

T  
226

~~84388~~

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRIA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN  
DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS

“ESTUDIO DE LAS CONDICIONES INICIALES DE  
FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA  
VIABLE DE *Bifidobacterium infantis*”

PRESENTA

PATRICIA BUSTAMANTE CAMILO

Matrícula: 99182108

Tutor: M. en C. RINA MARÍA GONZÁLEZ CERVANTES

Asesor: M. en C. ESTEBAN BARRANCO FLORIDO

Asesor: Dr. MARIANO GARCÍA GARIBAY

**Vo.Bo**



**Tutor: M. en C. RINA MARÍA GONZÁLEZ CERVANTES**



**Asesor: M. en C. ESTEBAN BARRANCO FLORIDO**



**Asesor: Dr. MARIANO GARCÍA GARIBAY**

## **COMITÉ TUTORIAL**

**Tutor: M. en C. RINA MARÍA GONZÁLEZ CERVANTES**

**Asesor: M. en C. ESTEBAN BARRANCO FLORIDO**

**Asesor: Dr. MARIANO GARCÍA GARIBAY**

**Sinodal: M. en C. LORENA DEL CARMEN GÓMEZ RUÍZ**

**Sinodal: Dr. FRANCISCO RUÍZ TERÁN**

**“...Querer es una gran cosa por que la actividad y el trabajo son consecuencias generalmente de la voluntad y casi siempre el trabajo va acompañado del éxito. Trabajo, voluntad y éxito llenan la vida de todo ser humano. La voluntad abre las puertas del éxito con brillantes y felicidad, el trabajo hace pasar a través de esta puerta y al final del viaje el éxito corona los esfuerzos realizados....”**

**L. Pasteur**

## AGRADECIMIENTOS

A la M en C. Rina María González por su guía y su apoyo.

Al M en C. Esteban Barranco por sus enseñanzas y amistad desinteresada.

Al Dr. Mariano García y M en C. Lorena del C. Gómez por su apoyo y cordialidad en la UAM Iztapalapa.

Al Dr. Francisco Ruiz por sus desinteresados comentarios.

Al Dr. Alejandro Azaola y Dr. Horacio Sandoval por todas las muestras de cariño y apoyo.

A la M en C. Alma R. Cortés por todas sus enseñanzas, apoyo en estadística y críticas constructivas.

A mis padres: Fernando y Ma. Del Socorro por haberme dado la vida y apoyarme en todos los aspectos.

A mis hermanos: Miguel Ángel, Fernando, Crisóforo y Vitensky por ser y estar siempre.

A mis sobrinos: Esly Merari, Miguel Ángel y Carlos Daniel por alegrar los momentos difíciles.

A mis tíos: Guillermo, Francisco y José por sus sabios consejos.

A mis amigos: Manuel, Daniel, Ulises, Karina, Naty, Anabél, Judit, Edgar y David por todo su apoyo incondicional.

A Shino y Pico por formar parte de mí.

# ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico	4
I. Bifidobacterias como probiótico	4
II. Bifidobacterias	5
Clasificación de las bifidobacterias	5
Metabolismo de las bifidobacterias	6
Vía de la degradación de la glucosa	5
III. Efectos benéficos al ingerir productos con bifidobacterias	9
Especies del género Bifidobacterium y su origen	10
IV. Producción de bifidobacteria	11
Condiciones de crecimiento	13
V. Modelo experimental	15
Objetivo general	16
Objetivos particulares	16
Material y métodos	18
I. Microorganismo	18
II. Medio de cultivo	18
III. Conservación de la cepa	19
IV. Elaboración de la curva patrón	19
V. Preparación del inóculo	20

VI. Fermentaciones	20
Obtención de biomasa en matraz	20
Obtención de biomasa en fermentador	21
VII. Métodos analíticos	21
Análisis de peso seco celular	21
Cuenta de células viables	22
Métodos de disgregación	22
Tasa específica de crecimiento	22
Concentración de glucosa	22
VIII. Diseño experimental	23
Análisis y discusión de resultados	24
Conclusiones	47
Propuestas	49
Referencias	50
Apéndices	57

## RESUMEN

La producción de bifidobacterias ha recibido últimamente gran atención debido a su potencial como probiótico para consumo humano y animal. Durante su proceso de fermentación su producción se ve limitada por los requerimientos nutricionales tan complejos con respecto a las fuentes de nitrógeno (McKellar y Cols, 1989; Wang y Cols, 1993) y de carbono (Biavati y Cols, 1992), así como las condiciones de oxidoreducción y de anaerobiosis (Shimamura y Cols, 1990). En el presente trabajo se usó la cepa de *Bifidobacterium infantis* ATCC17930, especie característica del tracto gastrointestinal de infantes reportada como probiótica y se creció en medio PYG.

En la literatura las condiciones experimentales reportadas de concentración de inóculo, pH inicial, temperatura y velocidad de agitación para la producción en biomasa de bifidobacterias no son constantes. Por lo tanto, en este trabajo se estudió el efecto de pH inicial (7.0, 6.5, 6.0 y 5.5) y concentración de inóculo (5%, 10%, 15% y 20%) bajo un diseño factorial encontrando mayor producción a pH 6.5 y 7.0, así como de manera independiente bajo diseños paralelos, la temperatura (33°C, 35°C, 37°C, 39°C, 41°C y 43°C) a nivel matraz presentando un mayor efecto a 43°C y la velocidad de agitación en fermentador, mejorando la producción a 100 rpm, manteniendo un control del pH durante la fermentación. El estudio de las variables descritas se realizó con la finalidad de mejorar la producción de bifidobacterias viables. Las variables respuesta para evaluar la producción fueron biomasa, tasa específica de crecimiento y cuenta viable. Como resultado de esta investigación se encontró que a pH inicial de 7.0, 10% de inóculo, 100 rpm a 43°C, la producción de biomasa en fermentador alcanzó un valor de 7.45 g/L con una cuenta viable de  $1 \times 10^9$  UFC/mL a 8 h, superando la producción de 7 g/L reportada por Azaola (2000).

## INTRODUCCIÓN

La fermentación es uno de los métodos conocidos más antiguos para la preservación de los alimentos. La mayoría de los países conservan alimentos tradicionales fermentados principalmente por la acción de bacterias ácido lácticas puras o en consorcios con otros microorganismos. Este tipo de bacterias preserva los alimentos por la utilización de carbohidratos transformándolos a ácido láctico, aumentando el rendimiento en alimentos, haciendo más digerible y sensible al paladar (Enciclopedia of food science).

Los alimentos fermentados terapéuticos o probióticos, son productos que utilizan un tipo especial de microorganismos: Bacterias ácido lácticas (BAL) que tienen la propiedad de sobrevivir durante su paso por el estómago hasta llegar al intestino, produciendo compuestos que pueden prevenir o proteger al huésped, animal o humano, de algunas enfermedades. Además, son generalmente seguros para su consumo y proporcionan un elevado contenido nutritivo ya que proveen calorías, proteínas, vitaminas, minerales y sustancias prebióticas. Este tipo de microorganismos convierte los azúcares en ácidos orgánicos como el láctico y acético que provocan la disminución del pH, produciendo además peróxido de hidrógeno y metabolitos secundarios como las biocinas, ayudando de esta manera a prevenir la posible contaminación por bacterias patógenas o enterotoxigénicas. La industria en alimentos que desarrolla probióticos (ver punto I), requiere la selección de cepas estables, tomando en cuenta algunos criterios de selección basados en propiedades tales como resistencia a condiciones de acidez y bilis, adherencia a la colonización, especificidad en las especies, producción de sustancias antimicrobianas, crecimiento *in vitro*,

estabilidad durante el proceso y estudio, tolerancia a aditivos de alimentos, antibióticos y seguridad para el consumidor (Alander y Cols, 1999). Además se requiere, tomando en cuenta los efectos promotores en la salud por el consumo de probióticos, manteniendo la microbiota del intestino, aumentando el valor nutricional de alimentos, actividad anticarcinogénica, reduciendo los niveles de colesterol en suero, disminuyendo la intolerancia a la lactosa y estimulando el sistema inmune (Fuller, 1992, Salminen y Cols, 1995).

La investigación científica actual y la manufactura de productos lácteos que contienen bifidobacterias está centrada principalmente en Japón y algunos países de Europa. En la actualidad existe gran variedad de productos que se han desarrollado en los últimos años que usan bacterias ácido lácticas 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; Shimamura, y Cols, 1990). En México son escasos los productos que contienen bifidobacterias, en el mercado una leche en polvo (fórmula infantil) que contiene *Bifidobacterias* y *Streptococcus thermophilus*. Así como una leche fermentada que contiene una mezcla de bacterias acidolácticas donde podemos encontrar *Bifidobacterias*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Otro producto comercial son tabletas reductivas, las cuales contienen Fructoligosacáridos (FOS) que actúan como fuente de carbono no digerida por el huésped y BAL en específico *Lactobacillus*.

Por otro lado, los requerimientos nutricionales de las bifidobacterias son muy complejos durante el proceso de fermentación. Además de la escasa información que

existe sobre el proceso de producción, donde se presentan factores que afectan en mayor proporción el crecimiento del microorganismo como es el caso de la temperatura y pH. Otros factores tales como concentración de inóculo y velocidad de agitación, se requieren para aumentar la producción en biomasa al final del proceso de fermentación.

La literatura no describe condiciones óptimas para la producción de bifidobacterias, varios autores manejan diferentes pH, concentraciones de inóculo, temperatura y velocidades de agitación (Tabla 2). Por ello, en este trabajo se estudio el efecto de estas condiciones con la finalidad de mejorar la producción de bifidobacterias viables. Controlando en el proceso de fermentación, la producción de bifidobacterias viables se favorecería y de esta manera podría definirse un proceso comercial rentable para la elaboración de un probiótico con *Bifidobacterium infantis* como suplemento alimenticio.

## **I. BIFIDOBACTERIAS COMO PROBIÓTICO**

Los probióticos son definidos como la materia viva que puede ser consumida proporcionando efectos benéficos en el humano, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y disminuyendo enfermedades gastrointestinales (Gallaher y Cols, 1996).

Algunos productos comerciales son combinaciones de bifidobacterias con otras bacterias lácticas, pero la acidez producida por los lactobacilos durante la fermentación disminuye la sobrevivencia de las primeras, lo que no permite tener la concentración recomendada para consumo humano de  $10^6$  -  $10^8$  células de bifidobacterias por gramo de producto final. Las concentraciones recomendadas para consumo humano requeridas debe ser  $\geq 10^6$  células viables por gramo de producto (Blanchette y Cols,

1996). Las formulaciones de probióticos deben contener concentraciones altas de células vivas para que el consumidor pueda mantener dosis de  $10^7$  -  $10^8$  células por día y muestre su efecto benéfico.

Las bifidobacterias son utilizadas para la elaboración de probióticos en productos fermentados, no fermentados y suplementos alimenticios. Entre los productos que contienen bifidobacterias podemos encontrar: yoghurt, leches fermentadas dulces, leches sin fermentar dulces, helados, queso fresco, leche en polvo (fórmulas infantiles), leche ultrafiltrada y productos farmacéuticos como tabletas y liofilizados.

Su producción se ve limitada por los requerimientos nutricionales tan complejos con respecto a las fuentes de nitrógeno (McKellar y Cols, 1989; Wang y Cols, 1993) y de carbono (Biavati y Cols, 1992), así como las condiciones de oxido-reducción y de anaerobiosis (Shimamura y Cols, 1990) requeridas durante el proceso de fermentación.

## II. BIFIDOBACTERIAS

### Clasificación de las bifidobacterias

Las Bifidobacterias son bacterias en forma de bacilos curvos, Gram-positivos, inmóviles, anaerobias estrictas, no esporuladas que pueden presentar pleomorfismo o bifurcarse en sus extremos en forma de Y, X ó V, dependiendo de su edad y de las condiciones de cultivo (Poupard y Cols, 1973).

Estas bacterias fueron descubiertas en 1899 por Tissier en el Instituto Pasteur (París, Francia), quien las aisló a partir de heces de infantes amamantados dándoles el nombre de *Bacillus bifidus comunis* o *B. bifidus*. Por su similitud morfológica se les

agrupó dentro del género *Lactobacilli*. Más adelante, comenzaron a surgir hallazgos en estudios metabólicos, serológicos y de contenido de guanina y citosina que llevaron a reubicarlas en un género independiente (Scardovi y Trobatelli, 1965). Figura 1.



Figura 1. Morfología de las Bifidobacterias.

### Metabolismo de las Bifidobacterias

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

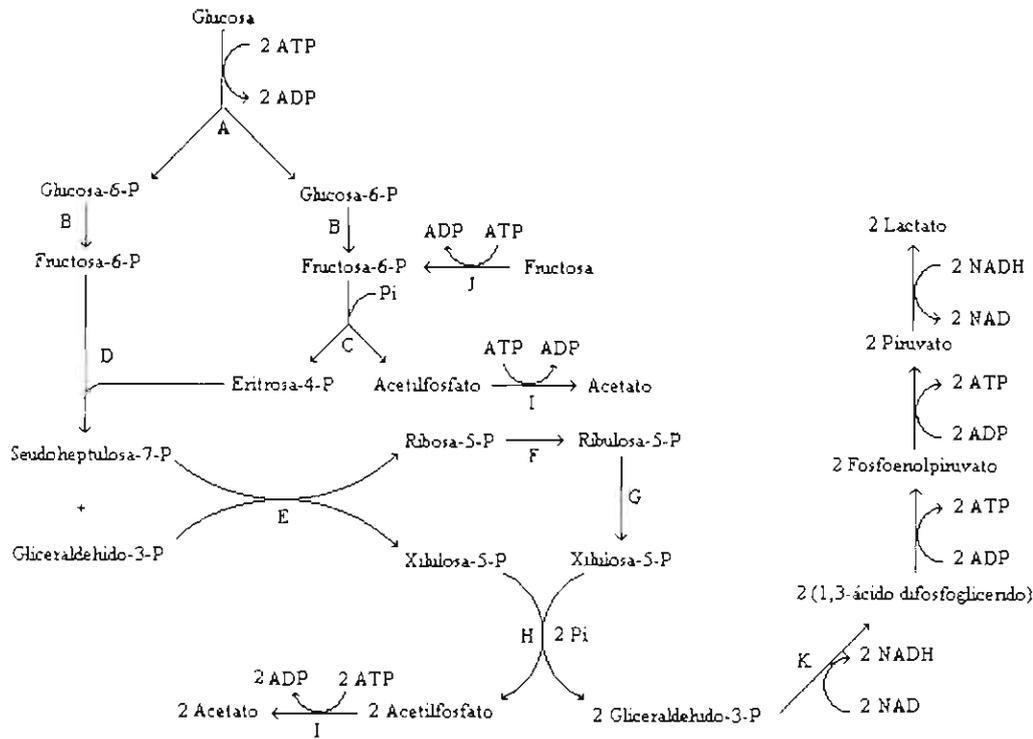
DeVries y Stouthamer (1967, 1968) y Scardovi y Cols. (1981), detectaron ácido acético, láctico, fórmico y etanol como productos finales del metabolismo de carbohidratos en bifidobacterias.

DeVries y Stouthamer en 1967, buscaron la actividad de la enzima aldolasa (EC.4.1.2.7), que es la enzima típica de la glucólisis, así como de la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, característica de la ruta de la hexosa monofosfato. Los autores al no detectar actividad de estas enzimas en las cepas de bifidobacterias estudiadas, investigaron una ruta alterna para la degradación de la glucosa reportada 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 esta es la fructosa-6-fosfato-fosfocetolasa (F6PPK), que cataliza la siguiente reacción:



Actualmente la detección de F6PPK se utiliza como un criterio para la identificación de bifidobacterias (Chevalier y Cols, 1990). Al final del proceso de fermentación se generan los productos finales de la oxidación de la glucosa, las bifidobacterias producen 3 moles de ácido acético y 2 moles de ácido láctico a partir de 2 moles de glucosa. (DeVries y Stouthamer (1976), Miller y Wolin (1996), Wolin y Cols (1998).

