

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE PRODUCCIÓN Y
CONSERVACIÓN DE UN INÓCULO PROBIÓTICO**

LEYDY PAOLA BARRERA LEMUS

LUISA FERNANDA TORRES TÉLLEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2019

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE PRODUCCIÓN Y
CONSERVACIÓN DE UN INÓCULO PROBIÓTICO**

**LEYDY PAOLA BARRERA LEMUS
LUISA FERNANDA TORRES TÉLLEZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de
Ingenieras Químicas**

**Directora
Lorena Paola Soto
Doc. En ciencias Biológicas**

**Codirectores
Luis Javier López Giraldo
Doc. Química, bioquímica y ciencia de alimentos.**

**Laureano Sebastián Frizzo
Doc. En ciencias Biológicas**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2019

A Dios por brindarme sabiduría, fortaleza, aprendizaje, por sembrar paz y por la fe necesaria para combatir toda clase de problema durante este tiempo de aprendizaje.

A mis padres por darle color a mi vida con su apoyo y comprensión incondicional, gracias a esto han hecho un sueño realidad.

A mis hermanas y sobrina por llenarme de alegría y mostrarme el lado bueno de cada circunstancia.

A mis amigos Laura, Mary, Álvaro, Daniela, Michael y Alex quienes forman parte importante de este paso.

A Karen Chaparro por ser gran compañera de travesías, concejera y una gran amiga, de la cual siempre recibí inmenso apoyo.

A mi compañera de proyecto de grado Luisa Torres quién fue un gran apoyo.

Leydy Paola Barrera Lemus

A Dios por la salud, por la fortaleza, por la inteligencia y por ser luz en mi camino.

A mis padres, mis hermanos, mi cuñada y mis sobrinas por su apoyo incondicional, su honestidad, su compañía, sus consejos y su aliento en cada paso de mi vida.

A Carolina, Daniel, y Silvia por ser mis mejores amigos y apoyarme cada vez que necesité algo en tantos años de amistad.

A mis amigos y amigas de la universidad y del intercambio en Argentina por hacer recuerdos muy lindos de esta etapa de mi vida.

A Martha y Leydy por ser grandes compañeras de apoyo durante los procesos de pasantía y la realización de la tesis de grado.

A mi pollo, porque nunca los olvidaré.

Luisa Fernanda Torres Téllez

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Industrial de Santander** por permitirnos formarnos como Ingenieras Químicas.

A la **Universidad Nacional del Litoral** que nos brindó la oportunidad y acompañamiento para cumplir con nuestros objetivos propuestos para el trabajo de grado.

A nuestra directora de tesis **Lorena Paola Soto**, por creer, apoyarnos y guiarnos en nuestro proyecto.

A nuestro co-director de tesis **Luis Javier López Giraldo** por brindarnos su apoyo y conocimiento con diferentes ítems del proyecto.

A nuestro co-director **Laureano Frizzo** en su apoyo y colaboración para realizar nuestras tesis de investigación en el equipo de trabajo del Laboratorio de Análisis de Alimentos de la UNL.

A **Carolina, Aye, Beto, Anita, Noe, Euge, Maru y Majo** por su apoyo y dedicación durante nuestra estadía en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la UNL.

Al Doctor **Comelli Raúl Nicolas** y el laboratorio de química y ambiente de la facultad de ingeniería y ciencias hídricas de la UNL en su apoyo en pruebas de detección de azúcares reductores.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. OBJETIVOS	23
1.1 OBJETIVO GENERAL	23
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
2. METODOLOGÍA.....	24
2.1 MICROORGANISMO.....	24
2.2 EVALUACIÓN DE LS Y PS COMO FC PARA EL CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO.....	24
2.3 DETERMINACIÓN DEL MEDIO DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO.....	25
2.3.1 EVALUACIÓN DE MEDIOS OPTIMIZADOS POR OTROS AUTORES PARA L. SALIVARIUS CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO	25
2.3.2 APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE UN FACTOR A LA VEZ PARA DETERMINAR LA COMPOSICIÓN ÓPTIMA DEL MEDIO.....	26
2.3.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE FC Y FN.	28
2.4 EVALUACIÓN DEL MEDIO ESCOGIDO EN ESCALA DE REACTOR DE LABORATORIO	29
2.5 AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS.....	29
2.6 ANÁLISIS DE LOS LIOPROTECTORES Y SU CONSERVACIÓN EN EL TIEMPO	30
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	31
3.1 EVALUACIÓN DE LS Y PS (ARLA FOOD INGREDIENTS, PORTEÑA) COMO MEDIOS DE CRECIMIENTO PARA EL MICROORGANISMO.....	31
3.2 DETERMINACIÓN DEL MEDIO DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO.....	32
3.2.1 EVALUACIÓN DE MEDIOS OPTIMIZADOS POR OTROS AUTORES PARA L. SALIVARIUS, CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.....	32
3.2.2 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN ÓPTIMA DEL MEDIO	34
3.2.3 DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE FC Y FN.	35

3.3 EVALUACIÓN DEL MEDIO ESCOGIDO EN ESCALA DE REACTOR DE LABORATORIO	37
3.4 AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS.....	37
3.5 ANÁLISIS DE LOS LIOPROTECTORES Y SU CONSERVACIÓN EN EL TIEMPO	40
4. CONCLUSIONES	42
5. RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFIA	44
ANEXOS.....	46

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 medios con fc o fc-fn para propagación de las cepas	24
Tabla 2 medios evaluados para el crecimiento de <i>lactobacillus salivarius</i>	25
Tabla 3 composición del medio presentado por el autor yeo et al. (2018)	26
Tabla 4 composiciones de medios con fc de ps y ps con dextrosa teniendo en cuenta el método “one factor change at a time”	27
Tabla 5 diseño factorial de las concentraciones de fc y fn del medio a realizar	28
Tabla 6 precio de compra para fc	31
Tabla 7 DO MÁX Y μ MÁX de los medios evaluados a condiciones de concentraciòn de FC de 40 g/l del medio propuesto por Yeo et.al,2018 y 20g/l del medio MRS.	32
Tabla 8 DO MÁX Y μ MÁX de los medios evaluados con ps y ps con dextrosa para prueba del método “one factor change at a time”	34
TABLA 9 concentraciones evaluadas y DO MÁX Y μ MÁX de medios con FC de PS	35
TABLA 10 concentraciones evaluadas y DO MÁX Y μ MÁX de medios con FC de PS Con dextrosa	36
Tabla 11 concentración y productividad de los sistemas de fermentación evaluados	37
Tabla 13 balances de masa para un sistema discontinuo alimentado con un pulso	39
Tabla 14 modelo cinético para el proceso discontinuo	39
Tabla 15 concentración bacteriana durante el mes de conservación	40

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1 Procesos de filtración para obtener otros subproductos de la industria láctea a partir del lactosuero.....	18
Figura 2 Ruta metabólica de la fermentación ácido láctica para la producción de Lactato	20
Figura 3 Curva de crecimiento del medio blanco positivo MRS y medio Yeo et, al.2018 con FC Dextrosa	33
Figura 4 Concentración de biomasa y consumo de sustrato en el tiempo	38

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A: protocolo para realización de hidrólisis de sacarosa o lactosa.....	46
Anexo B. protocolo para la determinacion de azucares reductores por prueba 3,5 dinitrosalicilico.....	47
anexo C. prueba estadística anova-duncan para prueba de medios propuestos por yeo et al. (2018); mrs modificado y mrs comercial generada por el programa ibm® spss statistics®.....	49
Anexo D. prueba estadística anova-duncan para prueba de medio propuesto por yeo et al. (2018) aplicando el método one factor change at a time, generada por el programa ibm® spss statistics®.....	50
Anexo E. prueba estadística anova-factorial para prueba de determinación de fc y fn generada por el programa ibm® spss statistics®.....	53
Anexo F. desarrollo de los balances de fermentador discontinuo.....	58
Anexo G. ajuste de parámetros cinéticos para el modelo de monod y contoins en un reactor discontinuo.....	60

Nomenclaturas

Índices

P	Producto Lactato [g/l]
r	Velocidad de reacción [kg/m ³ .s]
rpm	Revoluciones por minuto [rpm]
s	Sustrato [g/l]
T	Temperatura [°C]
t	Tiempo [h]
v	Volumen [L]
x	Biomasa [g/l]

Subíndices

BAL	Bacterias ácido lácticas
DO	Densidad óptica
DO máx	Densidad óptica máxima
DSPV	Departamento de Salud Pública Veterinaria
EL	Extracto de levadura
FC	Fuente de carbono
FN	Fuente de nitrógeno
H ₂ O _d	Agua destilada
FCV	Facultad de Ciencias Veterinarias
LS	Lactosuero

M	Medio
MRS	Medio de Man, Rogosa y Sharpe
PBS	Phosphate buffered saline o Tampón Fosfato salino
PS	Permeado de Suero
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UNL	Universidad Nacional del Litoral

Letra griega

$\mu_{\text{máx}}$	Velocidad máxima de crecimiento
--------------------	---------------------------------

Glosario

Medio positivo Blanco: Medio por literatura en el cual crece la bacteria *Lactobacillus* spp.

RESUMEN

TÍTULO: DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE PRODUCCIÓN Y CONSERVACIÓN DE UN INÓCULO PROBIÓTICO*

AUTORES: Leydy Paola Barrera Lemus – Luisa Fernanda Torres Téllez **

PALABRAS CLAVES: Inóculo probiótico, fermentación discontinuo, fermentación semicontinua, liofilización.

DESCRIPCIÓN

El permeado de suero es un subproducto que se obtiene del proceso de filtración del lactosuero actualmente utilizado como sustrato para el crecimiento de bacterias ácido lácticas.

