

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Desarrollo tecnológico y generación de riqueza sustentable

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

4DO8 Desarrollo tecnológico para la sustentabilidad ambiental, energética y alimentaria.

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Estudios de inhibición del crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* por productos finales de la fermentación

Ingeniería en biotecnología

Marco Antonio González Domínguez

Profesor PAP: Felipe Sánchez Carrillo

Asesor PAP: Oscar Ariel Rojas Rejón

Tlaquepaque, Jalisco, diciembre 2018

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP.....	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen.....	2
1. Introducción	3
1.1. Objetivos	3
1.2. Justificación	3
1.3 Antecedentes	4
1.4. Contexto.....	7
2. Desarrollo.....	8
2.1. Sustento teórico y metodológico.....	8
2.2. Planeación y seguimiento del proyecto.....	8
3. Resultados del trabajo profesional	15
4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto	27
5. Conclusiones	30
6. Bibliografía	31
Anexos (en caso de ser necesarios).....	35

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son una modalidad educativa del ITESO en la que el estudiante aplica sus saberes y competencias socio-profesionales para el desarrollo de un proyecto que plantea soluciones a problemas de entornos reales. Su espíritu está dirigido para que el estudiante ejerza su profesión mediante una perspectiva ética y socialmente responsable.

A través de las actividades realizadas en el PAP, se acreditan el servicio social y la opción terminal. Así, en este reporte se documentan las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo del proyecto, sus incidencias en el entorno, y las reflexiones y aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

Se realizó el estudio de la cinética de crecimiento de tres microorganismos catalogados como probióticos. Estos fueron cultivados en medios de cultivo comerciales a condiciones normales y añadiendo compuestos químicos que son productos del metabolismo microaerófilo de cada uno. Esto con el objetivo de comparar y conocer el efecto de inhibición de estos compuestos en cada microorganismo, así como el ajuste de los datos experimentales a modelos matemáticos de cinética de crecimiento microbiano. Utilizando Excel (versión 2016) y Matlab (versión 2017) se analizaron los datos para ajustar los datos a modelos de crecimiento con y sin inhibidores. Se logró observar que el ácido láctico, mezclado a un 1% con relación al volumen de operación tiene efecto inhibitor en la cinética de crecimiento de *Saccharomyces boulardii*. Mientras que el etanol mezclado al 10% también inhibe el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* sin representar ser una concentración letal. Ambos compuestos resultaron ser competitivos en el crecimiento de cada microorganismo, ajustándose todos al mismo modelo matemático. No se alcanzó a analizar este efecto en la bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. Dejando abierta la posibilidad de estudios posteriores con estos microorganismos probióticos.

1. Introducción

1.1. Objetivos

El objetivo del presente proyecto es evaluar el efecto de la inhibición por productos terminales del metabolismo microaerófilo en el cultivo de 3 microorganismos. Para ello, se analizará el comportamiento cinético de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* con diferentes concentraciones de inhibidores para determinar la mejor condición de crecimiento de cada uno de ellos. También mediante ajustes matemáticos se quiere conocer las constantes cinéticas de un modelo de inhibición y de modelos cinéticos sin inhibición según sea el caso para analizar.

1.2. Justificación

El ser humano contiene una cantidad de células más elevada en la microbiota que de células constitutivas. Estas células cumplen diferentes funciones en el organismo que permite un equilibrio de salud de este. Esta relación simbiótica lleva a cabo funciones metabólicas, de barrera y de interacción (Gibson y Macfarlane, 1995).

Existe una gran variedad de microorganismos en la microbiota humana, dentro de los cuales destacan los del género *Lactobacillus* y *Saccharomyces*. Los lactobacilos se ven inhibidos en su crecimiento bajo la presencia de etanol según diversos autores (Liu, Tsai & Pan, 2018; Yuan et al., 2015). Mientras que la levadura *S. boulardii* presenta dificultades para crecer en la presencia de ácido láctico en el entorno (Herbrecht & Nivoix, 2005).

Este trabajo pretende analizar el crecimiento de los dos microorganismos probióticos en diferentes concentraciones de etanol y ácido láctico. Debido a que la levadura produce el primer producto mencionado y los lactobacilos el segundo ya mencionado. Esto para conocer las constantes de inhibición en medios de cultivo comerciales buscando la inclusión de estos dos microorganismos a un cultivo combinado. Este cultivo combinado permitirá la creación de un

alimento probiótico con numerosos beneficios para los consumidores, especialmente para aquellos que sufren de problemas gastrointestinales.

1.3 Antecedentes

La microbiota se desarrolla en el ser humano después del nacimiento. Primeramente, las cepas aerobias y anaerobias facultativas, colonizan el tubo digestivo, entre ellas las de *Lactobacillus* y *Escherichia coli*. Este mismo se va instaurando, en consecuencia, un microsistema en el que también destaca una gran proliferación de bacterias anaerobias pertenecientes mayoritariamente a los géneros: *Clostridium*, *Bacteroides* y *Bifidobacterium* (Guarner y Malagelada, 2003; Macfarlane y Dillon, 2007). Transcurridos los primeros años de vida, puede indicarse que la microbiota en el tracto gastrointestinal establecida, es bastante definitiva (Ducluzeau, 1993). Se cree que la composición bacteriana de la misma es muy variable, aunque la actividad metabólica es constante entre un humano y otro.

Con el fin de mejorar la salud del ser humano, durante años se ha estudiado la microbiota para la conservación de un buen estado de esta. Se han diseñado diferentes alimentos para favorecer un mejor estado de la microbiota. Estos pueden ser prebióticos o probióticos. Los prebióticos se definen como alimentos no digeribles que llegan al tracto digestivo y sirven como alimento a los microorganismos presentes. Los probióticos por su parte son alimentos con microorganismos vivos que pertenecen a la microbiota natural humana y se caracterizan por tener una mínima o nula capacidad patógena, así como por desempeñar funciones favorables sobre la salud y el bienestar de los huéspedes (Rodríguez González, 2009).

Los microorganismos denominados como probióticos deben cumplir ciertos requisitos para ser considerados como tales. Estos deben ser pertenecientes a la microbiota del intestino humano, no ser patógeno ni toxigénico, poder adherirse a las células epiteliales del tracto gastrointestinal, mantenerse viables en el medio ácido estomacal y en la bilis del duodeno, adaptación a la microbiota nativa sin necesidad de desplazar a los organismos nativos, producción de sustancias antimicrobianas y potencializar las funciones inmunológicas y metabólicas del huésped. Todas estas características deben reunir los microorganismos probióticos debido a los útiles procesos que pueden llevar a cabo en el tracto gastrointestinal.

Algunos de ellos se mencionan a continuación (Rodríguez González, 2009):

- Disminución del pH en el intestino para favorecer el crecimiento de microorganismos benéficos.
- Competición por nutrientes.
- Estimulación de la respuesta inmune. Favoreciendo la producción Inmunoglobulina A, aumentando la producción del interferón gamma y activando macrófagos.
- Aumento de la resistencia a la colonización por competir con patógenos para unirse a los sitios de adhesión en la superficie del epitelio gastrointestinal.
- Producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (sustancias antimicrobianas). Esto reduce la concentración de organismos patógenos.

Diferentes especies microbianas han sido estudiadas y aceptadas como probióticas con el paso de los años. La siguiente tabla muestra los géneros microbianos más utilizados para el impacto positivo a la salud de los consumidores (Salminen *et al.*, 2012).

Tabla 1. Géneros de microorganismos probióticos.

Género	Efectos
<i>Lactobacillus</i>	Ninguna cepa es patógena. Existen casos de cepas oportunistas en pacientes inmunodepresivos.
<i>Lactococcus</i>	No son organismos patógenos
<i>Streptococcus</i>	Sólo el <i>Streptococcus thermophilus</i> se usa en la producción de productos lácteos.
<i>Enterococcus</i>	Oportunista, algunas cepas muestran resistencia a antibióticos.
<i>Bacillus</i>	Sólo el <i>Bacillus subtilis</i> puede ser utilizados como probiótico ya que es el único organismo GRAS de su género.
<i>Bifidobacterium</i>	No son patógenos, algunas cepas se aíslan a partir de infecciones humanas.
<i>Saccharomyces</i>	En ningún caso son patógenos

Lactobacillus plantarum es una bacteria Gram(+) que pertenece al género de los lactobacilos. Esta bacteria habita de manera natural en la saliva y el tracto gastrointestinal humano. Su principal desempeño en el cuerpo es la producción de los dos isómeros de ácido láctico (L y D). También es capaz de sintetizar peróxido de oxígeno con el oxígeno consumido del ambiente, esto permite la exclusión de otros organismos que compitan por la supervivencia en el entorno. Posee la habilidad de vivir y reproducirse en temperaturas que oscilan los 15 y 45 °C (Nguyen, Kang & Lee, 2007). Esto le permite desarrollarse en la microbiota humana y estabilizar la población de microorganismos. Este microorganismo ha sido aislado de diversos productos lácteos comerciales y de humanos saludables. Hoy en día, estudiado como probiótico ha mostrado un efecto positivo en la eliminación de patógenos de pacientes infectados por virus o *Salmonella* (Muyyarikkandy & Amalaradjou, 2017). Siendo estas una de las mayores aplicaciones a nivel salud.

Lactobacillus rhamnosus es una bacteria Gram(+) que también pertenece al género de los lactobacilos. Habita también de manera natural en tracto intestinal y pertenece a los más de 1150 tipos de microorganismos presentes en la microbiota. Actualmente, se utiliza esta bacteria en la producción de lácteos y yogures. Es raro encontrar actividad patógena en este microorganismo, pero se ha presentado en pacientes inmunodepresivos (Youssef, Goma & Olmos-Dichara, 2005). El tipo más estudiado de este microorganismo es el *Lactobacillus rhamnosus* GG. Esta bacteria es estable en bilis, escalas ácidas de pH y muestra una facilidad para adherirse a las paredes del tracto gastrointestinal. Ha mostrado tener efectos positivos al momento de competir con *Salmonella typhimurium* en animales sanos (Fayol-Messaoudi et al., 2007). También es un método muy utilizado en tratamiento de diversos tipos de diarrea en pacientes infectados.

