

19
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"VIABILIDAD DE *Lactobacillus* spp. INMOVILIZADOS
EN UN BIOPOLIMERO DE USO ALIMENTARIO
PARA SER USADO COMO PROBIOTICO"

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

GARCIA GARCIA GLORIA LETICIA



ASESORA: M EN C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

COASESOR: Q.F.B. S. PATRICIA MIRANDA CASTRO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA EL
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodriguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA: Viabilidad de Lactobacillus spp. inmovilizados en un Biopolímero de uso alimentario para ser usado como Probiótico.

que presenta la pasante: Gloria Leticia García García
con número de cuenta: 8857398-0 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 01 de Julio de 1996

PRESIDENTE	M. en C. Clara Ines Alvarez Manrique	<i>(Clara Ines Alvarez Manrique)</i>
VOCAL	Q. F. I. Andrea Becerril Osnaya	<i>(Andrea Becerril Osnaya)</i>
SECRETARIO	M. en C. Andres Romero Rojas	<i>(Andres Romero Rojas)</i>
PRIMER SUPLENTE	M. en C. Stella Maris Reginensi Rivera	<i>(Stella Maris Reginensi Rivera)</i>
SEGUNDO SUPLENTE	Q. F. B. Marcela Hernández Vargas	<i>(Marcela Hernández Vargas)</i>

AGRADECIMIENTOS:

A MIS PADRES.

Juan García Vallejo y Ma. Trinidad García Torres.

Por su amor y comprensión para seguir con mis estudios.

A MIS HERMANOS.

Teresa, Carlos, Alejandro, Marsela:

Por su cariño y su apoyo durante este tiempo.

A Carolina García Torres y Rafael Calvo García.

Por su apoyo y ayuda para seguir con mis estudios.

A Elizabeth Calvo García.

Por los momentos agradables que me ha hecho pasar durante este tiempo.

A la M en C. Clara Inés Álvarez Manrique.

Por su orientación y apoyo en la elaboración de este trabajo y en mi formación profesional, además de su sincera amistad.

A la Q.F.B. S. Patricia Miranda Castro.

Por su apoyo y ayuda en la elaboración de este trabajo.

A los sinodales Andrea Becerril Osnaya, Andres Romero Rojas, Marcela Hernández Vargas y Stella Maris Reginensi Rivera.

Por el tiempo empleado en la revisión así como las correcciones realizadas que sirvieron para mejorar el trabajo.

A Victoria Sosa.

Por su amistad y su ayuda incondicional en mi formación académica.

A Juan Ignacio Vidal Arellano.

Por su apoyo y ayuda con el material necesario para la elaboración de este trabajo y por su amistad desinteresada.

A Antonio Rojas Melchor.

Por su amistad así como también por las palabras de aliento en todo momento.

INDICE

RESUMEN	1
1.0 Introducción	2
2.0 Generalidades	3
2.1 Inmovilización de células microbianas	3
2.1.1 Métodos de union a un soporte	4
2.1.2 Métodos de entrecruzamiento	4
2.1.3 Método de atrapamiento	4
2.2 Aplicación de inmovilización de células	5
2.2.1 Producción de aminoácidos	5
2.2.2 Producción de antibióticos	5
2.2.3 Producción de ácidos organicos	5
2.2.4 Producción de alcoholes	5
2.2.5 Otros compuestos organicos útiles	6
2.3 Probióticos	6
2.3.1 Composición	7
2.4 Mecanismo de acción	9
2.4.1 Producción de antibióticos	9

2.4.2	Antagonismo competitivo	10
2.4.3	Alteración del metabolismo microbiano	10
2.4.4	Inmunoestimulación	11
2.5	Efecto benefico en algunas enfermedades	11
2.5.1	Alivia la intolerancia de la lactosa	11
2.5.2	Favorece la digestión	11
2.5.3	Actividad antitumoral	12
2.5.4	Efectos anticolesterolemicos	12
3.0	Justificación	13
4.0	Objetivo general	14
4.1	Objetivos particulares	14
5.0	Hipótesis	15
6.0	Metodología	16
6.1	Estandarizacion de la formulación del agente inmovilizante	16
6.2	Estandarizacion del enriquecimiento usado en la Inmovilización	17
6.3	Cinética de crecimiento	18

6.4 Obtención de biomasa	18
6.5 Formación de las esferas para la inmovilización del Microorganismo ...	18
6.5.1 Esferas simples	18
6.5.2 Esferas enriquecidas	19
7.0 Resultados	23
7.1 Estandarización de la formulación del agente inmovilizante	23
7.2 Estandarización del enriquecimiento usado en la inmovilización	25
7.3 Cinética de crecimiento	27
7.4.0 Viabilidad de las células de <i>Lactobacillus spp.</i> inmovilizadas y mantenidas en gel blando a 4 °C	29
7.4.1 Viabilidad de las células de <i>Lactobacillus spp.</i> inmovilizadas y mantenidas en gel blando a temperatura ambiente	29
7.4.2 Viabilidad de las células de <i>Lactobacillus spp.</i> inmovilizadas y mantenidas en SSF y a temperatura de 4 °C	31
7.4.3 Viabilidad de las células de <i>Lactobacillus spp.</i> inmovilizadas y mantenidas en SSF a temperatura ambiente	31
7.4.4 Viabilidad de las células de <i>Lactobacillus spp.</i> inmovilizadas con enriquecimiento y mantenidas en gel blando y a 4 °C	33

7.4.5 Viabilidad de las células de <i>Lactobacillus spp.</i> inmovilizadas con enriquecimiento y mantenidas en gel blando y a temperatura ambiente	33
7.4.6 Viabilidad de las células de <i>Lactobacillus spp.</i> inmovilizadas con enriquecimiento y mantenidas en SSF y a 4 °C	35
7.4.7 Viabilidad de las células de <i>Lactobacillus spp.</i> inmovilizadas con enriquecimiento y mantenidas en SSF y a temperatura ambiente	35
7.4.9 Las esferas que fueron secadas a temperatura ambiente	37
8.0 Discusiones	38
9.0 Conclusiones	42
10.0 Bibliografía	43

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Metodología para estandarizar la formulación del agente inmovilizante	20
Figura 2 Metodología para estandarizar el enriquecimiento usado en la inmovilización	21
Figura 3 Metodología para inmovilizar al <i>Lactobacillus spp.</i>	22
Figura 4 Curva de crecimiento de <i>Lactobacillus spp.</i> en medio de Rogosa ...	28
Figura 5 Curva de viabilidad del <i>Lactobacillus spp.</i> Inmovilizado en esferas simples y mantenidas en gel blando a diferentes T °	30
Figura 6 Curva de viabilidad del <i>Lactobacillus spp.</i> Inmovilizado en esferas simples y mantenidas en SSF a diferentes T °	32
Figura 7 Curva de viabilidad del <i>Lactobacillus spp.</i> Inmovilizado en esferas enriquecidas y mantenidas en gel blando a diferentes T °	34
Figura 8 Curva de viabilidad del <i>Lactobacillus spp.</i> Inmovilizado en esferas enriquecidas y mantenidas en SSF a diferentes T °	36

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Consistencia de las esferas formadas con diferentes concentraciones del biopolímero	24
Tabla 2 Influencia de la concentración de proteína en la mezcla del biopolímero sobre la formación de las esferas	26
Tabla 3 Influencia de la concentración del polisacárido vegetal en la mezcla del biopolímero, sobre la formación de las esferas	26
Tabla 4 Influencia de la formulación en la forma de las esferas	26

RESUMEN.

Muchos métodos de inmovilización de células pueden ser desarrollados de algunas imitaciones naturales por atrapamiento de organismos en polímeros naturales.

La aplicación de las células inmovilizadas de *Lactobacillus spp.* en el presente trabajo tuvo como objetivo el poderlas usar en la elaboración de "probióticos", cuya definición es: "suplementos alimenticios con microorganismos vivos, con efectos benéficos en el animal huésped y con la finalidad del mejoramiento del balance de microorganismos intestinales". Una de las características más importantes es que estén vivas las bacterias, por este motivo se estudio la viabilidad de las bacterias inmovilizadas para lo cual se realizaron esferas simples y enriquecidas donde se determinó su viabilidad.

La mayor sobrevivencia se presentó al utilizar esferas enriquecidas conservadas a 4 °C, sin importar el medio de mantenimiento utilizado (gel blando o SSF). A diferencia de las esferas simples en donde la viabilidad de las bacterias es alta también pero si están en un medio con mayor humedad (SSF) y a 4 °C.

1.0 INTRODUCCION

Hace miles de años el hombre descubrió como hacer pan, vino y como curtir cuero, la habilidad para proveerse de éstas necesidades básicas de cada día para vivir, también quizo entender el curso de los procesos biológicos complicados. En fechas recientes se pudo comprender el metabolismo celular y la posesión de enzimas catalíticas. Sin embargo, la adquisición de estos conocimientos pudo volverse un deseo para más proezas, como usar el potencial de las células y enzimas para uso doméstico, industrial y con propósitos médicos. (42)

Desde 1960 varios artículos sobre enzimas inmovilizadas han sido publicados primordialmente por el potencial que estas nuevas técnicas representan. Estos métodos permitieron el desarrollo de inmovilización de células y enzimas, si bien, se sigue estudiando e incrementando su importancia con el mejoramiento de la producción de enzimas microbianas mediante ingeniería genética. Esta capacidad con métodos nuevos y más económicos, llevará a la estabilidad de enzimas a crear muchos empleos en la explotación comercial de la tecnología de la inmovilización. (31)

Los autores Tosa et al 1967, 1968 y Chibata et al 1972 fueron los primeros en tener éxito en la aplicación industrial de la inmovilización de enzimas para la producción continua de L - aminoácidos y DL- aminoácidos. La producción de ácido 6-aminopenicilánico, fructuosa, y obtención de penicilina por enzimas inmovilizadas, pronto siguieron en los Estados Unidos, Europa y Japón respectivamente. (33)

Las células microbianas que contienen sistemas multienzimáticos al ser inmovilizadas pueden ser usadas como catalizadores sólidos, existe la posibilidad de que los métodos fermentativos, que involucran reacciones multienzimáticas puedan ser reemplazadas por las reacciones enzimáticas continuas usando inmovilización de células. (31)

Sin embargo, existen pocos reportes sobre células inmovilizadas. Chibata et al. (1974e) y Tosa et al. (1974). estudiaron la inmovilización de células microbianas completas, por ejemplo *E. coli* que tiene una alta actividad de aspartasa, y en 1973 tuvieron éxito en la aplicación industrial de células inmovilizadas para la producción continua de ácido L-aspartico a partir de fumarato de amonio. Esta fue la primera aplicación industrial internacional de células microbianas inmovilizadas.