Para determinar el medio de crecimiento de una cepa *Lactobacillus* se replicaron medios elaborados por autores que investigaron sobre esta, para luego aplicar el método de diseño de experimentos “one factor change at a time” y por último se variaron concentraciones de fuente de carbono y nitrógeno para encontrar la composición adecuada del medio de crecimiento.

Con este medio se desarrolló una fermentación discontinua y semicontinua, realizando una comparación entre productividad y concentración de biomasa encontrando que el sistema semicontinuo fue el mejor sistema de producción de inóculo probiótico obteniendo 14,54 [g/l] después de 24 horas de operación comparado con 9 [g/l] cuando se opera en proceso en discontinuo.

Se realizó un ajuste al comportamiento cinético del crecimiento de biomasa al fermentador en discontinuo usando el modelo de Contois; obteniendo un grado de ajuste de 0,859 y un error de mínimos cuadrados de 0,208.

La biomasa producida en el reactor fue repartida en partes iguales para ser encapsulada en lioprotectores con concentración de 18% p/v de maltodextrina, permeado de suero y dextrosa cada una y se almacenó a temperatura ambiente, se evaluó su concentración microbiana por un mes y se determinó que el permeado de suero usado como lioprotector resultó ser el más adecuado obteniendo $4,539 \pm 0,368$ log UFC/ml a la cuarta semana.

* Trabajo de Grado

**Facultad de ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química UIS. Laboratorio de Análisis de Alimentos UNL. Directora: Lorena Paola Soto. Doctora en Ciencias Biológicas.

ABSTRACT

TITLE: DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY OF PRODUCTION AND CONSERVATION OF A PROBIOTIC INOCULUM*

AUTHORS: Leydy Paola Barrera Lemus - Luisa Fernanda Torres Tellez **

KEYWORDS: probiotic inoculum, batch fermentation, semicontinuous fermentation, lyophilization.

DESCRIPTION

The whey permeate is a by-product obtained from the filtration process of whey currently used as growth substrate of lactic acid bacteria.

To determine the medium growth of a *Lactobacillus* strain media elaborated by authors who investigate this, were replicated to then, apply the design method of experiments “one factor change at a time” and finally concentrations of carbon and nitrogen source were varied to find the suitable composition of the medium growth.

With this medium growth a discontinuous and semicontinuous fermentation was developed, making a comparison between productivity and biomass concentration finding that the semicontinuous system was the best probiotic inoculum production system obtaining 14.54 [g/l] after 24 hours of operation compared to 9 [g/l] when operating in a discontinuous process.

An adjustment was made to the kinetic behavior of biomass growth to the batch fermenter using the Contois model; obtaining an adjustment degree of 0,859 and a least squares error of 0,208.

The biomass produced in the reactor was distributed in equal parts to be encapsulated in lyoprotectants with a concentration of 18% w/v maltodextrin, whey permeate and dextrose each and stored at room temperature, its microbial concentration was evaluated for a month and it was determined that the whey permeate used as lyoprotectant was found to be the most adequate, obtaining 4.539 ± 0.368 log CFU/ml for the fourth week.

* Undergraduate Project

** Physical and Chemical Engineering's Faculty. School of Chemical Engineering UIS. Food Analysis Laboratory UNL. Advisor: Lorena Paola Soto. Doctor of Biological Sciences.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha observado que el subproducto obtenido por la industria láctea conocido como lactosuero (LS) ha sido un problema ambiental, a causa de la elevada carga orgánica que posee. El problema de contaminación es generado normalmente por pequeñas empresas, las cuales disponen el LS directamente a las fuentes hídricas o sistemas de aguas residuales de los municipios en donde desarrollan su actividad económica. La disposición sin tratamiento previo, es una consecuencia del costo asociado con los equipos y operación de las plantas de tratamiento necesarias para la disminución de la carga orgánica¹.

Estas descargas podrían impactar negativamente en las tierras destinadas para explotación agrícola, generando la disminución del rendimiento de las cosechas. Así mismo, podría presentarse un fenómeno de lixiviación, puesto que el nitrógeno presente en el LS se mezcla en la tierra y afecta el cultivo².

Por otra parte, cuando el LS se desecha en los ríos, propicia el crecimiento de algas, reduciendo la vida acuática agotando el oxígeno disuelto³.

Se conoce como LS al líquido remanente tras la precipitación y separación de la caseína de la leche durante la elaboración del queso, su producción es de alrededor de 9 L por cada kg de queso producido; convirtiéndose en el principal subproducto de la industria quesera. Su composición varía, no obstante, está compuesto por lactosa, proteínas, minerales, vitaminas y grasa⁴; estos últimos, compuestos de

¹ LA PRENSA. Suero lácteo, “tesoro” desperdiciado. {En línea}. {15 de Mayo de 2018} Disponible en: <https://www.laprensa.com.ni/2016/03/10/economia/1999659-suero-lacteo-tesoro-desperdiciado>

² VALENCIA DENICIA, Elizabeth; RAMÍREZ CASTILLO, María. La industria de la leche y la contaminación del agua. En Elementos, vol. 16, no. 73 (Ene-Mar. 2009); p. 27-31

³ GUERRA, Álvaro Vicente Araujo; CASTRO, Lina María Monsalve; TOVAR, Andrés Luciano Quintero. Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental. En: Revista De Investigación Agraria Y Ambiental, vol. 4, no.2 (Jul-Dic. 2013); p. 55.

⁴ PARRA HUERTAS, Ricardo Adolfo. Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. En: Revista Facultad Nacional de Agronomía, vol. 62, no 1 (Sep-Abril, 2009); p. 1-3.

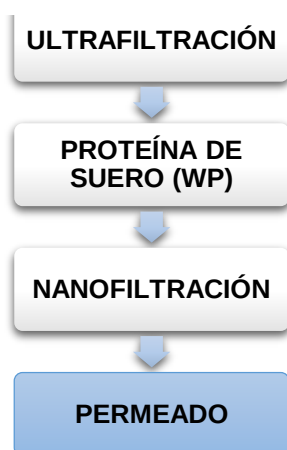
interés que pueden ser recuperados por medio de procesos de separación de partículas sólidas suspendidas en líquido.

Debido a lo anterior, se han planteado alternativas de uso a este subproducto, una de ellas es la utilización del LS como Fuente de Carbono (FC) de bacterias ácido lácticas (BAL) para la producción de probióticos (suplementos alimenticios que consisten en microorganismos vivos, que son beneficiosos en el organismo hospedador)⁵.

Para lo anterior, el LS es sometido a un proceso de ultrafiltración donde las sales insolubles y las proteínas de la leche quedan en suspensión en el interior de la membrana y la lactosa, sales solubles, nitrógeno no proteico y agua traspasan la membrana. Seguidamente, el permeado del proceso de ultrafiltración es usado como alimento a un proceso de nanofiltración; de este último se obtiene un permeado rico en lactosa que puede ser usado como FC por las BAL para producir biomasa probiótica.

Los procesos de filtración para obtener el PS a partir del LS se puede observar en la figura 1.

Figura 1 Procesos de filtración para obtener otros subproductos de la industria láctea a partir del lactosuero.



⁵ PASTRANA, Lorenzo. Producción de bacteriocinas y probióticos a partir de suero de leche y su aplicación de animales monogástricos. {En línea}. {15 de Mayo de 2018} Disponible en: <https://www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/pastrana2.pdf>

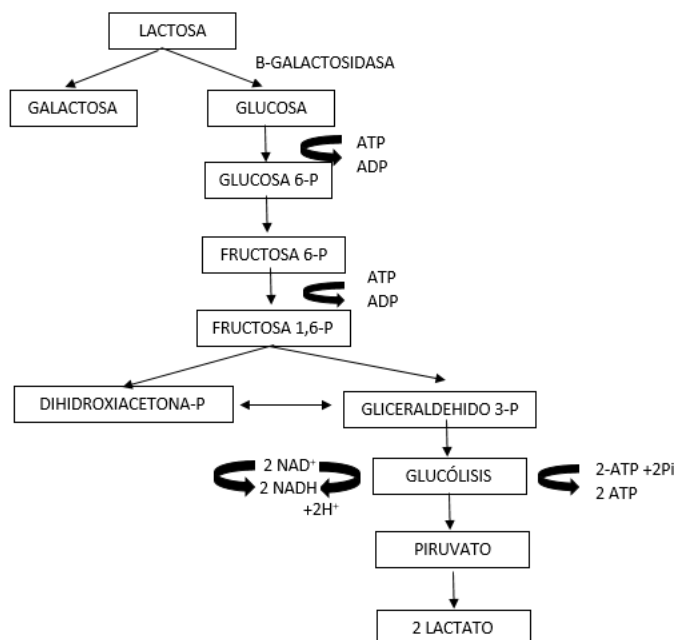
La producción de biomasa probiótica se lleva a cabo por fermentación láctica en la cual también se produce ácido láctico, comúnmente para este proceso se usan BAL del género de *Lactobacillus*⁶ que degradan las moléculas de lactosa presentes en el LS.

Una de esas bacterias es la *Lactobacillus salivarius*, bacteria grampositiva, anaerobia facultativa y mesófila, capaz de transformar compuestos presentes en la lactosa como lo son la glucosa, hexosas aldehídicas similares y azúcares simples para producir ácido láctico, este proceso se da a una temperatura óptima de 37°C y pH 6. La bacteria crece e hidroliza la lactosa produciendo galactosa y glucosa, punto en el que se realiza la isomerización de la glucosa para que sea incorporado a glucolisis la cual se caracteriza por degradar la fructosa para ser convertida a lactato.

