



División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

**Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de
microorganismos probióticos**

Departamento de Sistemas Biológicos (DSB) Edificio N-104

Presenta: Noemi Jimena Cruz Flores

2193029124

Asesores:

Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinoza

Dra. Martha Adriana Leyte Lugo

ÍNDICE

I. Resumen	3
II. Abstracta	3
III. Introducción	4
IV. Planteamiento del problema y justificación	5
V. Objetivo general:	6
VI. Objetivos específicos:	6
VII. Marco teórico	6
Probióticos	6
Fermentaciones ácido lácticas	7
Descripción y condiciones de cultivo para bacterias ácido lácticas	7
Medios de cultivo para el crecimiento de bacterias ácido lácticas	8
VIII. Materiales y métodos	9
a) Reactivación de cepas	9
b) Caracterización morfológica de microorganismos probióticos	10
c) Crecimiento de microorganismos probióticos con diferentes fuentes de carbono (glucosa, lactosa, inulina y sacarosa)	10
IX Resultados y discusión	11
a) Reactivación de cepas	11
a) Caracterización morfológica de microorganismos probióticos	13
b) Crecimiento de microorganismos probióticos con diferentes fuentes de carbono (glucosa, lactosa, inulina y sacarosa)	13
X. Conclusión	22
XI. Referencias	23

Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento de microorganismos probióticos

I. Resumen

Los microorganismos probióticos, especialmente los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, desempeñan un papel fundamental en la promoción de la salud humana y ofrecen una serie de beneficios funcionales. Su eficacia está estrechamente relacionada con su capacidad para proliferar y mantenerse activos en el tracto digestivo. A pesar de los avances significativos en el campo de la biotecnología, la optimización del crecimiento de estas cepas probióticas sigue siendo un desafío técnico, especialmente en lo que respecta a la selección adecuada de fuentes de carbono en los medios de cultivo. En este estudio, se evaluó el crecimiento utilizando diferentes fuentes de carbono, como glucosa, lactosa, inulina y sacarosa. El análisis cuantitativo mediante espectrofotometría reveló variaciones significativas en la biomasa entre las diferentes fuentes de carbono, destacando la lactosa y la sacarosa como promotores del crecimiento bacteriano.

Palabras clave: probióticos, crecimiento, fuente de carbono.

II. Abstract

Probiotic microorganisms, particularly the *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera, play a fundamental role in promoting human health and offer a range of functional benefits. Their effectiveness is closely linked to their ability to proliferate and remain active in the digestive tract. Despite significant advances in the field of biotechnology, optimizing the growth of these probiotic strains remains a technical challenge, especially regarding the proper selection of carbon sources in culture media. In this study, growth was evaluated using different carbon sources, such as glucose, lactose, inulin, and sucrose. Quantitative analysis using spectrophotometry revealed significant variations in biomass among the different carbon sources, highlighting lactose and sucrose as promoters of bacterial growth.

Keywords: probiotics, growth, carbon source.

III. Introducción

En la era actual de la biotecnología y la salud, la investigación en microorganismos probióticos ha emergido como un campo de profundo interés científico y aplicado. Estos microorganismos, que abarcan una diversidad de cepas, han capturado la atención debido a su potencial para fomentar la salud humana y desencadenar una serie de beneficios funcionales. Dentro de esta categoría, los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han surgido como protagonistas clave, demostrando capacidades probióticas notables que impactan positivamente en el bienestar intestinal y la respuesta inmunológica (Bernal *et al.*, 2017).

Los *Lactobacillus* son un grupo de bacterias Gram positivas, no formadoras de esporas, con forma de bastón, de la familia Lactobacillaceae. Se caracterizan por su capacidad de producir ácido láctico como subproducto del metabolismo de diversas fuentes de carbono (Dempsey & Corr, 2022). Para lograr el aislamiento eficaz de las cepas de *Lactobacillus*, es esencial emplear medios de cultivo selectivos, tales como el medio Mano, Rogosa y Sharpe (MRS) o medios diseñados específicamente para su crecimiento, como el medio Trypticase, Peptona, Levadura y Glucosa Yeast Glucose (trypticase peptone yeast-extract glucose por sus siglas en inglés, TPYG) (Azaola *et al.*, 1999). Estas bacterias exhiben un óptimo crecimiento en un rango de temperatura que oscila entre los 35 - 37°C y pueden desarrollarse en condiciones anaerobias facultativas (Dempsey & Corr, 2022).

Bifidobacterium es un género de bacterias anaerobias facultativas que pertenecen a la familia Bifidobacteriaceae. Estos microorganismos, de naturaleza Gram positiva, exhiben una morfología distintiva en forma de bacilo ramificado o bifurcado, de donde proviene su denominación. Son reconocidas por su habilidad para fermentar carbohidratos no digeribles en el colon lo que conlleva a la generación de ácidos grasos de cadena corta y otros metabolitos que ejercen efectos beneficiosos en el organismo. Utilizan una gran variedad de carbohidratos como fuente de carbono, algunos como lactosa, sacarosa, glucosa, galactosa y fructosa son utilizados por prácticamente todas las especies de *Bifidobacterium* (González-Vázquez *et al.*, 2022).

Sin embargo, para aprovechar al máximo su potencial, es esencial entender cómo optimizar sus condiciones de cultivo, y un factor clave en este proceso es la fuente de carbono utilizada en los medios de cultivo.

La disponibilidad y la naturaleza de las fuentes de carbono influyen directamente en el crecimiento, la reproducción y las actividades metabólicas de los microorganismos. Al proporcionar la energía necesaria para los procesos celulares, las fuentes de carbono son un factor determinante en el éxito de los cultivos microbianos. En este contexto, el objetivo principal de este estudio es evaluar el crecimiento de microorganismos probióticos en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono.

La presente investigación se sustenta en una revisión exhaustiva de la literatura científica, centrándose en artículos de divulgación especializados, con el fin de analizar y definir las características fundamentales de cuatro cepas probióticas de interés: *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum*. Esta fase de revisión bibliográfica proporciona una base sólida para comprender a fondo estas cepas, lo que resulta esencial para la etapa experimental en la cual, se llevarán a cabo fermentaciones controladas utilizando cada una de las cepas mencionadas y se evaluará el crecimiento en diferentes fuentes de carbono.

IV. Planteamiento del problema y justificación

Los microorganismos probióticos, particularmente de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, son fundamentales para la salud gastrointestinal humana, y su eficacia está vinculada a su capacidad de proliferar y permanecer activos en el tracto digestivo. A pesar de los avances significativos en el campo de la biotecnología, la optimización del crecimiento de estas cepas probióticas sigue siendo un desafío técnico, particularmente en la selección de fuentes de carbono adecuadas en los medios de cultivo. El problema radica en determinar qué fuentes de carbono optimizan el crecimiento de las cepas probióticas seleccionadas, lo cual es esencial para su aplicación efectiva en productos destinados a la salud humana.

Esta investigación es esencial para mejorar los procesos de cultivo de cepas probióticas ya que maximizan su viabilidad y funcionalidad. Al comprender y optimizar el uso de diferentes carbohidratos, incluidos lactosa, glucosa, sacarosa e inulina, podemos incrementar la eficacia

de los productos probióticos. El conocimiento generado podría llevar a la innovación en el proceso de producción y en el diseño de medios de cultivo especializados que mejoren la estabilidad de los probióticos durante el almacenamiento y la distribución. Por lo tanto, el impacto de este estudio trasciende en el ámbito científico, contribuyendo al desarrollo de productos probióticos más eficientes, con un beneficio directo para la salud intestinal y al bienestar general.

V. Objetivo general:

Evaluar el crecimiento de *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono: lactosa, glucosa, sacarosa e inulina.

