

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

“Comparación de la viabilidad y estabilidad de cepas de bifidobacterias
liofilizadas utilizando diferentes crioprotectores”

Presenta:

Diego Armando Herrera de la Cruz

MATRÍCULA
2202032640

ASESORES:

Dra. María Angélica Gutiérrez Nava



Dr. Lino Mayorga Reyes



Lugar de realización: Laboratorio de Ecología Microbiana

Junio de 2025

ÍNDICE

Resumen	3
Introducción	4
Marco teórico	5
Probióticos	5
Género <i>Bifidobacterium</i>	6
Conservación de cultivos bacterianos	7
Liofilización	7
Crioprotectores en la conservación de cepas	8
Conservación de probióticos	9
Microorganismos y medio de cultivo	11
Activación de microorganismos	11
Cinética de crecimiento bacteriano	11
Preparación de crioprotectores	11
Preparación de muestras para liofilización	12
Determinación de viabilidad por cuenta viable por goteo	13
Resultados	14
Curva de crecimiento (determinación de tiempo de crecimiento)	14
Efecto del crioprotector en la preservación de la integridad celular	25
Estabilidad de bacterias liofilizadas a través del tiempo	28
Efectos de los crioprotectores en la preservación de la viabilidad de los microorganismos	30
Tratamiento con inulina al 10% y 20%	32
Discusión	33
Conclusión	35
Bibliografía	36
Anexo	38

Resumen

El uso de probióticos del género *Bifidobacterium*, ha sido una práctica común para mejorar la microbiota intestinal, sin embargo, la baja tolerancia al estrés ante la presencia de oxígeno requiere condiciones de almacenamiento que aseguren su viabilidad. La liofilización es uno de los métodos más utilizados para la producción de polvos a partir de estos probióticos y así mismo aumentar su tiempo de almacenamiento. En este estudio, se evaluó la viabilidad y estabilidad de tres especies de bifidobacterias liofilizadas (*Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium longum*), utilizando como crioprotector inulina al 10% y 20%, caseína al 1%, manitol al 10% y leche en polvo al 20%. La viabilidad de estos microorganismos, fue monitoreada durante 6 meses con el fin de optimizar el proceso de producción de preparaciones probióticas estables y con una concentración alta de microorganismos viables para ser administrados a animales de experimentación y asegurar una concentración constante de microorganismos. Se determinó que la leche en polvo, fue el crioprotector que mantuvo la integridad de la membrana celular durante el congelamiento, liofilización y almacenamiento a través del tiempo, por lo que este crioprotector fue considerado como el óptimo para la preservación de las características morfológicas y fisiológicas de estos microorganismos.

Introducción

Actualmente el uso de probióticos es común en el área médica, ganadera y nutricional. Dentro de los más utilizados se encuentra el género *Bifidobacterium*, cuya importancia radica en que es empleado para tratar trastornos de la microbiota intestinal, mejorando y restaurando su composición. Así mismo, producen enzimas y proteínas que ayudan a la digestión (Russell *et al.*, 2011). Este género al igual que las bacterias ácido-lácticas presenta una baja tolerancia al estrés, por ende, para trabajar con ellos es indispensable establecer condiciones de almacenamiento que aseguren su viabilidad y la preservación de sus propiedades (Kharchenko *et al.*, 2017).

Actualmente, la liofilización se emplea a menudo para la producción de polvos de estos mismos probióticos con el fin de aumentar el tiempo de almacenamiento de estos microorganismos. Así mismo, mejorará los niveles de supervivencia (preservación), aunque este proceso ayude a la preservación de la estructura de la célula, la formación de cristales de hielo puede afectar significativamente la integridad, fluidez y la permeabilidad de la membrana celular de las bacterias, al igual que afecta a las enzimas intracelulares. Adicionalmente a esto, el proceso de liofilización también inhibe la actividad de las bacterias, lo cual puede causar fácilmente daños mecánicos, lo que resulta en la muerte de la célula (Sitong *et al.*, 2024). Para aumentar el porcentaje de supervivencia y minimizar el daño celular durante la liofilización, es necesario agregar crioprotectores, el cual como su nombre lo indica, es el material el cual puede proteger la integridad de la célula durante el proceso de congelación, evitando la formación de cristales de hielo. Entre ellos encontramos: los disacáridos (trehalosa, lactosa, maltosa y sacarosa), polialcoholes (glicerol, manitol, sorbitol, xilitol) (Santelices *et al.*, 2020).

En nuestro grupo de investigación, se estudia el efecto de la administración de microorganismos probióticos en un modelo experimental de hígado graso no alcohólico, por lo que buscamos encontrar las condiciones óptimas de almacenamiento de los microorganismos con características prebióticas a administrar y asegurar su viabilidad durante el tiempo que dure el experimento *in vivo*.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue, estudiar la viabilidad y estabilidad de tres especies de bifidobacterias liofilizadas utilizando diferentes crioprotectores.

Marco teórico

Probióticos

En una versión persa del antiguo testamento, precisamente en el Genesis, se hace correlación en la longevidad que alcanzó Abraham, con consumo de “leche agria”. Debido a esto, en el año 76 D.C. el historiador romano Plinio hacia la recomendación de ingerir productos lácteos fermentados para el tratamiento de la gastroenteritis (Oliveira *et al.*, 2016). En 1908, el científico ruso Elie Metchnikoff, se interesó en estudiar la longevidad humana, lo cual fue incitado por la observación del número inusualmente alto de personas mayores a los 100 años en Europa del Este, esto debido al consumo de leches fermentadas. Metchnikoff propuso que las bacterias ácido-lácticas (BAL) proporcionaban beneficios a la salud, dentro de los cuales, era alcanzar la longevidad (tener una esperanza de vida mayor). En donde se sugería que, la producción de productos tóxicos liberados por ciertos microorganismos patógenos que se alojan en el intestino contribuye al envejecimiento, este efecto podría ser reducido con la modificación de la microbiota intestinal sustituyendo los microbios proteolíticos -que producen sustancias tóxicas como fenoles, indoles y amoníaco a partir de la digestión de proteínas- por microbios sacarolíticos (WGO, 2011). De este modo, Metchnikoff identificó en la leche fermentada a la bacteria que denominó “*Bulgarian bacillus*”.

La fermentación ácido-láctica de alimentos constituidos principalmente por plantas, se ha implementado por los homínidos hace más de 1.5 millones de años, esto provocó que su tracto gastrointestinal se adaptara a una ingesta diaria de BAL. Además de que, esta práctica fue ampliamente utilizada en Europa hasta la revolución industrial (1760-1840), y actualmente es una práctica empleada por diversas comunidades africanas, ya que es una de las soluciones más comunes en las que se puede conservar de manera segura los alimentos. Sin embargo, en el siglo XX en los países industrializados, se abandonó completamente esta práctica, lo cual ocasionó que se presentaran diversos problemas gastrointestinales. Por este motivo, se introdujeron componentes no digeribles en la dieta, con el fin de favorecer el crecimiento de ciertas bacterias que se alojan en el intestino, las cuales son asociadas con los efectos benéficos para la salud (Iñiguez *et al.*, 2006).

Hablando en este ámbito, uno de los principales géneros aislados fue *Bifidobacterium*, el cual presenta una morfología de bacilo que muy frecuentemente forma cadenas cortas. Este fue aislado por primera vez por Henry Tissier (del Instituto Pasteur) a partir de un lactante alimentado con leche materna y el nombre que le dio a la bacteria fue “*Bacillus bifidus communis*”. Es de esta manera que Tissier proponía que las bifidobacterias pudiesen desplazar a las bacterias patógenas que ocasionaban diarrea

y sugería la administración de estas a los lactantes que presentaban esta sintomatología (Iñiguez *et al.* 2006). Hoy en día, su uso está dirigido para el tratamiento de los siguientes padecimientos: la disminución de la intolerancia a la lactosa, mantenimiento de la biota intestinal, prevención de algunos tipos de cáncer, reducción de padecimiento de alergias, disminución en los niveles de colesterol y mantenimiento de la salud gástrica (Collado, 2004).

A pesar de que la definición inicial de probiótico fue planteada en 1965 por Lilly y Stillwell donde hacían referencia a ciertos compuestos producidos por microorganismos que estimulan el crecimiento de otros, sin embargo, en 1989, Roy Fuller resaltó que, para considerarse probiótico, el microorganismo debe de encontrarse viable, además de que introdujo la idea de su efecto benéfico en la salud. No obstante, la definición que ha tenido una mayor aceptación fue dada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual menciona que, se refiere a los microorganismos vivos que cuando son administradas en las concentraciones adecuadas, producen un efecto beneficioso sobre la salud (Oluwatoyin *et al.* 2021).

De acuerdo con la Asociación Científica Internacional para los Probióticos y Prebióticos, los productos y preparados que pueden catalogarse como probióticos son los siguientes: fármacos probióticos, alimentos para usos médicos como probióticos (nutrición enteral), alimentos probióticos (productos lácteos fermentados), formulaciones infantiles (leches en polvo) y productos de administración no oral (administraciones vaginales). Del mismo modo, cada una de estas presentaciones, es necesario que se hayan llevado a cabo estudios en los que se demuestren los efectos benéficos específicos sobre la salud (Oliveira *et al.*, 2016).

Género *Bifidobacterium*

Las bacterias más comunes que se relacionan con la actividad probiótica son: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* y algunas variedades de levaduras como *Saccharomyces boulardii*. Debido a que existen cepas y dosis distintas para cada especie de bacteria, las propiedades entre cada una pueden ser diferentes.

Los miembros del género *Bifidobacterium*, son habitantes dominantes del tracto gastrointestinal de los mamíferos. La colonización del intestino grueso del huésped por bifidobacterias comienza inmediatamente después del nacimiento, éstas deben afrontar numerosos desafíos de estrés oxidativo, osmótico y de sales/ácidos biliares que ocurren a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI). Al mismo

tiempo, las bifidobacterias no solo deben competir con la multitud de otros comensales intestinales para la adquisición de nutrientes, sino que también requieren protección contra virus bacterianos.

Conservación de cultivos bacterianos

Para obtener un rendimiento óptimo en la viabilidad de los cultivos, es necesario considerar cual será el método de preservación, ya que se debe garantizar la estabilidad genética de los microorganismos, a largo plazo. En la industria y en laboratorios de investigación, las cepas bacterianas son de suma importancia para la investigación o para la producción de artículos biológicos derivados de las mismas (Zamora, 2003), por lo que es de vital importancia conservar las cepas que tengan un alto potencial de uso sin sufrir cambios en el fenotipo y genotipo.

Dentro de los principales métodos para su preservación encontramos: el crecimiento seriado o continuo, secado (por aspersión, liofilización) y congelación. El crecimiento seriado consiste en realizar siembras en agar para su uso continuo, sin embargo, no se pueden almacenar más de 30 días, por lo tanto, se llevan a cabo resiembras o transferencias en agares completamente nuevos. El método de secado por aspersión ha sido utilizado principalmente en hongos, esporas o en diferentes estructuras en reposo. Otros métodos para la preservación son la liofilización, congelación en nitrógeno líquido o congelación a baja temperatura (Morgan *et al.*, 2006).

El proceso de liofilización es uno de los más utilizados para la conservación de microorganismos, debido a sus bajos costos y la disminución de la carga de trabajo en comparación a la conservación de cultivos seriados, este proceso minimiza los riesgos de daño en la integridad, ya que es primordial asegurar su viabilidad, así como la integridad morfológica, fisiológica y genética del cultivo que pueda ser utilizado en futuras producciones y así, mantener las características principales de la cepa que fue aislada inicialmente (Escobar, 2015). El mantenimiento de cultivos *in vitro* demanda una cantidad notoria de trabajo, esto puede ocasionar inestabilidad genética, del mismo modo, se han desarrollado nuevas metodologías con la congelación de los cultivos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, así como la preservación con nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Arcos *et al.*, 2004).

