



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE ÉSTERES DE LACTULOSA OBTENIDOS
ENZIMÁTICAMENTE EN EL CRECIMIENTO DE CEPAS
PROBIÓTICAS COMERCIALES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

Lizbeth Guerrero Merino



MÉXICO, D.F.

2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: María del Carmen Wachter Rodarte

VOCAL: Profesora: Gloria Díaz Ruiz

SECRETARIO: Profesor: Francisco Ruiz Teran

1er. SUPLENTE: Profesora: Norma Angélica Camacho de la Rosa

2° SUPLENTE: Profesora: Aleida Mina Cetina

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 324, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA.

DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ

ASESOR DEL TEMA

DRA. MARÍA DE LOS DOLORES REYES DUARTE

SUPERVISOR DEL TEMA

LIZBETH GUERRERO MERINO

SUSTENTANTE

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran
belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un
técnico: es también un niño colocado ante fenómenos
naturales que le impresionan como un cuento de
hadas.”

Marie Curie

CONTENIDO

Introducción	1
Marco Teórico	
Probióticos.....	5
Definición.....	5
Características	6
Efectos benéficos asociados	7
Bacterias Ácido Lácticas	9
Características	9
Metabolismo	10
Género <i>Lactobacillus</i>	13
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	14
<i>Lactobacillus casei</i>	15
Prebióticos.....	16
Definición.....	16
Características	17
Aplicaciones potenciales en alimentos.....	18
Lactulosa	20
Actividad prebiótica	21
Efectos fisiológicos	22
Ésteres de azúcares y ácidos grasos.....	24
Síntesis enzimática.....	26
Síntesis química.....	27
Hipotesis	30
Objetivos	
Objetivo General	32
Objetivos Particulares	32

Desarrollo Experimental	33
Materiales.....	35
• Cepas probióticas.....	35
• Medio de cultivo.....	35
• Ésteres de lactulosa.....	35
Métodos.....	36
Incorporación de los ésteres de lactulosa en el medio de cultivo.....	36
Conservación de cepas probióticas en glicerol.....	36
Fermentación.....	36
• Reactivación de cepas conservadas en glicerol.....	36
• Condiciones de crecimiento.....	37
• Seguimiento de la fermentación.....	37
Medición del crecimiento bacteriano.....	37
Consumo de carbohidratos en el medio.....	38
• Azúcares reductores.....	38
• Azúcares totales.....	38
Determinación de los productos de fermentación.....	38
• pH.....	38
• Cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) ..	38
Actividad esterasa de las cepas probióticas.....	39
• Reactivación de cepas conservadas en glicerol.....	39
• Pruebas cualitativas enzimáticas.....	39
Resultados y Discusión	
Ésteres de lactulosa.....	42
Actividad esterasa de las cepas probióticas.....	43
Crecimiento de cepas probióticas de <i>Lactobacillus</i> en MRS modificando la fuente de carbono.....	45
Crecimiento de las cepas en MRS-acetato de lactulosa.....	48
Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> ssp <i>paracasei</i> LMGP-21380 en MRS-laurato de lactulosa.....	49
Consumo de los carbohidratos presentes en el medio de cultivo.....	50

Metabolismo de los ésteres de lactulosa por bacterias probióticas	53
Seguimiento del pH	53
Productos de la ruta metabólica	56
Discusión Global	58
Conclusiones	60
Perspectivas	62
Bibliografía	63
Anexos	
Anexo I. Ajuste molar de laurato de lactulosa	72
Anexo II. Curvas patrón para la cuantificación de azúcares en el medio de cultivo	72
Anexo III. Curva patrón para la cuantificación de productos finales de las fermentaciones.....	74

INTRODUCCIÓN

Desde que el hombre es hombre, ha co-existido con un increíble número de microorganismos que habita fuera y dentro de él siendo el tracto gastrointestinal el sitio con mayor carga y variedad microbiana, conformando así lo que se conoce como microbiota intestinal.

La microbiota intestinal es un ecosistema muy complejo con un importante papel en el mantenimiento de la salud gastrointestinal, la función inmunológica así como la fermentación y la utilización de los nutrientes que consume el ser humano. Su composición puede variar en función de muchos factores biológicos y exógenos, desde la forma en que la persona nace (cesaría o parto), el consumo de antibióticos y, por supuesto, la alimentación.

Esto ha impulsado el desarrollo y la comercialización de una nueva generación de alimentos que promueven la salud gastrointestinal con dos enfoques: los probióticos y los prebióticos.

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un efecto benéfico para la salud (FAO, 2002). Es decir, se administran bacterias exógenas promotoras de la salud.

Por otro lado, los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles por acción de las enzimas humanas, pero si por bacterias residentes del colon, estimulando así selectivamente su crecimiento y/o actividad. Se ha confirmado (Förster-Fromme et al., 2001) que la lactulosa es uno de solo tres carbohidratos con un carácter prebiótico, además de galactooligosacaridos e inulina/oligofruktosa.

Los ésteres de azúcar y ácidos grasos, por otro lado, son tensoactivos no iónicos. Estos ésteres se utilizan como edulcorantes bajos en calorías y biosurfactantes en los alimentos, así como en la industrias farmacéutica y cosmética (Chang y Shaw, 2009).

Dichos compuestos se sintetizan químicamente en su mayoría a partir de carbohidratos (generalmente con sacarosa) y ácidos grasos con una baja especificidad; la síntesis enzimática representa una alternativa en su producción

por ser generalmente más específica y controlando así el grado de la esterificación y por ende, sus características particulares.

Los ésteres de ácidos grasos muestran propiedades emulsificantes y si además se sintetizan con un azúcar prebiótico, podrían representar una doble funcionalidad de estas moléculas y una potencial aplicación en la industria de alimentos pues virtualmente cualquier alimento que contenga carbohidratos es susceptible a la suplementación con prebióticos, resolviendo así problemas en una matriz alimentaria que necesite de tensoactivos y además aporte azúcares que promueven la salud intestinal.

MARCO TEÓRICO

Probióticos

Los humanos han consumido cultivos de bacterias vivas por siglos en forma de leches fermentadas sin ningún conocimiento de los ingredientes activos o de su funcionamiento. Metchnikoff (científico ruso, premio Nobel y profesor del Instituto Pasteur en París) atribuyó la buena salud de los campesinos búlgaros a la ingestión de kéfir, un producto de leche fermentada, ya que una forma para modular la composición de la microbiota intestinal es mediante el uso de adiciones microbianas vivas, tales como los probióticos (Mackowiak, 2013).

Definición

El término probiótico deriva del griego y significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos benéficos para los seres humanos (FAO/OMS, 2002).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2002) y a la Organización Mundial de Gastroenterología, WGO por sus siglas en inglés (2008), los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud.

Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias y levaduras. Las especies comúnmente utilizadas pertenecen al género *Bifidobacterium*, al grupo de las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), siendo mayoritariamente empleados los géneros *Lactobacillus*. Mientras que el género *Saccharomyces* es el más estudiado dentro de las levaduras.

Se pueden encontrar en el mercado cepas probióticas viables, ya sea en algunos alimentos fermentados o de forma liofilizada como suplementos o como preparaciones farmacéuticas.

Características

Para que un microorganismo se considere como probiótico, deben cumplirse una serie de criterios:

1

Los probióticos deben ejercer sus efectos benéficos en el huésped mediante su crecimiento y/o actividad en el cuerpo humano (Collins et al., 1998; Morelli, 2000), por lo que es fundamental verificar, para cada cepa potencialmente probiótica, la capacidad de seguir siendo viable y eficaz en el lugar de acción.

El potencial probiótico de cada cepa es diferente incluso dentro de la misma especie, es por esto que la cepa debe estar plenamente identificada y las propiedades de éstas son específicas y no pueden ser extrapoladas (FAO, 2002; WGO, 2008).

2

Además, para que una cepa pueda ser llamada probiótica debe ser Generalmente Reconocida como Segura, GRAS por sus siglas en inglés, estatus que le otorga la FDA a los aditivos alimentarios seguros para el consumo humano, ya que la eficiencia y la seguridad de estas debe ser verificada y, por tanto, la evaluación es una parte importante de su caracterización (FAO, 2002; WGO, 2008).

3

También la FAO/OMS (2002) estipula que los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deben ser capaces no sólo de sobrevivir al paso por el aparato digestivo, sino también de proliferar en el intestino. Esto significa que deberían ser resistentes a los jugos gástricos y poder crecer en presencia de bilis, en las condiciones existentes de los intestinos, o ser consumidos en un alimento que, actuando como vehículo, les permita sobrevivir al paso por el estómago y a la exposición a la bilis.

4

Además de resistir dichas condiciones adversas, estos microorganismos deben tener la capacidad de adherirse a la pared epitelial, colonizar el tracto gastrointestinal y modificar la microbiota residente de la región. Se considera que la capacidad de algunas cepas para proliferar en el tracto intestinal se asocia a sus efectos benéficos, aunque dichos efectos también pueden ser fruto directo de su actividad metabólica (FAO, 2002).

5

Las cepas deben tener la capacidad de producir sustancias antimicrobianas contra patógenos del intestino para la restauración a una composición saludable de la microbiota (FAO, 2002).

A medida que nuestro conocimiento sobre la eficacia y la acción probiótica progresa, la lista de criterios se hace más larga para incluir factores como la eficacia frente a infecciones provocadas por *H. pylori*, propiedades antimutagénicas y anticancerígenas, actividad antioxidante, la estimulación del sistema inmune, por nombrar sólo algunos (Kolida et al., 2006).

Efectos benéficos asociados

Muchas funciones benéficas han sido sugeridas para las cepas probióticas (Holzapfel y Schillinger, 2002), entre ellas:

- ⊗ Beneficios nutricionales, tales como la producción de vitaminas, la disponibilidad de minerales y oligoelementos y la producción de enzimas digestivas importantes (por ejemplo, la β -galactosidasa)
- ⊗ Efecto barrera/restauración: Protegiendo así de diarrea infecciosa (diarrea del viajero, diarrea viral aguda en niños) y diarrea asociada a antibióticos.
- ⊗ Reducción del colesterol
- ⊗ Estimulación del sistema inmune

- ⊗ Mejora de la motilidad del intestino, alivio de la constipación
- ⊗ Adherencia y resistencia a la colonización
- ⊗ Mantenimiento de la integridad de la mucosa

El modo de acción de las cepas probióticas es, probablemente, multifactorial y depende de cada cepa específica, pero en general, las cepas probióticas mejoran la resistencia a la colonización y/o tienen efectos inhibitorios directos contra patógenos.

La inhibición de bacterias patógenas se promueve por varios mecanismos, entre los que destacan la producción de compuestos directamente inhibidores (bacteriocinas), reducción del pH luminal mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta, la competencia por nutrientes y sitios de adhesión en la pared intestinal y a través de la modulación de la respuesta inmune (Tuohy et al., 2003).

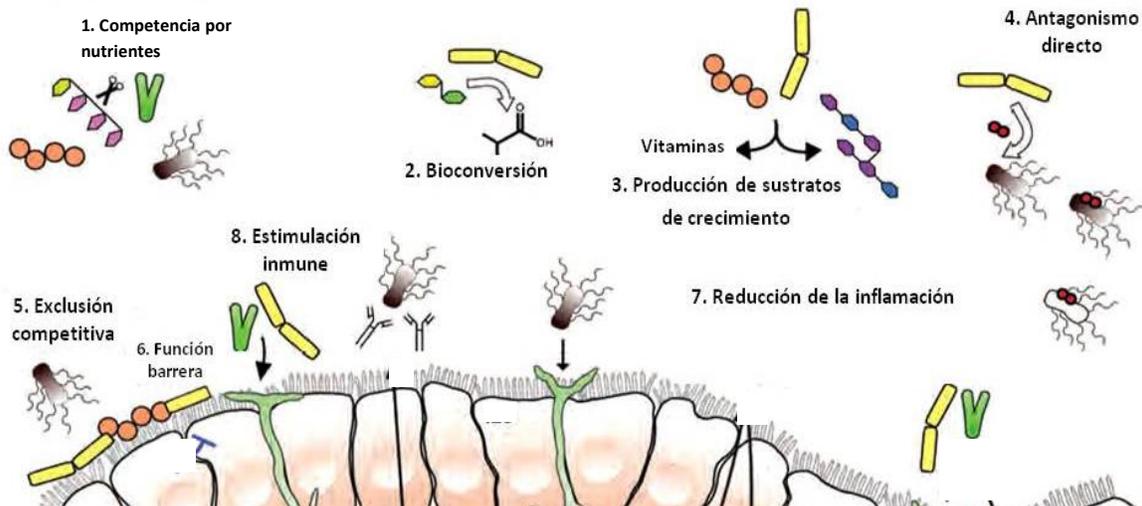


Figura 1. Diagrama que ilustra los mecanismos de acción conocidos de los probióticos; estos incluyen (1) competencia por ingredientes de la dieta como sustratos para su crecimiento, (2) bioconversión de azúcares, por ejemplo, en los productos de fermentación con propiedades inhibitorias, (3) producción de sustratos de crecimiento, como vitaminas, para otras bacterias, (4) antagonismo directo por bacteriocinas, (5) exclusión competitiva por sitios de unión, (6) mejora la función barrera, (7) reducción de la inflamación, alterando así las propiedades de colonización y persistencia, y (8) estimulación de la respuesta inmune innata. Modificada de Binns, 2013.

Bacterias Ácido Lácticas

Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) han sido importantes en los alimentos por siglos debido a su funcionalidad, actuando como agentes fermentadores de alimentos debido a varias de sus propiedades metabólicas que contribuyen en sabor, olor, textura y características sensoriales; además generan efectos benéficos a la salud y el aumento del valor nutricional en productos alimentarios (Parra, 2010).

Características

Las BAL representan un grupo de microorganismos relacionados con la producción de ácido láctico como principal metabolito o único producto de fermentación. Esta clasificación fue iniciada en 1919 por Orla-Jensen, teniendo como principales características las mostradas en la figura 2.

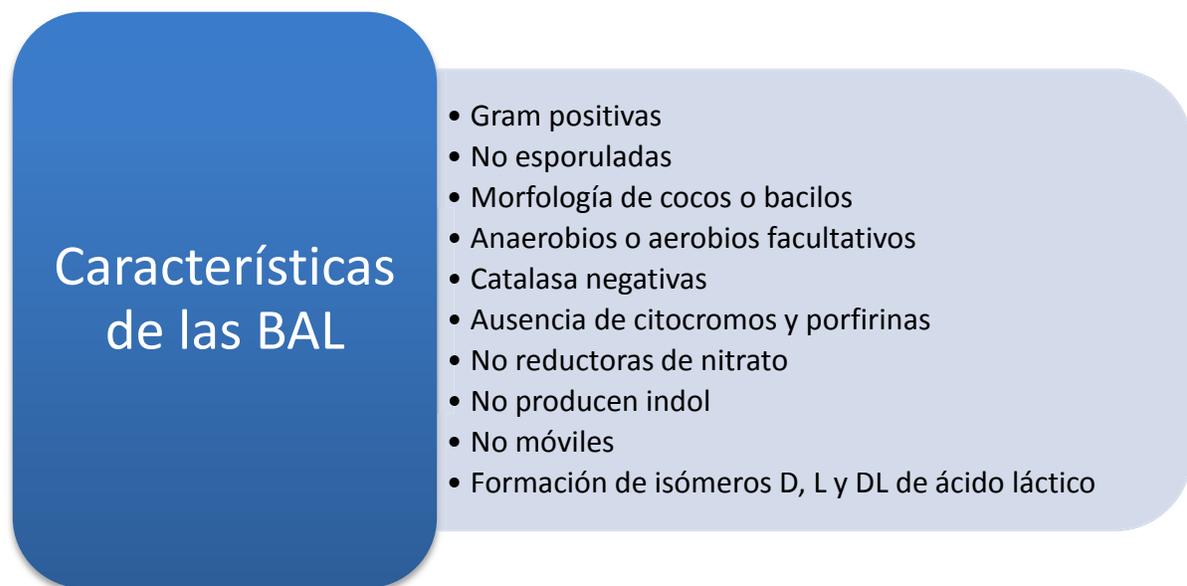


Figura 2. Características generales de las Bacterias Ácido Lácticas

Este grupo comprende bacterias de los géneros *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* y *Carnobacterium* (Sánchez, 2005).