La ruta metabólica a partir de la glucosa que se genera en la fermentación ácido láctica se muestra en la figura 2.

⁶ DALY, Charles, et al. Technological and health benefits of dairy starter cultures. In: International Dairy Journal, vol. 8, no 3, (Apr. 1998); p. 195-205

Figura 2 Ruta metabólica de la fermentación ácido láctica para la producción de Lactato



Otro componente importante para el crecimiento de la bacteria es la fuente de nitrógeno, así por ejemplo Arasaratnam, V. (1996) demostró que la fuente de nitrógeno (FN) adecuada para el proceso de fermentación a partir de bacterias ácido lácticas es el extracto de levadura debido al gran contenido de vitamina B favoreciendo la producción de ácido láctico, pero la obtención de extracto de levadura (EL) es generalmente costoso por las condiciones necesarias para su producción, por ende, la fuente de nitrógeno es el factor limitante para la generación de biomasa probiótica a partir de BAL.

Teniendo en cuenta que para la producción de biomasa probiótica a partir de *Lactobacillus salivarius* se necesita un medio con FC, FN y sales, se ha propuesto el medio comercial MRS para el crecimiento para este tipo de BAL⁷, pero debido a

⁷ DE MAN, J. C.; ROGOSA, deM; SHARPE, M. Elisabeth. A medium for the cultivation of lactobacilli. In: Journal of applied Bacteriology, vol. 23, no 1 (Apr. 1960); p. 130-135.

la cantidad de compuestos que contiene presenta un alto costo generando que en la actualidad se investigué sobre medios de menor valor, pero que cumplan con la misma función del MRS.

Además, la biomasa próbiotica obtenida en el proceso de fermentación debe ser preservada empleando diferentes métodos de conservación para luego ser suministrada como alimento a animales de granja.

Los alimentos probióticos son reconocidos por proporcionar varios beneficios en la salud; además la demanda de alimentos funcionales está creciendo rápidamente, por ende, el desarrollo de alimentos con dosis adecuadas de probióticos en el momento de su consumo es un reto.

Al igual, son varios los factores durante el procesamiento y el almacenamiento que afectan la viabilidad de los organismos probióticos⁸, por tal motivo durante las últimas décadas se han realizado experimentos para mejorar la viabilidad de los probióticos en diferentes productos alimenticios, haciendo énfasis en la protección de los microorganismos durante el proceso de conservación, uno de estos métodos es la liofilización⁹.

Durante la liofilización disminuye la viabilidad de la cepa, por ende, para mejorar las características del producto durante el proceso de liofilización¹⁰, se realiza un recubrimiento al microorganismo para protegerlo de factores externos que puedan dañar su membrana. Entre los procesos de recubrimiento usados se encuentra la encapsulación, del microorganismo, en una matriz porosa: alginato y quitosano¹¹ ;

⁸ TRIPATHI, Manjul K.; GIRI, Saroj Kumar. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. In: Journal of functional foods, vol. 9, (Jan-Apr, 2014); p. 225-241.

⁹ GIONO, S.; ARTEAGA, R. I. Recomendaciones generales para la liofilización de cultivos microbianos. Boletín FELACC, vol. 4, (2010), p. 2-4.

¹⁰ MURO-URISTA, Claudia, et al. Recuperación de los componentes del lactosuero residual de una industria elaboradora de queso utilizando membranas. En: Afinidad, vol. 67, no 547 (Dic-Jun, 2010) p 2-4.

¹¹ Blajman, Jesica. Desarrollo de un inóculo probiótico para pollos parrilleros y monitoreo durante su tránsito intestinal y en órganos del medio interno. Santa Fe, Argentina. 2017. Tesis Doctoral. Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet Litoral), UNL-CONICET.

otra opción es el uso de diferentes agentes lioprotectores¹², estos agentes pueden ser azúcares (sacarosa, trehalosa), polioles (manitol, sorbitol, inositol), aminoácidos (glutamato) y sustancias proteicas como peptona y leche descremada¹³, permiten realizar el proceso de liofilización cuidando de la biomasa próbiotica.

De acuerdo con los párrafos anteriores, es de gran interés y representa un reto el desarrollo de procesos conducentes a la producción y preservación de microorganismos con características probióticas.

¹² CORVELEYN, Sam, et al. Cryoprotectants for freeze drying of lactic acid bacteria. U.S. Patent No 9,574,169, 21 Feb. 2017.

¹³ MORALES-GARCÍA, Y., et al. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. En: BioTecnología, 2010, vol. 14, no 2 (Mayo, 2010); p. 11-29. 43.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un proceso metodológico de producción y conservación de un inóculo con características probióticas usando como fuente de carbono subproductos provenientes de la industria láctea.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la utilización de subproductos de la industria láctea (Permeado de Suero y Lactosuero) como fuente de carbono para el desarrollo de bacterias ácidolácticas (BAL) probióticas.
- Determinar las mejores condiciones de producción por vía fermentativa.
- Establecer los parámetros cinéticos que expliquen el crecimiento microbiano de *Lactobacillus salivarius* DSPV 010.
- Evaluar la eficiencia de diferentes lioprotectores empleados durante la liofilización de biomasa.

2. METODOLOGÍA

2.1 MICROORGANISMO

El microorganismo usado fue una cepa proveniente del cepario del Departamento de Salud Pública Veterinaria (DSPV) de la Universidad Nacional del Litoral Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL-FCV) conocida como *Lactobacillus salivarius* DSPV 010 aislada del ciego de un pollo. Esta especie de bacteria probiótica ha demostrado ser un buen inóculo probiótico para la dieta del pollo según el trabajo de Blajman et al. (2017).

2.2 EVALUACIÓN DE LS Y PS COMO FC PARA EL CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO

Se realizó una comparación entre dos subproductos de la industria láctea, LS y PS, los cuales son adquiridos por la empresa Arla Food Ingredients, Porteña, estos dos desechos son usados como FC haciendo una activación de la cepa *L. salivarius* DSPV 010 en placa de MRS a la cual luego de 48 h a 37 °C se hizo crecer dos veces al 1% en caldos de MRS contenidos en falcon de 10 ml y posteriormente se propagaron en los siguientes medios:

Tabla 1 Medios con FC o FC-FN para propagación de las cepas

Medio	Cantidad [g/L]
LS	60
PS	60
LS + EL	60, 20
PS + EL	60, 20

A estas cepas inoculadas en los medios mencionados anteriormente se les hizo diluciones decimales en Ringer ¼ (Biokar, Beauvais, Francia) tomando alícuotas de 1 ml para su posterior inoculación por siembra en superficie en placas de MRS.

Después las placas se dejaron en condiciones de anaerobiosis a 37 °C durante 48h, después de este período de tiempo se procedió a realizar un recuento en placa de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Todas las pruebas fueron desarrolladas por triplicado.

2.3 DETERMINACIÓN DEL MEDIO DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO

Para la determinación del medio de crecimiento se evaluaron las siguientes fases:

2.3.1 Evaluación de medios optimizados por otros autores para *L. salivarius* con diferentes fuentes de carbono La replicación y crecimiento del *Lactobacillus salivarius* se realizó siguiendo las preparaciones de medios propuestos por Yeo et al. (2018) con ligeras modificaciones, en la tabla 2 se muestran las formulaciones de medios evaluadas en este trabajo, de la misma forma se replicó el MRS con componentes sueltos y se usó el MRS de venta comercial.

Tabla 2 Medios evaluados para el crecimiento de *Lactobacillus salivarius*

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
Proteosa peptona [g/l]	10	10	10	10	0	0	0	0
Extracto de carne [g/l]	10	10	10	10	0	0	0	0
Extracto de levadura [g/l]	5	5	5	5	20	20	20	20
Glucosa [g/l]	20	0	0	20	40	0	0	0
Permeado [g/l]	0	20	0	0	0	40	0	0
Maltodextrina [g/l]	0	0	20	0	0	0	40	0
Dextrosa [g/l]	0	0	0	20	0	0	0	40
Monoleato de sorbitán (tween 80) [ml]	1	1	1	1	1	1	1	1
Fosfato dipotásico [g/l]	2	2	2	2	1	1	1	1
Acetato de sodio anhidrido [g/l]	5	5	5	5	6	6	6	6
Citarto de amonio [g/l]	2	2	2	2	0	0	0	0

Sulfato de magnesio heptahidratado [g/l]	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Sulfato de Manganeso hidratado [g/l]	0,05	0,05	0,05	0,05	0,02	0,02	0,02	0,02
Sulfato ferrico heptahidratado [g/l]	0	0	0	0	0,01	0,01	0,01	0,01

M1 es Medio de MRS con FC glucosa, M2 Medio MRS con FC PS, M3 Medio MRS con FC dextrosa, M4 Medio MRS con FC maltodextrina, M5 Medio basado en Yeo et al. (2018) con FC glucosa, M6 Medio basado en Yeo et al. (2018) modificando su FC por PS, M7 Medio basado en Yeo et al. (2018) modificando su FC por dextrosa, M8 Medio basado en Yeo et al. (2018) modificando su FC por maltodextrina.

Se utilizó 200 μL de cada medio inoculando con 2% del microorganismo ya previamente crecido en caldo de MRS, posteriormente se realizó un estudio de la densidad óptica máxima (DO máx) usando el software Gen5 para Windows versión 2.0.1 en un lector multimodal de microplacas (Sinergy HT, BioTek, Winooski, Estados unidos) por 24 h a 37 °C.