Los autores 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 típica glucolítica a partir de la cual se oxida la glucosa. La vía metabólica se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Degradación de glucosa por la vía de la fructuosa 6 fosfato A) hexocinasa, B) fosfofructoisomerasa, C) fructosa-6-fosfato-fosfocetolasa, D) transaldolasa, E) transcetolasa, F) ribosa-5-fosfato isomerasa, G) ribulosa-5-fosfato epimerasa, H) xilulosa-5-fosfato fosfocetolasa, I) acetatocinasa, J) gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, K) piruvato enolasa, L) piruvato cinasa, M) lactato deshidrogenasa. (Scardovi, 1981).

La producción de estos ácidos orgánicos sitúa a las bifidobacterias en condiciones ventajosas ya que 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 Cols, 1991) al disminuir como consecuencia la capacidad patogénica de bacterias enteroinvasivas (Hale, 1991).

### III. EFECTOS BENÉFICOS AL INGERIR PRODUCTOS CON BIFIDOBACTERIAS

Las bifidobacterias son habitantes normales del intestino humano, se adquieren durante el nacimiento en forma natural. Al cambiar la dieta se modifica el porcentaje de microorganismos habitantes en el tracto gastrointestinal, en niños amamantados con leche materna se encontró que comprenden el 92 % de la flora total y con leche de fórmula alcanzan tan sólo el 20% (Ventling y Mistry, 1993). Algunas cepas de bifidobacterias poseen actividad de lactasa *in vitro* (Passerat y Cols, 1995). *B. longum* posee una actividad de  $\beta$ -galactosidasa muy alta. El nivel de la actividad va a depender de la cepa utilizada, el sustrato en el que fue desarrollado su crecimiento y la sensibilidad de la cepa a la bilis. Las bifidobacterias son capaces de asimilar el colesterol *in vitro*, al disminuir el pH del medio de cultivo provocan la precipitación del colesterol. Se ha encontrado que el consumo de dosis muy grandes de productos lácteos fermentados se logra disminuir el colesterol en suero. Los beneficios potenciales en la salud de estos organismos se incrementan incorporándolos en las comidas diarias. Sin embargo, estudios realizados muestran que la viabilidad de las bacterias probióticas es importante para dar beneficios en la salud. Para favorecerse se requiere la selección apropiada de cepas, uso de contenedores impermeables al oxígeno para el producto y incorporación de micronutrientes como péptidos y aminoácidos (Shah, 1999).

Actualmente se han identificado 31 especies diferentes de bifidobacterias, de las cuales 12 son de origen humano (tabla 1).

**Tabla 1. Especies del género Bifidobacterium y su origen**

ESPECIE	FUENTE DE AISLAMIENTO
<i>B. adolescentis</i> *	Intestino de adulto
<i>B. angulatum</i>	Heces de humano adulto
<i>B. animalis</i> *	Heces de rata
<i>B. asteroides</i>	Abeja ( <i>Apis mellifera</i> )
<i>B. bifidum</i> *	Heces de humano infante
<i>B. boum</i>	Rumen de bovino
<i>B. breve</i> *	Heces de humano infante
<i>B. catenulatum</i>	Heces de humano adulto
<i>B. choerinum</i>	Heces de cerdo
<i>B. coryneforme</i>	Abeja ( <i>Apis mellifera</i> )
<i>B. cuniculi</i>	Heces de conejo
<i>B. denticolens</i>	Caries dental humana
<i>B. dentium</i>	Caries dental humana
<i>B. gallicum</i>	Heces de humanos
<i>B. gallinarum</i>	Cecum de pollo
<i>B. globosum</i>	Rumen de bovino
<i>B. indicum</i>	Abeja ( <i>Apis cerana</i> )
<i>B. infantis</i> *	Heces de humano infante
<i>B. inopinatum</i>	Caries dental humana
<i>B. longum</i> *	Heces de humano adulto
<i>B. magnum</i>	Heces de conejo
<i>B. merycicum</i>	Rumen de bovino
<i>B. minimum</i>	Aguas negras
<i>B. pseudocatenulatum</i>	Heces de humano infante
<i>B. pseudolongum</i>	Heces de cerdo
<i>B. pullorum</i>	Heces de pollo
<i>B. ruminantium</i>	Rumen de bovino
<i>B. saeculare</i>	Heces de conejo
<i>B. subtile</i>	Aguas negras
<i>B. suis</i>	Heces de cerdo
<i>B. thermophilum</i> *	Heces de lechón

\* Especies reportadas de mayor estudio (uso como probiótico)

FUENTE: Crociani y Cols, 1996)

Las bifidobacterias desempeñan un papel importante en la resistencia a la colonización del intestino por patógenos, ya que estimulan la respuesta inmune del individuo y crean un ambiente restrictivo gracias a la liberación de ácidos orgánicos y a la producción de bacteriocinas de tipo no proteico (polisacáridos), modificando los sitios receptores de las células epiteliales, impidiendo así el implante y/o proliferación de bacterias indeseables (Bezkorovainy (1989), Bernet y Cols. (1993). estudiaron la adhesión de *B.breve* y *B. infantis* a células de colon *in vitro.*, encontrando que sintetizan un factor proteico que ayuda a la adhesión y muestran un efecto inhibitorio de la adhesión celular de cepas enteropatógenas

#### IV. PRODUCCIÓN DE BIFIDOBACTERIAS

Algunos medios de cultivo utilizados para el crecimiento de bifidobacterias son: Lactobacilli MRS, TPY, TPY con yodoacetato, Skim Milk (Sejong y Cols, 1995), GPV (Fujiwara y Cols, 1997) y BL modificado (Muramatsu y Cols,1992), medio de cultivo TPYG (Scardovi, 1981), PYG (Azaola, 2000) y MRS Modificado (Chevalier y Cols, 1990). Se ha puesto poca atención en el efecto de los medios de cultivo complejos y su influencia sobre la producción no ha sido aclarada, para fuentes complejas de nitrógeno y carbono es el caso de las peptonas, extracto de levadura, polímero de glucosa y FOS, se han estudiado únicamente como factores de crecimiento celular a nivel laboratorio. Para el estudio detallado de producción del microorganismo han aplicado métodos estadísticos que ayudan a entender el efecto de los ingredientes y sus interacciones, lo que ha permitido a los microbiólogos establecer la composición de los medios de cultivo.

A nivel laboratorio se ha comprobado que las Bifidobacterias prefieren medios donde el potencial de óxido reducción sea bajo, lo que se logra con la adición de compuestos como la cisteína, ácido ascórbico y sales de estos mismos.

Algunos autores reportan condiciones específicas para la producción de diferentes especies del género *Bifidobacterium*. Sin embargo, no existen condiciones que se especifiquen como óptimas para su producción. Para ciertas especies como es el caso de *B. termophilus* y *B. infantis* que soportan temperaturas mayores a 40°C y menores de 33°C respectivamente. En cuanto al pH inicial de fermentación se reportan rangos entre 5.0 - 7.0 (tabla 2). No se ha reportado el crecimiento de bifidobacterias con pH inicial menor a 5.0 ya que se sabe que el crecimiento se inhibe por la formación de ácidos como producto final. Otra variable de suma importancia es el tamaño de inóculo. En la tabla 2, se reportan rangos que van desde 0.5% a 10% del volumen de cultivo. En cuanto a la velocidad de agitación, esta no está reportada en la mayoría de los casos, pero algunos autores han utilizado de 70 rpm a 300 rpm, Además de que por tratarse de una fermentación anaerobia se puede manejar el cultivo estático, sin embargo, al aumentar la biomasa se ha demostrado que las células precipitan por lo que es conveniente agitar para mantener un aporte importante de nutrientes homogéneo para aumentar la producción del microorganismo.

Tabla 2. Condiciones reportadas para el crecimiento para especies del género *Bifidobacterium* en condi

Cepa Utilizada	Capacidad: Reactor Matraz	Medio y volumen utilizado	Volumen del inóculo	Tiempo de incubación (hrs)	Velocidad de agitación (r.p.m.)	pH Inicial	Temperatura de crecimiento (°C)	Control de pH
<i>B. longum</i>	NR	PY	10% v/v	16	NR	5.0	37	(+)
<i>B. infantis</i>	50 mL (VP)	PYG (35 mL)	0.20 g/L	12	200	7.0	37	(-)
<i>B. animalis</i>	Tubos	TPY	NR	48	Estático	6.8	37-39	(-)
<i>B. infantis</i>	150 L (R)	MRS C/2.5% de lactosa. (110 L)	2%	18	70	6.0	37	(+)
<i>B. bifidum</i>	2 L (R)	MRS C/15% (1 L)	1%	15	150	6.8	37	(+)
<i>B. bifidum</i>	5 L (R)	MRS C/15% Glicerol. (1.5 L)	0.66%	18	NR	6.8	37	(+)
<i>B. infantis</i>	0.125 L (M)	MRS C/0.05% Cist. (0.05 L)	2%	24	Estático	NR	37	(-)
<i>B. spp</i>	Tubos	Medio complejo	10 %	20 – 22	Estático	6.8	37	(-)
<i>B. spp</i>	0.125 L (M)	MRS (0.08 L)	NR	48	Estático	7.0	37- 41	(-)
<i>B. spp</i>	NR	MRS modificado (5 L)	5%	18	150	5.7	37	(+)
<i>B. spp</i>	0.125 L (M)	TPY (0.08 L)	NR	18	300	6.8	37	(-)
<i>B. spp</i>	50 mL (VP)	GPV ( 25 mL)	NR	12	150	7.4	37	(-)
<i>B. spp</i>	1 L (M)	TPY (0.5 L)	1%	16	NR	7.0	37	(-)

Tabla 2. Continuación

Cepa Utilizada	Capacidad: Reactor Matraz	Medio y Volumen utilizado	Volumen del inóculo	Tiempo de incubación (hrs)	Velocidad de agitación (r.p.m.)	pH Inicial	Temperatura de crecimiento (°C)	Control de pH
<i>B. longum</i>	1 L (M)	MRS (0.7 L)	2%	18	NR	6.8	37	(-)
<i>B. adolescentis</i>	50 mL (VP)	M-17	0.5% w/v	48	Estático	7.0	37	(-)
<i>B. spp</i>	0.250 L (M)	TPY (0.120 L)	NR	18	NR	6.5	37	(-)
<i>B. infantis</i>	Tubos	MRS	NR	24	Estático	6.5	37	NR
<i>B. spp</i>	Tubos	TPY (10 mL)	1%	48	Estático	7.5	37	NR
<i>B. infantis</i>	0.5 L (M)	TPY (0.25 L)	1%	72	120	6.0	34	(-)
<i>B. spp</i>	1 L (M)	BL modificado 0.7 L	0.5% w/v	48	Estático	7.2	37	(-)
<i>B. adolescentis</i>	NR	TPY	2 X 10 <sup>4</sup> Cel	96	Estático	5.0	35	NR
<i>B. spp</i>	Tubos	TPY (10 mL)	4 x 10 <sup>7</sup> Cel	18	Estático	6.8	37	(-)
<i>B. spp</i>	Tubos	MRS	0.1-0.2%	48	Estático	7.0	37	NR
<i>B. spp</i>	Tubos	TPY	NR	72	Estático	6.5	39-40	NR
<i>B. infantis</i>	0.125 L (M)	MRS + .5 Cist (0.05 L)	1%	18	NR	6.5	37	NR
<i>B. longum</i>	Tubos	M-17 (10 mL)	NR	16 - 20	Estático	7.0	37	(-)

Vial de penicilina (VP), Matraz (M), Reactor (R). (+) con control de pH, (-) sin control de pH

## V. MODELO EXPERIMENTAL

El diseño de experimentos ha sido la mejor herramienta para resolver problemas prácticos y probar hipótesis teóricas en las ciencias básicas y aplicadas.

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

El diseño experimental estadístico es una herramienta eficiente para tratar problemas con gran número de variables (Box y Cols, 1978) y proporcionar información necesaria sobre la forma y la longitud de la respuesta. Además disminuye el número de experimentos y evalúa la significancia de las variables de estudio con certeza. (Montgomery, 1991).

El diseño factorial puede ser utilizado como diseño inicial para conocer los factores que afectan o contribuyen al cambio de la variable respuesta, de manera que puedan seleccionarse entre una gran cantidad de variables solo aquellas que contribuyan de manera significativa sobre el proceso para que posteriormente puedan ser estudiadas con diseños factoriales complejos.

La aplicación de diseños de experimentos en procesos de fermentación ayudan a identificar los efectos de variables involucradas sobre la producción de biomasa por ejemplo, con lo que puede finalmente conocerse los niveles con los cuales se logra una mejora en el rendimiento.

## OBJETIVO GENERAL

Establecer los parámetros para la producción de biomasa viable de *Bifidobacterium infantis* para la elaboración de un probiótico.

## OBJETIVOS PARTICULARES

### En matraz

1. Establecer las condiciones de manejo de células semilla y del inóculo  
Concentración del pre-inóculo.  
Medio de cultivo PYG para activación.  
Tiempo y concentración para obtener el inóculo.
2. Ajustar las condiciones de crecimiento para el inóculo (concentración o tamaño y duración de la fase exponencial) para la producción de biomasa viable de *B. infantis*
3. Estudiar el efecto de diferentes pH iniciales para encontrar un óptimo para el proceso de fermentación.
4. Estudiar el efecto de diferentes temperaturas para encontrar un óptimo para el proceso de fermentación.

## En reactor

1. Realizar fermentación con pH controlado durante el proceso de fermentación a partir del pH inicial óptimo obtenido a nivel matraz.
2. Estudiar el efecto de 2 velocidades de agitación sobre la producción de biomasa.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## I. Microorganismo

La cepa utilizada fue *Bifidobacterium infantis* ATCC 17930, especie característica del tracto intestinal de niños. conservada en una solución de leche descremada al 10 % y glicerol al 20 % a -70 °C. Para su activación se sembró en tubos conteniendo 10 mL de medio de cultivo MRS modificado (Medio MRS Oxoid, conteniendo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.2 g/L), CaCl<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.10 g/L) y cisteína (0.5 g/L) Chevalier y Cols. (1990).

## II. Medio de cultivo

El medio utilizado fue el PYG (Azaola, 2000) que contiene peptona de soya (Bioxon) (6.4 g/L), extracto de levadura (Bioxon) (23.0 g/L), glucosa (J. T. Baker) (30 g/L), cisteína (Merk) (0.5 g/L), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (J. T. Baker) 0.5 g/L, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (J. T. Baker) 0.25 g/L, CaCl<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O (Merk) 0.15 g/L, FeCl<sub>3</sub> (Merk) 0.03 g/L y Tween 80 (Merk) 1 mL/L. Este medio se preparó en una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0, 0.2 M. El medio se colocó en frascos viales de 50 mL con 40 mL de medio de cultivo incorporando CO<sub>2</sub> 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. Se ajustó el pH inicial dependiendo la condición de estudio después de esterilizar.

### III. Conservación de la cepa

La cepa original de *B. infantis* se creció en frascos viales de 100 mL con 80 mL de medio de cultivo PYG, en condiciones anaerobias; después de 12 horas, el caldo se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C por 10 minutos. El sobrenadante se descartó y el paquete celular se lavó con agua peptonada al 0.1%, se realizó 2 veces el procedimiento para eliminar los residuos del medio de cultivo y el paquete celular se resuspendió en leche descremada al 10 % con glicerol al 20 %. Se colocó 1 mL de esta suspensión en tubos eppendorf estériles con capacidad de 1.5 mL y se mantuvieron a -70 °C hasta su utilización.