Debido a la limitada capacidad biosintética de las BAL, son muy exigentes nutricionalmente y se cultivan usualmente en medios que contengan peptona, extracto de levadura u otros hidrolizados de materiales vegetales o animales. Estos deben ser suplementados con un azúcar fermentable para proporcionar una fuente de energía (Stanier et al., 1992). Entre los sustratos fermentables por las BAL se encuentran los azúcares (monosacáridos, disacáridos y polisacáridos), los polialcoholes, el citrato y algún aminoácido (arginina) (Sánchez, 2005).

Las BAL carecen de ciclo de Krebs, por lo que la generación de ATP ocurre mediante la fermentación de carbohidratos y compuestos relacionados, acoplada a fosforilación a nivel de sustrato; lo cual es un reflejo de su incapacidad para sintetizar citocromos y otras enzimas que contengan el grupo hemo. Aunque pueden realizar oxidaciones limitadas de unos cuantos compuestos orgánicos, mediadas por enzimas flavoproteicas, como oxidasas o peroxidasas, sin embargo, estas oxidaciones no se acompañan de formación de ATP (Stanier et al., 1992).

Otra característica fisiológica distintiva de las BAL es su elevada tolerancia a los ácidos. Esta característica tiene un gran valor selectivo, ya que les permite eliminar la competencia de la mayoría de las otras bacterias en ambientes que son ricos en nutrientes (Stanier et al., 1992).

Metabolismo

Según el tipo de fermentación de glucosa, las BAL se clasifican en homofermentativas y heterofermentativas, dependiendo del producto final de la fermentación.

Las BAL homofermentativas utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) al convertir una mol de glucosa en dos moles de ácido láctico. Las bacterias pertenecientes a este grupo poseen la enzima aldolasa que permite la obtención directa del ácido láctico (Figura 3). En contraste, las BAL heterofermentativas no poseen la enzima fructosa difosfato aldolasa por lo que no pueden seguir la vía EMP y usan la vía de las pentosas fosfato dando como resultados cantidades equimolares de ácido láctico, etanol y CO₂ a partir de una mol de glucosa (Figura 3).

Una de las principales diferencias entre las dos rutas está en sus rendimientos netos de ATP: dos moles por molécula de glucosa fermentada en la ruta homofermentativa y sólo una mol a través de la ruta heterofermentativa (Stanier et al., 1992).

El grupo de las BAL homofermentativas está compuesto de los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus* mientras que las BAL heterofermentativas están los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (Larpen, 1995).

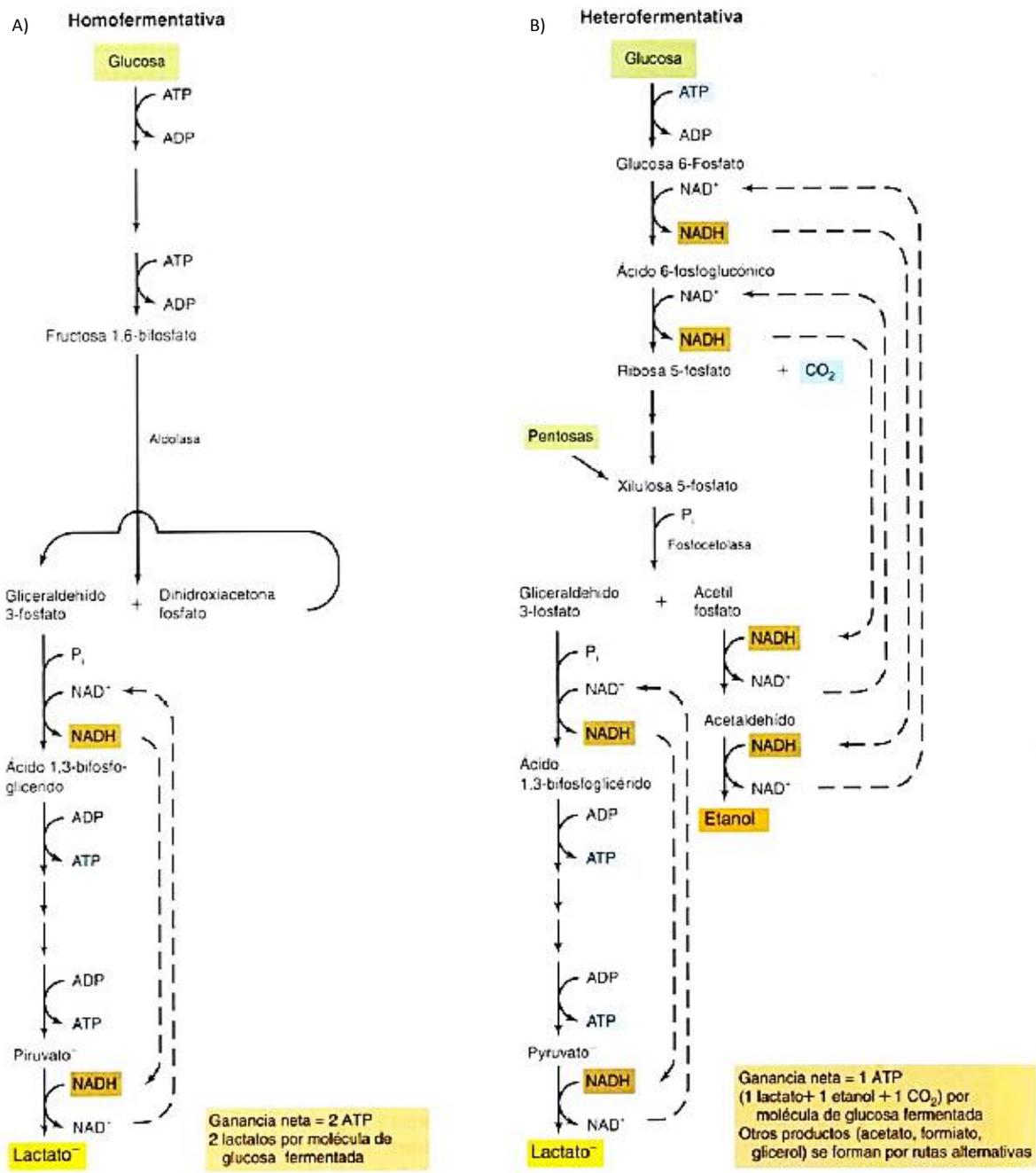


Figura 3. Fermentación A) homofermentativa y B) heterofermentativa de la glucosa por BAL (Cervantes, 2010)

Género *Lactobacillus*

El género de *Lactobacillus* ha sido encontrado en una gran variedad de hábitats, como en membranas mucosas de hombres y animales (cavidad oral, intestino y vagina), en plantas, en hábitats de estiércol tales como aguas residuales y por supuesto en la fermentación o la descomposición de alimentos (Hammes y Vogel, 1995).

Todas los *Lactobacillus* son BAL, Gram positivas, catalasa negativa y no formadora de esporas. Presentan células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos. Son estrictamente fermentativos, aerotolerantes o anaerobios, acidúricos o acidófilos y tienen requerimientos nutricionales complejos (por ejemplo, para carbohidratos, aminoácidos, péptidos, ésteres de ácidos grasos, sales, derivados de ácidos nucleicos y vitaminas). Ellos no sintetizan porfirinas y así, están desprovistas de las actividades hemo-dependientes (Hammes y Vogel, 1995).

La división clásica de los lactobacilos está basada en sus características fermentativas (Hammes y Vogel, 1995):

- ⊗ Grupo A: Especies homofermentativas estrictas. Fermentan prácticamente hexosas a ácido láctico por la vía EMP. Estos organismos poseen la enzima fructosa-1,6-difosfato-aldolasa pero carecen de la enzima fosfoacetolasa y por tanto no fermentan gluconato ni pentosas.
- ⊗ Grupo B: Especies heterofermentativas facultativas. Las hexosas son usualmente fermentadas a ácido láctico por la ruta EMP. Los organismos poseen tanto la enzima aldolasa como fosfoacetolasa, y por tanto, no solo fermentan hexosas sino también pentosas (y a menudo gluconato) en presencia de glucosa, las enzimas de la vía fosfogluconato son reprimidas.
- ⊗ Grupo C: Especies heterofermentativas estrictas. Las hexosas son fermentadas por la vía fosfogluconato, produciendo lactato, etanol y CO₂ en cantidades equimolares. Las pentosas entran a esta ruta metabólica y pueden ser fermentadas.

Este género juega dos roles principales en la elaboración de productos lácteos: como cultivos iniciadores en alimentos fermentados y como cultivos probióticos por expresar muchas propiedades cruciales, tales como la alta tolerancia a pH ácidos, jugos gástricos y bilis, capacidad para adherirse a las superficies intestinales, inhibición de especies potencialmente patógenas (actividad antimicrobiana), resistencia a antibióticos, producción de exopolisacáridos y reducción de colesterol (Fijan, 2014).

Lactobacillus tales como: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. rhamnosus*, *L. brevis*, *L. johnsonii*, *L. plantarum* y *L. fermentum* se utilizan comúnmente como cepas probióticas. Adjudicando a este género propiedades terapéuticas como ayuda a la digestión de lactosa en personas intolerantes, reducción del estreñimiento y la diarrea infantil, ayuda a resistir infecciones como de *Salmonella* y ayuda a aliviar el síndrome de intestino irritable (Manning y Gibson, 2004).

Lactobacillus acidophilus

La especie *L. acidophilus* (adjetivo, amante del ácido) pertenece al grupo A. Sus células son varillas con extremos redondeados, de entre 0.6-0.9 por 1.5-6µm, se encuentran aisladas, en pares y en cadenas cortas (Hammes y Vogel, 1995). Es una cepa termófila que muestra crecimiento a una temperatura de 30-45°C y tiene buen crecimiento a un pH entre 4 y 5. Genera tanto los isómeros D y L del ácido láctico. Es resistente a antibióticos como kanamicina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, penicilina y vanomicina (Anjum, et al., 2014). La cepa ha sido aislada del tracto intestinal humano y de animales, la boca humana y vagina.

Además produce bacteriocinas, que son agentes antimicrobianos de naturaleza proteica, letales para bacterias diferentes a la cepa productora. Las bacteriocinas que produce *L. acidophilus* son estables al calor y de bajo peso molecular (Anjum, et al., 2014).

L. acidophilus tiene potencial probiótico en el ecosistema humano debido a las bacteriocinas que produce ya que la ayudan a proliferar sobre otros microorganismos ya establecidos en el intestino (Anjum, et al., 2014).

Además, *L. acidophilus* es usada en alimentos como cepa probiótica. Se encuentra también en un gran número de productos fermentados como en el yogurt, miso, tempeh y la leche ácida dulce. En este último producto la bacteria es inoculada en la leche y se deja reposar por 24 horas obteniendo un suero de leche con bajo contenido de lactosa (Anjum, et al., 2014). Este tipo de leche es sobre todo consumida por personas intolerantes a la lactosa.

Lactobacillus casei

L. casei (del latín *caseus* queso) es una BAL que pertenece al grupo B de los lactobacilos. Las células son acidúricas, con forma de varillas de entre 0.7-1.1 por 2.0-4.0 μm , a menudo con extremos cuadrados y con tendencia a formar cadenas.

Las especies de *L. casei* son las más predominantes del género *Lactobacillus*, con respecto a su distribución en un gran número de hábitats y aplicaciones. Han sido aisladas de productos lácteos fermentados y vegetales, estiércol de vaca, tracto intestinal humano, boca y vagina (Hammes y Vogel, 1995).

L. casei se utiliza principalmente en la fabricación de quesos, convirtiéndose en la especie dominante conforme avanza la maduración de los mismos. Aunque también tienen utilidad potencial en otras aplicaciones industriales, como la producción de ácido láctico y bebidas fermentadas (Hosseini et al., 2015).

Ciertas cepas son reconocidas como probióticas, adjudicándole varios beneficios para la salud, tales como la regulación del sistema inmune, la inhibición de patógenos intestinales, la reducción de la diarrea, entre otros (Hosseini et al., 2015).

Prebióticos

La microbiota intestinal fermenta una gama de sustancias, proporcionadas principalmente por la dieta que no pueden ser digeridas por el huésped en el intestino delgado y están disponibles para la fermentación por la microbiota del colon. Estos incluyen almidón resistente, los polisacáridos no amiláceos (fibra dietética), oligosacáridos, proteínas, aminoácidos, entre otros (Manning y Gibson, 2004). Es por esto que la dieta es el factor principal para modificar y controlar la microbiota autóctona del intestino.

Los dos tipos principales de fermentación anaerobia que se llevan a cabo en el intestino son sacarolítica y proteolítica. Los principales productos finales del metabolismo de carbohidratos son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato. Estos pueden ser metabolizados sistémica o localmente para proporcionar la generación de energía para el anfitrión. Los productos finales de la fermentación proteolítica incluyen compuestos fenólicos, aminas y amoníaco, todos los cuales son tóxicos (Manning y Gibson, 2004).

Un enfoque alternativo para el mantenimiento de la microbiota intestinal a través de la dieta es el uso de prebióticos, dirigiéndose al crecimiento y actividad selectiva de bacterias residentes en el intestino y no por la incorporación exógena de microorganismos como en el caso de los probióticos.

Definición

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura reconoce la definición de Gibson y Roberfroid (1995) en la que se designan a los prebióticos como ingredientes alimentarios no digeribles que afectan benéficamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una de las especies de bacterias que están ya establecidas en el

colon, o de un número limitado de ellas, y por consiguiente mejoran la salud del huésped.

El efecto de un prebiótico es, esencialmente, indirecto para el huésped, porque un número limitado de microorganismos se alimentan de ellos, causando así una modificación selectiva de la microbiota en el intestino del huésped siendo estos cambios los responsables de sus efectos benéficos (Wang, 2009).

Características

Los prebióticos deben cumplir, en general, con las características como:

- ⊗ No ser hidrolizados ni absorbidos en el estómago o en el intestino delgado ya que su sitio de acción se encuentra en el colon
- ⊗ Ser sustratos fermentables selectivos por bacterias comensales benéficas en el colon como las bifidobacterias, estimulando así su crecimiento y/o metabolismo
- ⊗ Ser capaces de alterar la microbiota del colon favoreciendo así una composición más saludable de la misma
- ⊗ La fermentación de los sustratos deben inducir efectos benéficos para el hospedero

Un compuesto capaz de alcanzar las porciones distales del intestino es un buen candidato a ser considerado como prebiótico. De entre todos los ingredientes alimentarios, los carbohidratos no digeribles (oligo- y polisacáridos) son los candidatos más importantes para ser prebióticos. Debido a su estructura química, estos no se absorben en la parte alta del tracto gastrointestinal ni son hidrolizados por las enzimas digestivas humanas sirviendo así como sustrato para las bacterias colónicas endógenas (Cardelle, 2009).

Aplicaciones potenciales en alimentos

La principal ventaja de los prebióticos es que la mayoría de estos compuestos son parte de fuentes naturales como frutas y verduras. La dieta incluye fuentes prebióticas naturales en alimentos como la soya, jícama, raíz de achicoria, avena, trigo sin refinar, plátano crudo, cebolla, espárragos, salvado de trigo, ajo, etc. Predominantemente, los componentes prebióticos activos que se encuentran en las fuentes mencionadas anteriormente son los oligosacáridos, fructooligosacáridos o inulina (Ishwarya y Prabhasankar, 2014).



Figura 4. Aplicaciones potenciales de prebióticos en la industria alimentaria (Ishwarya y Prabhasankar, 2014)

La gama de los alimentos a los que se pueden añadir los prebióticos es mucho más amplio que el de los probióticos, ya que para estos últimos se debe garantizar su viabilidad, mientras que los prebióticos tienen una mayor estabilidad (Manning y

Gibson, 2004). Como tal, virtualmente cualquier alimento que contenga carbohidratos es susceptible a la suplementación. En la Figura 4 se muestran algunas de las aplicaciones potenciales que podrían encontrar los consumidores ya que esos ingredientes, a menudo, se aplican para obtener un doble beneficio: una mejor calidad sensorial y una composición nutricional más equilibrada (Wang, 2009).