El experimento se desarrolló en tres réplicas y los datos obtenidos fueron analizados usando el programa IBM® SPSS Statistics®, donde se realizó una prueba estadística [ANOVA-Duncan] comparando las DO máx y $\mu\text{máx}$ de los medios modificados con las FC contra la DO máx del MRS comercial (blanco positivo) y así se determinó si la FC de PS tubo mejores resultados que otras FC como lo son dextrosa, maltodextrina o glucosa.

2.3.2 Aplicación de la metodología de un factor a la vez para determinar la composición óptima del medio Para esta fase se usó el medio de Yeo et al. (2018) escogido del análisis realizado en el apartado anterior, los compuestos del medio se pueden observar en la tabla 3

Tabla 3 Composición del medio presentado por el autor Yeo et al. (2018)

	Compuesto	Cantidad [g/l]
FC	PS	40
	PS con dextrosa	20;20
FN	EL	20
Micronutrientes	Sulfato de hierro heptahidratado	0,2

	Sulfato de Manganeso	0,02
	Monoleato de Sorbitán (tween 80)	0,1 ml
Solución Buffer	Fosfato de potasio heptahidratado	0,1
	Acetato de Sodio trihidratado	10

Al medio se le realizó el método de diseño de experimentos conocido como “one factor change at a time” o un factor a la vez donde solo se cambia un factor a la vez mientras que los otros factores se mantienen fijos¹⁴ , ver tabla 4.

Tabla 4 Composiciones de medios con FC de PS y PS con dextrosa teniendo en cuenta el método “one factor change at a time”

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
EL [g/l]	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
PS [g/l]	40	40	40	40	40	40	20	20	20	20	20	20
Dextrosa [g/l]	0	0	0	0	0	0	20	20	20	20	20	20
monoleato de sorbitán [ml]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fosfato dipotásico [g/l]	1		1	1	1	1	1		1	1	1	1
Acetato de sodio trihidratado [g/l]	10	10		10	10	10	10	10		10	10	10
Sulfato de magnesio Heptahidratado [g/l]	0,2	0,2	0,2		0,2	0,2	0,2	0,2	0,2		0,2	0,2
Sulfato de Manganeso hidratado [g/l]	0,02	0,02	0,02	0,02		0,02	0,02	0,02	0,02	0,02		0,02
Sulfato férrico heptahidratado [g/l]	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01		0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	

¹⁴ CZITROM, Veronica. One-factor-at-a-time versus designed experiments. The American Statistician, 1999, vol. 53, no 2 (Jan-Feb 2012); p. 126-131.

Se usaron 200 μL de cada medio de la tabla 4 donde se inoculó la cepa al 2% de caldo MRS anteriormente realizados e inoculados con el microorganismo, la prueba se realizó por duplicado

Seguidamente se obtuvo la DO máx utilizando el lector multimodal de microplacas para luego haber realizado un análisis estadístico ANOVA en el programa IBM® SPSS Statistics® comparando las DO máx y $\mu\text{máx}$ obtenidas del medio escogido en el apartado anterior (medio M1) contra ese mismo medio elaborado sin un compuesto (medio M2 hasta medio M12) y así se obtuvieron los compuestos que no daban propiedad alguna al microorganismo para generar mayores DO.

2.3.3 Determinación de las concentraciones de FC y FN En la tabla 4, se realizó un factorial de tres niveles, donde se varió la concentración tanto de la FC como la FN para encontrar los efectos que estos tenían en el crecimiento de la cepa *L. salivarius*.

Para esto se realizó una prueba de crecimiento con el lector multimodal de microplacas con dos réplicas y así analizar los resultados (DO máx y $\mu\text{máx}$) realizando una prueba estadística [ANOVA – Duncan] usando el programa IBM® SPSS Statistics®, con el fin de obtener el medio óptimo para el crecimiento de los microorganismos.

Tabla 5 Diseño factorial de las concentraciones de FC y FN del medio a realizar

Factor	Nivel			Justificación
	Bajo	Medio	Alto	
Concentración FC [g/l]	20	40	60	Yeo et al. (2018) en su trabajo considera el rango entre 10 y 60 g/l de concentración de FC para obtención de biomasa para la cepa <i>Lactobacillus salivarius</i>
Concentración FN [g/l]	8	20	40	Panesar et al. (2007) consideran la adición de 2 hasta 20 g/l de concentración de FN a medios realizados con permeado de suero

2.4 EVALUACIÓN DEL MEDIO ESCOGIDO EN ESCALA DE REACTOR DE LABORATORIO

Una vez seleccionado el medio de fermentación a emplear se realizó un cambio de escala en el volumen de reacción de 4 L. Para tal fin, se usó un fermentador Biostat® A agitado de 5 L, que permite el control de temperatura, agitación y pH en valores de 37 °C, 200 rpm y 6, respectivamente.

Se desarrollaron dos sistemas de fermentación en modo discontinuo y semicontinuo en cada uno se determinó la concentración y productividad de la biomasa.

✓ Proceso discontinuo

El fermentador fue inoculado con 2% v/v a la hora 0, seguidamente se realizaron tomas de muestras a las 3,6,9, 12 y 20 horas.

✓ Proceso semicontinuo

Seguidamente al terminar el proceso discontinuo al reactor se le ingresó 4 L de nuevo medio inoculando con 1% con inóculo nuevo, esto debido a que una parte (170 ml) del proceso discontinuo no se retiró.

Posteriormente a las 6 horas de crecimiento se realizó una alimentación de un pulso con la mezcla de 400 ml de EL al 10% p/v y PS al 10% p/v con ayuda de una bomba peristáltica de un caudal de 100 [ml/min], el proceso duró 24 horas a los cuales se realizan toma de muestras a la 0,3,6,9,12 y 24 horas.

Por último, se realiza una comparación entre la concentración y la productividad de biomasa para determinar el mejor modo de fermentación para una cepa *L. salivarius* DSPV 010.

2.5 AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS

Posteriormente se procesaron las muestras obtenidas en el reactor discontinuo y semicontinuo para determinación de concentración de azúcares reductores

empleando la prueba de ácido 3,5 - dinitrosalicílico (Ver protocolo en Anexo A) la cual se hizo posterior a la hidrólisis de lactosa (Ver protocolo anexo B).

Paralelamente estas muestras se usaron para la obtención del peso de biomasa seca en el tiempo centrifugado la muestra a 8000 g por 5 minutos para luego secarse a 65 °C en estufa y se pesó en balanza de precisión.

Con estos datos se realiza un ajuste de parámetros cinéticos utilizando diferentes modelos cinéticos que explican el crecimiento de microorganismos *Lactobacillus*.

2.6 ANÁLISIS DE LOS LIOPROTECTORES Y SU CONSERVACIÓN EN EL TIEMPO

Se emplearon tres lioprotectores en solución en las siguientes concentraciones: maltodextrina 18% p/v, PS 18% p/v y dextrosa 18% p/v.

La biomasa producida en el fermentador fue centrifugada a 5000 g durante 10 minutos a 17 °C, el sobrenadante fue descartado y el pellet de biomasa fue lavado dos veces con tampón fosfato salino (PBS de phosphate buffered saline) así se obtuvo 36 ml de pellet de biomasa que fueron repartidos en partes iguales en 6 falcon de 50 ml para luego ser mezclados de manera homogénea con 5 ml de la solución lioprotectora (maltodextrina, dextrosa o PS).

Posteriormente se dejaron los frascos en congelación en el freezer –80 °C por 6 horas para luego ser liofilizados en el mismo contenedor en el equipo Alpha 1-2 LDplus marca CHRIST a presión de vacío por 46 horas para luego realizar el secado secundario por 4 horas.

La biomasa en solución de lioprotectores fue almacenada en los frascos de 50 ml a temperatura ambiente por un mes, en el cual cada semana se realizaron diluciones decimales ringer $\frac{1}{4}$ para luego ser sembradas en placas de MRS y por último realizar un recuento en placa y así se encontró la concentración bacteriana viva.

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 EVALUACIÓN DE LS Y PS (ARLA FOOD INGREDIENTS, PORTEÑA) COMO MEDIOS DE CRECIMIENTO PARA EL MICROORGANISMO

Luego de 48h de incubación de la cepa *L. salivarius* DSPV 010 no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro medios evaluados, obteniendo un promedio de concentración bacteriana de $8,312 \pm 0,256$ log UFC/ml para LS; $8,019 \pm 0,125$ log UFC/ml para PS; $8,407 \pm 0,018$ log UFC/ml para LS +EL y $8,505 \pm 0,444$ log UFC/ml para PS + EL.

Por ende, el criterio que se empleó para la selección de la fuente de carbono (FC) para este proyecto fue el precio de compra de los subproductos LS y PS.

Tabla 6 Precio de compra para FC

FC	Costo
LS \$US/kg	1,143 ¹⁵
PS \$US/kg	0,397 ¹⁶

De acuerdo con los valores mostrados en la tabla 6, el precio de compra del LS es 2,88 veces superior que el de PS; por ende, el PS se usó como FC para la cepa *L. salivarius* DSPV 010. Además, la utilización del LS como FC no es viable debido a que las bacterias del género *Lactobacillus* spp tienen baja actividad proteolítica¹⁷; así las cosas, la cepa seleccionada para este trabajo tendría una baja capacidad de degradar las proteínas presentes en el LS y sería necesario plantear estrategias que permitieran eliminarlas al final del proceso.

¹⁵ DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADISTICA. Expo arancel 8017 {En línea}. {1 de Diciembre de 2017}. Disponible en: https://sitios.dane.gov.co/spee/Expo_Arancel_8017.rar

¹⁶ ARLA FOODS INGREDIENTS. Permeado de Suero bolsa de 25 kg. Argentina (2018).