VI. Objetivos específicos:

1. Reactivar los microorganismos probióticos
2. Caracterizar morfológicamente los microorganismos probióticos por medio de una tinción Gram.
3. Analizar el efecto de lactosa, glucosa, sacarosa e inulina sobre el crecimiento de *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum*.

VII. Marco teórico

Probióticos

El término probiótico se utilizó por primera vez en la década de 1950, es bien conocido que la interacción de estos microorganismos con la humanidad data desde los principios de la historia y hace aproximadamente unos 10,000 años, en el periodo neolítico, el consumo de probióticos se volvió algo habitual, durante esta época el ser humano comenzó a producir y conservar alimentos debido a que era muy frecuente la descomposición de estos (Cobarrubias, 2020). En este contexto se descubre, quizá por casualidad el proceso de fermentación, el cual jugó un papel crucial debido a que alteraba sabor, textura, así mismo mejoraba la conservación de los alimentos (Caplice & Fitzgerald, 1999). Con el tiempo, se fue perfeccionando el arte de la fermentación, reconociendo el papel vital de factores como la temperatura y el oxígeno en su proceso (Zhang Q *et al.*, 2020).

En línea con este histórico entendimiento de los beneficios de los microorganismos, en 2002 la Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) denominan probióticos a los “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio de salud al hospedero”. De acuerdo con la comunidad científica el valor para poder conferir un beneficio a la salud del hospedero debe ser de 10^6 UFC/ mL. Conforme a la definición, muchas especies contienen cepas que pueden ser consideradas portadoras de características probióticas. La gran mayoría de las especies propuestas como probióticos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) siendo especialmente importante los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Roobab *et al.*, 2020).

Fermentaciones ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se distinguen por ser cocos o bacilos Gram positivos, inmóviles y no esporulados, con una amplia gama de aplicaciones industriales y alimentarias donde la fermentación desempeña un papel crucial. Estos microorganismos metabolizan una diversidad de fuentes de carbono, mostrando preferencia por azúcares simples como la glucosa, fructosa, galactosa y el disacárido lactosa (Taye *et al.*, 2021). A través de procesos fermentativos eficaces, las BAL transforman dichos azúcares en ácidos orgánicos, predominando la producción de ácido láctico, que es el resultado de una oxidación parcial de los átomos de carbono del azúcar, donde simultáneamente se reduce un compuesto orgánico generado en el proceso. Este mecanismo de conversión, heredado del catabolismo del sustrato por las enzimas del microorganismo, reduce el pH del entorno, lo que contribuye significativamente a la supresión del crecimiento de agentes patógenos (Guadarrama-Ortíz *et al.*, 2018). Además de los ácidos orgánicos como el acético, propiónico y fenilacético, ciertas cepas de BAL son capaces de sintetizar bacteriocinas, las cuales poseen propiedades antimicrobianas que les permiten combatir a microorganismos rivales, incrementando así su utilidad en distintos sectores (Zhang *et al.*, 2020).

Descripción y condiciones de cultivo para bacterias ácido lácticas

Las condiciones de cultivo para las BAL son cruciales para su crecimiento y producción de metabolitos. Se prefiere un entorno ligeramente ácido y temperaturas que oscilan entre 30 y 40 °C. La oxigenación también es importante; aunque muchas BAL son anaeróbicas

facultativas o aerotolerantes, la presencia o ausencia de oxígeno puede influir significativamente en su metabolismo y en los perfiles de fermentación (Morocho y Leiva-Mora, 2019). Algunas cepas tienen requerimientos más específicos tal es el caso de los *Lactobacillus* que al ser aerotolerantes pueden desarrollarse en ambientes con 5-10 % de CO₂ y su temperatura óptima es de 35 – 37 °C, además requieren de 2 a 3 días para su reproducción, pueden reproducirse tanto en ambientes líquidos como en sólidos, la coloración de sus colonias es de color blanco, con una forma circular, bordes lisos y regulares, su tamaño oscila entre 1 y 5 µm, el pH ideal es de 5.4 – 5.5, y todas estas características se pueden observar en medios de cultivo sólidos (Sin *et al.*, 2017).

Por otra parte, las cepas del género *Bifidobacterium* son de morfología variada, presentan células en forma de bacilos: cortos, ramificados en Y, bifurcados, aislados o dispuestos en V, de ahí el nombre. Otras de sus características es que son microorganismos Gram positivos anaerobios estrictos y pocas especies pueden tolerar el oxígeno (Dhanashree *et al.*, 2017). La temperatura óptima de crecimiento para las bifidobacterias de origen humano es a 37°C, el pH ideal es de 6.5 a 7, y se reproducen en 2 días en ambientes tanto líquidos como sólidos. La coloración de las bacterias es de color blanco, con forma circular, bordes ondulados y el diámetro de las colonias oscila entre 1 a 6 µm, y estas características se pueden observar en medios de cultivo sólidos (Ruiz *et al.*, 2011).

Medios de cultivo para el crecimiento de bacterias ácido lácticas

Los medios de cultivo están formulados para proporcionar no solo la fuente de carbono adecuada sino también, nitrógeno, vitaminas y minerales esenciales para el crecimiento de las BAL. Investigaciones recientes se centran en la optimización de medios de cultivo para satisfacer las necesidades nutricionales requeridas para el crecimiento de bacterias. Este enfoque implica un ajuste en parámetros de crecimiento, tales como la fuente de carbono, el equilibrio del pH, y la duración del tiempo de incubación, entre otros (Dang *et al.*, 2021).

El medio MRS es el más común para el cultivo de *Lactobacillus* debido a su composición rica que favorece un crecimiento rápido y prolífico. Contiene peptona, extracto de carne y levadura, que proporcionan nitrógeno, vitaminas y factores de crecimiento (Taye *et al.*, 2021).

El medio TPYG se considera un medio nutritivo con ricos depósitos de aminoácidos, carbohidratos, con la adición de factores estimuladores del crecimiento como la L-cisteína y el sulfato ferroso. El medio TPYG es ampliamente utilizado para el crecimiento de bacterias ácido-lácticas, en particular para aquellos géneros que requieren un ambiente nutritivamente enriquecido para su proliferación, como las bifidobacterias, ya que se consideran microorganismos exigentes. Este medio de cultivo se puede utilizar tanto para cultivos de laboratorio como para la producción a gran escala ya que, al estar formulado con materiales económicos, puede ser rentable y factible durante la fabricación. Además, al igual que otros medios de cultivos especializados, el TPY puede ser modificado o suplementado con otras fuentes de carbono (Dang *et al.*, 2021).

VIII. Materiales y métodos

Este estudio se caracterizó por ser una investigación de tipo cualitativo y experimental, dedicada a la medición precisa y sistemática de variables clave asociadas con el crecimiento y desarrollo de los microorganismos probióticos *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum*. Las siguientes actividades se llevaron a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana:

a) Reactivación de cepas

Las cepas *L. acidophilus* y *L. reuteri* se reactivaron a partir de viales de 1mL que se encontraban congelados. Este proceso se inició descongelando los viales a temperatura ambiente dentro de una campana de seguridad biológica para mantener las condiciones estériles. Una vez descongelados, se preparó agar MRS según las especificaciones de la etiqueta, disolviendo la cantidad indicada en 100 ml de agua destilada y esterilizando la mezcla en el autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Con el agar esterilizado, se procedió a verter 10 mL en cajas de Petri y se inocularon con 3 µL del cultivo original mediante la técnica de estriado. Las placas se incubaron a 37 °C en una cámara con atmósfera anaerobia durante 24 horas.

