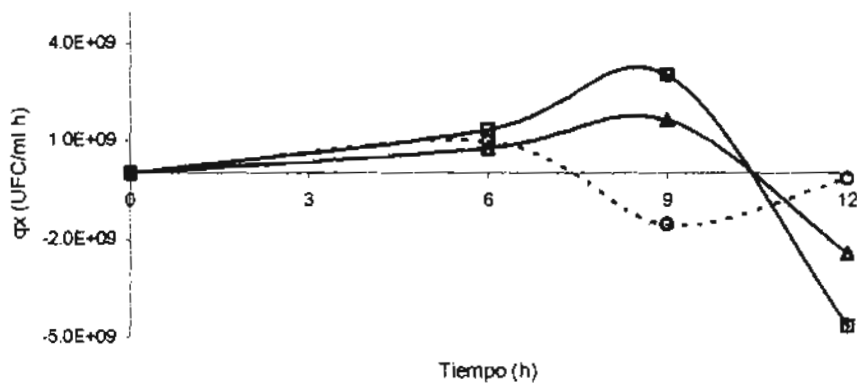


Figura 17. Productividad volumétrica de biomasa viable de *B. infantis* durante las fermentaciones en el medio de cultivo TPYG original (○), TPYG con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (Δ) y en medio optimizado con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 (□)

En la Figura 17 se observan la productividad volumétrica de la biomasa viable (UFC/ml h) con un comportamiento similar a la productividad de biomasa en peso seco, con un máximo de productividad a las 9 horas de fermentación y favorecida por el medio optimizado.

Como se puede observar en los resultados anteriores, se obtuvo una biomasa en peso seco igual a la que se calculó mediante el modelo de optimización, con un crecimiento teórico de 11.04 g/l, en el caso de este experimento se obtuvo un crecimiento experimental de 11.3 g/l de células en peso seco, sin embargo, la preparación de los medios de cultivo con el amortiguador de fosfatos no se reflejó en una menor disminución del pH, ya que este en los tres medios de cultivo llegó a 4.5.

Con respecto a la biomasa viable, la Figura 13 muestra las unidades formadoras de colonias (UFC) durante los cultivos y en la Tabla 11 se muestra el análisis estadístico, donde se observa que existen diferencias significativas entre los medios de cultivo TPYG original y el medio optimizado y no hay diferencias significativas entre los medio TPYG original con TPYG con amortiguador de fosfato de potasio y entre los medio TPYG con amortiguador y el medio optimizado con fosfato de potasio.

Tabla 11. Análisis de grupos de los medios de cultivo TPYG, TPYG con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7 y medio optimizado con amortiguador

Medio de cultivo	N	Media UFC	Grupos homogéneos
TPY original	8	$1.9 \times 10^9$	X
TPYG amortiguador	8	$4.0 \times 10^9$	X
Medio Optimizado	8	$7.0 \times 10^9$	X

Tukey P = 0.05

En la Tabla 2 se observa que la ausencia de la fuente de fosfatos disminuye significativamente el crecimiento, es muy probable que en este último experimento el amortiguador de fosfatos no fue suficiente en su concentración para mantener el pH, sino para ayudar a la obtención de biomasa celular.

También, en lo que respecta a la obtención menor de biomasa viable entre los experimentos con el amortiguador de fosfato con los que no lo tienen, se observó la formación de agregados

difíciles de romper, lo que probablemente afectó las lecturas de células viables, pero aún así la diferencia entre el medio optimizado con el medio TPYG es notoria.

Con respecto al pH, en todos los experimentos realizados durante este estudio, entre las 9 y 12 h de fermentación, el pH siempre se encontró en 4.0 en promedio. En las Figuras 12 y 13 se puede comparar que la máxima concentración de células viables fue a las 6 horas cuando el pH se encuentra en 5, después, ya en fase estacionaria, la producción de ácidos orgánicos aumenta y causa una caída en la biomasa viable, lo que lleva a fijar como un tiempo máximo de fermentación 6 horas, que usualmente es el utilizado en la industria de producción de bebidas lácteas fermentadas.



## Discusión

Muchos estudios con bifidobacterias se han enfocado principalmente al efecto en la salud y en la microflora intestinal y son escasos los estudios sobre los medios de cultivo y las necesidades nutricionales para su crecimiento y producción. Olmos-Dichara y col. (1997) reportaron que los medios de cultivo con ingredientes complejos como las peptonas y extracto de levadura se han estudiado como factores para el crecimiento celular, pero su papel aún no es claro. La producción de bifidobacterias mantiene actualmente un gran interés debido a su efecto benéfico en la microflora intestinal y a su utilización en productos lácteos fermentados (Ishibashi y Shimamura, 1993).

La literatura describe condiciones óptimas para la producción de bifidobacterias, pero no explica la influencia de los ingredientes de los medios de cultivo (Tien-Meng y Schaffner, 1997). Poca atención se ha puesto en el efecto de los medios complejos y su influencia no ha sido aclarada. Para compensar este hecho, se han desarrollado métodos estadísticos que ayudan a entender el efecto de los ingredientes y sus interacciones, el desarrollo de estas metodologías ha permitido a los microbiólogos establecer la composición de los medios de cultivo en la obtención para la máxima producción de compuestos o células de interés (Saval y col., 1993; Sejong y col., 1995; Kalaimahan y Panda, 1995; Kimmel y col., 1998).

En este trabajo se estudió el efecto de los ingredientes del medio de cultivo para la producción de biomasa de *B. infantis* utilizando un medio complejo. Con respecto al aporte de nitrógeno, los resultados permiten evaluar que la ausencia de cada uno de los ingredientes que aportan

nitrógeno en el medio de cultivo TPYG, la obtención de biomasa disminuye de manera significativa, principalmente por la ausencia de la peptona de caseína ( $x_1$ ) y la de soya ( $x_2$ ) (Tabla 1).

En el caso de la caseína, Rasik y Kurmann (1983) reportaron que la actividad promotora del crecimiento por los derivados de leche se debe a la presencia de N-acetilglucosamina, indispensable para la síntesis de pared celular de *B. bifidum* y es considerada como factor bifidogénico. Petschow y Talbot (1990) reportaron que las fracciones del suero de leche humana incrementan el crecimiento de *B. infantis* en mayor cantidad que el suero de leche animal. Azuma y col. (1984) reportaron que el tratamiento de  $\kappa$ -caseína con enzimas proteolíticas libera un macropeptido que promueve el crecimiento de *B. infantis*.

Sin embargo, en el medio de cultivo optimizado en este trabajo, la ausencia de caseína aunado al incremento en la concentración de extracto de levadura ( $x_4$ ), permite obtener una mayor biomasa y se puede asumir que este ingrediente puede proporcionar la N-acetilglucosamina que es un componente de la pared celular de microorganismos

La ausencia de extracto de levadura o de cisteína afectó la obtención de biomasa en menor grado que la ausencia de los demás componentes del medio de cultivo control (TPYG) aunque no se observó diferencia significativa cuando se eliminan por separado y también, este aminoácido puede ser suplido por la peptona de soya ( $x_3$ ) (Tabla 1). Sin embargo, la ausencia

de las dos juntas sí afecta significativamente la producción de biomasa (Tabla 2). Por lo anterior, para el desarrollo de la investigación, estos resultados fueron determinantes.

Para analizar con mayor perspectiva el papel de los ingredientes nitrogenados en el medio de cultivo, fue necesario buscar los componentes que aportan estos ingredientes en particular. En la Tabla 12 se muestran los aminoácidos y su concentración. No se observan diferencias que permitan determinar cuál de los productos es mejor, pero es interesante ver que en la mayor parte de los experimentos, al realizar el análisis de significancia, la ausencia de peptona de soya mostró efectos significativos sobre el crecimiento ( $P < 0.05$ ).