¹⁷ BUSTOS GUTIÉRREZ, Paola Daniela, et al. Estudio del cultivo y concentración de una cepa *Lactobacillus plantarum* autóctona empleando un reactor y membranas semipermeables Secado y estabilización de biomasa. Chile. 2013. Tesis Doctoral. Universidad de Concepción. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química.

3.2 DETERMINACIÓN DEL MEDIO DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO

3.2.1 Evaluación de medios optimizados por otros autores para *L. salivarius*, con diferentes fuentes de carbono En la tabla 7 se muestran los valores máximos de densidad óptica obtenidos cuando se usa un medio MRS comercial, un MRS modificado con PS (propuesta de este trabajo), un MRS blanco positivo y los reportados por Yeo *et al.* (2018)

Tabla 7 DO máx y μ máx de los medios evaluados a condiciones de concentración de FC de 40 g/l del medio propuesto por Yeo *et al.*, 2018 y 20 g/l del medio MRS.

MEDIO	FUENTE DE CARBONO	DO máx[630nm]	μ Máx. [h ⁻¹]
MRS COMERCIAL	-	1,447±0,0015 ^a	0,389 ^a
MRS	Glucosa comercial	1,345±0,0173 ^b	0,165 ^b
	Permeado de suero	0,786±0,0108 ^c	0,103 ^c
	Maltodextrina	0,270±0,0128 ^d	0,208 ^d
	Dextrosa	0,833±0,0095 ^e	0,333 ^e
Yeo <i>et.al.</i> (2018)	Glucosa comercial	1,197±0,056 ^f	0,121 ^f
	Permeado de suero	1,320±0,0064 ^b	0,119 ^b
	Maltodextrina	0,229±0,0195 ^g	0,389 ^g
	Dextrosa	0,731±0,027 ^h	0,165 ^h

Letras minúsculas iguales es un mismo grupo que no presentan diferencia significativa entre ellos.

De acuerdo a los datos obtenidos en la tabla anterior se encuentra que en los medios que contienen FC maltodextrina el microorganismo no crece de manera adecuada, esto puede explicarse por el aumento de estrés osmótico¹⁸ que genera este compuesto a la cepa, por lo tanto, esta FC de carbono no es adecuada para un medio de crecimiento.

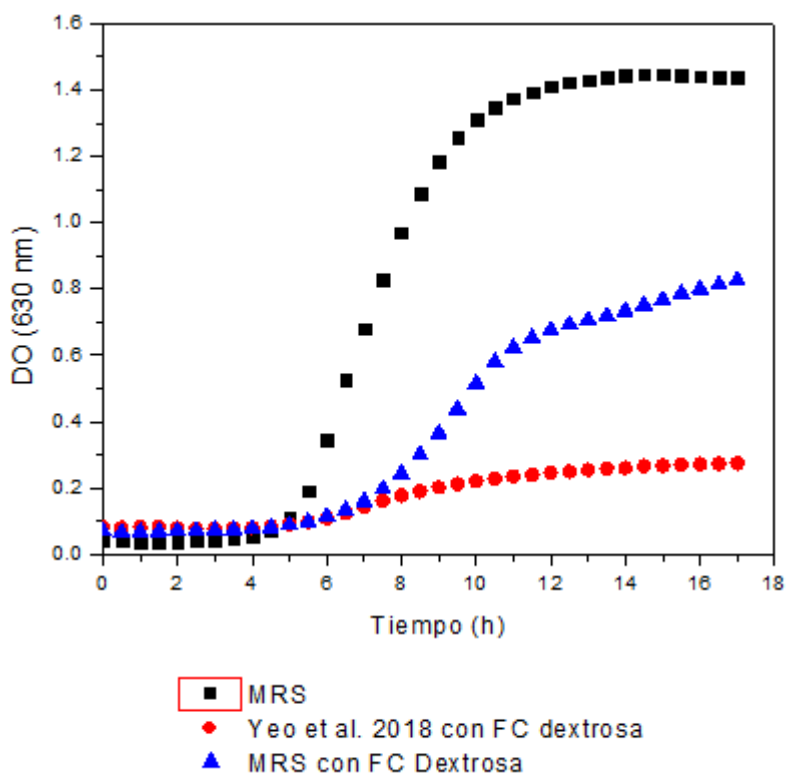
Como se puede observar de la tabla 7, las DO máx y μ máx obtenidas fueron mayores al utilizar el medio presentado por Yeo *et al.* (2018) modificando su FC por

¹⁸ LAHTINEN, Sampo, *et al.* Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 4 ed. CRC Press, 2011. 81 p.

PS, el cual no presenta diferencia significativa con respecto al MRS (los datos se pueden observar en el Anexo C).

Al igual, se pudo observar que al utilizar como FC dextrosa, hay diferencias significativas con el medio blanco positivo, esto se debe a que el microorganismo tarda en crecer y llegar a su fase estacionaria como se puede apreciar en la figura 3, por eso fue conveniente analizar esta FC mezclándola con el PS que demostró ser buena FC para la cepa, para ver su efecto en la DO.

Figura 3 Curva de crecimiento del medio blanco positivo MRS y medio Yeo et, al.2018 con FC Dextrosa



Por lo anterior, para este proyecto se usaron las concentraciones de los compuestos descritos por Yeo *et al.* (2018) pero evaluando como FC PS y PS con dextrosa, las concentraciones del medio que se estudió se pueden observar en la tabla 3 (Composición del medio presentado por el autor Yeo *et al.* (2018)).

3.2.2 Determinación de la composición óptima del medio En la tabla 8 se muestran los valores máximos de densidad óptica y $\mu_{\text{máx}}$ obtenida para los medios evaluados según el diseño experimental planteado en la tabla 4.

Tabla 8 DO máx y $\mu_{\text{máx}}$ de los medios evaluados con PS y PS con Dextrosa para prueba del método “one factor change at a time”

MEDIOS	DO máx (630nm)	μ Máx. [h^{-1}]
M1 (medio de control PS)	1,24 $\pm$ 0,097 ^a	0,20 ^a
M2	0,95 $\pm$ 0,197 ^b	0,13 ^b
M3	0,92 $\pm$ 0,135 ^b	0,13 ^b
M4	1,27 $\pm$ 0,095 ^a	0,21 ^a
M5	0,89 $\pm$ 0,076 ^b	0,14 ^b
M6	1,17 $\pm$ 0,111 ^a	0,22 ^a
M7 (medio de control PS con dextrosa)	1,30 $\pm$ 0,012 ^c	0,22 ^c
M8	1,06 $\pm$ 0,379 ^d	0,14 ^d
M9	1,12 $\pm$ 0,179 ^d	0,17 ^d
M10	1,30 $\pm$ 0,036 ^c	0,22 ^c
M11	0,92 $\pm$ 0,058 ^d	0,18 ^d
M12	1,30 $\pm$ 0,02 ^c	0,21 ^c

Letras minúsculas iguales es un mismo grupo que no presentan diferencia significativa entre ellos.

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla 8 se aprecia que tanto para medios con dextrosa como para medios sin dextrosa no hay diferencias significativas en la densidad óptica máxima y $\mu_{\text{máx}}$ cuando los medios contienen todos los compuestos (medio M1 sin dextrosa y M7 con dextrosa); o cuando hay ausencia de uno de los siguientes compuestos: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (medio M4 sin dextrosa y M10 con dextrosa) y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (medio M6 sin dextrosa y medio M12 con dextrosa).

Previo este análisis se expone que estos compuestos no le otorgan propiedades al medio para mejorar el crecimiento de la cepa estudiada, esto confirma los resultados

presentados por Berisvil Ayelen (2019) quien concluye que estas sales no ayudan al crecimiento del microorganismo tratado.

Por otro lado, tanto la FC de PS como la de PS reforzada con dextrosa no presentan diferencia significativa ($P= 0,077$) con respecto al medio positivo blanco (los datos se pueden observar en el Anexo D) por lo cual cualquiera de estas dos FC pudo usarse en el medio de crecimiento.

3.2.3 Determinación de las concentraciones de FC y FN En la tabla 9 y 10 se encuentran los valores obtenidos de DO máx y $\mu_{\text{máx}}$ para cada concentración evaluada sea con FC de PS o PS con dextrosa.

Tabla 9 Concentraciones evaluadas y DO máx y $\mu_{\text{máx}}$ de medios con FC de PS

	CONCENTRACION[g/l]	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
EL	8	X	X	X	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	X	X	X	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	X	X	X
PS	20	X	0	0	X	0	0	X	0	0
	40	0	X	0	0	X	0	0	X	0
	60	0	0	X	0	0	X	0	0	X
	DO máx	1,100	0,939	1,061	1,278	1,199	1,102	1,283	1,049	0,870
	μ Máx. [h^{-1}]	3,653	4,201	4,232	4,976	3,615	3,566	3,947	4,001	3,444

Tabla 10 Concentraciones evaluadas y DO máx y μ máx de medios con FC de PS con dextrosa

	CONCENTRACION [g/l]	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
EL	8	X	X	X	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	X	X	X	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0	X	X	X
PS con dextrose	20	X	0	0	X	0	0	X	0	0
	40	0	X	0	0	X	0	0	X	0
	60	0	0	X	0	0	X	0	0	X
	DO máx	0,953	0,923	0,909	1,149	1,223	1,118	1,307	1,300	1,187
	μ Máx. [h-1]	4,177	3,798	4,842	5,679	5,423	5,302	5,670	3,262	5,132

De acuerdo con el estadístico realizado (Anexo E) y los datos mostrados en la tabla 9 se encontró que, para cada una de las FC y sus concentraciones, hubo diferencia significativa en los tres niveles evaluados; así las cosas, se concluye que el mejor valor de concentración corresponde al menor nivel de concentración de FC, es decir 20 [g/l].