### IV. Elaboración de la curva patrón

La curva estándar de absorbancia en función de peso seco celular se realizó de la siguiente manera: las células de bifidobacterias se crecieron durante 8 horas en 200 mL de medio de cultivo PYG, se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el paquete celular se lavó con 10 ml de solución de agua peptonada estéril al 0.1%. Este proceso se repitió 3 veces para quitar residuos del medio de cultivo. El paquete celular se resuspendió en 5 mL de agua peptonada al 0.1%. De esta solución se hicieron diluciones desde 1:2 hasta 1:1024 en solución de agua peptonada al 0.1 % por duplicado para leer a 660 nm. Las diluciones de cada tubo se filtraron en una membrana Millipore de 0.22 µ de diámetro (previamente llevados a peso constante en desecador), posteriormente se colocaron en un desecador a 55°C por 48 horas. La absorbancia se graficó contra el peso seco. En la Figura 3.

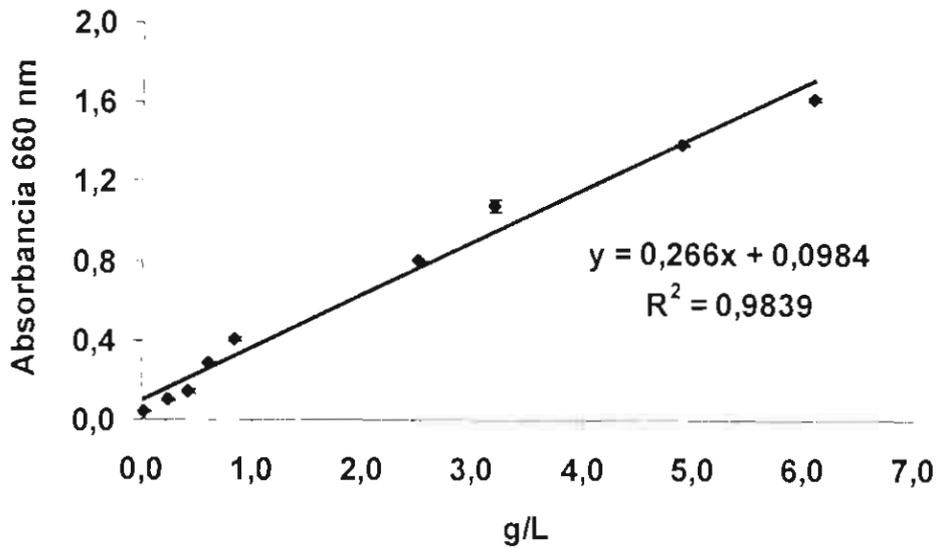


Figura 3. Curva patrón de peso seco vs. Absorbancia a una longitud de onda de 660 nm.

## V. Preparación del inóculo

A partir de la cepa pre-activada, se incorporaron con jeringa estéril 10 mL de caldo con células a un frasco vial de 500 mL (previamente sellados, conteniendo 500 mL de caldo PYG incorporando  $\text{CO}_2$  para desalojar el oxígeno presente), se colocaron en una incubadora a  $37^\circ\text{C}$  con agitación de 200 rpm. La cosecha del inóculo se hizo en la fase exponencial media.

## VI. Fermentaciones

### Obtención de biomasa en matraz

Los frascos viales preparados previamente, se inocularon con la concentración de inóculo estudiada con jeringa estéril desechable y se colocaron en una incubadora con agitación de 200 rpm; a las temperaturas de estudio durante 12 h.

## Obtención de biomasa en fermentador

Se realizaron 4 fermentaciones para las pruebas de agitación en un fermentador Bio-Flo IIC con capacidad de 1.25 L, el volumen de trabajo fue de 940 mL (75%), utilizando medio PYG y las condiciones de pH, temperatura y porcentaje de inóculo se establecieron de acuerdo a los resultados obtenidos en matraz. El esquema del reactor se muestra en la Figura 4.

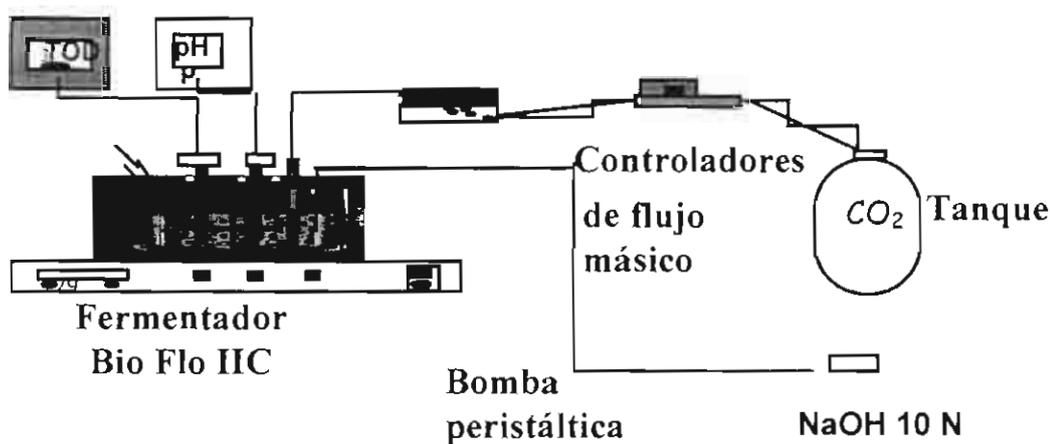


Figura 4. Esquema del reactor

## VII. Métodos analíticos

### Análisis de peso seco celular

A partir del tiempo cero y hasta el tiempo final de fermentación, 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 patrón previamente construida.

### Cuenta de células viables

Para la cuenta de células activas o viables (UFC/mL), se tomó una alícuota de (0.1 mL) y se hicieron diluciones de  $10^1$  hasta  $10^8$  en agua peptonada al 0.1%. Se sembraron 0.1 mL en cajas de petri con medio de cultivo MRS modificado. Las cajas se incubaron en jarras anaerobias con el sistema Gas-Pack BBL por 48 horas a 37 °C. Se contaron las colonias y se multiplicó por el factor de dilución para obtener el número de células (UFC) por mL de medio de cultivo.

### Métodos de disgregación

Se utilizaron tres métodos de disgregación celular para cada tubo de dilución usando agua peptonada al 0.1%, con vortex por 10 seg, homogenizador de vidrio por 20 seg y vortex con 3 perlas de vidrio por 10 seg.

### Tasa específica de crecimiento ( $\mu$ )

Los valores de  $\mu$  se calcularon a partir de la pendiente de los valores obtenidos en fase exponencial de la biomasa (transformados a Ln) en un periodo de tiempo.

### Determinación de la concentración de glucosa

La determinación de la glucosa durante los tiempos de muestreo en todo el proceso de fermentación se realizó con un kit (Sping react) de glucosa.

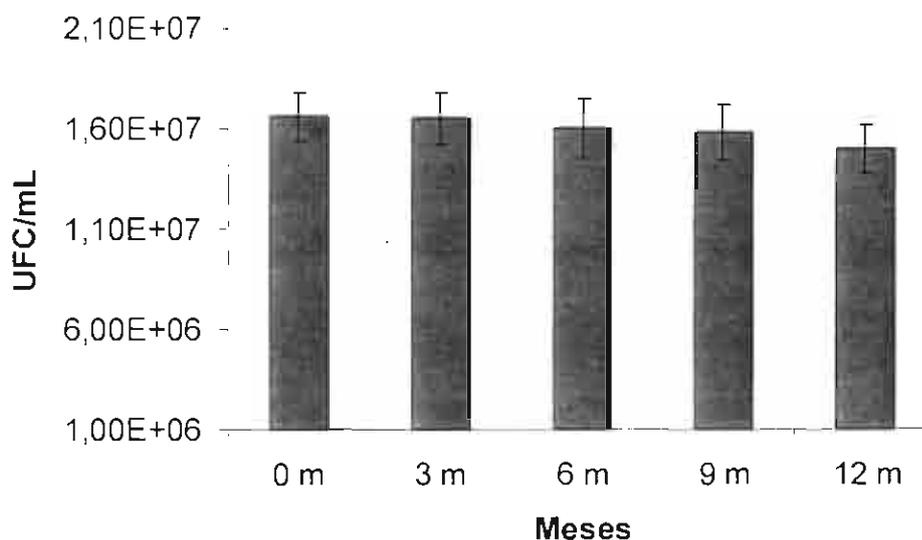
## VIII. Diseño experimental

Bajo un diseño factorial  $4^2$ , se evaluaron 2 factores (concentración de inóculo y pH). Los niveles estudiados para las concentraciones de inóculo fueron 5%, 10%, 15% y 20% y para los pH de 5.5, 6.0, 6.5 y 7.0. Además, se estudió de manera independiente el efecto de la temperatura (33°C, 35°C, 37°C, 39°C, 41°C, 43°C) y de la velocidad de agitación (50 rpm, 100 rpm, con y sin control de pH). En todos los casos las respuestas cuantificadas fueron la biomasa expresada en peso seco (g/L) y la cuenta en placa (UFC/mL). El análisis de los resultados fue realizado con el programa *SPSS* para Windows versión 8.0.

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Cuenta viable de la cepa control

En este estudio la cepa de *Bifidobacterium infantis* ATCC17930 fue conservada en glicerol al 80% y leche descremada al 10% a  $-70^{\circ}\text{C}$ , condiciones bajo las cuales se mantiene. Se realizó la cuenta viable de la suspensión en conservación, con el fin de conocer la estabilidad de la cepa durante la duración del estudio en estas condiciones. El conteo de UFC se llevó a cabo al inicio del estudio así como a 3, 6, 9 y 12 meses (Figura 5).



**Figura 5. Cuenta en placa de la cepa** de *Bifidobacterium infantis* conservada en 20 % de glicerol y 10 % de leche descremada, conservada a  $-70^{\circ}\text{C}$ .  
Media  $\pm$  DE (n = 3).

Estos resultados indican que el orden de magnitud de la cuenta viable del cultivo control en congelación se mantiene y no presenta una disminución significativa a 12 meses. Sin embargo dada la ligera tendencia a la disminución, sería conveniente

continuar con el monitoreo de la cuenta viable para la cepa control si esta fuera a usarse durante periodos de tiempo más largos.

### **Preparación del inóculo**

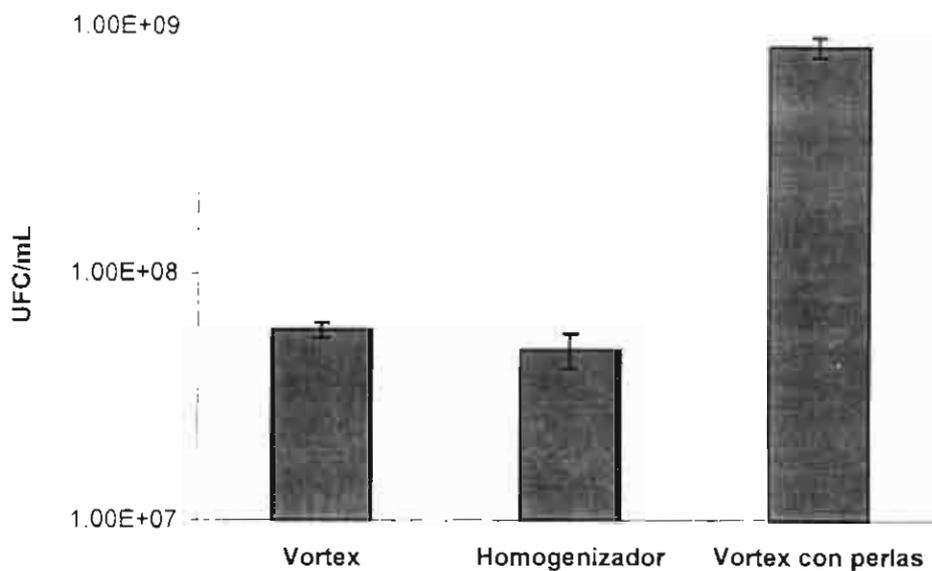
Para la preparación del inóculo se probaron 2 tiempos de crecimiento del pre-inóculo a 10 horas y 16 horas. Estos cultivos se utilizaron para inocular las botellas conteniendo medio de cultivo PYG que a su vez fueron los inóculos para las fermentaciones problema. Se contaron las UFC/mL de este inóculo al tiempo de cosecha en fase exponencial media (4 - 6 horas) en un rango de absorbancia de 0.500 a 0.600 a 660 nm, obteniéndose mejor resultado en el cultivo proveniente del pre-inóculo crecido a 10 h con respecto al de 16 h ( $1 \times 10^8$  UFC/mL,  $1 \times 10^7$  UFC/mL).

Además, se encontró que es muy importante que el rango de absorbancia para el inóculo se mantenga entre 0.500 - 0.600 para evitar la fase lag (datos no mostrados) en la fermentación, ya que en absorbancias mayores se corre el riesgo de entrar muy rápidamente en fase estacionaria y/o fase de muerte.

### **Métodos de disgregación de células**

Por otro lado, al realizar la cuenta en placa se observó que las células se agregaban dificultando la cuenta en placa, por lo que se realizaron pruebas para disgregar las células usando diferentes métodos (vortex, homogenizador de vidrio y vortex con perlas de vidrio) y así obtener una cuenta más confiable.

El experimento se realizó a partir de una misma suspensión de células y se sembró en placa una alícuota de 100  $\mu$ L de las suspensiones obtenidas con los diferentes métodos de disgregación (Figura 6).



**Figura 6. Cuenta en placa de la cepa de *Bifidobacterium infantis* a partir de diferentes métodos de disgregación.**  
Media  $\pm$  DE (n = 3).

Como se observa en la figura 6, la mayor cuenta de células se obtiene cuando se hace la disgregación mediante vortex con perlas de vidrio. Por lo que fue el método utilizado en los experimentos posteriores. Cabe mencionar que con homogenizador de vidrio se obtuvo una cuenta menor de  $4.9 \times 10^7$  UFC/mL a la obtenida por el método de vortex con perlas de vidrio ( $8.5 \times 10^8$  UFC/mL), esto se debe a que por este método de disgregación se obliga la incorporación de oxígeno, desfavoreciendo la cuenta viable.

En la Tabla 3, se proponen finalmente las condiciones para la preparación del inóculo.

**Tabla 3.** Condiciones establecidas para la preparación del inóculo

Prueba realizada	Condiciones establecidas
Conservación de la cepa control	En glicerol al 20% y 10% de leche descremada a - 70°C (Estable por 12 meses).
Crecimiento del pre-inóculo	A 10 horas incubando a 37°C
Crecimiento del inóculo	De 5 a 6 horas (fase exponencial media) en un rango de absorbancia de 0.5 a 0.6 a $\lambda$ 660 nm
Método de disgregación	Vortex con perlas de vidrio por 10 seg.

### Obtención de biomasa en matraz

Se realizaron experimentos en matraz (Viales de penicilina con 36 mL de medio de cultivo PYG) para probar el efecto de pH inicial (7.0, 6.5, 6.0, 5.5) y diferentes concentraciones de inóculo (5%, 10%, 15% y 20%) sobre la producción en biomasa de *B. infantis* a 37°C, 200 rpm.

## Efecto de la concentración de inóculo y pH

Los resultados del efecto de las concentraciones de inóculo (5%, 10%, 15% y 20%) y pH (7.0, 6.5, 6.0, 5.5) sobre la biomasa se presentan en la figura 7.