Además, los prebióticos pueden ser considerados para varias aplicaciones en el desarrollo de nuevos productos, tales como (Manning y Gibson, 2004):

⌘ Simbióticos

Los simbióticos son una mezcla de prebióticos y probióticos que forman un solo producto, el cual ejerce un efecto benéfico sobre el hospedero mejorando su estado de salud a través de la implementación de microorganismos exógenos promotores de la salud así como la seguridad de su viabilidad por la presencia de sustratos como lo son los prebióticos pues estimulan su crecimiento y/o el metabolismo.

⌘ Fórmulas infantiles

El tracto gastrointestinal humano alberga una compleja colección de microorganismos que forman una microbiota única para cada persona. Esta puede verse influida por factores ambientales desde el nacimiento, ya que el tracto gastrointestinal de un feto se encuentra en condiciones estériles hasta el parto y la microbiota de un recién nacido se empieza a poblar con el consumo de leche materna o fórmula láctea (Isolauri et al., 2004).

La lactancia materna tiende a contribuir con niveles más altos de bifidobacterias a diferencia de las fórmulas infantiles. Sin embargo, la composición y la estructura de los oligosacáridos de la leche humana no ha sido posible reproducirla por la industria alimentaria, por lo tanto, los prebióticos están siendo considerados para la fortificación de los preparados para lactantes (Touhy et al., 2003).

⌘ Alimentos funcionales para adultos mayores

Durante la vida adulta, la microbiota intestinal es relativamente estable. En la vejez, sin embargo, los niveles de bifidobacterias tienden a disminuir y la diversidad de los géneros en la microbiota tiende a disminuir. Esto podría ser un motivo de preocupación, ya que la microbiota intestinal de los adultos mayores podría verse comprometida y resultar en una mayor susceptibilidad a la colonización de patógenos. La enfermedad más plenamente documentada en la alteración de la microbiota intestinal es la diarrea infecciosa aguda (Isolauri et al., 2004).

Lactulosa

La lactulosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-fructofuranosa) es un disacárido sintético, constituido por una molécula de fructosa y otra de galactosa unidas entre sí con enlaces β -1,4 glicosídico (Figura 5).

No se encuentra libre en la naturaleza y se obtiene, principalmente, por isomerización química de la lactosa en medio básico, aunque también se puede obtener por síntesis enzimática por cualquiera de las estructuras de reordenamiento de lactosa o por condensación de galactosa y fructosa (Schuster-Wolff, et. al, 2010; Panesar y Kumari, 2011).

Es 1.5 veces más dulce y más soluble que la lactosa y, a diferencia de ésta, no es hidrolizada por las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal humano aunque sí es metabolizada por bifidobacterias y bacterias lácticas en general (Cardelle, 2009).

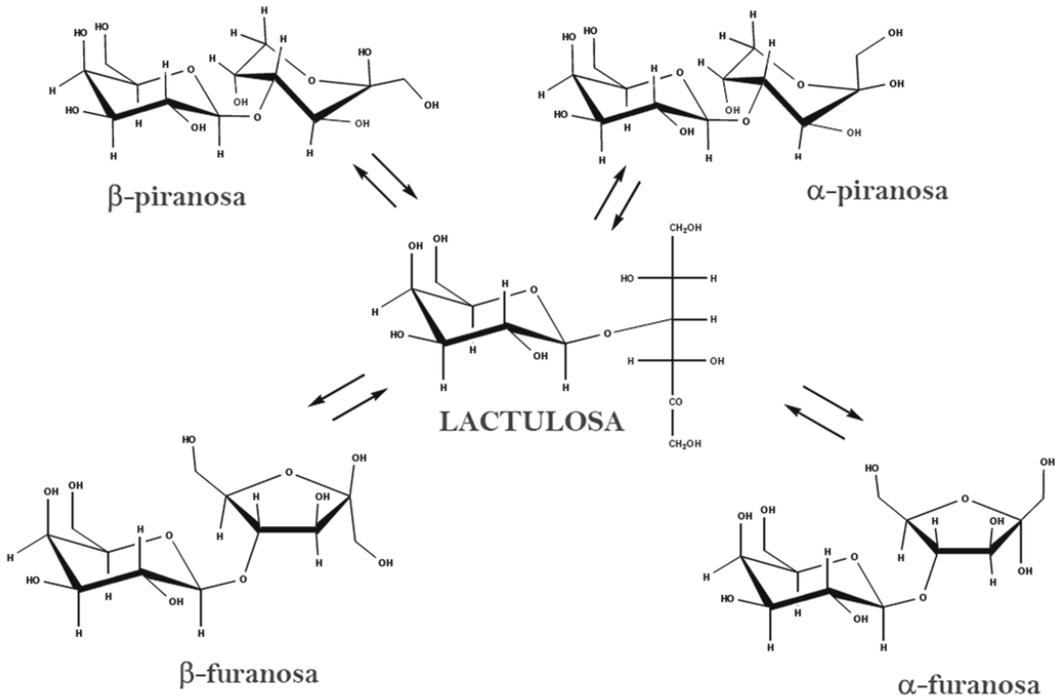


Figura 5. Estructura química de la lactulosa y sus posibles estructuras anoméricas (Cardelle, 2009).

Actividad prebiótica

El enlace β -glicosídico del disacárido no es hidrolizado por las enzimas digestivas de mamíferos y la lactulosa ingerida pasa el estómago y el intestino delgado sin ser degradado. Es esta característica por la que el disacárido es considerado como prebiótico, ya que bacterias promotoras de salud que viven en la parte baja del intestino son capaces de romper el enlace β -glicosídico, estimulando así su crecimiento y, al mismo tiempo, inhibe el crecimiento de bacterias patógenas, tal como se muestra en la Tabla 1.

La aplicación de la lactulosa como prebiótico se restringe a dosis bajas, pues una mayor ingesta probablemente provocaría movimientos intestinales frecuentes o diarrea. Estudios que se centran en la dosis-respuesta de lactulosa indica que las dosis de lactulosa que ejerce una acción prebiótica en adulto es de 4 hasta 10 g diarios (Mizota et al., 2002 y Venema et al., 2003).

Tabla 1. Utilización de lactulosa por la microbiota intestinal (Panesar y Kumari, 2011)

Microorganismo	Crecimiento
<i>Bacteroides fragilis</i> C-2	
<i>Bacteroides vulgatus</i> E1	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC 15705	
<i>Bifidobacterium bifidus</i> S 28	
<i>Bifidobacterium breve</i> S1	
<i>Bifidobacterium infantis</i> S12	
<i>Bifidobacterium longum</i> E 194	
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	Crecimiento positivo
<i>Clostridium ramosum</i> ATCC 13937	
<i>Escherichia coli</i> No. 28	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	
<i>Lactobacillus casei</i> 8138	
<i>Lactobacillus salivarius</i> ATCC 11741	
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 19434	
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> NCTC (9338)	
<i>Clostridium difficile</i> No. 55	Sin crecimiento
<i>Eubacterium lentum</i> ATCC 25559	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> PCI 602	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	
<i>Salmonella</i> Typhi	Crecimiento negativo
<i>Shigella flexneri</i>	
<i>Shigella sonnei</i>	

Efectos fisiológicos

El metabolismo bacteriano de la lactulosa conduce a la producción de ácido láctico, acético, gas, ácidos grasos de cadena corta y el pH cecal disminuye a pH cercanos a 5. Estos cambios del entorno colónico inducen diferentes efectos fisiológicos, como el tratamiento del estreñimiento, encefalopatía hepática, la prevención de tumores y para mantener la glucosa en sangre y niveles de insulina (Figura 6).

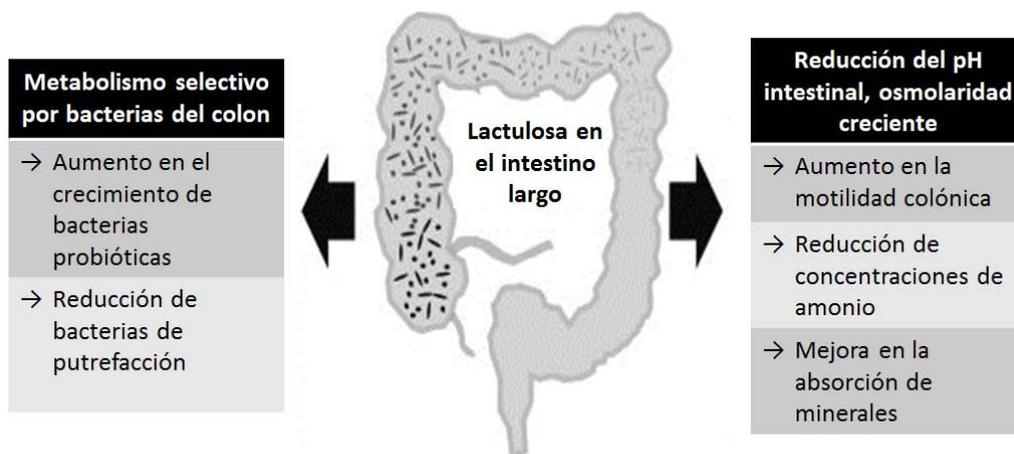


Figura 6. Acción fisiológica de la lactulosa sobre el metabolismo bacteriano en el intestino grueso (Adaptado de Schuster-Wolff et. al, 2010)

⌘ Tratamiento del estreñimiento

La lactulosa es ampliamente usada como un agente laxante en el tratamiento del estreñimiento. Esta aplicación médica se debe a la formación de ácidos de bajo peso molecular después de la degradación bacteriana de lactulosa, compuestos que aumentan la osmolaridad intestinal. El flujo de agua resultante en la luz del colon y la disminución del pH cecal mejoran la motilidad del colon, suavizan las heces y conduce a una disminución en el tiempo de tránsito colónico. El alcance de la acción purgante depende de varios hechos, entre ellos el estado de salud, edad, peso, sexo y dieta de la persona en cuestión.

⌘ Encefalopatía hepática

La encefalopatía hepática es un síndrome neuropsiquiátrico inducido por altas concentraciones de componentes tóxicos como el amoníaco en sangre. Dos efectos fisiológicos podrían ser responsable de la reducción de amoníaco en el suero de la sangre después de la ingestión de lactulosa: (1) la acidificación de contenido cecal aumenta la protonación de amoníaco a iones de amonio, que se mantienen dentro del colon y se excretan a través de la defecación, (2) el crecimiento selectivo de bacterias benéficas en el colon por el consumo de la lactulosa viéndose inhibida la actividad de bacterias proteolíticas, que contribuyen a la producción de amoníaco (Schuster-Wolff et. al, 2010).

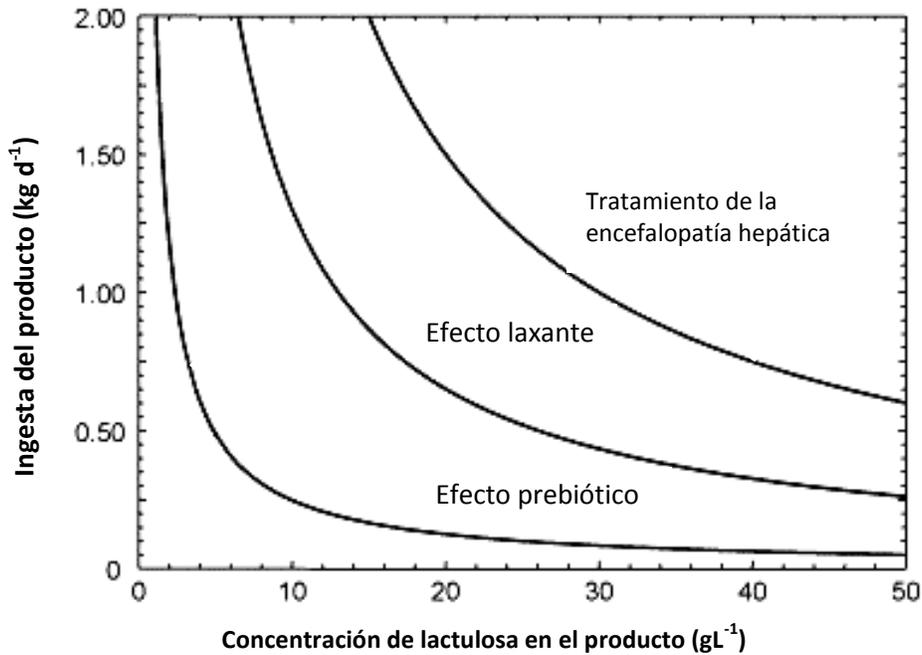


Figura 7. Acción fisiológica de un producto que contenga lactulosa dependiendo de la ingesta diaria y la concentración de lactulosa (Schuster-Wolff et. al, 2010).

⊕ Mejora la absorción de minerales

La mejora en la absorción de minerales ha sido descrito en general como una cualidad de los prebióticos y está, presumiblemente, mediada por un aumento de la permeabilidad de la mucosa intestinal y una mayor solubilidad de los minerales en el colon a pH bajo.

Ésteres de azúcares y ácidos grasos

Los ésteres de azúcares son tensoactivos no iónicos que consisten de un resto de carbohidrato (comúnmente sacarosa) como grupo hidrófilo y ácidos grasos como grupo lipófilo unidos por un enlace éster.

Los agentes tensoactivos son moléculas que poseen, simultáneamente, afinidad por el agua y por el aceite, debido a que la molécula contiene un grupo hidrófilo (parte polar) y uno hidrofóbico (parte no polar). Es por ello que también se denominan sustancias anfifílicas (Figura 8).

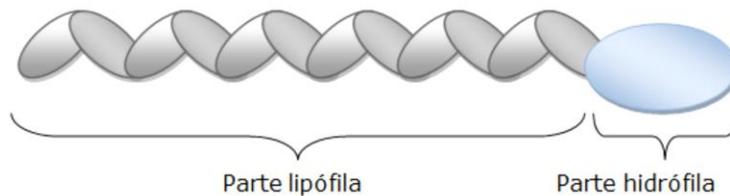


Figura 8. Representación de un tensoactivo (Linares, 2012)

Estos agentes son adsorbidos en la interfase agua-aceite a causa de sus grupos hidrófilos y lipófilos. Como consecuencia de esta orientación en la interfase, las moléculas del agente superficial forman una especie de “puente” entre las fases polar y no polar, reduciendo así la tensión en la interfase.

Los ésteres de sacarosa fueron rápidamente aprovechados en Japón por su uso como aditivos alimentarios en 1959 y subsecuentemente se ha aprovechado en todo el mundo como surfactantes no iónicos y emulsificantes en alimentos. Eso por la ventaja de su metabolismo total y su biodegradabilidad (Polat y Linhardt, 2001).

Los monoésteres de sacarosa son compatibles con la piel y su poca o inexistente irritación en ella ha permitida aplicar los compuestos en cosméticos, incluyendo productos para la piel, cosméticos de aceite en gel y formulaciones desodorantes (Polat y Linhardt, 2001).

Generalmente estos compuestos se sintetizan a partir de sacarosa y pueden ser sintetizados químicamente o por catálisis enzimática.

Síntesis enzimática

Los ésteres de azúcares y ácidos grasos se producen mediante una reacción de esterificación entre un azúcar ($C_n(H_2O)_n$) y un ácido graso (RCO_2H) como se muestra a continuación:



Mediante el control del grado de la esterificación y la naturaleza de ácido graso y de azúcar, es posible sintetizar ésteres de azúcar dentro de una amplia gama de equilibrio hidrófilo-hidrófobo (HLB) y, en consecuencia, de sus propiedades (Plou, et. al., 2002).

⊗ Lipasas

Las lipasas típicamente catalizan la hidrólisis de los lípidos en medio acuoso, pero esta reacción de equilibrio se desplaza hacia la síntesis, o la esterificación, en disolventes no acuosos en presencia de una cantidad moderada de agua (Gumel et al., 2011). Sin embargo, una cierta cantidad de agua es esencial para la hidratación de la enzima ya que esta afecta su conformación tridimensional, y por ende, su actividad catalítica y su estabilidad.

La mayoría de las lipasas utilizadas en la síntesis de ésteres de azúcares en medios no acuosos parecen ser de origen microbiano, como las provenientes de *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Candida cylindracea*, *Rhizomucor miehei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Chromobacterium viscosum* y *Streptomyces* sp., aunque las lipasas pancreáticas porcinas también se usan con frecuencia (Kennedy et al., 2006).

Aunque las lipasas ofrecen una exquisita regioselectividad en la síntesis de ésteres de azúcares, la baja productividad comparada con el proceso químico usado comúnmente, limita esta explotación en la industria (Reyes-Duarte et. al, 2005).