Para la concentración de FN no se encontró diferencia significativa entre los niveles alto y medio, pero, debido al costo de EL se escoge el nivel medio para el desarrollo del proyecto, es decir 20 [g/l].

Al igual se encontró que entre las dos FC evaluadas (PS y PS con dextrosa) no existieron diferencias significativas (Anexo E), pero se evidenció que la concentración de FN para obtener una DO máx y μ máx, ver tabla 10, del medio de PS con dextrosa es el nivel alto lo cual generaría un costo elevado del medio, optando por escoger como FC PS.

3.3 EVALUACIÓN DEL MEDIO ESCOGIDO EN ESCALA DE REACTOR DE LABORATORIO

En la tabla número 11 se puede observar las concentraciones y productividades obtenidas durante los dos procesos de fermentación.

Tabla 11 Concentración y productividad de los sistemas de fermentación evaluados

Sistema	Concentración $\left[\frac{g\ X}{L}\right]$	Productividad $\left[\frac{g\ X}{h\ x\ l}\right]$
DISCONTINUO	9	0,450
SEMICONTINUO	14,55	0,606

De acuerdo a los datos anteriores se puede observar que al realizar un incremento con una mezcla de EL y PS en el sistema semicontinuo la producción de biomasa se eleva 1,35 veces más que en el proceso discontinuo, por lo cual el sistema de fermentación que mayor productividad genera con una cepa *L. salivarius* DSPV 010 es un semicontinuo.

3.4 AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS

Como se puede observar en la figura 4 la tendencia de consumo de sustrato de los dos sistemas de fermentación tiende a ser igual a partir de diez horas de crecimiento, por tal motivo para el ajuste de parámetros cinéticos se usaron los datos de concentración de azúcar y biomasa (ver tabla 12) del reactor en discontinuo siguiendo una aproximación lineal de los modelos de Contois y Monod.

Figura 4 Concentración de biomasa y consumo de sustrato en el tiempo

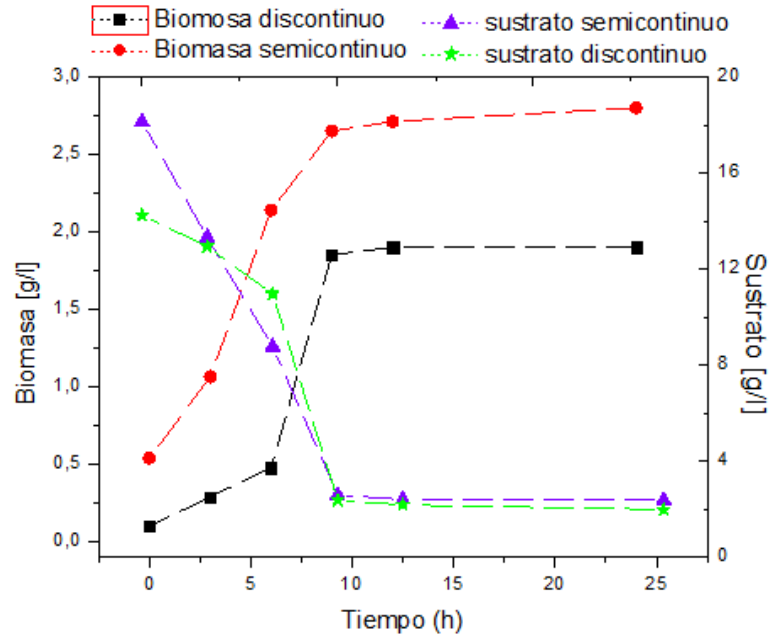


Tabla 11 Concentración de biomasa y sustrato en el tiempo para un sistema discontinuo

Tiempo [h]	Biomasa [g/l]	Sustrato [g/l]
0	0,100	14,240
3	0,288	12,930
6	0,475	10,960
9	1,850	2,360
12	1,900	2,170
20	1,900	1,970

Teniendo en cuenta lo anterior se plantearon los balances de masa en estado transitorio para un fermentador en discontinuo donde la variable de entrada es la concentración de sustrato, los cuales se pueden observar en la tabla 13.

Tabla 13 Balances de masa para un sistema discontinuo alimentado con un pulso

Compuesto	Balances
Biomasa (X)	$\frac{dX}{dt} = r_x(1)$
Sustrato (S)	$\frac{dS}{dt} = r_s(2)$

Los desarrollos matemáticos de los balances y el RMSE se pueden observar en el anexo F, al igual se encontró que los datos de concentración de azúcar y biomasa del fermentador en discontinuo se ajustaron al modelo Contoins (ver anexo G) tal como fue reportado por Calderón, 2017 además este modelo es apropiado para describir los procesos donde hay hidrólisis como es el caso de azúcares no fermentables [18].

En la tabla 14 se muestran las velocidades de reacción, parámetros cinéticos y la cinética de crecimiento microbiano, coeficiente de correlación y porcentaje de error.

Tabla 14 Modelo cinético para el proceso discontinuo

Velocidades de reacción	Biomasa (X)	$rx = \mu X \quad (3)$
	Sustrato (S)	$rs = -\left[\frac{\mu}{Y_{XS}} + ms\right]X \quad (4)$
Modelo cinético de crecimiento	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s X + S} \quad (5)$	
Parámetros cinéticos	$\mu_{\max} = 1,143 \text{ h}^{-1}; k_s = 1,279 \left[\frac{Kg}{m^3}\right]$	

	$Y_{XS} = 0,413 \left[\frac{g \text{ Biomasa}}{g \text{ Sustrato}} \right]; ms = 0,790 h^{-1}$
Coeficiente de correlación	0.859
RMSE	0,208

3.5 ANÁLISIS DE LOS LIOPROTECTORES Y SU CONSERVACIÓN EN EL TIEMPO

Los datos de la concentración bacteriana durante el mes de conservación se pueden observar en la tabla 15.

Tabla 15 Concentración bacteriana durante el mes de conservación

	Log [UFC/ml]		
	Maltodextrina	PS	Dextrosa
Semana 0		8,936±0,138	
Semana 1		9,332±0,411	
Semana 2	7,123±0,072	8,332±0,411	5,454±0,678
Semana 3		6,336±0,311	
Semana 4		4,539±0,368	

Los espacios en blanco que se presentan en esta tabla son aquellos pellets de biomasa con solución lioprotectora donde los recuentos fueron menores de 300 UFC

Los recuentos realizados en placa de MRS para la solución lioprotectora de maltodextrina con biomasa y dextrosa con biomasa antes de realizar el liofilizado evidenciaron ausencia de concentración bacteriana, en cambio para PS con biomasa se encontró un promedio de 8,936±0,138 Log UFC/ml.

Después de haber realizado la liofilización se encontró que el recuento para la solución de PS con biomasa tiene un promedio de 9,332±0,411 Log UFC/ml y para los lioprotectores dextrosa y maltodextrina los recuentos son menores a 100 UFC en diluciones de -7,-6 y -5 evidenciando que las BAL en estos lioprotectores no tienen capacidades suficientes para subsistir.

De acuerdo a lo anterior se sembraron en placas de MRS diluciones seriadas en el orden de -2,-3,-4 y -5 para maltodextrina y dextrosa encontrando en los recuentos $5,454 \pm 0,678$ Log UFC/ml para dextrosa, $7,123 \pm 0,072$ Log UFC/ml y $8,332 \pm 0,411$ Log UFC/ml evidenciando la disminución de concentración bacteriana en PS.

Para la cuarta semana la mejor viabilidad del liófilo que se protegió con PS presentó recuentos de $4,539 \pm 0,368$ log UFC/ml y en dextrosa se observó una menor concentración bacteriana, con recuentos < 100 UFC/ml.

Por lo tanto, se puede concluir que el recubrimiento realizado con PS mejora la supervivencia de la cepa *L. salivarius* DSPV 010 durante el mes de viabilidad evaluado en comparación con los otros lioprotectores, esto se debió a que la bacteria tuvo mejor tolerancia a los procesos de congelación, liofilización y almacenamiento, al igual su membrana es muy compatible con el PS compuesto que también fue usado para realizar su sistema de fermentación.

4. CONCLUSIONES

- Se realizó una evaluación entre los subproductos de la industria láctea, Lactosuero y Permeado de Suero, encontrando que el sustrato adecuado fue el Permeado de suero para el crecimiento de una bacteria de *Lactobacillus salivarius*.
- A través de un proceso de fermentación semicontinua con una alimentación de 400 ml de Extracto de levadura al 10 % p/v y Permeado de Suero al 10% p/v en un reactor de 5 L, a 37 °C, pH de 6, 200 rpm se obtuvo una productividad de $0,606 \left[\frac{g}{l \cdot h} \right]$.
- Se encontró que los datos de biomasa en peso seco y la cantidad de sustrato en el tiempo se ajustaron al modelo de Contois; así mismo, se determinaron los valores asociados con los parámetros cinéticos encontrándose que la velocidad de crecimiento máxima es de $1,143 [h^{-1}]$ un rendimiento de la biomasa con respecto al sustrato de $0,413 \left[\frac{g \text{ biomasa}}{g \text{ sustrato}} \right]$.
- Por medio de la concentración microbiana encontrada usando el método de recuento en placa de MRS se determinó que el Permeado de suero fue el mejor lioprotector después de estar en almacenamiento a temperatura ambiente durante un mes.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar otros parámetros que puedan afectar el modelo de crecimiento del microorganismo como producción de ácido láctico e inhibición por producto o sustrato.
- Realizar una prueba de detección de ácido láctico para posterior aprovechamiento de este subproducto después de realizar el proceso de fermentación.
- Mantener el control de la humedad relativa del medio ambiente donde estén contenidas las capsulas de almacenamiento para disminuir la movilidad del agua y tasa de pérdida de viabilidad.

