



Universidad de Concepción  
Facultad de ciencias Farmacéuticas  
Magister en Ciencias Farmacéuticas



**DISEÑO DE UN BIORREACTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE  
*LACTOBACILLUS FERMENTUM* UCO-979C (*Limosilactobacillus fermentum* UCO-  
979C) Y ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA POR ESTE PROBIÓTICO CON  
ACTIVIDAD ANTI-*HELICOBACTER PYLORI*, EN UN SISTEMA GÁSTRICO  
INTESTINAL SIMULADO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN CIENCIAS  
FARMACÉUTICAS**

**LUIS ALEJANDRO VILLAMARIN PALMERO**

**PROFESORA GUÍA:**

**DRA. APOLINARIO DEL ROSARIO GARCÍA CANCINO**

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:**

**DR. CRISTIAN AGURTO MUÑOZ**

**DRA. CAROLINA PILAR GÓMEZ GAETE**

**DR. JAVIER FERRER VALENZUELA**

**DIRECTORA DEL PROGRAMA:**

**MSc. SIGRID CLAUDIA MENNICKENT CID**

**CONCEPCIÓN, CHILE 2023**

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Laboratorios Pasteur y el Departamento de Ciencias y Tecnologías Analíticas de la Facultad de Farmacia.

**Profesora Guía**

---

Dra. Apolinaria García Cancino  
**Facultad de Ciencias Biológicas**  
**Universidad de Concepción**

**Comisión Evaluadora**

---

Dr. Cristin Agurto Muñoz  
**Facultad de Farmacia**  
**Universidad de Concepción**

---

Dra. Carolina Pilar Gómez Gaete  
**Facultad de Farmacia**  
**Universidad de Concepción**

---

Dr. Javier Ferrer Valenzuela  
**Faculta de Ingeniería**  
**Universidad de Concepción**

**Directora del Programa**

---

MSc. Sigrid Claudia Mennickent Cid  
**Facultad de Farmacia**  
**Universidad de Concepción**



## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a cada uno de mis familiares, especialmente a mi amada madre Belkys Palmero, a mi adorada esposa Johana Gómez, a mi pequeño gigante Antoly Villamarin, a mis hermanos Arturo, Williams y Jesús Antonio, ustedes con su amor y paciencia han forjado en mí una persona perseverante.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quién tiene un sueño debe perseguirlo, visualizarlo, planificarlo, ejecutarlo, reinventarlo y conseguirlo, pero, el camino que se recorre siempre será más fácil si te consigues personas maravillosas. Es difícil tener pocas líneas para agradecerles a tantos, pero, quiero expresar en estas cortas líneas unas palabras de agradecimiento a la Dra. Apolinaria García, quien con su enorme paciencia, bondad y cariño me ha guiado a la consecución de este objetivo, que empezó hace muchos años, pero, nunca dejó de confiar en mí, a la profesora Sigrid Mennickent, quien con su inconmensurable apoyo nos alentó a avanzar en cada objetivo, al personal del laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Facultad de Ciencias Biológicas, Cristian, Michelle, Romina y especialmente a Olga, quien me ayudó incansablemente en la consecución de reactivos y materiales necesarios. Agradezco al profesor Dr. Luis Bustamante por su apoyo dentro del departamento de Ciencias y Tecnologías Analíticas, por siempre estar dispuesto a apoyar en cada cambio que fuese necesario para avanzar. Al Dr. Humberto Bernasconi, quién con su apoyo dentro del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Pasteur ha hecho posible avanzar de forma importante en los objetivos de esta tesis, gracias por tanta confianza.

Agradezco enormemente a mi madre, por enseñarme lo importante de terminar lo que una vez se ha iniciado, a perseverar sin importar lo difícil que sea, a ser paciente, agradezco enormemente a mi esposa e hijo, quienes con su enorme amor me han apoyado, sacrificando nuestro tiempo en familia para dedicarlo a realizar este trabajo, gracias a mis hermanos y demás familiares. Podría quedarme agradeciendo a muchos más, pero, a quienes no he nombrado, no por ser menos importantes, les estaré toda la vida agradecido. Por último, pero más importante, quiero agradecer a Dios, ese Dios que no se ve, pero que está allí, dándonos fuerza y fe, empujando nuestras vidas al límite de lo maravilloso, gracias, por tanto.

# Tabla de contenidos

DEDICATORIA .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
Indice de Figuras .....	VIII
Indice de tablas .....	XI
RESUMEN .....	XIV
<b>1.0. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes generales sobre <i>Helicobacter pylori</i> .....	1
1.2. Epidemiología .....	2
1.3. Patogenicidad.....	3
1.4. Factores de colonización .....	3
1.5. Factores del daño tisular.....	4
1.5.1. Citotoxina A Vacuolizante (VacA) .....	4
1.5.2. Proteína CagA (Gen A Asociado a la citotoxina).....	5
1.5.3. Gen promotor de la Úlcera Duodenal ( <i>dupA</i> ) .....	6
1.6. Enfermedades asociadas a <i>H. pylori</i> .....	6
1.7. Tratamientos convencionales contra <i>H. pylori</i> .....	7
1.7.1. Terapia triple.....	7
1.7.2. Terapia cuádruple no bismuto.....	7
1.7.3. Terapia BCQT.....	7
1.7.4. Probióticos contra <i>H. pylori</i> .....	8
1.8. <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C.....	8