El etanol es un hidrocarburo muy utilizado en el área de investigación microbiana a nivel laboratorio. Este es producido por muchas levaduras fermentativas de azúcares dentro de los biorreactores. Este producto en altas concentraciones suele ser letal para ciertos tipos de bacterias gram-negativa. Ya que, al estar concentrado en el ambiente, produce interrupciones con la estructura de la membrana celular y la integridad de esta, generando una muerte de la célula. Mientras que las bacterias gram-positivas son conocidas por soportar medios con etanol

presente, en especial las bacterias ácido lácticas. Un estudio con 31 especies de lactobacilos demostró que existen 8 tipos de este que son altamente resistentes y capaces de desarrollarse, pudiendo llegar a reproducirse en un medio hasta con un 16% de concentración de etanol. Una de estas especies fue *Lactobacillus plantarum* y otras dos lograron hasta con un 18% de concentración de etanol. La inhibición de estas bacterias se observó cuando la concentración del medio alcanzaba de 10-14% de etanol, sin embargo, a menores concentraciones no se observaron resultados muy significativos. El tipo de bacterias ácido-lácticas es quién más tolera el etanol en los medios de cultivo hasta ahora. Sin embargo, el mecanismo de resistencia de bacterias gram-positiva al etanol no está completamente explicado aún (Liu & Qureshi, 2009). *Saccharomyces boulardii* es la única levadura conocida hasta el momento con efectos probióticos de manera preventiva y terapéutica. Su capacidad de crecer a una temperatura de 37°C y de sobrevivir el paso por el tracto gastrointestinal la hacen una opción atractiva en la producción de alimentos probióticos (Czerucka, Piche & Rampal, 2007). Uno de los mecanismos de acción más conocidos es la neutralización de toxinas liberadas por *C. difficile* (McFarland, 1994). También *S. boulardii* ha demostrado tener acción antitoxinas en infecciones por cólera. Se ha comprobado también la capacidad de desfosforilar endotoxinas como LPS producidas por *E. Coli* O55B5 (patógeno) e inactivar parcialmente efectos citotóxicos, esto gracias a la síntesis de fosfatasas por esta levadura. Un incremento en la producción de IgA ha sido reportado en estudios con ratas suministradas con probióticos de *S. boulardii* de acuerdo con Buts *et al* (2006). Esta levadura también ha sido asociada con el tratamiento de diarrea en niños durante muchos años demostrando una gran efectividad (Newberry, 2012).

1.4. Contexto

Desde hace años atrás se empezaron a formular y vender alimentos con múltiples propiedades nutritivas. Estos lograron captar la atención suficiente de los consumidores que fueron dando más y más popularidad a alimentos prebióticos y probióticos. Esto se puede ver reflejado en los últimos 5 años, donde ha proliferado la venta de estos alimentos a gran escala y alrededor de muchos países. A pesar de que son un recurso en la prescripción de los profesionales sanitarios desde hace bastante tiempo, ha sido en el último lustro cuando la población ha empezado a incluir estos suplementos de forma habitual en su dieta. Según diferentes estudios, aquellas

personas que llevan suficiente tiempo consumiendo estos productos, refieren un mejor estado de salud general, así como su decisión favorable a mantenerlos como parte importante de su vida.

Los principales mercados emergentes de alimentos probióticos se encuentran principalmente en América del norte y Europa, seguidos por Asia. En el año 2015, el continente europeo fue el principal consumidor de alimentos probióticos. Sin embargo, en países como India y China la demanda de estos alimentos ha incrementado considerablemente, principalmente en la industria panificadora y de confitería. Lo cual es un factor que hará crecer altamente el mercado asiático y el mercado de los alimentos probióticos en los próximos años. El mercado de ingredientes probióticos en el mercado general y los probióticos funcionales de alimentos y bebidas, han sido uno de los principales beneficiarios de la última tendencia de los alimentos fortificados y funcionales de todo el mundo. Con los avances en la tecnología de los alimentos, el requisito de ingredientes probióticos ha crecido a un ritmo considerable. Se prevé que el mercado de los ingredientes probióticos pueda llegar a USD 46,55 millones en 2020.

2. Desarrollo

2.1. Sustento teórico y metodológico

El presente estudio se realizó en los laboratorios de biorreactores, microbiología, biología molecular y bioseparaciones ubicados en el parque tecnológico del ITESO. Sede Tlaquepaque, Jalisco. Se dispuso de tres diferentes cepas proporcionadas por el asesor: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii*, así como los medios de cultivo y los biorreactores a utilizar.

2.2. Planeación y seguimiento del proyecto

Reactivación de cepas

Para la reactivación de los organismos bacterianos se utilizó una metodología similar a un estudio reciente (León-de la O *et al.*, 2013), haciendo uso de un agar MRS modificado y proporcionado por la institución.

- Preparar 50 mL de MRS para cada una de las cepas bacterianas a utilizar.
- Cultivar las bacterias mediante la técnica de estrías.
- Dejar incubar por un periodo de 24 horas a 37°C.
- Recolectar todo el contenido de la caja Petri y se verter en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con tapón de algodón con 100 mL de caldo MRS.
- Cultivar el caldo con un pH de 6.4.
- Dejar por un periodo de 24 horas sin agitación y manteniendo una temperatura constante de 37°C para cada uno de los matraces.

Para la reactivación de la levadura se siguió una metodología para la propagación de otra *Saccharomyces* (Arana Sánchez & Rojas Rejón, 2017)

- Preparar 50mL de agar YPD (extracto de levadura 10g/L, peptona bacteriológica 20g/L, glucosa 20g/L y agar 15g/L).
- Verter 30mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 100mL.
- Añadir el extracto de levadura, la peptona y la sacarosa.
- Después de disolver la mezcla, ajustar el pH a 5 usando ácido fosfórico, agar y agua destilada.
- Pasar mezcla a un frasco Schott para ser esterilizada en autoclave por 15 minutos a 121°C.
- Verter en una caja Petri para su gelificación dentro de la campana de flujo laminar cuando baje la temperatura.
- Cultivar las células usando un asa metálica con la técnica de estriado.
- Incubar por 24 horas a una temperatura de 37°C.

Una vez reactivada la levadura, seguir los siguientes pasos:

- Propagar usando 50mL de caldo YPD (extracto de levadura 10g/L, peptona bacteriológica 20g/L y glucosa 20g/L) a pH 5.
- Agregar 50mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 250 mL.
- Añadir el extracto de levadura, la peptona y la sacarosa hasta disolver la mezcla de todos los elementos.
- Ajustar el pH de la misma manera que el paso anterior.

- Verter 10mL en cada uno de los 2 matraces Erlenmeyer de 100mL (pre-inóculo).
- Añadir 20mL en cada uno de los matraces Erlenmeyer de 250mL (inóculo).
- Colocar el tapón de algodón y aluminio para proceder a esterilizar a 121°C por 15 minutos en autoclave.
- Después de la esterilización dejar enfriar para posteriormente añadir las células cultivadas.



Figura 1. Diagrama de Gantt del proyecto, mes de agosto

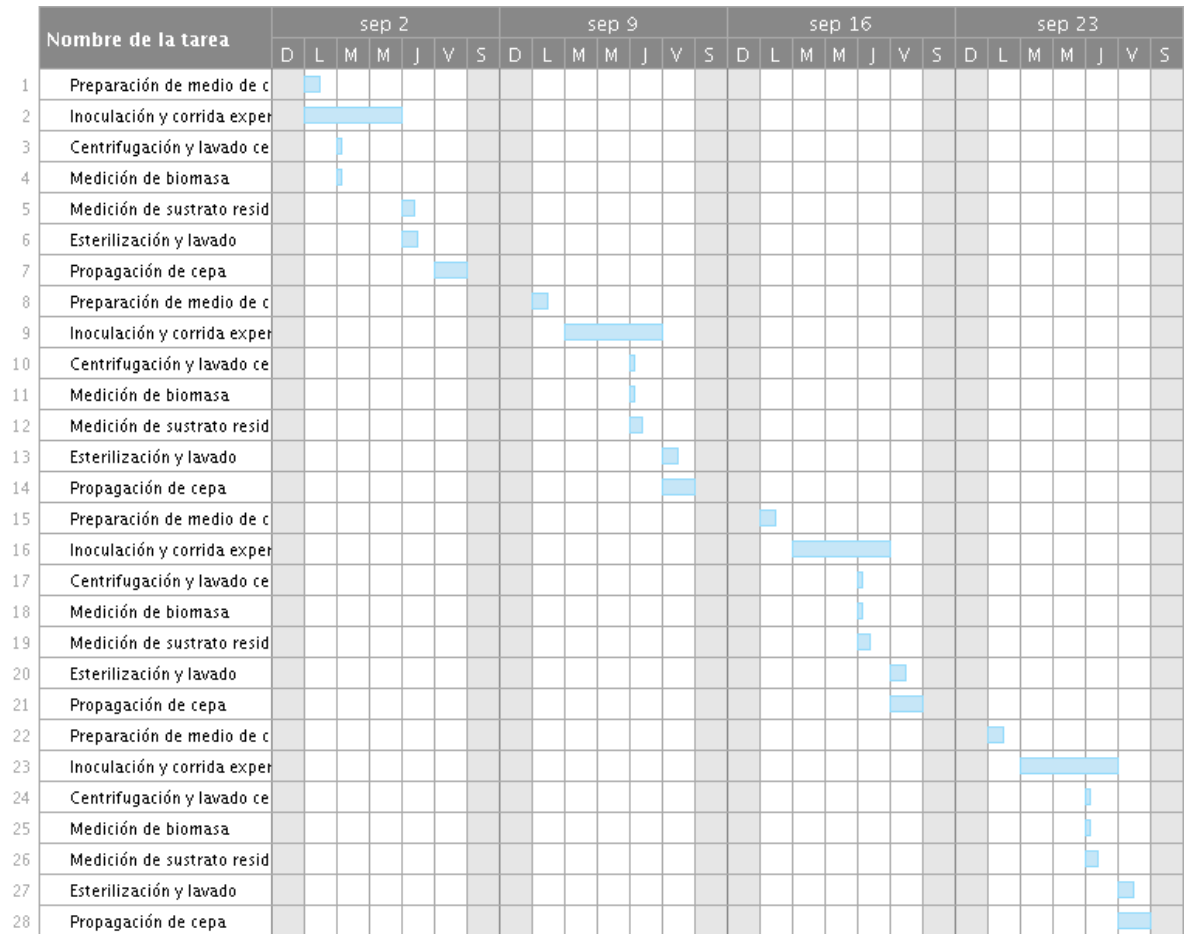


Figura 2. Diagrama de Gantt del proyecto, mes de septiembre

Figura 4. Diagrama de Gantt del proyecto, mes de noviembre

La figura 1 muestra las actividades realizadas dentro del laboratorio en el transcurso de 13 semanas. Estas fueron llevadas a cabo de manera continua y procurando mantener cada actividad dentro de la hora establecida.