⊗ Disolventes

Los solventes hidrofóbicos son buenos medios para la reacción enzimática de transesterificación catalizada por hidrolasas. Pero el problema con esto es la baja solubilidad del azúcar en solventes orgánicos.

En los primeros trabajos sobre la síntesis enzimática de ésteres de azúcar se usaron solventes orgánicos inmiscibles en agua relativamente polares. Disolventes peligrosos tales como dimetilformamida (DMF) y dimetilpirrolidona (DMP) eran de uso común. Los riesgos ambientales y de salud de estos disolventes han impulsado la búsqueda de otros disolventes adecuados (Gumel et al., 2011).

⊗ Temperatura

La temperatura de reacción afecta la estabilidad de la enzima, la solubilidad de las sustancias reaccionantes y la del producto, la velocidad de la reacción y la dirección del equilibrio (Gumel et al., 2011).

⊗ Actividad acuosa

La formación en sí del éster no requiere agua, pero, una cantidad mínima de esta es necesaria para la hidratación de la enzima, su estabilidad y su actividad catalítica.

El agua también es un producto de la reacción de esterificación, por lo que una acumulación obliga al equilibrio a la reacción de hidrólisis en lugar de hacia la síntesis del éster, así que es fundamental que la cantidad de agua permanezca en niveles bajos para que ocurra la síntesis.

Síntesis química

Los ésteres de azúcar con ácidos grasos pueden producirse por rutas químicas no enzimáticas. La síntesis industrial de ésteres de glucosa, fructosa y sacarosa se realiza por transesterificación de los ésteres metílicos de ácidos grasos

correspondientes en presencia de un catalizador básico o metálico. Esta reacción normalmente requiere una temperatura $>100^{\circ}\text{C}$ y una presión reducida (Gumel et al., 2011).

El uso de altas temperaturas en la síntesis química implica un alto costo de energía para el proceso. Además de que se requieren separaciones difíciles y pasos múltiples para obtener productos generalmente contaminados con subproductos indeseables y comúnmente contienen mezclas heterogéneas de productos de diferentes grados de esterificación y diferentes posiciones de acilación (Gumel et al., 2011).

Tal como se compara en la Figura 9, las rutas químicas requieren más energía que la ruta enzimática y tienen una baja selectividad. Además, la combinación de alta temperatura y el catalizador alcalino usado provoca la decoloración del producto y la formación de subproductos tóxicos. Como consecuencia, la síntesis catalizada por lipasas es la mejor opción para la producción de ésteres de ácidos grasos de azúcar (Gumel et al., 2011).

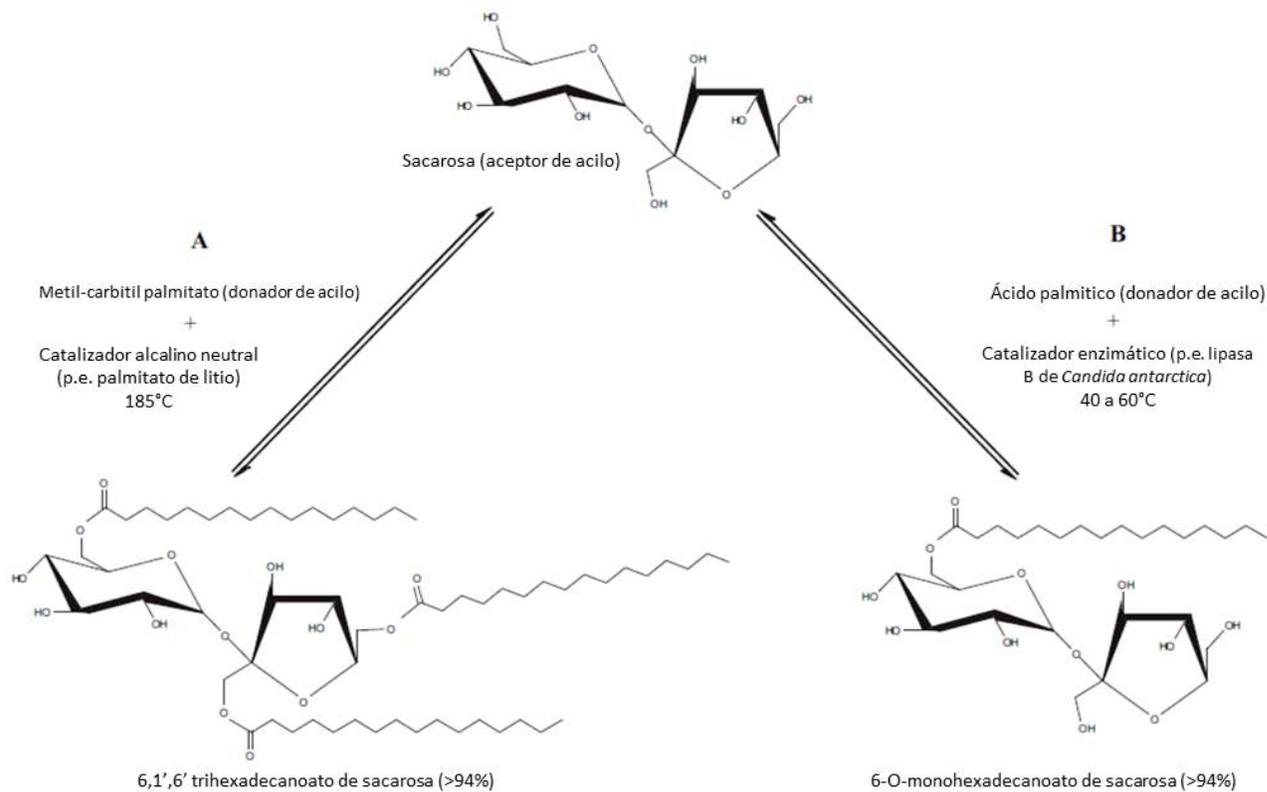


Figura 9. Comparación de la síntesis (A) química y (B) enzimática de ésteres de azúcar (Gumel et al., 2011).

HIPÓTESIS

Si las cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 y *Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* LMGP-21380 metabolizan los ésteres de lactulosa como fuente de carbono, entonces se pueden considerar a dichos compuestos como prebióticos potenciales.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el potencial prebiótico del acetato y laurato de lactulosa a través de su metabolización por cepas probióticas comerciales de *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 y *Lactobacillus casei* subespecie paracasei LMGP-21380.

Objetivos Particulares

- 👤 Evaluar el crecimiento de las dos cepas probióticas comerciales de *Lactobacillus* en medios MRS donde la fuente de carbono sean los ésteres de lactulosa.
- 👤 Cuantificar la capacidad de fermentar los ésteres de lactulosa mediante la disminución de la concentración de dichos compuestos y evaluando la producción de los compuestos finales de las fermentaciones.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la figura 10 se presenta la estrategia experimental llevada a cabo durante el estudio.

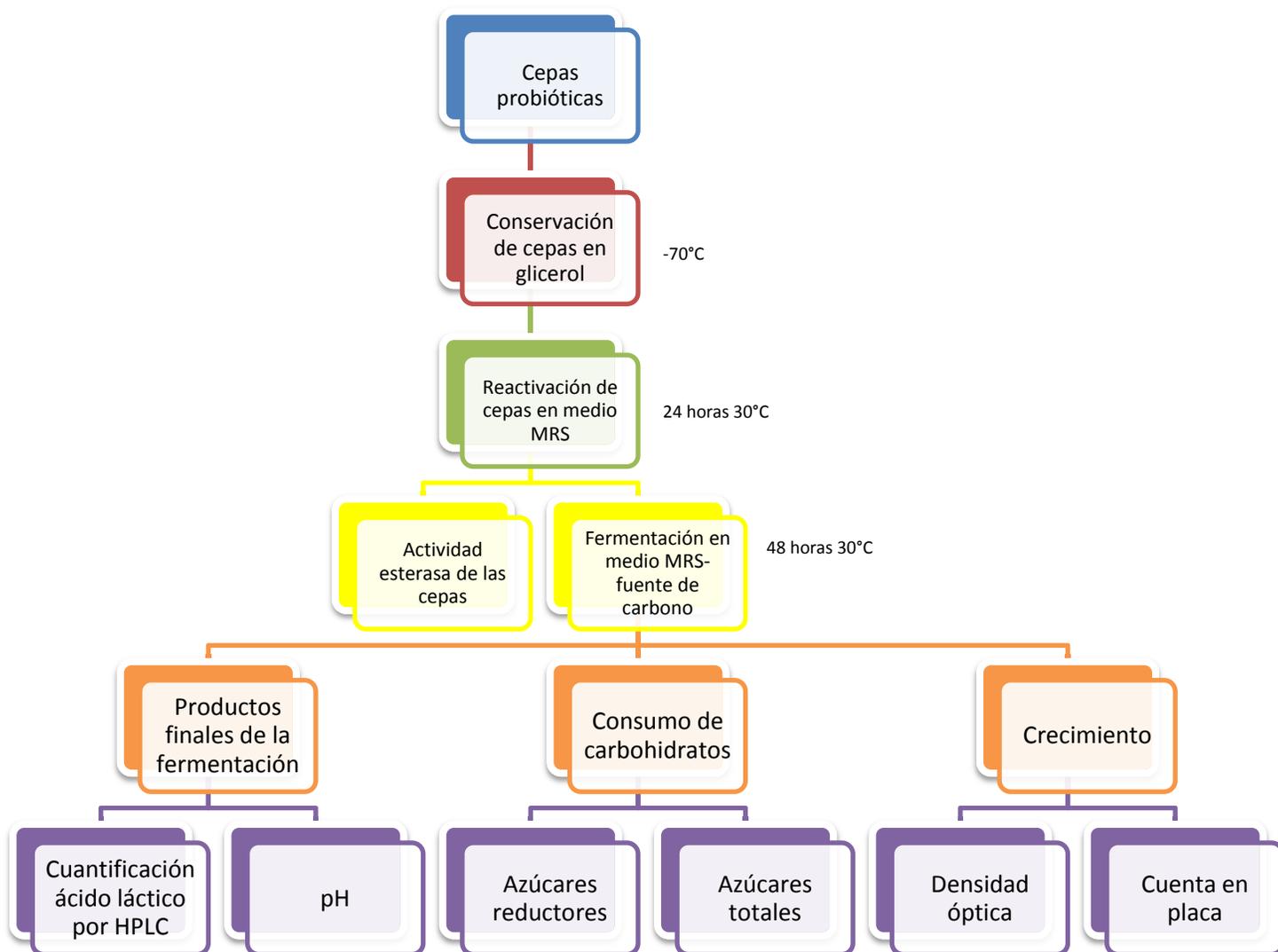


Figura 10. Diagrama general de la metodología de trabajo para el estudio del efecto de los ésteres de lactulosa en el crecimiento de cepas probióticas.

Materiales

Cepas probióticas

Para este trabajo se emplearon dos cepas comerciales: *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 y *Lactobacillus casei* subespecie paracasei LMGP-21380 adquiridas de ALCE S.R.L. (Novara, Italia) empaquetadas en bolsas flexibles de aluminio con 50 gramos de cepas liofilizadas.

Medio de cultivo

Se usaron agar y caldo MRS (Difco TM), cuyo contenido basal es de: 10 gL⁻¹ triptona, 10 gL⁻¹ extracto de carne, 5 gL⁻¹ extracto de levadura, 2gL⁻¹ citrato de amonio, 5 gL⁻¹ acetato de sodio, 0.1gL⁻¹ sulfato de magnesio, 0.05 gL⁻¹ sulfato de manganeso y 2 gL⁻¹ fosfato dipotásico.

Se sustituyó la glucosa modificando los carbohidratos en el caldo MRS, adicionando así la lactulosa (Regulact® de Valeant Farmacéutica, S.A. de C.V.) y los ésteres de lactulosa en una concentración de 20gL⁻¹.

Ésteres de lactulosa

Los ésteres de lactulosa que se trabajaron fueron:

- ∅ Acetato de lactulosa y
- ∅ Laurato de lactulosa

Estos fueron amablemente proporcionados por la Dra. Dolores Reyes Duarte y sintetizados enzimáticamente por I.A. Luis Felipe Chávez Flores a partir de lactulosa (Regulact®), acetato y laurato de vinilo, usando la lipasa comercial de *Candida antarctica* B (Novozym 435) en 2-metil-2-butanol (2M2B) con dimetilformamida (DMF) como disolventes a 60°C (Chávez, 2013).

Métodos

Incorporación de los ésteres de lactulosa en el medio de cultivo

Tras una prueba de solubilidad para los dos compuestos, se observó que el laurato de lactulosa no era soluble en el medio MRS mientras que el acetato de lactulosa si lo fue. Por lo que el primer compuesto se disolvió en aproximadamente 20mL de caldo MRS estéril basal con ayuda de un sonicador Branson modelo 2210 por 165 minutos.

Una vez disueltos los compuestos en un volumen pequeño (aproximadamente 20 o 30mL), se esterilizaron por filtración a través de una membrana de 0.45 micrómetros y se incorporaron al matraz de fermentación. Posterior a esto, el caldo se sometió a prueba de esterilidad incubándolo a 30°C por un día.

Con lo anterior, el acetato de lactulosa quedó en una concentración del 2% en el medio de cultivo, mientras que para el laurato de lactulosa se consideró un ajuste molar con respecto a la lactulosa, quedando así el compuesto en una concentración de 3.07% en el caldo MRS (Anexo I).

Conservación de cepas probióticas en glicerol

Se colocó una punta de espátula de *L. casei* ssp. *paracasei* LMGP-21380 y *L. acidophilus* LMGP-21381 liofilizadas en 100mL de caldo MRS y fueron incubadas a 30°C por 24 horas, para posteriormente vaciar 1mL de cada cepa reactivada en tubos criogénicos con 0.5mL de glicerol estéril. Dichos tubos se homogenizaron y se conservaron a -65°C hasta su uso.

Fermentación

Reactivación de cepas conservadas en glicerol

Para la reactivación de las cepas *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 y *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei* LMGP-21380, se colocaron 50µL de cada cepa

conservada en glicerol en viales con 4.5mL de caldo MRS estériles. Dichos viales fueron incubados a 30°C por 24 horas para posteriormente seguir su crecimiento.

Condiciones de crecimiento

Se inocularon 500µL de las cepas *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 y *Lactobacillus casei* subespecie paracasei LMGP-21380 previamente reactivadas en matraces de 500mL con 250mL de caldo MRS-glucosa, -lactulosa y -ésteres de lactulosa sin agitación a 30°C.

Seguimiento de la fermentación

Se tomaron muestras del medio de cultivo cada tres horas durante las primeras 12 horas, además de las 24 y 48 horas.

En cada tiempo se monitoreo el crecimiento de las cepas y se determinó el pH del medio de cultivo. Además, se congelaron dos microtubos con 1.5mL de cada uno de los medios de cultivo para determinar, posteriormente, el consumo de carbohidratos en el medio así como los productos finales de las fermentaciones.

Medición del crecimiento bacteriano

Se usó como control negativo la inoculación de las cepas en el medio MRS basal libre de fuente de carbono.

Las fermentaciones en las que la fuente de carbono fue la glucosa, lactulosa, acetato de lactulosa y el control negativo se evaluó el crecimiento mediante la Densidad óptica (DO) a 600nm en un espectrofotómetro “Spectronic 21D” ajustado a cero con caldo estéril MRS o MRS modificado.

Además, se siguió el crecimiento de la cepa *L. casei* ssp. paracasei LMGP-21380 en caldo MRS-laurato de lactulosa y en un control negativo mediante la cuenta en placa de células viables en cajas Petri por duplicado, considerando colonias pequeñas circulares con bordes enteros, una elevación convexa, textura butirosa y color blanquecino en un rango de 25 a 250 colonias.

Consumo de carbohidratos en el medio

Azúcares reductores

Previo a la determinación, 1.5 mL de la muestra recolectada en cada tiempo de las fermentaciones en MRS-glucosa y -lactulosa se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos, separando así las células y usando el sobrenadante para realizar la determinación de azúcares reductores por el método de DNS (Nielsen, 2003), usando curvas de calibración para la cuantificación (Anexo II).