1.8.1. Caracterización probiótica de la cepa <i>L. fermentum</i> UCO-979C .....	8
1.8.2. Capacidad inmunomoduladora de <i>L. fermentum</i> UCO-979C .....	10
1.8.3. Alternativa funcional para transferencia tecnológica de <i>L. fermentum</i> UCO-979C.....	11
1.9. Desafíos y estrategias para la producción de cepas probióticas.....	12
1.10. Simulaciones gástricas.....	16
2.0. Metodología General .....	23
2.1. Materiales y métodos .....	27
2.1.1. Reactivos.....	27
2.1.2. Medio de cultivo y variables involucradas .....	28
2.1.3. Obtención del inóculo.....	28
2.1.4. Preparación del medio de cultivo modificado.....	28
2.1.5. Cinética de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C .....	29
2.1.6. Estimación del crecimiento celular en el medio modificado.....	29
2.1.7. Estimación de la densidad óptica del medio de cultivo .....	29
2.1.8. Cuantificación de azúcares totales .....	30
2.1.9. Modelamientos matemáticos .....	30
2.2. Escalamiento de la cepa bajo condiciones óptimas.....	31
2.2.1. Activación de la cepa .....	31
2.2.2. Inóculo inicial para el biorreactor .....	31
2.2.3. Control del crecimiento celular de la cepa en el proceso escalado.....	32
2.2.4. Liofilizado de la biomasa .....	32
2.2.5. Análisis estadístico.....	33
2.2.6. Evaluación de la calidad de ajuste .....	33
2.3. Dimensionamiento del biorreactor .....	34
2.4. Balances de masas .....	35
2.5. Simulación gástrica.....	38
2.5.1. Preparación del medio colónico .....	38
2.5.2. Preparación del inóculo .....	39
2.5.3. Fermentación colónica .....	39
2.5.4. Viabilidad de la cepa en el medio colónico simulado .....	39

2.5.5.	Análisis estadístico.....	40
2.6.	Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta producidos por <i>L. fermentum</i> UCO 979C en el medio colónico simulado.....	40
2.6.1.	Preparación de la muestra.....	40
2.6.2.	Extracción de ácidos grasos de cadena corta por micro extracción en fase solida (SPME).....	40
2.6.3.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	41
2.6.4.	Identificación de ácidos grasos de cadena corta.....	41
2.6.5.	Validación del método.....	42
2.6.6.	Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta.....	42
3.0.	Resultados.....	43
3.1.	Cinética de <i>L. fermentum</i> UCO-979C.....	43
3.1.1.	Cinética de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuando se modifica la temperatura de fermentación (Bloque 01).....	43
3.1.2.	Cinética de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuando se modifica la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación (Bloque 02).....	44
3.1.3.	Cinética de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuando se modifica la velocidad de agitación en el medio de fermentación (Bloque 03).....	46
3.1.4.	Cinética de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuando se modificó el pH inicial en el medio de fermentación (Bloque 04).....	47
3.1.5.	Escalamiento de la cepa en un biorreactor Batch bajo las condiciones determinadas en los bloques de ensayos.....	49
3.1.6.	Modelamientos matemáticos para cada una de las cinéticas de la cepa observadas bajo las distintas condiciones de fermentación evaluadas en cada bloque de ensayo.....	50
3.1.7.	Parámetros cinéticos estimados a partir de modelamientos matemáticos.....	54
3.1.8.	Análisis estadístico para el ajuste cinético de los modelos matemáticos.....	66
3.2.	Dimensionamiento del biorreactor.....	70
3.2.1.	Ajuste polinomial de los datos.....	71
3.2.2.	Solución de la derivada por el método de diferenciación numérica.....	77
3.2.3.	Regresión no lineal de los datos.....	78
3.2.4.	Dimensionamiento del biorreactor.....	82
3.3.	Simulación gástrica <i>in vitro</i> .....	85

3.3.1. Viabilidad de la cepa en el medio colónico simulado .....	85
3.4. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta producidos por <i>L. fermentum</i> UCO 979C en el medio colónico simulado.....	86
3.4.1. Identificación de ácidos grasos de cadena corta por cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas .....	86
3.4.2. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en el medio colónico simulado .....	89
3.4.3. Cuantificación de ácido acético producido por fermentación de la glucosa (control positivo) en el medio colónico simulado.....	90
3.4.4. Precisión del método.....	103
3.4.5. Límite de identificación y límite de cuantificación (LOD y LOQ).....	104
4.0. DISCUSIÓN.....	106
4.1. Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C.....	106
4.2. Modelado y dimensionamiento del biorreactor por balance de masas y modelo de Monod .....	112
4.3. Viabilidad de la cepa bacteriana y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el medio colónico simulado .....	113
5.0. CONCLUSIONES .....	118
6.0. BIBLIOGRAFIA .....	119



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> <i>H. pylori</i> tiene flagelos que le facilitan su movilidad a través del epitelio gástrico. .....	1
<b>Figura 2.</b> Prevalencia mundial de <i>H. pylori</i> .....	2
<b>Figura 3.</b> Efectos de VacA sobre las células epiteliales del huésped. ....	4
<b>Figura 4.</b> Efectos de CagA sobre las células epiteliales del huésped. ....	5
<b>Figura 5.</b> Factores principales que afectan la viabilidad de las cepas probióticas en las diversas etapas de procesamiento, almacenamiento y producto final. ....	13
<b>Figura 6.</b> Flujo de trabajo para determinar la cinética de crecimiento de la cepa <i>L. fermentum</i> UCO-979C.....	26
<b>Figura 7.</b> Cinética de crecimiento para <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuando se modifica la temperatura de fermentación. ....	44
<b>Figura 8.</b> Curvas de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuando se modifica la concentración de carbohidrato en el medio de cultivo .....	46
<b>Figura 9.</b> Crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuando se ha modificado la velocidad de agitación en el medio de cultivo .....	47
<b>Figura 10.</b> Crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuando se modifica el pH inicial del medio de cultivo .....	49
<b>Figura 11.</b> Cinética de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C en un biorreactor Batch de 50 litros de capacidad.. ....	50
<b>Figura 12.</b> Cinéticas de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuándo se empleó la glucosa como fuente de carbono en el medio de cultivo.....	52
<b>Figura 13.</b> Cinética de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuando en el medio de cultivo se sustituyó la fuente de carbono por inulina .....	53