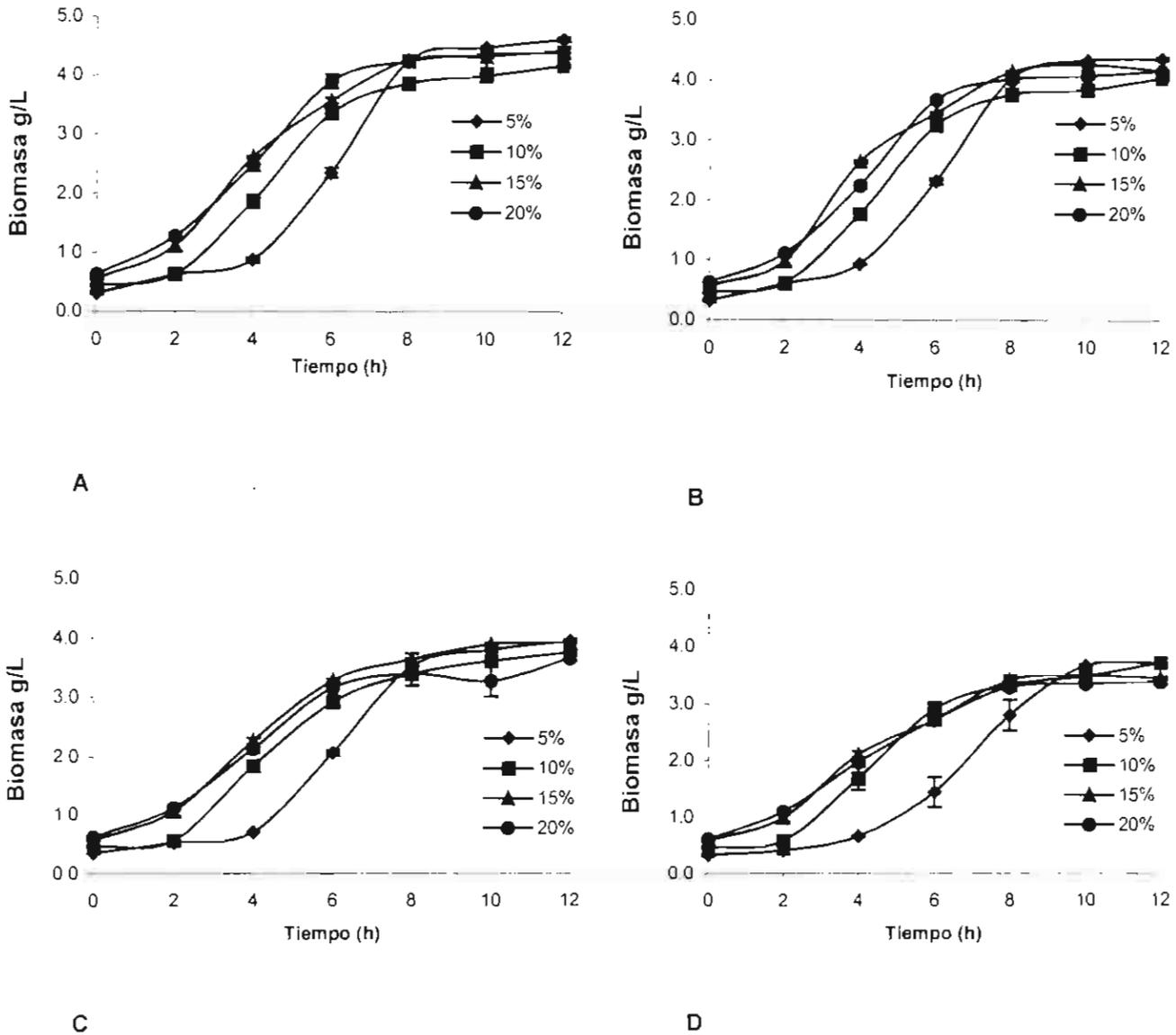


Figura 7. Efecto de pH 7.0 (A), pH 6.5 (B), pH 6.0 (C) y pH 5.5 (D) en la producción de biomasa de *Bifidobacterium infantis* a diferentes concentraciones de inóculo en medio de cultivo PYG a 37°C, 200 rpm. Media  $\pm$  DE (n = 3).

Como se observa en la figura 7A, B, C y D, la concentración de inóculo del 5% presenta una fase lag mayor para todos los pH probados. Para el 10%, 15% y 20% de

inóculo, su fase exponencial de crecimiento tiene una duración de 2 a 6 horas y para 5% de inóculo de 4 a 8 horas. A partir de las 8 horas de fermentación los perfiles para los diferentes pH se encuentran en fase estacionaria alcanzando valores para pH 7.0 de 3.29 g/L (15%), 3.41 g/L (20%), 3.33 g/L (10%), 2.88 g/L (5%), no mostrando diferencias a pH inicial 6.5. Para pH inicial 5.5 la producción en biomasa disminuyó en un 25%, obteniendo valores de 4.27 g/L (15%), 4.26 g/L (20%), 2.80 g/L (10%), 4.25 g/L (5%). Con el análisis de varianza (Apéndice 1) para los datos a las 8 horas de fermentación se puede observar que a pesar de la interacción significativa, existe un efecto tanto de la concentración de inóculo como del pH sobre la biomasa, siendo mejor la producción (en general) para la concentración de inóculo del 15% y pH 7.0 obteniendo un valor de 3.8 g/L (Apéndice 2 y 3). Analizando independientemente a cada pH, dado que la interacción fue significativa, se pudo observar (análisis no mostrado en los apéndices) que la diferencia significativa en la biomasa al 15% de inóculo se presenta solamente a pH 6.5 mientras que en los demás pH no hubo diferencias significativas de la biomasa entre 15% y 20% de inóculo e incluso con 10% a pH 5.5.

Debido a esta pobre discriminación a las 8 horas se procedió a realizar un segundo análisis con los datos a las 6 horas de fermentación donde se puede observar (Figura 7A, B, C y D) que los perfiles de crecimiento para 10%, 15% y 20% de inóculo se encuentran en fase exponencial final y para 5% de inóculo en fase exponencial media.

El análisis mostrado en el apéndice 4, muestra nuevamente que existe efecto de ambos factores y la interacción es significativa. Por lo que se analizó el efecto del

porcentaje de inóculo por separado a cada pH, encontrando que la biomasa es diferente en todos los niveles de concentración de inóculo, para pH 7.0 de 3.92 g/L (20%), 3.59 g/L (15%), 3.37 g/L (10%), 2.36 g/L (5%); para pH 6.5 de 3.69 g/L (20%), 3.47 g/L (15%), 3.27 g/L (10%), 2.32 g/L (5%), mientras que para pH 6.0 se obtuvieron valores de 3.16 g/L (20%), 3.29 g/L (15%), 2.92 g/L (10%), 2.06 g/L (5%) y para pH 5.5 de 2.72 g/L (20%), 2.73 g/L (15%), 2.90 g/L (10%), 1.44 g/L (5%), no encontrando diferencias significativas de la biomasa a 15% y 20% (Apéndice 5). De aquí es claro que la mayor producción de la biomasa se obtiene con 15% y 20% de inóculo, pero no se descarta el efecto para 10% de inóculo (Figura 7A, B, C y D), dado que entre 15% y 10% la diferencia es tan sólo de 0.2 g/L

Con respecto al pH se puede observar en el apéndice 6 que las mejores condiciones para la producción en biomasa de las bifidobacterias fueron para 15% y 20% de inóculo a pH de 7.0 y 6.5.

Esto nos indica que el pH inicial y la concentración de inóculo tienen influencia en la producción de biomasa a 37°C, 200 rpm. Los resultados anteriores concuerdan con estudios de Loaria y Martín en 1991 quienes reportaron que las bifidobacterias no sobrevivieron a pH menores de 4.5, mientras que a pH 5.6 la sobrevivencia es de apenas el 50% de la población de células. Otros autores encontraron que a pH bajos el microorganismo requiere elevados factores de crecimiento específico (Poch y Bezcorovainy (1988), Roy y Cols (1991).

Estudios de Grill y Cols (2000), observaron que a pH 7.0 y 37°C en presencia de bilis se favorecía la cuenta viable de algunas cepas de bifidobacterias, mientras que a pH 5.5 las cepas fueron sensibles disminuyendo considerablemente la cuenta con

respecto a pH 7.0. Scardovi (1986), observó que a pH arriba de 8 unidades no se presenta crecimiento de cepas de bifidobacterias. Estos resultados concuerdan con Taillandier y Cols (1996), quienes usaron diseños factoriales para temperatura (30°C - 37°C) y pH (5.5 - 7.0), encontrando que a pH 7.0 y temperatura de 37°C se favorece la cuenta viable, siempre y cuando se mantenga un control del pH durante el proceso de fermentación. Además, observaron que el mayor efecto sobre la viabilidad lo proporciona la composición del medio de cultivo, en específico las fuentes de Nitrógeno y Carbono. (Shimamura y Cols, 1992). Todo esto confirma la importancia del pH del medio de cultivo para la producción de bifidobacterias.

Por otro lado, además del estudio del efecto de pH y concentración de inóculo sobre la producción de biomasa de *B. infantis*, se estudió su efecto sobre la tasa específica de crecimiento a concentraciones de inóculo del 10%, 15% y 20%. Encontrando que para 10%, se obtienen las tasas más altas (Tabla 4), descartando las concentraciones de 15% y 20% de inóculo.

Dado que no hay diferencias de la tasa específica de crecimiento a los diferentes pH, las fermentaciones posteriores se realizaron a pH inicial 7.0.

Estudios de Thomas (1999), utilizando modelos de superficie de respuesta con ajuste de curvas de crecimiento a través de la ecuación de Gompertz para el efecto de pH y temperatura sobre la viabilidad (UFC/mL), demostrando que al final del proceso de fermentación a 37.5°C y pH inicial de 7.4, se obtuvieron valores máximos de la cuenta viable en un periodo de tiempo de 6 h y se favorecieron las velocidades específicas de crecimiento por el ajuste del modelo, resultados que coinciden con pH inicial 7.0, 10% de inóculo. Por otro lado, a concentraciones de inóculo mayores no se permite

visualizar el efecto sobre la producción ya que se parte de valores altos iniciales, acumulándose los productos finales del metabolismo y disminuyendo el pH inicial después de incorporarse en los frascos de fermentación.

**Tabla 4.** Promedios de la tasa específica de crecimiento.

pH inicial	5 % inóculo $\mu(\text{h}^{-1})$	10 % inóculo $\mu(\text{h}^{-1})$	15 % inóculo $\mu(\text{h}^{-1})$	20 % inóculo $\mu(\text{h}^{-1})$
7,0	0.327	<b>0.419</b>	0.389	0.345
6,5	0.321	0.417	0.384	0.320
6,0	0.302	0.412	0.349	0.308
5,5	0.278	0.405	0.326	0.294

## Perfil de pH en fermentaciones con diferentes concentraciones de inóculo y diferentes pH.

En la figura 8, se observan los perfiles de pH para cada condición de estudio (Figura 8A, B, C y D), resultados que muestran la caída de pH durante la fermentación a diferentes concentraciones de inóculo encontrando que al final del proceso de fermentación los valores de pH no son menores de 4, no existiendo de esta forma una diferencia en los valores finales.

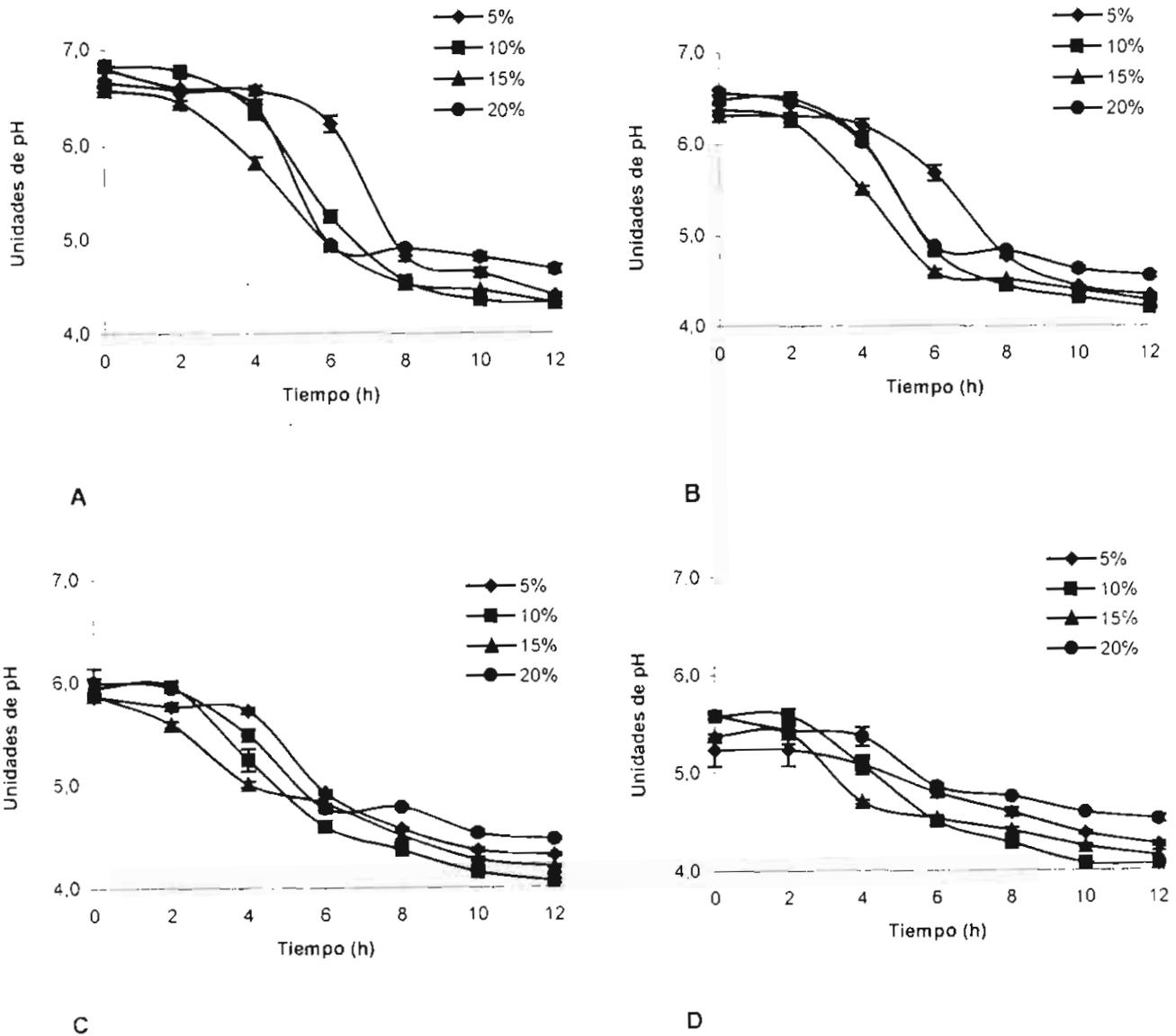


Figura 8. Perfil de caída de pH a pH inicial de 7.0 (A), pH 6.5 (B), pH 6.0 (C) y pH 5.5 (D), en la producción de 3 biomasa de *Bifidobacterium infantis* a diferentes concentraciones de inóculo en medio de cultivo PYG a 37°C, 200 rpm.

Media  $\pm$  DE (n = 3).

Estos resultados nos indican que al final del proceso de fermentación aunque se parta de pH diferentes los valores finales siempre serán cercanos a 4 (Tabla 5). Podemos mencionar que el medio de cultivo utilizado en las fermentaciones (PYG) no proporciona una capacidad amortiguadora aceptable ya que los fosfatos pueden estar siendo consumidos.