Liofilización

Este es el método más utilizado en todas las áreas de investigación, así como en la industrial, este proceso consiste en la extracción del agua de los alimentos, proteínas o productos de interés farmacéutico y células para la conservación de su estabilidad a temperatura ambiente. Se lleva a cabo mediante sublimación (transición de sólido a gas, sin llegar a pasar por el estado líquido), el cual es

necesario someter a vacío, congelación del agua presente en la célula (las muestras deben de ser congeladas previamente) (Fuentes *et al.*, 2018). La fase de congelación del cultivo puede llevarse a cabo rápidamente o lentamente, a pesar de ello, se deben de tomar en cuenta el uso de crioprotectores (son aquellas que pueden mejorar la tasa de supervivencia durante la liofilización) como la leche descremada y carbohidratos, el glicerol no puede ser utilizado debido a su punto de evaporación y su higroscopicidad lo cual ocasiona que el producto presente una viscosidad que es desfavorable para la conservación, el dimetilsulfóxido (DMSO) es poco utilizado, debido a su toxicidad y al concentrarse con el agua durante la evaporación, puede causar daños en la célula (Hubalek, 2003).

Crioprotectores en la conservación de cepas

Las interacciones moleculares que realizan los crioprotectores impiden que durante la congelación el agua pueda formar cristales geométricos ordenados dentro de la célula, y de este modo la solidificación del medio sea desordenada y de esta manera, produce que los crioprotectores tomen un carácter de sustancia vítrea protectora, esto hace que los procesos que pueden afectar la integridad de la célula sean ralentizados, mejorando de esta manera su viabilidad a largo plazo (Escobar, 2015). Estos tienen un papel fundamental ya que previene la formación de hielo con bajos niveles de toxicidad para la célula, ya que, debido a sus propiedades fisicoquímicas, presentan una alta afinidad con el agua (Oluwatoyin *et al.*, 2021).

Uno de los componentes que forman parte de la célula que sufre un mayor daño durante el proceso de congelación es la membrana celular, debido a la pérdida de fluidez de los componentes lipídicos (colesterol y ácidos grasos) ya que son los componentes más abundantes de la membrana, dado que, la posición que adopta cada una de estas moléculas en las bicapas lipídicas, determina la rigidez de esta y con ello, el transporte entre membranas. Este es un factor determinante para la supervivencia de la célula (Ávila *et al.*, 2006).

Se ha reportado una gran variedad de compuestos que pueden ser utilizados como crioprotectores, donde los más utilizados son: glicerol al 15% y 20%, DMSO al 3% y 15%, leche descremada y algunos carbohidratos como la glucosa, lactosa, sacarosa, inulina, inositol y manitol a concentraciones muy variables dependiendo de las cepas y condiciones (Cui *et al.*, 2022; Pajuelo *et al.*, 2023). Sin embargo, una de las características que determina su eficacia es su polaridad, cuanto menos polar sea la molécula, más fácilmente puede atravesar la membrana (Santelices *et al.*, 2020).

Estos pueden ser clasificados en agentes penetrantes; que son compuestos de bajo peso molecular y permeables ante la membrana celular, entre los que podemos encontrar son: DMSO (dimetil sulfóxico), el cual es un disolvente bipolar aprótico e hidrosoluble, su acción crioprotectora es atribuible a su interacción con electrolitos, el cual previene su acumulación excesiva, evitando así la formación de cristales de hielo, debido a su bajo peso molecular puede atravesar fácilmente la membrana celular, y con ello puede regular la estabilidad de la bicapa lipídica, adicionalmente, también interfiere con los procesos de solvatación del agua. Otro de los crioprotectores que se encuentra dentro de esta categoría es el 1-2 propanediol, el cual ha sido principalmente utilizado en la preservación de blastocitos y embriones en estado preimplantacional (Ávila *et al.*, 2006).

Un grupo adicional es la de los agentes no penetrantes, son sustancias que presentan alto peso molecular, que son efectivos a congelaciones a altas velocidades, su acción protectora produce la rápida deshidratación. Los más utilizados son: glucosa, sacarosa, dextrosa y dextrano. Estos generalmente forman puentes de hidrogeno con el agua, lo que reduce la actividad de agua a una mayor magnitud que a la que se predeciría por su concentración molar (Escobar, 2015).

Conservación de probióticos

En los últimos años, se han utilizado numerosas cepas de probióticos como suplementos dietéticos tanto para humanos como para animales. La eficacia y la supervivencia de los probióticos durante la producción podrían asegurar una mejor actividad de ellos en el huésped. Por lo tanto, en nuestro equipo de investigación, buscamos optimizar el proceso de producción de preparaciones probióticas estables y un mayor número de microorganismos viables para ser administrados a animales de experimentación y asegurar una concentración constante de microorganismos.

Objetivo general

Determinar el crioprotector ideal que mantenga viables a largo plazo, bifidobacterias liofilizadas.

Objetivos particulares

- Elaborar mezclas de *Bifidobacterium* sp. con los diferentes tipos de crioprotectores para su conservación en refrigeración, congelación y liofilización.
- Determinar el efecto del crioprotector sobre la viabilidad de *Bifidobacterium* sp., mediante la técnica de cuenta viable.
- Determinar la estabilidad de la viabilidad de *Bifidobacterium* sp., en los liofilizados obtenidos.
- Elaborar una comparación entre los resultados obtenidos a lo largo de todo el estudio de cada una de las pruebas de viabilidad, para evaluar el tiempo en el cual la muestra se mantiene de manera adecuada.

Materiales y Métodos

Microorganismos y medio de cultivo.

Las cepas utilizadas para este experimento fueron *Bifidobacterium lactis* BB12, *Bifidobacterium longum* LBUX23 y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCLA3.

El caldo de cultivo se preparó con medio MRS, suplementado con HCl-cisteína al 0.5% (MRS-C), en condiciones de anaerobiosis burbujando CO₂ durante 30 segundos en los medios de 20 mL, durante 1 minuto, en los medios de 80 mL y 3 minutos en los medios de 200 mL. Los frascos se sellaron herméticamente con tapones de hule y arillo de metal, posteriormente se esterizaron a una presión de 15 lb/in² por 15 minutos. Para el medio de cultivo sólido, se utilizó agar MRS suplementado con HCl-cisteína al 0.05%

Activación de microorganismos

Las cepas se encontraban liofilizadas con leche descremada al 20%. Para su recuperación se realizó una rehidratación de 1 g de liofilizado con 1 mL de caldo MRS-C, se homogenizó de manera vigorosa en vortex, posteriormente se inoculó en un vial de 20 mL con caldo MRS- C, y se incubó durante 24 horas a 37 °C con agitación orbital de 180 rpm. Los cultivos se observaron a microscopio previa tinción de Gram, para descartar contaminación.

Cinética de crecimiento bacteriano

Para la elaboración de la cinética de crecimiento de cada uno de los microorganismos activados, se inoculó un vial con 80 mL que contenía caldo MRS-C a una densidad óptica inicial (DO_i) de 0.5 y se incubaron a las condiciones anteriormente mencionadas. A partir del tiempo cero (t₀), se tomaron muestras de 1 mL cada 2 horas hasta llegar a la fase estacionaria.

Preparación de crioprotectores

Se emplearon 4 agentes crioprotectores: inulina, caseína, manitol y leche en polvo, los cuales se prepararon a las concentraciones indicadas en la tabla 1, además de que se integró un control negativo (sin crioprotector) que consistió en células resuspendidas en solución salina fisiológica (SSF).

Tabla 1. Crioprotectores utilizados para liofilizar *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacteriu. longum* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum*.

CRIOPROTECTOR	MARCA	CONCENTRACIÓN
Inulina	Orafti ® GR	10 % y 20%
Caseína	Nzmp TM	1 %
Manitol	Droguería Cosmopolitan	10 %
Leche	Alpura®	20 %

De cada crioprotector se prepararon 200 mL, para lo cual se pesó la cantidad respectiva de cada uno y se resuspendieron en H₂O destilada, posteriormente fueron esterilizados en autoclave a 15 lb/in² por 15 minutos.

Para el caso de la caseína, se implementó un protocolo para disolverla que consistió en una desnaturalización básica con NaOH al 0.1 M y posteriormente se neutralizó con HCl al 0.1 M, al finalizar con su preparación, se procedió a esterilizarlo bajo las mismas condiciones mencionadas (Post, 2011).

Preparación de muestras para liofilización

Para cada una de las cepas, se utilizaron cultivos de 200 mL dejando en tiempo previamente establecido con la cinética de crecimiento para conseguir la mayor cantidad de bacterias. Las células se recuperaron por centrifugación a 10,000 rpm por 10 minutos en una centrifuga del alto rendimiento Beckman Coulter Avanti J-301, posteriormente, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 25 mL de SSF (del cual se tomaron 5 mL para medir la viabilidad antes del proceso) y se colocó en un vial de 50 mL con 20 mL de crioprotector, los cuales consisten en inulina, caseína, manitol, leche descremada y SSF como control negativo (sin crioprotector). Una vez obtenidas cada una de las muestras, se llevaron a ultracongelación a -70 °C mínimo por 2 horas o hasta ser liofilizadas.

Se utilizó una liofilizadora marca Labconco modelo 775322. Las muestras se sacaron del ultracongelador una a la vez (para evitar la descongelación) y se colocaron en los frascos para

liofilizadora (Labconco) teniendo la precaución de que estas no se descongelen. El equipo se programó con condiciones estándar siguiendo las instrucciones del fabricante (ver ANEXO). Una vez liofilizadas las cepas, se midió la viabilidad por la técnica de cuenta viable por goteo.

Determinación de viabilidad por cuenta viable por goteo

Para cada uno de los liofilizados, se realizaron diluciones decimales seriadas en microtubos de 1.5 mL los cuales contenían las diluciones: (10^{-1}) , (10^{-2}) , (10^{-3}) , (10^{-4}) , (10^{-5}) , (10^{-6}) . Para lograr esto, se pesaron 0.03 g del liofilizado y se rehidrataron con 0.3 mL de SSF; se tomaron 100 μ L de éste y se colocaron en 900 μ L SSF (primera dilución), esto se realizó de manera consecutiva hasta llegar a la dilución 10^{-6} . Entre cada una de las diluciones, se mezcló perfectamente con vortex.

Se colocaron por triplicado 3 μ L de cada una de las diluciones en una caja Petri con agar MRS-C. Las cajas se rotularon con fecha y nombre y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en jarra de anaerobiosis la cual fue llenada con CO₂.

Se contó el número de colonias en las diluciones donde se desarrollaron entre 30 y 300 UFC y se procedió a realizar los cálculos para determinar la concentración de bacterias en los liofilizados, expresada en [UFC/g]. Para el caso de las muestras antes de liofilizar, en lugar de pesar 0.03 g, se tomaron 100 μ L de cada una de las suspensiones celulares.