<b>Figura 14.</b> Cinética de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuando en el medio de cultivo se substituyó la fuente de carbono por FOS. ....	54
<b>Figura 15.</b> Velocidad máxima de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuando en el medio de cultivo la fuente de carbono es glucosa y las variables se evalúan a tres niveles. 55	
<b>Figura 16.</b> Tiempo de duplicación celular de <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuando se han modificado el pH, la temperatura de fermentación, la velocidad de agitación y la concentración de glucosa en el medio de cultivo. ....	56
<b>Figura 17.</b> Ajuste polinomial de los datos de biomasa respecto al tiempo, para <i>L. fermentum</i> UCO-979C cuando se emplea caldo MRS como medio de cultivo en un biorreactor Batch. ....	72
<b>Figura 18.</b> Estimación del valor de biomasa (g/L) respecto a los valores predichos por el modelo. ....	73
<b>Figura 19.</b> Dimensionamiento interno del biorreactor. ....	83
<b>Figura 20.</b> Viabilidad de <i>L. fermentum</i> UCO 979-C en un medio gástrico simulado, el cual ha sido suplementado con 10 g/L de fuente de carbono (inulina, FOS o glucosa).. ....	85
<b>Figura 21.</b> Viabilidad de <i>L. fermentum</i> UCO-979C en un medio gástrico simulado, el cual ha sido suplementado con 30 g/L de fuente de carbono (inulina, FOS o glucosa). ....	86
<b>Figura 22.</b> Cromatograma de mezcla de estándares de ácidos grasos de cadena corta. (a) ácido acético, (b) ácido propiónico, (c) ácido butírico y (d) ácido valérico.....	87
<b>Figura 23.</b> Cromatograma de iones extraídos (EIC) para los estándares de ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico.....	88
<b>Figura 24.</b> Espectros de masas para estándares de ácidos grasos de cadena corta. (a) ácido acético los iones 43 y 60 m/z, (b) ácido propiónico los iones 74, 45 y 57 m/z, (c) ácido butírico los iones 73, 42 y 60 m/z, (d) ácido valérico los iones 73, 60 y 41 m/z.....	89

<b>Figura 25.</b> Cromatograma de iones extraídos para el ácido acético (ion molecular 60 m/z), ácido propiónico (iones 60,73,74 m/z), ácido butírico (iones 60,73,74 m/z) y ácido valérico (iones 60,73, 74 m/z).....	92
<b>Figura 26.</b> Cromatograma de iones extraídos para los iones m/z 74 y 60. (a) Fuente de carbono glucosa, (b) Fuente de carbono Inulina, (c) fuente de carbono FOS, (d) sin fuente de carbonos en el medio gástrico simulado, solo cepa, cuando han transcurrido 24 horas a a una concentración de carbohidratos de 10 g/L.....	94
<b>Figura 27.</b> Cromatograma de iones extraídos para los iones m/z 60 y 74. (a) Fuente de carbono glucosa, (b) Fuente de carbono Inulina, (c) fuente de carbono FOS, (d) sin fuente de carbonos en el medio gástrico simulado, solo cepa, cuándo han transcurrido 24 horas y se ha suplementado los carbohidratos a razón de 30 g/L en el medio gástrico simulado.....	96
<b>Figura 28.</b> Curva de calibración para el ácido acético en el rango de 1,67-33,33 $\mu\text{mol/ml}$ en medio gástrico simulado (sin suplemento de carbohidratos).....	99

## Indice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Modelos matemáticos empleados para describir la cinética de crecimiento de cepas bacterianas. ....	15
<b>Tabla 2.</b> Modelos de fermentación <i>in vitro</i> para la evaluar los principales metabolitos producidos durante la fermentación, detallando las principales condiciones de operación. 17	
<b>Tabla 3.</b> Composición del medio de cultivo modificado preparado para determinar la cinética de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C. ....	24
<b>Tabla 4.</b> Distribución de las experiencias experimentales para evaluar el efecto de las variables a los distintos niveles, sobre el crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C .....	24
<b>Tabla 5.</b> Velocidades máximas de crecimiento de la cepa cuando se modifican las variables en el medio de cultivo. ....	56
<b>Tabla 6.</b> Parámetros cinéticos determinados para cada uno de los modelos matemáticos empleados para modelar la fermentación de la cepa cuando en el medio de cultivo se modificó la fuente de carbono y la temperatura de fermentación. ....	58
<b>Tabla 7.</b> Parámetros cinéticos determinados para cada uno de los modelos matemáticos empleados para modelar la fermentación de la cepa cuando en el medio de cultivo se modificó la concentración y la fuente de carbono. ....	60
<b>Tabla 8.</b> Parámetros cinéticos determinados para cada uno de los modelos matemáticos empleados para modelar la fermentación de la cepa cuando en el medio de cultivo se modificó la fuente de carbono y la velocidad de agitación. ....	62
<b>Tabla 9.</b> Parámetros cinéticos determinados para cada uno de los modelos matemáticos empleados para modelar la fermentación de la cepa cuando en el medio de cultivo se modificó la fuente de carbono y el pH inicial. ....	64