**Tabla 5.** Cambio de pH en el proceso de fermentación.

Concentración de inóculo	pH inicial de producción	pH final de producción
5%	7,0	4,40
	6,5	4,34
	6,0	4,31
	5,5	4,26
10%	7,0	4,32
	6,5	4,20
	6,0	4,06
	5,5	4,06
15%	7,0	4,32
	6,5	4,28
	6,0	4,20
	5,5	4,14
20%	7,0	4,68
	6,5	4,55
	6,0	4,47
	5,5	4,52

## Consumo de glucosa a diferentes pH y concentraciones de inóculo.

Como se observa en la figura 9, los perfiles del consumo de glucosa a diferentes pH iniciales (Figura 9A, B, C y D) y a diferentes concentraciones de inóculo para *B. infantis*, siguen la misma tendencia, presentando un consumo mayor en las primeras 4 horas y disminuyendo conforme pasa el tiempo de fermentación.

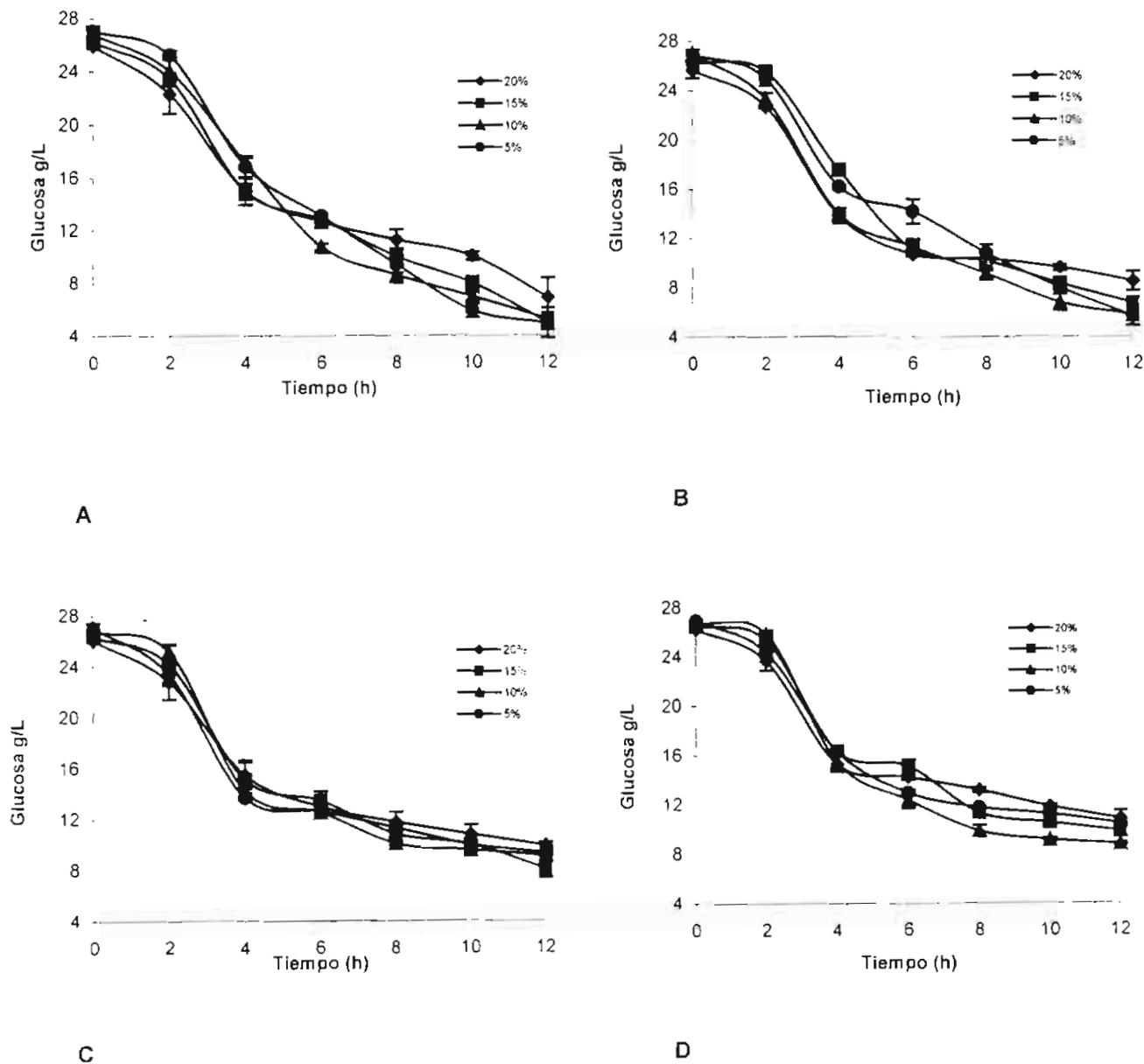


Figura 9. Consumo de glucosa a pH inicial de 7.0 (A), pH 6.5 (B), pH 6.0 (C) y pH 5.5 (D) en el crecimiento de *B. infantis* a diferentes concentraciones de inóculo en medio de cultivo PYG a 37°C, 200 rpm. Media  $\pm$  DE (n = 3).

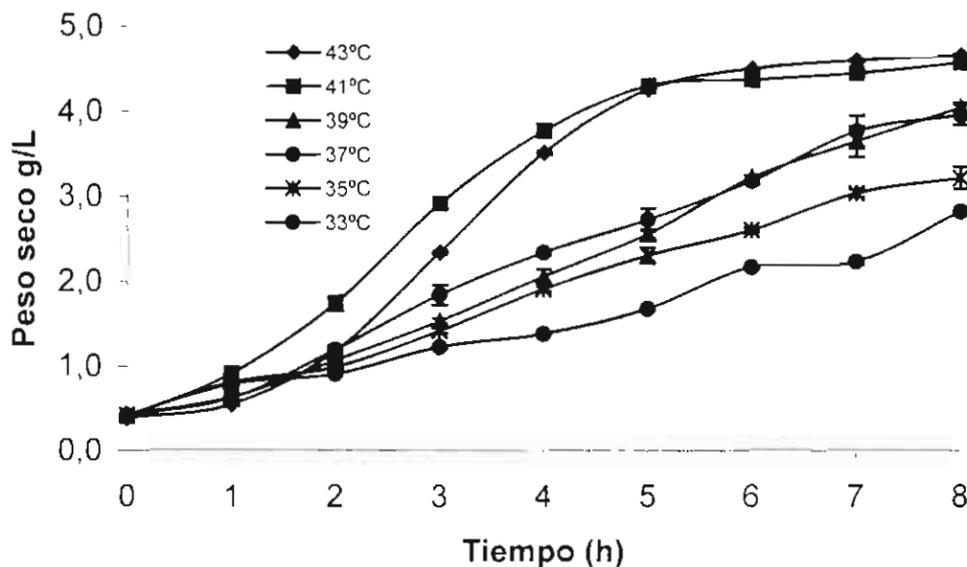
Estos datos coinciden con el comportamiento de la producción (Figura 7A, B, C y D) y perfil de caída de pH (Figura 8A, B, C y D). Al final del proceso de fermentación se observa que no llega a consumirse en su totalidad la concentración de glucosa. A tiempo cero, los valores reportados no coinciden con la concentración inicial de 30 g/L por el efecto de la dilución del volumen incorporado de inóculo.

Con base en estos resultados se determinó que las combinaciones más adecuadas para lograr una mayor producción (Máxima biomasa) en menor tiempo (máxima tasa específica de crecimiento) fueron 10% de inóculo con pH inicial 6.5 y 10% de inóculo con pH inicial 7.0 a 37°C, 200 rpm. Por lo tanto, basado en la discusión previa sobre las variables del proceso de fermentación que proporcionan mayor efecto para la biomasa viable y tasa específica de crecimiento reportado por Grill (2000), Thomas (1999) y Taillander (1996), además de que la importancia del efecto probiótico es en el intestino (valores de pH cercanos a 7.0), se considerará en adelante únicamente la combinación del 10% de inóculo y pH inicial 7.0

### **Efecto de la temperatura**

Estableciendo de los experimentos anteriores las condiciones iniciales de pH 7.0 y concentración de inóculo del 10%, se realizaron fermentaciones a diferentes temperaturas (33°C, 35°C, 37°C, 39°C, 41°C y 43°C).

En la figura 10, se observan los perfiles de biomasa de *B. infantis* a diferentes temperaturas mostrando que a 41°C y 43°C se observa un comportamiento similar en los perfiles de crecimiento, obteniendo mayores valores de biomasa de 4.59 g/L (41°C), 4.67 g/L respectivamente a 8 horas de fermentación y menores a su vez para las temperaturas de 39°C (4.06 g/L), 37°C (3.97 g/L), 35°C (3.22 g/L), 33°C (2.83 g/L), siendo esta última un 60% menor con respecto a la obtenida a 43°C, datos que concuerdan con estudios de Boon y Cols. (2000), quienes encontraron que el efecto de la temperatura favorece la producción en un proceso de fermentación y sistema enzimático, alcanzando valores de 4 g/L a 39°C en 8 horas.



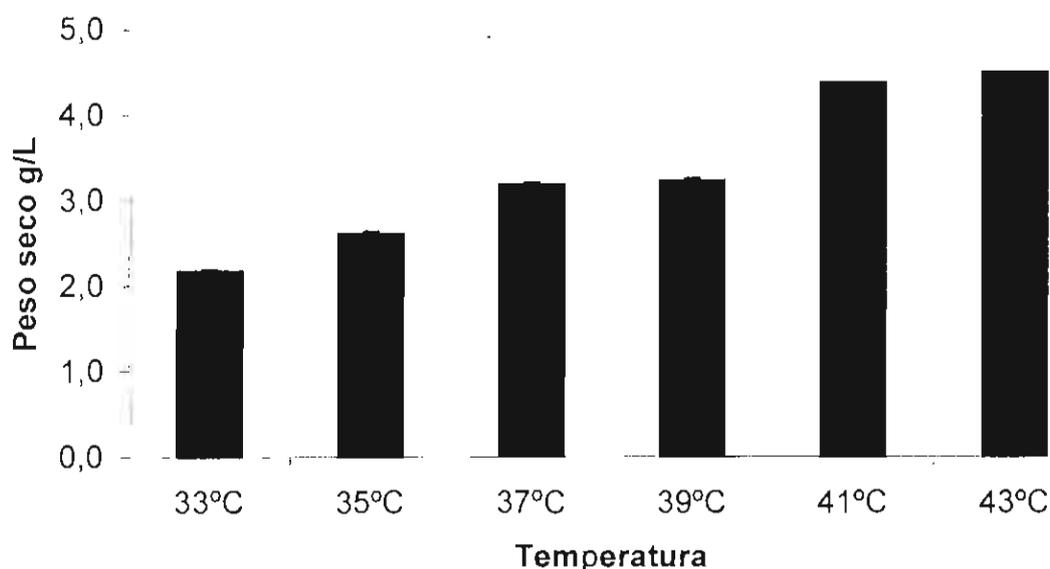
**Figura 10. Efecto de temperatura** en la producción de biomasa de *Bifidobacterium infantis* .a pH inicial 7.0, 10% de inóculo, 200 rpm. Media  $\pm$  DE (n = 3).

En los perfiles de crecimiento para temperaturas menores de 39°C no se observa el cambio en la pendiente que marque la fase estacionaria, además mantienen un comportamiento similar a lo largo del proceso de fermentación, por lo que es claro

que a estas temperaturas se requieren tiempos de fermentación mayores para obtener la biomasa producida a 41°C y 43°C.

Con base en el análisis estadístico para la biomasa producida a 8 horas de fermentación (Apéndice 7 y 8), la mayor producción de biomasa fue a 41°C (4.57 g/L) y 43°C (4.69 g/L) no presentando diferencias significativas entre estas. Este análisis no permite visualizar la diferencia de la biomasa dado que a estas temperaturas el crecimiento se encuentra en fase estacionaria. Sin embargo a las 6 horas de fermentación (Apéndice 9 y 10), se obtuvo la mayor producción a 43°C. A este tiempo, se calculó la cuenta viable siendo mayor a esta temperatura ( $3.2 \times 10^8$  UFC/mL) y diferente de todas las demás cuentas a temperaturas menores (Apéndice 11 y 12) ya que la biomasa generada se encuentra en fase exponencial final.

A partir de lo anterior se consideró la temperatura de 43°C como condición para los experimentos subsecuentes favoreciendo la biomasa (Figura 11) y la cuenta viable.



**Figura 11.** Biomasa obtenida a 6 h de fermentación de *Bifidobacterium infantis* en medio de cultivo PYG a pH inicial 7.0, 10 % de inóculo, 200 rpm. Media  $\pm$  DE (n = 3).

## Tasa específica de crecimiento, $\mu$ ( $h^{-1}$ )

Por otro lado, además del estudio del efecto de la temperatura sobre la producción de biomasa de *B. infantis*, se estudió su efecto sobre la tasa específica de crecimiento. Encontrando que para 43°C, se obtiene la tasa más alta (Tabla 6). Estos datos concuerdan con Watier y Cols. (1996), quienes encontraron que al aumentar la temperatura en un rango de 30°C a 37°C a pH inicial de 6.0 la velocidad específica de crecimiento se favorece. Así mismo, estos valores coinciden con estudios de Burkhard y Cols. (1996), quienes observaron la actividad metabólica a diferentes temperaturas, encontrando que a 33°C la velocidad específica de crecimiento disminuye y así mismo el consumo de glucosa, acumulándose la formación de ácido láctico.

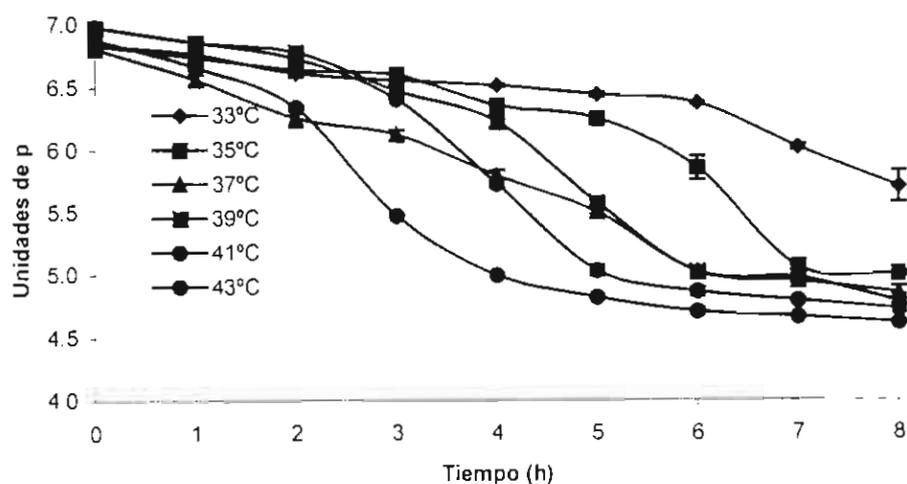
Dado que hay diferencias de la biomasa viable obtenida y tasa específica de crecimiento a 41°C y 43°C, se realizarán fermentaciones posteriores a 43°C.