Microscopio electrónico de barrido (MEB)

Las bacterias en cultivo y liofilizadas se observaron en un microscopio electrónico de barrido. Para la preparación de las muestras, se tomaron 5 mL del medio de cultivo y se recuperó el paquete celular mediante centrifugación a 10,000 rpm durante 5 minutos, se retiró sobrenadante, este paso se llevó a cabo 3 veces, sin embargo, se resuspendió el paquete celular con 1 mL de SSF, para la eliminación del medio. Una vez obtenido, se le colocaron 0.5 mL de glutaraldehído al 3%, se mezcló suavemente y se incubó durante 4 horas para fijar la muestra. Finalizado este paso, se centrifugó y se recuperó nuevamente el paquete celular, se realizaron 3 lavados con 1 mL de buffer de fosfatos pH 7.6, y posteriormente se realizaron lavados con etanol en diferentes grados (30%, 50%, 70% y 100%). Para terminar, se retiró el sobrenadante y se colocó la muestra en un termoblock a 36 °C hasta completa deshidratación.

Resultados

Morfología celular

Una vez preparados los medios y activado el microorganismo, se procedió a realizar una tinción Gram (Figura 1), de modo que se descarte posibles contaminaciones. Es indispensable destacar que en cada uno de los microorganismos se observó una morfología de bacilo, sin embargo, en el caso de *Bifidobacterium lactis* (Figura 1. A) se observaron la formación de cadenas cortas.

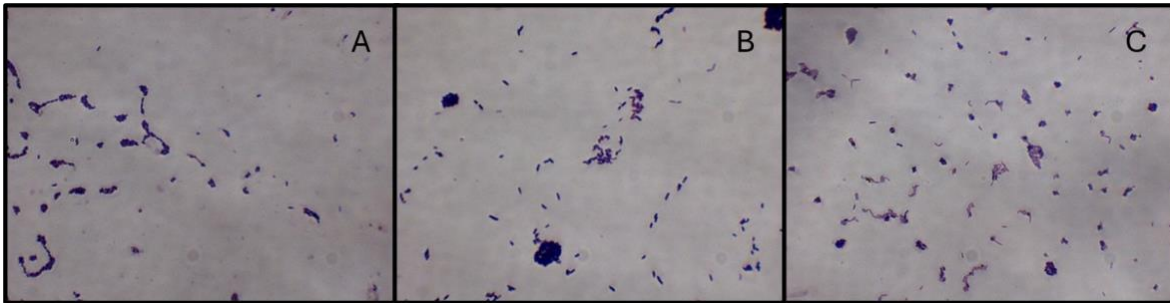


Figura 1. Tinción Gram realizada tras haber activado cada una de las cepas en medio MRS-C. A) *Bifidobacterium lactis*, B) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y C) *Bifidobacterium longum*

Curva de crecimiento (determinación de tiempo de crecimiento)

Una vez recuperadas cada una de las cepas, se procedió a realizar la cinética de crecimiento, los datos mostrados en las tablas 2, 3 y 4 son las absorbancias obtenidas a 600 nm ya considerado el factor de dilución.

Tabla 2. Absorbancias obtenidas a 600 nm de la cinética de crecimiento de *Bifidobacterium lactis* (el experimento se realizó por triplicado)

Tiempo (horas)	DO1	DO2	DO3	Promedio	Desviación estándar
0	0.504	0.46	0.433	0.466	0.029
2	0.596	0.586	0.54	0.574	0.024
4	1.024	0.998	0.946	0.989	0.032
5	1.29	1.34	1.15	1.260	0.080
6	1.548	1.44	1.484	1.491	0.044
7	1.568	1.59	1.65	1.603	0.035
8	2.897	2.964	2.9	2.920	0.031
9	3.49	3.51	3.516	3.505	0.011
21	4.18	4.28	4.25	4.237	0.042
22	4.809	5.2	5.98	5.330	0.487
23	4.869	5.526	5.22	5.205	0.268
24	4.995	4.995	5.391	5.127	0.187
25	4.95	5.643	5.76	5.451	0.357
26	4.833	5.67	5.661	5.388	0.392
27	4.797	5.616	5.706	5.373	0.409

Tabla 3. Absorbancias obtenidas a 600 nm del caldo MRS-C con *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (el experimento se realizó por triplicado)

Tiempo (horas)	DO1	DO2	DO3	Promedio	Desviación estándar
0	0.542	0.354	0.315	0.404	0.099
2	0.707	0.409	0.336	0.484	0.160
4	0.938	0.763	0.7	0.800	0.101
5	1.132	1.25	1.16	1.181	0.050
6	1.214	1.36	1.25	1.275	0.062
7	1.354	1.38	1.34	1.358	0.017
8	1.42	1.432	1.41	1.421	0.009
9	2.5	2.784	2.784	2.689	0.134
21	3.62	3.54	3.489	3.550	0.054
22	4.088	4.205	4.19	4.161	0.052
23	4.122	4.572	4.617	4.437	0.223
24	4.329	4.59	4.509	4.476	0.109
25	4.14	4.383	4.77	4.431	0.259
26	4.095	4.455	4.563	4.371	0.200
27	4.392	4.572	4.527	4.497	0.076

Tabla 4. Absorbancias obtenidas a 600 nm del caldo MRS-C con *Bifidobacterium longum* (el experimento se realizó por triplicado)

Tiempo (horas)	DO1	DO2	DO3	Promedio	Desviación estándar
0	0.415	0.396	0.402	0.404	0.008
2	0.42	0.394	0.405	0.406	0.011
4	0.514	0.61	0.628	0.584	0.050
5	0.684	0.789	0.765	0.746	0.045
6	0.883	0.925	0.944	0.917	0.025
7	0.936	0.98	0.936	0.951	0.021
8	1.23	1.172	1.21	1.204	0.024
9	2.31	2.322	2.292	2.308	0.012
21	4.67	4.54	4.67	4.627	0.061
22	4.963	4.56	4.68	4.734	0.169
23	5.544	5.778	5.238	5.520	0.221
24	5.823	5.193	5.265	5.427	0.282
25	6.111	5.805	5.796	5.904	0.146
26	5.832	5.733	5.742	5.769	0.045
27	5.247	5.544	5.562	5.451	0.144

Cada una de las cepas presentó un crecimiento exponencial aproximadamente entre las 6 y 20 horas después de haber inoculado a una densidad óptica inicial (DO_i) de 0.5, en donde, es importante mencionar que *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* alcanzaron una densidad óptica (DO) alrededor de 5 (Figura 5).

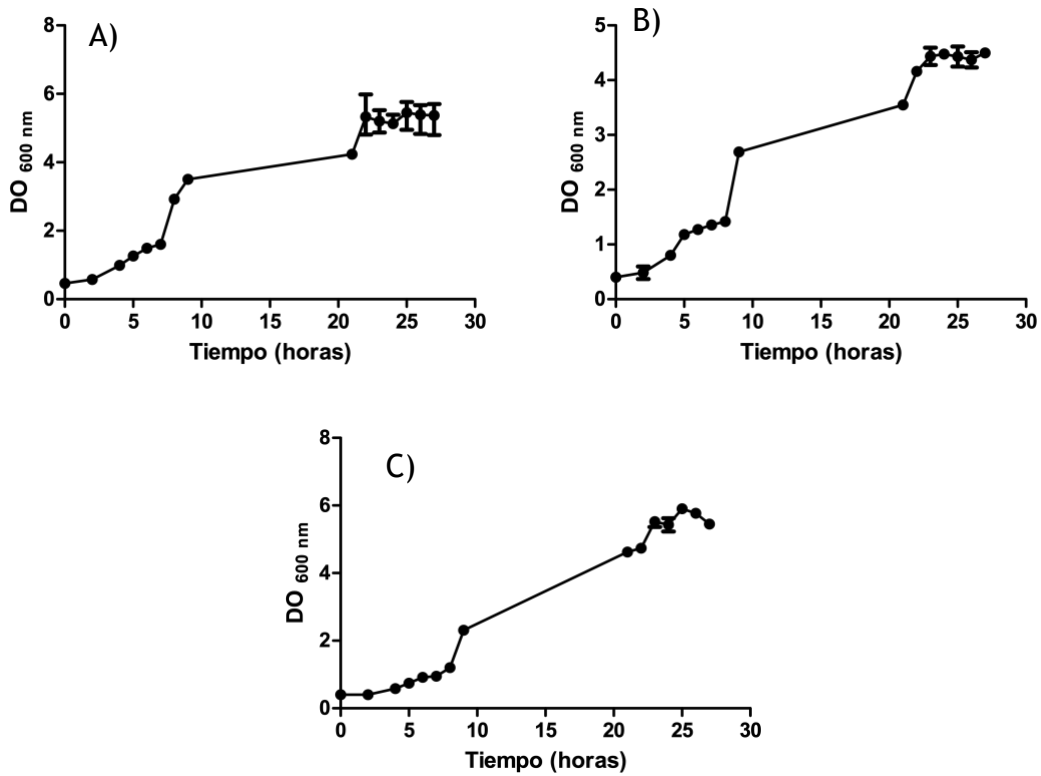


Figura 5. Cinética de crecimiento de A) *Bifidobacterium lactis* B) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y C) *Bifidobacterium longum* en caldo MRS-C. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Viabilidad de *Bifidobacterium lactis* BB12, *Bifidobacterium longum* LBUX23 y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCLA3 después del proceso de liofilización.

Una vez establecido el tiempo para obtener la máxima concentración de bacterias en el medio, se preparó un cultivo bajo las condiciones mencionadas, el paquete celular se resuspendió en cada uno de los crioprotectores como se indicó anteriormente.

La pérdida de viabilidad se determinó midiendo la viabilidad por cuenta viable en la suspensión con el crioprotector y después de liofilizar. La Figura 6 muestra un ejemplo de las colonias obtenidas en los triplicados plaqueados por cada dilución.

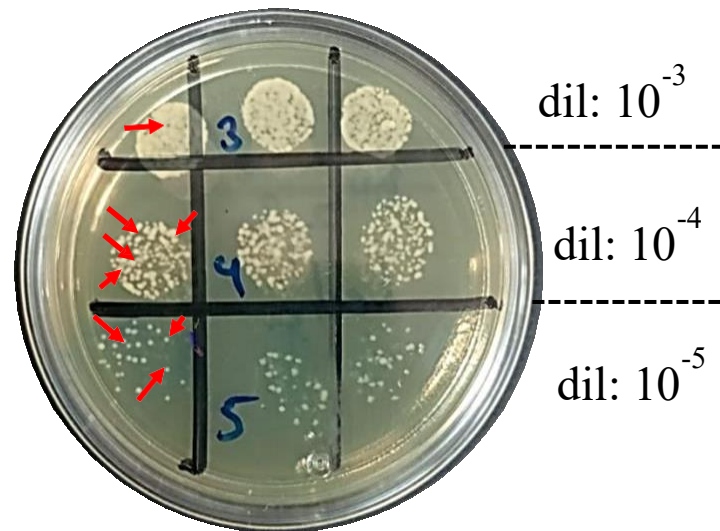


Figura 6. Imagen que explica la división de cada una de las cajas de Petri con agar MRS-C, para el experimento de cuenta viable, con respecto a plaqueado de cada una de las diluciones.

Viabilidad de *Bifidobacterium lactis* después de liofilizar

Es indispensable mencionar que hubo una disminución notoria en la viabilidad de las bacterias antes y después de liofilizar, ya que se perdieron 3 unidades logarítmicas en las muestras que fueron tratadas con inulina, caseína y leche, mientras que con manitol y el control negativo se perdieron 6 y 4, respectivamente (Figura 7). Los porcentajes de sobrevivencia para *B. lactis* fueron: 77%, 76%, 54%, 82%, 67% y 75% para inulina, caseína, manitol, leche, control negativo e inulina al 20% respectivamente.