Para *B. animalis* y *B. pseudocatenulatum* se preparó medio sólido TPYG compuesto de (g/L): peptona caseína 10; peptona fitona (de soya) 5; extracto de levadura 2.5; fuente de carbono (glucosa) 5; cisteína HCl 0.5; K₂HPO₄ 2; MgCl₂·H₂O 0.5; ZnSO₄·H₂O 0.25; CaCl₂ 0.15;

FeCl₃ 0.03; 1 mL de Tween 80 y agar bacteriológico al 15%. Se inocularon las placas de Petri con 3 µL del cultivo original y se incubaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, extendiendo el periodo a 48 horas para las *Bifidobacterium* debido a sus requerimientos específicos de crecimiento.

b) Caracterización morfológica de microorganismos probióticos

En este proceso de caracterización morfológica de los microorganismos probióticos, se llevó a cabo la tinción de Gram. Inicialmente, se prepararon frotis en portaobjetos de vidrio utilizando cultivos previamente reactivados. Los frotis se fijaron térmicamente para preservar la integridad de las muestras.

El procedimiento de tinción se efectuó de la siguiente manera: se aplicó cristal violeta al frotis durante un minuto para impregnar las células con el colorante primario. Posteriormente, se añadió yodo durante un minuto, actuando como mordiente para fijar el colorante. Para la decoloración, se utilizó una solución de acetona-agua durante cinco segundos, seguido por la aplicación de safranina durante cuarenta segundos como colorante de contraste. Después de cada paso, se procedió a un lavado cuidadoso con agua para eliminar los excesos de solución.

Una vez finalizado el proceso de tinción, los frotis se examinaron bajo un microscopio óptico. Se utilizó aceite de inmersión con el objetivo de 100x.

c) Crecimiento de microorganismos probióticos con diferentes fuentes de carbono (glucosa, lactosa, inulina y sacarosa).

Se inocularon cepas probióticas utilizando medio de cultivo TPYG líquido. Los medios de cultivo se depositaron en viales cerrados con tapa de caucho, sellos de aluminio y conteniendo una atmósfera de CO₂. Se inocularon muestras de bifidobacterias y lactobacilos previamente aislados y fueron depositados en los viales previamente descritos. A este primer paso se le denominó cultivo (overnight) debido a que se incubó durante toda la noche en una cámara de crecimiento rotatoria a 37°C y 150 rpm. Posteriormente se prepararon 4 viales de medio líquido de TPY con las diferentes fuentes de carbono (glucosa como control, lactosa, inulina y sacarosa) para cada una de las bacterias, a estos se les denominó viales de fermentación los cuales también tenían las mismas condiciones que el vial overnight.

Del vial se tomó una alícuota con la cantidad necesaria para inocular viales de fermentación que al inicio tuvieran una densidad óptica (OD_{600nm}) de 0.2. El proceso de fermentación se mantuvo por 48 horas a 37°C en una incubadora rotatoria a 150 rpm. Se tomaron muestras de 2 mL a partir del tiempo cero y posteriormente cada dos horas. Cada muestra se centrifugó a 11500 rpm durante 3 min. El sobrenadante se usó para medir el pH. Se enjuagó con agua las células suspendidas dos veces y posteriormente se midió la absorbancia con un espectrofotómetro a 600nm. Los datos obtenidos de las lecturas fueron extrapolados utilizando curvas estándar de peso seco vs. absorbancia de microorganismos del mismo género previamente elaboradas.

IX Resultados y discusión

La estrategia metodológica experimental implementada facilitó un análisis detallado de la respuesta en el crecimiento de estos probióticos ante variadas condiciones de cultivo, especialmente en las fuentes de carbono utilizadas (lactosa, glucosa, sacarosa e inulina). La aplicación de técnicas cuantitativas, como la espectrofotometría, fue esencial para la recopilación de datos numéricos confiables que resultaron cruciales para dilucidar las dinámicas de crecimiento de las cepas en estudio. Además, la tinción Gram se usó como un método eficaz para la identificación morfológica de las bacterias, de manera rápida y efectiva. Los métodos empleados en esta investigación aseguraron la cuantificación y el análisis estadístico de los datos recabados, brindando así resultados confiables y reproducibles.

a) Reactivación de cepas

Durante la reactivación de cepas en medio sólido MRS, las colonias de *L. acidophilus*, tras 24 horas de incubación, se presentaron como circulares e irregulares, con una apariencia translúcida y consistencia rígida, a diferencia de las colonias de *L. reuteri* presentaron una apariencia circular regular con un color blanco brillante y aspecto cremoso (Figura 1). Al realizar la resiembra, las colonias de *L. acidophilus* presentaron dificultad para la inoculación en un nuevo medio debido a su consistencia mientras que las colonias de *L. reuteri* se desprendieron con facilidad utilizando un asa estéril.

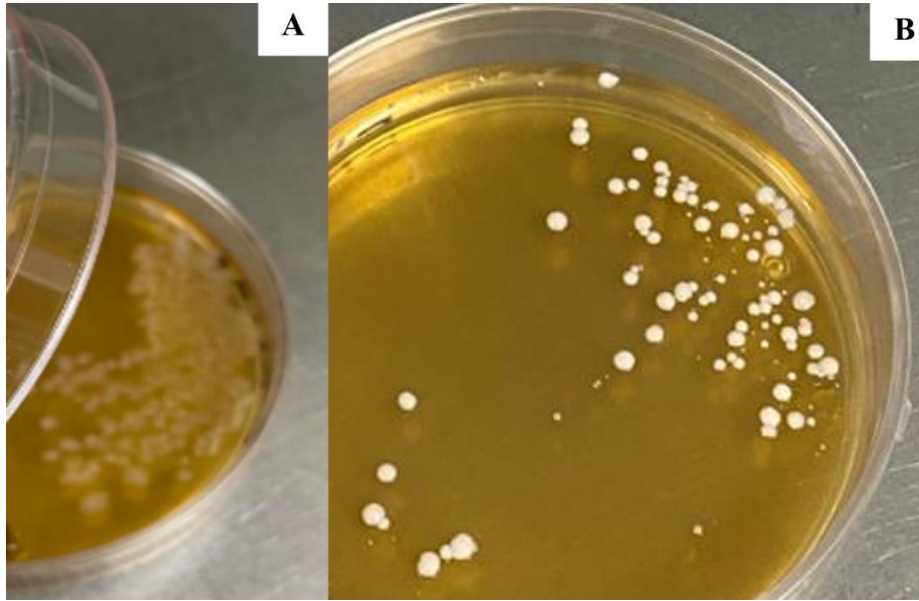


Figura 1. A: *L. acidophilus* y B: *L. reuteri* ambos en medio MRS.

Por otra parte, después de 48 horas de incubación las colonias de *Bifidobacterium* presentaron forma circular, con bordes ondulados, las colonias de *B. animalis* tenían un color blanco más intenso a comparación de *B. pseudocatenulatum* las cuales se veían un poco opacas (Figura 2). Al realizar la resiembra, las colonias se desprendieron con facilidad utilizando un asa estéril.