**Tabla 6.** Tasa específica de crecimiento.

T°C	33°C	35°C	37°C	39°C	41°C	43°C
$\mu$ ( $h^{-1}$ )	0.1920	0.2427	0.3616	0.3433	0.5621	0.5874

## Perfil de pH y consumo de glucosa en fermentaciones a diferentes temperaturas.

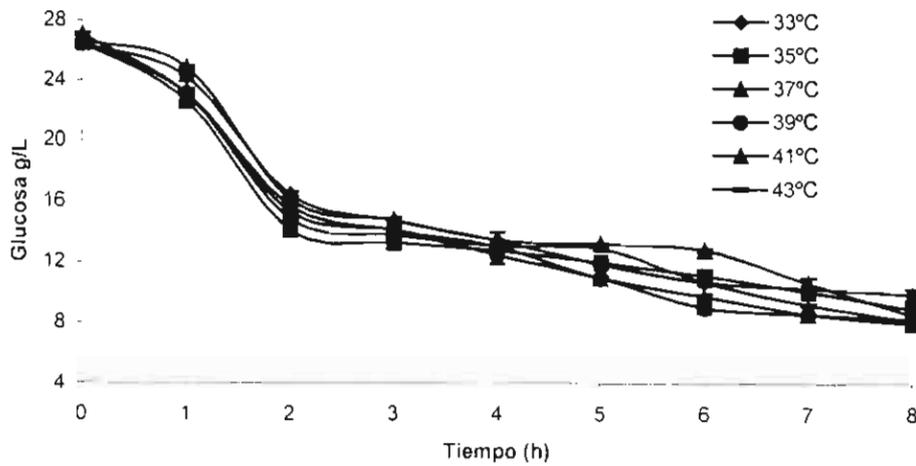
En la figura 12, se observa la caída de pH a las diferentes temperaturas, encontrando que para ninguna temperatura el pH final es menor de 4.5 a 8 horas de fermentación. Estos resultados concuerdan con la biomasa obtenida en estas condiciones. Al obtener menor producción, el metabolismo de las bifidobacterias disminuye reflejando sus valores en la caída de pH.



**Figura 12. Perfil de caída de pH** en la producción de biomasa de *B. infantis* a diferentes temperaturas en medio de cultivo PYG a pH inicial 7.0, 10% de inóculo, 200 rpm.

Media  $\pm$  DE (n = 3).

En la figura 13, se muestra el consumo de glucosa a diferentes temperaturas encontrando que para 43°C no se presenta un consumo total a 8 h, sin presentar aumento en la concentración residual al disminuir la temperatura (Figura 11).



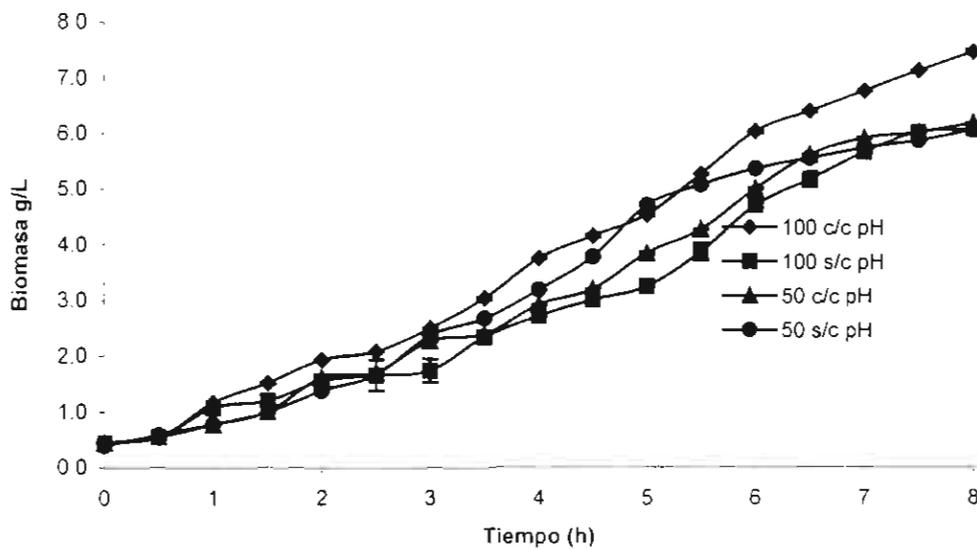
**Figura 13. Consumo de glucosa** en la producción de biomasa de *B. infantis* a diferentes temperaturas en medio de cultivo PYG a pH inicial 7.0, 10% de inóculo, 200 rpm. Media  $\pm$  DE (n = 3).

Con base en los experimentos anteriores el mayor efecto en la producción de biomasa viable y tasa específica de crecimiento fue a las condiciones iniciales de pH 7.0 y concentración de inóculo del 10%, a temperatura de 43°C a 200 rpm, lo cual está basado en los sustratos incorporados en el medio de cultivo relacionados con las vías metabólicas primarias necesarias para la obtención de energía (Van Hoek y cols, 1998) y las condiciones adecuadas de fermentación para mantener un mismo ambiente que permita el desarrollo y proliferación de las bifidobacterias en un tiempo de fermentación menor.

## Obtención de biomasa viable en fermentador

### Efecto de la agitación en la producción de biomasa

Estableciendo de los experimentos previos las condiciones iniciales de pH 7.0, concentración de inóculo del 10% y temperatura de 43°C, se realizaron fermentaciones en reactor a 2 velocidades de agitación con y sin control de pH (50 rpm y 100 rpm). En la figura 14, se observa la producción de biomasa de *B. infantis* en medio de cultivo PYG a estas condiciones.



**Figura 14. Efecto de la agitación** en la producción en biomasa de *Bifidobacterium infantis* en medio de cultivo PYG a pH inicial 7.0, 10% de inóculo a 43°C. Media  $\pm$  DE (n = 2).

Como se observa en la figura 14, los perfiles en la producción de biomasa de *B. infantis*, siguen el mismo comportamiento entre 50 rpm, 100 rpm con y sin control de pH. La biomasa obtenida a 8 horas de fermentación a estas velocidades de agitación presentan valores para 50 rpm con y sin control de pH de 6.20 g/L y 6.07 g/L; para 100

rpm con y sin control de pH de 7.48 g/L y 6.08 g/L. Además, los perfiles de producción de biomasa muestran fase estacionaria después de 6 horas.

Por otro lado, la biomasa obtenida en fermentador a 100 rpm con pH controlado es 50% mayor a la obtenida en matraz a 200 rpm. Dado que las agitaciones son diferentes en ambos procesos.

Con base en el análisis estadístico para la biomasa producida a 8 horas de fermentación (Apéndice 13 y 14), la mayor producción de biomasa fue a 100 rpm con pH controlado durante la fermentación siendo 12 % mayor respecto a 50 rpm con pH controlado, cos mostrando mayor efecto para 100 rpm y 50 rpm con pH controlado y menor para 50 rpm y 100 rpm sin control de pH.

### **Cuenta viable (UFC/mL)**

La cuenta viable inicial en la fermentación fue de  $10^5$  UFC/mL, obteniendo valores de  $5 \times 10^8$  UFC/mL (50 rpm con pH controlado) y  $1 \times 10^9$  UFC/mL (100 rpm con pH controlado) a 8 horas de fermentación, presentando un aumento del 12% para 100 rpm con respecto a 50 rpm con pH controlado (Tabla 7). Estos resultados nos permiten visualizar el aumento de 4 niveles en magnitud controlando el pH a 100 rpm y disminuyendo 1 orden para las otras condiciones descritas, lo cual puede ser indicativo de la cosecha en fase exponencial del inóculo, favoreciendo la cuenta viable al final del proceso de fermentación.

**Tabla 7.** Cuenta viable a las 8 horas de fermentación

	100 rpm		50 rpm	
	PH control	S/control de pH	PH control	S/control de pH
6 h	$6.3 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$
8 h	$1 \times 10^9$	$5 \times 10^8$	$8 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8$

**Tasa específica de crecimiento,  $\mu$  ( $h^{-1}$ )**

Por otro lado además del estudio de la agitación sobre la producción de biomasa viable de *B. infantis*, se estudió su efecto sobre la tasa específica de crecimiento. Encontrando que para 100 rpm con control del pH durante la fermentación se obtiene la tasa específica de crecimiento más alta comparada con la obtenida con 50 rpm. La tasa específica con 100 rpm sin control de pH también resultó ser menor de la obtenida con control de pH (Tabla 8).

Cabe mencionar que el valor de  $\mu$  obtenido a nivel matraz a esta temperatura con agitación de 200 rpm y un volumen final de 40 mL es superior ( $0.5874 h^{-1}$ ), comparada con la obtenida en fermentador volumen final cercano a 1 L a 100 rpm.

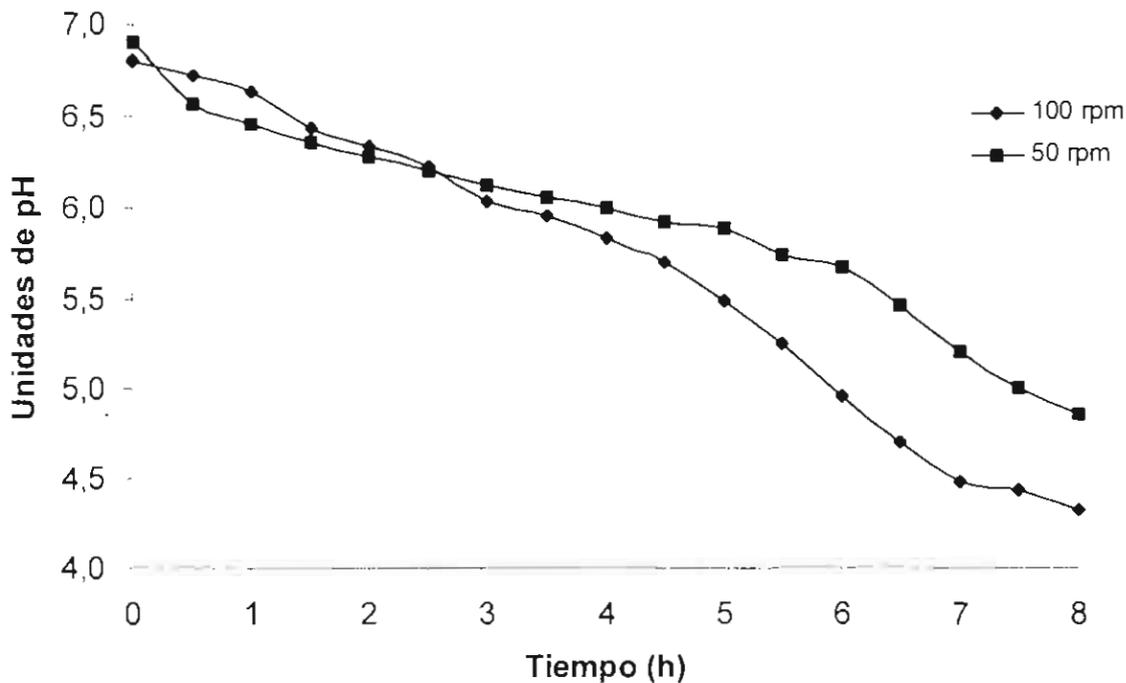
Con estos resultados podemos encontrar que la velocidad de agitación es un factor importante en el proceso de fermentación para aumentar la biomasa viable ya que se asegura mayor transferencia de nutrientes al microorganismo favoreciendo su producción viable

**Tabla 8.** Tasa específica de crecimiento  $\mu$  ( $h^{-1}$ )

100 rpm		50 rpm	
PH control	S/control de pH	PH control	S/control de pH
<b>0.323</b>	0.298	0.293	0.253

### Efecto de la agitación en el perfil de caída de pH

En la figura 15, se observa el perfil de la caída a 50 y 100 rpm, encontrando que el pH disminuye rápidamente alcanzando valores menores de 4.5 a 100 rpm y de 5 a 50 rpm a 8 horas.



**Figura 15.** Efecto de la agitación en el perfil de la caída de pH en la producción en biomasa de *Bifidobacterium infantis* en medio de cultivo PYG a pH inicial de 7.0, 10% de inóculo a 43°C.

Con estos resultados podemos encontrar que al aumentar la agitación el medio de cultivo se mantiene más homogéneo y cabe la posibilidad de que la transferencia de

nutrientes al microorganismo sea mayor favoreciendo la caída de pH. Dado que hay diferencias en la producción de biomasa, viabilidad y tasa específica de crecimiento, en fermentaciones futuras se plante mantener un control de pH 7.0 durante el proceso de fermentación partiendo del 10% de inóculo.

A partir de estos resultados podemos proponer que si el proceso de fermentación se realiza bajo las condiciones propuestas en este estudio, la producción final de *Bifidobacterium infantis* alcanzaría niveles en magnitud de  $10^9$  UFC/mL con una biomasa promedio de 7.5 g/L, lo que aseguraría que la concentración de células viables sea suficiente para poder llegar a establecerse en el intestino y ejerza su efecto probiótico.

La FDA establece que las cepas probióticas deben de mantener una cuenta viable  $\geq$  a  $10^6$  UFC/mL. Estudios de Biavati y Cols. (1992), Dave y Shah (1997), en yoghur encontraron que las bifidobacterias en leches no sobrevive a 35 días después de su fermentación. HA y Cols. (1999), reportaron la disminución en 1 orden de magnitud de  $10^6$  a  $10^5$  UFC/mL durante 40 días a 4°C. Micanel y Cols. (1997), investigaron el efecto de la temperatura a 4°C y 9°C en la conservación del producto en 4 yoghurts comerciales encontrando que a 4°C la cuenta viable de bifidobacterias se mantiene ( $10^6$  UFC/mL), a 9°C disminuye 3 ordenes de magnitud ( $10^3$  UFC/mL). Con estos niveles de viabilidad no se asegura que la ingesta del producto pueda mejorar la microbiota en el tracto gastrointestinal, por lo cual se requiere mantener una cuenta en un orden de magnitud mayor para asegurar la concentración de microorganismos vivos en el producto y su estabilidad en anaquel. Con ello, podemos estimar que el número de células vivas proporcione un efecto benéfico en el huésped.

**Tabla 7.** Cuenta viable a las 8 horas de fermentación

	100 rpm		50 rpm	
	PH control	S/control de pH	PH control	S/control de pH
6 h	$6.3 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$
8 h	$1 \times 10^9$	$5 \times 10^8$	$8 \times 10^8$	$1.3 \times 10^8$

**Tasa específica de crecimiento,  $\mu$  ( $h^{-1}$ )**

Por otro lado además del estudio de la agitación sobre la producción de biomasa viable de *B. infantis*, se estudió su efecto sobre la tasa específica de crecimiento. Encontrando que para 100 rpm con control del pH durante la fermentación se obtiene la tasa específica de crecimiento más alta comparada con la obtenida con 50 rpm. La tasa específica con 100 rpm sin control de pH también resultó ser menor de la obtenida con control de pH (Tabla 8).

Cabe mencionar que el valor de  $\mu$  obtenido a nivel matraz a esta temperatura con agitación de 200 rpm y un volumen final de 40 mL es superior ( $0.5874 h^{-1}$ ), comparada con la obtenida en fermentador volumen final cercano a 1 L a 100 rpm.