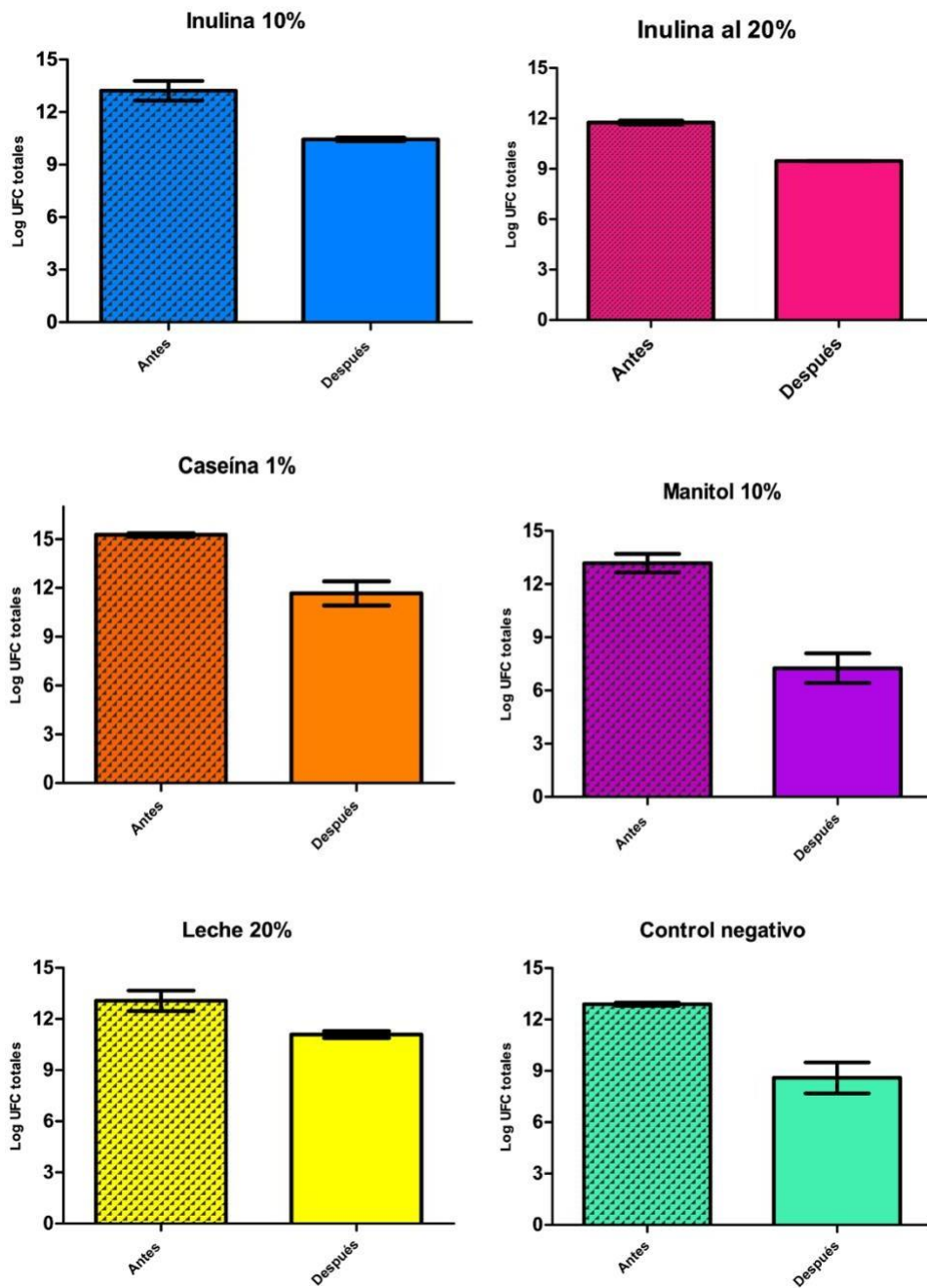


Figura 7. Graficas de comparación en la perdida de viabilidad para la cepa de *Bifidobacterium lactis* con cada uno de los crioprotectores (inulina al 10% y 20%, caseína 1%, manitol al 10% y leche al 20%)

Viabilidad de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* después de liofilizar

En el caso de *B. pseudocatenulatum*, la pérdida tras el proceso de liofilización fue de 3 unidades logarítmicas para todos los crioprotectores, excepto manitol el cual obtuvo una pérdida de 6 como lo podemos ver en la Figura 8. Los porcentajes de sobrevivencia fueron de: 81%, 78%, 57%, 80%, 80% y 78% para inulina, caseína, manitol, leche, control negativo e inulina al 20% respectivamente.

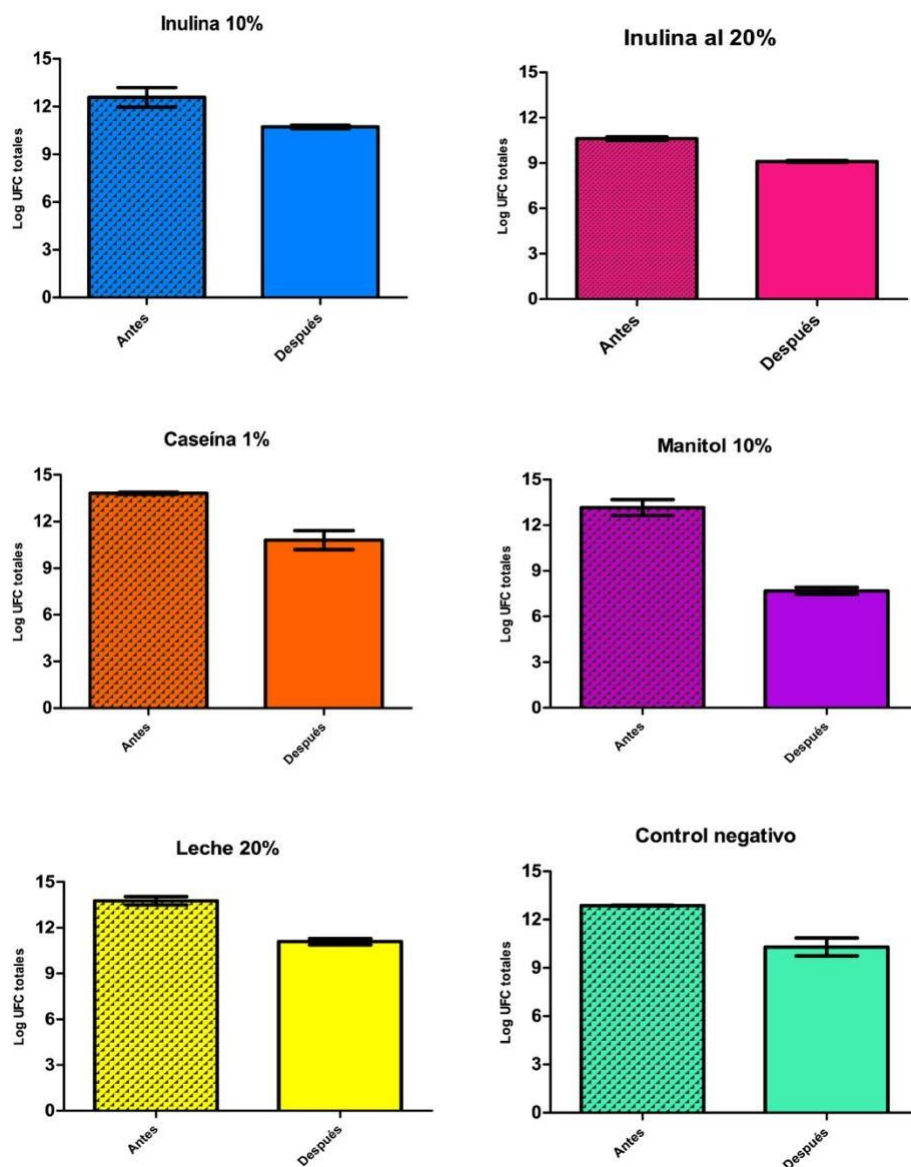


Figura 8. Graficas de comparación en la pérdida de viabilidad para la cepa de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* con cada uno de los crioprotectores (inulina al 10% y 20%, caseína 1%, manitol al 10% y leche al 20%)

Viabilidad de *Bifidobacterium longum* después de liofilizar

Al igual que ocurrió en los casos anteriores, *B. longum* tuvo en promedio la pérdida de 3 unidades logarítmicas para cada uno de los crioprotectores, excepto en manitol, en donde se perdieron 5 unidades logarítmicas (Figura 9). Los porcentajes de sobrevivencia después de liofilizar fueron: 82%, 79%, 62%, 76%, 80% y 81% de igual manera para inulina, caseína, manitol, leche, control negativo e inulina al 20% respectivamente.

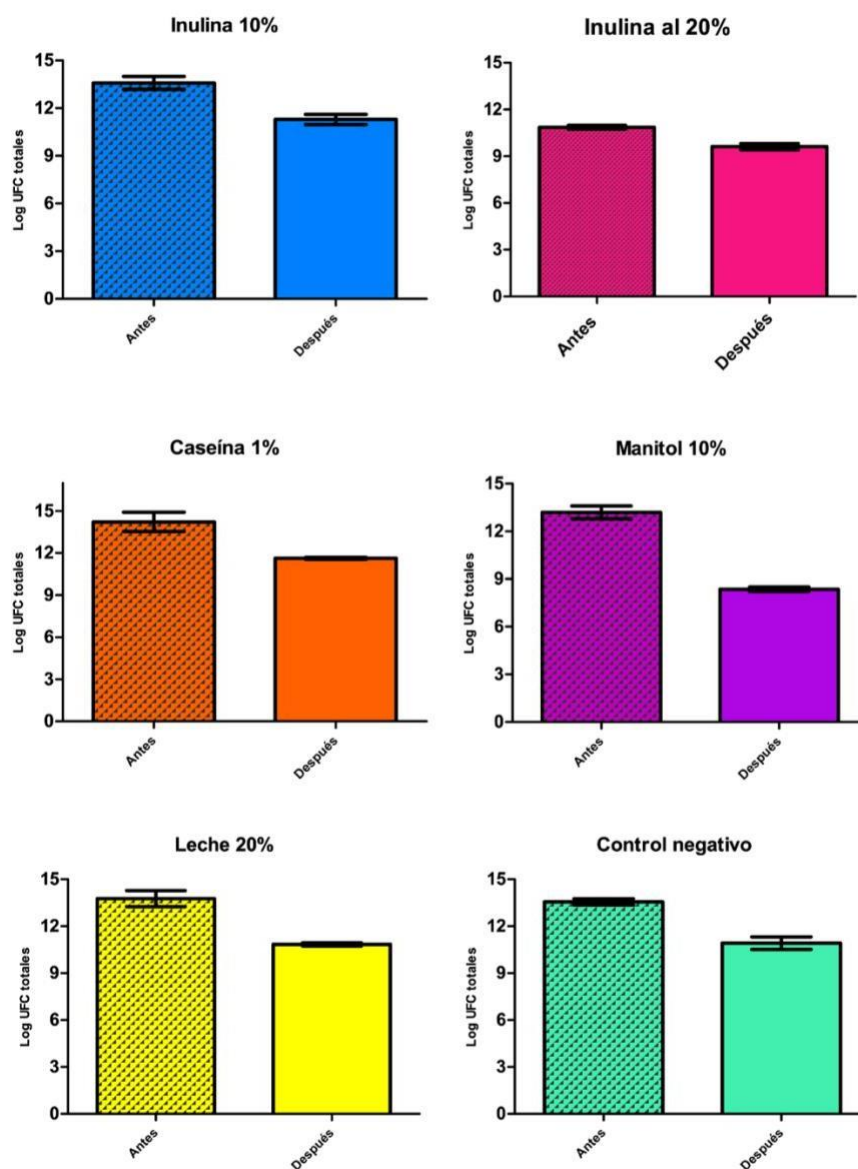


Figura 9. Graficas de comparación en la pérdida de viabilidad para la cepa de *Bifidobacterium longum* con cada uno de los crioprotectores (inulina al 10% y 20%, caseína 1%, manitol al 10% y leche al 20%)

La pérdida de viabilidad que se presentó para cada uno de los crioprotectores fue de 3 unidades logarítmicas (excepto manitol y el control negativo), lo cual indica que las sustancias utilizadas cumplen con su papel en la protección de la integridad de la membrana celular durante el proceso de congelación y liofilización, sin embargo, en el caso del control negativo, mostró que hay una pérdida comparable con las muestras que fueron tratadas con el crioprotector, y en el caso del manitol pese utilizarse como crioprotector, no mostró una protección importante de las células.