Tabla 12. Aporte de los ingredientes (%) utilizados como fuentes de nitrógeno en procesos de fermentación.

	fitona soya papaina •	Peptona caseína Pancreática •	extracto levadura autolizado enzimático*
Nitrógeno %	9.2	11.7	10.3
Azúcares	37	0	16.6
Aminoácido			
Arg	4.6	2.6	3.5
Asp	5.8	5.1	--
Cys	5.0	0.3	1.6
Gly	2.8	1.8	--
Glu	9.3	17.0	--
Hís	1.6	2.4	1.5
Isoleu	2.5	5.0	4.7
Leu	3.2	7.1	6.4
Lys	3.6	5.3	6.5
Met	0.6	2.4	2.0
F.ala	3.6	3.8	3.5
Pro	3.4	11.5	--
Treo	1.8	3.5	3.3
Trip	0.7	0.9	1.0
Tir	1.9	2.3	4.0
Val	2.0	5.6	4.8

Fuentes, Manual de medios de Cultivo BBL (1980), Zabriskie y Armiger, (1985)

Con respecto a las sales minerales que componen el medio TPYG, únicamente el zinc no tiene efecto sobre el crecimiento (Tabla 2) y la ausencia de las otras sales y principalmente, del fosfato de potasio y del calcio si afectó significativamente. Probablemente, el aumento de 0.01M de esta sal en el medio original a 0.2 M en el medio de cultivo optimizado, ayudó al aumento de biomasa. Este resultado debe ser evaluado de manera particular.

Por otro lado, con la finalidad de optimizar el medio de cultivo, los experimentos factoriales permiten estudiar los efectos de los ingredientes y las interacciones que se presentan entre ellos, pero es indispensable tener en cuenta que esta metodología, es solo una herramienta y que los resultados deben ser evaluados a la luz de criterios biológicos. En el caso del experimento factorial de los ingredientes nitrogenados (Tabla 5) el análisis estadístico dejó ver que los ingredientes con mayor efecto en el crecimiento son las peptonas de caseína ( $x_1$ ) y de soya ( $x_2$ ), aunque se presenta una interacción triple ( $x_1x_2x_3$ ) también significativa pero difícil de interpretar biológicamente, pero que en este estudio se consideró para justificar la presencia de los tres ingredientes que aportan nitrógeno para favorecer la producción de biomasa. El análisis ortogonal central con puntos estrella de los cuatro ingredientes del medio TPYG mostró que los ingredientes significativos fueron únicamente  $x_1$  y  $x_2$ .

Para poder entender los resultados obtenidos hasta ese momento, se diseñaron tres medios de cultivo (Tabla 7) el análisis estadístico de los resultados (Tabla 8) dejó ver que cuando se disminuye la concentración de las peptonas y se aumenta la del extracto de levadura, se obtiene un incremento de biomasa en la mayoría de las corridas. A partir del medio M-3 y del crecimiento celular en las corridas 15 y 16 (Tabla 8), se diseñó el medio de cultivo para los

siguientes diseños experimentales por superficie de respuesta. La composición del medio modificado es la siguiente en g/l: peptona de caseína ( $x_1$ ) 7.5; peptona de soya ( $x_2$ ) 4.0; extracto de levadura ( $x_3$ ) 15 y glucosa ( $x_4$ ) 10.

El análisis de regresión múltiple de los resultados del nuevo experimento mostró que todos los ingredientes fueron significativos ( $P < 0.05$ ), en su efecto particular y por sus interacciones. Estos resultados permitieron calcular las nuevas concentraciones de los ingredientes y es notorio señalar que el modelo descarta a la peptona de caseína en el medio de cultivo optimizado, siempre y cuando se aumente la concentración del extracto de levadura.

El coeficiente de regresión de este experimento ( $R^2 = 0.89$ ) señala que el 11% de los resultados no se explican por este modelo. Sejong y col. (1995) reportaron un valor de  $R^2 = 0.809$  en un primer experimento de optimización para la producción de *Lactobacillus casei*, que no representa certeza en sus resultados. Ellos aumentaron el valor del coeficiente ( $R^2 = 0.98$ ) utilizando términos hasta de orden cuadrático, siendo significativas las variables temperatura ( $x_5^3$ ), extracto de levadura ( $x_2^3$ ), glucosa ( $x_4^4$ ) y peptona de caseína ( $x_1^4$ ). Con estos datos pudieron calcular que el nuevo medio de cultivo contiene en g/l; glucosa 25; peptona de caseína 20 y extracto de levadura 7. En este reporte no hubo aumento de células activas, solo una disminución del costo.

Sin embargo, Sen y Swaminathan (1997) y Kalaimahan y Panda (1995), a partir de el primer experimento de optimización, obtuvieron valores de  $R^2$  de 0.968 y 0.98 respectivamente. Los autores trabajaron la optimización de variables físicas y con medios de cultivo simples. La

diferencia entre los reportes anteriores es la utilización de medios de cultivo simples. Los medios de cultivo con ingredientes complejos producen gran variabilidad de los resultados, como es el caso de este reporte.

Con respecto a los resultados, los gráficos de las figuras 5 y 6 mostraron que los ingredientes ya están optimizados con una biomasa teórica de 11 g/l de biomasa. Cuando se realizó el ensayo con el nuevo medio de cultivo la biomasa resultante fue en promedio de 8.6 g/l de biomasa (Figura 7). En el caso de las células viables, a las 12 horas de fermentación se obtuvieron  $10^{12}$  UFC/ml para el medio optimizado y de  $10^{10}$  UFC/ml en el medio TPYG.

Considerando la baja obtención de biomasa en el medio optimizado (8.6 g/l) con respecto al valor teórico, probablemente debido a la disminución del pH en el medio y teniendo en cuenta la baja resistencia de las bifidobacterias a valores de pH menores a 4.5, se consideró preparar el medio optimizado con un amortiguador. Para controlar la disminución del pH, se seleccionó un amortiguador de fosfatos pH 7 0.2 M., ya que su efecto en la obtención de biomasa es notorio, como se observa en la Tabla 2.

El aumento en la concentración de fosfatos (amortiguador) en el medio optimizado sirvió para obtener 11 g/l de biomasa, pero las células activas disminuyeron en dos órdenes de magnitud. Es interesante apuntar que a partir de las 6 horas de fermentación se observó que las células se agregaban en el medio, lo que probablemente dificultó la cuenta de células. Abbad y col. (1995) reportaron en *B. longum* la producción de exopolisacáridos después de 48 h de cultivo en un medio con leche descremada, peptona y extracto levadura, con un control continuo de

pH a 7 con  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Los autores observaron que la adición de  $\text{CaCO}_3$  aumentó la producción del exopolisacárido en cantidades similares a las producidas por bacterias utilizadas en la producción de yogurt y que le da al producto final características reológicas ideales para la presentación del producto. Tomita y col. (1994) reportaron la aglutinación de *B. longum*, *Clostridium innocuum* y *Micrococcus luteus* en el medio de cultivo por la presencia de lactoferrina y ovotransferrina, situación que tuvo influencia en la determinación de biomasa cuando la comparan con medios de cultivo sin la presencia de las glicoproteínas.

Aunque los estudios citados en el párrafo anterior no permiten concluir el papel de los ingredientes en la agregación de células, es posible en este estudio que la adición del amortiguador de fosfatos provocó la aglutinación y la dificultad consecuente para cuantificar las células activas.

Por otra parte, las bifidobacterias pierden su viabilidad a pH menores de 5, la concentración de ingredientes en el medio optimizado ayudó a mantener un pH menos ácido (Fig 8), comparado con el medio en el que se agregó el amortiguador de fosfatos (Fig 11) por lo que es muy posible que este último sirvió para mejorar la obtención de biomasa. Si la ausencia de esta sal afectó significativamente la producción de biomasa (Tabla 2), un aumento de la misma, puede tener un efecto positivo en el crecimiento celular.