En 1974 Chibata et al. (1975c) y Yamamoto et al. (1976, 1977) tuvieron éxito en la aplicación de la producción industrial del ácido L- málico a partir de fumarato usando *Brevibacterium ammoniagenes* inmovilizada con alta actividad de fumarasa.⁽³¹⁾

2.0 GENERALIDADES

2.1 INMOVILIZACION DE CELULAS MICROBIANAS.

La inmovilización está definida como la limitación de la materia dentro de un medio sólido, líquido o gaseoso, esto es, probablemente debido al estado en que la mayoría de los microorganismos existen en la naturaleza. Las bacterias son atrapadas naturalmente en fango o absorbidas en materiales inertes o sustratos de crecimiento. Igual sucede con algunas enzimas que pueden ser absorbidas naturalmente sobre partículas de tierra y también hay muchas algas que producen polisacáridos extracelulares para adherirse a superficies y sobrevivir en períodos de sequía.⁽⁹⁾

Muchos métodos de inmovilización de células, pueden ser desarrollados de algunas imitaciones naturales por atrapamiento de organismos en polímeros naturales, se necesitan algunos mejoramientos naturales para incrementar la estabilidad física de las preparaciones y otras por unión natural, por modificación covalente celular y así encaminar muchas de sus actividades biológicas.⁽⁹⁾

El uso de células inmovilizadas tiene muchas ventajas sobre el uso de células libremente suspendidas. La principal entre estas son: la capacidad de rehusar las células inmovilizadas y la facilidad con la cual las células pueden ser separadas de la mezcla de reacción, previniendo así contaminación de los productos.⁽⁹⁾

Otro beneficio de la inmovilización es que puede ser reversible. Las células inmovilizadas resisten más al congelamiento que las células no inmovilizadas.⁽³⁶⁾

Los métodos para inmovilización de células microbianas pueden ser clasificadas en tres categorías semejantes a los de inmovilización de enzimas y éstos son: ligadas a un soporte, entrecruzamiento y atrapamiento. De estos métodos, el de atrapamiento ha sido extensamente usado.⁽³¹⁾

2.1.1 METODO DE UNION A UN SOPORTE.

El método de unión a un acarreador está basado en la unión directa de células microbianas a acarreadores insolubles en agua. Las células microbianas son unidas iónicamente a soportes conteniendo residuos de intercambio iónico. Hattori y Furusaka (1960,1961) unieron células *E. coli* y células de *Azotobacter agilis* a Dowex-1. Observaron que estas células inmovilizadas mostraban actividad oxidativa para glucosa y ácido succínico.

Sin embargo éste método no se considera muy ventajoso ya que células y enzimas pueden salirse del soporte debido a la autólisis durante la reacción enzimática.⁽³¹⁾

2.1.2 METODO DE ENTRECruzAMIENTO.

Las células microbianas pueden ser inmovilizadas por entrecruzamiento con dos o más reactivos semejantes como glutaraldehído, disocianato de tolueno. Chibata et al. (1974) investigaron la inmovilización de *E. coli* teniendo actividad de aspartasa por entrecruzamiento con glutaraldehído con los reactivos bifuncionales. La inmovilización de células mostraron actividad de aspartasa correspondiente a 34,2%.

Así, muy pocas investigaciones tienen semejanza con este método. Sin embargo hay la posibilidad de que los reactivos de entrecruzamiento para inmovilización de células se establezca en el futuro.⁽³¹⁾

2.1.3 METODO DE ATRAPAMIENTO.

Los métodos de atrapamiento dentro de matrices poliméricas pudieron ser mas extensamente investigados, gracias a la inmovilización de células. Para este método, las matrices principalmente empleadas son colágeno, gelatina, agar, alginato, poliacrilamida y poliestireno. Entre estas matrices, los geles de poliacrilamida han sido extensamente usados para inmovilización de muchas células microbianas. El método de geles de poliacrilamida fue primeramente usado para inmovilización de enzimas por Bernfeld y Wan (1963). Estas técnicas más tarde fueron aplicadas a la inmovilización de células de liqúen, *Umbilicaria pustulata*, por Mosbach y Mosbach (1966).⁽³¹⁾

2.2 APLICACION DE INMOVILIZACION DE CELULAS.

2.2.1 PRODUCCION DE AMINOACIDOS.

Los aminoácidos son ampliamente usados en los alimentos, comida, medicina e industrias cosméticas y también como materias iniciadoras para síntesis químicas. En los alimentos tiene aplicaciones nutricionales, solamente los L- aminoácidos son activos.

Se ha empleado en la inmovilización de aminoamilasa y para producción continua de L- aminoácidos de acil DL-aminoácidos.⁽¹⁴⁾

2.2.2 PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS.

Solamente pocos estudios han sido publicados en la utilización de células para la producción de antibióticos. Algunos antibióticos producidos por inmovilización de células son, penicilina G, cefalosporina C, bacitracina, nicomicina, ampicilina.⁽¹⁶⁾ Las bacterias ácido lácticas son capaces de producir un metabolito secundario antibiótico conocido como bacteriocina. La inmovilización de *Lactobacillus spp.* en sustratos sólidos es visto como un posible medio de aumento de producción de bacteriocinas.⁽⁶⁾ Otro antibiótico elaborado por inmovilización de células microbianas de *Streptomyces griseus* es el candicin.⁽¹³⁾

2.2.3 PRODUCCION DE ACIDOS ORGANICOS.

Los ácidos orgánicos son ampliamente usados en alimentos y medicina, algunos son producidos por fermentación convencional. La inmovilización de células microbianas es ocasionalmente utilizada para mejorar la productividad. Ejemplos de ácidos orgánicos producidos por inmovilización de células microbianas son L- ácido málico, ácido urónico, ácido acético, ácido cítrico.⁽¹⁴⁾

2.2.4 PRODUCCION DE ALCOHOLES.

Más recientemente la producción de alcoholes como etanol, usando inmovilización de células ha sido el tema de considerable interés. Este sistema parece prometedor para la producción comercial de etanol.⁽¹⁴⁾

2.2.5 OTROS COMPUESTOS ORGANICOS UTILES.

La inmovilización de células animales vivas como biocatalizador representa un nuevo, fascinante y rápido crecimiento en la tendencia de la biotecnología en células animales. La inmovilización de células animales es usado como un método para producción de metabolitos secretados por las células como en: factores de crecimiento, hormona del crecimiento humana, linfoquinas, anticuerpos monoclonales. (17, 13, 29, 30, 42)

La inmovilización de *Porphyridium cruentum* es usado para la producción de un polisacárido sulfatado extracelular (Jones 1962), ácido araquidónico (Ahern et. al. 1983). (23)

A partir de células inmovilizadas se produce una gran variedad de enzimas tal es el caso de las proteasas que se obtienen de células inmovilizadas de *Bacillum megaterium*.

La transformación de reacciones de esteroides pueden ser llevadas a cabo fuera de solventes orgánicos usando inmovilización de células microbianas. Algunas sustancias que pueden ser producidas por inmovilización de células microbianas son: hidrocortisona, testosterona, NADP, NAD, ATP, flavin adenil dinucleótido, coenzima A, ácido pantoténico, L- cistefna, glucosa 6- fosfato, glucosa 1- fosfato, vitamina B 12, alfa amilasa, proteasa, proinsulina. (14)

Otra de la aplicación de la inmovilización de células bacterianas sería, el utilizarlas para ser incluidas en diferentes productos "probióticos" a base de bacterias ácido lácticas por los beneficios de salud que causa cuando las bacterias son administradas y estas sobreviven en el tracto gastrointestinal.