- Desarrollo de propuesta de mejora

Para poder mejorar la calidad de los resultados obtenidos y medidos, se añadió un proceso de centrifugación previo al análisis de cada una de las variables de interés. Esto con el fin de separar las células cultivadas en el biorreactor del sobrenadante que contenía el medio de cultivo y el producto generado por cada microorganismo. El sobrenadante fue pasado a otro tubo Eppendorf estéril y sometido a refrigeración. Mientras que el botón celular con toda la biomasa fue mezclado con 1mL de solución salina al 0.9% estéril. Se tomaron posteriormente 200 μ L de muestra de biomasa haciendo una dilución de 1:10. Cada volumen se cargó en un pocillo de una microplaca de 96 pozos para medir la absorbancia de cada muestra de biomasa. Con los resultados obtenidos se usó el valor de la absorbancia a 600 nanómetros para obtener la concentración de células en gramos/litro, estas ecuaciones fueron proporcionadas por el profesor Franklin Estrada (*Ecn 1 y 2*). Este método de medición por densidad óptica es mucho más exacto al momento de reportar biomasa generada ya que el lavado celular previo elimina interferencias de los demás compuestos en la muestra tomada. Las muestras del sobrenadante obtenido en el paso anterior fueron cargadas en otra microplaca de 96 pocillos. Esto con el fin de medir la concentración de ácido láctico y glucosa utilizando el analizador bioquímico YSI. Los resultados arrojados por este instrumento también se reportan en unidades de gramos/litro. Las siguientes imágenes muestran los pasos de la metodología seguida.

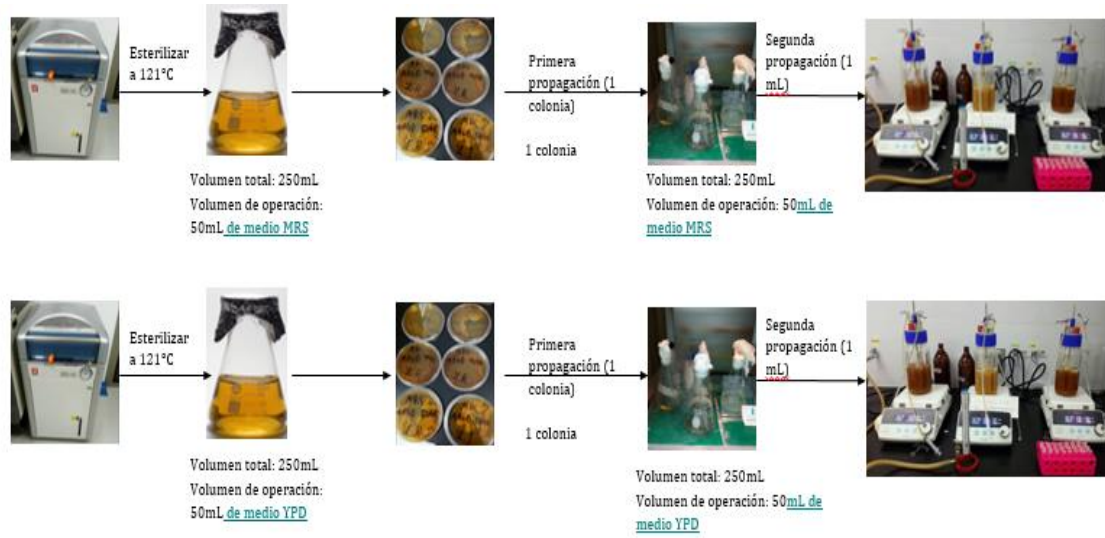


Figura 5. Cultivo de microorganismos en biorreactores Schott

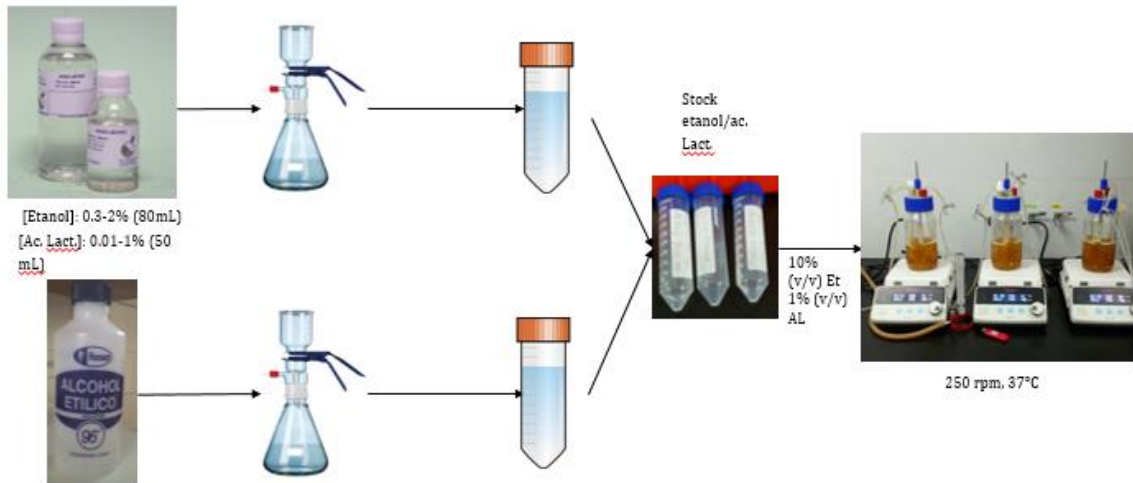


Figura 6. Filtración de inhibidores para ser agregados a los biorreactores

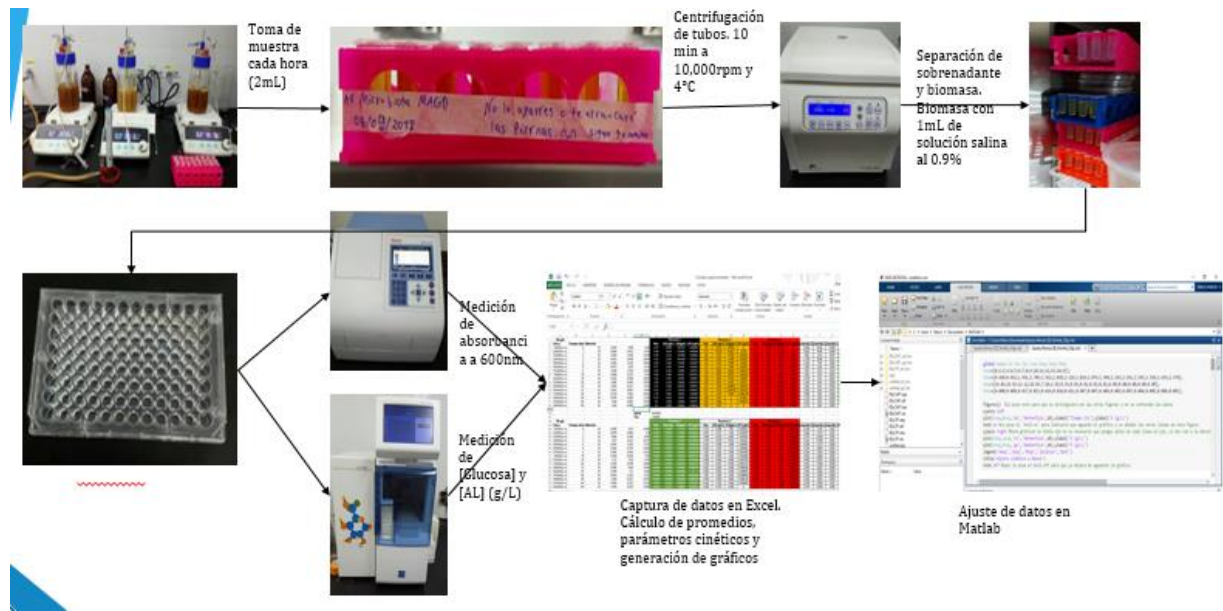


Figura 7. Lavado celular, obtención y procesamiento de datos

3. Resultados del trabajo profesional

Se realizó un total de 11 corridas experimentales por triplicado. Estas constaron de cinéticas de crecimiento microbiano que duraron 50 horas cada una. Se empezó cultivando la levadura probiótica *S. boulardii* en medio YPD. Se variaron las concentraciones de glucosa en el medio a tres niveles diferentes: 20, 10 y 1 gramos/litro. Utilizando un inóculo de 50mL de levadura crecida en medio líquido y un volumen de operación del 60%, se inoculó el microorganismo dentro del biorreactor y se dejó crecer por un periodo de 50 horas. Se tomaron 2mL de muestra cada hora en diferentes partes de los 3 días que duró la cinética, obteniendo un total de 16 puntos. Cada muestra fue procesada como se mencionó en la propuesta de mejora, con el fin de obtener resultados homogéneos.

Para la determinación de biomasa mediante espectrofotometría se utilizaron dos ecuaciones proporcionadas por el profesor Franklin Estrada. Ambas operando en la longitud de onda de 600nm. Para ambos lactobacilos involucrados se usó la siguiente relación lineal:

$$\text{Ecn 1: } y = 0.16 + 0.4743x$$

Donde la biomasa en gramos/litro está en función de la cantidad de luz absorbida por la muestra, siendo esta la variable independiente. Siguiendo este mismo principio se usó una regresión lineal para obtener la cantidad de biomasa producida por la levadura *S. boulardii*:

$$\text{Ecn 2: } y = 0.1786 + 0.4958x$$

Obteniendo los tres parámetros en cada corrida experimental se capturaron los datos en una hoja de Excel. Se calcularon los promedios y las desviaciones estándar de cada una de las corridas cinéticas para analizar el comportamiento del microorganismo en distintas condiciones del medio de cultivo. Posteriormente, se utilizó el software de Matlab para obtener los demás parámetros cinéticos y para ajustar cada corrida a un modelo de crecimiento microbiano. Obteniendo el rendimiento de generación de biomasa en función del consumo de sustrato y el rendimiento de generación de producto en función del consumo de sustrato, se dejaron como valores definidos dentro de la simulación en el software matemático. Estos también fueron promediados y calculada su desviación estándar. En las cinéticas con ausencia de inhibidor, se ajustaron los datos a modelos cinéticos en función de un solo sustrato. Usando correlación de los datos biomasa, sustrato y producto se escogió cuál era el mejor modelo para cada caso. Las siguientes gráficas muestran el comportamiento promedio de las 3 variables iniciales medidas en presencia y ausencia de inhibidores por los microorganismos usados.

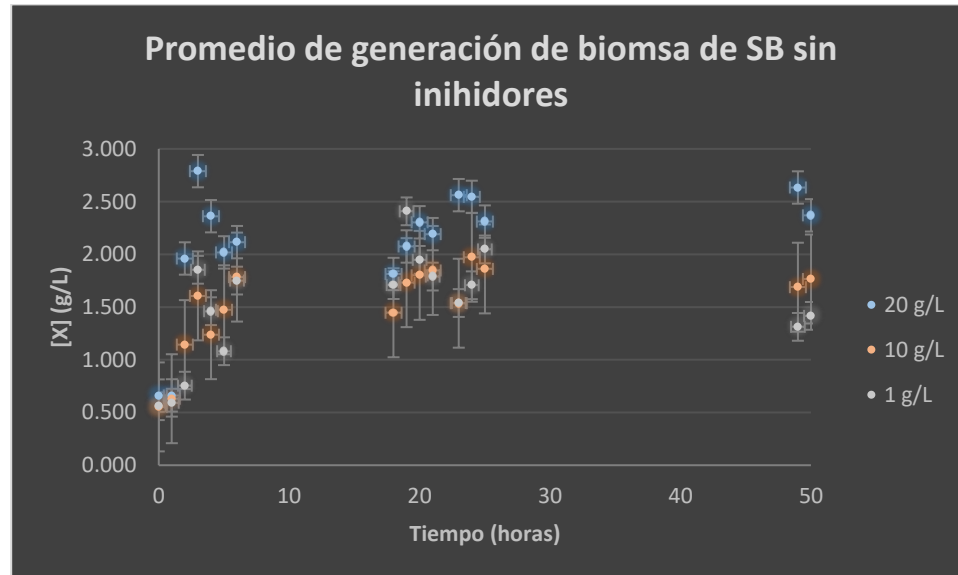


Figura 8. Gráfico de generación de biomasa por *S. boulardii*.