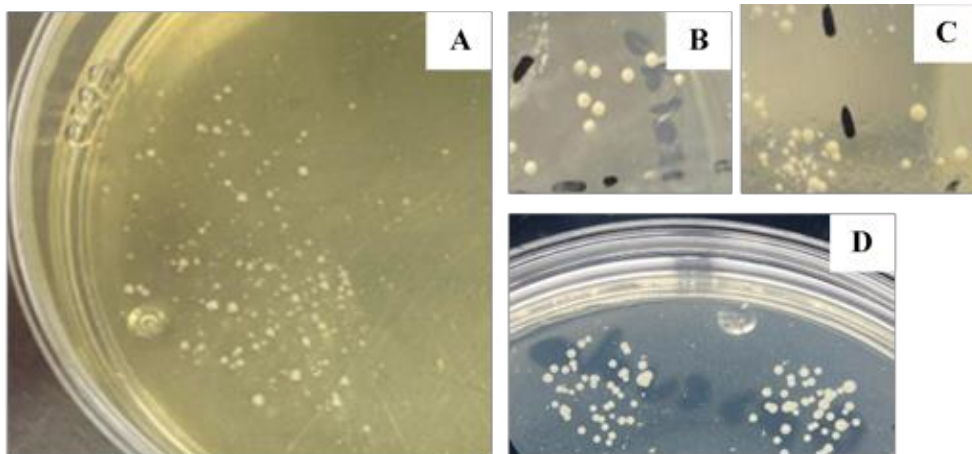


Figura 2. A y D: *B. pseudocatenulatum*, B y C: *B. animalis*.

a) Caracterización morfológica de microorganismos probióticos

A las colonias de bacterias obtenidas en el medio sólido MRS se les realizó una tinción Gram para determinar y comprobar bajo el microscopio que las bacterias eran Gram positivas, con forma de bacilos como se muestra en la Figura 3.

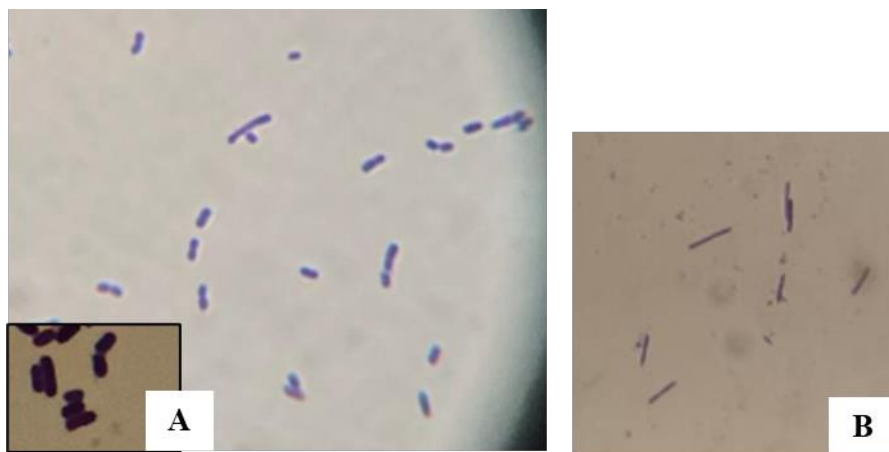


Figura 3. Microfotografías de estructuras bacilares Gram positivas, observadas en el microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión A: *L. reuteri* y B: *L. acidophilus*.

De las colonias inoculadas en el medio sólido de TPYG también se les realizó tinción Gram para observar en el microscopio la forma bifurcada, característica principal de las *Bifidobacterium* y determinar que eran Gram positivas.

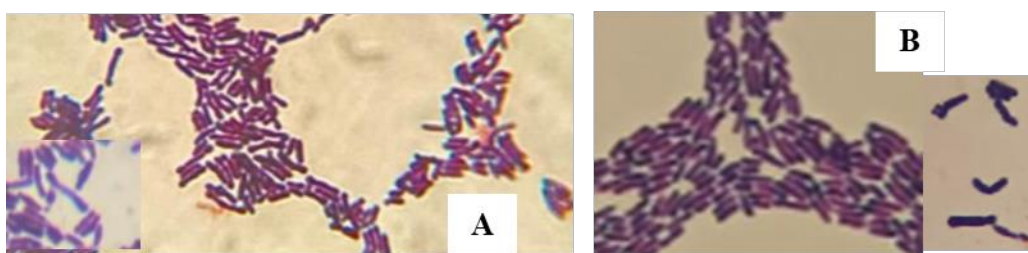


Figura 4. Microfotografías de estructuras bifurcadas Gram positivas, observadas en el microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión A: *B. pseudocatenulatum*, y B: *B. animalis*

b) Crecimiento de microorganismos probióticos con diferentes fuentes de carbono (glucosa, lactosa, inulina y sacarosa).

Las fermentaciones se realizaron con la finalidad de analizar y determinar cuál es la mejor fuente de carbono (glucosa, lactosa, inulina y sacarosa) y se calculó la tasa de crecimiento específica para cada uno de los microorganismos probióticos, a continuación se presentan

los gráficos correspondientes obtenidos de los datos recabados de las absorbancias medidas a una DO_{600} de cada una de las muestras tomadas cada 2 horas durante 48 horas para cada microorganismo:

L. acidophilus

En la Figura 5 se puede observar las fases de crecimiento que llevó a cabo *L. acidophilus* en medio TPY con glucosa, lactosa, inulina y sacarosa como fuente de carbono. Inicialmente se observa el ligero aumento en el peso seco (Figura 5) y la disminución del pH (Figura 6), lo indica el inicio de la fase lag, donde las bacterias se adaptan al medio, con glucosa e inulina la fase exponencial empieza a las 6 horas tal como describe James *et al.*, (2017) mientras que el pH disminuye debido a la producción de ácidos. A las 22 horas aproximadamente inicia la fase estacionaria por lo que ambas curvas se estabilizan lo que implica un equilibrio entre el crecimiento bacteriano y las limitaciones del medio. Cuando la bacteria utiliza lactosa hay una fase exponencial de crecimiento activo lo que genera mayor aumento de peso seco (Figura 5) y con sacarosa hubo una mayor disminución de pH. Con ninguna fuente de carbono se observa una fase de declinación evidente, esta normalmente seguiría a la fase estacionaria, caracterizada por una reducción en el peso seco y posibles cambios en el pH por la lisis celular. Con esto se pudo determinar que la lactosa es la mejor fuente de carbono para la bacteria.

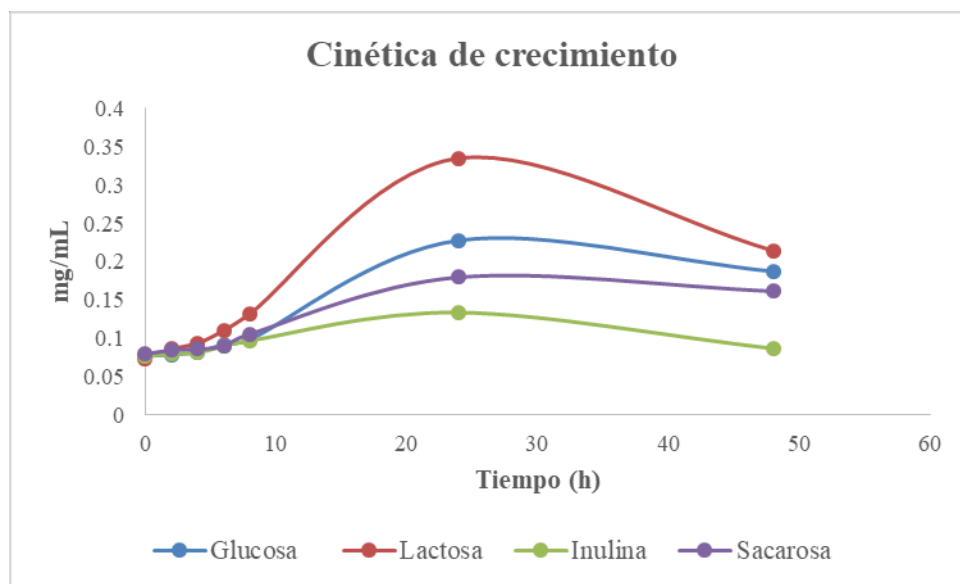


Figura 5. Cinética de crecimiento de *L. acidophilus* en medio líquido TPY con diferentes fuentes de carbono.