Observación morfológica en microscopio electrónico de barrido

La Figura 10 muestra la morfología celular de las cepas obtenidas directamente del cultivo en medio MRS-C. En donde, se pudo apreciar que en los tres casos se observa una morfología de bacilo, sin embargo, en el caso de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium longum* tienen una longitud mayor en comparación al de *Bifidobacterium lactis*. Se pudieron apreciar muy pocas bifurcaciones en la morfología celular, ya que éstas se presentan en función de las condiciones de cultivo y la etapa de crecimiento de las bifidobacterias.

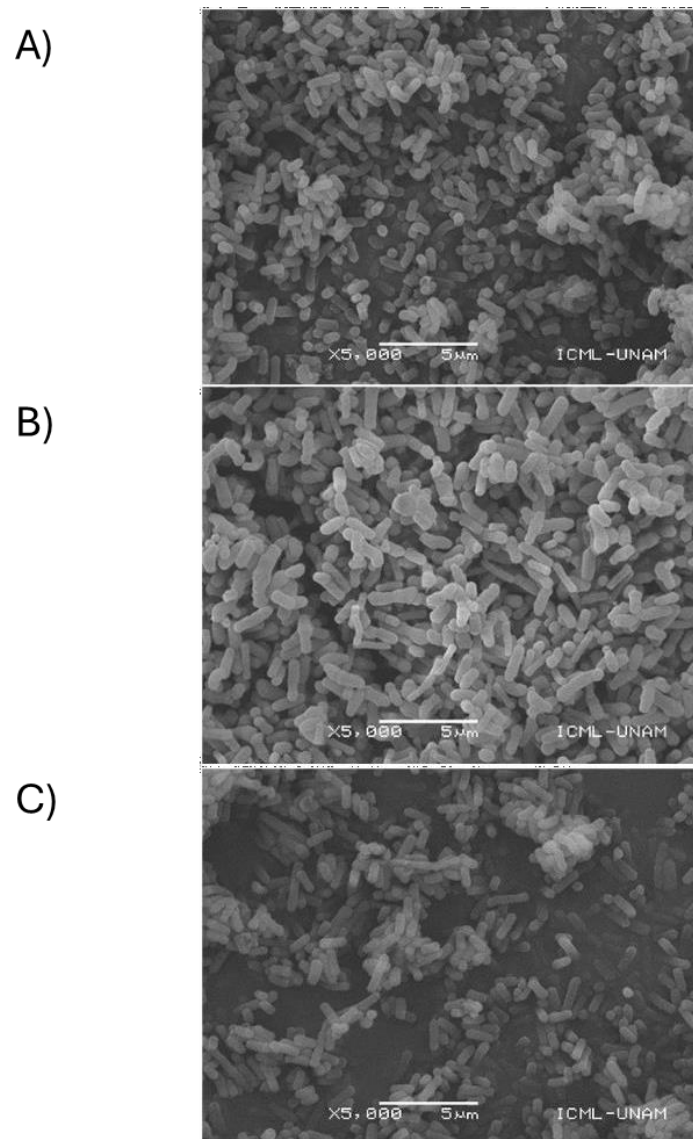


Figura 10. Imágenes de MEB de cada una de las cepas A) *Bifidobacterium lactis*, B) *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y C) *Bifidobacterium longum* en medio MRS-C. (5,000x)

Efecto del crioprotector en la preservación de la integridad celular

Las cepas liofilizadas se observaron en microscopio electrónico de barrido (MEB), con el fin de determinar si la pérdida de viabilidad se relaciona con el cambio en la integridad física de las células y poder correlacionar los cambios observados con el respectivo crioprotector. Se utilizaron los liofilizados representativos de donde se mantuvo mejor la viabilidad, y de donde se obtuvo una pérdida drástica de la viabilidad. Se eligieron los siguientes liofilizados de *Bifidobacterium pseudocatenulatum*: con leche al 20%, manitol al 10% y control negativo respectivamente.

Es importante mencionar que, al utilizar manitol, se obtuvieron porcentajes de sobrevivencia menores al 65% en las 3 cepas en comparación con los demás crioprotectores, probablemente esta caída de viabilidad se deba a la pérdida de la integridad de la membrana celular y esto se confirma con las imágenes obtenidas con MEB en la Figura 11.

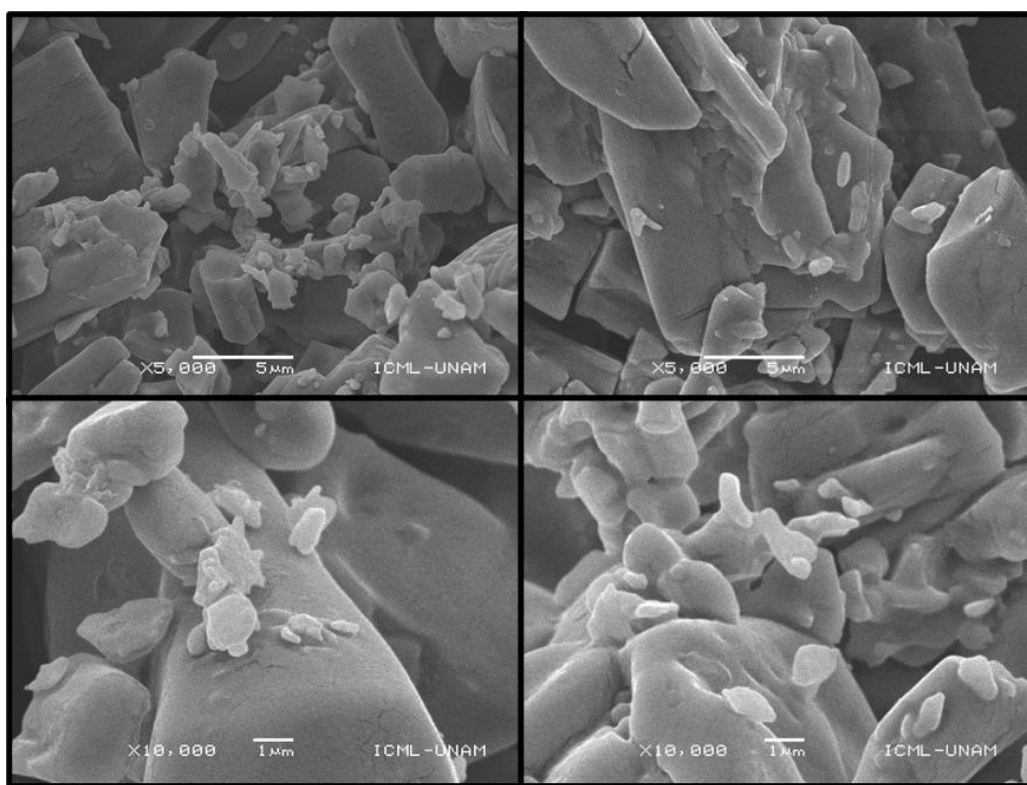


Figura 11. Imágenes de MEB, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* liofilizado con manitol (5,000 y 10,000x)

En el caso de la muestra marcada como control negativo (sin crioprotector), se obtuvieron porcentajes de recuperación del 80% para *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium longum*, mientras que para *Bifidobacterium lactis*, se obtuvo un porcentaje de 67%. Estos datos se corroboran al observar las imágenes del MEB, donde se puede notar mayor conservación de la integridad celular (Figura 12). Es importante destacar que se observan bacterias íntegras entre restos celulares que pudieron generarse durante el proceso de congelación, liofilización y de almacenamiento, esto se debe a la ausencia de un crioprotector que protegiera la integridad celular.

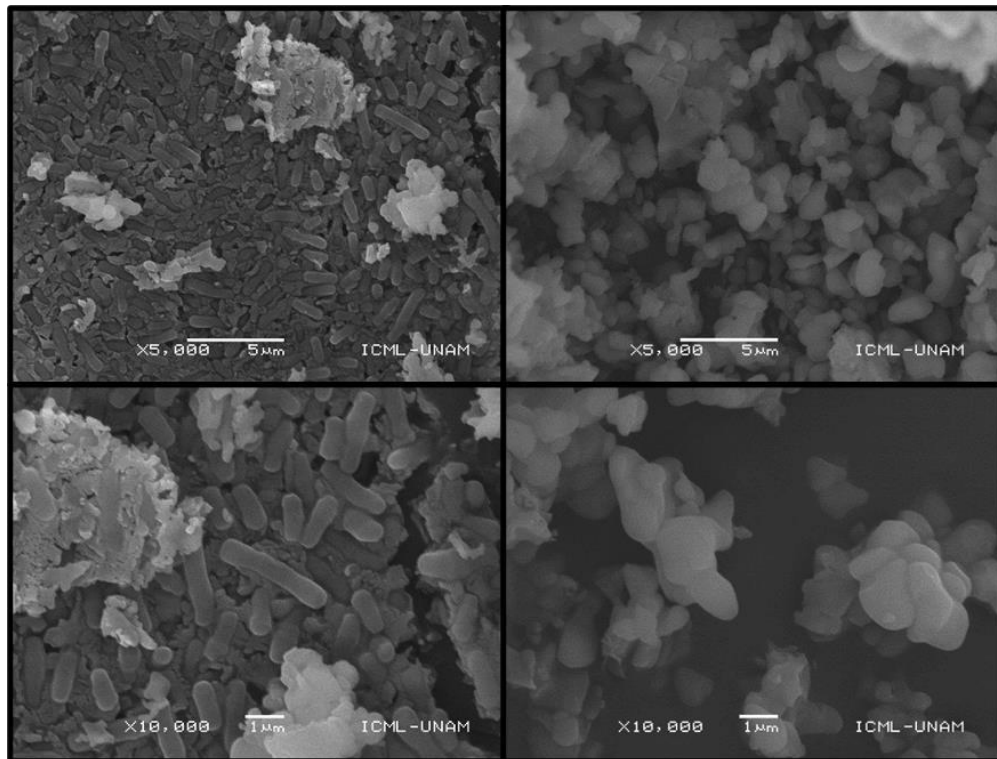


Figura 12. Imágenes de MEB, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* liofilizado sin crioprotector (control negativo) (5,000 y 10,000x)

Por otro lado, el liofilizado que obtuvo un mayor rendimiento de viabilidad fue el que contenía la leche, consiguiendo un rendimiento del 80% en cada una de las cepas, lo cual indica que, en comparación con el resto de crioprotectores, la integridad de la membrana celular es conservada en mejor medida, la confirmación de esto es mediante la visualización en MEB (Figura 13).