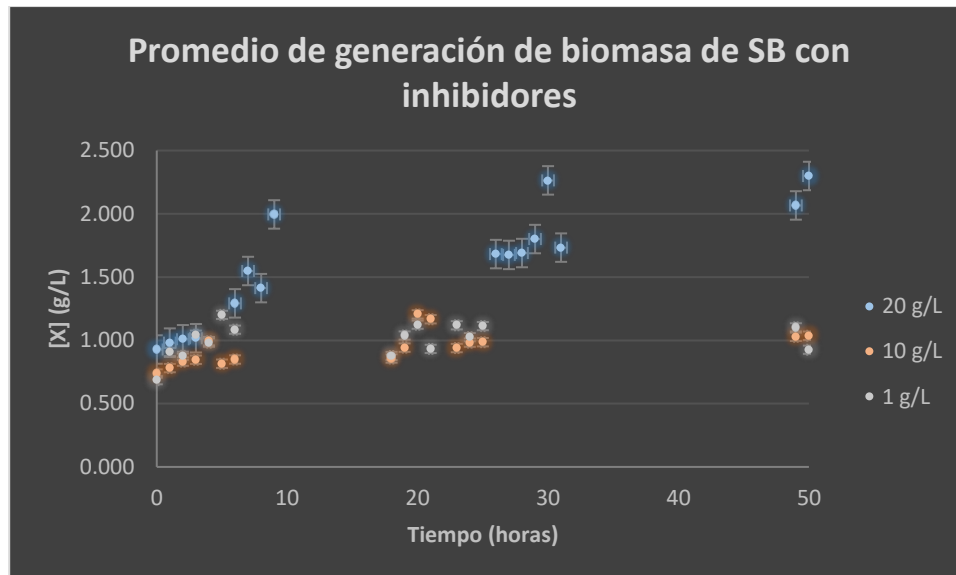


Figura 9. Gráfico generación de biomasa por *S. boulardii* en presencia de 1% de ácido láctico.

Los resultados de biomasa para *S. boulardii* mostraron un comportamiento lógico. Ya que la biomasa generada durante las 50 horas fue menor cuando la concentración de glucosa fue menor en el medio de cultivo. Sin presencia de ácido láctico en el medio de cultivo se alcanzó un punto máximo de biomasa cerca de los 3 gramos/litro, mientras que con menor glucosa este valor no llegó ni a un orden de magnitud de 2.5. De manera similar se observa la cinética microbiana cuando se añadió un 1% de ácido láctico en relación con el volumen de operación. Este ácido demostró tener un efecto inhibitorio en el crecimiento de la levadura en cada uno de los casos analizados. Donde el mayor registro de biomasa obtenida no llegó a los 2.5 gramos/litro. Esto sería modelado y representado después con el simulador de Matlab.

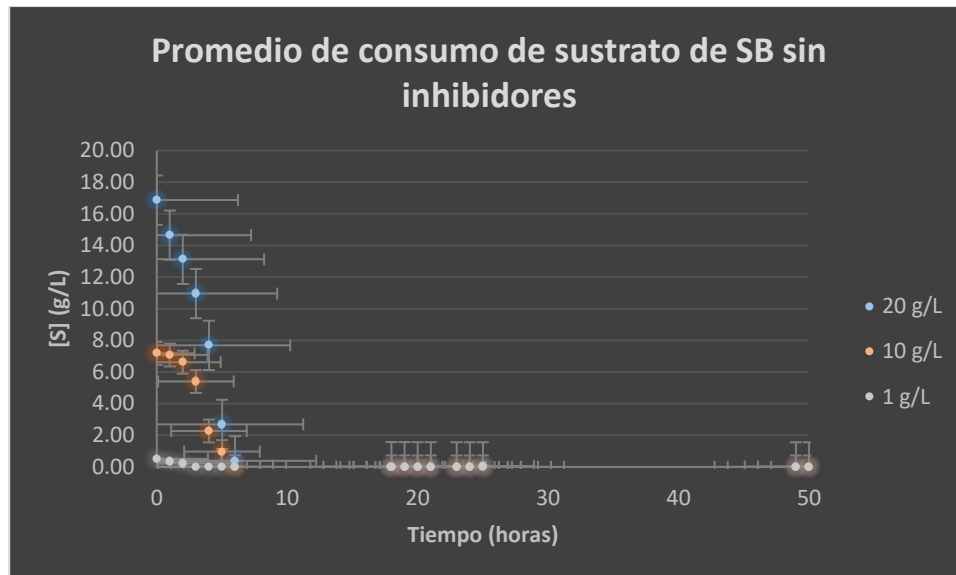


Figura 10. Gráfico de consumo de sustrato por *S. boulardii*.

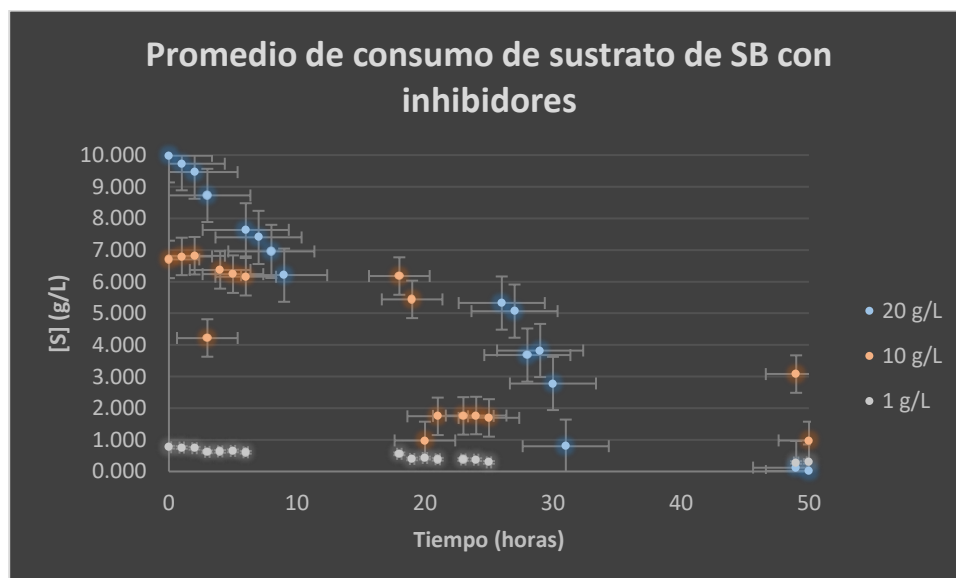


Figura 11. Gráfico de consumo de sustrato por *S. boulardii* en presencia de 1% de ácido láctico.

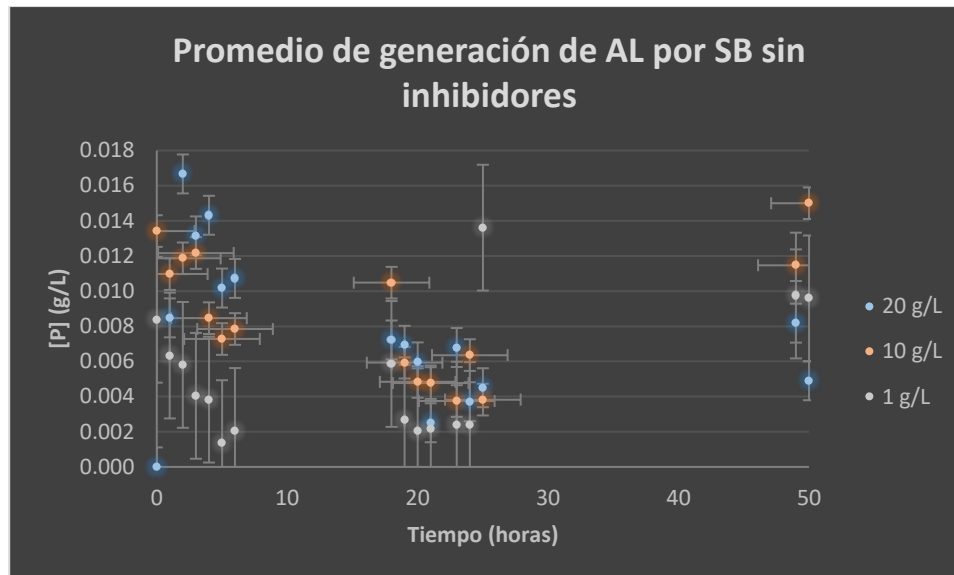


Figura 12. Gráfico generación de ácido láctico por *S. boulardii*.

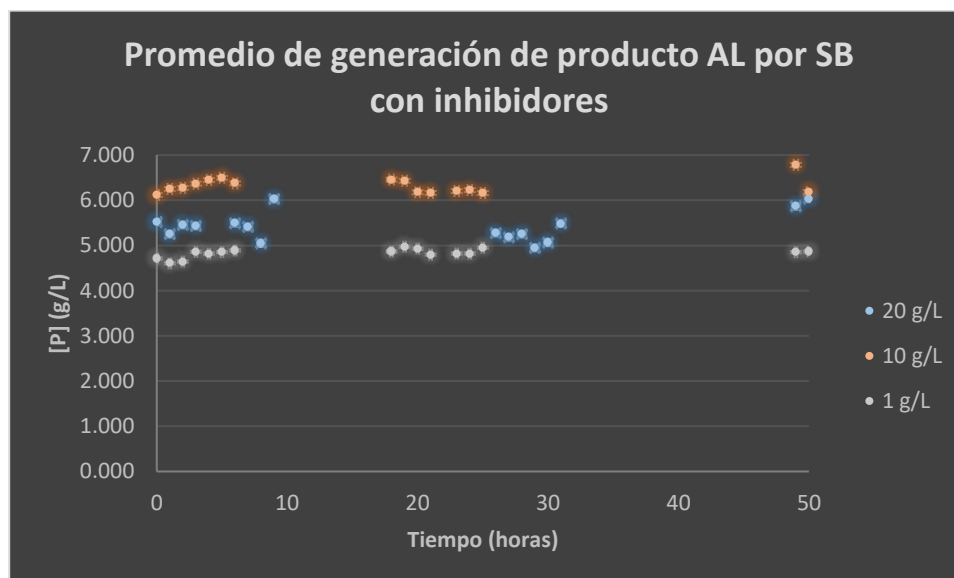


Figura 13. Gráfico generación de ácido láctico por *S. boulardii* en presencia de 1% de ácido láctico.