<b>Tabla 10.</b> Parámetros determinados para cada uno de los modelos matemáticos empleados para el ajuste de datos experimentales observados durante la fermentación realizada en el biorreactor batch. ....	66
<b>Tabla 11.</b> Análisis estadístico para la discriminación del modelo matemático de ajuste para la cinética de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C en un medio al cual se le ha modificado la fuente de carbono, la temperatura de fermentación y la concentración de la fuente de carbono.....	66
<b>Tabla 12.</b> Análisis estadístico para la discriminación del modelo matemático de ajuste para la cinética de crecimiento de <i>L. fermentum</i> UCO-979C en un medio al cual se le ha modificado la fuente de carbono, la velocidad de agitación y el pH inicial del medio de cultivo. ....	69
<b>Tabla 13.</b> Colección de datos para la producción de biomasa y consumo de sustrato en el biorreactor para <i>L. fermentum</i> UCO-979C a 35°C, pH 6,50-6,70, velocidad de agitación de 100 RPM y MRS caldo como medio de cultivo.....	70
<b>Tabla 14.</b> Intervalos de confianza del 95,0% para los coeficientes estimados del modelo.	72
<b>Tabla 15.</b> Colección de datos para evaluar la derivada de la función polinómica de la producción de biomasa respecto al tiempo.....	74
<b>Tabla 16.</b> Parámetros cinéticos del modelo del Monod para la producción de biomasa de <i>L. fermentum</i> UCO-979C.....	74
<b>Tabla 17.</b> Estimado de las derivadas para la producción de biomasa para el tiempo de fermentación. ....	76
<b>Tabla 18.</b> Estimación de las derivadas por el método de diferenciación numérica. ....	78
<b>Tabla 19.</b> Parámetros cinéticos de <i>L. fermentum</i> UCO-979C estimadas por la ecuación de Monod.....	79

<b>Tabla 20.</b> Valores estimados para el balance de masa por el método de regresión no lineal de los datos observados experimentalmente. ....	81
<b>Tabla 21.</b> Dimensiones y geometría del agitador de turbina de disco para la agitación del caldo de fermentación.....	84
<b>Tabla 22.</b> Resumen de datos obtenidos para la curva de calibración por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. ....	96
<b>Tabla 23.</b> Datos obtenidos para la cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas para las muestras de la simulación gástrica cuando se ha suplementado con carbohidratos a dos niveles de concentración .....	100
<b>Tabla 24.</b> Valores obtenidos por análisis cromatográficos acoplado a espectrometría de masas para la muestra de control de calidad.....	103
<b>Tabla 25.</b> LOQ para blanco fortificado con estándar de ácido acético a una concentración de 0,2700 $\mu\text{mol/ml}$ . ....	105

## **RESUMEN**

*Helicobacter pylori* es un patógeno que presenta un alto nivel de infectividad, aproximadamente el 50% de la población mundial está infectada. En la mayoría de los pacientes la sintomatología no se manifiesta de forma importante, pero la colonización del epitelio gástrico por este patógeno puede provocar daño tisular, desarrollar gastritis crónica y en el caso más extremo cáncer gástrico. Los tratamientos convencionales con antibióticos han visto disminuida su efectividad contra este patógeno debido a la resistencia bacteriana que se ha desarrollado a nivel genético, la baja tasa de cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes y, además, los efectos secundarios que causan los antibióticos, favoreciendo la disbiosis intestinal, modificando la microbiota bacteriana normal. Por lo que existe la necesidad de buscar terapias alternativas que demuestren capacidad para erradicar o inhibir la colonización de este patógeno en el epitelio gástrico, es aquí donde ha demostrado un efecto sinérgico el uso de probióticos conjuntamente con las terapias convencionales de antibióticos, así como un efecto preventivo de la infección.

La cepa *Limosilactobacillus fermentum* UCO-979C, la cual nombraremos de aquí en adelante como *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, para mantener su conexión bibliográfica con ensayos realizados anteriormente, ha demostrado alta capacidad para inhibir la colonización de *H. pylori* en el epitelio gástrico en ensayos *in vivo* e *in vitro*, convirtiéndose en una cepa relevante para combatir este patógeno, pues posee un 93% de capacidad de inhibir la infección por este patógeno, pero el reto de transferencia tecnológica no ha sido estudiado con anterioridad, con el fin de establecer condiciones sólidas para el escalamiento a nivel industrial.

En este trabajo se ha determinado la cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C en un medio convencional modificado, como lo es el caldo MRS, para ello se modificó la concentración y la fuente de carbono por fructooligosacáridos (Inulina o FOS), manteniendo a la glucosa como control positivo, además, se modificaron variables de operación como la temperatura, el pH inicial del medio de cultivo y la velocidad de agitación, todos a tres niveles. Los resultados obtenidos demostraron la incapacidad de *L. fermentum* UCO-979C para hidrolizar fructooligosacáridos, de esta manera poder aprovechar dicho sustrato como

fuentes de carbono, que estimule los procesos metabólicos para la división celular. La cepa ha aprovechado a la glucosa como fuente de carbono en el medio de cultivo, por lo que a partir de este sustrato se determinó los parámetros cinéticos relevantes para la cepa bajo condiciones óptimas de fermentación, las cuales resultaron ser 35°C, pH =6,80, concentración de glucosa en el medio de cultivo de 20 g/L y una velocidad de agitación de 100 RPM (el crecimiento celular no mostró dependencia importante con la velocidad de agitación), estas condiciones fueron evaluadas en un biorreactor batch de 50 litros, para el cual se ocuparon 30 litros de caldo de cultivo, obteniendo los siguientes parámetros cinéticos: velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) fue de  $0,2567 \pm 0,0174 \text{ h}^{-1}$ , la constante de Monod,  $K_s$ ,  $2,1065 \pm 0,3820 \text{ g/L}$ , tiempo de duplicación celular,  $2,7002 \pm 0,1955 \text{ h}$ , rendimiento de producción de biomasa respecto al consumo de sustrato (glucosa)  $Y_{X/S}$  de  $0,1181 \pm 0,0012 \text{ g/g}$  y un tiempo de adaptación de  $0,3518 \pm 0,0071 \text{ h}$ . Estos parámetros permitieron establecer una ecuación de diseño para dimensionar un birreactor batch, la cual es función del tiempo de fermentación y del volumen de caldo a utilizar, siempre que el medio a emplear sea caldo MRS. El escalamiento de la cepa permitió obtener una biomasa seca con una concentración celular viable de  $2,37 \pm 0,03 \times 10^{14} \text{ UFC/g}$ , lo cual representa una concentración alta respecto a los requerimientos mínimos de la FAO de  $1,0 \times 10^7 \text{ UFC/g}$  de biomasa seca.