2.3 PROBIOTICOS

A través de los años la palabra "probiótico" ha sido usada en formas diferentes. Esta fue originalmente usada para describir "sustancias producidas por un protozoario", el cual estimulaba a otro (Lilly y Stillwell 1965) pero, más tarde fue usada para describir "suplemento alimenticio" para animales que tuvo un efecto benéfico en los animales huéspedes afectando la flora intestinal (Parker 1974). Posteriormente, esta última fue definida como "organismos y sustancias para contribuir en el balance de microorganismos intestinales". Esta definición no es satisfactoria, porque también es imprecisa ya que abarca a los antibióticos. Finalmente después de haber revisado la definición, ésta quedaría como "un suplemento alimenticio formada con microorganismos vivos con efectos benéficos en los animales huéspedes para el mejoramiento del balance intestinal de microorganismos" (Fuller 1989). (17,18,34)

El término "probiótico" que es usualmente usado para describir suplementos alimenticios para animales abarca también al yogurt utilizado para el consumo humano. La creencia de los efectos benéficos del yogurt es a raíz de Metchnikoffs (1907), la longevidad de los campesinos Búlgaros fue directamente relacionada ya que consumían grandes cantidades de leche fermentada. Siguiendo el concepto original de Metchnikoff, las leches fermentadas fueron desarrolladas con muchos organismos como *Lactobacillus acidophilus* el cual coloniza el tracto gastrointestinal (Rettger y Cheplin 1921). Recientes evidencias indican que otras bacterias en el intestino son benéficas en los huéspedes por protección de enfermedades o mejorando la nutrición. (17)

2.3.1 COMPOSICION.

Los "probióticos" tienen diferentes presentaciones para los animales que dependerán de la especie animal en la que se vaya a emplear. Pueden ser incluidos en los alimentos peletizados, cápsulas, pastas, polvo o granulados el cual puede ser usado por dosificación a los animales directamente o en su comida. Las especies donde se han empleado son: el ganado vacuno, carnero, cabras, cerdo, aves de corral, caballos, animales domésticos. Casi todos los probióticos existentes en el mercado comúnmente contienen *Lactobacillus spp.* y/o *Streptococcus spp.* y unos pocos contienen Bifidobacterias. Muchos probióticos consisten en preparaciones con una sola cepa o pueden contener hasta 8 especies diferentes. Los atractivos de las múltiples cepas es que son activas frente a un amplio número de bacterias y en varias especies animales. (3,16,17,18)

Las especies comúnmente usadas en probióticos son: *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. lactis*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter faecalis* y *Bifidobacterium spp.*. Con dos excepciones *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* estas no son cepas intestinales y se emplean en la elaboración del yogurt. (3,17) Los *Lactobacillus spp.* y *Streptococcus faecalis* son los grupos más comúnmente usados en la producción de probióticos. La justificación para el uso de *Lactobacillus spp.* emerge a raíz de estudios que demuestran que los *Lactobacillus spp.* se incrementan en el intestino y están en mayor cantidad en comparación con el resto de la flora intestinal, además son capaces de controlar el desarrollo de *E. coli* (Smith 1965). (18)

Los probióticos pueden reducir el porcentaje de crecimiento de los agentes patógenos de la mucosa ileal y demorar la síntesis de fimbrias K88 y además el

establecimiento de estos patógenos en el intestino puede ser inhibido por la presencia de los *Lactobacillus spp.* y *Streptococcus faecalis*. (21)

Características de bacterias lácticas. Aun cuando *Lactobacillus spp* o *Streptococcus faecalis*. son usados como aditivo del alimento, también hay certeza que poseen características que producen efectos en los animales tales como:

- Inhibición de patógenos intestinales.
- Previsión de la clave en la actividad enzimática del intestino.
- Asimilación del colesterol.
- Incrementa el crecimiento y funcionamiento de los animales.

Asumiendo que un microorganismo aislado posea dichos efectos es necesario que sobreviva, crezca y se reproduzca en el tracto intestinal, que tenga resistencia al jugo gástrico, al pH bajo y a enzimas gástricas, además tolerancia a la bilis, que sea hábil para desalojar otros microorganismos del intestino y se presente en número suficiente. (11)

La siguiente sección menciona las características más importantes que deben tomar en cuenta cuando se seleccionen bacterias para productos probióticos.

Los *Lactobacillus spp.* son incapaces de originar enfermedad en el animal a nivel intestinal. Es conocido también que los *Lactobacillus spp.* son inofensivos y no contaminantes como otros microorganismos. (12,13)

Las Bacterias gram positivas son más resistentes a la destrucción por enzimas digestivas, por eso tienen una mejor posibilidad de alcanzar el intestino delgado. Ejemplo de bacterias gram positivas son los *Lactobacillus spp.* (11,18)

Las bacterias deben tener propiedades ácido resistentes para no sufrir daño a través del estómago y al pasar a sitios de más actividad en el intestino delgado. También las bacterias deben ser productoras de ácido creando un ambiente antagonista a las bacterias más sensibles como en el caso de las coliformes el *Lactobacillus spp.* satisface dichos requerimientos. (11)

Para que la bacteria sea efectiva, es importante asegurar la colonización incluyendo la adhesión que tiene lugar en el tracto intestinal. (11,12,18)

Las bacterias ácido lácticas son bien reconocidas por su producción de proteínas

antimicrobiales (Klaenhammer, 1988 Lindgren y Dobrogosz, 1990). Las bacteriocinas de especies de *Lactobacillus spp.* inhiben a bacterias coliformes, ya que compiten por algunos nichos ecológicos. Las bacteriocinas facilitan la competencia de *Lactobacillus spp.* en el intestino por eliminación de cepas patógenas. (8,10,22)

El éxito de los microorganismos probióticos depende de la sobrevivencia de estas cepas y de resistir la acción del jugo biliar. Cierta resistencia al jugo biliar de las cepas puede ser probada por los métodos de Gilliland (1984). (19)

Cepas elegidas para ser usadas comercialmente para la elaboración de probióticos no deben perder las características de ser genéticamente estables y viables. (16,18)

2.4 CARACTERISTICAS Y MECANISMO DE ACCION.

Aunque el concepto de probiótico ha sido conocido durante muchos años, el mecanismo preciso de acción no se conoce; se cree que bajo ciertas circunstancias los *Lactobacillus spp.* pueden prevenir o reducir diarreas asociadas a coliformes. (16)

Los efectos benéficos de los probióticos pueden ser mediados por un antagonismo directo contra grupos específicos de microorganismos, resultando en una disminución en número o por afectar su metabolismo o por la estimulación de la inmunidad. (16)

La supresión del número de bacterias en el intestino puede ser por: producción de sustancias antibacterianas como metabolitos primarios, algunos ácidos orgánicos o por peróxido de hidrógeno; mediante la síntesis de lactato con reducción del pH intestinal y la adhesión a la pared intestinal; previniendo la colonización de patógenos por detoxificación de endotoxinas y prevención de síntesis de aminas tóxicas. (15)

2.4.1 PRODUCCION DE ANTIBIOTICOS.

Se han reportado que los *Lactobacillus spp.* producen varios tipos de sustancias semejantes a antibióticos. Los *Lactobacillus acidophilus* produce acidofilina, lactocidina y acidolina. Adicionalmente, algunos de los *Lactobacillus spp.* producen suficiente peróxido de hidrógeno para inhibir varios microorganismos patógenos.

Los metabolitos antibióticos de *Lactobacillus spp.* (acidofilina, acidolina,

lactobacilina y lactocidina) han demostrado una actividad inhibitoria in vitro, contra Salmonella, Shigella, Staphylococcus, Proteus, Klebsiella, Pseudomonas, Bacillus, enteropatógenos de *E. coli* y algunas especies de Vibrio. (2,15,16,27,33,40)

Los *Lactobacillus spp.* producen ácidos orgánicos tales como ácido acético y láctico, los cuales inhiben el crecimiento de muchos organismos patógenos Gram-negativos. La especulación largamente sostenida, es que esta actividad antimicrobial puede ser debida, al bajo potencial de oxidación y reducción (bajando el oxígeno disponible para los patógenos) y al pH bajo mantenido dentro del intestino a través del metabolismo de los *Lactobacillus spp.* (4,35)

2.4.2 ANTAGONISMO COMPETITIVO.

La flora microbiana normal del tracto intestinal actúa como una barrera defensiva en el animal, al hacer que el blanco del epitelio celular no esté disponible para los patógenos ó bien creando un ambiente desfavorable para los mismos. Dicho de otra forma, si los habitantes del tracto intestinal están seguros en su nicho, la potencialidad patogénica bacteriana podría no ser capaz de competir exitosamente para fijarse en ese sitio, además, cualquier cosa que afecte el balance entre el animal y la flora normal podría dar a los patógenos la oportunidad de multiplicación para fijarse al epitelio. (16)

A través de la administración constante de bacterias benéficas en la dieta del animal, la colonización del tracto gastrointestinal por organismos patógenos puede ser alterada. (16)

2.4.3 ALTERACION DEL METABOLISMO MICROBIANO.

Los suplementos a base de *Lactobacillus spp.* pueden influenciar el metabolismo microbiano en el intestino como lo demostraron Goldin y Gorbach (1984). Cuando ellos alimentaron a un número determinado de animales con *Lactobacillus acidophilus* para humanos y midieron la cantidad de enzimas descubrieron que el tratamiento suprimió la actividad de beta- glucuronidasa, nitroreductasa y azoreductasa. Un estudio similar en ratas con una flora intestinal humana tuvo una reducción en beta- glucuronidasa y beta- glucosidasa. (18)

Los probióticos pueden también tener influencia en el incremento de la actividad de enzimas útiles en casos de intolerancia de la lactosa (beta- galactosidasa). (18)

2.4.4 INMUNOESTIMULACION.

En animales alimentados con probióticos se reduce la actividad fagocítica y disminuye los niveles de inmunoglobulinas siempre y cuando los animales estén libres de gérmenes. También se ha estudiado el importante papel que la microflora juega en la evolución de resistencia a enfermedades y algunos de estos efectos pueden ser debidos a *Lactobacillus spp*, esto fue demostrado por experimentos con *Lactobacillus casei* el cual fue administrado en ratón incrementando la actividad de los macrófagos (Perdigon, De Macias, Alvarez, Oliver y De Ruiz Holgado, 1986). En otro estudio se demostró que el yogurt incrementa los niveles de inmunoglobulinas (Wade, Curthier Moreau y Besnier, 1984). Respecto a la leche fermentada con *Lactobacillus casei* o *Lactobacillus acidophilus* solo fue más efectiva en la estimulación de la actividad fagocítica (Perdigon et al 1988). El alimento de yogurt en ratones estimuló la producción de inmunoglobulinas e incrementó el tamaño de los folículos linfáticos. (32)