Azúcares totales

Se realizó para las fermentaciones en las que la fuente de carbono fueron los ésteres de lactulosa y para el control negativo. Para realizar dicha cuantificación, de igual forma se descongelaron los microtubos con 1.5 mL de los cultivos, se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos, se descartaron las células y en los sobrenadantes se siguió el método Fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956), usando curvas de calibración para cuantificarlos (Anexo II).

Determinación de los productos de fermentación

pH

Se midió el pH de todas las fermentaciones con ayuda de un potenciómetro “Jenway” calibrado con buffer de referencia a pH 4 ± 0.01 y pH 7 ± 0.01 .

Cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Las muestras recolectadas en los diferentes tiempos de crecimiento de las cepas se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron 1.5mL del cultivo en microtubos a 10,000 rpm por 10 min para separar las células y remover todas las partículas insolubles.

Se cuantificó la producción de ácido láctico por medio de un cromatografía de líquidos en un cromatógrafo Waters 515 (Waters, Milford, MA, USA) con ayuda del programa Empower usando una columna de intercambio iónico BioRad Aminex (HPX-87H, 300x7.8mm), usando una fase móvil de H₂SO₄ 0.05N, a condiciones isocráticas con un flujo de 0.6mL/min a 30°C, utilizando un detector UV Waters 2487 a 215nm.

La determinación se realizó mediante un estándar externo de ácido láctico (Anexo III).

Actividad esterasa de las cepas probióticas

Se realizaron pruebas cualitativas para observar la actividad esterasa de las cepas *L. acidophilus* LMGP-21381 y *L. casei* ssp. paracasei LMGP-21380, una prueba en medio sólido y otra en medio líquido. Se usaron bacterias lácticas como controles, la cepa 6a (control positivo) y la cepa 7g (control negativo) (Fraustro, 2015).

Reactivación de cepas conservadas en glicerol

Las cepas *L. acidophilus* LMGP-21381, *L. casei* ssp. paracasei LMGP-21380 y la 7g (control negativo) se reactivaron tras su conservación en glicerol como se mencionó en el apartado anterior. Para la cepa 6a (control positivo) de igual forma se reactivó pero su incubación fue por 48 horas.

Pruebas enzimáticas cualitativas

En sólido

Las cepas ya reactivadas, se inocularon por estriado cada una en un cuadrante en cajas con agar MRS por duplicado, para posteriormente incubarlas a 30°C por 48 horas o hasta observar su crecimiento.

Para cada caja petri se preparó una solución que contenía 5 mL de buffer TAE (tris-acetato-EDTA) 1X con agarosa (4%), 0.4 mL de acetato de naftilo (20mg/mL de acetona) y 0.4mL de colorante Fast-Blue RR en DMSO (Dimetilsulfóxido)

(80mg/mL). Inmediatamente se vertió sobre la caja Petri y se espera la aparición de un precipitado café sobre las colonias (Oliver et al, 1991).

En líquido

Se inocularon 500µL de las cepas *L. acidophilus* LMGP-21381, *L. casei* ssp. *paracasei* LMGP-21380, las cepas 6a y la 7g previamente reactivadas en matraces de 100mL con 50mL de caldo MRS con agitación a 30°C por 24 horas.

Se colocaron 1.5mL de cada medio de cultivo en microtubos, se centrifugaron para separar las células y el sobrenadante y después se sonicaron por 3 minutos: seis ciclos de 30 segundos discontinuados por 15 segundos sin sonicar, para después centrifugarlas nuevamente a 10000rpm por 10 minutos. Estos cultivos se usaron como extracto enzimático y fueron preparados previos a la prueba.

El ensayo fue hecho en placas multipocillos, por duplicado, usando *para*-nitrofenil acetato y *p*-nitrofenil decanoato como sustratos de reacción a una concentración de 10mM en isopropanol. En cada pocillo se colocaron 180µL de amortiguador HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico) 100mM pH8, 10µL de sustrato y 10µL del extracto enzimático. Una actividad esterasa positiva se caracteriza por la aparición de una coloración amarilla en los pocillos después de 10 minutos a temperatura ambiente (Peña, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ésteres de lactulosa

En un trabajo previo dirigido por la Dra. Reyes Duarte (Chávez, 2013), se estudió la síntesis de ésteres con lactulosa en el grupo hidrófilo de la molécula anfifílica, brindando así una doble funcionalidad a cualquier matriz alimentaria a la que se le pudiera añadir, ya que el compuesto podría brindar tanto los beneficios de un azúcar prebiótico como de un emulsificante.

Sin embargo, estos beneficios no han sido estudiado previamente, por lo que el presente trabajo se centra en el estudio de dos ésteres sintetizados con lactulosa: **acetato de lactulosa** (Acetato-Lu) y **laurato de lactulosa** (Laurato-Lu).

Tal como se menciona en la Tabla 2, las características físicas y funcionales son diferentes entre los compuestos por la variación del tamaño de la cadena hidrocarbonada del grupo hidrofóbico de la molécula. Mientras que el acetato de lactulosa sugiere una mayor afinidad en un sistema coloidal de aceite en agua (o/w), el laurato de lactulosa podría expresar una mejor funcionalidad en sistemas coloidales de agua en aceite (w/o), puesto que el primero muestra una mejor solubilidad en agua que el segundo ya que este se disuelve completamente en el medio sin presentar precipitado o partículas suspendidas.

Tabla 2. Características físicas encontradas en el acetato de lactulosa y laurato de lactulosa sintetizados enzimáticamente.

Aspecto	Acetato de lactulosa	Laurato de lactulosa
Estado físico	Sólido-Gel	Sólido
Color	Amarillo translúcido	Amarillo opaco
Olor	No detectado	Muy intenso
Solubilidad en caldo MRS	Sí	Después de 165 minutos de sonicación

Actividad esterasa de las cepas probióticas

Para estudiar el efecto de los ésteres de lactulosa en el crecimiento y metabolismo de las cepas probióticas, estas bacterias debería hidrolizar inicialmente el enlace éster de los compuestos para así liberar el azúcar fermentable, tal como se muestra en la figura 11.

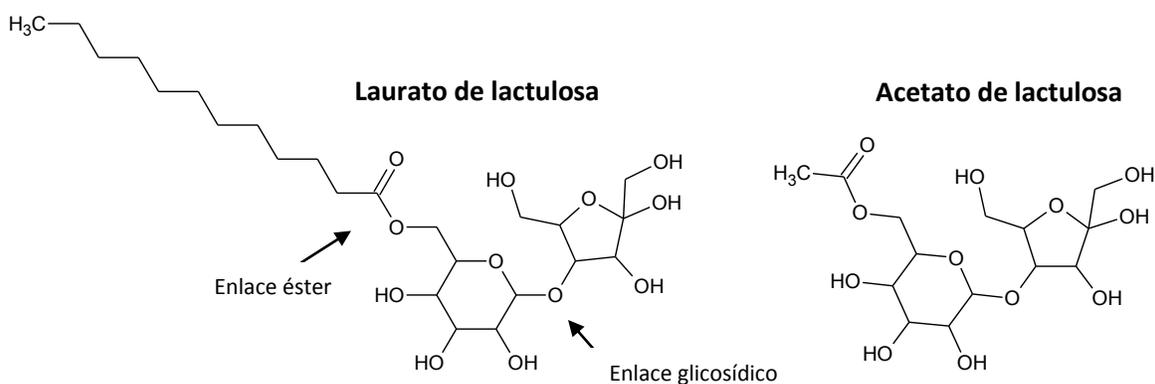


Figura 11. Estructuras químicas de los monoésteres en posiciones 6'-O- tanto del acetato de lactulosa y del laurato de lactulosa, en este último se señalan tanto el enlace éster como el enlace glicosídico.

Por esta razón, se probaron dos técnicas cualitativas para detectar la actividad de la enzima esterasa en las cepas probióticas *L. casei* ssp. *paracasei* LMGP-21380 y *L. acidophilus* LMGP-21381.

Como primera prueba, el ensayo enzimático se realizó en agar MRS para las cepas probióticas comerciales, donde un resultado positivo se observa con un precipitado café debido a la reacción entre el colorante y el grupo naftol cuando se hidroliza el enlace ester del acetato de naftilo. En la Figura 12 se muestra que tanto la cepa *L. casei* ssp. *paracasei* LMGP-21380 así como *L. acidophilus* LMGP-21381 dan positiva a la prueba, al igual que el control positivo (cepa 6a) debido a la acción de las esterases presentes en cada cepa. Mientras que en el control negativo (cepa 7g) las colonias no se ven modificados por el ensayo.

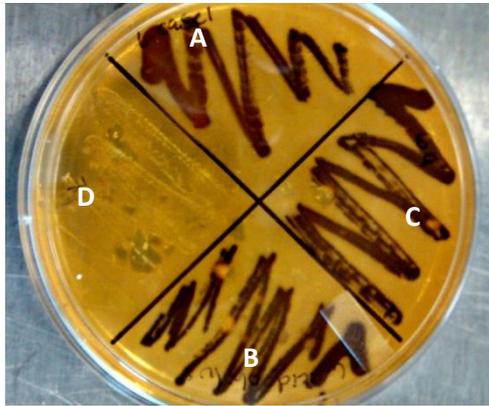


Figura 12. Actividad esterasa en agar MRS de las cepas A) *L. casei* ssp. paracasei LMGP-21380 y B) *L. acidophilus* LMGP-21381 usando como control positivo la cepa 6a (C) y como control negativo a la cepa 7g (D).

La actividad esterasa de las cepas frente a diferentes sustratos se ensayó a través una reacción amortiguador-sustrato-enzima en medio líquido. En la Figura 13 se muestra el ensayo enzimático de las cepas *L. casei* ssp. paracasei LMGP-21380 en la fila 3 y *L. acidophilus* LMGP-21381 en la fila 4, observando así una actividad positiva para los diferentes sustratos (Fila A y B).

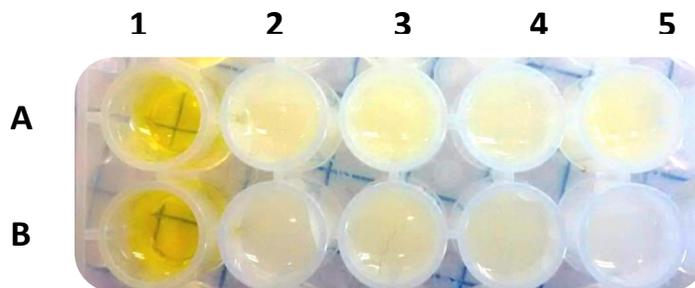


Figura 13. Ensayo enzimático de la actividad esterasa usando como sustratos, Fila: A) *p*-Nitrofenil-acetato y B) *p*-Nitrofenil-decanoato, probadas en, Columna: 1) Lipasa (Amano PS), 2) cepa 6a, 3) *Lactobacillus casei* ssp. paracasei LMGP-21380, 4) *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381, y 5) cepa 7g

Sin embargo, el tono amarillo se aprecia mejor cuando se utiliza el éster de acetato, y en menor grado cuando se utiliza como sustrato el éster de decanoato. Lo anterior indica que es más viable que estas cepas en específico hidrolicen los ésteres de cadena corta que los de cadena larga, ya que las enzimas estererasas presentes en las bacterias tienen preferencia por sustratos de cadena corta como el acetato. A diferencia de una actividad lipolítica que, de igual forma, cataliza la hidrólisis del enlace éster carboxílico, aunque estas prefieren sustratos de cadena larga como triglicéridos compuestos de ácidos grasos de cadena más larga (Holland et al., 2005), como lo es el decanoato, por lo que se podría pensar que estas bacterias no pueden hidrolizar este tipo de sustratos.

La actividad esterasa en BAL modifican las características sensoriales de productos como el vino (Matthews et al., 2004, Matthews et al., 2007, Pérez-Martín et al., 2013) y en quesos (Holland et al., 2005). Sin embargo, la información sobre la presencia de actividad lipolítica en BAL es escasa y necesita más investigación (Holland et al., 2005).

Crecimiento de cepas probióticas de *Lactobacillus* en MRS modificando la fuente de carbono

Una vez evidenciada la enzima esterasa en las cepas probióticas de *Lactobacillus*, se procedió a estudiar su capacidad de metabolizar los ésteres de lactulosa por las bacterias, siguiendo su crecimiento por 48 horas en un medio de cultivo óptimo, modificándole las fuentes de carbono, usando así glucosa, lactulosa, acetato y laurato de lactulosa, además de un medio basal sin carbohidrato añadido.

La fermentación en medio MRS-glucosa se incluyó en este estudio con fines comparativos por ser considerado un medio que favorece el crecimiento de este género (De Man et al., 1960). Como segundo control, se usó la lactulosa ya que es el disacárido de interés en esta investigación por sus propiedades prebióticas

(Panesar y Kumari, 2011) así como un control negativo para distinguir el crecimiento de las cepas en caldo MRS sin carbohidratos añadidos.

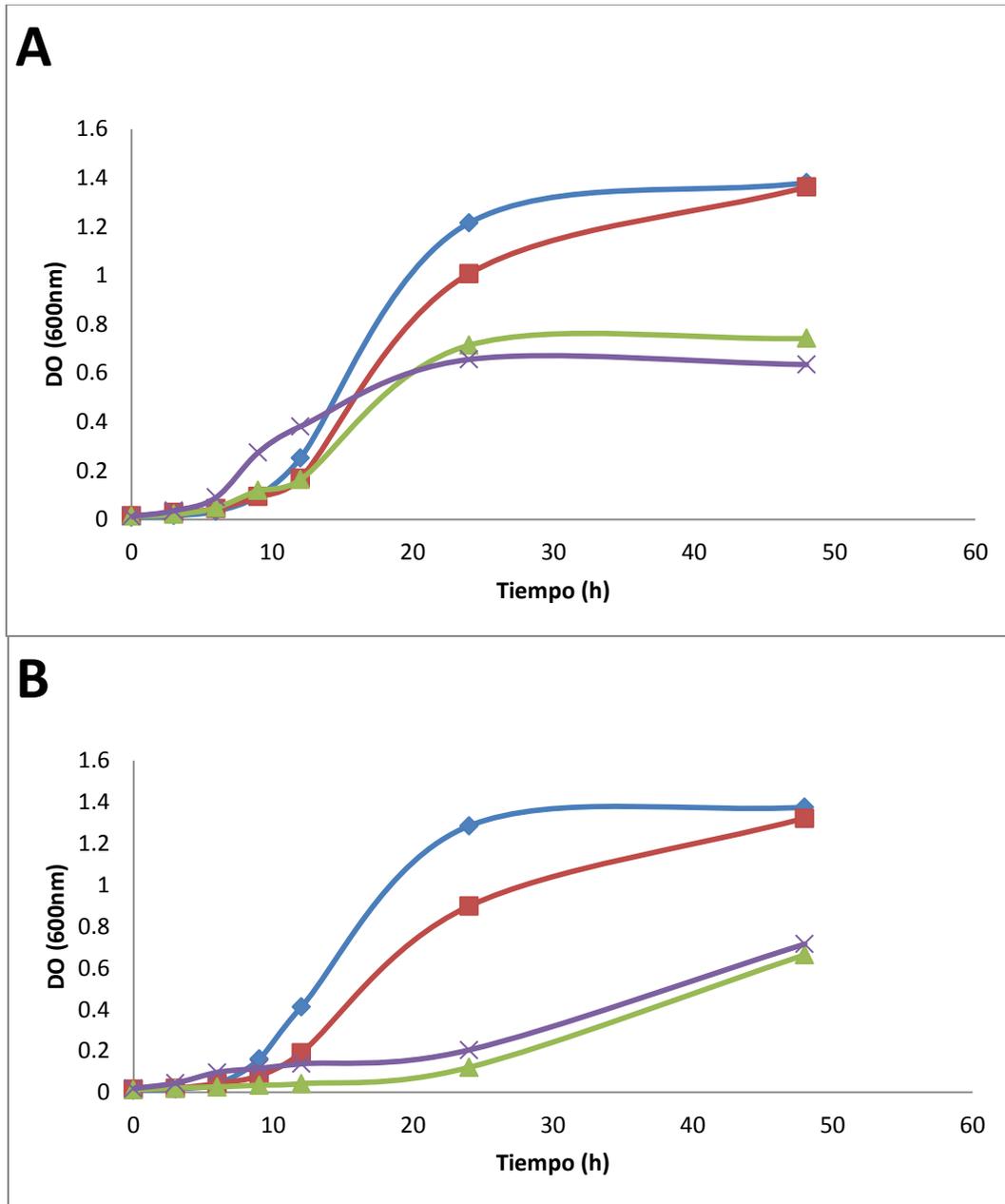


Gráfico 1. Cinéticas de crecimiento de A) *Lactobacillus casei* ssp *paracasei* LMGP-21380 y B) *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 en caldo MRS modificando las fuentes de carbono, donde:

—●— Glucosa —■— Lactulosa —▲— Acetato-Lu —×— Control negativo

El crecimiento de las bacterias se evaluó mediante la densidad óptica a 600nm (DO_{600}), observando que la glucosa fue el carbohidrato en el que crecieron mejor ambas cepas (Gráfico 1). Además exhiben un comportamiento similar entre ellas, presentando una fase lag o adaptativa de alrededor de 6 horas para los dos microorganismos, una fase exponencial entre las 6 y las 24 horas, para finalmente mostrar una fase estacionaria después de las 24 horas de incubación a 30°C en el medio de cultivo. Este comportamiento fue igualmente observado por Nava (2012) usando estas mismas cepas.