Además, se realizaron ensayos *in vitro* para cuantificar la producción de ácidos grasos de cadena corta por fermentación de fructanos en un medio colónico simulado, empleando cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, donde se utilizó la glucosa como control positivo y un medio sin fuente de carbono como control negativo, evaluando su viabilidad en dicho medio. Se obtuvo un incremento de las UFC/ml viable respecto del inóculo inicial a las 24 horas en inulina de  $14,44 \pm 1,57 \%$ , en FOS de  $9,80 \pm 0,01 \%$ , glucosa de  $82,57 \pm 2,65 \%$ , para el control negativo de  $5,38 \pm 0,8$  para lo cual un test ANOVA dio detalles del nivel de significancia, en el cual existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) cuando se sustituyó la fuente de carbono a una concentración de 10 g/L para cada fuente de carbono; para una concentración de carbohidratos de 30 g/L la viabilidad de la cepa en glucosa fue de  $81,07 \pm 1,01 \%$ , inulina de  $16,22 \pm 1,34 \%$ , FOS de  $6,53 \pm 1,32 \%$  y en el control negativo de  $8,62 \pm 0,67 \%$ , para el cual existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la viabilidad y el recuento bacteriano cuando se sustituye la fuente de carbono. La cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en el medio colónico simulado se obtuvo



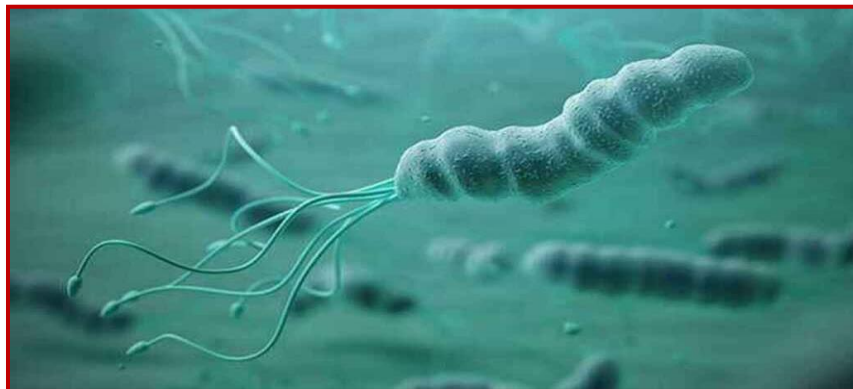
para el único ácido graso identificado, ácido acético, un valor de  $5,16 \pm 0,60 \mu\text{mol/mL}$  y  $27,60 \pm 3,43 \mu\text{mol/mL}$ , cuando la fuente de carbono es la glucosa en el medio colónico simulado a una concentración de 10 g/L y 30 g/L, respectivamente.

Los resultados obtenidos permiten establecer las condiciones a las cuales se podrá obtener biomasa con alta viabilidad para *L. fermentum* UCO-979C, además, la producción de ácido acético por parte de esta cepa podría favorecer la homeostasis intestinal, ejerciendo un efecto inmunomodulador que podrían asociarse a diversos efectos benéficos a la salud en general, puesto que *L. fermentum* UCO-979C es un microorganismo probiótico que produce ácido acético en cantidades importantes, lo que la convierte en una cepa de gran relevancia.

## 1.0. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes generales sobre *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es una bacteria espiral Gram negativa, microaerófila que infecta el estómago humano [01], de 0,3 a 3,5  $\mu\text{m}$  de tamaño, muy móvil gracias a dos a seis flagelos monopolares [02]. Estos flagelos facilitan la motilidad de *H. pylori* a través del tracto gastrointestinal, los que se consideran un factor de virulencia, más correctamente un factor de colonización [03]. Estudios han demostrado que el grado de motilidad de las cepas de *H. pylori* se correlaciona con el grado de infectividad en lechones gnotobióticos [04]. La cepa más móvil fue la más exitosa, con una tasa de infección del 100 %, mientras que la menos móvil, tuvo una tasa de infección de solo el 17%. La bacteria coloniza selectivamente el epitelio gástrico de aproximadamente el 50% de la población y la evidencia sugiere que los humanos han estado infectados con *H. pylori* durante al menos 88.000 años [05]. En la mayoría de los individuos infectados, la colonización provoca gastritis crónica, pero no provoca síntomas ni complicaciones de la enfermedad. Sin embargo, aproximadamente el 10 % de las personas infectadas desarrollarán enfermedad de úlcera péptica y < 1 % desarrollarán cánceres gástricos, incluido el linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) y el adenocarcinoma gástrico [06].