BIBLIOGRAFIA

ARASARATNAM, Vasanthy; SENTHURAN, Appadurai; BALASUBRAMANIAM, Kandiah. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. In: Enzyme and Microbial Technology. Vol 19. (Sep-Aug, 1995); p.482-486.

BERISVIL, Ayelen. Producción de biomasa y metodologías de conservación de inóculos probióticos destinados a pollos parrilleros para mejorar la performance productiva en sistemas intensivos. Santa Fe, Argentina. 2019. Tesis Doctoral. Laboratorio de Análisis de Alimentos, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet Litoral), UNL-CONICET

CALDERÓN VARGAS, Juan Fernando. Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus Acidophilus* en la fermentación de sustrato complejo. Colombia. 2017. Tesis de Licenciatura. Fundación Universidad de América.

CARVALHO, Ana S., et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. In: International Dairy Journal, 2004, vol. 14, no 10 (Oct, 2004); p. 835-847.

CHAMPAGNE, Claude P., et al. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. International journal of food microbiology, vol. 149, no 3 (Oct, 2011); p. 185-193.

LIM, C. H., et al. Optimization of growth medium for efficient cultivation of *Lactobacillus salivarius* i 24 using response surface method. In: Malaysian Journal of Microbiology, vol. 3, no 2 (2007), p. 41-47.

MOTTA-CORREA, Yeisson; MOSQUERA, Welner Jair. AVANCES EN EL APROVECHAMIENTO DEL LACTOSUERO COMO MATERIA PRIMA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. En: Ciencia y Tecnología Alimentaria, vol. 13, no 1 (2015).

MORALES-GARCÍA, Y., et al. Bacterias preservadas, una fuente importante de recursos biotecnológicos. En: BioTecnología, vol. 14, no 2 (2010); p. 11-29.

PANESAR, Parmjit S., et al. Bioutilisation of whey for lactic acid production. In: Food chemistry, vol. 105, no 1 (Sep-Nov 2006); p. 1-14.

POSADA FLOREZ, E. Principios básicos de crioconcentración y la liofilización. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, Chinchiná (Colombia). Centro Nacional de Investigaciones de Café, 1990.

YÉPEZ, Bárbara Calderón, et al. Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para Lactobacillus con potencial probiótico aislado del pulque. Investigación Universitaria Multidisciplinaria. En: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar, 2013, no 12, (Jun-Sep, 2013); p. 133-144.

YEO, Soyoung, et al. Determination of Optimized Growth Medium and Cryoprotective Additives to Enhance the Growth and Survival of Lactobacillus salivarius. In: Journal of microbiology and biotechnology, vol. 28, no 5 (Mar, 2018); p. 718.

ANEXOS

ANEXO A: PROTOCOLO PARA REALIZACIÓN DE HIDRÓLISIS DE SACAROSA O LACTOSA

Luego de centrifugar la muestra proveniente del reactor, transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf (procedimiento habitual para separar la biomasa del sobrenadante).

1) Centrifugar nuevamente el eppendorf para eliminar biomasa residual (5 min a 6000 rpm).

2) Tomar 0,5 mL del sobrenadante y volcarlo en otro eppendorf ("A")

3) En el Eppendorf "A" alicuotar 50 microlitros de ácido clorhídrico comercial

(NO SUMERGIR LA MICROPIPETA EN EL FRASCO, VOLCAR UN PEQUEÑO VOLUMEN DE ACIDO EN UN VASO DE PRECIPITADO Y TOMAR DE AHÍ)

4) Llevar el eppendorf "A" a baño maría de 70° C durante 15 minutos.

5) Transferir 100 microlitros del hidrolizado a un tubo de DQO con 9,9 ml de agua + 20 microlitros de hidróxido de sodio 10 N (Esta es la dilución 1/100 madre para determinar directamente reductores).

6) Neutralizar previo a determinar azúcares reductores

ANEXO B. PROTOCOLO PARA LA DETERMINACION DE AZUCARES

REDUCTORES POR PRUEBA 3,5 DINITROSALICILICO

* Preparación del reactivo DNS: ácido dinitrosalicílico al 1% (10 g/L) + NaOH 1% (10 g/L), en agua destilada. (preparación 24 h antes de su uso, guardar en heladera protegido de la luz)

* Stock de glucosa: vaso de precipitado en estufa de secado

* Lectura a 540 nm

* **Linealidad hasta 1.0 g/L de azúcar aproximadamente.**

Preparación de Curva de calibrado

* Se realiza cada vez que se prepara reactivo DNS

* Preparar patrón de glucosa disolviendo **0.1 g en 10 mL** de agua destilada (Conc. = 10 g/L)

* Preparar muestras por DUPLICADO

	Blanco	1	2	3	4	5	6
Patrón glucosa (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
Agua destilada (mL)	10	9.8	9.6	9.4	9.2	9.0	8.8
Conc. glucosa (g/L)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2

Procedimiento

- 1) Diluir las muestras (con agua destilada) según sea necesario en cada caso
- 2) En un tubo HACH, pesar 0,1 g en 10 ml de agua destilada (patrón de glucosa)
- 3) Realizar la dilución del patrón de glucosa en tubos HACH, mostrados en la tabla anterior
- 4) Incluir un blanco de reactivos (luego restar este valor a cada valor de las muestras)
- 5) En otros tubos HACH, agregar 0.335 uL de reactivo DNS + 0.335 uL de muestra diluida.

- 6) Homogeneizar suavemente
- 7) Llevar a ebullición por 5 min en baño maría, se puede realizar este proceso en un baño termostático.
- 8) Enfriar los tubos sumergiendo la gradilla en agua de la canilla
- 9) Agregar 3.3 mL de agua destilada a cada tubo. Homogeneizar por inversión (varias veces)
- 10) Dejar en reposo durante 15 min y luego leer a 540 nm.
- 11) El cromatógrafo debe ponerse en 0 con agua destilada.

ANEXO C. PRUEBA ESTADÍSTICA ANOVA-DUNCAN PARA PRUEBA DE MEDIOS PROPUESTOS POR Yeo et al. (2018); MRS MODIFICADO Y MRS COMERCIAL GENERADA POR EL PROGRAMA IBM® SPSS STATISTICS®

ANOVA

DO

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4,996	8	,625	1094,968	,000
Dentro de grupos	,010	18	,001		
Total	5,007	26			

Subconjuntos homogéneos

DO

Duncan^a

MEDIOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Yeo.et.al.,2018 MALTODEXTRINA	3	,2267							
MRS MALTODEXTRINA	3		,2700						
Yeo.et.al.,2018 DEXTROSA	3			,7300					
MRS PERMEADO	3				,7867				
MRS DEXTROSA	3					,8333			
Yeo.et.al.,2018	3						1,1967		
Yeo.et.al.,2018 PERMEADO	3							1,3200	
MRS GLUCOSA	3							1,3500	
MRS comercial	3								1,4500
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	,141	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

ANEXO D. PRUEBA ESTADÍSTICA ANOVA-DUNCAN PARA PRUEBA DE MEDIO PROPUESTO POR Yeo et al. (2018) APLICANDO EL MÉTODO ONE FACTOR CHANGE AT A TIME, GENERADA POR EL PROGRAMA IBM® SPSS STATISTICS®

ANOVA PERMEADO

NMÁX

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,439	5	,088	5,697	,006
Dentro de grupos	,185	12	,015		
Total	,625	17			

Subconjuntos homogéneos

NMÁX

Duncan^a

MEDIOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Medio sin MnSO4H2O	3	,8933	
Medio sin Buffer	3	,9267	
Medio sin tween 80	3	,9533	
Medio sin FeSO47H2O	3		1,17
medio completo	3		1,24
Medio sin MgSO47H2O	3		1,27
Sig.		,584	,352

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

ANOVA PERMEADO CON DEXTROSA

NMÁX

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,388	5	,078	2,553	,085
Dentro de grupos	,365	12	,030		
Total	,753	17			

Subconjuntos homogéneos

NMÁX

Duncan^a

MEDIOS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
medio sin MnSO ₄ H ₂ O	3	,9167	
Medio sin tween	3	1,0633	1,0633
Medio sin buffer	3	1,1233	1,1233
Medio sin MgSO ₄ 7H ₂ O	3		1,3000
Medio sin FeSO ₄ 7h ₂ o	3		1,3000
Medio completo	3		1,3033
Sig.		,192	,149

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

ANOVA FUENTES DE CARBONO

DO

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	,017	2	,009	2,459	,166
Dentro de grupos	,021	6	,003		
Total	,038	8			

Subconjuntos homogéneos

DO

Duncan^a

Medios	N	Subconjunto para alfa = 0.05 1
PERMEADO	3	1,2433
PERMEADO CON DEXTROSA	3	1,3033
MRS	3	1,3500
Sig.		,077

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

- a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

ANEXO E. PRUEBA ESTADÍSTICA ANOVA-FACTORIAL PARA PRUEBA DE DETERMINACIÓN DE FC Y FN GENERADA POR EL PROGRAMA IBM® SPSS STATISTICS®

Análisis univariado de varianza

Factores inter-sujetos			
		Etiqueta de valor	N
Fuente	1,00	permeado	18
	2,00	permeado con dextrose	18
C.nitrógeno	1,00	8 min	12
	2,00	20 med	12
	3,00	40 max	12
C.cabono	1,00	20 min	12
	2,00	40 med	12
	3,00	60 máx	12