Como segundo carbohidrato a probar se usó la lactulosa pues si las cepas son capaces de hidrolizar el enlace éster en los ésteres de lactulosa, entonces dicho carbohidrato quedará disponible para ser metabolizado por las bacterias.

Los perfiles de crecimiento de los probióticos en MRS-lactulosa se muestran en el Gráfico 1, donde se puede apreciar un comportamiento muy similar entre ambas cepas, con una fase adaptativa de 6 horas, una fase exponencial de crecimiento de las 6 a las 24 horas después de la inoculación, para finalmente alcanzar una fase estacionaria de las 24 a las 48 horas. La DO_{600} en el medio MRS-lactulosa es menor comparada con el que se alcanzó en el medio con glucosa a las 24 horas, sin embargo, transcurrida las 48 horas se observa que llegan a niveles similares. Hernández-Hernández y sus colaboradores (2012) también observaron un crecimiento exponencial de 24 horas en cepas como *L. casei* en MRS con glucosa y lactulosa, también notaron que después de las 48 horas de su incubación en ambos sustratos, *L. casei* entra en una fase de muerte celular.

Como control negativo se usó caldo MRS sin la adición de ningún carbohidrato en el medio (Gráfico 1). Para las dos bacterias, se alcanza una DO_{600} máxima de 0.6 a las 48 horas. En el caso de la cepa de *L. casei* ssp *paracasei* LMGP-21380 puede distinguirse una fase lag de 6 horas, una fase exponencial de las 6 a las 24 horas y una fase estacionaria de las 24 a las 48 horas. Mientras que *L. acidophilus* LMGP-21381 tiene una fase adaptativa de 24 horas para después observar una fase exponencial entre las 24 a las 48 horas del estudio. Esto sugiere que *L.*

acidophilus necesitaba más tiempo que *L. casei* para adaptarse en un medio de cultivo con una fuente de carbono muy limitada.

Crecimiento de las cepas en MRS-acetato de lactulosa

Los perfiles de crecimiento de las cepas de *L. casei* ssp *paracasei* LMGP-21380 y *L. acidophilus* LMGP-21381 en presencia de acetato de lactulosa se muestran en el Gráfico 1.

En el perfil de crecimiento de *L. casei*, se observa que esta cepa tiene la capacidad de crecer en el medio MRS-acetato de lactulosa, con una DO_{600} menor que en MRS-glucosa y -lactulosa y ligeramente superior al control negativo. La cinética de crecimiento tiene una fase adaptativa de 6 horas, una fase exponencial de las 6 a las 24 horas donde alcanza su máximo crecimiento y después entra en un equilibrio celular de las 24 a las 48 horas.

Por otra parte, en el caso de la cepa *L. acidophilus* en MRS-acetato de lactulosa, se encuentra una cinética de crecimiento muy similar al control negativo, con fase lag de 24 horas después de su inoculación, para después tener un crecimiento exponencial de las 24 a las 48 horas que duró el estudio.

Lo anterior muestra una mayor preferencia de *L. casei* por el sustrato (acetato de lactulosa) ya que tuvo una fase de adaptación menor comparada con *L. acidophilus*. Además, en la cinética de crecimiento de *L. acidophilus*, para este mismo sustrato, no se puede distinguir claramente la fase exponencial respecto a la estacionaria, lo que sugeriría que la cepa requiere aún más tiempo para poder alcanzar dicha fase.

No existen reportes del crecimiento de *Lactobacillus* en este sustrato, ya que la Dra. Reyes Duarte es pionera en la síntesis de estos compuestos (Chávez, 2013). Sin embargo, se ha estudiado el efecto prebiótico de galactooligosacáridos de lactulosa y de lactosa en el crecimiento de cepas de *Lactobacillus*, esto con el fin de ampliar el estudio de prebióticos ya que representan una alternativa a los

azúcares comúnmente consumidos y así apoyar el crecimiento y proliferación de cepas benéficas en el tracto gastrointestinal (Hernandez-Hernandez et al., 2012).

Crecimiento de *Lactobacillus casei* ssp *paracasei* LMGP-21380 en MRS-laurato de lactulosa

El laurato de lactulosa fue el segundo éster probado en el trabajo. Para la evaluación del crecimiento en laurato de lactulosa, se seleccionó la cepa de *L. casei* ssp. *paracasei* LMGP-21380 ya que, tal como se analizó anteriormente, tardó menos tiempo en adaptarse en el medio MRS-acetato de lactulosa como fuente de carbono.

Dadas las propiedades del laurato de lactulosa (Tabla 2), cuando se agregó el laurato de lactulosa en el caldo MRS, se generó un aspecto turbio en el medio, por lo que fue imposible seguir el crecimiento microbiano a través de la DO_{600} , de modo que el crecimiento de la cepa fue monitoreado por cuenta en placa de células viables, indicado en el Gráfico 2, así como la comparación del crecimiento de la cepa en un medio control sin carbohidrato añadido.

El crecimiento de *L. casei* en el medio control fue de dos ciclos logarítmicos mientras que en el medio MRS-laurato de lactulosa, la cuenta del probiótico se mantuvo prácticamente constante a lo largo de todo el estudio sin observar muerte celular.

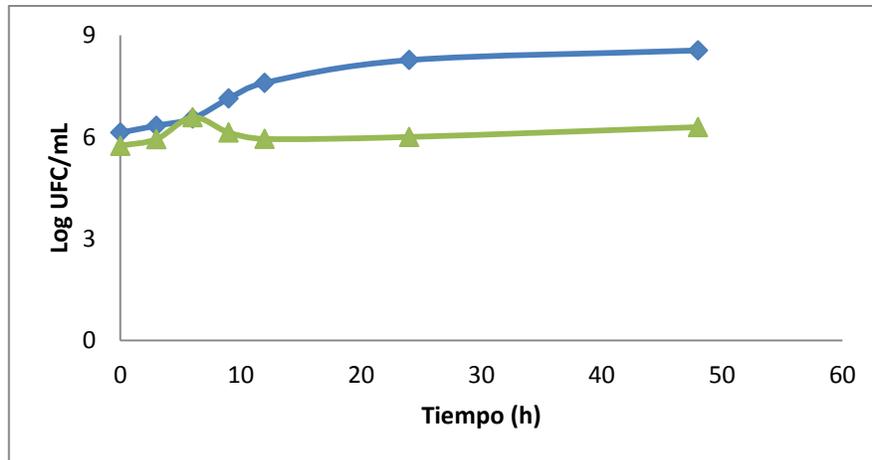


Gráfico 2. Cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* LMGP-21380 en caldo MRS modificado, donde:

—◆— Control negativo —▲— Laurato-Lu

Esta falta de crecimiento de *L. casei* en el medio MRS-laurato de lactulosa es porque al parecer la bacteria no pudo hidrolizar el enlace éster del laurato de lactulosa y por ende, no pudo metabolizar el carbohidrato. La cepa no hidrolizó este enlace por que las esterases que posee tienen preferencia por los sustratos de cadena corta, por lo que para hidrolizar el enlace éster del laurato de lactulosa se requeriría de lipasas, enzimas que no posee *L. casei*, según el análisis previo de actividad enzimática.

Consumo de los carbohidratos presentes en el medio de cultivo

El constituyente principal de los microorganismos es el carbono, de ahí que no pueden prescindir de la fuente de este elemento, además, los carbohidratos proporcionan también al microorganismo oxígeno, hidrógeno y energía metabólica (Hernández, 2003). Es por esta razón, que el crecimiento de las cepas de *Lactobacillus* en los medios de MRS-carbohidrato tiene una íntima relación entre el consumo de los carbohidratos presentes en el medio y el aumento del número de células.

Como se ha mencionado anteriormente, para este trabajo se usaron tres medios de cultivo como controles: MRS-glucosa, MRS-lactulosa y un control negativo sin adición de carbohidrato. El consumo de estas fuentes de carbono por las bacterias *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus* a lo largo de toda la fermentación, y restos de azúcares en el medio control, se muestran en el Gráfico 3.

De manera similar para las dos cepas, se observa que la concentración de la glucosa y lactulosa disminuyen de forma paralela respecto a su crecimiento. Distinguiendo así una fase donde la concentración se encuentra constante hasta las 6 primeras horas, correspondiente a la fase adaptativa de los microorganismos al medio de cultivo, después de lo cual ocurre un consumo acelerado de los carbohidratos pues las cepas se encuentran en una fase exponencial de crecimiento, hasta, finalmente, encontrar bajas concentraciones de carbohidratos al final del estudio (48 horas después de la inoculación). En contraste, no se detectan variaciones ni concentraciones significativas en el caso de los azúcares totales por el método Fenol-Sulfúrico en la fermentación control, comparando con las otras fermentaciones.

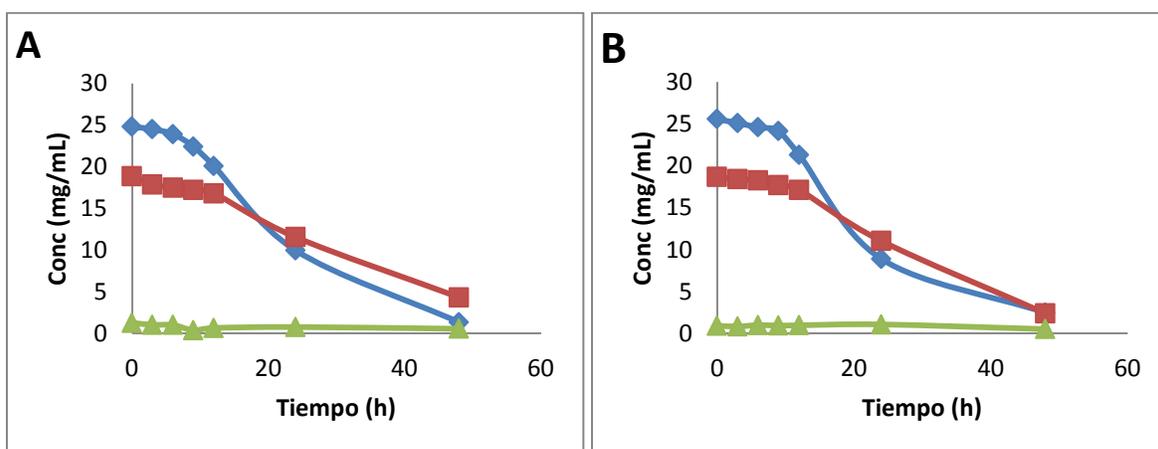


Gráfico 3. Concentración de carbohidratos controles en caldo MRS durante el crecimiento de A) *L. casei* ssp paracasei LMGP-21380 y B) *L. acidophilus* LMGP-21381, donde las fuentes de carbono son:

—●— Glucosa —■— Lactulosa —▲— Control negativo

El consumo del acetato de lactulosa por las cepas probióticas puede observarse en el Gráfico 4, donde la concentración de los azúcares en el medio se ve disminuida a la par del crecimiento de las dos bacterias. Lo que evidencia la utilización del compuesto por las cepas probióticas, ya que conforme la concentración de los azúcares totales en el medio disminuye, se incrementa el número de bacterias.

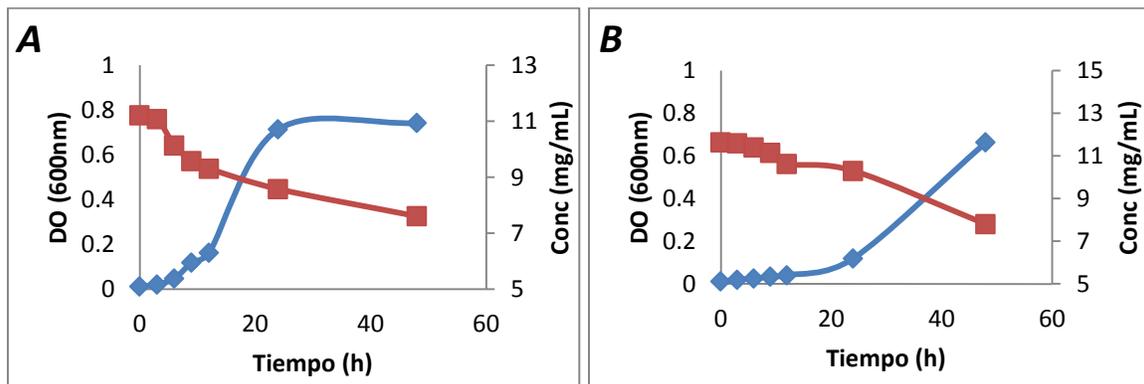


Gráfico 4. Cambio de la concentración del acetato de lactulosa durante el crecimiento de A) *Lactobacillus casei* subespecie paracasei LMGP-21380 y B) *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381, en caldo MRS donde:

—◆— Crecimiento —■— Conc azúcares

En contraste con el acetato de lactulosa, en el medio MRS-laurato de lactulosa, mostrado en el Gráfico 5, hay una escasa variación de la concentración de azúcares totales en el caldo de cultivo, manteniéndose en concentraciones de alrededor de 5mg de azúcares/mL del medio. Esto es congruente con el nulo crecimiento de *L. casei* en la fermentación, ya que si la bacteria no es capaz de usar este compuesto como fuente de carbono, se ve dependiente de crecer de los niveles residuales de azúcar en el medio basal o del uso de otros componentes mismos del medio MRS, como el extracto de carne (Bridson, 1978).

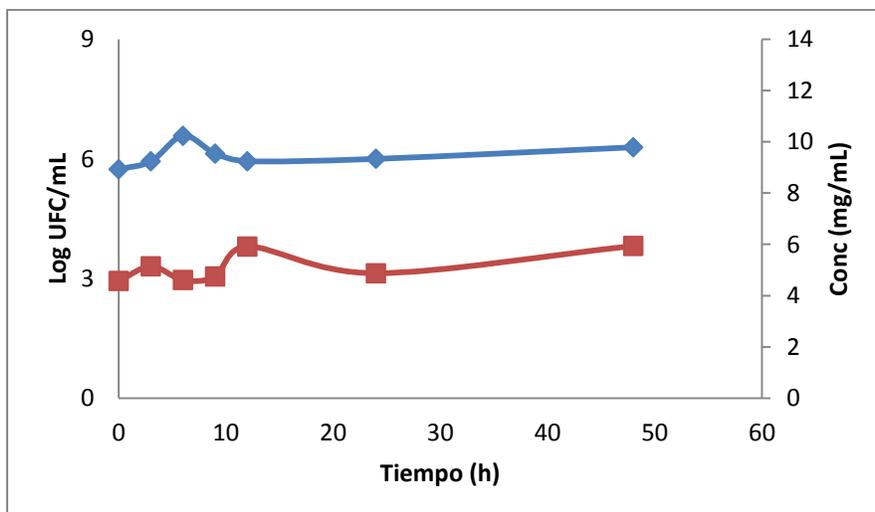


Gráfico 5. Cambio de la concentración del laurato de lactulosa durante el crecimiento de *Lactobacillus casei* ssp *paracasei* LMGP-21380 en caldo MRS donde:

—◆— Crecimiento —■— Conc azúcares

Metabolismo de los ésteres de lactulosa por bacterias probióticas

Seguimiento del pH

Para este trabajo, se monitorearon los valores de pH en el medio MRS modificando las fuentes de carbono ya que las variaciones en el pH evidencian el metabolismo de la fuente de carbono por las bacterias ácido lácticas pues estas son fermentadoras obligadas.