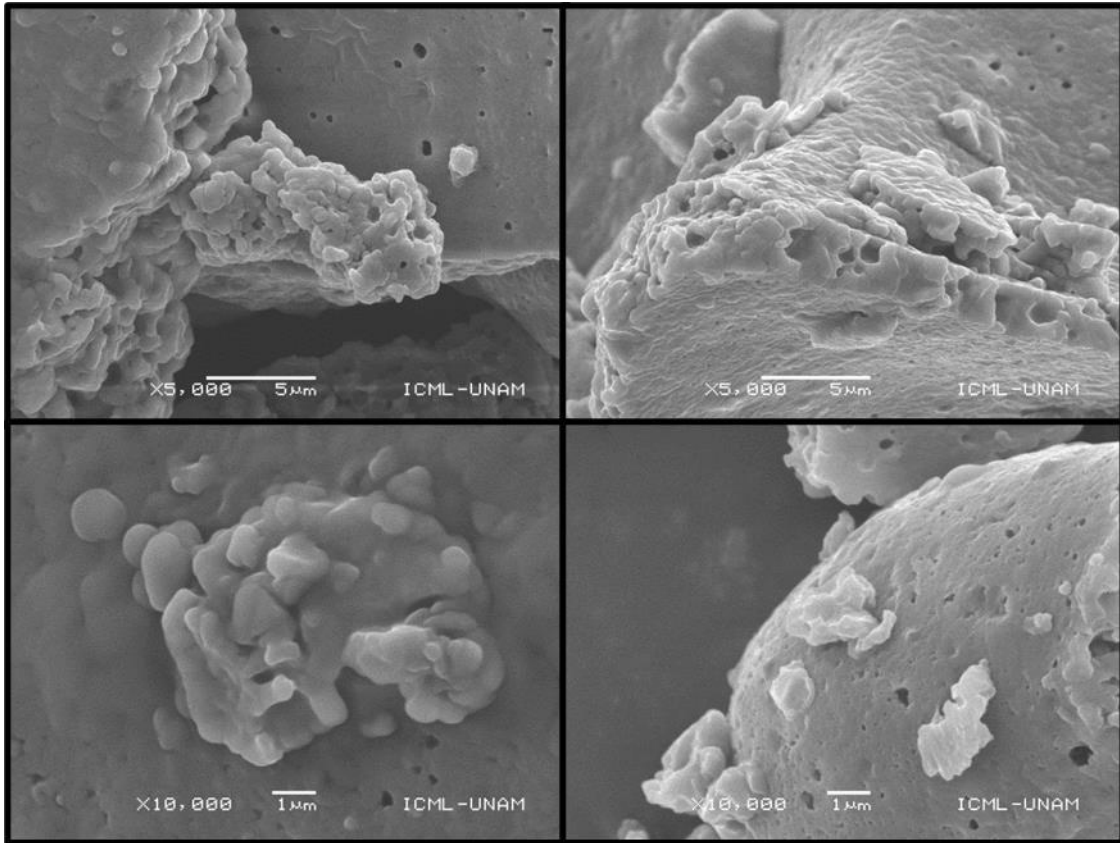


Figura 13. Imágenes de MEB, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* liofilizado con leche (5,000 y 10,000x)

Pese a no ser observada una cantidad apreciable de bacterias en los liofilizados con leche en polvo, la estructura microscópica nos muestra poros donde pudiesen estar embebidas y, por lo tanto, protegidas las bacterias, así mismo, se observa una especie de capa protectora sobre las bacterias.

Este efecto se obtuvo de igual medida con el uso de caseína al 1% e inulina al 10% y 20%, sin embargo, se obtuvo un menor porcentaje de viabilidad con estos crioprotectores.

Estabilidad de bacterias liofilizadas a través del tiempo

Una vez calculada la concentración de bacterias en cada uno de los liofilizados, estos valores se tomaron como tiempo cero (T_0), y a partir de ahí se estableció un periodo de 2 semanas para llevar a cabo la medición de la viabilidad para cada una de las muestras (el proceso se llevó a cabo por triplicado).

De esta manera, se observó que el uso de leche descremada como crioprotector, ha mostrado una mejor respuesta ya que hasta el momento, la viabilidad se ha mantenido constante a través del tiempo. Por el contrario, el manitol no sirvió para proteger a ninguna de las cepas durante el proceso de liofilización, ya que desde la semana 2 no había células viables (Figura 14).

Para *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, se observó que en inulina al 10%, la viabilidad fue disminuyendo lenta y gradualmente perdiendo aproximadamente 7 órdenes de magnitud en 24 semanas, en cambio, con inulina al 20% la viabilidad también fue disminuyendo lenta y gradualmente perdiendo aproximadamente únicamente 3 órdenes de magnitud en 22 semanas. Con esta cepa, se presentó mejor protección con inulina ya que, para *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium longum*, la viabilidad fue cayendo de forma más rápida hasta llegar a cero a las 16 y 18 semanas respectivamente. Con los demás crioprotectores, para las 3 cepas se observó una pérdida de viabilidad más marcada hasta llegar a 0 a partir de la semana 16 (Figura 14).

Cabe mencionar que no se analizó la viabilidad de las muestras más allá de las 2 semanas para el caso de los liofilizados con manitol, ya que éste se observó muy hidratado, además de mostrar un menor porcentaje de sobrevivencia después de ser liofilizado. Por otro lado, las concentraciones de inulina (10 y 20%) fueron establecidas de esta manera ya que el uso de un prebiótico ha mostrado que puede mejorar la proliferación de los microorganismos con efecto probiótico, aunado a esto, es importante tomar en cuenta que las concentraciones en las que usualmente es utilizado entre el 1% y 10%, de esta manera, se busca comprobar que, al aumentar su concentración, su efecto de preservación es de igual manera aumentado.

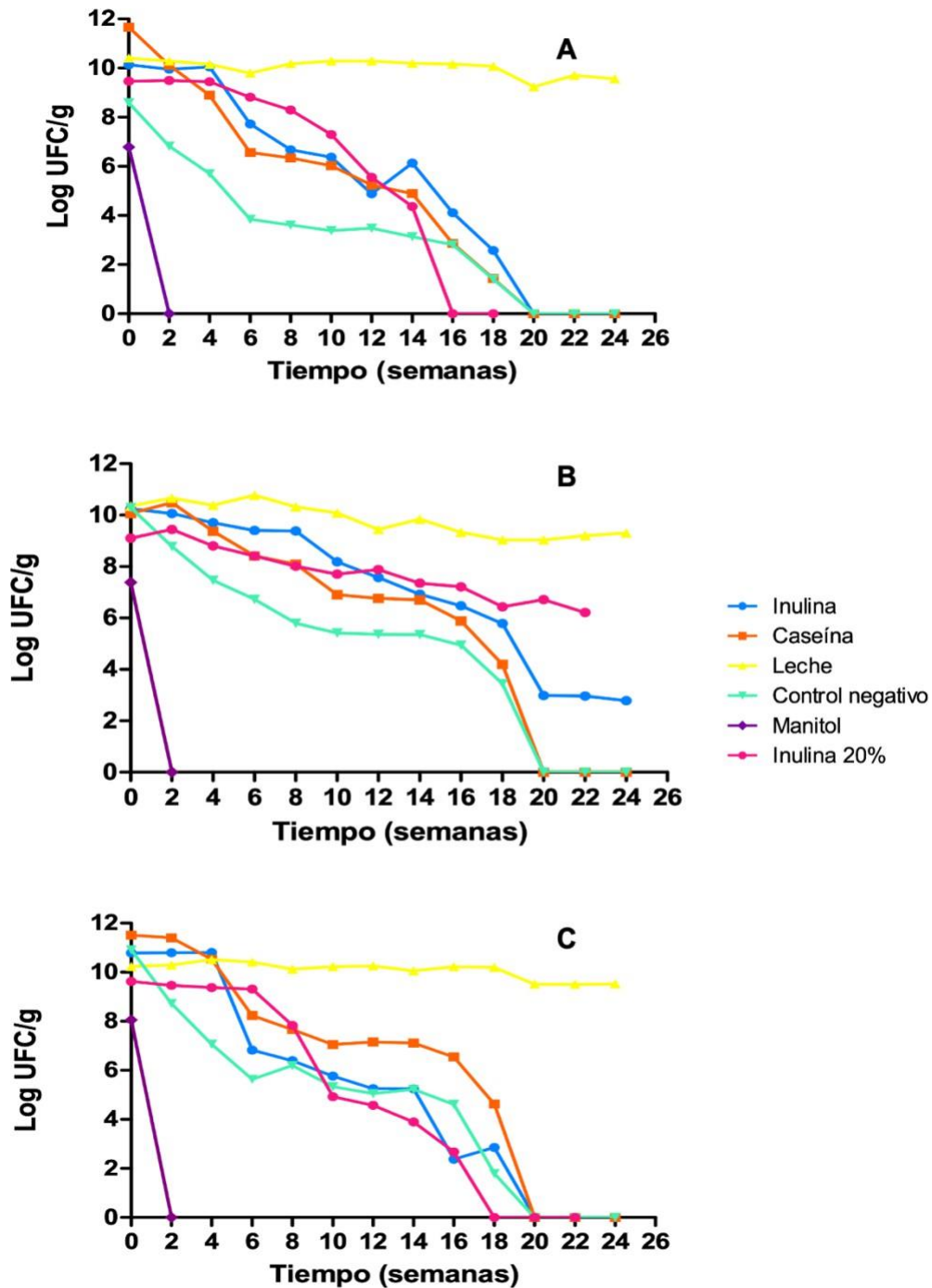


Figura 14. Monitoreo de la viabilidad de cada uno de los microorganismos con el tratamiento con cada uno de los crioprotectores (inulina 10% y 20%, caseína 1%, manitol 10%, leche descremada 20% y control negativo) en un lapso de 6 meses (las lecturas se realizaron por triplicado) para la A) *Bifidobacterium lactis*, B) *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, C) *Bifidobacterium longum*.

Efectos de los crioprotectores en la preservación de la viabilidad de los microorganismos

La temperatura, la exposición a gases reactivos presentes en la atmósfera (oxígeno, dióxido de carbono o humedad), son condiciones que juegan un papel importante en la viabilidad de las bacterias durante su almacenamiento, ya que la actividad bioquímica de las células puede restaurarse al ser expuestas a estos factores, lo cual puede ocasionar que se liberen metabolitos perjudiciales, ocasionando su muerte. Adicional a esto, la ausencia de un crioprotector contribuiría a una disminución de su viabilidad. (Escobar, 2015)

Este efecto se ve reflejado en las muestras de *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium longum* que fueron liofilizadas sin crioprotector (control negativo) ya que, al cabo de 12 semanas, el porcentaje de viabilidad perdido fue de 59%, 48% y 54%, respectivamente. Sin embargo, para las 24 semanas, se perdió el 100% de la viabilidad por parte de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium longum*, mientras que *Bifidobacterium lactis* conservó solo el 13% de su viabilidad. Por lo tanto, la ausencia de un crioprotector demuestra que es perjudicial para la conservación de integridad de la célula.