Entre el medio TPYG original y el medio optimizado, se logró un aumento de 2.5 en promedio a 11 g/l, más de 4 veces se aumentó la concentración de biomasa. De una relación C:N de 1:3 se pasó a una relación C:N de 1:1. La concentración de peptona de caseína pasó de 10 g/l a

cero. De peptona de soya de 5 g/l a 6g/l. De extracto de levadura de 2.5 g/l a 23 g/l y de glucosa de 5 g/l a 30 g/l. Sejong y col. (1995) optimizaron el medio de cultivo para la producción de *L. casei* con 30 g/l de peptona de caseína, 9 g/l de extracto de levadura y 15 g/l de glucosa con un promedio de  $10^8$  células/ml. Mientras Olmos-Dichara y col. (1997) incrementaron la producción de biomasa de *L. casei* de 1.95 g/l a 4.0 g/l cuando aumentaron de 5 a 20 g/l el extracto de levadura, de 10 a 40 g/l la peptona de caseína con 50 g/l de glucosa. En la tabla 13 se muestra un resumen de lo descrito arriba.

Tabla 13 Comparación entre los medios TPYG original y el medio optimizado en composición y resultados obtenidos

Componente	Concentración en el medio TPYG original (g/l)	Concentración en el medio optimizado (g/l)
Peptona de caseína	10	0
Peptona de soya	5	6
Extracto de levadura	2.5	23
Glucosa	5	30
$K_2HPO_4/KH_2PO_4$	2/--	8/6
Rel C/N	1/3.5	1/1
Biomasa	2.5	11
Células activas	$10^8$	$10^9$

Estos resultados permiten observar que los sistemas de optimización de ingredientes complejos es complicado y no se encuentra linealidad en la respuesta del diseño experimental. El error experimental puede deberse a varios factores, como son las interacciones que se presentan entre cada componente de los medios de cultivo para la obtención de biomasa final y por la respuesta distinta en el crecimiento de la bacteria en cada una de las corridas del



experimento. El uso de ingredientes complejos como los utilizados en este trabajo son comunes en la industria de fermentaciones, ya que su costo es menor al de los medios simples, pero la complejidad y variabilidad de estos ingredientes debe ser considerada como una variable de respuesta más que aumenta el error experimental.

Para la industria de fermentaciones es muy importante conocer los niveles mínimos y máximos de concentración de ingredientes que les permita la máxima producción del producto deseado. En este estudio, la figura 6 muestra que para las interacciones peptona de soya y glucosa ( $x_2x_4$ ) y para las interacciones extracto de levadura y glucosa ( $x_3x_4$ ), los rangos de variación de los ingredientes son pequeños. Es decir, una variación en la concentración de cada ingrediente, puede provocar una disminución notoria en la obtención de biomasa. Para calcular los límites permisibles de trabajo en las concentraciones, es necesario realizar un nuevo experimento de superficie de respuesta con las concentraciones optimizadas y con el error estándar de estas interacciones, calcular el límite inferior y superior de trabajo para cada ingrediente.

Cuando se realizan estudios sobre el efecto de ingredientes complejos y sus interacciones mediante diseños experimentales estadísticos, durante el análisis de los resultados siempre debe prevalecer el criterio biológico. Esto se puede apreciar en el medio de cultivo TPYG original, donde la interacción triple llevó a concluir que los tres componentes complejos deben estar presentes. Por el contrario, cuando en el medio M-2 se aumentó 4 veces la concentración de glucosa, el modelo utilizado no señaló un efecto en el crecimiento, por lo que se decidió

que el crecimiento estaría limitado por el tipo y cantidad de los componentes nitrogenados que aportan los ingredientes usados.

Los modelos de superficie de respuesta permiten apreciar no solo la importancia de los efectos principales, sino también la importancia de las interacciones que existen entre los factores. Así, este estudio permitió aumentar la obtención de biomasa celular de *B. infantis* en el medio propuesto con respecto al medio TPYG original, al analizar que los efectos significativos de cada uno de los ingredientes complejos que aportan los substratos nitrogenados. Se puede concluir con mayor precisión, que la presencia de los tres es importante.

Los procesos biológicos estudiados a través de modelos que arrojan efectos triples significativos no tienen una explicación fácil de interpretar, pero al igual que con el medio TPYG original donde se observó una interacción triple significativa entre los tres ingredientes que aportan la fuente de nitrógeno, la ausencia de cualquiera de los tres, tendría como consecuencia una disminución importante en la obtención de biomasa, tal como se observó en la tabla 1.

## Conclusiones

### *Ausencia de un ingrediente*

- Son necesarios las tres fuentes que aportan nitrógeno orgánico
- La cisteína puede ser sustituida por el extracto de levadura siempre y cuando esté presente la peptona de soya
- La fuente de carbono es indispensable
- La ausencia de Tween 80 afecta la morfología celular y disminuye la obtención de biomasa
- La ausencia de fosfato de potasio y de calcio afectan la obtención de biomasa
- La ausencia de zinc no afecta significativamente la producción de células
- Todas las sales del medio TPYG son importantes y un aumento en la concentración de fosfatos parece mejorar el crecimiento de *B. infantis*
- La ausencia de un componente del medio TPYG afecta la tasa de crecimiento de *B. infantis*
- *B. infantis* es capaz de crecer en un medio simple con amonio como fuente de nitrógeno

### *Diseño ortogonal central compuesto central*

- El medio de cultivo TPYG no es un medio optimizado
- Esta metodología permite observar el efecto de la interacción de los componentes
- Esta metodología permitió hacer un cambio sustancial en el medio de cultivo optimizado

- No es necesaria la presencia de peptona de caseína siempre y cuando exista otra fuente de N-acetil-glucosamina
- Probablemente el aumento en la concentración de fosfatos tiene un efecto en el aumento de biomasa y de células activas
- La contribución de las interacciones no permite examinar el efecto total del medio de cultivo en la producción de biomasa
- Se optimizó el medio y se aumentó la biomasa celular de 2.5 g/l en el medio TPYG a 11 g/l en el medio optimizado
- Las tasas de crecimiento y las velocidades volumétricas de biomasa y de células activas aumentaron en el medio optimizado
- La metodología utilizada permite estudiar el efecto de los ingredientes y sus interacciones, pero es indispensable tener en cuenta el criterio biológico
- El error del diseño experimental puede ser debido a la complejidad del sistema en estudio

## Bibliografía

- 1-[http://www.umr.edu/~ environ/461/hist\\_12.htm](http://www.umr.edu/~environ/461/hist_12.htm)
- 2-<http://www.ilw.agrl.ethz.ch/~puhan/>
- Abbad A.S., H. Talbaoui, R. Marczak and T. Bonaly (1995). Isolation and characterization of exocelular polisaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43: 995-1000
- Abdelali H., P. Cassand, B. Soussotte, B.B. Koch and J.F. Narbonne (1995). Antimutagenicity of components of dairy products. **Mutation Res.** 331: 133-141.
- Abu-Taraboush H.M., M. M. Al-Dagal and M.A. Al-Royli (1998). Growth, viability and proteolytic activity of bifidobacteria in whole camel milk. **J. Dairy Sci.** 81: 354-361
- Achary A., K.A. Hariharan, S. Bandhyopadhyaya, R. Ramachandran and K. Jayaraman. (1997) Application of numerical modeling for the development of optimized complex medium for D- hydantoinase production from *Agrobacterium radiobacter* NRRL B 11291. **Biotechnol. Bioeng.** 55: 148-154.
- Aeschlimann A. and U. Von Stockar (1990). The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 32: 398-402
- Azuma N., K. Yamauchi y T. Mitsuoka (1984). Bifidus growth promoting activity of a glycomacropeptide derived from human  $\kappa$ -casein. **Agric. Biol. Chem.** 48: 2159-2162
- Baird-Parker A.C. and D.C. Kirsby (1987). Principles of predictive food microbiology. **J. Appl. Bacteriol.** Sppl. 62: 43-49
- Ballonge J. (1993). En Lactic acid bacteria, Eds Salminen, S and A. Von Wriyth, pp: 357-428. New York, Marcel Drekker
- Beerens H. (1990). An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. **Lett. Appl. Microbiol** 11: 155-157
- Bernet M.F., D. Brassart, J.R. Neserer and A.L. Servin (1993). Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interaction. **Appl. Envir. Microbiol** 59: 4121-4128