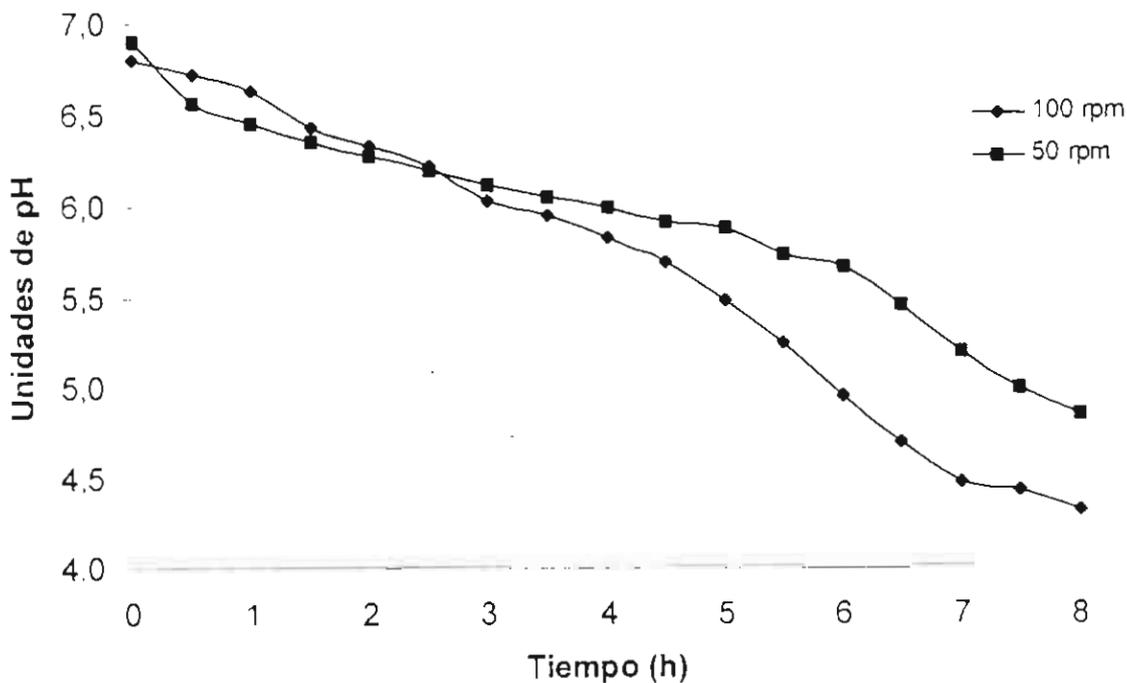
Con estos resultados podemos encontrar que la velocidad de agitación es un factor importante en el proceso de fermentación para aumentar la biomasa viable ya que se asegura mayor transferencia de nutrientes al microorganismo favoreciendo su producción viable

**Tabla 8.** Tasa específica de crecimiento  $\mu$  ( $h^{-1}$ )

100 rpm		50 rpm	
PH control	S/control de pH	PH control	S/control de pH
0.323	0.298	0.293	0.253

### Efecto de la agitación en el perfil de caída de pH

En la figura 15, se observa el perfil de la caída a 50 y 100 rpm, encontrando que el pH disminuye rápidamente alcanzando valores menores de 4.5 a 100 rpm y de 5 a 50 rpm a 8 horas.



**Figura 15.** Efecto de la agitación en el perfil de la caída de pH en la producción en biomasa de *Bifidobacterium infantis* en medio de cultivo PYG a pH inicial de 7.0, 10% de inóculo a 43°C

Con estos resultados podemos encontrar que al aumentar la agitación el medio de cultivo se mantiene más homogéneo y cabe la posibilidad de que la transferencia de

nutrientes al microorganismo sea mayor favoreciendo la caída de pH. Dado que hay diferencias en la producción de biomasa, viabilidad y tasa específica de crecimiento, en fermentaciones futuras se plante mantener un control de pH 7.0 durante el proceso de fermentación partiendo del 10% de inóculo.

A partir de estos resultados podemos proponer que si el proceso de fermentación se realiza bajo las condiciones propuestas en este estudio, la producción final de *Bifidobacterium infantis* alcanzaría niveles en magnitud de  $10^9$  UFC/mL con una biomasa promedio de 7.5 g/L, lo que aseguraría que la concentración de células viables sea suficiente para poder llegar a establecerse en el intestino y ejerza su efecto probiótico.

La FDA establece que las cepas probióticas deben de mantener una cuenta viable  $\geq$  a  $10^6$  UFC/mL. Estudios de Biavati y Cols. (1992), Dave y Shah (1997), en yoghur encontraron que las bifidobacterias en leches no sobrevive a 35 días después de su fermentación. HA y Cols. (1999), reportaron la disminución en 1 orden de magnitud de  $10^6$  a  $10^5$  UFC/mL durante 40 días a 4°C. Micanel y Cols. (1997), investigaron el efecto de la temperatura a 4°C y 9°C en la conservación del producto en 4 yoghurts comerciales encontrando que a 4°C la cuenta viable de bifidobacterias se mantiene ( $10^6$  UFC/mL), a 9°C disminuye 3 ordenes de magnitud ( $10^3$  UFC/mL). Con estos niveles de viabilidad no se asegura que la ingesta del producto pueda mejorar la microbiota en el tracto gastrointestinal, por lo cual se requiere mantener una cuenta en un orden de magnitud mayor para asegurar la concentración de microorganismos vivos en el producto y su estabilidad en anaquel. Con ello, podemos estimar que el número de células vivas proporcione un efecto benéfico en el huésped.

## CONCLUSIONES

- a) Se verificó la cuenta viable de la cepa en congelación observando que no existe una variación significativa de la viabilidad original ( $1.66 \times 10^7$  UFC/mL) con la obtenida a 12 meses de estudio ( $1.50 \times 10^7$  UFC/mL).
- b) El tiempo de activación de la cepa como pre-inóculo se estableció a 10 horas de incubación estática en sistema Gas-Pack BBL obteniendo una cuenta viable de  $1 \times 10^8$  UFC/mL.
- c) La cosecha del inóculo debe realizarse en fase exponencial media de crecimiento en un rango de absorbancia de 0.500 - 0.600 a  $\lambda_{660 \text{ nm}}$ , el tiempo puede variar de 4 a 6 horas.
- d) Las condiciones de fermentación seleccionadas para la obtención de una mayor cantidad de biomasa viable de *B. infantis* fueron las siguientes: pH inicial 7.0 y su control durante el proceso de fermentación, 10% de inóculo, 43°C, 100 rpm a 8 horas
- Se eligió la concentración del 10% de inóculo y pH inicial 7.0 ya que proporciona una tasa específica de crecimiento máxima de 0.419 y el modelo factorial aplicado muestra diferencias estadísticamente significativa para la biomasa obtenida.

- La temperatura de mayor efecto fue de 43°C a las 6 h de fermentación, obteniendo una biomasa de 4.50 g/L y favoreciendo la cuenta viable promedio de  $3.2 \times 10^8$  UFC/mL así como su tasa específica de crecimiento.
- Velocidad de agitación de 100 rpm con un control a pH 7.0 durante la fermentación. Con estos factores de proceso optimizados se incrementó la biomasa hasta 7.48 g/L con una cuenta viable de  $1 \times 10^9$  UFC/mL.
- Se requiere mantener un control de pH 7.0 durante las 8 horas de fermentación para favorecer la cuenta viable y la biomasa.
- El tiempo final de fermentación se estableció a 8 h en donde se llega a la fase estacionaria.

## PROPUESTAS

1. La concentración de glucosa de 30 g/L del medio PYG no se consume en su totalidad al tiempo de cosecha. Si se disminuye esta concentración, proporcionaría una reducción en el costo del medio de cultivo haciendo más rentable su producción. Para corroborar este idea se requiere realizar fermentaciones con menores concentraciones de glucosa.
2. A tiempo de 8 h en fermentador no se observa la fase estacionaria en el crecimiento de *B. infantis* en fermentador, por lo que se podría aumentar para alcanzarla.
3. Se requiere probar otras velocidades de agitación para conocer con cual se genera la máxima biomasa viable.
4. Se requiere la medición de los productos finales del metabolismo por HPLC, para analizar el efecto de las variables estudiadas en la presencia de ácidos al final del proceso de fermentación.

## REFERENCIAS

- Abbad Andaloussi, A., Talbaoui, H., Marczak, R y Bonaly, R. (1995). Isolation and characterization of exocellular polysaccharides produced by *Bifidobacterium longum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 995-1000.
- Alander, A., Smet, I. D., Nollet, L., Verstraete, W., Wright, A, V y Sandholm T. M. (1999). The effect of probiotic strains on the microbiota of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME). *Int. J. Food. Microbiol.* 46: 71-79.
- Azaola, A. (2000). "Optimización del medio de cultivo TPYG para la producción de biomasa activa de *Bifidobacterium infantis*"., Tesis del Doctorado en Ciencias Biológicas: UAM-xochimilco; pág. 65 - 68.
- Bezkorovainy, A. (1989). Nutrition y metabolism of Bifidobacteria. en *Biochemistry y Physiology of Bifidobacteria*. Cap IV. Ed. A. Bezkorovainy y R. Miller-Catchpole. CRC Press Inc. USA.
- Biavati, B., Crociani, F. y Mattarelli, P. (1992). Phase variations in *Bifidobacterium animalis*. *Curr. Microbiol* 25:51-55.
- Blanchette, L., Roy D., Bélanger, G y Gauthier, F. S. (1996). Production of cottage cheese using dressing fermented by Bifidobacteria. *J. Dairy Sci.* 79:8-15.
- Boon, M. A., Janssen, A. E. M y Riet, K. V. (2000). Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enz. Microbiol. Technol.* 26:271-278.
- Box. G.E.P., Hunter, W. G y Hunter, J. S. (1978). *Statistics for experimenters*. New York: wiley y Sons.
- Boyaval, P., Madec, M. N y Corre, C. (1992). Concentrated starter productions in a two stage cell-recycle bioreactor plant. *Biotechnol Lett.* 14(7)589-592.
- Collins, E. B y Hall, B. J. (1984). Growth of Bifidobacteria in Milk y Preparation of *Bifidobacterium infantis* for a Dietary Adjunct., *J. Dairy Sci* 67: 1376-1380.

- Corre, C., Madec, M. N. y Boyaval, P. (1992). Production of concentrated *Bifidobacterium bifidum*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 53:189-194.
- Cox, R. P y Marling, N. (1992). High affinity oxygen uptake by *Bifidobacterium bifidum*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 62:291-297.
- Crociani, F., Biavaty, B., Alessyrini, A., Chiarini, C y Scardovi, V. (1996). *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. Y *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., Two New Species Isolated From Human Dentals. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46(2) 564-571.
- Charteris, P. W., Kelly, M. P., Morelli, L. y Collins, J. K. (1997). Selective detection, enumeration y identification of potentially probiotic *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* species en mixed bacterial populations. *Int. J. Food. Microbiol.* 35:1-27
- Chevalier, P., Roy, D y Ward, P. (1990) Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 619-624.
- Dave, R. I y Shah, N. P. (1997). Viability of yogurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *Int. Dairy J.* 7: 31-41.
- Desjardins, M. L., Roy, D y Touping, C. (1990). Uncoupling of growth and acids production in *Bifidobacterium* spp. *J. Dairy Sci.* 73: 1478-1484.
- DeVries, W y Stouthamer, A. H. (1968). Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol y xilose by *Bifidobacteria*. *J. Bacteriol.* 96: 472-478.
- DeVries, W y Stouthamer, A. H. (1976). Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of *Bifidobacteria*. *J. Bacteriol.* 93: 574-576.
- Elo, S., Saxelin, M y Salminen, S. (1991). Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: comparison with other dairy. *Lett. Appl. Microbiol.* 13:154-156.
- Enciclopaedia of food science, food technology and nutrition., col 7. Academic Press. 4391-4399.

- Fuller, R. (1989). Probiotics in man y animals, *J. Appl. Bacteriol.* 66:356-378.
- Fuller, R. ( 1992). Probiotics: The scientific basis. Chapman & Hall London, 398 pp.
- Gallagher, D. D., Stallings, W. H., Blessing, L. L., Busta, F. F y Brady, L. J. (1996). Probiotics, Cecal microflora y aberrant crypts in the rat colon. *J. Nutr.* 126(5) 1362-1371.
- Grill, J.P., Schneider, F., Crociani, J., y Ballongue, J. (1995). Purification y Characterization of Conjugated Bile Salt Hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(7)2577-2582.
- Grill, J.P., Perrin, P y Schneider, F. (2000). Bile salt toxicity to some bifidobacteria strains: Role of conjugated bile salt hydrolase and pH. *Can. J. Microbiol.* 46, 878-884.
- HA, C. L., Lee, J. H., Zhou, H. R., Ustunol, Z y Pestka, J. J. (1999). Effect of yogurt ingestion on mucosal an systemic citokinee gene expreeion in the mouse. *J. Food Protec.* 62(2):181-188.
- Hale T. L.. (1991). Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microbiol. Rev.* 55: 206-224.
- Jiang T., Mustapha A., y Savaiano, D. A. (1996). Improvement of Lactose Digestion in Humans by Ingestion of Unfermented Milk Containing *Bifidobacterium longum*. *J. Dairy Sci.* 79:750-757.
- Juven, B.J., Meinesmann, R. J. y Stern, N.J. (1991). Antagonist effects of *Lactobacilli* y *Pediococci* to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 95-103.
- Katrien, M. J., Laere, V., Abbe, T., Schools, A. H., Beldman, G y Voragen, J. G. A. (2000). Characterization of a novel  $\beta$ -Galactosidase from *Bifidobacterium adolescentis* DSM 20083 active towards transgalactooligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(4)1379-1384.

- Kok, G. R., Waal, A., Schut, F., Welling, W. G., Weenk, G y Hellingwerf, J, K. (1996). Specific detection y analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(10):3668-3672.
- Kot, E., Furmanov, S y Bezkorovainy A. (1995). Acumulation of Iron in Lactic Acid Bacteria y Bifidobacteria *J. Food Sci.* 60(3):547-550.
- Loaria S. y Martín, J. H. (1991). Effect of pH on survival of *Bifidobacterium bifidum* y *Lactobacillus acidophilus* in frozen fermented dairy desserts. *Cult. Dairy Products.* 11: 13-21
- McKellar, C. R y Modler, W. H. (1989). Metabolis of fructo-oligosaccharides by *Bifidobacterium* spp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31. 537-541.
- Micanel, M., Haynes, I. N y Playne, M. J. (1997). Viability of probiotic cultures in commercial Australian yoguts. *Aus. J. Dairy Technol.* Vol 52: 24-27
- Miller T.L. y Wolin, M. J. (1996). Pathway of acetate, propionate y butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5): 1589-1592
- Mitsouka, T. (1990). *Bifidobacteria* y their role in human health. *J. Ind. Microbiol.* 6: 263 - 268.
- Montgomery D. C. (1991). Design y analysis of experiments. 3er Edición. Wiley. New York.
- Muñoa, F. J y Parres, R. (1988). Selective Medium for Isolation y Enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(7); 1715-1718.
- Muramatzu, K., Onodera, S., Kikuchi, M y Shiomi, N. (1992). The production of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium* spp. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(9); 1451-1454.
- Novik, I. G., Astapovich, I. N., Ryabaya, E. N y Bogdan, S. A. (1997). Biological activity of the extracellular protein.polisacharide complex of *Bifidobacterium adolescentis*. *Microbiol.* 66(5) 525-529.

- Ouwehand, A. C., Isolauri, E., Kirjavainen, P. V y Salminen S. J. (1999). Adhesión of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS. Microbiol. Lett.* 172: 61-64.
- Petschow, W. B y Talbott, D. R. (1990). Growth promotion of *Bifidobacterium* species by whey and casein fractions from human and bovine milk. *J. Clin. Microbiol.* 71:3214-3221.
- Pock, M y Bezkorovainy A. (1988). Growth-Enhancing supplements for various species of the genus *Bifidobacterium*. *J. Dairy Sci.* 71:3214-3221.
- Poupard, J. A., Husain, Y. y Norris, R. F. (1973). Biology of Bifidobacteria. *Bacteriol. Rev.* 37:136-165.
- Roy, D., Chevalier, P., Ward, P., Savoie, L. (1991). Sugars fermented by *bifidobacterium infantis* ATCC 27920 in relation to growth y  $\alpha$ -galactosidase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34:653-655.
- Saavedra, J. M., Bauman, N. A., Oung, I., Perman, J. A y Yolken, R. H. (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* y *streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea y shedding of rotavirus. *Lancet.* 344: 1046-1049.
- Shah, N. P. (1999). Simposium: probiotic bacteria., Probiotic Bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy. Sci.* 83: 894-907.
- Salminen, S., Isolauri, E y Onnela, T. (1995). Gut flora in normal y disordered states. *Chemother.* 4 (sup 1), 5 - 15.
- Scardovi, V. y Trovatelli, L. D. (1965). The fructose-6-P shunt as a peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann. Microbiol. Enzymol.* 15:19-29.
- Scardovi, V. (1986). The genus *Bifidobacterium*. Orlajensen in: *Bergey's Manuals of sistematic Bacteriology*, vol 2 Sneath P. H. A. Mair N.S. Sharpe M.E., Holt J. G. 1418-1434.