El comportamiento del consumo de glucosa por la levadura probiótica fue prácticamente el mismo en todos los casos. Se comenzó con una concentración alta de sustrato y este se fue consumiendo con el paso de las horas. En el caso de concentración mediana inicial de glucosa (10 g/L), el sustrato no se consumió en su totalidad cuando hubo presencia de ácido láctico en el medio de cultivo. Demostrando también una inhibición del crecimiento y reproducción del

microorganismo en cuestión. Esta sería modelada posteriormente con un modelo cinético de inhibición competente.

Mientras que en el caso de generación de ácido láctico también se obtuvo un comportamiento esperado. Debido a que *Saccharomyces boulardii* no es un microorganismo productor de ácido láctico, sino etanol; se esperaba una nula generación de este compuesto químico, ya que no se dispone con una membrana de etanol en el analizador bioquímico YSI para determinar la concentración de este en muestras líquidas. Esto se puede observar en las dos gráficas anteriores, donde al no haber ácido láctico mezclado en el medio de cultivo se obtienen valores por debajo de los 0.02 gramos/litro. Estas mediciones reportadas pueden deberse a un error de medición por el analizador bioquímico. Mismo que se observó cuando se añadió el inhibidor al medio de cultivo. Se registraron concentraciones altas de ácido sin embargo estas fueron registradas desde el inicio de la corrida y sin registrar cambios significativos en el transcurso del tiempo. Posteriormente y por cuestiones de tiempo y logística, se analizó la cepa de *Lactobacillus plantarum*, realizando cinéticas de crecimiento en medio comercial MRS en presencia y ausencia de etanol. La metodología con esta bacteria fue la misma que con el trabajo previo de *S. boulardii*. Las siguientes gráficas muestran la comparación de las 3 variables iniciales medidas previo al ajuste de datos en Matlab.

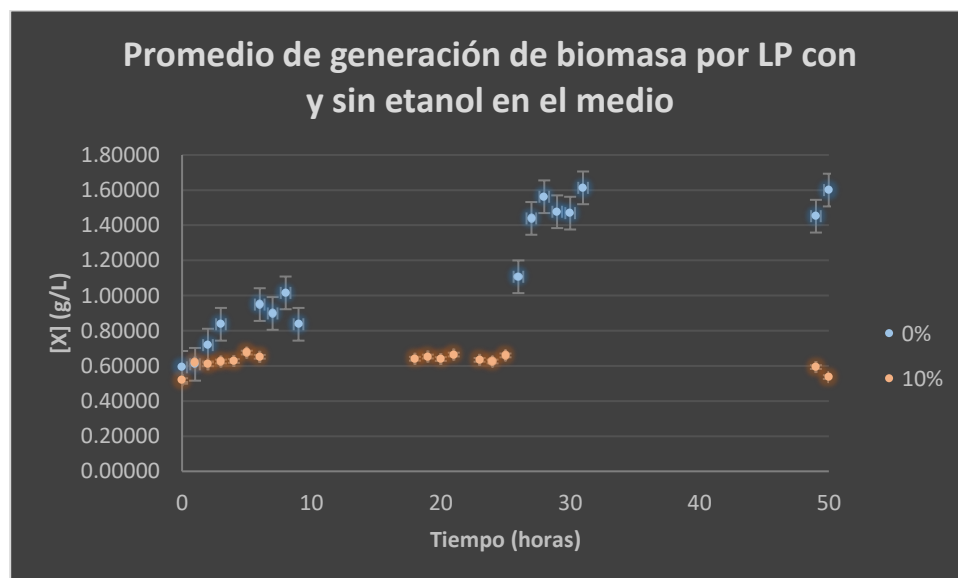


Figura 14. Gráfico de comparación de generación de biomasa por *L. plantarum* con y sin inhibidor.

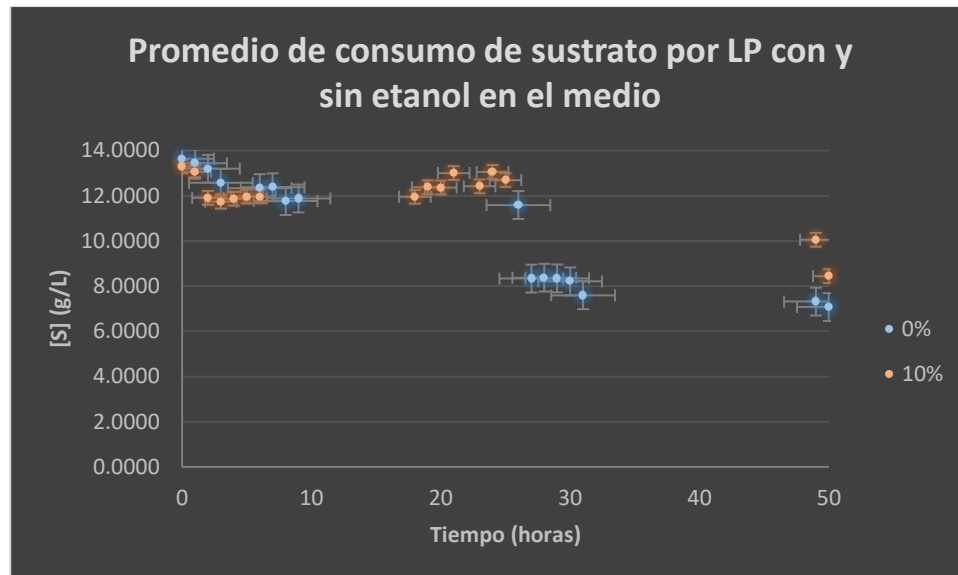


Figura 15. Gráfico de comparación de consumo de sustrato por *L. plantarum* con y sin inhibidor.

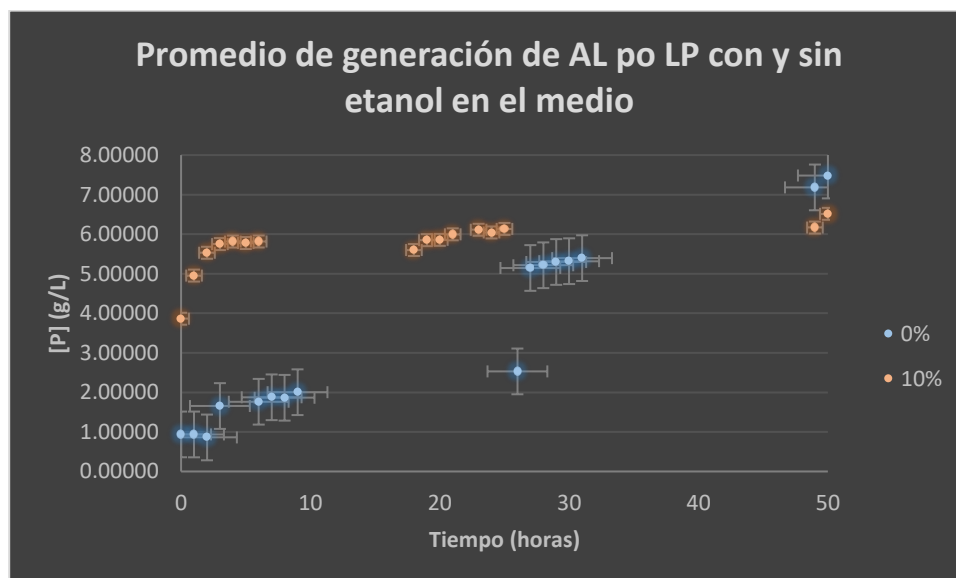


Figura 16. Gráfico de comparación de generación de ácido láctico por *L. plantarum* con y sin inhibidor.

Como se puede apreciar en las tres gráficas anteriores, el etanol demostró tener un efecto inhibitorio en las 50 horas donde se cultivó la bacteria ácido-láctica (BAL) *L. plantarum*. Cuando se prescindió del alcohol en el medio de cultivo la bacteria produjo hasta 1.6 gramos/litro de biomasa, discrepando hasta por 1 gramos/litro en el promedio de generación de esta cuando se añade etanol al medio de cultivo. Sin embargo, se pudo obtener un crecimiento del

microorganismo ya que la concentración de etanol que más evita su crecimiento es de 18% en relación con el volumen de operación (Liu & Qureshi, 2009). De igual manera se observa cómo el consumo del sustrato del medio es menor cuando se tiene este inhibidor en la mezcla. Aquí se observa un comportamiento muy similar de los datos obtenidos ya que los puntos más bajos son de 7.07 g/L de glucosa en el medio sin etanol y 8.44 g/L de glucosa cuando se añadió. En el caso de la medición de ácido láctico se puede observar un cambio muy grande entre las mediciones iniciales de cada uno de los casos. Sin embargo, después de las 48 horas se registró una concentración más alta de este compuesto en los sobrenadantes medidos. Mostrando que para el caso de *L. plantarum* cultivada en medio MRS la producción de ácido láctico se ve incrementada después de las primeras 24 horas de cultivado el microorganismo.

En la última semana de trabajo en laboratorio se realizó una corrida experimental con cada uno de los 3 microorganismos en un biorreactor utilizando un inóculo mucho más bajo. Se usó un inóculo de 5mL al iniciar el cultivo para los 3 casos. Las siguientes gráficas muestran los datos de biomasa, consumo de sustrato y generación de ácido láctico en un cultivo de 50 horas.

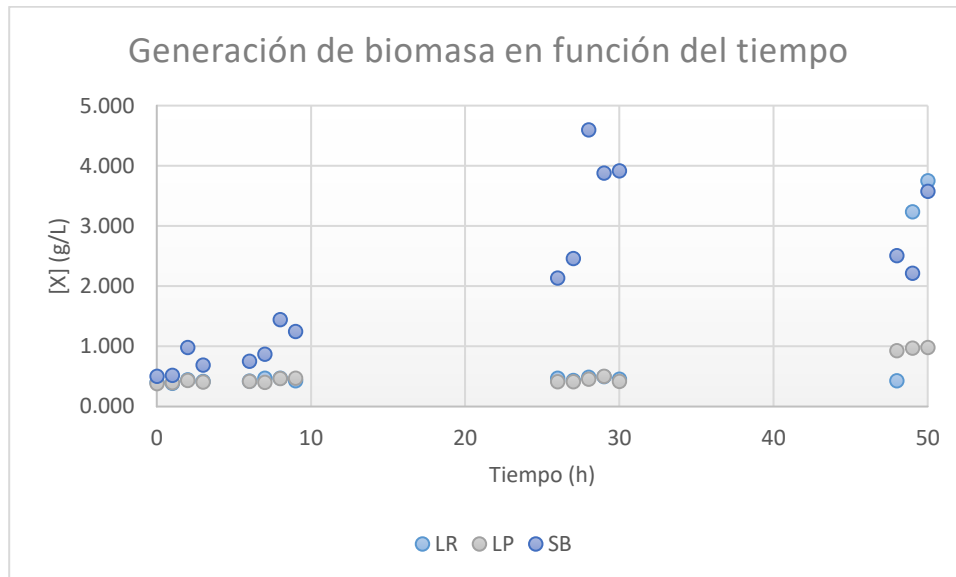


Figura 17. Gráfico de comparación de generación de biomasa por microorganismos probióticos con inóculo bajo.