Por otra parte, con las muestras de *Bifidobacterium lactis* tratadas con los diferentes crioprotectores (inulina 10%, caseína 1%, leche 20% e inulina 20%) para las 12 semanas perdieron 52%, 55%, 1% y 41%, respectivamente. Mientras que a las 24 semanas únicamente en leche se perdió solo el 7% de viabilidad y en el resto de los crioprotectores se perdió el 100% de la viabilidad. Para *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, a las 12 semanas de almacenamiento, se obtuvo una pérdida de: 26%, 33%, 9% y 13%, mientras que, para las 24 semanas, el porcentaje perdido fue de: 66%, 85%, 11% y 44%. Y para el caso de *Bifidobacterium longum*, en las primeras 12 semanas, el porcentaje de pérdida en las muestras fue: 51%, 38%, 0% y 52.47%, sin embargo, para las 24 semanas se perdió el 100% de la viabilidad en los crioprotectores, exceptuando la muestra que fue tratada con leche, la disminución en unidades logarítmicas de cada uno de los crioprotectores en estos lapsos de tiempo está representada en la Figura 15.

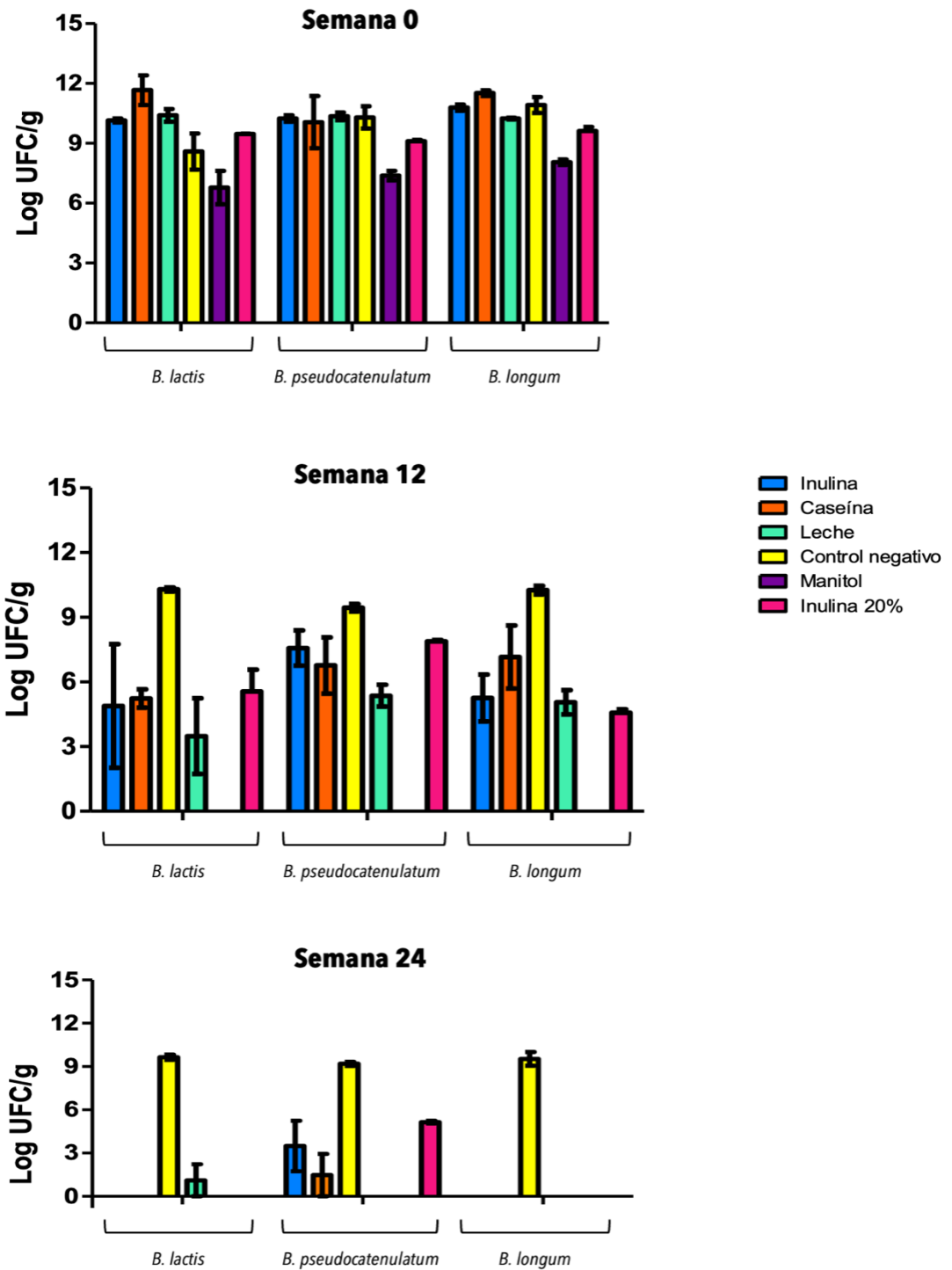


Figura 15. Viabilidad de *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium longum* a las 0, 12 y 24 semanas, liofilizadas con los diferentes crioprotectores.

Tratamiento con inulina al 10% y 20%

Al utilizar dos diferentes concentraciones de inulina (10 y 20%) como crioprotector, en *Bifidobacterium pseudocatenulatum* se observó mayor protección que en *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium longum*, ya que a las 24 semanas no se perdió la viabilidad por completo, sin embargo, en las otras cepas se observó una pérdida de viabilidad total a partir de la semana 16 (Figura 16).

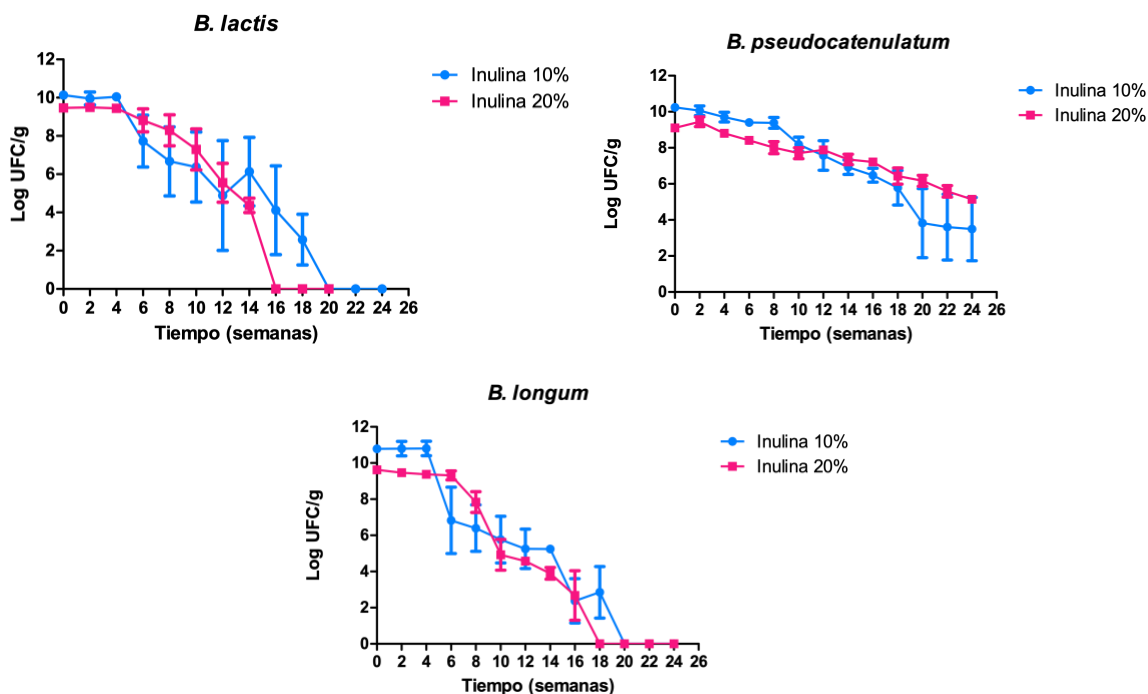


Figura 16. Monitoreo de viabilidad de *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium longum*, liofilizadas con inulina al 10% y 20%.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), para cada una de las cepas en los tiempos 0, 12 y 24 semanas (únicamente en las muestras que aun presentaron viabilidad) y con un nivel de significancia (α) de 0.05. Para el caso de *Bifidobacterium lactis*, en las lecturas de la semana 0, tenemos que el valor de p de 0.003, el cual es menor al α previamente establecido, por lo tanto, esto indica que no todas las medias son iguales, mientras que, para las 12 semanas, el valor de p que se obtuvo fue de 0.837 y al ser mayor al α , esto da a lugar a que se infiera que todas las medias son iguales. En las lecturas obtenidas de las muestras de *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, ocurre algo particular, ya que en las 0, 12 y 24 semanas, los valores de p obtenidos fueron de 0.164, 0.723 y 0.400, respectivamente. Estos al ser valores mayores al α , nos muestran que las medias de los tratamientos son iguales, por lo tanto, no hay diferencia significativa entre ellas. Por último, en los datos obtenidos

de las muestras con *Bifidobacterium longum* en la semana 0, el valor de p es de 0.010, que indica que las medias de los tratamientos son diferentes, por lo tanto, hay una diferencia significativa. Mientras que para la semana 12, el valor obtenido es de 0.568, en donde muestra que no hay diferencia significativa entre las medias.

Es importante destacar que *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium longum* en la semana 0 (después de liofilizar) con los tratamientos de inulina al 20% se observa que hay una disminución en la sobrevivencia obtenida en comparación con el tratamiento con inulina al 10%.

Discusión

El proceso de liofilización es perjudicial para la integridad de la membrana celular de las bacterias, lo podemos ver de manera importante en las imágenes de referencia (Figura 10) en el MEB, ya que se muestran bacilos, con una distribución uniforme y sin daños en su morfología, mientras que en las muestras sin crioprotector, se observa que hay una deformación en la estructura de la célula y su distribución no es uniforme (Figura 12) en comparación con las de referencia, este mismo efecto también es apreciado en las muestras que fueron tratadas con manitol al 10% (Figura 11). Por otro lado, para los tratamientos con leche al 20%, en las observaciones se puede apreciar que hay una mayor abundancia del crioprotector, sin embargo, esto indica que este presenta la característica de envolver el exterior de la célula, siendo un recubrimiento vítreo, que actúa eficazmente durante el proceso de liofilización, de esta manera, produciendo un bloqueo eficaz del contacto directo con el hielo (durante la congelación) y el oxígeno (tras el proceso de liofilización y durante el proceso de almacenamiento) (Escobar, 2015).

El porcentaje de sobrevivencia de cada una de las cepas con los diferentes tratamientos de manera inicial para cada una de las cepas fue arriba del 75%, excepto para el caso de las muestras tratadas con manitol al 10%, en donde los porcentajes fueron de: 54%, 57% y 62% para *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium longum*, respectivamente. Esta diferencia en los resultados obtenidos para este crioprotector lo reportan Sitong y colaboradores en 2024, en el cual se menciona que, al aumentar la concentración de este crioprotector, durante el proceso de congelación crean estructuras ordenadas que provocan daños en la integridad celular y con ello disminuyendo su viabilidad después de liofilizar, así mismo, se menciona que la concentración óptima es del 2%. Las muestras que fueron tratadas con leche al 20% obtuvieron un porcentaje de sobrevivencia del 80%, el cual fue uno de los más altos junto con la inulina al 10%, el uso de este crioprotector ha ganado interés, puesto que Cody, y colaboradores 2008 y Wong y

colaboradores, 2010 mencionaron que el uso de este ha superado la conservación a largo plazo a los métodos tradicionales, ya que mantiene su integridad, sin sufrir cambios importantes en sus características morfológicas y fisiológicas.