- Beverly A.D. and G.T. Macfarlane (1991). Comparison of carbohydrate substrate preferences in eight species of bifidobacteria. **FEMS Microbiol. Letters** 84: 151-156.
- Bezkorovainy A. and R. Miller-Catchpole. *Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria*. CRC Press, cap 8 y 9. 1989. Boca Raton, USA.
- Bezkorovainy A. Nutrition and metabolism of Bifidobacteria. en **Biochemistry and Physiology of Bifidobacteria**. Cap IV. Ed. A. Bezkorovainy and R. Miller-Catchpole. CRC Press Inc. USA. 1989
- Bibal B., Vayssier, Y., Tournou, M. and Pereilleux, A. (1989). Enhanced inhibitory effect of lactic acid on growth kinetics of *Streptococcus cremoris* during nutritional medium limitations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 30: 630-635
- Blanchette L., D. Roy, G. Bélanger and S. Gauthier (1996). Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. **J. Dairy Sci.** 79:8-15
- Bouhnik Y., B. Flourié, C. Andrieux, N. Bisetti, F. Briet and J.C. Rambaud (1996). Effects of *Bifidobacterium sp.* fermented milk ingested with or without inulin on colonic bifidobacteria and enzymatic activities in healthy humans. **Eur. J. Clin. Nutr.** 50: 269-273.
- Box, G.E.P., W.G. Hunter, J.S. Hunter (1978). *Statistics for experimenters*. New York: Wiley and Sons
- Boyaval P., M.N. Madec and C. Corre (1992). Concentrated starter productions in a two stage cell-recycle bioreactor plant. **Biotech. Letters** 14:589-592
- Bretler G. and I.W. Marison (1996) A medium optimization strategy for improvement of growth and methane production by *Methanobacterium thermoautotrophicum*. **J. Biotechnol.** 50: 201-212
- Corre C., M.N. Madec and P. Boyaval (1992). Production of concentrated *Bifidobacterium bifidum*. **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 53:189-194
- Crociani F., B. Biavati, A. Alessandrini, C. Chiarini and V. Scardovi (1996). *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. two new species isolated from human dental caries. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 46: 564-571.
- Chevalier P., D. Roy and P.Ward (1990) Detection of Bifidobacterium species by enzymatic methods. **J. Appl. Bacteriol** 68: 619-624.

- Daigle A., D. Roy, G. Bélanger and J.C. Vuillemard (1999). Production of probiotic cheese (cheddar like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. **J. Dairy Sci.** 82: 1081-1091
- Desjardins M.L., D. Roy, and J. Goulet (1990). Growth of Bifidobacteria and their enzymes profiles. **J. Dairy Sci.** 73: 299-307.
- DeVries W and A.H. Stouthamer (1967a). Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of Bifidobacteria. **J. Bacteriol.** 93: 574-576.
- DeVries W. and A.H. Stouthamer (1968). Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xilose by Bifidobacteria. **J. Bacteriol.** 96: 472-478.
- DeVries W., J. Gerbrandy and A.H. Stouthamer (1967b). Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. **Biochem. Biophys Acta** 136: 415-425.
- Dubey U.K. and V.M. Mistry (1996). Effect of bifidogenic factors on growth characteristics of bifidobacteria in infant formulas. **J. Dairy Sci.** 79:1156-1163
- Dunn G.M. Nutritional requirements of microorganisms. Pp: 113-126. In **Comprehensive Biotechnology**. Ed. Murray Moo-Young. Pergamon Press, N.Y. 1985
- Elmer G.W., C.M. Surawicz, V. Lynne y V. McFarland (1996). Biotherapeutic agents. A neglected modality of the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. **JAMA** 275 (11): 870-876
- Fujino S. and M. Nagawa (1989). Effect of a warm-water extract of malt on the proliferation of mouse intestinal bifidobacteria. **Agric. Biol. Chem** 53: 843-844.
- Fujiwara S., H. Hashiba, T. Hirota and J.F. Forstner (1997). Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to ganglioside GM1. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 506-512.
- Fuller, R (1989). Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.** 66: 365-378
- Gallaher D.D., W.H. Stallings, L.L. Blessing, F.F. Busta and L.J. Brady (1996). Probiotics, cecal microflora, and aberrant crypts in the rat colon. **J. Nutr.** 126: 1362-1371.
- Gibson G.R. and M.B. Roberfroid (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.** 125: 1401-1412
- Gibson G.R. and X. Wang (1994). Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. **J. Appl. Bacteriol.** 77: 412-420.

- Gobbetti M., A. Corsetti, E. Smacchi, A. Zocchetti and M. de Angelis (1998). Production of crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. **J. Dairy Sci.** 81: 37-47
- Gomes A.M.P., F.X. Malcata and F.A.M. Klaver (1998). Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* by milk hydrolyzates. **J. Dairy Sci.** 81: 2817-2825.
- Grill J.P, J. Crociani and J. Ballongue (1995). Effect of bifidobacteria on nitrites and nitrosamines. **Letters Appl. Microbiol.** 20: 328-330.
- Hale T.L. (1991). Genetic basis of virulence in *Shigella* species. **Microbiol. Rev.** 55: 206-224.
- Hartemink R., K.M.J. Van Laere and F.M. Rombouts (1997). Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. **J. Appl. Microbiol.** 83: 367-374
- Hassinen J.B., G.T. Durbin, R.M. Tomarelli and F.W. Bernhart (1951). **J. Bacteriol** 62: 771-777
- Heinig M.J. and K.G. Dewey (1996). Health advantages of breast feeding for infants: a critical review. **Nutr. Res. Rev.** 9: 89-110.
- Hoon-Ahn J., Y. Phil Lee and J. Shick Rhee (1997) Investigation of refolding condition for *Pseudomonas fluorescens* lipase by response surface methodology. **J. Biotechnol.** 54: 151-160.
- Hopkins M.J., J.H. Cummings and G.T. MacFarlane (1998). Inter-species differences in maximum specific growth rates and cell yields of bifidobacteria cultured on oligosaccharides and other simple carbohydrates sources. **J. Appl. Microbiol.** 85: 381-386
- Hounsa C.G., J.M. Aubry, H.C. Dubourguier and J.P. Hornez (1996) Application of factorial and Doehlert designs for optimization of pectate lyase production by a recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Microb. Technol.** 45: 764-770.
- Hove H., I. Nordgaard-Andersen and P.B. Mortensen (1994). Effect of lactic acid bacteria on the intestinal production of lactate and short-chain fatty acids, and the absorption of lactose. **Am. J. Clin. Nutr.** 59:74-79.
- Hudault S., C. Bridonneau, P. Raibaud, C. Chabanet and M.F. Vial (1994). Relationship between intestinal colonization of *Bifidobacterium bifidum* in infants and the presence of



- exogenous and endogenous growth-promoting factors in their stools. **Pediatr. Res.** 35: 696-700.
- Ishibashi N. and S. Shimamura (1993). Bifidobacteria: research and development in Japan. **Food Technol.** 6: 126-135
  - Ishizaki A. and P. Vonkaveesuk (1996) Optimization of substrate feed for continuous production of lactic acid by *Lactococcus lactis* IO-1. **Biotechnol. Letters** 18(10): 1113-1118
  - Juven B.J., Meinesmann, R.J. and N.J. Stern (1991). Antagonist effects of *Lactobacilli* and *Pediococci* to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry. **J. Appl. Bacteriol.** 70: 95-103.
  - Kalaimahan T. and T. Panda (1995) Application of response surface methodology to evaluate the influence of temperature and initial pH on the production of  $\beta$ -1,3-glucanase and carboxymethylcellulase from *Trichoderma harzianu*. **Enzyme Microb. Technol.** 17: 1043-1049
  - Kampmann E., A. Goldbohm, A. van den Brandt and P. van 't Veer (1994). Fermented dairy products, calcium and colorectal cancer in the Netherlands Cohort Study. **Cancer Res.** 54: 3186-3190.
  - Kaneko T., T. Kohmoto, H. Kikuchi, M. Shiota, H. Iino and T. Mitsuoka (1994). Effects of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerization on human fecal Bifidobacteria. **Biosci. Biotech. Biochem.** 58: 2288-2290
  - Kaufmann P., A. Pfefferkorn, M. Teuber and L. Meile (1997). Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 1268-1273.
  - Kimmel S.A., R.F. Roberts and G.R. Ziegler (1998) Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. **Appl. Environ. Microbiol.** 64(2): 659-664
  - Kok R.G., A. De Waal, F. Schut, G.W. Welling, G. Weenk and K.J. Hellingwerf (1996). Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 3668-3672.