- Scardovi, V. (1981). The genus *Bifidobacterium*. en "The Prokaryotes" vol II. Ed. M. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows y H.G. Schlegel. Cap 149. Springer-verlag. N.Y.
- Schiffrin, E. J., Link-Amster, R. H., Aeschlimann, J. M y Donnet – Hughes, A. (1995). Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 78: 491 – 497.
- Sen, R y Swaminathan, T. (1997). Application of response surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 358-363.
- Sejong, O., Sungsoo, R., Jaehun, S., Sangyo, K y Youngjin, B. (1995). Optimizing conditions for the growth of *Lactobacilli casei* YIT 9018 in Tryptone-Yeast Extract-Glucose medium by using response surface methodology. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(11)3809-3814.
- Shimamura, S., Abe, F., Ishibashi, N., Miyakawa, H., Yaeshima, T., y Tomita, M. (1990). *Bifidobacteria: production y Development.* *Agric. Biol. Chem.* 54: 2869-2874.
- Tailandier, P., Gilis, F., Portugal R. F., Laforece, L y Ctrehaiano, P. (1996). Influence of médium composition, pH and temperature on the wroth and viability of *Lactobaccillus acidophilus*. *Biotechnol. Letts.* 18 (7):775-780.
- Tanaka, H., Hashiba, H., Kok, J y Mierau, I. (2000). Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*, biochemical and genetic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (6):2505-2512.
- Thomas, P. O. (1999). Response surface models for effects of temperature, pH, and previous growth pH on growth kinetics of *Salmonella thyphimurium* in brain heart infusion broth. *J. Food Protec.* 62 (2):106-111.
- Van Hoek. P., Van Dijken, J. P y Pronk, J. T. (1998). Effect of specific growth rate of fermentative capacity og Baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (11): 4226 – 4233.

- Ventling, B. L., Mistry, V. V. (1993). Growth characteristics of bifidobacteria in ultrafiltered milk. *J. Dairy Sci.* 76:962-971.
- Wang X., y Gibson, G. R. (1993). Effects of the in vitro fermentation of oligofructose y inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J. Appl. Bacteriol.* 75:373-380.
- Watier, D., Dubourguier, H. C., Leguerinel, I y Hornez, J. P. (1996). Response surface models to describe the effects of temperature, pH, and ethanol concentration on growth kinetics and fermentation end products of a *Pectinatus. sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 62(4):1233-1237.
- Wolin J. M., Zhang, Y., Bank, S., Yerry, S y Miller, T. L. (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.

## APÉNDICES

**Apéndice 1. Diseño factorial 4<sup>2</sup> para biomasa a diferentes pH (7.0, 6.5, 6.0, 5.5) y concentraciones de inóculo (5%, 10%,15 %, 20%) a 8 h**

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: PSECO\_8H

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observe Power
Corrected Model	8,541 <sup>b</sup>	15	,569	46,365	,000	,956	695,469	1,0
Intercept	664,065	1	664,065	54073,532	,000	,999	54073,532	1,0
INÓCULO	,501	3	,167	13,593	,000	,560	40,780	1,0
PH	7,178	3	2,393	194,842	,000	,948	584,527	1,0
INÓCULO * PH	,862	9	9,574E-02	7,796	,000	,687	70,162	1,0
Error	,393	32	1,228E-02					
Total	672,999	48						
Corrected Total	8,934	47						

a. Computed using alpha = ,05

b. R Squared = ,956 (Adjusted R Squared = ,935)

**Apéndice 2. Comparación de biomasa promedio por prueba de Tukey para el efecto concentración de inóculo.**

**PSECO\_8H**

Tukey HSD<sup>a</sup>

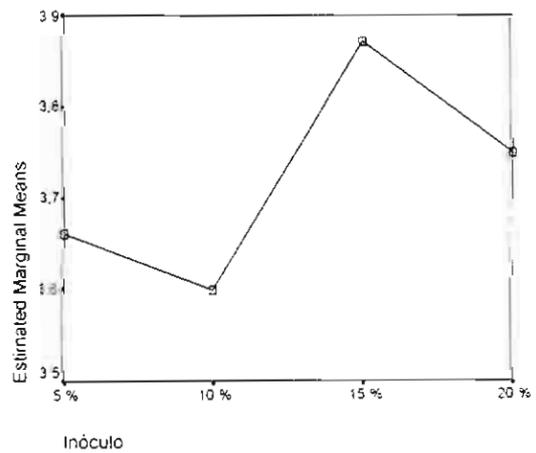
Inóculo	N	Subset		
		1	2	3
10	12	3,5990		
5	12	3,6602	3,6602	
20	12		3,7481	
15	12			3,8708
Sig.		,538	,231	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are display Based on Type III Sum of Squares  
The error term is Mean Square(Error) = 1,228E-02.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

b. Alpha = ,05.

**Estimated Marginal Means of PSECO**



**Apéndice 3. Comparación de biomasa promedio por prueba de Tukey para el efecto de pH.**

**PSECO\_8H**

Tukey HSD<sup>a,b</sup>

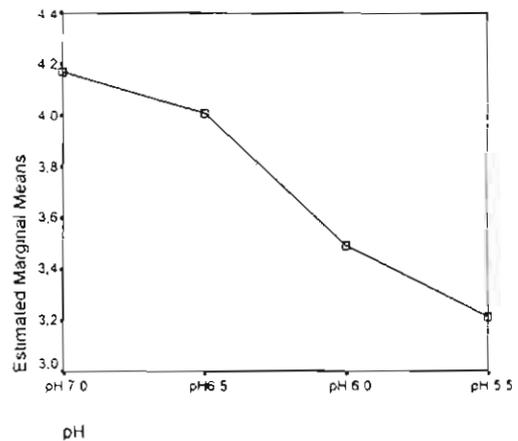
pH	N	Subset			
		1	2	3	4
5.5	12	3,2109			
6.0	12		3,4887		
6.5	12			4,0089	
7.0	12				4,1695
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.  
Based on Type III Sum of Squares  
The error term is Mean Square(Error) = 1,228E-02.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12,000.

b. Alpha = .05.

Estimated Marginal Means of PSECO\_8



**Apéndice 4. Diseño factorial 4<sup>2</sup> para biomasa a diferentes pH (7.0, 6.5, 6.0, 5.5) y concentraciones de inóculo (5%, 10%, 15 %, 20%) a 6 h.**

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: PSECO\_6H

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Eta Squared	Noncent. Parameter	Observed Power
Corrected Model	19,469 <sup>b</sup>	15	1,298	133,948	,000	,984	2009,217	1.0
Intercept	418,145	1	418,145	43152,766	,000	,999	43152,766	1.0
INÓCULO	13,432	3	4,477	462,055	,000	,977	1386,164	1.0
PH	5,337	3	1,779	183,609	,000	,945	550,828	1.0
INÓCULO * PH	,700	9	7,776E-02	8,025	,000	,693	72,226	1.0
Error	,310	32	9,690E-03					
Total	437,924	48						
Corrected Total	19,779	47						

a. Computed using alpha = .05

b. R Squared = ,984 (Adjusted R Squared = ,977)

## Apéndice 5. Efecto de pH a diferentes concentraciones de inóculo sobre la biomasa promedio por prueba de Tukey.

PSECO\_6H<sup>+</sup>

Tukey HSD<sup>a</sup>

Inóculo	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
5	3	2.3583			
10	3		3.3730		
15	3			3.5860	
20	3				3.9160
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

b. pH = 7.0

PSECO\_6H<sup>+</sup>

Tukey HSD<sup>a</sup>

Inóculo	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
5	3	2.3257			
10	3		3.2677		
15	3			3.4710	
20	3				3.6940
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

b. pH = 6.5

PSECO\_6H<sup>+</sup>

Tukey HSD<sup>a</sup>

Inóculo	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
5	3	2.0660		
10	3		2.9220	
20	3			3.1590
15	3			3.2860
Sig.		1.000	1.000	.364

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

b. pH = 6.0

PSECO\_6H<sup>+</sup>

Tukey HSD<sup>a</sup>

Inóculo	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
5	3	1.4457	
20	3		2.7203
15	3		2.7280
10	3		2.9033
Sig.		1.000	.497

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. pH = 5.5

## Apéndice 6. Efecto de las concentraciones de inóculo a diferentes pH sobre la biomasa promedio por prueba de Tukey.

PSECO\_6H<sup>+</sup>

Tukey HSD<sup>a</sup>

pH	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
5.5	3	1.4457	
6.0	3		2.0660
6.5	3		2.3257
7.0	3		2.3583
Sig.		1.000	.134

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Inóculo = 5

PSECO\_6H<sup>+</sup>

Tukey HSD<sup>a</sup>

pH	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
5.5	3	2.9033	
6.0	3	2.9220	
6.5	3		3.2677
7.0	3		3.3730
Sig.		.990	.377

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

b. Inóculo = 10

PSECO\_6H<sup>+</sup>

Tukey HSD<sup>a</sup>

pH	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
5.5	3	2.7280		
6.0	3		3.2860	
6.5	3			3.4710
7.0	3			3.5860
Sig.		1.000	1.000	.099

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

b. Inóculo = 15

PSECO\_6H<sup>+</sup>

Tukey HSD<sup>a</sup>

pH	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
5.5	3	2.7203		
6.0	3		3.1590	
6.5	3			3.6940
7.0	3			3.9160
Sig.		1.000	1.000	.097

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Usas Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

b. Inóculo = 20

**Apéndice 7. Análisis de varianza para biomasa obtenidas a diferentes temperaturas a 8 h de fermentación.**

**ANOVA**

PSECO_8					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8,074	5	1,615	264,450	,00
Within Groups	7,327E-02	12	6,106E-03		
Total	8,147	17			

**Apéndice 8. Comparación de biomasa promedio por prueba de Tukey.**

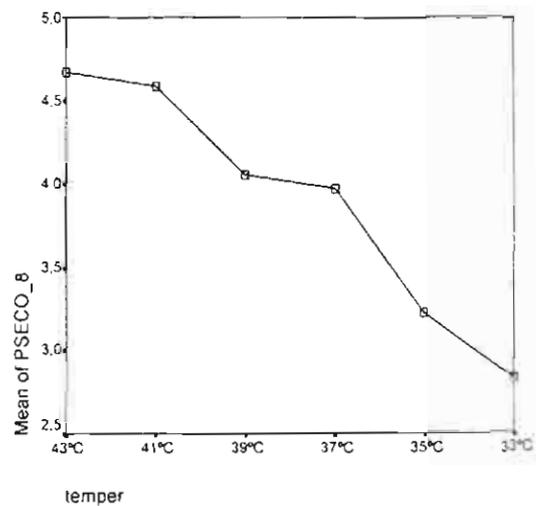
**PSECO\_8**

**Tukey HSD**

temper	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
33°C	3	2,83333			
35°C	3		3,22667		
37°C	3			3,97367	
39°C	3			4,06000	
41°C	3				4,58733
43°C	3				4,67267
Sig.		1,000	1,000	,752	,760

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



**Apéndice 9. Análisis de varianza para biomasa obtenida a diferentes temperaturas a 6 h de fermentación.**

**ANOVA**

PSECO_6					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13,166	5	2,633	7082,946	,00
Within Groups	4,461E-03	12	3,718E-04		
Total	13,171	17			

**Apéndice 10. Comparación de biomasa promedio por prueba de Tukey.**

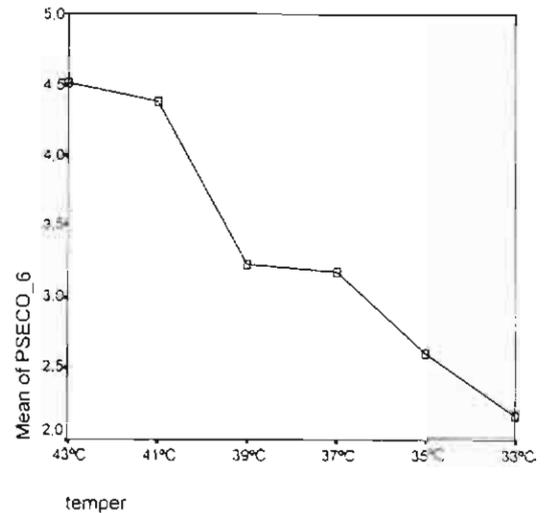
**PSECO\_6**

Tukey HSD<sup>a</sup>

tempe	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	5
33°C	3	2,16867				
35°C	3		2,61000			
37°C	3			3,18633		
39°C	3			3,22933		
41°C	3				4,37933	
43°C	3					4,5096
Sig.		1,000	1,000	,139	1,000	1,00

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



**Apéndice 11. Análisis de varianza para cuenta viable obtenido a diferentes temperaturas a 6 h de fermentación.**

**ANOVA**

VIABI6H

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1,52E+17	5	3,04E+16	69,193	,00
Within Groups	5,26E+15	12	4,39E+14		
Total	1,57E+17	17			

**Apéndice 12. Comparación de la cuenta en placa promedio por prueba de Tukey.**

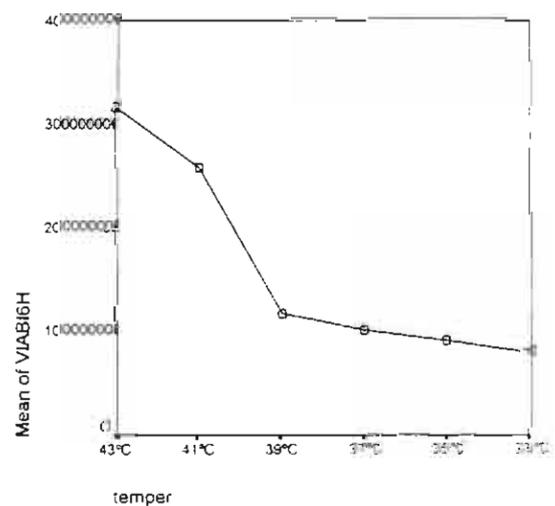
**VIABI6H**

Tukey HSD<sup>a</sup>

temper	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
33°C	3	8,0E+07		
35°C	3	9,2E+07		
37°C	3	1,0E+08		
39°C	3	1,2E+08		
41°C	3		2,6E+08	
43°C	3			3,2E+08
Sig.		,288	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.



**péndice 13. Análisis de varianza para biomasa obtenida a 2 velocidades de agitación a 8 h de fermentación.**

**ANOVA**

PSECO8H

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,824	3	,941	1141,131	,00
Within Groups	3,300E-03	4	8,250E-04		
Total	2,828	7			

**Apéndice 14. Comparación de biomasa promedio por prueba de Tukey para el efecto de velocidad de agitación.**

PSECO8H

Tukey HSD<sup>a</sup>

AGITACIO	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
50 rpm s/pH c	2	6,0700		
100 rpm s/pH c	2	6,0800		
50 rpm c/pH c	2		6,2050	
100 rpm c/pH c	2			7,4850
Sig.		,984	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