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Nmáx

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,709 ^a	17	,042	31,219	,000
Intersección	44,194	1	44,194	33092,181	,000
F.cabono	,004	1	,004	2,956	,103
C.nitrógeno	,293	2	,147	109,834	,000
C.cabono	,113	2	,056	42,171	,000

F.cabono * C.nitrógeno	,149	2	,074	55,620	,000
F.cabono * C.cabono	,051	2	,025	18,984	,000
C.nitrógeno * C.cabono	,076	4	,019	14,217	,000
F.cabono * C.nitrógeno * C.cabono	,024	4	,006	4,419	,012
Error	,024	18	,001		
Total	44,926	36			
Total corregido	,733	35			

a. R al cuadrado = ,967 (R al cuadrado ajustada = ,936)

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: Nmáx

Fuente	C.nitrógeno	C.cabono	Media	Desv. Desviación	N
Permeado	8 min	20 min	1,0995	,05020	2
		40 med	,9385	,03182	2
		60 máx	1,0610	,01273	2
		Total	1,0330	,07996	6
	20 med	20 min	1,2775	,02192	2
		40 med	1,1985	,02475	2
		60 máx	1,1015	,04031	2
		Total	1,1925	,08222	6
	40 max	20 min	1,2830	,00424	2
		40 med	1,0485	,01485	2
		60 máx	,8695	,04031	2
		Total	1,0670	,18648	6
	Total	20 min	1,2200	,09655	6
		40 med	1,0618	,11830	6
		60 máx	1,0107	,11387	6
		Total	1,0975	,13812	18
	8 min	20 min	,9525	,07283	2

permeado con dextrosa		40 med	,9225	,01485	2
		60 máx	,9090	,02546	2
		Total	,9280	,04039	6
	20 med	20 min	1,1485	,01344	2
		40 med	1,2225	,01626	2
		60 máx	1,1180	,07920	2
		Total	1,1630	,06045	6
	40 max	20 min	1,3065	,01061	2
		40 med	1,2995	,04596	2
		60 máx	1,1870	,02546	2
		Total	1,2643	,06460	6
	Total	20 min	1,1358	,16211	6
		40 med	1,1482	,17961	6
		60 máx	1,0713	,13519	6
		Total	1,1184	,15426	18
Total	8 min	20 min	1,0260	,09905	4
		40 med	,9305	,02228	4
		60 máx	,9850	,08928	4
		Total	,9805	,08157	12
	20 med	20 min	1,2130	,07594	4
		40 med	1,2105	,02201	4
		60 máx	1,1098	,05218	4
		Total	1,1777	,07050	12
	40 max	20 min	1,2948	,01509	4
		40 med	1,1740	,14757	4
		60 máx	1,0282	,18536	4
		Total	1,1657	,16830	12
	Total	20 min	1,1779	,13459	12
		40 med	1,1050	,15185	12
		60 máx	1,0410	,12331	12
		Total	1,1080	,14470	36

Pruebas post hoc

Subconjuntos homogéneos

C.nitrógeno

Subconjuntos homogéneos

		Nmáx	
Duncan ^{a,b}			
C.nitrógeno		Subconjunto	
o	N	1	2
8 c.min	12	,9805	
40 c.max	12		1,1657
20 c.med	12		
Sig.		1,000	,429

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,001.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,000.

b. Alfa = ,05.

C.cabono

Subconjuntos homogéneos

		Nmáx		
Duncan ^{a,b}				
C.cabon		Subconjunto		
o	N	1	2	3
60 máx	12	1,0410		
40 med	12		1,1050	
20 min	12			1,1779
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = ,001.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 12,000.

b. Alfa = ,05.

**ANEXO F: DESARROLLO DE LOS BALANCES DE FERMENTADOR
DISCONTINUO**

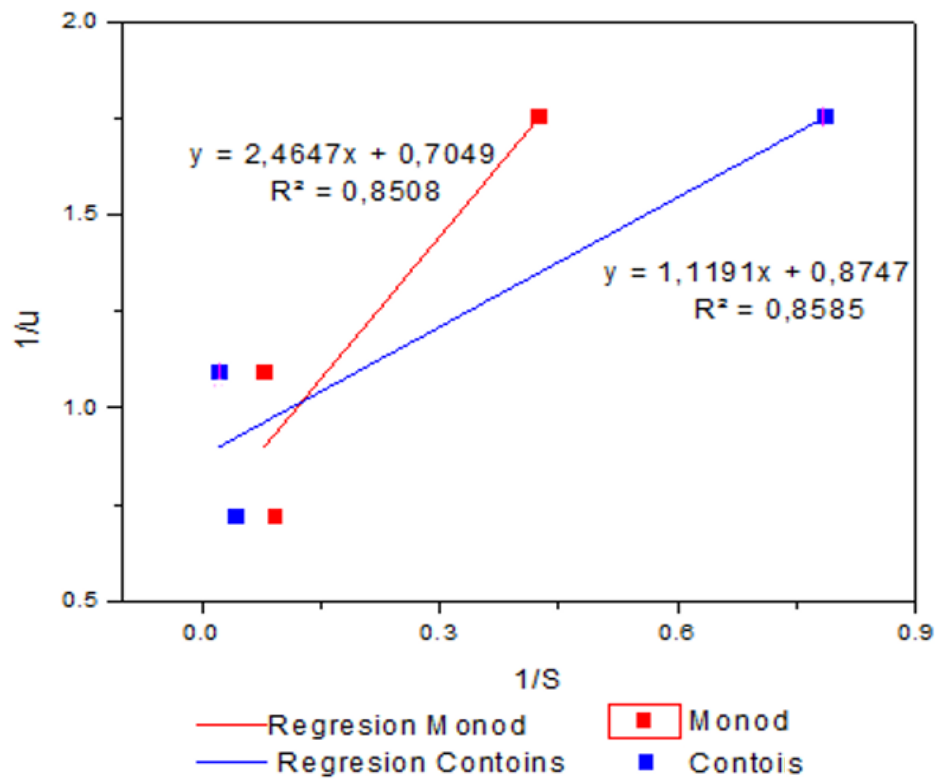
BALANCE PARA BIOMASA	$rxV = \frac{d(XV)}{dt} (1)$ <i>Volumen cte.</i> $rx = \frac{dX}{dt} (2)$ $rx = \mu X (3)$ <i>Reemplazando (2) en (3)</i> $\mu X = \frac{dX}{dt} (4)$
BALANCE PARA SUSTRATO	$-rsV = \frac{d(sV)}{dt} (5)$ <i>Volumen cte.</i> $-rs = \frac{ds}{dt} (6)$ $-rs = -qsX (7)$ <i>Reemplazando (6) en (7)</i> $-qsX = \frac{ds}{dt} (8)$ $qs = \frac{1}{Y_{xs}} + \frac{ms}{\mu} (9)$ <i>Reemplazando (7) en (9)</i> $rs = - \left[\frac{1}{Y_{xs}} + \frac{ms}{\mu} \right] X (10)$

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	
MONOD	$\mu = \mu_{\text{máx}} \frac{S}{K_s + S} (9)$
CONTOIS	$\mu = \mu_{\text{máx}} \frac{S}{K_s X + S} (10)$

ERROR DE MÍNIMOS CUADRADOS	
RMSE	$\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\mu_{experimental} - \mu_{teórico})^2}{n}} \quad (11)$ n es el número total de datos $\mu_{teórico}$ obtenido por el modelo usado

ANEXO G AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS PARA EL MODELO DE MONOD Y CONTOINS EN UN REACTOR DISCONTINUO

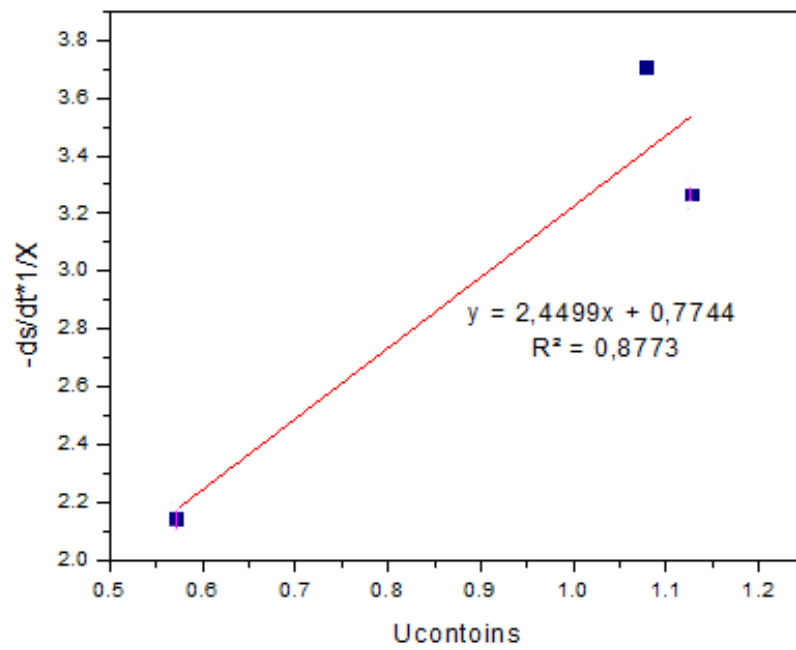
Curva Modelos cinéticos



ERROR CUADRÁTICO MEDIO (RMSE)	
MONOD	0,214
CONOTOIS	0,207

GRADO DE AJUSTE (R^2)	
MONOD	0,851
CONOTOIS	0,859

Rendimiento usando modelo de Contoins



ms [h ⁻¹]	0,774
Yxs [g biomasa/g sustrato]	0,408