2.5 EFECTO BENEFICO EN ALGUNAS ENFERMEDADES

2.5.1 ALIVIA LA INTOLERANCIA DE LA LACTOSA.

Muchas personas por todo el mundo sufren de intolerancia de lactosa debido a una deficiencia congénita de la enzima beta-galactosidasa resultando la incapacidad para digerir la lactosa. Es conocido que las personas con intolerancia de lactosa pueden digerir lactosa en el yogurt mejor que alguna cantidad de lactosa en leche (Gallagher et al 1974). Se ha sugerido que el yogurt ejerce este efecto por abastecimiento adicional de enzima y hay evidencias para sostener esto. Ratas alimentadas con yogurt pueden incrementar la concentración de la enzima en el intestino delgado (Garvie et al. 1984). Esta enzima es de origen bacteriano y no debido a la estimulación de la lactosa en la rata. (18)

2.5.2 FAVORECE LA DIGESTION.

Existe una favorable influencia en la función intestinal de pacientes alimentados con suplementos de *Lactobacillus acidophilus*. (18)

2.5.3 ACTIVIDAD ANTITUMORAL.

Desde la primera observación por Bogdanov et al. (1962) se descubrió que *L. bulgaricus* produce sustancias que fueron activas contra desarrollo tumoral. Las propiedades anticancerígenas de *Lactobacillus spp.* se dividen en tres categorías: a) inhibición de las células tumorales (Reddy et al. 1973); b) La supresión de las bacterias con producción de muchas enzimas como beta-glucosidasa, beta-glucoronidasa y azoreductasas, las cuales son responsables de destruir cancerígenos. (Goldin y Gorbach 1977) y c) La destrucción de cancerígenos tal como nitrosaminas (Rowland y Grasso 1975) y la supresión de nitroreductasa (Goldin y Gorbach 1984). (20)

2.5.4 EFECTOS ANTICOLESTEROLEMICOS.

Los efectos del yogurt y leche con *L. acidophilus* en el colesterol de la sangre es variable. Alimentos con yogurt para humanos produce bajas concentraciones de este en sangre. (Mann 1977). (18)

3.0. JUSTIFICACION:

La disponibilidad de antibióticos en 1950 fue el resultado de su uso difundido como agentes terapéuticos y estimulantes del crecimiento para animales de granja. El uso de antibióticos como promotores de crecimiento, resultó en el desarrollo de resistencia de las poblaciones bacterianas, con lo cual se dificultó su uso en la terapéutica, dando como resultado que se restringiera su administración como suplemento alimenticio por Swann Committee en 1969. (17)

La posibilidad de desistir a que los antibióticos sean usados como promotores del crecimiento en animales de granja por los efectos colaterales de los agentes terapéuticos, puede producir un cambio en el que tanto los consumidores como los fabricantes estén buscando alternativas de prevención del agente causal de diarrea en lechones. (17,39)

Dada la gran cantidad de lechones que son afectados por las diarreas causadas por *E. coli*, es necesario encontrar formas de controlarla. Actualmente existe la tendencia de prevenir la presentación de las infecciones gastrointestinales de origen bacteriano en los lechones, mediante el uso de microorganismos fermentadores benéficos tales como *Lactobacillus spp.* y *Streptococcus faecalis*. De acuerdo con esto, se busca producir suplementos alimenticios tales como los "Probióticos" formulados con microorganismos vivos debido a sus efectos benéficos en los animales huéspedes ya que mejoran y controlan el balance intestinal microbiano sin efectos colaterales.

4.0 OBJETIVO GENERAL:

- Inmovilizar una cepa de *Lactobacillus spp.* en un biopolímero de uso alimentario para ser utilizado como probiótico.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES:

- a.- Estudiar la cinética de crecimiento del *Lactobacillus spp.* en caldo Rogosa.
- b.- Obtener la biomasa del *Lactobacillus spp.* para la inmovilización.
- c.- Inmovilizar los *Lactobacillus spp.* en un biopolímero de uso alimentario.
- d.- Estudiar la viabilidad del *Lactobacillus spp.* inmovilizado.

5.0 HIPOTESIS

Si se inmovilizan los microorganismos vivos para ser usados como probióticos y se les mantiene a niveles metabólicos bajos y en condiciones adecuadas de humedad, éstos sobrevivirán por más tiempo.

6.0 METODOLOGIA

El *Lactobacillus spp.* empleado en este trabajo fue aislado de lechones por el laboratorio de Bacteriología de posgrado de la F.E.S.-C. e identificados según Bergey. El medio empleado para el crecimiento de los *Lactobacillus spp.* fue una modificación del medio Rogosa desarrollado por Rogosa, Mitchell y Wiseman (1951) contiene (extracto de carne 5g, extracto de levadura 2.5g, ácido ascórbico 0.5 g, peptona de soya 5g, polipeptona 5g, acetato de sodio anhidro 5g, dextrosa 5g por litro de medio de cultivo).²⁶ El biopolímero de uso alimentario proviene de algas marinas y donado por industrias Provequim. El agente gelificante (sales minerales de uso alimentario Merk).^{6, 7, 9, 11, 23, 24, 25, 35, 37, 41}

Para la formación de las esferas es necesario tener una mezcla del biopolímero de uso alimentario con la bacteria por goteo con ayuda de una bomba peristáltica sobre la solución del agente gelificante se encuentra en agitación, se forman las esferas las cuales se dejan una hora más en agitación para su estabilización.⁴¹

6.1 ESTANDARIZACION DE LA FORMULACION DEL AGENTE INMOVILIZANTE.

Se evaluaron diferentes concentraciones del biopolímero de uso alimentario que fue utilizado para la inmovilización del *Lactobacillus spp.* con el fin de obtener esferas de consistencia dura, que favoreciera la permanencia del microorganismo en el interior de ellas. Se usaron 3 concentraciones del agente gelificante (contraíón) 0.05M, 0.1M y 0.2M y 3 concentraciones del biopolímero de uso alimentario 0.5%, 1% y 2%. Se valoró su consistencia (resistencia mecánica para romperse las esferas con los dedos) en forma cualitativa.³⁸

	0.05 M. Agente gelificante	0.1 M Agente gelificante.	0.2 M Agente gelificante
0.5 % Biopolímero	+		
1 % Biopolímero	+		
2 % Biopolímero	+		
0.5 % Biopolímero		+	
1 % Biopolímero		+	
2 % Biopolímero		+	
0.5 % Biopolímero			+
1 % Biopolímero			+
2 % Biopolímero			+

+ Concentraciones del biopolímero empleadas en la elaboración de las esferas.

6.2 ESTANDARIZACION DEL ENRIQUECIMIENTO DE LAS ESFERAS USADAS EN LA INMOVILIZACION.

Se hicieron varias formulaciones para elegir la más adecuada donde permanezcan por más tiempo vivas las bacterias que consistieron en: adicionar polisacárido de origen vegetal como fuente de carbono y energía y una proteína de origen animal en diferentes concentraciones a la mezcla donde se encuentra el biopolímero de uso alimentario:

% Polisacárido	20	10	5	2.5	1
% Biopolímero	2	2	2	2	2

% Proteína	50	40	30	25	20	15	10
% Biopolímero	2	2	2	2	2	2	2

% Polisacárido		2.5	5
% Proteína	10	+	+
	15	+	+

Se valoró cualitativamente la consistencia (resistencia mecánica para romperse las esferas con los dedos) de las esferas y su forma. 38

6.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO.

Se realizó la cinética de crecimiento del *Lactobacillus spp.* en caldo Rogosa iniciando con un inóculo del 10% previamente crecido durante 18-24 hrs. y se determinó la cantidad de microorganismos presentes a diferentes tiempos realizando diluciones decimales y sembrándolas en agar Rogosa e incubándolas durante 48 hrs a 37 °C.

6.4 OBTENCION DE BIOMASA.

Una vez que se determinó la curva de crecimiento se realizaron cultivos con un inóculo de 10% en un volumen de 700 ml de caldo Rogosa con un tiempo de incubación de 6 hrs, tiempo en el cual se obtuvo el máximo de la fase logarítmica de acuerdo a la curva de crecimiento y una mayor concentración de masa celular la cual, fue separada del medio de cultivo por centrifugación a 7000 rpm durante 15 min a 4 °C.

6.5 FORMACION DE LAS ESFERAS PARA LA INMOVILIZACION DEL MICROORGANISMO.

6.5.1 ESFERAS SIMPLES.

Se eligió la formulación de 2% del biopolímero de uso alimentario y del agente gelificante 0.2 M que dio una mejor calidad en la forma y consistencia de las esferas y se procedió a inmovilizar al microorganismo en concentración del 30%, su viabilidad se estudió de la siguiente manera: Las esferas fueron divididas en tres partes, una de ellas fue

% Polisacárido		2.5	5
% Proteína	10	+	+
	15	+	+

Se valoró cualitativamente la consistencia (resistencia mecánica para romperse las esferas con los dedos) de las esferas y su forma. 38

6.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO.

Se realizó la cinética de crecimiento del *Lactobacillus spp.* en caldo Rogosa iniciando con un inóculo del 10% previamente crecido durante 18-24 hrs. y se determinó la cantidad de microorganismos presentes a diferentes tiempos realizando diluciones decimales y sembrándolas en agar Rogosa e incubándolas durante 48 hrs a 37 °C.

6.4 OBTENCIÓN DE BIOMASA.

Una vez que se determinó la curva de crecimiento se realizaron cultivos con un inóculo de 10% en un volumen de 700 ml de caldo Rogosa con un tiempo de incubación de 6 hrs, tiempo en el cual se obtuvo el máximo de la fase logarítmica de acuerdo a la curva de crecimiento y una mayor concentración de masa celular la cual, fue separada del medio de cultivo por centrifugación a 7000 rpm durante 15 min a 4 °C.