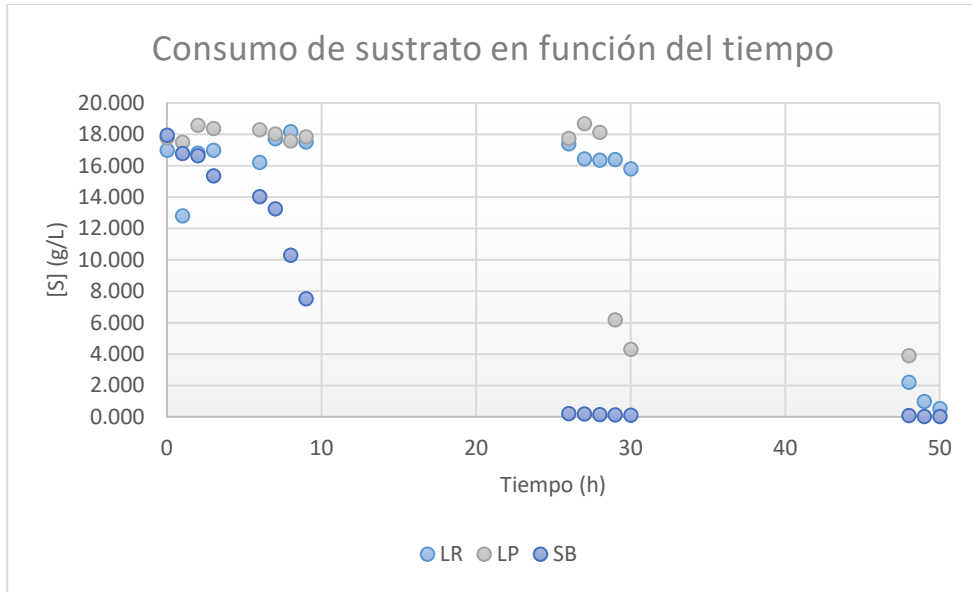


Figura 18. Gráfico de comparación de consumo de sustrato por microorganismos probióticos con inóculo bajo.

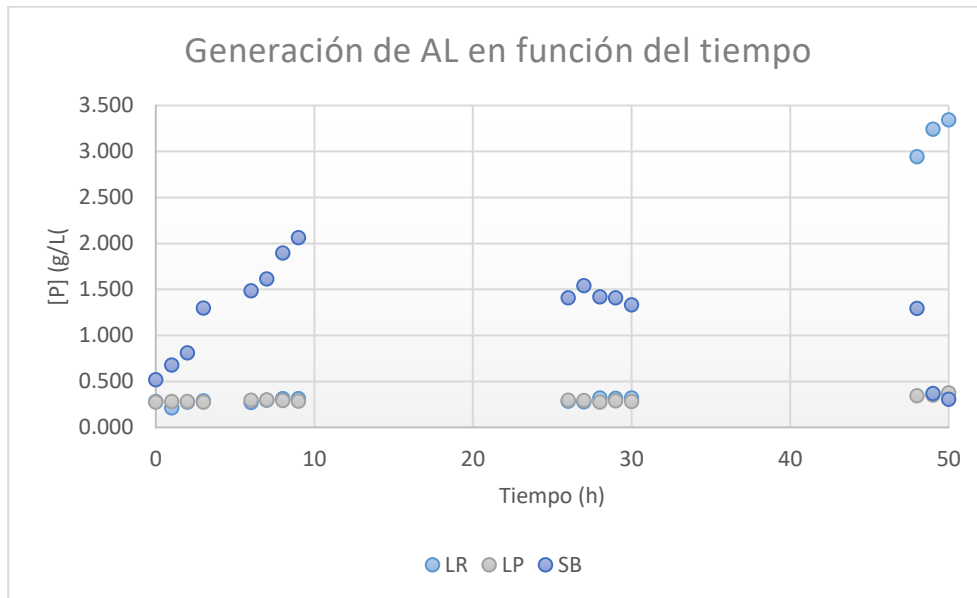


Figura 19. Gráfico de comparación de generación de ácido láctico por microorganismos probióticos con inóculo bajo.

Estos tres resultados demuestran a *L. plantarum* como el microorganismo que presenta mayor tiempo de adaptación al medio de cultivo para en comparación a *L. rhamnosus* y *S. boulardii*. Mientras que el consumo de sustrato fue más rápido por parte de la célula eucarionte.

Mostrando que *L. rhamnosus* tiene un mayor potencial de crecimiento y generación de ácido láctico. Dejando abierta la posibilidad de realizar estudios posteriores con esta bacteria.

Una vez capturados los datos en Excel, se realizó un simulador para obtener las constantes cinéticas de cada experimento y el ajuste a un modelo cinético. Estos resultados son presentados en las siguientes tablas, separadas por el tipo de microorganismo, donde la primera muestra los datos recabados en la última corrida experimental.

Tabla 1. Constantes cinéticas de microorganismos probióticos con bajo inóculo

Microorganismo	Modelo	Autor	μ_{max}	Y_{xs}	Y_{ps}	K_s	K_i	R^2
LR	$\mu = \frac{\mu_m * [S]}{K_s + [S]}$	Monod, 1942	0.1	0.131	-0.181	5.25	N/A	0.6594 0.7249 0.7606
LP	$\mu = \frac{\mu_m * [S]}{K_s + [S]}$	Monod, 1942	0.1	0.0392	-0.00528	20	N/A	0.7487 0.7243 0.7161
SB	$\mu = \frac{\mu_m * [S]}{K_s + [S]}$	Monod, 1942	0.1	0.155	-0.00515	20	N/A	0.8026 0.9137 0.1358

Los tres microorganismos se ajustaron al modelo de Monod mejor que otros modelos de crecimiento microbiano sin presencia de inhibidor y de un solo sustrato. La tasa de crecimiento microbiano en este caso fue ajustada con el mismo valor numérico por el software de Matlab. Como mostraban las gráficas anteriores, el rendimiento de generación de biomasa en función del sustrato (Y_{xs}) es más bajo para la bacteria *L. plantarum*, mismo caso para el rendimiento de generación de producto (Y_{ps}) comparado con la otra bacteria ácido-láctica. La constante de afinidad al sustrato (K_s) se mantuvo como el valor más alto en dos casos. Demostrando que ambos microorganismos son muy a fines al sustrato utilizado en el medio de cultivo. Estos datos pueden ser usados como un control para el análisis de cinéticas de crecimiento con inóculos altos. De igual manera pueden ser estudiados en crecimiento bajo la inducción de compuestos inhibidores a diferentes concentraciones.

Tabla 2. Constantes cinéticas de *S. boulardii* en distintas concentraciones de sustrato con ausencia y presencia de ácido láctico

[S] (g/L)	Modelo	Autor	μ_{max}	Y _{xs}	Y _{ps}	K _s	K _i	R ²
20	$\mu = \frac{\mu m * [S]}{[X] * K_s + [S]}$	Contois (Nielsen & Villadsen, 1994)	0.1±0	0.0629±0.0241	0.2085±0.361	10±0	N/A	0.486±0.1411 0.859±0.063 0.293±0.323
10	$\mu = \frac{\mu m * [S]}{[X] * K_s + [S]}$	Contois (Nielsen & Villadsen, 1994)	0.1±0.0	0.12±0.024	0.00071±0.00063	10±0	N/A	0.671±0.199 0.827±0.051 0.416±0.431
1	$\mu = \mu m * (1 - \frac{[X]}{K_s})$	Ley logística (Nielsen & Villadsen, 1994)	0.569±0.414	2.722±0.079	0.0103±0.00487	0.56±0.079	N/A	0.605±0.088 0.911±0.081 0.174±0.143
20	$\mu = \frac{\mu m * [S]}{K_s * \frac{1 + [P]}{K_p} + [S]}$	Inhibición competitiva (Nielsen & Villadsen, 1994)	0.063±0.036	0.115±0.0288	0.0267±0.0544	9.378±8.174	4.213±7.154	0.585±0.144 0.959±0.046 0.329±0.289
10	$\mu = \frac{\mu m * [S]}{K_s * \frac{1 + [P]}{K_p} + [S]}$	Inhibición competitiva (Nielsen & Villadsen, 1994)	1.6±2.656	0.208±0.337	0.0569±0.075	8.095±7.09	0.034±0.057	0.522±0.102 0.908±0.008 0.479±0.333
1	$\mu = \frac{\mu m * [S]}{K_s * \frac{1 + [P]}{K_p} + [S]}$	Inhibición competitiva (Nielsen & Villadsen, 1994)	0.100±0.000	0.285±0.541	0.518±0.748	7.931±10.593	6.722±11.476	0.403±0.239 0.897±0.021 0.704±0.199

En base en los valores obtenidos del parámetro de R² para cada uno de los casos se determinó el mejor modelo cinético. Estos se presentan en orden descendente de biomasa, sustrato y producto. Se analizó cada corrida experimental con el modelo de: Monod, Tessier, Blackmann, logístico, Contois, Moser y Aiba. Determinando a sí cada una de las constantes cinéticas y las correlaciones de los datos medidos experimentalmente. Calculando el promedio y la desviación estándar de cada uno se determinó que para los primeros dos casos de crecimiento de *S.*

boulardii el mejor ajuste es el modelo de Contois. Con este modelo los valores de μ_{max} y K_s se mantuvieron igual en los 3 casos analizados. Sin embargo, los rendimientos de biomasa fueron más altos cuando había una concentración de 10 g/L de glucosa en el medio. Generando menor cantidad de células, pero con un mayor incremento en relación del inicio al final del experimento. En el caso de cuando se usó la menor cantidad de glucosa en el medio con *S. boulardii*, el mejor ajuste cinético fue con un modelo de ley logística. Obteniendo un valor de correlación más alto en el caso del sustrato y con una desviación estándar de sólo 0.08. Mostrando también un promedio más alto de μ_{max} en comparación con los dos casos anteriores. Mismo caso con los valores de Y_{xs} . Demostrando un mejor aprovechamiento del sustrato por la levadura para su crecimiento cuando el sustrato es más limitado en el medio. Para los casos de inhibición se analizaron los modelos de: Levenspiel, Ghose & Tyagi y el modelo de inhibición competitiva por Nielsen & Villadsen; todos de inhibición por producto. Todos estos modelos cinéticos fueron obtenidos del libro *Biorreactors: analysis and design* (Panda, 2011). Bajo los mismos criterios que los análisis anteriores se determinó que el mejor modelo para los 3 casos era el de inhibición competitiva. Obteniendo también una constante de inhibición (K_i en la tabla, K_p en el código y modelo matemático) como parámetro extra. En la tabla se puede ver una relación inversamente proporcional con el valor de μ_{max} y K_i , demostrando que mientras mayor sea la constante de inhibición en la cinética de crecimiento, menor será la velocidad de crecimiento celular. Demostrando que el ácido láctico actúa como inhibidor del crecimiento de *S. boulardii* en condiciones de alta o baja concentración de sustrato en el medio de cultivo.