En el Gráfico 6 se observan los valores de pH a lo largo de las 48 horas de la fermentación de glucosa, lactulosa y los encontrados en la fermentación control (sin fuente de carbono). Para las dos cepas, los valores del pH en las fermentaciones de glucosa y lactulosa presentan comportamientos muy similares. En las primeras 6 horas el pH no se ve modificado pues coincide con las fase adaptativa de las cepas en el medio, después de este tiempo se reduce de forma exponencial hasta las 24 horas (de pH 6.3 a 4), para finalmente mantenerse constante en pH 3.8 de las 24 a las 48 horas de la fermentación pues las cepas ya han alcanzado su fase estacionaria de crecimiento. En contraste con lo anterior, en la fermentación control, no hay variación en el pH, manteniéndose en valores de pH 6 durante las 48 horas de monitoreo del crecimiento de las dos cepas.

En un trabajo anterior, Nava (2012) observó de igual forma en medio MRS una disminución del pH en el medio de 6.69 a 4.2 tras el crecimiento *L. casei* como de *L. acidophilus* en 24 horas que duró su prueba, descubriendo de igual forma que de entre las fuentes de carbono que varió en el medio de cultivo, fue en MRS-glucosa cuando se logró el valor de pH final más bajo.

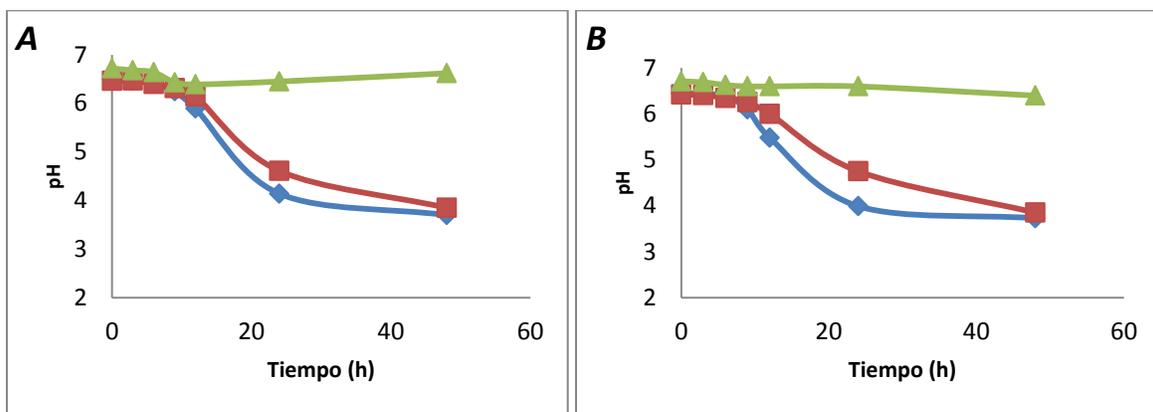


Gráfico 6. Cambio del pH en caldo MRS durante el crecimiento de A) *L. casei* ssp paracasei LMGP-21380 y B) *L. acidophilus* LMGP-21381, donde las fuentes de carbono fueron:

—●— Glucosa —■— Lactulosa —▲— Control negativo

Los valores de pH encontrados en las fermentaciones donde la fuente de carbono fue el acetato de lactulosa se muestran en el Gráfico 7, observando en él una disminución progresiva del pH desde 6 hasta 4, lo que evidencia la capacidad de metabolizar dicha fuente de carbono por las dos cepas.

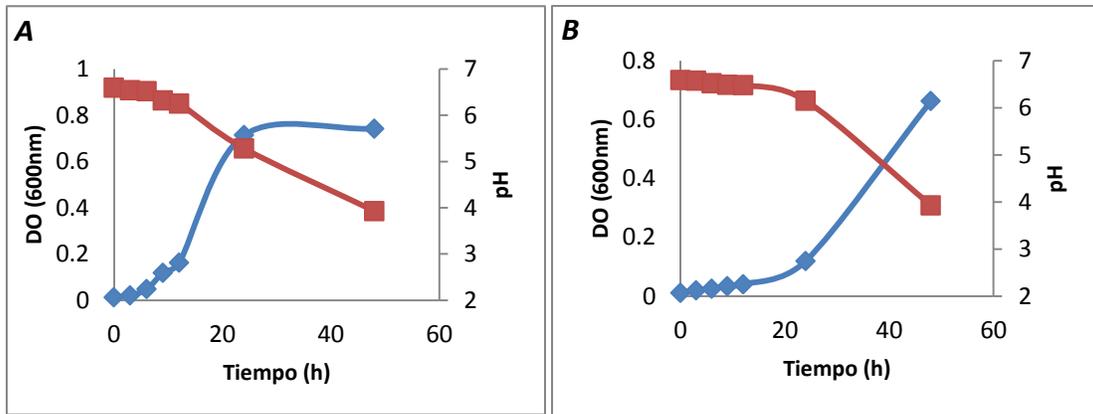


Gráfico 7. Cambio del pH del caldo MRS-acetato de lactulosa durante el crecimiento de A) *L. casei* ssp paracasei LMGP-21380 y B) *L. acidophilus* LMGP-21381

—●— Crecimiento —■— pH

Por otro lado, al analizar el comportamiento del pH y el crecimiento de *L. casei* en MRS-laurato de lactulosa, mostrado en el Gráfico 8, se puede apreciar que el pH 6.5 permanece constante a lo largo de las 48 horas de la fermentación, lo que es congruente con la falta de crecimiento de la cepa.

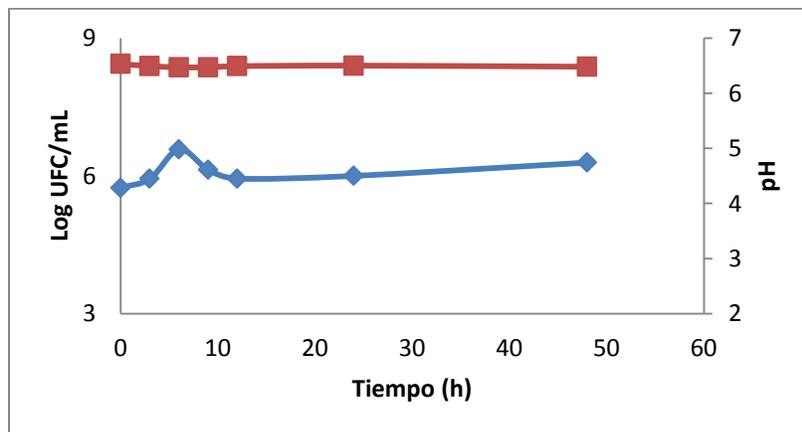


Gráfico 8. Cambio del pH del caldo MRS-laurato de lactulosa durante el crecimiento de *Lactobacillus casei* ssp paracasei LMGP-21380

—●— Crecimiento —■— pH

Productos de la ruta metabólica

La disminución del pH, antes mencionada, sugiere la producción de ácidos derivados de la fermentación de los diferentes azúcares por las bacterias. Las cepas que se probaron son BAL, este grupo de microorganismos se relacionan entre sí por la producción de ácido láctico como principal o único producto de fermentación. A través de un análisis por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se detectó, en todas las fermentaciones por las dos cepas, producción de ácido láctico.

En el Gráfico 9 se muestra la producción de ácido láctico de todas las fermentaciones, único producto final de la fermentación, lo que sugiere que estas bacterias fermentan las hexosas en ácido láctico como único producto final de su fermentación (Hammes y Vogel, 1995). Además, en dicho gráfico se observa que la cepa de *L. acidophilus* produjo una mayor concentración de ácido láctico en el medio con lactulosa que en el medio con glucosa, contrario a lo que sucede con la cepa de *L. casei* donde se detectó una mayor concentración del ácido en el sobrenadante del medio de cultivo con glucosa.

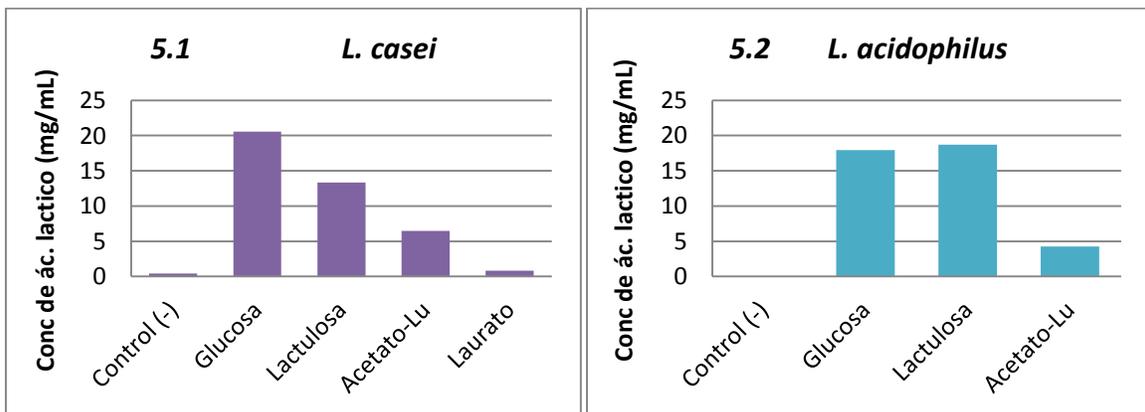


Gráfico 9. Producción total de ácido láctico detectado por HPLC después de 48 horas de crecimiento de las cepas 5.1 *L. casei* ssp *paracasei* LMGP-21380 y 5.2 *L. acidophilus* LMGP-21381 en caldo MRS modificando la fuente de carbono.

En cuanto al metabolismo de los ésteres, en el caso del acetato de lactulosa, se detectó una concentración de ácido láctico de 6.47mg/mL por la cepa de *L. casei* y para la cepa de *L. acidophilus* se produjeron 4.26 mg de ácido láctico/mL, esta menor producción entre las cepas puede deberse a que *L. acidophilus* tardó más tiempo en adaptarse al medio con esta fuente de carbono, teniendo así una fase lag muy larga.

En cuanto al laurato de lactulosa, la concentración de ácido láctico producido por la fermentación de *L. casei* fue muy baja, con niveles prácticamente insignificantes y muy cercanos a la fermentación control (0.84mg/mL), lo que hace evidente el metabolismo nulo del compuesto por la cepa.

DISCUSIÓN GLOBAL

El estudio de la fermentación a pequeña escala de compuestos con presunta actividad prebiótica, como lo son los ésteres de lactulosa, es importante ya que abre la puerta a la utilización de nuevos compuestos funcionales en alimentos, ya que los ésteres pueden ofrecer propiedades tensoactivas así como un presunto carácter prebiótico, característica a la que se enfoca este estudio.

Para este trabajo, se probaron dos ésteres como fuente de carbono: acetato de lactulosa y laurato de lactulosa, esto con el fin de poder estudiar el metabolismo y crecimiento de dos cepas probióticas (*L. casei* y *L. acidophilus*) a través de su utilización y poder así observar la influencia del grupo hidrófobo de la molécula sobre ellas.

Para que las bacterias consuman los compuestos, es necesario que realicen dos reacciones de hidrólisis en los ésteres de lactulosa: el enlace éster que une tanto a la lactulosa como a la cadena hidrocarbonada en cuestión (acetato o laurato) y el enlace glicosídico de la lactulosa (Figura 11). Es por esta razón que en primer lugar se buscó de forma cualitativa la actividad esterasa en las bacterias por dos métodos. Uno de ellos fue en sólido, donde las dos cepas presentaron una actividad positiva, mientras que en un segundo ensayo en líquido se confirmó dicha actividad y mostró una preferencia por sustratos de cadena corta.

Una vez confirmada la capacidad que tienen las cepas por hidrolizar el enlace éster, se estudió el crecimiento y metabolización de los compuestos. Se usó como control al medio MRS, ya que favorece el crecimiento de bacterias del género *Lactobacillus*. Se analizó además el crecimiento de las cepas en el medio MRS-

lactulosa, ya que es este el azúcar prebiótico de interés, observando que en ambas cepas aumentó la DO_{600} , disminuyó el pH por la producción de ácido láctico como único producto de metabolización y disminuyó la concentración de dicho azúcar. Además, se usó como control negativo al medio MRS basal, sin adición de algún carbohidrato, en los perfiles de las cepas en este medio de cultivo se observó poco crecimiento de las cepas, así como una nula variación en la concentración de azúcares totales en el medio, no se detectaron productos de metabolización ni variaciones en el pH.

En cuanto al uso de acetato de lactulosa como fuente de carbono en las cepas probióticas, se observó que el crecimiento de ambas cepas en MRS con dicho compuesto fue muy similar al control negativo, sin embargo, el medio MRS-acetato de lactulosa mostró una disminución del pH por la producción de ácido láctico como único producto de su metabolización así como una disminución de la concentración de azúcares totales en el medio de cultivo, a diferencia del control negativo que no reflejó variación en ninguno de esos indicadores, lo que nos sugiere que el acetato de lactulosa sí es metabolizado por ambas cepas de *Lactobacillus*. Sin embargo, *L. acidophilus* mostró una fase adaptativa muy larga en el medio de cultivo, por lo que se probó solo a *L. casei* en MRS-laurato de lactulosa.

L. casei se mantuvo en la misma concentración celular las 48 horas del ensayo en el medio MRS-laurato de lactulosa como fuente de carbono ya que la cepa no pudo metabolizar el compuesto, evidenciándolo por la nula variación de la concentración de azúcares totales, de pH en el medio de cultivo y por la nula producción de ácido láctico.

CONCLUSIONES

Después de evaluar la capacidad fermentativa de las cepas comerciales *Lactobacillus casei* subespecie *paracasei* LMGP-21380 y *Lactobacillus acidophilus* LMGP-21381 en presencia de diversos carbohidratos en el medio de cultivo con el fin de comparar su comportamiento en el medio MRS con ésteres de lactulosa como fuente de carbono, se puede concluir lo siguiente:

- 👤 Se confirmó, de forma cualitativa, la presencia de la enzima esterasa en ambas cepas probióticas, mostrando preferencia por sustratos de cadena corta.
- 👤 En medio MRS-glucosa y MRS-lactulosa ambas bacterias mostraron un buen crecimiento evidenciado por la producción de metabolitos propios de la fermentación, por los valores bajos de pH y la disminución de los carbohidratos en el medio de cultivo.
- 👤 Ni *L. casei* ni *L. acidophilus* mostraron crecimiento en el medio MRS basal (sin adición de azúcar).
- 👤 Ambas cepas probióticas crecieron en el medio MRS-acetato de lactulosa, evidenciado por el aumento en la DO_{600} .
- 👤 La cepa *L. acidophilus* mostró un mayor tiempo de adaptación al medio de cultivo con el acetato de lactulosa, lo que sugiere una menor capacidad de fermentar el compuesto en comparación a la cepa *L. casei* ssp. *paracasei*.
- 👤 La capacidad de fermentar el acetato de lactulosa por las bacterias se evidenció por la reducción del pH, la disminución en la concentración de los compuestos y producción de ácido láctico.
- 👤 *L. casei* no creció en el medio MRS-laurato de lactulosa, manteniéndose en concentraciones similares a la que fue inoculada, sin observar tampoco que éste las inhibiera ya que no hubo muerte celular.
- 👤 *L. casei* no fue capaz de metabolizar al laurato de lactulosa evidenciándose por valores constantes de pH en el medio de cultivo a lo largo de la fermentación, nula variación de azúcares totales en el medio y escasa producción de metabolitos.

PERSPECTIVAS

- 👤 Los ésteres de lactulosa deben probarse en un medio de cultivo con condiciones similares a la microbiota intestinal como, por ejemplo, condiciones anaerobias de cultivo y diversidad microbiológica, para así observar la selectividad fermentativa de los compuestos por bacterias benéficas bajo dichas condiciones.
- 👤 Evaluar el efecto antimicrobiano de los ésteres de lactulosa frente a microorganismos patógenos y de descomposición presentes en alimentos.
- 👤 Comprobar que los ésteres de lactulosa son seguros para su uso como aditivo alimentario, asignando además una dosis de ingesta recomendada que garantice una acción benéfica a la salud.
- 👤 Desarrollo de nuevos productos usando ésteres de lactulosa como emulsificantes y prebióticos en alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Andersson, H., Asp, N-G., Bruce, A., Roos, S., Wadstrom, T., Wold, A.E. 2001. Health effects of probiotics and prebiotics: A literature review on human studies. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 48, pp 58-75.