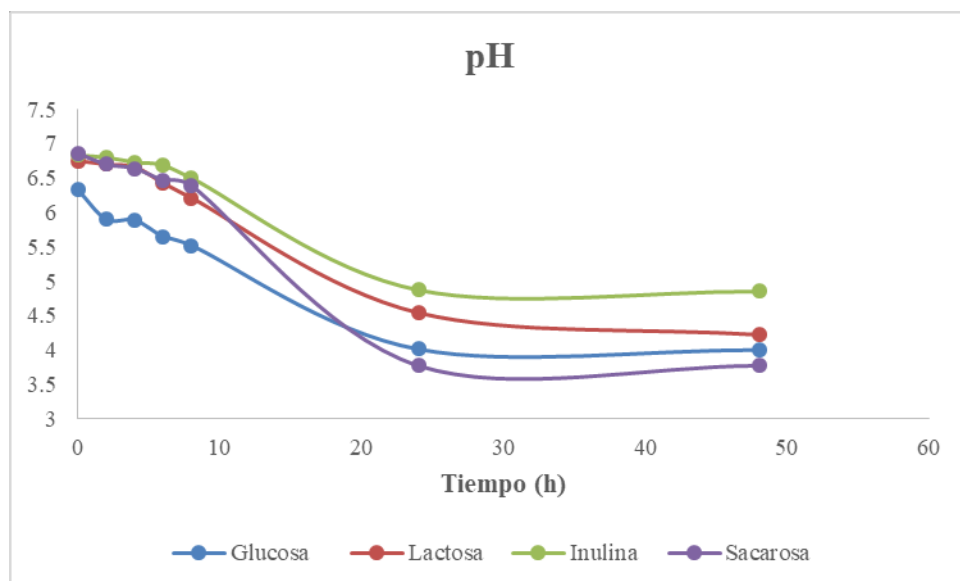


Figura 6. Cambio de pH del medio de cultivo inoculado con *L. acidophilus* en medio líquido TPY con diferentes fuentes de carbono

En la Tabla 1 se observa que durante las primeras 4 horas, todas las fuentes de carbono mostraron tasas de crecimiento moderadas. La tasa aumentó significativamente en el intervalo de 4 a 8 horas para glucosa y lactosa, lo cual indica un periodo de crecimiento exponencial más activo con estas fuentes de carbono. En contraste, la inulina y sacarosa exhibieron tasas de crecimiento menores. Desde las 8 hasta las 24 horas, la tasa de crecimiento para lactosa continuó siendo la más alta, mientras que las demás fuentes de carbono mostraron una disminución, posiblemente debido a la transición hacia la fase estacionaria o al agotamiento de nutrientes disponibles para la fermentación.

Tabla 1. Cinética de crecimiento de *L. acidophilus* (tasas específicas de crecimiento de cada sustrato).

Sustrato	Glucosa			Lactosa			Inulina			Sacarosa			
	Tiempo (h)	0-4	4-8	8-24	0-4	4-8	8-24	0-4	4-8	8-24	0-4	4-8	8-24
Tasa de crecimiento específica ($\mu_{\text{máx.}}$, h ⁻¹)		0.017	0.045	0.052	0.061	0.086	0.058	0.015	0.044	0.020	0.020	0.052	0.033

L. reuteri

En la Figura 7 se puede observar las fases de crecimiento que llevó a cabo *L. reuteri* en medios TPY con glucosa, lactosa, inulina y sacarosa como fuente de carbono. En las curvas de crecimiento se puede observar un aumento de biomasa en las primeras 10 horas para las cuatro fuentes de carbono, la metabolización de lactosa ocurre de manera muy rápida en comparación con las demás fuentes de carbono, alrededor de las 20 horas inicia la fase estacionaria y el descenso del pH (Figura 8) puede actuar como un mecanismo de autorregulación del crecimiento bacteriano. (Bevilacqua *et al.*, 2016). Cuando la bacteria metaboliza la sacarosa hay un mayor aumento de biomasa, mientras que con la inulina hay una menor producción de biomasa y así mismo una menor disminución de pH. La estabilidad del pH durante la mayor parte del tiempo sugiere que la inulina no induce una acidificación fuerte del medio, probablemente debido a su metabolización más lenta en comparación con la glucosa y lactosa (Figura 8). *L. reuteri* tiene una producción similar de biomasa con glucosa y sacarosa la diferencia es que de acuerdo con la Figura 7 después de las 48 horas en el medio con sacarosa no se observa una disminución de biomasa debido a que sigue en fase estacionaria, mientras que con glucosa el descenso es notable.

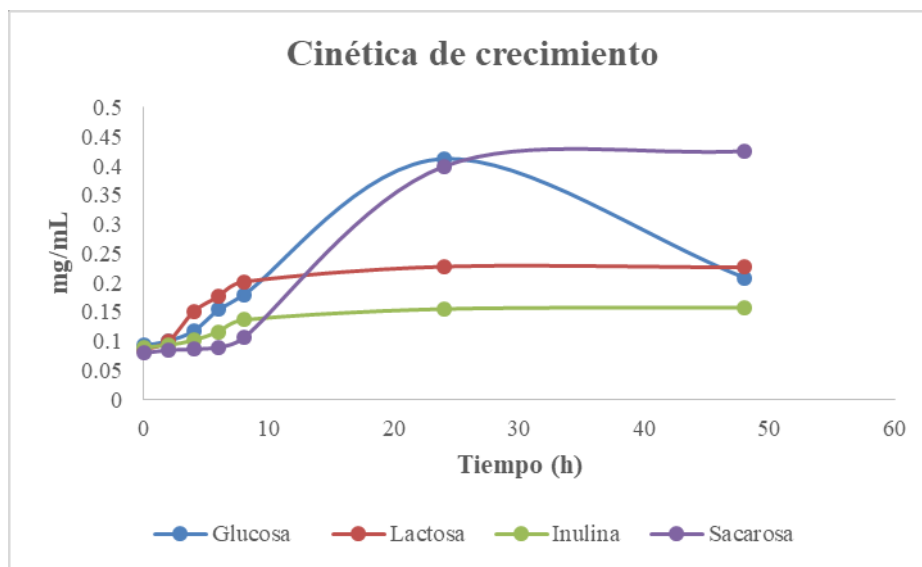


Figura 7. Cinética de crecimiento de *L. reuteri* en medio líquido TPY con diferentes fuentes de carbono.

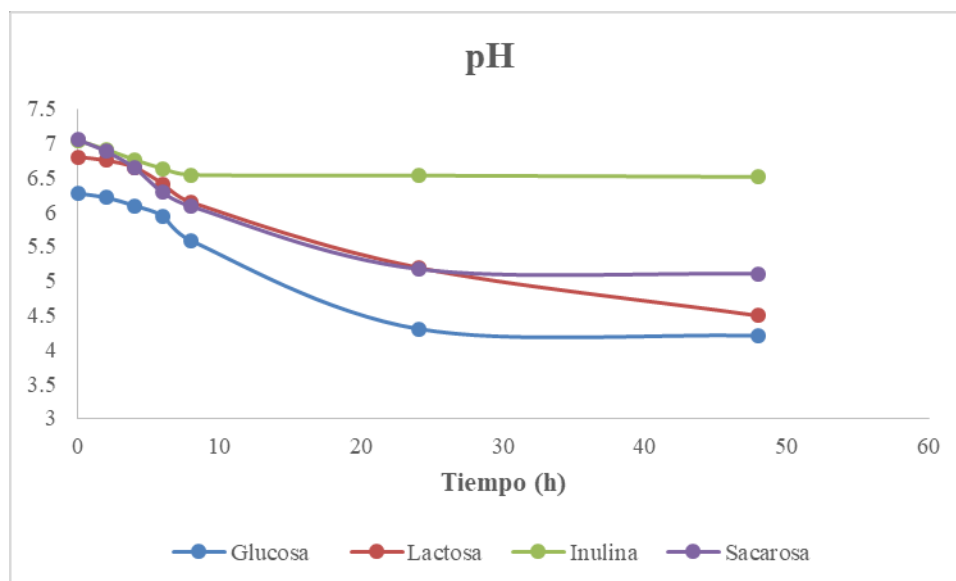


Figura 8. Cambio de pH del medio de cultivo inoculado con *L. reuteri* en medio líquido TPY con diferentes fuentes de carbono.