6.5 FORMACIÓN DE LAS ESFERAS PARA LA INMOVILIZACIÓN DEL MICROORGANISMO.

6.5.1 ESFERAS SIMPLES.

Se eligió la formulación de 2% del biopolímero de uso alimentario y del agente gelificante 0.2 M que dio una mejor calidad en la forma y consistencia de las esferas y se procedió a inmovilizar al microorganismo en concentración del 30%, su viabilidad se estudió de la siguiente manera: Las esferas fueron divididas en tres partes, una de ellas fue

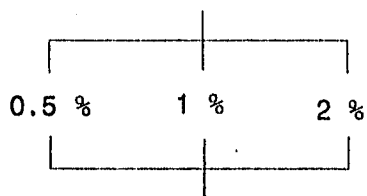
secada a temperatura ambiente durante 4 horas, las otras dos partes permanecieron en forma húmeda una parte en gel blanda y la otra en SSF respectivamente, y mantenidas a dos diferentes temperaturas, a 4 °C y a temperatura ambiente.

6.5.2 ESFERAS ENRIQUECIDAS.

Una vez elegidas las concentraciones de la proteína y del polisacárido que dieron mejor calidad de las esferas se agregaron a la mezcla del biopolímero 2% los *Lactobacillus spp.* al 30%, la cual fue goteada sobre el agente gelificante 0,2M para la formación de las esferas. Las esferas fueron divididas en tres partes, una de ellas fue secada a temperatura ambiente durante 4 horas, las otras dos partes permanecieron en forma húmeda una parte en gel blanda y la otra en SSF respectivamente, y mantenidas a dos diferentes temperaturas, a 4 °C y a temperatura ambiente.

**FIGURA 1. METODOLOGIA PARA ESTANDARIZAR
LA FORMULACION DEL AGENTE INMOVILIZANTE**

**CONCENTRACION DEL BIOPOLIMERO DE USO
ALIMENTARIO**



**CONCENTRACION DEL AGENTE
GELIFICANTE**

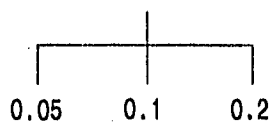


FIGURA 2. METODOLOGIA PARA ESTANDARIZAR EL ENRIQUECIMIENTO USADO EN LA INMOVILIZACION

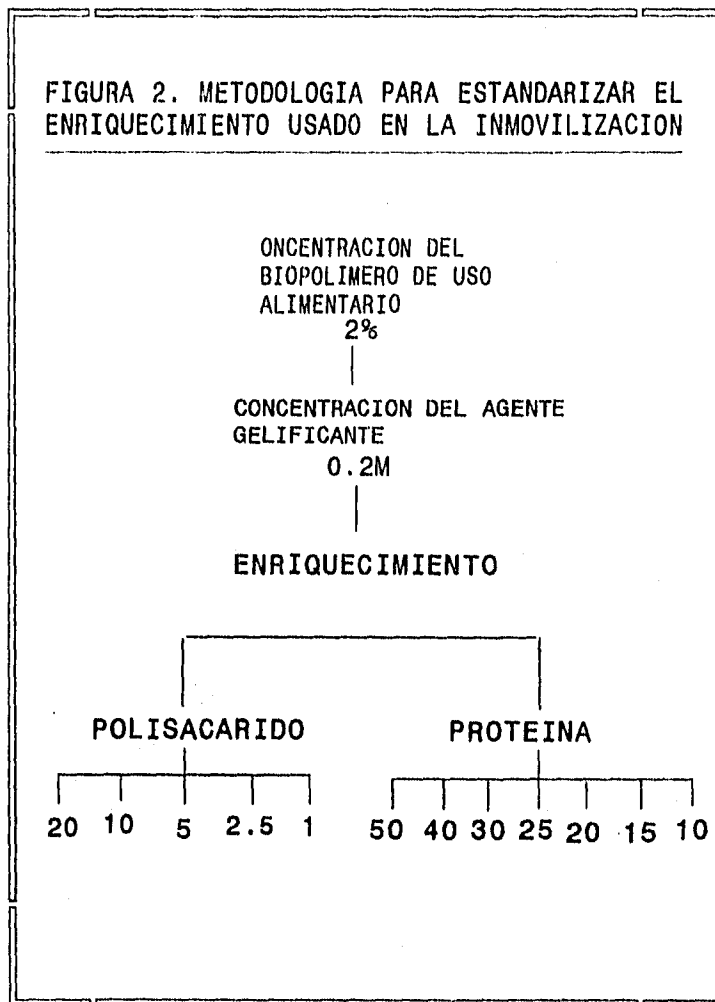
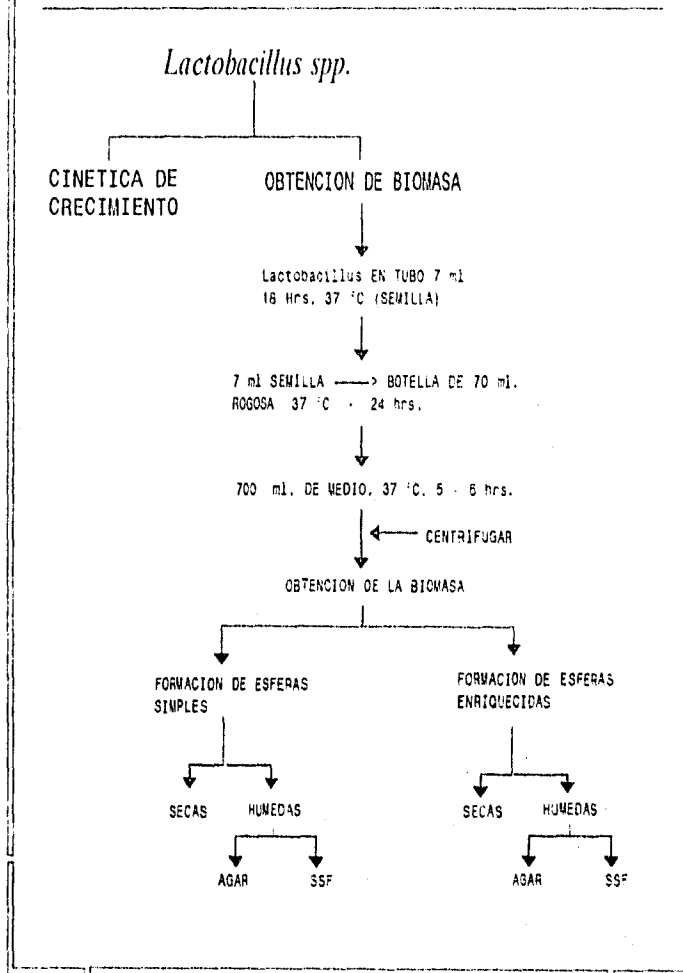


FIGURA 3. METODOLOGIA PARA INMOVILIZAR
AL *Lactobacillus spp.*



7.0 RESULTADOS:

7.1 ESTANDARIZACION DE LA FORMULACION DEL AGENTE INMOVILIZANTE.

De las diferentes esferas formadas, las de 0.5% del biopolímero de uso alimentario con las tres concentraciones del agente gelificante tenían consistencia blanda, mal formadas y alargadas, las formadas con 1% de biopolímero de uso alimentario y las diferentes concentraciones del agente gelificante son blandas pero bien formadas, con 2% del biopolímero y las diferentes concentraciones del agente gelificante fueron de consistencia dura (Tabla 1). Por lo cual se eligieron las formadas con 0.2M del agente gelificante, que dio una consistencia dura y de forma esférica.

TABLA 1. CONSISTENCIA DE LAS ESFERAS FORMADAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL BIOPOLIMERO.

TIPOS DE ESFERAS	CONCENTRACION DE BIOPOLIMERO	AGENTE GELIFICANTE	CONSISTENCIA	DIAMETRO
1	0,5%	0,05M	+	0,15
2	0,5%	0,10M	+	0,15
3	0,5%	0,20M	+	0,15
4	1,0%	0,05M	++	0,2
5	1,0%	0,10M	++	0,2
6	1,0%	0,20M	++	0,2
7	2,0%	0,05M	+++	0,25
8	2,0%	0,10M	+++	0,25
9	2,0%	0,20M	+++	0,25

NOTA ACLARATORIA.

LOS VALORES ASIGNADOS SON ARBITRARIOS Y ESTOS FUERON ASIGNADOS DE ACUERDO A LA CONSISTENCIA MEDIDA CON LOS DEDOS. + PARA LAS ESFERAS MAS BLANDAS, ++ PARA LAS DURAS, Y +++ PARA LAS ESFERAS MAS DURAS.

7.2 ESTANDARIZACION DEL ENRIQUECIMIENTO DE LAS ESFERAS USADAS EN LA INMOVILIZACION.

Al enriquecer con proteína la mezcla del biopolímero para la formación de las esferas, con las concentraciones 50%, 40% y 30% se formaba un coágulo que impedía la formación de las esferas, con las de 25% y 20% dio como resultado una solución muy espesa formándose esferas ovaladas, por último, las concentraciones al 15% y 10% de proteína se obtuvieron esferas de textura y forma aceptable. (Tabla 2)

Respecto al polisacárido de origen vegetal (Tabla 3) con 20% se forma una solución muy espesa, dando esferas ovaladas por lo que no fueron adecuadas para este trabajo. Con las concentraciones de 10%, 5%, 2.5% y 1% se formaron esferas sin dificultad.

En base a estos datos se formaron esferas enriquecidas con proteína 15% y 10% y polisacárido 10% y 2.5% (Tabla 4)

Al usar las concentraciones de proteína al 15% y las dos del polisacárido al 10% y 2.5% se forman esferas ovaladas por lo que no fueron adecuadas para ser utilizadas, de igual manera sucedió con la concentración al 10% y polisacárido al 10%, las esferas que se formaron fueron ovaladas. Cuando se usó la concentración de proteína del 10% pero con 2.5 del polisacárido, las esferas que se formaron fueron adecuadas debido a que presentaron forma esférica por lo que fue la elegida para inmovilizar al microorganismo.