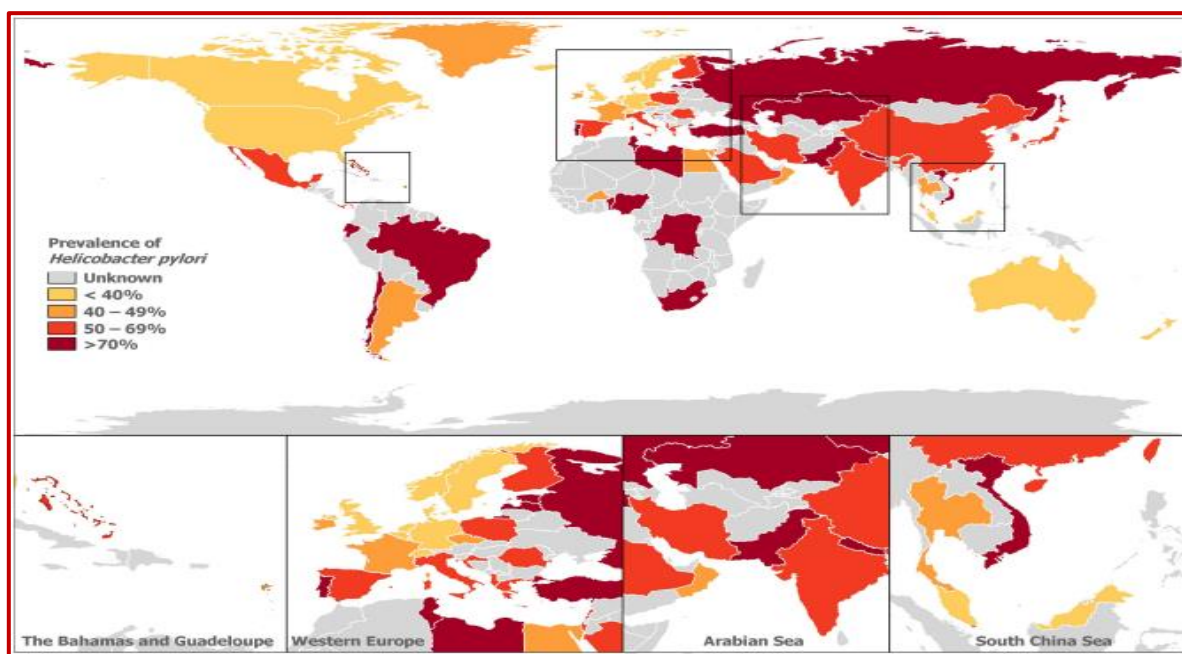


**Figura 1.** *H. pylori* tiene flagelos que le facilitan su movilidad a través del epitelio gástrico [07].

## 1.2.Epidemiologia

*H. pylori* es uno de los patógenos bacterianos más comunes en humanos y se estima que infecta a 4400 millones de personas en todo el mundo [01]. La prevalencia es más elevada en países en vías de desarrollo socioeconómicos (50.8%) que en los más desarrollados (34.7%). Los estudios epidemiológicos de *H. pylori* demuestran que el hombre es el huésped natural de este microorganismo, siendo junto con el agua, los principales reservorios de la infección. El agua, contaminada con restos fecales humanos, es el vector de la infección por *H. pylori* en los países en vías de desarrollo con malas condiciones sanitarias. Sin embargo, la vía de transmisión más frecuente de la infección por *H. pylori* en los países desarrollados es la persona a persona (vía fecal-oral, oral-oral o gástrica-oral) [08].

Hooi *et al.* 2017[09], realizaron una revisión sistemática y un metaanálisis para evaluar los cambios en la prevalencia mundial de la infección por *H. pylori*, la figura 02 contiene los datos relevantes de este metaanálisis, donde se incluyeron un total de 184 artículos (11 de África, 75 de Asia, 66 de Europa, 13 de América Latina y el Caribe, 13 de América del Norte y 6 de Oceanía), informando su prevalencia en 62 países con 257.768 (48,5%) participantes que dieron positivo para esta bacteria, de un total de 531.880 participantes.



**Figura 2.** Prevalencia mundial de *H. pylori* [09].

Las regiones con la prevalencia de *H. pylori* informada más alta fueron África (70,1 %), América del Sur (69,4 %) y Asia occidental (66,6 %). Las regiones con la prevalencia más baja notificada fueron Oceanía (24,4 %), Europa Occidental (34,3 %) y América del Norte (37,1 %) [09].

### **1.3. Patogenicidad**

La interacción entre las cepas de *H. pylori* y la diversidad compleja de la microbiota gástrica es una de las causas probables para ser identificado como un factor de riesgo. La mayoría de las cepas de *H. pylori* pueden modificar el entorno gástrico y, por lo tanto, afectar el hábitat de las bacterias residentes para aumentar el riesgo de carcinogenicidad gástrica [10]. Cuando *H. pylori* está presente en el estómago, constantemente hay un infiltrado inflamatorio de linfocitos y polimorfos, especialmente en el antro. Comienza con una gastritis aguda, que generalmente no se reconoce clínicamente, similar a una gastroenteritis, y evolucionando a una gastritis crónica que puede durar toda la vida. Esta gastritis tiene consecuencias sobre la morfología de la mucosa gástrica, pudiendo dar lugar a condiciones premalignas y malignas y también sobre la fisiología del estómago, la pérdida de los componentes glandulares conduce a una reducción de la secreción ácida con consecuencias como un mayor riesgo de infección entérica y reducción de la absorción de hierro y vitamina B12 [02].