Durante el monitoreo a largo plazo de cada una de las cepas tratadas con los diferentes crioprotectores, podemos apreciar que, en las 12 semanas de haber sido liofilizadas, la mayor parte de estas perdieron el 50% de su viabilidad (excepto los tratamientos con leche), y para las 24 semanas las muestras con viabilidad apenas apreciable son: el control negativo de *Bifidobacterium lactis*, inulina al 10% y 20% al igual que caseína al 1% de *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, sin embargo, los tratamientos con leche al 20% solo perdieron el 7%, 11% y 5% de su viabilidad inicial con *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium longum*, respectivamente. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Oluwatoyin y colaboradores, en 2022, en donde se mantuvo viabilidad inicial durante tres meses sin diferencias significativas. Por otro lado, también se menciona que los tratamientos con azúcares perdieron de manera gradual su viabilidad. Este efecto probablemente es atribuible a su higroscopicidad del compuesto utilizado como crioprotector, ya que afecta en la integridad celular durante su almacenamiento (Escobar, 2015).

Por otro lado, los tratamientos de inulina al 10% y 20% para cada una de las cepas, se obtuvieron dos valores de p importantes, los cuales son de la semana 0 en el caso de *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium longum*, en donde se mostró que hay una diferencia significativa entre cada uno de los tratamientos, en el cual, las muestras que fueron tratadas con inulina al 20%, obtuvieron menores unidades logarítmicas en comparación con inulina al 10% de manera inicial (después de ser liofilizados), no obstante, el valor de p para la semana 12 mostró que no había diferencia significativa, lo cual indica que al aumentar la concentración de este crioprotector, solo se aumenta la capa vítrea que protege a la célula bacteria por un mayor tiempo que esta referido en el trabajo de Escobar en 2015, sin embargo, como se había mencionado anteriormente, el mantenimiento de la viabilidad estará dado por la higroscopicidad del crioprotector.

Conclusión

Si bien los tratamientos desarrollados con inulina al 10% y 20%, caseína al 1%, manitol al 10% y leche al 20%, mostraron un papel importante en la protección de *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* y *Bifidobacterium longum* durante el proceso de liofilización. El nivel y el tipo de protección dependieron del crioprotector utilizado. Entre los que obtuvieron un mayor porcentaje sobrevivencia después de la liofilización para cada una de las cepas son: caseína para el caso de *Bifidobacterium lactis* y *Bifidobacterium longum*, mientras que para *Bifidobacterium pseudocatenulatum* fue la leche. Sin embargo, el único crioprotector que obtuvo el menor porcentaje de pérdida en su viabilidad durante las 24 semanas es la leche, al haber perdido menos del 12% para cada una de las cepas. Seguido de este fue inulina con ambas concentraciones, únicamente en el caso de *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. Esto nos indica que la conservación de la integridad de la membrana celular durante el proceso de congelación y su almacenamiento estará dada por el grado de higroscopicidad del crioprotector, como se ha mencionado anteriormente.

En conclusión, se cumplieron cada uno de los objetivos establecidos, en donde se llevó a cabo las mezclas de las cepas con los diferentes crioprotectores con sus respectivas concentraciones para su posterior liofilización, así mismo, se llevó el monitoreo de la viabilidad de los liofilizados de manera periódica mediante la técnica de cuenta viable y con ello se realizó una comparación entre cada uno de los crioprotectores y de esta manera se determinó que el crioprotector que tuvo las mejores características de preservación para las tres cepas es la leche al 20% gracias a que conserva la viabilidad de célula, a temperatura ambiente y manteniéndola en condiciones óptimas, para que puedan ser administradas en nuestro grupo de investigación. Ya que, al ser bacterias con efecto probiótico, la concentración óptima para que presenten su efecto benéfico en la salud es >100 millones de UFC/g y con ello, puedan llegar al tracto digestivo, colonizar y con ello conseguir su respectivo efecto.

Bibliografía

- Anderson, R. (1996) 'Algae'. En: Hunter-Cevera, J.C. y Belt, A. (eds.) '*Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*'. San Diego: Academic Press, pp. 29-64.
- Arcos, M., Ossa, F. y Díaz, T. (2004) 'Crioprotectores de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*'. *Revista Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 5, pp. 60-63.
- Ávila, P., Madero, I., León, F., Acosta, L., Gomez, C., Delgado, G., Comez, C., Lozano, M. y Reguero, T. (2006) 'Fundamentos de criopreservación'. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), pp. 291-300.
- Bejarano, F., Erazo, E., Luegas, Y. y Alvarez, A. (2017) 'Estudio del efecto de un agente crioprotector en la liofilización de una emulsión directa O/W'. Departamento de Ingeniería Química, Universidad de los Andes.
- Cody, L., Wilson, W., Hendrixson, R., McIver, S., Hagman, E., Nickerson, A. y Schurr, J. (2008) 'Skim milk enhances the preservation of thawed $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bacterial stocks'. *Journal of Microbiological Methods*, 75, pp. 135-138.
- Collado, A. (2004) 'Caracterización de cepas del género *Bifidobacterium* con carácter probiótico'. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Biotecnología.
- Escobar, E. (2015) 'Evaluación de dos crioprotectores sobre la viabilidad y actividad de una bacteria ruminal celulolítica conservada por liofilización'. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas.
- Fuentes, P., Carrillo, I., Gijon, A. y Macias, P. (2018) 'Aplicación de la liofilización en la conservación de microemulsiones usadas en alimentos funcionales y nutracéuticos: en caso de la ingeniería en alimentos'. *Tlatemoani*, (29), pp. 290-310.
- Hubalek, Z. (2003) 'Protectants used in the cryopreservation of microorganisms'. *Cryobiology*, 46, pp. 205-229.
- Iñiguez, P. y Acedo, F. (2006) 'Mecanismos de adhesión al tracto intestinal y antagonismo de *Bifidobacterium*'. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 7(2), pp. 1-10.
- Kharchenko, N., Cherdycev, T. y Netrusov, A. (2017) 'Development of lyophilization procedure ensuring survival of bifidobacteria and preservation of their probiotic potential upon long-term storage'. *Mikrobiologiya*, 86(2), pp. 225-230.
- Miyamoto, Y., Nozawa, F., Sukenobe, J. y Imaizumi, T. (2010) 'Survival of yeasts stored after freezer-drying or liquid-drying'. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 56(2), pp. 107-119.
- Morgan, C., Herman, N., White, P. y Vesey, G. (2006) 'Preservation of microorganisms'. *Journal of Microbiological Methods*, (7), pp. 183-193.

- Oluwatoyin, O., Leng, T. y Faga, E. (2021) 'Sucrose, maltodextrin and inulin efficacy as cryoprotectant, preservative and prebiotic – towards a freeze dried *Lactobacillus plantarum* topical probiotic'. *Biotechnology Reports*, (33), pp. 1-8.
- Oliveira, G. y Gonzalez, M. (2016) 'Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica'. *Endocrinología y Nutrición*, 63(9), pp. 482-494.
- Russell, D., Ross, R. y Fitzgerald, G. (2011) 'Metabolic activities and potential of bifidobacteria'. *International Journal of Food Microbiology*, 149, pp. 88-105.
- Santelices, S. y Castro, F. (2020) 'Conformación de colecciones de cultivos microbianos'. Boletín INIA N° 428. Chillán, Chile: Instituto de Investigaciones Agropecuarias.
- Sitong, G., Jiarun, H., Qiaoyu, S., Zhongdu, Y., Qingqing, Z., Ping, L. y Qing, G. (2024) 'Optimization of cryoprotectants for improving the freeze-dried survival rate of potential probiotic *Lactococcus lactis* ZFM559 and evaluation of its storage stability'. *LWT - Food Science and Technology*, 198, pp. 1-8.
- Wong, S., Mohammed, K., Mustafa, S., Mohamad, R., Meor, H. y Yazid, M. (2010) 'Viability of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 after spray-drying and freeze-drying'. *Microbiology Insights*, 3, pp. 37-43.
- WGO (World Gastroenterology Organisation) (2011) *Practice Guideline: Probiotics and prebiotics*. Disponible en: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/probiotics-and-prebiotics> (Accedido: 15 Febrero 2025).
- Zamora, R. (2003) *Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero*. Universidad de Girona.
- Post, E., Arnold, B., Weiss, J. y Hinrichs, J. (2011) 'Effect of temperature and pH on the solubility of caseins: Environmental influences on the dissociation of α - and β -caseins'. *Journal of Dairy Science*, 95, pp. 1603-1616.
- Cui, S., Hu, M., Sun, Y., Mao, B., Zhang, Q., Zhao, J., Tang, X. y Zhang, H. (2022) 'Effect of Trehalose and Lactose Treatments on the Freeze-Drying Resistance of Lactic Acid Bacteria in High-Density Culture'. *Microorganisms*, 11(1), pp. 48.
- Pajuelo, D., Carpio M., Maraza G., Chachaque D. y Cáceda J. (2023) 'Effect of lyoprotective agents on the preservation of survival of a *Bacillus cereus* strain PBG in the freeze-drying process'. *Microorganisms*, 11(11), pp. 2705.

Anexo

Instrucciones de uso para liofilizadora Labconco modelo 775322

Encendido y preparación del equipo:

- Destapar la manguera del depósito de drenado para retirar el agua.
- Colocar los respectivos empaques (serpentin de refrigeración y cubeta superior), del mismo modo, asegurarse que las válvulas de la cubeta estén cerradas. Es importante tomar en cuenta que cada uno de los empaques debe de tener grasa de silicón.
- Para asegurar la cubeta media, se debe de colocar la rondana metálica que atraviesa el conducto de vacío, finalmente colocar su tapa.
- Encender el interruptor de la caja de la corriente trifásica y verificar que el equipo esté conectado al enchufe de esta
- Prender el equipo con el apagador que está colocado en la parte superior delantera del lado izquierdo.
- Enseguida presionar “MENU” y posteriormente “AUTO” y dejar que el equipo genere el vacío durante 30 minutos, el equipo esta calibrado para que la temperatura descienda hasta $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el vacío a valores menores de 0.200 mBar
-

Introducción de muestras:

El material (material a liofilizar) previamente debe de estar congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o en REVCO (solo si la muestra lo requiere)

- Los frascos de la liofilizadora son de 600 mL, adicionalmente también cuentan con tapa de goma y adaptador, entre estos dos se debe colocar un filtro, el cual se encuentra en la gaveta.
- Las muestras por liofilizar deben de ser retiradas del congelador una a una y ser colocadas dentro del frasco (en caso de ser viales y tengan tapón de hule deben de ser retirados) evitando que se descongelen. Tapar los frascos con sus respectivas tapas con el adaptador previamente preparados.
- Enchufe el adaptador en la boquilla de hule y gire la válvula 180° para generar el vacío en el frasco.
- Dejar las muestras se liofilicen el tiempo necesario, hasta que estén completamente secas.
-

Proceso de apagado:

- Gire nuevamente las válvulas para cerrar el vacío dentro de los frascos para retirar las muestras
- Al terminar, presionar nuevamente el botón de “AUTO” para restaurar la temperatura y presión del equipo (este proceso toma aproximadamente 2 horas)
- En caso de haber hielo condensado en el serpentin, presionar el botón de “DEFROST” hasta su eliminación. Se debe de considerar que el equipo no debe de sobrepasar los $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Apaga el equipo del interruptor que se encuentra en la parte frontal superior izquierda, y apaga la caja de corriente eléctrica.
- Finalmente, retira restos de las muestras liofilizadas de los frascos (en caso de que hayan salido del vial), retirar el agua del depósito, seca perfectamente el serpentin y retira cada una de las piezas del equipo (tapas y cubeta superior) y colócalas nuevamente dentro de la gaveta.