TABLA 2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA EN LA MEZCLA DEL BIOPOLIMERO SOBRE LA FORMACION DE LAS ESFERAS.

BIOPOLIMERO DE USO ALIMENTARIO.	PROTEINA	FORMACION DE DE ESFERAS
2 %	50 %	- (COAGULO)
2 %	40 %	- (COAGULO)
2 %	30 %	- (COAGULO)
2 %	25 %	OVALES
2 %	20 %	OVALES
2 %	15 %	ESFERICAS
2 %	10 %	ESFERICAS

TABLA 3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DEL POLISACARIDO VEGETAL EN LA MEZCLA DEL BIOPOLIMERO, SOBRE LA FORMACION DE ESFERAS

BIOPOLIMERO DE USO ALIMENTARIO	POLISACARIDO DE ORIGEN VEGETAL	FORMACION DE ESFERAS
2 %	20 %	OVALADAS
2 %	10 %	ESFERICAS
2 %	5 %	ESFERICAS
2 %	2.5 %	ESFERICAS
2 %	1 %	ESFERICAS

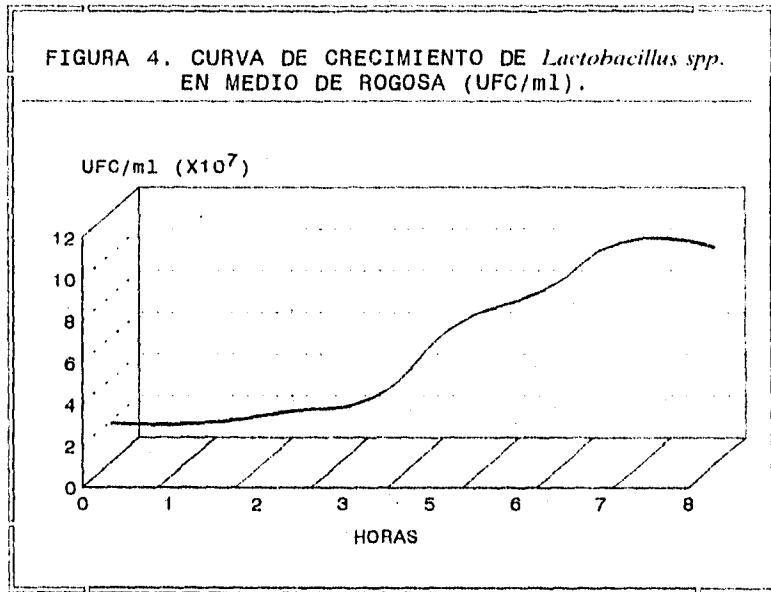
TABLA 4. INFLUENCIA DE LA FORMULACION EN LA FORMA DE LAS ESFERAS.

BIOPOLIMERO	ALIMENTO PROTEICO	POLISACARIDO	FORMA
2%	15%	10%	OVALADAS
2%	15%	2.5%	OVALADAS
2%	10%	10%	OVALADAS
2%	10%	2.5%	REDONDAS

7.3 CINETICA DE CRECIMIENTO.

Se realizaron cinéticas de crecimiento con la cepa de *Lactobacillus spp.* en donde se determinó que la fase de latencia duró 3 horas y la fase logarítmica 4 horas con una concentración final de 10×10^7 UFC/ml, presentándose una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.1325 hr^{-1} y un tiempo de duplicación de 5.23 horas, iniciándose luego la fase estacionaria donde la cuenta viable fue constante. Se eligió un crecimiento de 6 hrs. para realizar la inmovilización del microorganismo con un crecimiento aproximado de 8.26×10^7 (Figura 4).

FIGURA 4. CURVA DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus* spp.
EN MEDIO DE ROGOSA (UFC/ml).



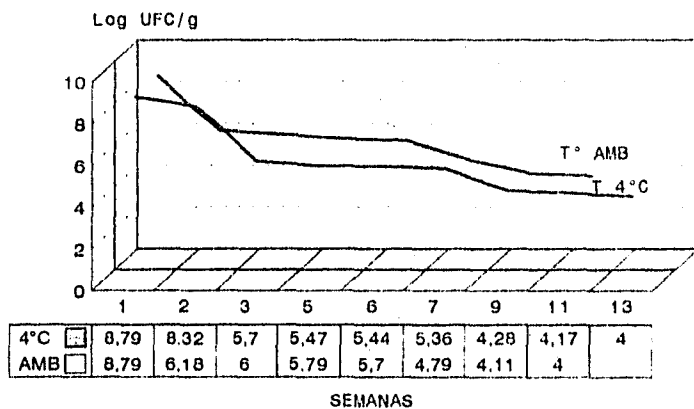
7.4.0 VIABILIDAD DE LAS CELULAS DE *Lactobacillus spp.* INMOVILIZADAS Y MANTENIDAS EN GEL BLANDO A 4 °C.

A partir de un conteo inicial 8.79 log UFC/g. disminuyen drásticamente durante las primeras semanas hasta 5.36 log UFC/g., y continuaron con la mortalidad en las últimas semanas a partir de la séptima semana 4.0 log UFC/g (Figura 5).

7.4.1 VIABILIDAD DE LAS CELULAS DE *Lactobacillus spp.* INMOVILIZADAS Y MANTENIDAS EN GEL BLANDO A TEMPERATURA AMBIENTE.

Tuvieron un conteo inicial de 8.79 log UFC/g. disminuyendo paulatinamente desde la primera semana hasta 6.18 log UFC/g. llegando a la sexta semana a 5.70 log UFC/g. y en la novena semana disminuyó a 4 log UFC/g (Figura 5).

FIGURA 5. CURVA DE VIABILIDAD DEL *Lactobacillus* spp. INMOVILIZADO EN ESFERAS SIMPLES Y MANTENIDAS EN GEL BLANDO A DIFERENTES T°



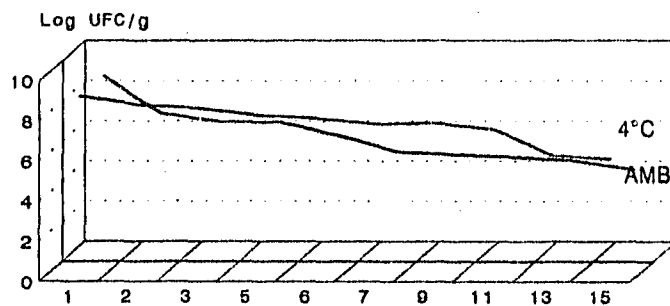
7.4.2 VIABILIDAD DE LAS CELULAS DE *Lactobacillus spp.* INMOVILIZADAS Y MANTENIDAS EN SSF Y A TEMPERATURA DE 4 °C.

Tienen una disminución de la viabilidad poco marcada de 8.75 log UFC/g. a 7.08 log UFC/g. en la onceava semana, y a partir de esta semana se incrementa la mortalidad hasta llegar a 5.60 log UFC/g (Figura 6).

7.4.3 VIABILIDAD DE LAS CELULAS De *Lactobacillus spp.* INMOVILIZADAS Y MANTENIDAS EN SSF A TEMPERATURA AMBIENTE.

El conteo inicial fue de 8.75 UFC/g. el cual bajo drásticamente en la primera semana hasta 6.87 log UFC/g., estabilizándose en las dos siguientes semanas en 6.4 log UFC/g. para después bajar un poco en la sexta semana hasta 5.75 log UFC/g. y en la séptima semana a 4.95 log UFC/g. Después de lo anterior se mantuvo con pocos cambios hasta la quinceava semana en 4.07 log UFC/g (Figura 6).

FIGURA 6. CURVA DE VIABILIDAD DE *Lactobacillus spp.* INMÓVILIZADO EN ESFERAS SIMPLES Y MANTENIDAS EN SSF A DIFERENTES T°



4 °C	8,75	8,3	8,14	7,79	7,63	7,34	7,4	7,08	5,78	5,6
AMB.	8,75	6,87	6,46	6,44	5,75	4,95	4,82	4,7	4,51	4,07

SEMANAS

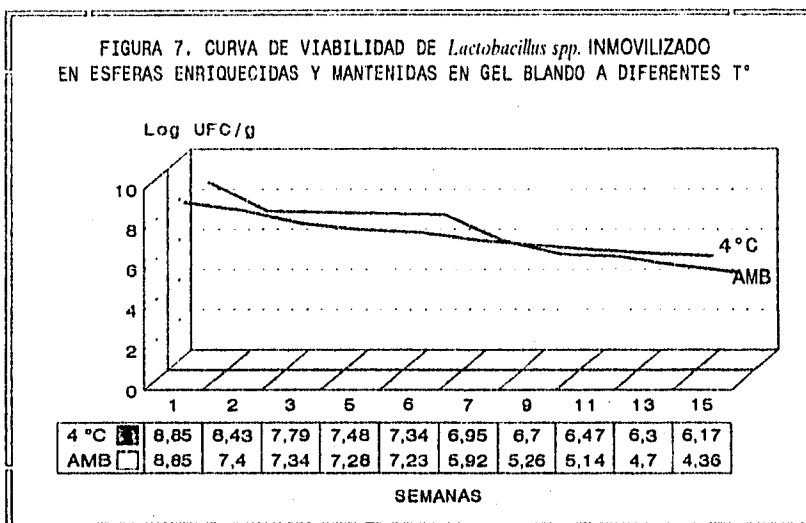
7.4.4 VIABILIDAD DE LAS CELULAS DE *Lactobacillus spp.* INMOVILIZADAS CON ENRIQUECIMIENTO Y MANTENIDAS EN GEL BLANDO Y A 4 °C.

El conteo inicial en la primera semana de 8.85 log UFC/g disminuyó lentamente hasta la séptima semana a 6.95 log UFC/g bajando poco más en las siguientes semanas hasta llegar a 6.17 log UFC/g en la semana 15 (Figura 7).