Tabla 3. Constantes cinéticas de *L. plantarum* en ausencia y presencia de etanol

Etanol	Modelo	Autor	μ_{max}	Y_{xs}	Y_{ps}	K_s	K_i	R^2
0%	$\mu = \frac{\mu_m * [S]}{K_s + [S]}$	Monod, 1942	0.0758±0.0615	0.092±0.0922	1.262±0.825	3.648±2.783	N/A	0.722±0.295 0.939±0.002 0.835±0.169
10%	$\mu = \frac{\mu_m * [S]}{K_s * \frac{1 + [P]}{K_p} + [S]}$	Inhibición competitiva (Nielsen & Villadsen, 1994)	3.404±2.604	0.0155±0.0164	0.199±0.044	13.332±11.539	0.455±0.581	0.519±0.138 0.303±0.003 0.868±0.002

Siguiendo la metodología del caso anterior, se modelaron los datos obtenidos para el lactobacilo crecido en medio MRS con y sin inhibidor. Para el caso de ausencia de inhibidor se determinó que el modelo de Monod fue el mejor ajuste, tal y como el caso donde el inóculo fue bajo. Mientras que en el inóculo bajo se registró un valor único de K_s , estos variaron más en el caso del inóculo alto. También se pudo observar que los valores calculados de la constante de inhibición no pasaron el valor numérico de 1 y el valor de μ_{max} se vio favorecido en comparación con el caso de 0% de etanol en el medio. En contraste, los dos rendimientos se vieron altamente disminuidos con la adición del alcohol etílico. Este efecto de inhibición se debe a que este compuesto es antagonista en el crecimiento de los lactobacilos, a pesar de no ser la concentración letal para estos microorganismos. Esto se puede ver de nuevo en la figura 11 donde se obtuvieron muchas menos células en el proceso gracias a la competencia del producto en el medio de cultivo.

4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto

- Aprendizajes profesionales

Los aprendizajes obtenidos por la realización de este proyecto van más implicados al área de la investigación. Debido a la necesidad de trabajar por mi cuenta en la mayoría del tiempo fue fundamental mi participación en todas las actividades del proyecto. En la realización de los protocolos, los procedimientos experimentales y el análisis de resultados impartieron un nuevo aprendizaje en la cuestión de investigación. Esto desarrolló y complementó diversas técnicas y habilidades dentro y fuera del laboratorio.

Uno de los aprendizajes que se siguió desarrollando fue la capacidad de buscar y obtener información de diferentes fuentes para un desarrollo crítico de mi proyecto. Al igual aprender a considerar diversas fuentes para llegar a una conclusión a partir de los resultados obtenidos.

También se retomaron ciertas técnicas de manejo de instrumentación de laboratorio, así como de diversos reactivos del laboratorio. Generando así un mejoramiento en diversas técnicas de

cultivo de microorganismos y de tratamiento de muestras después de la fermentación de estos.

- Aprendizajes sociales

Hoy en día, se les ha dado más importancia a los alimentos prebióticos y probióticos. Debido a que se sigue investigando y conociendo de sus múltiples beneficios a la salud. Estos son la primera o segunda alternativa de muchas personas para el tratamiento de síntomas de diversas enfermedades. Lo que implicó un avance importante en la implementación de un alimento probiótico con más de un microorganismo. Se logró observar que, en las condiciones adecuadas, una de las bacterias manejadas puede llegar a ser compatible con la levadura. Brindando así, la posibilidad de crear en el futuro un alimento con ambos o hasta más microorganismos que permitan un mejoramiento del funcionamiento de la microbiota intestinal y del organismo completo del paciente.

Atacando con esta alternativa una necesidad importante de México en el sector salud y social. Ya que hoy en día muchas personas padecen de enfermedades gastrointestinales por la alta ingesta de comidas altas grasas saturadas y conservadores nocivos. Al igual con la ascendencia de los alimentos procesados y falta de higiene en muchos lugares de venta, la comida puede representar un riesgo para muchas personas a nivel local, nacional e incluso internacional. Con el desarrollo de alimentos pro y prebióticos se puede tomar una alternativa para prevenir y tratar problemas en el aparato digestivo. Reduciendo así las personas con problemas gastrointestinales y una mejora en la salud de la mayor cantidad de sectores sociales posibles, dependiendo del alcance de este proyecto y similares.

- Aprendizajes éticos

Este aprendizaje es de gran importancia ya que la ética la encontramos todos los días en todos lados. Este proyecto permitió el trabajo constante en este ámbito personal como futuro biotecnólogo y profesional. Además de como un ser humano que se construye día con día. El hecho de conocer las posibles aplicaciones de estos experimentos a futuro me permitió comprometerme cada día más a realizar los experimentos de la mejor manera y con una buena

disposición. Esto también sin olvidar la parte humana que es el trabajar con otros tipos de vida, aunque se traten de organismos menos desarrollados evolutivamente hablando. Construyendo día con día mi compromiso como biotecnólogo de trabajar conservando de la mejor manera todo tipo de vida y el aprovechamiento de estos seres para el mejoramiento del entorno humanos, este caso en el sector de la salud (a futuro).

- Aprendizajes en lo personal

Me sentí frente a un gran reto desde el comienzo de este proyecto en las instalaciones del ITESO. El no saber cómo enfrentar las tareas a realizar en el inicio presentó un reto para mí para mejorar mis capacidades de trabajo, expresión y redacción. Conforme fue avanzando el tiempo, logré ir recordando diversas técnicas y métodos dentro de un laboratorio científico.

Esto también fue posible gracias a los comentarios y asesoría constante de mi asesor Oscar Rojas, de mi profesor Felipe Sánchez y del profesor Franklin Estrada en los momentos previos y durante la experimentación con los diversos microorganismos. También gracias al apoyo del personal como David Mendoza, Fabián de la Peña y mis compañeros José Herrera, Ruth Quintero, Ana Martínez, Elisa Volquartz, Carmen Vergara, Diego López y Alejandro Saldaña fue posible la realización de todo este proyecto de aplicación.

Desarrollé diversas habilidades a lo largo del proyecto para poder manipular mejor los medios de cultivo necesarios, las cepas microbiológicas, mejor manejo del software de Matlab, conocimiento en cuestiones de cinética microbiana, mejor manejo de los materiales e instrumentos del laboratorio y sobre todo la conciencia de cuidar y mantener todo aquello que pasaba por mis manos en el mejor estado posible. Desarrollando así una responsabilidad de todas mis acciones dentro y fuera de las instalaciones. Cada uno de los retos enfrentados semana con semana fue dejando pequeños pero significativos aprendizajes en mi persona y enriqueciendo mi perfil como futuro profesionalista.

5. Conclusiones

Se logró el objetivo de analizar el efecto de inhibición por parte de productos terminales de la fermentación para 2 de los 3 microorganismos. Obteniendo numerosos datos experimentales para el ajuste a diversos modelos matemáticos y analizar las constantes cinéticas. Se logró ver el efecto inhibitorio del etanol en bacterias ácido-lácticas y del ácido láctico en una levadura, concordando con la información citada previamente en la literatura. Sin embargo, no se pudo analizar el efecto de estos compuestos a diferentes concentraciones en el medio de cultivo. Tampoco el comportamiento de *Lactobacillus rhamnosus* creciendo en medio de cultivo comercial con y sin presencia de etanol. Abriendo la posibilidad de continuar con este proyecto para poder concluir los objetivos planteados al inicio de este. También, se debe considerar la inclusión de más personas a este proyecto ya que representa una alta carga de trabajo experimental y uso de equipo y reactivos de manera considerable. Añadiendo que mediante la continuación de estos estudios se puede estar más cerca de la implementación de un alimento probiótico con los tres microorganismos estudiados a lo largo de estos meses.

6. Bibliografía

- Agudelo, C., Ortega, R., & Hoyos, J. (2010). Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 Y Bacterias ácido lácticas de yogurt. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n2/v8n2a02.pdf>
- Alvarez, M., Aguirre-Ezkauriatza, E., Ramírez-Medrano, A., & Rodríguez-Sánchez, Á. (2010). Kinetic analysis and mathematical modeling of growth and lactic acid production of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus* in milk whey. *Journal Of Dairy Science*, *93*(12), 5552-5560. doi: 10.3168/jds.2010-3116
- Anderson, R., Cookson, A., McNabb, W., Kelly, W., & Roy, N. (2010). *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function. *FEMS Microbiology Letters*, no-no. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02038.x
- Arena, M., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D. (2016). Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. *Frontiers In Microbiology*, *7*. doi: 10.3389/fmicb.2016.00464
- Buts, J., Dekeyser, N., Stilmant, C., Delem, E., Smets, F., & Sokal, E. (2006). *Saccharomyces boulardii* Produces in Rat Small Intestine a Novel Protein Phosphatase that Inhibits *Escherichia coli* Endotoxin by Dephosphorylation. *Pediatric Research*, *60*(1), 24-29. doi: 10.1203/01.pdr.0000220322.31940.29
- Czerucka, D., & Rampal, P. (1998). Effect of *saccharomyces boulardii* on Ca²⁺-mediated secretion in T84 cells. *Gastroenterology*, *114*, A362. doi: 10.1016/s0016-5085(98)81467-4
- CZERUCKA, D., PICHE, T., & RAMPAL, P. (2007). Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, *26*(6), 767-778. doi: 10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x
- Czerucka, D., Dahan, S., Mograbi, B., Rossi, B., & Rampal, P. (2000). *Saccharomyces boulardii* Preserves the Barrier Function and Modulates the Signal Transduction Pathway Induced in Enteropathogenic *Escherichia coli*-Infected T84 Cells. *Infection And Immunity*, *68*(10), 5998-6004. doi: 10.1128/iai.68.10.5998-6004.2000
- [El mercado de probióticos sigue proliferando. \(2016\). Retrieved from https://www.imfarmacias.es/uploads/2017/12/mercado_probioticos_sigue_14194_20171221_113906.pdf](https://www.imfarmacias.es/uploads/2017/12/mercado_probioticos_sigue_14194_20171221_113906.pdf)
- Estela, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E., & Egoavil, E. (2013). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista Peruana De Biología*, *14*(2). doi: 10.15381/rpb.v14i2.1797
- Fajardo Castillo, E. and Sarmiento Forero, S. (2007). *Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana.
- Fayol-Messaoudi, D., Coconnier-Polter, M., Moal, V., Atassi, F., Berger, C., & Servin, A. (2007). The *Lactobacillus plantarum* strain ACA-DC287 isolated from a Greek cheese demonstrates antagonistic activity in vitro and in vivo against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal Of Applied Microbiology*, *103*(3), 657-665. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03293.x
- Giang, H., Viet, T., Ogle, B. and Lindberg, J. (2012). Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with a complex of

lactic acid bacteria alone or in combination with *Bacillus subtilis* and *Saccharomyces boulardii*. *Livestock Science*, 143(2-3), pp.132-141.