Anjum, N., Maqsood, S., Masud, T., Ahmad, A., Sohail, A., Momin, A. 2014. *Lactobacillus acidophilus*: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54:9, pp. 1241-1251.

Binns, N. 2013. Probiotics, prebiotics and the gut microbiota. *ILSI Europe concise monograph*, pp.1-32

Bridson E.Y. 1978. Natural and Synthetic Culture Media for Bacteria. **En:** M. Rechcigl ed. *CRC Handbook series in food and nutrition*, vol. III. Cleveland, Ohio CRC Press, pp. 91-281.

Cardelle Cobas, A. 2009. Síntesis, caracterización y estudio del carácter prebiótico de oligosacáridos derivados de la lactulosa. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de ciencias. Departamento de Química Física Aplicada.

Cervantes Salinas, A.O. 2010. Identificación de cepas de bacterias lácticas por criterios fenotípicos y análisis de secuencia del gen ADN ribosomal 16s. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

Chang, S.W. y Shaw J.F., 2009. Biocatalysis for the production of carbohydrate esters: A review. *New biotechnology*, 26(3), pp. 109-116

Chávez Flores, L.F. 2013. Modificación enzimática de azúcares prebióticos mediante la acilación con enzimas comerciales y obtenidas de librerías metagenómicas. Tesina de especialización en Ciencias Naturales e Ingeniería. México. D.F. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa.

Collins JK, Thornton G, Sullivan GO. 1998. Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8, pp.487-490.

De Man J.C., Rogosa, M. y Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, pp. 130-135.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. y Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28 (3), pp. 350-356.

Enrriquez Blanco, H. 2010. Alimentos funcionales, prebióticos, probióticos, simbióticos y antibióticos. **En:** H. Enrriquez Blanco ed. *Síndrome de intestino irritable y otros trastornos relacionados: fundamentos biopsicosociales*. México. Editorial Médica Panamericana, pp. 644-650.

FAO/OMS. 2002. Probióticos en los alimentos. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación.

Fraustro Romo, Rafael. 2015. Bacterias lácticas del pozol con actividades enzimáticas novedosas. Reporte de Servicio Social. Facultad de Química. UNAM.

Fijan, S. 2014. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11, pp. 4745-4767.

Förster-Fromme, K., Schuster-Wolff-Bühning, R., Hartwig, A., Holder, A., Schwiertz, A., Bischoff, S.C., Hinrichs, J., 2011. A new enzymatically produced 1-lactulose: A pilot study to test the bifidogenic effects. *International Dairy Journal*, 21, pp. 940-948

Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, pp 1401-1412.

Gumel, A.M., Annuar, M.S.M., Heidelberg, T., Christi, Y. 2011. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters. *Process Biochemistry*, 46, pp. 2079-2090.

Hammes, W.P. y Vogel, R.F. 1995. The genus *Lactobacillus*. **En:** B.J.B. Wood y W.H. Holzapfel eds. *The genera of lactic acid bacteria*. Glasgow: Blackie Academic and Professional, Cap.3.

Hernandez-Hernandez, O., Muthaiyan, A., Moreno, F.J., Montilla, A., Sanz, M.L., Ricke, S.C. 2012. Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiology*, 30. pp. 355-361.

Holland, R., Liu, S.-Q., Crow, V.L., Delabre, M.-L., Lubbers, M., Bennett, M., Norris, G. 2005. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavor: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal*, 15, pp. 711-718.

Holzapfel, W.H. y Schillinger, U. 2002. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35, pp. 109-116.

Hosseini Nezhad, M., Hussain, M.A. y Britz, M.L. 2015. Stress responses in probiotic *Lactobacillus casei*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(6), pp. 740-749.

Ishwarya, S. y Prabhasankar. 2014. Prebiotics: Application in Bakery and Pasta Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(4), pp. 511-522.

Isolauri, E., Salminen, S., Ouwehand, A. C. 2004. Probiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), pp.299-313

Kennedy, J.F., Kumar, H., Panesar, P.S., Marwaha, S.S., Goyal, R., Parmar, A. y Kaur, S. 2006. Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sugar esters and related compounds. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, pp. 866-876.

Kolida S., Saulnier, D.M. y Gibson, G.R. 2006. Gastrointestinal Microflora: Probiotics. *Advances in Applied Microbiology*, 59, pp. 187-218.

Larpent, J.P. 1995. Las bacterias lácticas. En ICMSF, Microbiología Alimentaria Vol. 2., Las fermentaciones alimentarias. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.

Linares Soto, J. 2012. Obtención y comportamiento de dos emulsiones cosméticas O/W formuladas con poliacrilato de sodio y tensoactivos no-iónicos como agentes emulsificantes. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

Mackowiak, P.A 2013. Recycling Metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Frontiers in Public Health*, 1:53, pp. 1-3

Manning, T.S. y Gibson, G.R. 2004. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), pp 287-298.

Marti del Moral, A., Moreno-Aliaga, M.A. y Martinez, A. 2003. Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. *Nutrición hospitalaria*. 18(4), pp. 181-188

Matthews, A., Grimaldi, A., Walker, M., Bartowsky, E., Grbin, P., Jiranek, V. 2004. Lactic Acid Bacteria as a Potential Source of Enzymes for Use in Vinification. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (10), pp. 5715-5731.

Matthews, A., Grbin, P.R., Jiranek, V. 2007. Biochemical characterization of the esterase activities of wine lactic acid bacteria. *Applied Microbiology Biotechnology*, 77, pp. 329-337.

Mizota, T., Mori, T., Yaeshima, T., Yanagida, T., Iwatsuki, M., Ishibashi, N. 2002. Effects of low dosages of lactulose on the intestinal function of healthy adults. *Milchwissenschaft*, 57, pp- 312-315.

Morelli L. 2000. In vitro selection of probiotic Lactobacilli: A critical appraisal. *Current Issues In Intestinal Microbiology*, 1(2), pp.59-67.

Nava, S. 2012. Elaboración de una bebida simbiótica a partir de un sustrato lácteo. Tesis Lic. Química de alimentos. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Neta, N.A.S, dos Santos, J.C.S., Sancho, S. de O., Rodrigues, S., Gonçalves, L.R.B., Rodrigues, L.R. y Teixeira, J.A. 2012. Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as Surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. *Food Hydrocolloids*, 27, pp. 324-331.

Nielsen, S. (Ed); 2003. Food Analysis Laboratory Manual; Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA.

Oliver, C., Lewis, P.R. y Stoward, P.J. 1991. Esterases. **En:** P.J. Stoward y A.G.E. Pearse, eds. *Histochemistry Theoretical and Applied* vol. 3 Enzyme histochemistry. Churchill Livingstone, London, UK.

Panesar, P.S. y Kumari, S. 2011. Lactulose: Production, purification and potential applications. *Biotechnology Advances*, 29, pp. 940-948.

Parra Huertas, R.A. 2010. Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 8(1), pp 93-95.

Peña García, G.C. 2011. Búsqueda y caracterización de enzimas hidrolíticas bacterianas de interés industrial obtenidas del metagenoma del pozol. Tesis de maestría en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México, D.F.

Pérez-Martín, F., Seseña, S., Izquierdo, P.M., Llanos Palop, M. 2013. Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines. *International Journal of Food Microbiology*, 163, pp. 153-158.

Plou, F. J., Cruces, M. A., Ferrer, M., Fuentes, G., Pastor, E., Bernabé, M., Christensen, M., Comelles, F., Parra, J. L., Ballesteros, A., 2002. Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent: A review. *Journal of Biotechnology*, 96, pp. 55-66.

Polat, T. y Linhardt, R.J. 2001. Review. Syntheses and applications of sucrose-based esters. *Journal of Surfactants and Detergents*, 4(4), pp. 415-421.

Reyes-Duarte, D., López-Cortés, N., Ferrer, M., Plou, F.J. y Ballesteros, A., 2005. Parameters affecting productivity in the lipase-catalysed synthesis of sucrose palmitate. *Biocatalysis & Biotransformation*, 23, pp. 19-27.

Rodríguez Navarro, A. y Villalva Fuentes, B. 2010. Estudio potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol. Tesis para obtener el título de químico de alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

Sánchez Martínez, J.I. 2005. Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacáridos. Tesis doctorado. Universidad de Oviedo. Departamento de Biología Funcional.

Schuster-Wolff-Bühning, R., Fischer, L., Hinrichs, J., 2010. Production and physiological action of the disaccharide lactulose: A review. *International Dairy Journal*, 11, pp. 731-741.

Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L., Painter, P.R. 1992. Microbiología. Segunda edición. Barcelona: Reverté.

Tuohy, K.M., Probert, H.M., Smejkal, C.W. y Gibson, G.R. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, 8(23), pp. 692-700

Venema, K., van Nuenen, M.H.M.C., van den Heuvel, E.G., Pool, W., y van der Voseen J.M.B.M. 2003. The effect of lactulose on the composition of the intestinal microbiota and short-chain fatty acid production in human volunteers and a computer-controlled model of the proximal large intestine. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 15, pp- 94-105.

Vieira, A.T., Teixeira, M.M. y Martins, F.S. 2013. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Frontiers in immunology*. 4, pp.1-12.

Walker, WA. y Duffy, LC. 1998. Diet and bacterial colonization: role of probiotics and prebiotics. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 9(12), pp.668-675.

Wang, Y. 2009. Prebiotics: Present and future in food science and technology. *Food Research International*, 42, pp. 8-12.

World Gastroenterology Organisation WGO. 2008. Guías prácticas: Probióticos y Prebióticos.

Anexos

Anexo I. Ajuste molar de laurato de lactulosa

- Se contó con 2g de laurato de lactulosa para la prueba
- Y considerando los pesos moleculares:

Lactulosa: 342.29g/mol

Laurato de lactulosa: 524.28g/mol

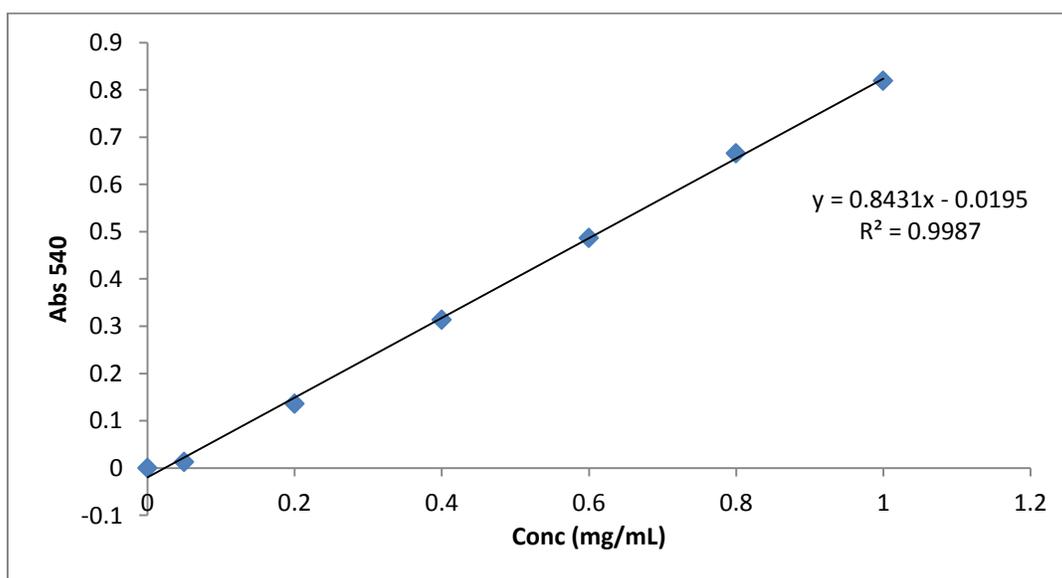
- Se realiza una relación matemática para considerar la cantidad de lactulosa presente en el laurato de lactulosa:

$$2g \times \frac{342.3g/mol}{524g/mol} = 1.3g \text{ de lactulosa en la molecula}$$

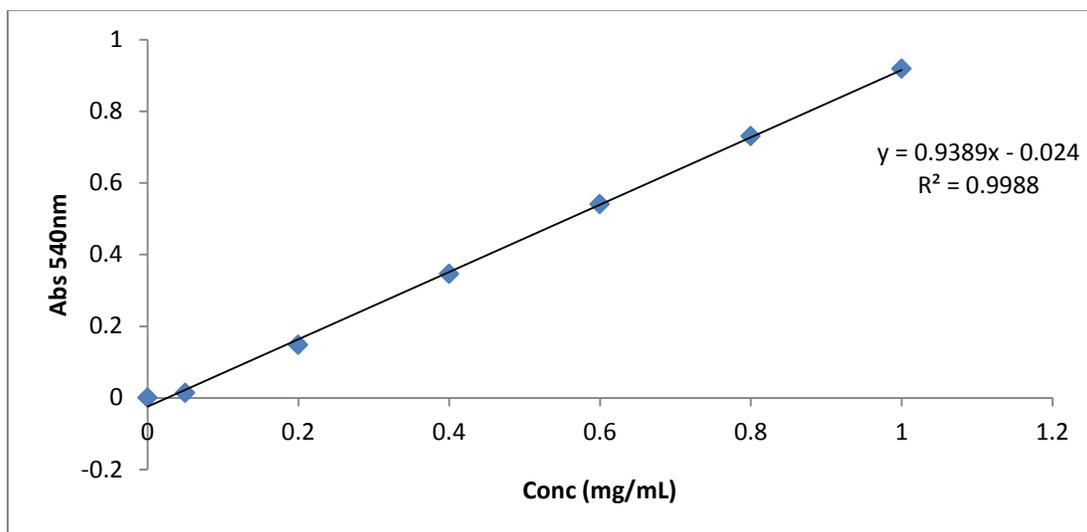
- Para poder incorporar el compuesto y conseguir una concentración final de la lactulosa al 2% en el medio de cultivo, se requirieron 65mL de medio MRS.

Anexo II. Curvas patrón para la cuantificación de azúcares en el medio de cultivo

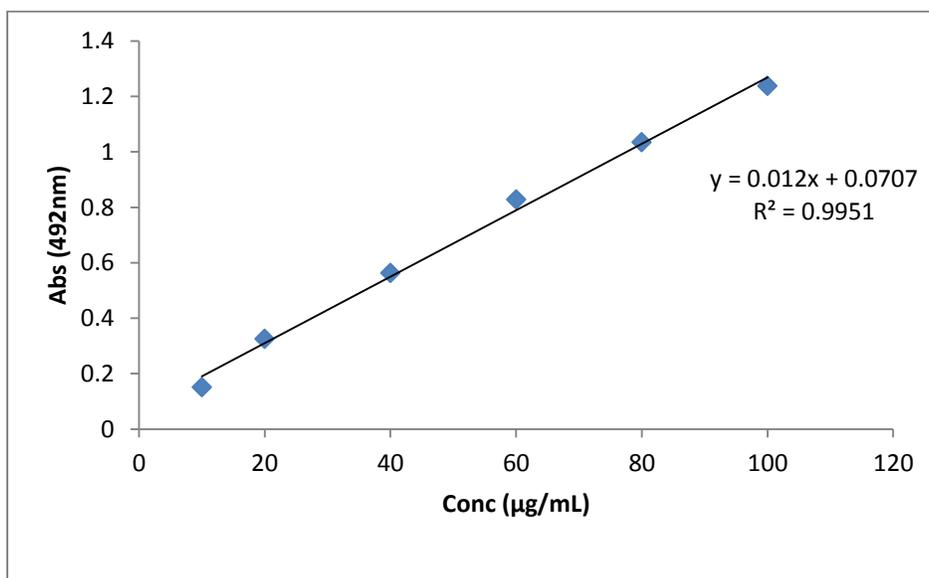
Curva patrón de glucosa para la determinación de la concentración de azúcares por DNS



Curva patrón de lactulosa para la determinación de la concentración de azúcares por DNS



Curva patrón de glucosa para la determinación de la concentración de azúcares por el método Fenol-sulfúrico.



Anexo III. Curva patrón para la cuantificación de productos finales de las fermentaciones

Curva patrón de ácido láctico para la determinación de la concentración de dicho compuesto en las muestras analizadas por HPLC.