7.4.5 VIABILIDAD DE LAS CELULAS DE *Lactobacillus spp.* INMOVILIZADAS CON ENRIQUECIMIENTO Y MANTENIDAS EN GEL BLANDO Y A TEMPERATURA AMBIENTE.

Con un conteo inicial de 8.85 log de UFC/g disminuyen en la segunda semana a 7.40 log. UFC/g (pero no tanto como en las que no tienen enriquecimiento), continuando con una disminución paulatina poco marcada hasta la séptima semana que es de 5.92 log UFC/g y después de ésta, la disminución continúa hasta la quinceava semana hasta detenerse 4.36 log UFC/g (Figura 7).

FIGURA 7. CURVA DE VIABILIDAD DE *Lactobacillus spp.* INMOVILIZADO EN ESFERAS ENRIQUECIDAS Y MANTENIDAS EN GEL BLANDO A DIFERENTES T°



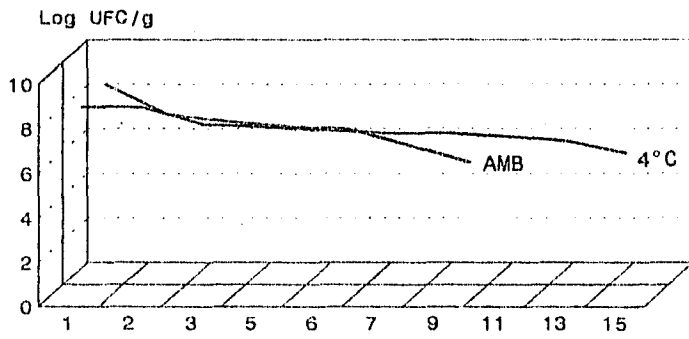
7.4.6 VIABILIDAD DE LAS CELULAS DE *Lactobacillus spp.* INMOVILIZADAS CON ENRIQUECIMIENTO Y MANTENIDAS EN SSF Y A 4 °C.

Con un conteo inicial de 8.49 log UFC/g disminuyen muy lentamente hasta la onceava semana a 7.16 log UFC/g e incrementándose el descenso un poco más en las siguientes semanas hasta llegar a 6.41 log UFC/g (Figura 8).

7.4.7 VIABILIDAD DE LAS CELULAS DE *Lactobacillus spp.* INMOVILIZADAS CON ENRIQUECIMIENTO Y MANTENIDAS EN SSF Y A TEMPERATURA AMBIENTE.

Con un conteo inicial 8.49 log UFC/g disminuyen un poco en la segunda semana a 7.15 log UFC/g permaneciendo prácticamente constante hasta la sexta semana a 6.49 log UFC/g y bajando ligeramente en la séptima semana a 5.75 log UFC/g y por último llegando a la novena semana a 5.0 log UFC/g (Figura 8).

FIGURA 0. CURVA DE VIABILIDAD DE *Lactobacillus* spp. INMOVILIZADO EN ESFERAS ENRIQUECIDAS Y MANTENIDAS EN SSF A DIFERENTES T°



4 °C	8,49	8,47	7,69	7,6	7,43	7,31	7,31	7,16	6,95	6,41
AMB	8,49	7,15	6,82	6,59	6,49	5,75	5			

SEMANAS

7.4.8 LAS ESFERAS QUE FUERON SECADAS A TEMPERATURA AMBIENTE.

Se les estudió su viabilidad y se vio que morfan muy rápidamente antes de 24 hrs. por lo cual no fueron adecuadas para mantener al *Lactobacillus spp.*

ESTA TESIS NO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA

8.0 DISCUSION:

Las bacterias ácido lácticas proveen beneficios a la salud cuando sobreviven en el tracto gastrointestinal humano y en animales. Y se puede apoyar este efecto si se le administran vivas por vía oral buscando este objetivo.

Se han buscado métodos de inmovilización para aumentar la vida de anaquel de estos microorganismos entre los que se encuentran la inmovilización de células mantenidas a bajas temperaturas resistiendo mejor que las células no inmovilizadas. (36)

Para la inmovilización de células vivas en las que se encuentran bacterias, levaduras, células de plantas superiores y animales tales como hibridomas y células de páncreas es necesario que los biopolímeros sean no tóxicos (tales como K-carragenina y alginato de calcio, quitosán) esto es, que no tengan contaminantes como metales pesados o polifenoles. (14,36). También que sean biocompatibles con las células y que se puedan además mejorar las condiciones de mantenimiento de los microorganismos, adicionando al biopolímero de inmovilización sustancias nutritivas para el microorganismo. (20,23). La inmovilización de células microbianas se ha empleado para conservar las células vivas por más tiempo, para producir ciertos metabolitos secundarios cuya producción no se asocie al crecimiento (13). En este estudio se obtuvieron células vivas, por tiempo prolongado y para lograr esto se enriqueció la mezcla de inmovilización de los microorganismos en esferas con la finalidad de que los microorganismos sean retenidos en el soporte y mantuvieran su metabolismo a niveles muy bajos que les permitió sobrevivir y se les protegió de la deshidratación (13). En diversos estudios se menciona que al incorporar nutrientes y buffer dentro de las esferas aumenta la viabilidad de los microorganismos (16).

Las técnicas de inmovilización son simples tal como lo menciona Ighal y Zafar (1993). Los materiales usados son estables, durables además de no modificar la estructura de las células así como también su naturaleza química (23).

Los resultados indican que se eligieron las esferas de mayor dureza, las formadas con 2% del biopolímero de uso alimentario y 0.2 M del agente gelificante las cuales impidieron la salida de los microorganismos, condición que fue comprobada cuando se cuantificó el microorganismo en el líquido en donde se encontraban las esferas.

El tamaño y la dureza de las esferas se ve influenciado por la cantidad de biopolímero de uso alimentario esto es, mientras mayor es la concentración usada del

biopolímero mayor el tamaño y dureza de la esfera. En cuanto a la disminución o aumento de la concentración del agente gelificante son aproximadamente constantes en la reducción del volumen y la fuerza del gel según lo afirman Martinsen A. Skjak G. et al. (1989)

Las mezclas que se eligieron para enriquecer la inmovilización del *Lactobacillus spp.* en base a su calidad y facilidad en su manejo para formar las esferas fue: 10% de proteína y 2.5% de polisacárido de origen vegetal.

Los probióticos por estar formulados con microorganismos vivos tales como los *Lactobacillus spp.*, es muy importante determinar su viabilidad y estabilidad (1,16). Lo anterior permitió establecer que para la cepa *Lactobacillus spp.* en la fase de crecimiento logarítmico de 6 horas con un crecimiento aproximado de 8.26×10^7 donde el grado de desarrollo del microorganismo es óptimo en cuanto a composición química y actividad metabólica. (30)

Las esferas simples mantenidas en gel blando y a 4 °C presentaron una mortalidad muy acelerada de los *Lactobacillus spp.* lo que se puede deber a la falta de nutrientes y a la poca disponibilidad de agua.

A las condiciones evaluadas (temperatura ambiente y en gel blando) los microorganismo mueren rápidamente desde la primera semana por lo que, sólo tienen una buena viabilidad las primeras tres semanas, condición que no sería muy adecuado para ser usado en un probiótico por tener poca viabilidad.

Los *Lactobacillus spp.* inmovilizados en esferas sin enriquecimiento y mantenidas a 4 °C, presentaron una buena viabilidad durante 11 semanas. Esto nos puede indicar que es importante la presencia de agua ya que evita la deshidratación.

Las esferas mantenidas a temperatura ambiente y en SSF presentan una mortalidad acelerada durante la primera semana y en menor grado en la segunda, durante las siguientes 5 semanas se mantienen vivas por mayor tiempo al compararlas con las mantenidas en gel blando probablemente porque tienen mayor humedad lo que está indicando que los microorganismos mueran fácilmente si se encuentran en ausencia de agua.

Las esferas con enriquecimiento y mantenidas en gel blando y a 4 °C con un conteo inicial en la primera semana de 8.85 log UFC/g disminuyó lentamente, permaneciendo con buena viabilidad durante todas las semanas que duró el experimento por lo que se concluye

qué, el enriquecimiento favorece la viabilidad de la cepa evaluada, debido a que se deshidratan menos.

En las esferas con enriquecimiento y mantenidas en gel blando y a temperatura ambiente los microorganismos vivieron por más tiempo que en las simples. Debe tener relación con su mayor resistencia a la deshidratación ya que las esferas secas a temperatura ambiente morían muy rápido, y cuando se mantenían en un medio hidratado aumentaban su viabilidad.

Las condiciones en SSF y a 4 °C es uno de los mejores medios de mantenimiento para las esferas en donde se encuentra inmovilizado el *Lactobacillus spp.* ya que permanecen por más tiempo vivos pudiéndose ser usadas en la formulación de un probiótico ya que mantienen una buena viabilidad mínimo por 15 semanas.

Las esferas enriquecidas y mantenidas en SSF a temperatura ambiente tienen viabilidad hasta la sexta semana esto no es muy adecuado ya que es poco tiempo el que permanecen vivos los microorganismos lo que nos indica que con esta formulación el probiótico debe ser mantenido en refrigeración para favorecer su eficacia.

Por los resultados obtenidos se observó que si no se enriquecían las esferas, era necesario mantenerlas en SSF y a 4 °C.

Las esferas enriquecidas presentan mejor viabilidad que las simples, pero podría ser comparable si estas se mantienen en gel blando o SSF a 4 °C. Lo que favorecería la utilización del gel blando sería que permite una mejor administración al animal recién nacido.

Los *Lactobacillus spp.* inmovilizados en esferas simples y secados a temperatura ambiente por toda la noche mueren rápidamente antes de 24 hrs. Esto es debido a que al carecer de un medio hidratado se provoca la muerte celular.