- Langhendries J.P., J. Detry, J. Van Hees, J.M. Lamboray, J. Darimont, M. Ozin, M.C. Secretin and J. Senterre (1995). Effect of a fermented infant formula containing viable bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. **J. Pediatr. Gastroenterol.** 21: 177-181.
- Laoria S. and J.H. Martin (1991). Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. **Cultured Dairy Products J.** 11: 13-21
- Link-Amster H., F. Rochat, K.Y. Saudan, O. Mignot and J.M. Aeschlimann (1994). Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** 10: 55-64.
- McCartney A.L., W. Wenzhi and G.W. Tannock (1996). Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 4600-4613.
- McKellar R.C. and H.W. Modler (1989). Metabolism of fructo-oligosaccharides by *Bifidobacterium* spp. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 31:537-541
- McKellar R.C., H.W. Modler and J. Mullin (1993). Characterization of growth and inulinase production by *Bifidobacterium* spp. on fructooligosaccharides. **Bifidobacteria Microflora.** 12 (2): 75-86.
- Meile L., W. Ludwig, U. Rueger, C. Gut, P. Kaufmann, G. Dasen, S. Wenger and M. Teuber (1997). *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. **Syst. Appl. Microbiol.** 20: 57-64.
- Midolo P.D., J.R. Lambert, R. Hull, F. Luo and M.L. Grayson (1995). *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. **J. Appl. Bacteriol.** 79: 475-479.
- Miettinen M., J. Vuopio-Varkila and K. Varkila (1996). Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and interleukin-10 induced by lactic acid bacteria. **Infection and Immunity.** 64: 5403-5405
- Miller T.L. and M.J. Wolin (1996). Pathway of acetate, propionate and butyrate formation by the human fecal microbial flora. **Appl. Environ. Microbiol.** 62(5): 1589-1592

- Mitsuoka T. (1990). Bifidobacteria and their role in human health. **J. Ind. Microbiol.** 6: 263-268
- Montgomery D.C. 1991. Design and analysis of experiments. 3rd. Edition. Wiley. New York
- Moore W.E. and L.H. Moore (1995). Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. **Appl. Environ. Microbiol.** 61: 3202-3207.
- Muramatsu K., S. Onodera, M. Kikuchi and N. Shiomi (1993). Purification and some properties of  $\beta$  -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. **Biosci. Biotech. Biochem.** 57: 1681-1685
- Myers R.H. (1971) Response surface methodology. Allyn & Bacon Inc. Boston, p134
- Nagawa M. Nakabayashi, A. and S. Fujino (1988). Preparation of the Bifidus milk powder. **J. Dairy Sci.** 71: 1777-1782.
- Nuraida L., Y, Grigolava, J.D. Owens and G. Campbell-Platt (1992). Oxygen and pyruvate as external electron acceptor for *Leuconostoc* spp. **J. Appl. Bacteriol.** 72: 517-522
- Olmos-Dichara A., F. Ampe, J.L. Uribelarrea, A. Pareilleux and A. Goma (1997). Growth and lactic acid production by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* in batch and membrane biorreactor: influence of yeast extract and tryptone enrichment. **Biotechnol. Letters** 19(8): 709-714.
- Orrhage K., E. Sillerström, J.A. Gustafsson, C.E. Nord and J. Rafter (1994). Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. **Mutation Res.** 311: 239-248.
- Payne J.F., A.E.J. Morris and P. Beers (1999). Note: Evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* spp. in milk. **J. Appl. Microbiol.** 86: 353-358
- Petschow B.W. and R.D. Talbot (1990). Growth promotion of *Bifidobacterium* species by whey and casein fractions from human and bovine milk. **J. Clin. Microbiol.** 28(2): 287-292
- Poch M. and A. Bezkorovainy.(1988) Growth-enhancing supplements for various species of the genus *Bifidobacterium*. **J. Dairy Sci.** 71: 3214-3221.
- Poch M. and A.Bezkorovainy (1991). Bovine milk casein trypsin digest is a growth enhancer for the genus *Bifidobacterium*. **J. Agric. Food Chem.** 39: 73-77

- Poupard J. A., I. Husain and R. F. Norris (1973). Biology of Bifidobacteria. **Bacteriol Rev.** 37: 136-165
- Rasic J. (1989). The role of dairy foods containing bifidobacteria and acidophilus bacteria in nutrition and health. in "Fermented Milks, Current research". Ass International des Fabricants de yogurt. Paris, France.
- Rasic J.L. and J.A. Kurmann (1983). **Bifidobacteria and their role**. Birkhauser Verlag, Boston, MA. USA
- Resnick I.G. and M. A. Levin (1981). Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution. **Appl. Environ. Microbiol.** 42: 433-438
- Roberto I.C., S. Sato, I.M. Manchilla and M.E.S. Taqueda (1995) Influence of media composition on xylytol fermentation by *Candida guilliermondi* using response surface methodology. **Biotechnol. Letters** 17(11): 1223-1228
- Roberts C.M., W.F. Fett, S.F. Osmas, J.V. O'Connor and D.G. Hoover (1995). Exopolisaccharide production by *Bifidobacterium longum* BB-79. **J. Appl. Bacteriol.** 78: 463-468
- Rösler B., H. Lübben and G. Kretzmer (1996) Temperature: a simple parameter for process optimization in feed-batch cultures of recombinant chinese hamster ovary cells. **Enzyme Microb. Technol.** 19: 423-427
- Saavedra J.M., N.A. Bauman, I. Oung, J.A. Perman and R.H. Yolken (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. **Lancet** 344:1046-1049.
- Salminen S., E. Isolauri and T. Onnela (1995). Gut flora in normal and disordered states. **Chemother.** 41: (suppl. 1), 5-15.
- Sanders M.E., D.C. Walker, K.M. Walker, K. Aoyama and T.R. Klaenhammer (1996). Performance of commercial cultures in fluid milk applications. **J. Dairy Sci.** 79: 943-955.
- Saval S., L. Pablos and S. Sanchez (1993) Optimization of a culture medium for streptomycin production using response-surface methodology. **Bioresource Technol.** 43: 19-25