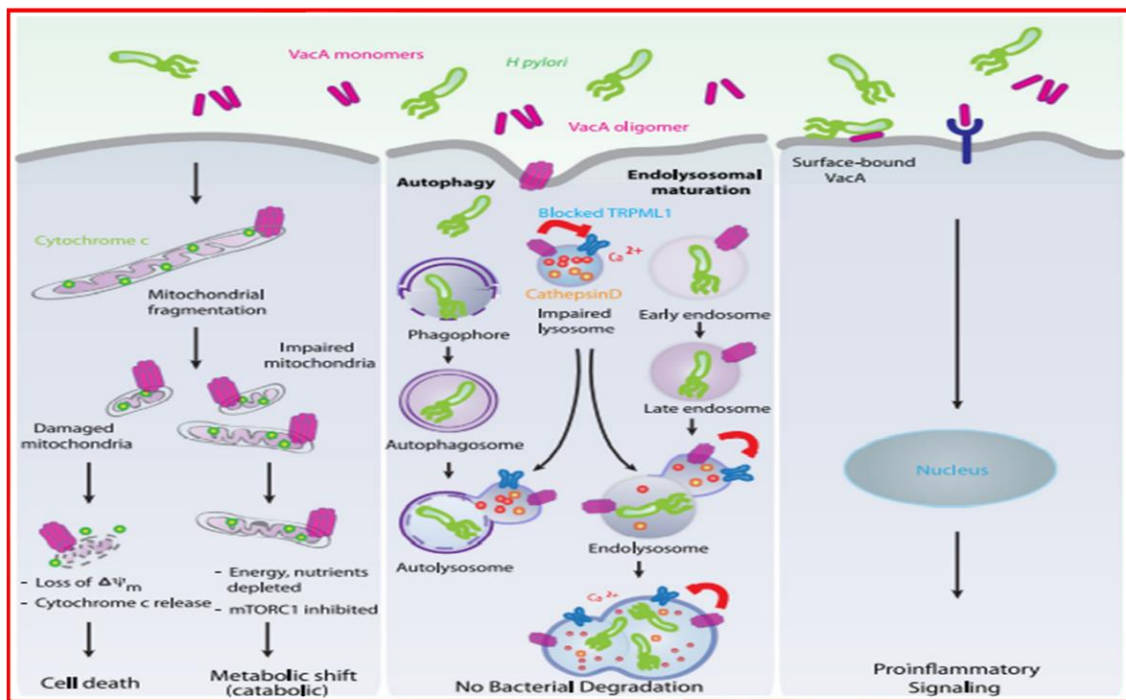
### **1.4. Factores de colonización**

Cuando *H. pylori* llega al estómago, su ureasa producida en grandes cantidades permite la producción de amoníaco que amortigua su microambiente, protegiéndolo de la acidez gástrica. Su morfología en espiral y sus flagelos le permiten primero escapar del alto contenido de ácido de la luz del estómago y luego moverse en el moco gástrico y llegar a la capa de células gástricas donde puede unirse mediante adhesinas específicas [02]. La urea, el sustrato de la enzima ureasa, después de entrar en la membrana externa a través de las porinas, puede difundirse pasivamente a través de la membrana interna bacteriana y tras la exposición de *H. pylori* a una acidez alta, la entrada de urea se vuelve más rápida. La urea es hidrolizada por la ureasa dando como resultado la producción de amoníaco (NH<sub>3</sub>) y carbamato. El carbamato se descompone espontáneamente para dar amoníaco (NH<sub>3</sub>) y ácido carbónico, el ácido carbónico se descompone en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O [11].

## 1.5. Factores del daño tisular

### 1.5.1. Citotoxina A Vacuolizante (VacA)

VacA es una toxina multifuncional secretada por *H. pylori* (Fig. 03) que se oligomeriza en la membrana de la célula huésped y forma un canal de iones selectivo de cloruro, que se internaliza y se transporta a los lisosomas. Allí altera la maduración lisosomal, causando lisosomas agrandados [12], lo que da como resultado la formación de vacuolas agrandadas en las que las bacterias pueden sobrevivir y evadir la terapia antimicrobiana [13]. Como resultado de la maduración interrumpida del lisosoma, también se interrumpe la autofagia, una vía de degradación celular. A través de un mecanismo desconocido, VacA también se dirige a las mitocondrias donde provoca fragmentación mitocondrial, reducción de los niveles celulares de ATP, permeabilidad de la membrana externa y liberación de citocromo c, lo que en última instancia puede conducir a la muerte celular [14].

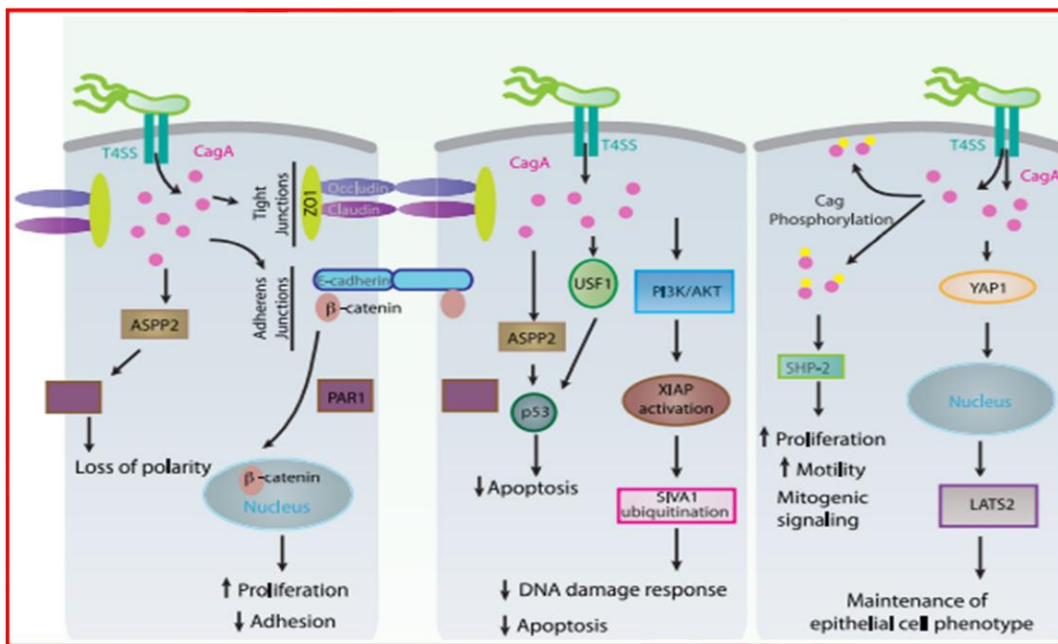


**Figura 3.** Efectos de VacA sobre las células epiteliales del huésped. La VacA secretada ingresa a las células huésped, donde causa una disfunción mitocondrial que conduce a la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c, lo que lleva a la muerte celular por apoptosis. La VacA intracelular también afecta la actividad del