Los *Lactobacillus spp.* inmovilizados a los cuales se les agregó enriquecimiento proteínico y polisacárido de origen vegetal y que fueron secados mueren rápidamente. Esto es debido a que el polisacárido y la proteína les da mayor protección proporcionándoles nutrientes que les permiten mantener un metabolismo mínimo para sobrevivir en un medio hidratado.

Por lo anterior se determino que las esferas no deben ser secadas, independientemente en las condiciones a las cuales se preparen (simples o enriquecidas).

8.0 CONCLUSIONES.

El estudio de la cinética de crecimiento del *Lactobacillus spp.* fue de gran utilidad ya que nos permitió conocer todas las fases de crecimiento del microorganismo en medio Rogosa bajo las condiciones experimentales estudiadas. La velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.1325 hr^{-1} y un tiempo de duplicación de 5.23 horas.

Conociendo la cinética de crecimiento se consideró que a las 6 horas de iniciado el cultivo, se tiene una cantidad de biomasa suficiente del orden de 8.26×10^7 UFC/ml.

Con el fin de administrar vivos los microorganismos y que en este estado se mantuvieran por períodos más largos en el tracto digestivo de los animales, el *Lactobacillus spp.* fue inmovilizado en un biopolímero de uso alimentario obteniéndose esferas redondas de consistencia y tamaño de poro suficientemente pequeño para no permitir la salida de los mismos, así como la capacidad de mantenerlos con respecto al tiempo.

Las formulaciones del medio de inmovilización encontradas para mantener por más tiempo vivos a los *Lactobacillus spp.* fueron: biopolímero de uso alimentario, alimento proteico y polisacárido de origen vegetal, bajo condiciones de almacenamiento ya sea en gel blando o SSF.

La viabilidad del microorganismo fue la siguiente: Las esferas contenían una cantidad inicial de $8.49 \log \text{ UFC/g}$ y al cabo de 15 semanas aún se mantuvieron vivos $6.41 \log \text{ UFC/g}$ en almacenamiento de refrigeración en solución salina.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Apligén. 1a. conferencia sobre biotecnología en alimentación Animal. "Los cuatro aliados naturales de la alimentación animal".
- 2.- Apella María C., González Silva N., Nader de Macías María E., Romero Nora y Oliver G. (1992) Invitro Studies in the inhibition of the growth of *Shigella Sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. Journal of Applied Bacteriology **73**, 480-483.
- 3.- Backstrom L., Morkoc A. (1983) *Streptococcus faecium* in prevention of neonatal colibacillosis in piglets Research report. Dept of veterinar y Clinicat Medicine; College of veterirary Medicine University of Illinois.
- 4.- Barrow P.A., et al. (1977) Changes in the Microflora and physiology of the anterior intestinal tract of pigs weaned at two days; with Special Reference to the pathogenesis of diarrhea. *Infec. and Inmun.* **18**, 585-595.
- 5.- Barrow P.A., Brooker B.E., et al. (1980) The Attachment of Bacteria to the Gastric Epithelium of the pig and its importance in the Microecology of the intestine. Journal of Applied Bacteriology; **48**, 147-154.
- 6.- Cahill S.M., McLoughlin A.J., et. al. (1994). Enhancement of bacteriocin production using. Supplement to Journal of applied Bacteriology **77** (1) xix.
- 7.- Chang P.L., Hortelano G. Et al. (1994). Growth of recombinant fibroblastsin Alginate Microcapsules. *Biotechnology and Bioengineering* , **43**, 925-933.
- 8.- Chateau N., Castellanos I, et al. (1993) Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. Journal of Applied Bacteriology **74**, 36-40.
- 9.- Cheltham S.J. and Bucke C. (1984) Immobilisation of Microbial cells and Their use in, Waste Water Treatment. *Microbiological methods for Envirommental Biotechnology* 219-226.
- 10.- Clements Mary L., Levine Myron M., et al. (1981) *Lactobacillus* Prophylaxis for Diarrhea Due to Enterotoxigenic Escherichia coli. *Ant. microbial Agents and chemotherapy* **20**(1), 104-108.

- 11.- Collington G. k., Parker D.S. and Arntroug (1990) The influence of inclusion of either an antibiotic or a probiotic in the diet an the development of digestive enzime activity in the pig. *Journal of nutrition* 64, 59-70.
- 12.- Conway P.L., Gorbach S.L., and Goldin B.R. (1987) Survival of Lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70, 1-12.
- 13.- Constantinides A., Mehta N. (1991). Peridic Operation of immobilized Live cell. Bioreactor for the production of Candicin. *Biotechnology and Bioengineering*; 37, 1010-1020.
- 14.- Demain Arnold L., Solomon Nadin A. (1986) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, American society for microbiology Washington D.C., 216-229.
- 15.- Ellen R.P. and Gibbons R.J. (1974), Parameters effecting the adherence and tissue tropisms of *Streptococcus pyogenes*. *Infeccion immunity*, 2, 85.
- 16.- Fox Steven M. traducido y adaptado por MVZ Ortíz M Victor . (1993) Historia de los probióticos. Los microorganismos amigos ganan mercado, *Nuestro Acontecer Porcino* 1 , 26-36.
- 17.- Fuller R. (1986) Probiotics. *Journal of Applied Bacteriology Symposium supplement* 15-75.
- 18.- Fuller R. (1989) Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66, 365-378.
- 19.- Gilliland S.E., Stahly T.E. and Bush L.J. (1984) Importance of bile tolerance *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunot. *Journal of Dairy Acience* 67, 3045-3051.
- 20.- Groboillot A.F., Champagne C.P. et al. (1993) Membrane Formation by Interfacial Cross-Linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnology and Bioengineering* 42, 1157-1163.
- 21.- Hillman K. and Fox Anna. (1994) Effects of porcine feccal *Lactobacilli* on the rate of growth of enterotoxigenic *Escherichia coli*: O149: K88: K91. *Letters in Applied Microbiology* 19, 497-500.

- 22.- Hoover Dallas G., Steenson Larry R. (1993) Bacteriocins of Lactic acid Bacteria Academic Press, 151-180.
- 23.- Iqbal M. and Zafar S.I. (1993) Biactivity of immobilized microalgas cells: Application potential of vegetable sponge in microbial biotechnology. Letters in Applied microbiology 17, 289-291.
- 24.- Martinsen A., Skjak G. et al. (1989) Alginate as immobilization material: 1 Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. Biotechnology and Bioengineering 33, 79-89.
- 25.- Martinsen Anita, Storro Ivar, Skjak-Braek Gudmund. (1992) Alginate as immobilization material: 3 diffusional properties. Biotechnology and Bioengineering 32, 186-194.
- 26.-Merk (1988) Culture Media Handbook 121.
- 27.- Mikolajch E.M., Harndoh Ly., (1975) *Lactobacillus acidophilus*, II antimicrobial agents Cultured Dairy products 10, 18.
- 28.- Min Lee Gyun, Varna Amit and Palsson Bernard O. (1991) Production of Monoclonal Antibody Using Free-suspended and Immobilized Hybridoma Cells: Effect of Serum. Biotechnology and Bioengineering 38, 821-830.
- 29.- Nader de Macias María E., Apella María C., Romero Norac (1992) Inhibition of *Shigella Sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lact. acidophilus*. Journal of Applied Bacteriology 73, 407-411.
- 30.- Pelezar H.J., Machael J. (1982) Microbiologfa. Cuarta Edición. 107.
- 31.- Peppler H. J., Perlman D. (1979) Microbial Technology. Segunda edición. Academic Press. 433-461.
- 32.- Perdigon G., De macias M. E. N., Alvarez S., Oliver G and Ruiz Holgado A. P. (1986) Effect of perorally administered *Lactobacilli* on macrophage activation mice. Infection and immunity 53, 404-410.

- 33.- Price R. J., Lee J. S. (1970) Inhibition of *Pseudomonas* Species by Hydrogen peroxide producing *Lactobacilli*. J. Milk Food tech. 13, 33.
- 34.- Renner H. W. and Münzner. (1991) The possible role of probiotics as dietary antimutagens. Mutation Research 262, 239-245.
- 35.- Shev T. Y. and Marshall R. T. (1993) Microentrapment of *Lactobacilli* in calcium Alginate gels. Journal of Food Science 53 (3), 557-651.
- 36.- Shirai Y., Hashimoto K. and Kurioka T., (1989) Continuous Production of Monoclonal Antibody by Alginate Immobilized Cells in a medium containing divalent cation. Trends in Animal cell culture Technology 257-258.
- 37.- Skjak-Braek, Gudmund, Murano Erminio, Paoletti Sergio. (1989) Alginate as immobilization Material. II. Determination of polyphenol contaminants by fluorescence Spectroscopy and Evaluation of Methods for Their Removal 13 , 90-94
- 38.- Stöcklein W., Eisgruber A., y Schmidt H.-I.. (1983) Conversion of L-phenylalanine to L- tyrosine by immobilized bacteria. Biotechnology Letters 5, 10. 703-708.
- 39.- Tournut J. (1994) Introduction to probiotics. National Veterinary College. Proceedings of the 13th IPUS Congres Fangkok Thiland 20-30 June, 291.
- 40.- Vaughan Elaine E., Caplice Elizabeth, Looney R., O'Ruke Nollag, Coveney Helen, et al. (1994) Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. Journal of Applied Bacteriology 76, 118-123.
- 41.- Venugopal V., Alud M. D. and Nerkal D. P. (1989) Solubilization of Fish Proteins Using Immobilized Microbial Cells. Biotechnology and Bioengineering 33, 1098-1103.
- 42.- Woodward J. (1985) Immobilized Cells and enzymes a practical approach, Ed. IRL press 39-49.