La Tabla 2 muestra que la glucosa tiene una tasa de crecimiento significativa en el intervalo de 4 a 8 horas, la lactosa, por otro lado, presenta un aumento en la tasa de crecimiento en el mismo intervalo, pero su pico parece ser menos pronunciado que el de la glucosa. En el caso de la inulina, hay una tendencia interesante donde la tasa de crecimiento aumenta entre las 4 y las 8 horas, pero luego se incrementa aún más de las 8 a las 24 horas, lo cual podría ser debido a una posible adaptación enzimática o un retraso en el metabolismo completo de este sustrato. Finalmente, la sacarosa muestra una tasa de crecimiento constante y más uniforme en los tres intervalos, con la tasa más alta al final, entre las 8 y 24 horas, lo que puede indicar un uso sostenido de la sacarosa como fuente de energía a lo largo del tiempo.

Tabla 2. Cinética de crecimiento de *L. reuteri* (tasas específicas de crecimiento de cada sustrato).

Sustrato	Glucosa			Lactosa			Inulina			Sacarosa			
	Tiempo (h)	0-4	4-8	8-24	0-4	4-8	8-24	0-4	4-8	8-24	0-4	4-8	8-24
Tasa de crecimiento específica ($\mu_{m\acute{a}x}$, h ⁻¹)		0.060	0.11	0.052	0.014	0.073	0.0075	0.032	0.074	0.080	0.020	0.052	0.083

B. pseudocatenulatum

La Figura 9 presenta las distintas fases de crecimiento de *B. pseudocatenulatum* en medios TPY, utilizando glucosa, lactosa, inulina y sacarosa como fuentes de carbono. De acuerdo con las curvas, la bacteria mostró un crecimiento más pronunciado con lactosa y sacarosa. Específicamente, cuando la bacteria metaboliza lactosa, se aprecia que la fase estacionaria inicia cerca de las 20 horas. En contraste, en el medio con sacarosa, no se distingue claramente el comienzo de la fase estacionaria; esto podría deberse a que la sacarosa se hidroliza en glucosa y fructosa. La glucosa es rápidamente utilizada en las primeras 8 horas, lo que potencialmente estimula una fase de crecimiento acelerado. Posteriormente, la producción de enzimas necesarias para metabolizar la fructosa podría prolongar la fase exponencial del crecimiento bacteriano. Este fenómeno sugiere una adaptación metabólica de *B. pseudocatenulatum* para aprovechar eficazmente los componentes de la sacarosa a lo largo del proceso de fermentación. En la Figura 10 cuando la bacteria metaboliza la sacarosa el pH no disminuye tan rápidamente lo que sugiere una producción menos intensa de ácidos. Esto podría deberse a una utilización más gradual de los monosacáridos resultantes de la hidrólisis de la sacarosa. En el caso de la fermentación con lactosa e inulina, la actividad enzimática y la ruta metabólica pueden estar más sincronizadas, llevando a una liberación más constante de ácidos en un periodo más corto, lo que se refleja en una disminución del pH más marcada.

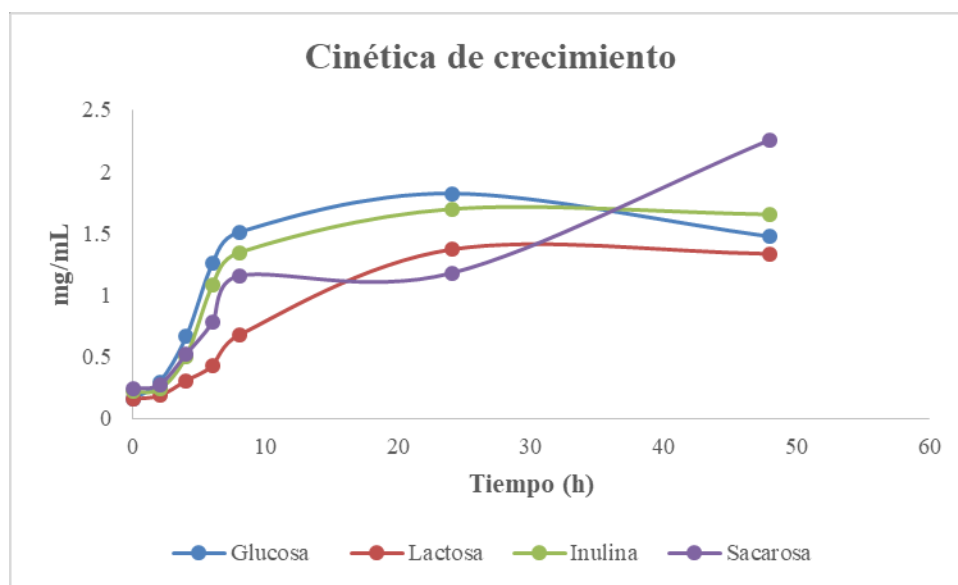


Figura 9. Cinética de crecimiento de *B. pseudocatenulatum* en medio líquido TPY con diferentes fuentes de carbono.

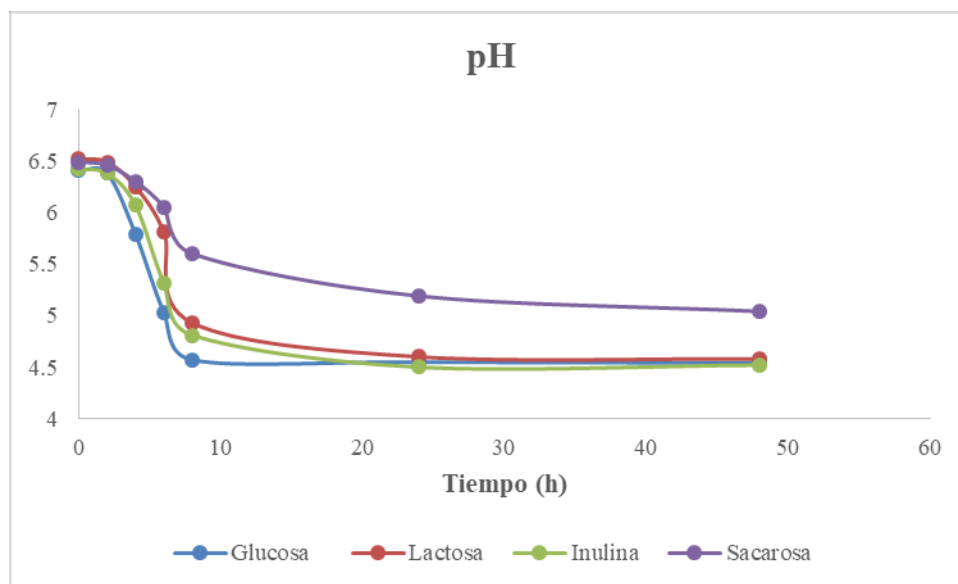


Figura 10. Cambio de pH del medio de cultivo inoculado con *B. pseudocatenulatum* en medio líquido TPY con diferentes fuentes de carbono.