- Scalabrini P., M. Rosi, P. Spettoli and D. Matteuzzi (1998). Characterization of *Bifidobacterium* strains for use in soymilk fermentation.. **Intl. J. Food Microbiol.** 39: 213-219
- Scardovi V (1981). The genus *Bifidobacterium*. en "The Prokaryotes" vol II. Ed. M. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schlegel. Cap 149. Springer-verlag. N.Y.
- Schiffrin E.J., F. Rochat, H. Link-Amster, J.M. Aeschlimann and A. Donnet-Hughes (1995) Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. **J. Dairy Sci.** 78: 491-497.
- Sejong O., R. Sungsoe, S. Jaehun. K. Sangkyo and B. Youngjin (1995). Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in triptone yeast extract-glucose medium by using response surface methodology. **Appl. Environ. Microbiol.** 61(11):3809-3814.
- Seki M., M. Igarashi, Y. Fukuda, S. Simamura, T. Kawashima and K. Ogasa (1978). The effect of *Bifidobacterium* cultured milk on the "regularity" among aged group. **Nutr. Food** 4: 379-387 (English abstract).
- Sen R. and T. Swaminathan (1997) Application of response surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. **Appl. Microb. Biotechnol.** 47: 358-363.
- Sghir A., J.M. Chow and R.I. Mackie (1998). Continuous culture selection of bifidobacteria and lactobacilli from human faecal samples using fructooligosaccharide as selective substrate. **J. Appl. Microbiol.** 85: 769-777
- Shimamura S., A. Fumiaki, N. Ishibashi, H. Miyakawa, T. Yaeshima, T. Araya and M. Tomita (1991). Relationship Between Oxygen Sensitivity and Oxygen Metabolism of *Bifidobacterium* Species. **J. Dairy Science** 75: 3296-3306
- Stecher H., U. Felder and K. Faber (1997) Large scale production of mandelate racemase by *Pseudomonas putida* ATCC 12633: optimization of enzyme induction and development of a stable crude enzyme preparation. **J. Biotechnol.** 56: 33-40
- Stoll T.S., K. Mühlethaler, U. Vos Stockar and I.W. Marion (1996) Systematic improvement of a chemically defined protein free medium for hybridoma growth and monoclonal antibody production. **J. Biotechnol.** 45: 111-123

- Taillander P., F. Gilis, F. R. Portugal, P. Laforce and P. Strehaiano (1996) Influence of medium composition, pH and temperature on the growth and viability of *Lactobacillus acidophilus*. **Biotechnol Letters** 17(7): 775-780.
- Takiguchi R., M. Miyamoto, M. Ohe, S. Toyoda, I. Nakajima and Y. Benno (1996). Effects of fermented milk administration on fecal microflora and putrefactive metabolites of healthy adults and healthy elderly persons. **Bifidus-Flores, Fructus et Semina** 9: 135-140 (English abstract).
- Tamime A.Y., V. Marshall and M. Robinson (1995). Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. **J. Dairy Res.** 62: 151-187.
- Thebaudin J.Y., A.C. Lefebvre, M. Harrington and C.M. Bourgeois (1997). Dietary fibres: nutritional and technological interest. **Trends Food Sci. Technol.** 8: 41-48.
- Tien Meng N. and D.W. Schaffner (1997). Mathematical models for the effects of pH, temperature and sodium chloride on the growth of *Bacillus stearothermophilus* in salty carrots. **Appl. Environ. Microbiol.** 63(4): 1237-1243
- Tomita S., M. Matsue, J. Matsuyama and I. Kiyosawa (1994). Agglutination of bacterial cells of *B. longum*, *Clostridium innocuum* and *Micrococcus luteus* by lactoferrin and ovotransferrin. **Biosci. Biotech. Biochem.** 58(4): 722-726
- Van Hoek P., J.P. Van Dijken y J.T. Pronk (1998). Effect of specific growth rate on fermentative capacity of Baker's yeast. **Appl. Environ. Microbiol.** 64(11): 4226-4233
- Ventling B.L. and V.V. Mistry (1993). Growth characteristics of bifidobacteria in ultrafiltered milk. **J. Dairy Sci.** 76: 962-971.
- Waitier D., H.C. Dubourguier, I. Leguerinel and J.P. Hornez. (1996) Response surface models to describe the effect of temperature, pH and ethanol concentration on the growth kinetics and fermentation end products of a *Pectinatus sp.* **Appl. Environ. Microbiol.** 62(4): 1233-1237
- Wang X., and G. R. Gibson (1993). Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. **J. Appl. Bacteriol** 75:373-380
- Wijsman M.R, J.L.P.M. Hereijers and J.M.F.H. de Groot (1989). Selective enumeration of bifidobacteria in fermented dairy products. **Neth. Milk Dairy J.** 43: 395-405

- Witjitra K., M.M. Shah and M. Cheryan (1996) Effect of nutrient sources on growth and acetate production by *Clostridium thermoaceticum*. **Enzyme Microb. Technol.** 19: 322-327
- Wolin J.M., Y. Zhang, S. Bank, S. Yerry and T.L. Miller (1998). NMR Detection of  $^{13}\text{CH}_3$ ,  $^{13}\text{COOH}$  from 3- $^{13}\text{C}$ -Glucose: A signature for *Bifidobacterium* fermentation in the intestinal tract. **J. Nutr.** 128: 91-96
- Zabriskie D. W. and W. B. Armiger (1985). *Trader's Guide to Fermentation Media Formulation.* (fotocopias)
- Zhang J., C. Marcin, M.A. Shiffet, P. Salmon, T. Brix, R. Greasham, B. Buckland and M. Chartrain. (1996) Development of a defined medium fermentation process for physostigmine production by *Streptomyces griseofuscus*. **Appl. Microb. Biotechnol** 44: 568-575

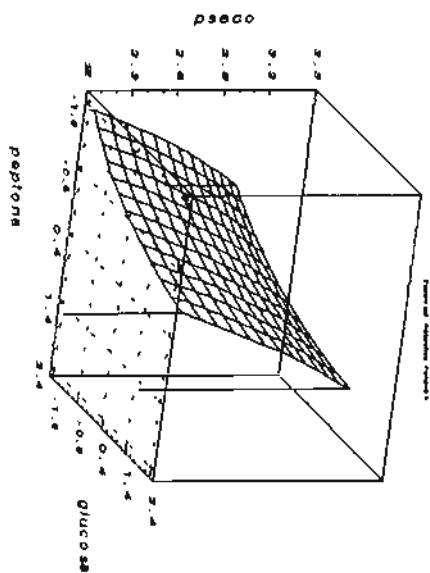
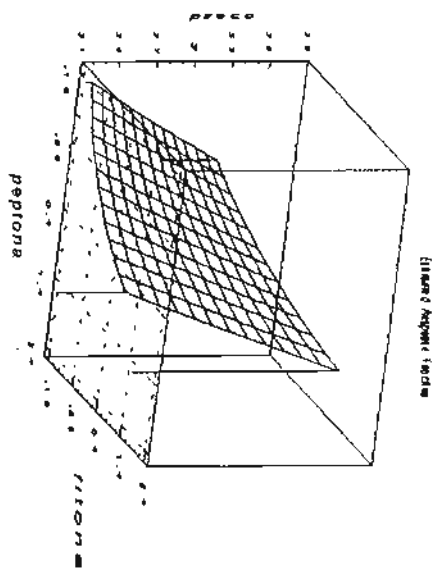
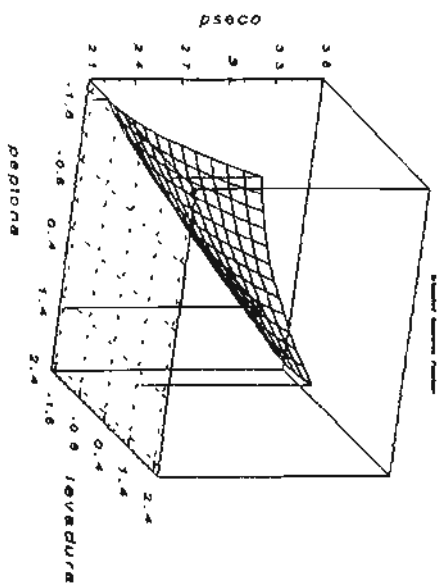
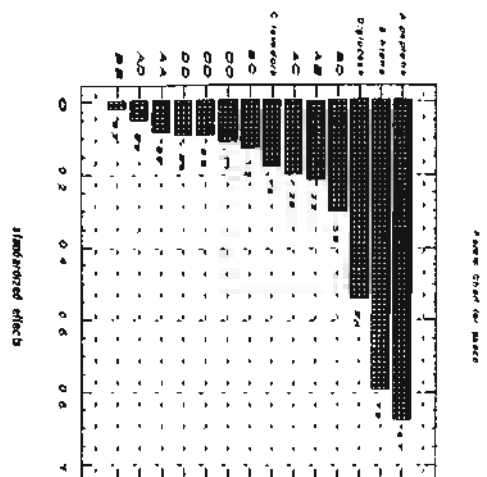
Anexos