Goldin, B., Gorbach, S., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L., & Salminen, S. (1992). Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases And Sciences*, 37(1), 121-128. doi: 10.1007/bf01308354

Guerzoni, M., Sinigaglia, M., Gardini, F., Ferruzzi, M., & Torriani, S. (1995). Effects of pH, Temperature, Ethanol, and Malate Concentration on *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc oenos*: Modelling of the Malolactic Activity. Retrieved from <http://www.ajeonline.org/content/46/3/368>

Herbrecht, R., & Nivoix, Y. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia: An Adverse Effect of *Saccharomyces boulardii* Probiotic Administration. *Clinical Infectious Diseases*, 40(11), 1635-1637. doi: 10.1086/429926

Jurado Gámez, H., Ramírez, C., & Aguirre, D. (2014). Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. *Veterinaria Y Zootecnia*, 7(2), 37-53. doi: 10.17151/vetzo.2013.7.2.3

Kennes, C., Veiga, M., Naveau, H., & Nyns, E. (1995). Kinetics of growth of *Lactobacillus plantarum* with glucose, organic acids (malate, citrate, acetate) and ethanol. *Biotechnology Letters*, 17(9), 899-904. doi: 10.1007/bf00127423

Kennes, C., Veiga, M., Naveau, H., & Nyns, E. (1995). Kinetics of growth of *Lactobacillus plantarum* with glucose, organic acids (malate, citrate, acetate) and ethanol. *Biotechnology Letters*, 17(9), 899-904. doi: 10.1007/bf00127423

Kwon, S., Yoo, I., Lee, W., Chang, H., & Chang, Y. (2001). High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a two-stage membrane cell-recycle bioreactor. *Biotechnology And Bioengineering*, 73(1), 25-34. doi: 10.1002/1097-0290(20010405)73:1<25::aid-bit1033>3.0.co;2-n

León-de la O, D. A. N. T. E. I. S. M. A. E. L., Calderón-Yépez, B. Á. R. B. A. R. A., Martínez-Ballinas, A. B. R. I. L., Sánchez-Herrera, E. U. G. E. N. I. A., Zulatto-Lobato, A. N. A. C. A. R. O. L. I. N. A., Camacho-Hernández, I. S. R. A. E. L., . . .

Liu, S., & Qureshi, N. (2009). How microbes tolerate ethanol and butanol. *New Biotechnology*, 26(3-4), 117-121. doi: 10.1016/j.nbt.2009.06.984

Liu, T., Tsai, T., & Pan, T. (2018). The Anti-Periodontitis Effects of Ethanol Extract Prepared Using *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101. *Nutrients*, 10(4), 472. doi: 10.3390/nu10040472

McFarland, L. (1994). A Randomized Placebo-Controlled Trial of *Saccharomyces boulardii* in Combination With Standard Antibiotics for *Clostridium difficile* Disease. *JAMA: The Journal Of The American Medical Association*, 271(24), 1913. doi: 10.1001/jama.1994.03510480037031

Muyyarikkandy, M., & Amalaradjou, M. (2017). *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* Attenuate *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium Colonization and Virulence Gene Expression In Vitro. *International Journal Of Molecular Sciences*, 18(11), 2381. doi: 10.3390/ijms18112381

Newberry, S. (2012). Probiotics for the Prevention and Treatment of Antibiotic-Associated Diarrhea. *JAMA*, 307(18), 1959. doi: 10.1001/jama.2012.3507

- Nguyen, T., Kang, J., & Lee, M. (2007). Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *International Journal Of Food Microbiology*, 113(3), 358-361. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.08.015
- Ortiz, Á., Reuto, J., Fajardo, E., Sarmiento, S., Aguirre, A., Arbeláez, G., Gómez, D. and Quevedo-Hidalgo, B. (2018). *EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA “IN VITRO” DE UNA CEPA NATIVA DE Saccharomyces cerevisiae*. [online] *Revistas.javeriana.edu.co*. Available at: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/1418/4439> [Accessed 21 May 2018].
- Panda, T. (2011). *Bioreactors*. New Delhi: Tata McGraw Hill Education.
- Passos, F., Fleming, H., Ollis, D., Felder, R. & McFeeters, R. (1994) Kinetics and Modeling of Lactic Acid Production by *Lactobacillus plantarum*. *Applied and environmental microbiology*. 60 (7), 2627-2636.
- Peñuela, M., Vargas, G., Torres, A., & Ríos, R. (2001). Evaluación de medios de cultivo preparados a partir de suero de leche enriquecido, para la producción de ácido láctico con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei*. *Facultad de ingeniería*, 24 (1), 35-39
- Plaza Díaz, J. (2014). *Colonización, seguridad y tolerancia Lactobacillus paracasei CNCM I-4034, Lactobacillus rhamnosus CNCM I- 4036 Y Bifidobacterium breve CNCM I-4035 En adultos sanos y sus efectos sobre el metabolismo y sistema inmunitario en ratas Zucker*. Doctorado. Universidad de Granada.
- Prebiotics and Probiotics. (2015). *Journal of Probiotics & Health*, 03(02).
- Rodríguez González, M. (2009). *Aislamiento y selección de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiótica e inmunomoduladora* (Doctorado). Universitat Autònoma de Barcelona.
- Ruiz-Barba, J., Cathcart, D., Warner, P., & Jiménez-Díaz, R. (2018). Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a Bacteriocin Producer, as a Starter Culture in Spanish-Style Green Olive Fermentations. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/60/6/2059.short>
- [Saccharomyces boulardii: MedlinePlus Supplements. \(2014\). Retrieved from https://web.archive.org/web/20150405050650/http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/natural/332.html](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25111111/)
- Salgado-Brito, R. O. S. A. (2013). Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque. *Facultad de Ciencia y Tecnología*, 12(12), 133-144.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Lahtinen, S. and von Wright, A. (2012). *Lactic acid bacteria*. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis.
- Sunny-Roberts, E. and Knorr, D. (2008). Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress. *Food Microbiology*, 25(1), pp.183-189.
- Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Matošić S. (2010). Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Techn. Biotechnol.* 48, 296–307.
- [Tendencias y previsiones para 2020 del mercado de Ingredientes probióticos. \(2018\). Retrieved from http://www.foodnewlatam.com/sectores/33-ingredientes/5750-tendencias-previsiones-2020-mercado-ingredientes-probioticos.html](http://www.foodnewlatam.com/sectores/33-ingredientes/5750-tendencias-previsiones-2020-mercado-ingredientes-probioticos.html)

Youssef, C., Goma, G., & Olmos-Dichara, A. (2005). Kinetic Modelling of *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* Growth and Lactic Acid Production in Batch Cultures Under Various Medium Conditions. *Biotechnology Letters*, 27(22), 1785-1789. doi: 10.1007/s10529-005-3557-0

Yuan, X., Wen, A., Wang, J., Guo, G., Desta, S., & Shao, T. (2015). Effects of ethanol, molasses and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation quality, *in vitro* digestibility and aerobic stability of total mixed ration silages in the Tibetan plateau of China. *Animal Science Journal*, 87(5), 681-689. doi: 10.1111/asj.12477

Anexos (en caso de ser necesarios)

```
global mumax Ks texp Xexp Sexp Pexp
texp=[0;1;2;3;4;5;6;7;8;9;10;11;12;13;14;15];
Xexp=[0.577;0.596;0.620;0.668;0.649;0.639;0.639;0.582;0.587;0.938;1.180;1.104;1.042;1.080;1.161;1.052];
Sexp=[13.135;12.997;12.843;12.793;12.736;12.714;12.273;12.538;12.587;11.046;10.758;10.846;11.001;10.451;10.704;10.234];
Pexp=[0.157;0.237;0.166;0.165;0.166;0.165;0.182;0.183;0.244;3.892;4.366;4.599;4.656;4.653;5.676;5.865];
lb = [0;0];
ub = [5;10];
A = [];
b = [];
Aeq = [];
beq = [];
nonclon = [];
mumax_est=0.5; Ks_est=1.5;
xguess = [mumax_est;Ks_est];
[xopt,feval] = fmincon(@mincuaderr,xguess,A,b,Aeq,beq,lb,ub,nonclon);
mumax=xopt(1); Ks=xopt(2);
formatSpec = 'mumax = %4.4f\n';
fprintf(formatSpec,mumax)
formatSpec = 'Ks = %4.4f\n';
fprintf(formatSpec,Ks)
tint=texp;
Ci0=[Xexp(1);Sexp(1);Pexp(1)];
[t,Ci] = ode45(@Monod,tint,Ci0);
Xcal = Ci(:,1); Scal = Ci(:,2); Pcal = Ci(:,3);
yyaxis left
hold on
plot(t,Xcal,'b-')
yyaxis right
plot(t,Scal,'r-')
legend('Xexp','Xcal','Sexp','Scal','Pexp','Pcal')
hold off
corr = corrcoef(Xexp,Xcal); corrX = corr(2,1)
corr = corrcoef(Sexp,Scal); corrS = corr(2,1)
corr = corrcoef(Pexp,Pcal); corrP = corr(2,1)
function F=mincuaderr(x)
global mumax Ks texp Xexp Sexp Pexp
mumax=x(1); Ks=x(2);
tint=texp;
Ci0=[Xexp(1);Sexp(1);Pexp(1)];
[~,Ci]=ode45(@Monod,tint,Ci0);
Xcal=Ci(:,1); Scal=Ci(:,2); Pcal=Ci(:,3);
errX=(Xexp-Xcal).^2; errS=(Sexp-Scal).^2; errP=(Pexp-Pcal).^2;
F=sum(errX) + sum(errS) + sum(errP);
end
```

```
function dCi=Monod(~,Ci)
global mumax Ks
X=Ci(1); S=Ci(2); P=Ci(3);
mu=(mumax*S)/(Ks+S);
dX=mu*X;
dS=(-1/0.21865)*mu*X;
dP=(-1/2.21054)*mu*X;
dCi=[dX;dS;dP];
end
```

Figura 20. Ejemplo de código utilizado en Matlab para ajustar datos a modelo de Monod.