De acuerdo con la cinética de crecimiento (Tabla 3) la glucosa proporcionó un comienzo de crecimiento más rápido en el intervalo de 0-4 horas, pero esta tasa disminuyó en los intervalos posteriores, posiblemente indicando un consumo temprano y rápido del sustrato. La lactosa y la inulina mostraron tasas de crecimiento más bajas inicialmente, pero en el caso de la inulina, hubo un aumento notable en la tasa de 8-24 horas, lo que podría reflejar una utilización más lenta y sostenida del sustrato. En contraste, la sacarosa mantuvo tasas de crecimiento relativamente constantes en los primeros dos intervalos, seguido de un descenso pronunciado después de las 8 horas, lo que podría indicar una rápida utilización del sustrato.

Tabla 3. Cinética de crecimiento de *B. pseudocatenulatum* (tasas específicas de crecimiento de cada sustrato).

Sustrato	Glucosa			Lactosa			Inulina			Sacarosa			
	Tiempo (h)	0-4	4-8	8-24	0-4	4-8	8-24	0-4	4-8	8-24	0-4	4-8	8-24
Tasa de crecimiento específica ($\mu_{\text{máx.}}$, h^{-1})		0.036	0.021	0.012	0.017	0.020	0.044	0.021	0.024	0.014	0.019	0.020	0.001

***B. animalis*.**

La Figura 11 presenta las distintas fases de crecimiento de *B. animalis* en medios TPY, utilizando glucosa, lactosa, inulina y sacarosa como fuentes de carbono. De acuerdo con las curvas, la bacteria mostró un mayor crecimiento con lactosa y sacarosa. Con sacarosa el peso seco muestra un rápido incremento inicial, alcanzando un pico más alto en comparación con la lactosa, lo que indica que la sacarosa puede estar facilitando una fase de crecimiento exponencial más pronunciada. En términos del pH (Figura 12), todas las curvas muestran una disminución inicial, lo que es indicativo de producción de ácido. Sin embargo, la disminución del pH es más pronunciada en el medio con lactosa, lo que sugiere una tasa más rápida de producción de ácido en comparación con la sacarosa.

Con la inulina, la gráfica muestra un aumento sostenido del peso seco hasta aproximadamente las 30 horas, lo cual es indicativo de un crecimiento más lento y sostenido, posiblemente debido a la naturaleza compleja de la inulina que requiere una hidrólisis enzimática más extensa antes de ser utilizada por las bacterias. El pH disminuye de manera más moderada en comparación con las otras fuentes de carbono, lo que sugiere una producción de ácido más baja.

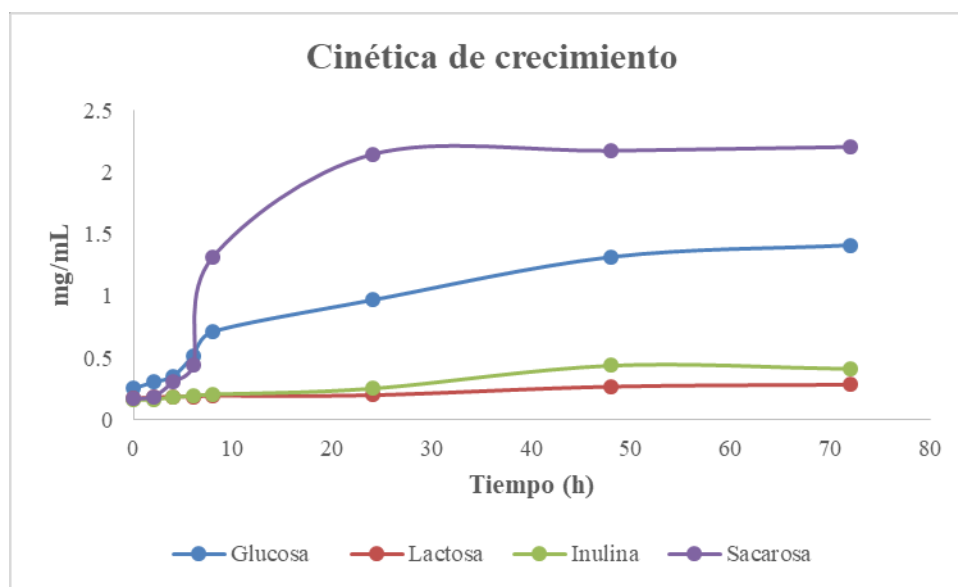


Figura 11. Cinética de crecimiento de *B. animalis* en medio líquido TPY con diferentes fuentes de carbono.

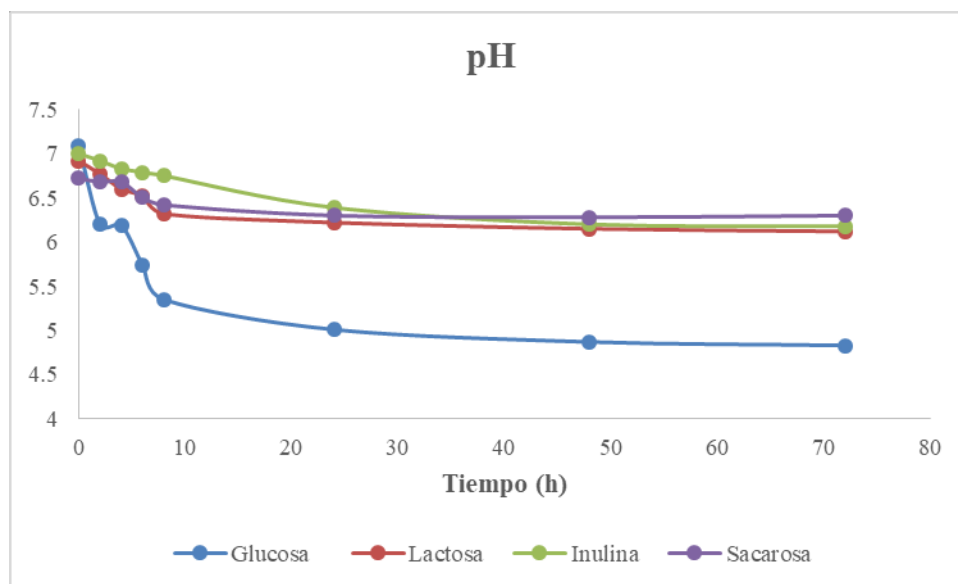


Figura 12. Cambio de pH del medio de cultivo inoculado con *B. animalis* en medio líquido TPY con diferentes fuentes de carbono

En la Tabla 4 de acuerdo con las tasas de crecimiento específico se observa que la glucosa presenta la tasa de crecimiento más alta en el intervalo de 4-8 horas, lo cual podría indicar que *B. animalis* metaboliza rápidamente la glucosa durante este periodo. En contraste, la lactosa muestra una tasa de crecimiento más uniforme y baja en todos los intervalos de tiempo, sugiriendo una utilización más lenta y constante de este sustrato.

La inulina, muestra una tasa de crecimiento inicial más alta en el intervalo de 0-4 horas comparado con la lactosa, lo cual es interesante dado que la inulina generalmente se hidroliza y metaboliza más lentamente. La tasa decrece en el intervalo más largo de 8-24 horas, lo que puede reflejar la limitación de la disponibilidad del sustrato conforme la fermentación avanza. Por último, la sacarosa tiene una tasa de crecimiento consistente en los primeros dos intervalos de tiempo y disminuye ligeramente en el último intervalo esto podría ocurrir por una posible disponibilidad del sustrato con relación al tiempo.