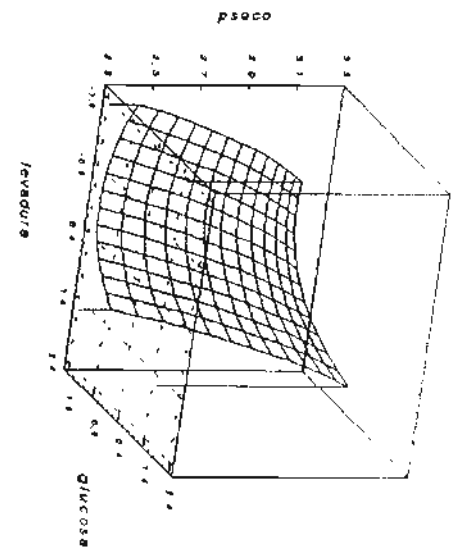
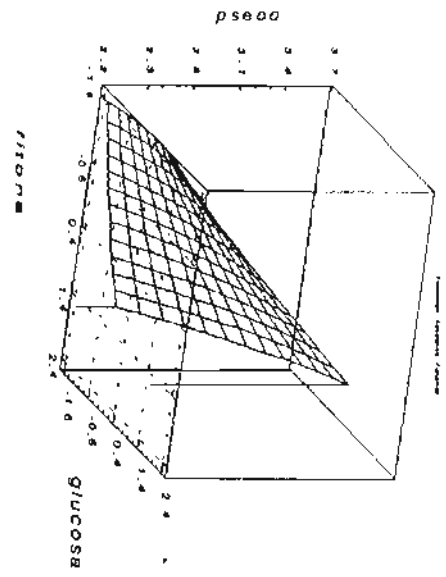
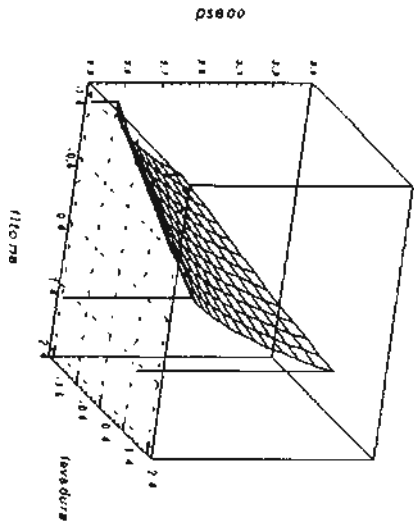
 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO



## Anexo I

Gráficas de superficie de respuesta medio TPYG

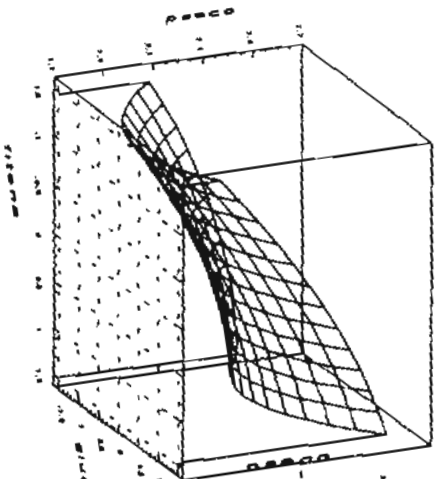




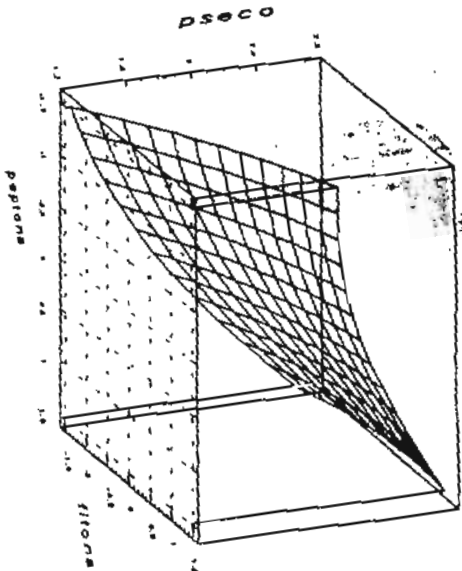
## Anexo 2

**Gráficas de superficie de respuesta medio M-1**

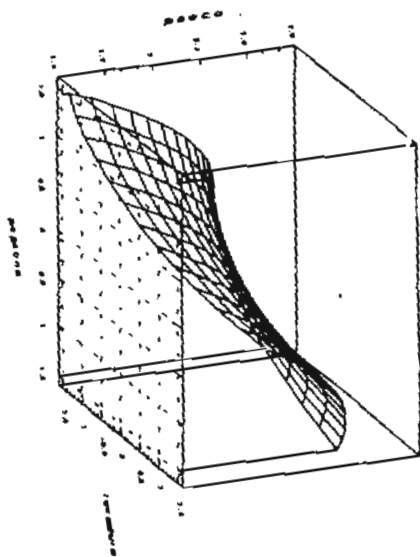
1-9



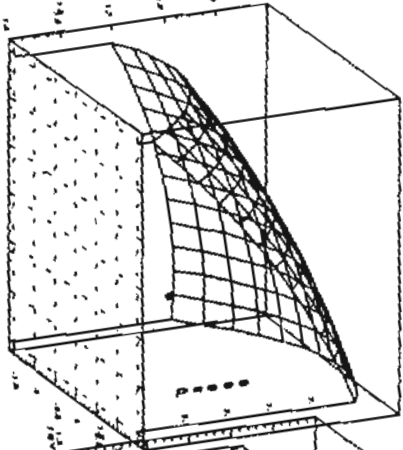
p-1



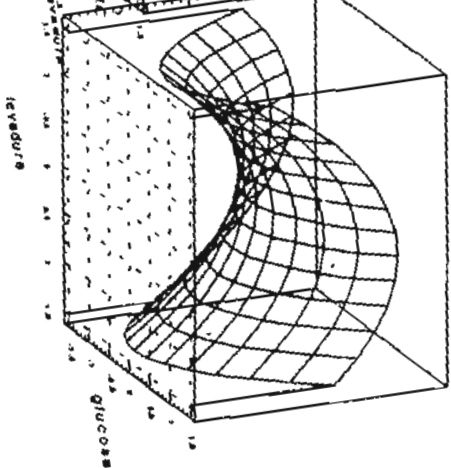
p-1



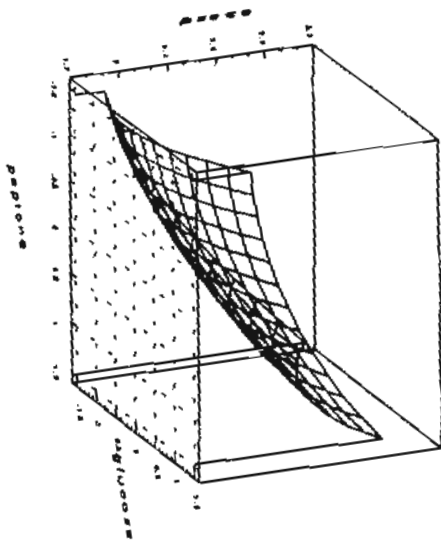
1-1



1-9



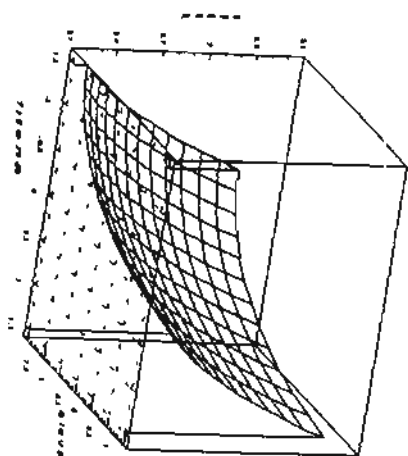
p-9



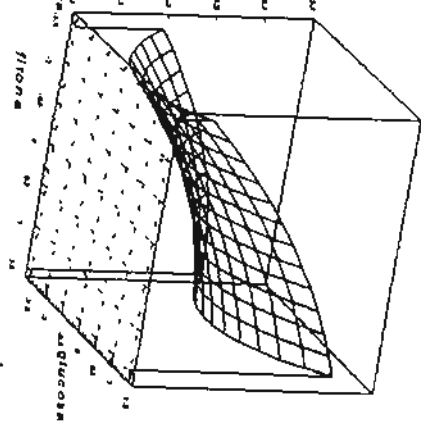
## Anexo 2

Gráficas de superficie de respuesta medio M-2

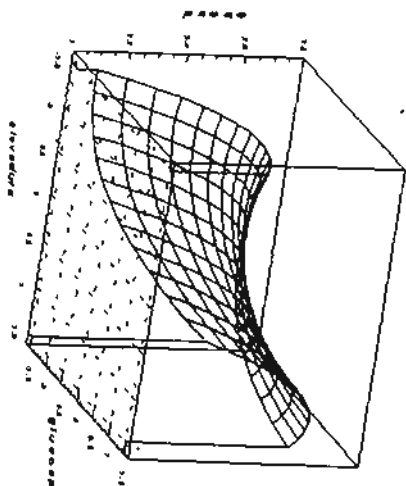
1-1



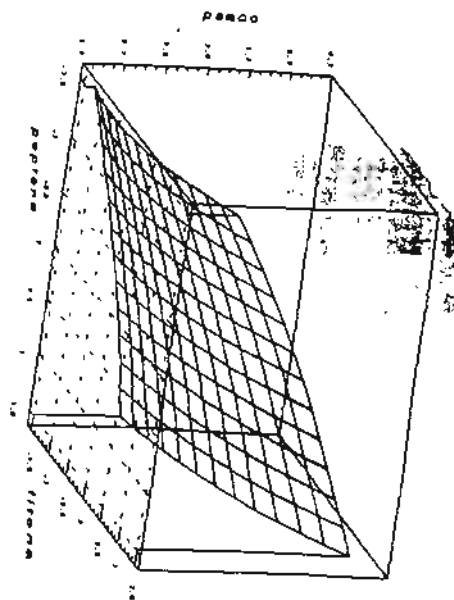
1-9



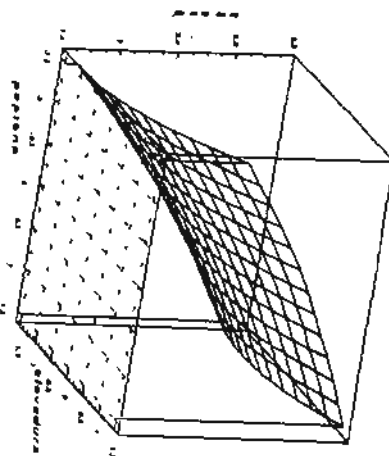
1-9



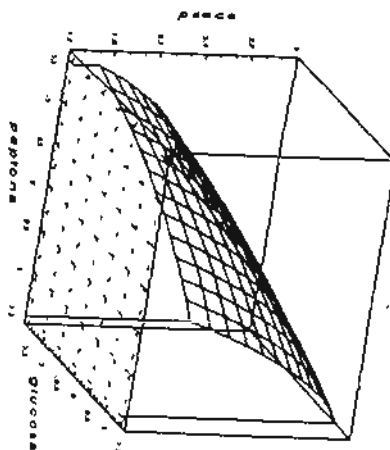
p-1



p-1



p-9

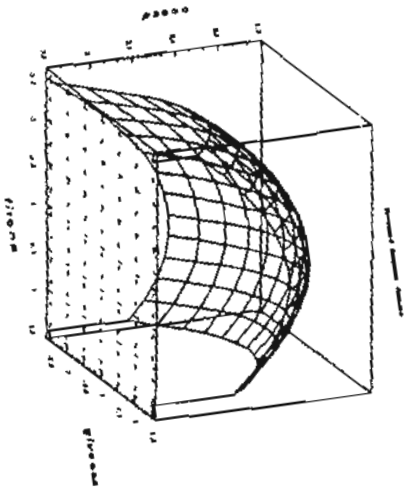


## Anexo 2

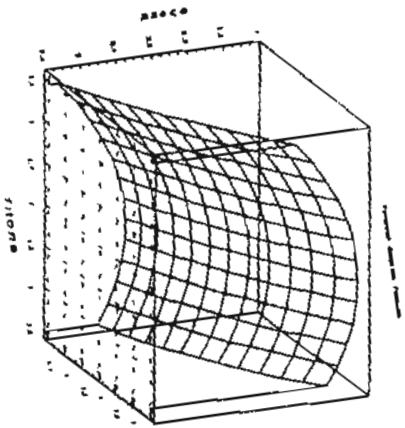
Gráficas de superficie de respuesta medio M-3



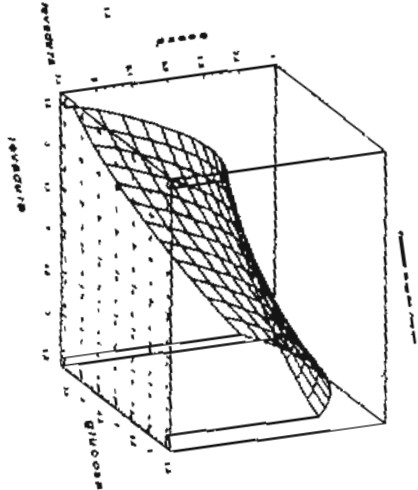
f-g



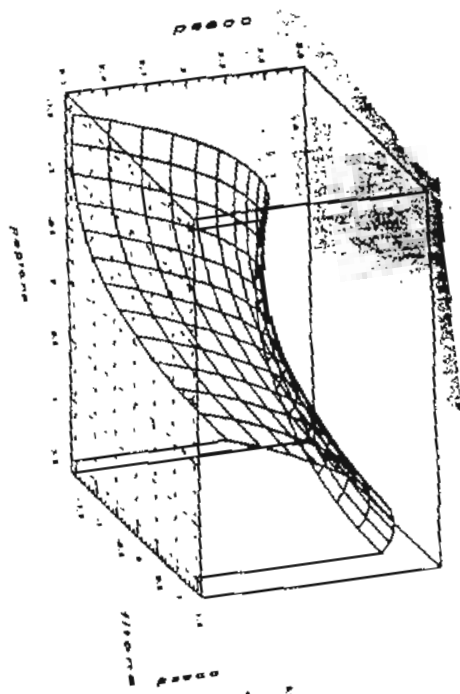
f-l



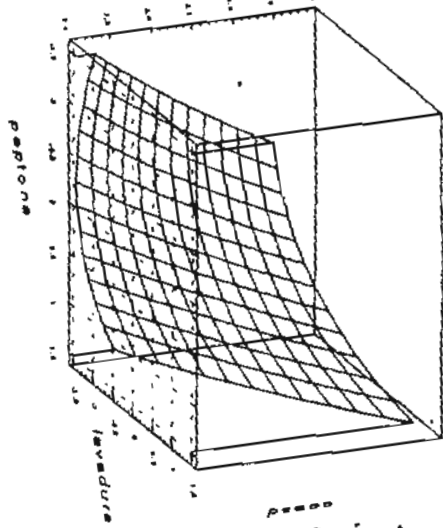
l-g



p-f



p-l



p-g