Tabla 4. Cinética de crecimiento de *B. animalis* (tasas específicas de crecimiento de cada sustrato).

Sustrato	Glucosa			Lactosa			Inulina			Sacarosa			
	Tiempo (h)	0-4	4-8	8-24	0-4	4-8	8-24	0-4	4-8	8-24	0-4	4-8	8-24
Tasa de crecimiento específica ($\mu_{\text{máx.}}$, h^{-1})		0.083	0.157	0.019	0.019	0.009	0.013	0.034	0.030	0.013	0.014	0.036	0.030

X. Conclusión

La presente investigación proporcionó una visión integral sobre el crecimiento de cepas probióticas bajo distintas condiciones de cultivo, subrayando la importancia de la selección de la fuente de carbono en los medios de cultivo. Se demostró que los microorganismos probióticos responden de manera diferente ante la presencia de lactosa, glucosa, sacarosa e inulina, lo cual tiene implicaciones directas en la optimización de su cultivo para aplicaciones industriales y de salud.

La lactosa y la sacarosa promovieron un crecimiento acelerado en las cepas probióticas, lo que se traduce en una rápida proliferación y un pronto ingreso a la fase estacionaria. Esto sugiere que tales azúcares simples son metabolizados eficientemente, desencadenando una producción significativa de ácido láctico y otros metabolitos beneficiosos. Por el contrario, la inulina resultó ser el azúcar con menor efecto como fuente de carbono para el crecimiento de las bacterias analizadas, pero mostro un efecto positivo para *B. pseudocatenulatum*. Esto resalta las diferencias intrínsecas entre cepas incluso dentro del mismo género en cuanto a sus preferencias y eficiencias metabólicas. Además, se observó que la inulina no induce una acidificación tan pronunciada del medio, lo que permite un ambiente menos estresante para las bacterias. Tales hallazgos subrayan la diversidad metabólica entre las bacterias lácticas y bifidobacterias, y enfatizan la necesidad de una selección cuidadosa del sustrato para la optimización de su cultivo. El conocimiento adquirido a través de este estudio es crucial para el diseño de medios de cultivo especializados y para el desarrollo de formulaciones probióticas con características mejoradas. El éxito de este estudio abre camino a investigaciones futuras que podrían explorar la interacción entre diferentes cepas probióticas y otros componentes del medio, con el objetivo de maximizar los beneficios para la salud humana y el rendimiento en la producción de probióticos.

XI. Referencias

1. Azaola, A., Bustamante, P., Huerta, S., et al. (1999). Uso de metodología de respuesta de superficie para describir la producción de biomasa de *Bifidobacterium infantis* en medios complejos. *Técnicas de Biotecnología*, 13(1), 93–95. <https://doi.org/10.1023/A:1008804119310>
2. Caplice, E., y Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50(1-2), 131–149. [https://doi.org/10.1016/s01681605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/s01681605(99)00082-3)
3. Cobarrubias Esquer, J. (2020). *Categoría: Nutrición* (1ra ed.). Ergon.
4. Bernal Castro, C. A., Díaz-Moreno, C., & Gutiérrez-Cortés, C. (2017). Probióticos y prebióticos en matrices de origen vegetal: Avances en el desarrollo de bebidas de frutas. *Revista Chilena de Nutrición* 44(4), 383-392. <https://dx.doi.org/10.4067/s0717-75182017000400383>
5. Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., Speranza, B., Campaniello, D., & Altieri, C. (2016). Effects of inulin, fructooligosaccharides/glucose and pH on the shape of the death kinetic of *Lactobacillus reuteri* DSM 20016. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(10), 2251-2259 <https://doi.org/10.1111/ijfs.13205>
6. Dang, T. D., Yong, C. C., Rheem, S., Oh, S. (2021). Optimizing the composition of the medium for the viable cells of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* JNU306 using response surface methodology *Journal of Animal Science and Technology* 63(3), 603–613. <https://doi.org/10.5187/jast.2021.e43>
7. Dhanashree, Rajashekharan, S., Krishnaswamy, B., Kammara, R. (2017). Bifid Shape Is Intrinsic to *Bifidobacterium adolescentis*. *Frontiers in Microbiology* 8, 478. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00478>
8. Dempsey, E., y Corr, S. C. (2022). *Lactobacillus* spp. for Gastrointestinal Health: Current and Future Perspectives. *Frontiers in immunology* 13, 840245. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840245>
9. FAO/OMS. *Directrices para la Evaluación de probióticos en los alimentos*. Vol. 30. Ontario, Canadá: OMS; 2002. Informe del grupo de trabajo de la OMS sobre la redacción de directrices para la evaluación de probióticos en los alimentos.
10. González-Vázquez, R., Zúñiga-León, E., Torres-Maravilla, E., Leyte-Lugo, M., Mendoza-Pérez, F., Hernández-Delgado, N. C., Pérez-Pastén-Borja, R., Azaola-Espinosa, A., Mayorga-Reyes, L. (2022). Genomic and Biochemical Characterization of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* JCLA3 Isolated from Human Intestine. *Microorganisms* 10(11), 2100. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112100>

11. Guadarrama-Ortíz, P., Flores-Vázquez, J. C., Carnalla Cortés, M., Choreño-Parra, J. A. (2018). Probióticos ¿coadyuvantes en el tratamiento médico?. *Medicina interna de México* 34(4), 574–581. <https://doi.org/10.24245/mim.v34i4.1878>
12. James, M., Velastegui, E., & Cruz, M. (2017). Evaluación de las condiciones de cultivo de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* a nivel de laboratorio, con inulina como fuente de carbono. *Bionatura*, 2. <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.01.4>
13. Morocho, T., y Leiva-Mora, M. (2019). Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas. *Centro Agrícola* 46(2), 93–103. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852019000200093&lng=es&tlng=es
14. Roobab, U., Batool, Z., Manzoor, M. F., Shabbir, M. A., Khan, M. R., & Aadil, R. M. (2020). Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. *Current Opinion in Food Science*, 32, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.01.003c>
15. Ruiz, L., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A., Sánchez, B. (2011). How do bifidobacteria counteract environmental challenges? Mechanisms involved and physiological consequences. *Genes & Nutrition* 6(3), 307–318. <https://doi.org/10.1007/s12263-010-0207-5>
16. Sin, C., Britos, M., Ortega, S., Vasek, O. (2017). Reactivación de *Lactobacillus* spp. aislados de saliva y alimentos. *Revista de La Facultad de Odontología* 10(1), 7–12. <https://doi.org/10.30972/rfo.1012928>
17. Stephenie, W., Kabeir, B. M., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M., & Yazid, A. M. (2007). Growth optimization of a probiotic candidate, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4, in milk medium using response surface methodology. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12(2), 106-113 <https://link.springer.com/article/10.1007/BF03028634>
18. Taye, Y., Degu, T., Fesseha, H., Mathewos, M. (2021). Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Cow Milk and Milk Products. *The Scientific World Journal* 4697445. <https://doi.org/10.1155/2021/4697445>
19. Zhang, J., Bu, Y., Zhang, C., Yi, H., Liu, D., & Jiao, J. (2020). Development of a Low-Cost and High-Efficiency Culture Medium for Bacteriocin Lac-B23 Production by *Lactobacillus plantarum* J23. *Biology*, 9(7), 171. <https://doi.org/10.3390/biology9070171>
20. Zhang, Q., Fu, C., Zhao, C., Yang, S., Zheng, Y., Xia, M., Yan, Y., Lang, F., & Wang, M. (2020). Monitoring microbial succession and metabolic activity during manual and mechanical solid-state fermentation of Chinese cereal vinegar. *LWT*, 133, 109868. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109868>