canal de calcio lisosomal, TRPML1, y provoca la formación de lisosomas no funcionales, que no degradan las bacterias intracelulares que son el objetivo de la autofagia o del tráfico endocítico. VacA unido a la superficie también puede desencadenar respuestas inmunitarias proinflamatorias. Tomado desde Jaehoon Cho & col, 2021 [12].

### 1.5.2. Proteína CagA (Gen A Asociado a la citotoxina)

La secuenciación de los genomas bacterianos ha mostrado la presencia de islas genómicas, algunas de las cuales juegan un papel en la patogenicidad. El gen *cagA* se encuentra en el segmento de ADN conocido como isla de patogenicidad *cag*. La *cag* PAI codifica para un sistema de secreción de tipo IV, que es una jeringa molecular que traslada CagA a las células huésped [15]. En el citoplasma, CagA es fosforilada por quinasas celulares en residuos de tirosina y se une a la fosfatasa SHP2, lo que tiene consecuencias importantes en la señalización celular correspondientes a una transición epitelio-mesenquimatoso (EMT) con proliferación y cambios en el citoesqueleto [02].



**Figura 4.** Efectos de CagA sobre las células epiteliales del huésped. La actividad de CagA interfiere con las vías de la célula huésped que regulan la morfología celular, la proliferación, la polaridad celular y la apoptosis. Tomado desde Jaehoon Cho & col, 2021 [12].

CagA puede variar de tamaño entre las distintas cepas de *H. pylori*. Esta variación proviene de la presencia de un número de repeticiones de la secuencia Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala, llamado “EPIYA”. Las cepas con dichas repeticiones (EPIYA) son menos resistentes al ácido gástrico lo que conlleva, a que puedan sobrevivir en presencia de gastritis atrófica avanzada, en la que la secreción de ácido es baja [16].

### **1.5.3. Gen promotor de la Úlcera Duodenal (*dupA*)**

El gen promotor de la úlcera duodenal (*dupA*) se encuentra en la región de plasticidad del genoma de *H. pylori*. La prevalencia de este gen fue significativamente mayor en las cepas de pacientes con úlcera duodenal que en las de pacientes con gastritis o cáncer gástrico. El papel de *dupA* en la supervivencia del ácido es relevante, aunque aún se desconoce el mecanismo [17, 18].

### **1.6. Enfermedades asociadas a *H. pylori***

Aunque la mayoría de los individuos infectados no desarrollan secuelas clínicas obvias, se desarrollan úlceras pépticas en alrededor del 10% de los individuos infectados, y las neoplasias gástricas finalmente resultan del 1% al 2% de las infecciones, generalmente como consecuencia de una secuencia lentamente progresiva de cambios preneoplásicos de la mucosa gástrica marcados por gastritis atrófica, metaplasia intestinal y displasia [12]. La gastritis crónica es una afección inflamatoria de la mucosa gástrica que puede afectar diferentes regiones del estómago y presentar diversos grados de daño de la mucosa. La presencia de *H. pylori* en el estómago siempre se asocia con daño tisular y hallazgos histológicos de gastritis activa y crónica [19, 20]. En pacientes con úlceras duodenales, la fisiopatología subyacente involucra a *H. pylori* que inhibe la secreción de somatostatina antral gástrica, lo que conduce a una mayor liberación de gastrina, la hormona estimulante del ácido, y la subsiguiente hipersecreción ácida [12]. Según estudios epidemiológicos, se estima que el 90 % de los adenocarcinomas gástricos están relacionados con la infección por *H. pylori*, y el 10 % restante se debe al virus de Epstein Barr (EBV). Esta estimación se confirmó cuando se estudió el enfoque mecanicista de la carcinogénesis. Después de entrar en el citoplasma de las células epiteliales gástricas, se fosforila en motivos que contienen las

secuencias “EPIYA” y comienza una cadena de eventos moleculares relacionados con la carcinogénesis [21].

## **1.7. Tratamientos convencionales contra *H. pylori***

### **1.7.1. Terapia triple**

La terapia triple con IBP (Inhibidor de la bomba de protones) se refiere al uso de éste y dos antibióticos contra la infección por *H. pylori* durante 7-14 días. Los antibióticos utilizados son generalmente amoxicilina, claritromicina, metronidazol y levofloxacina. La terapia triple con suficiente duración del tratamiento sigue siendo efectiva en algunas áreas con baja resistencia a los medicamento [22]. las guías internacionales recomiendan que solo en áreas con baja resistencia a la claritromicina (<15%), se pueda usar IBP, ampicilina y claritromicina como tratamiento de primera línea para *H. pylori* por 14 días [23].

### **1.7.2. Terapia cuádruple no bismuto**

La terapia cuádruple no bismuto, que consiste en el tratamiento con un IBP y tres antibióticos (claritromicina, amoxicilina y nitroimidazol) durante 10-14 días, fue diseñada para resolver el problema de la resistencia a los medicamentos. Hay tres tipos de terapia cuádruple no bismuto, es decir, terapia secuencial, terapia concomitante y terapia híbrida. Tanto la eficacia terapéutica de estos tratamientos como el papel destacado de aliviar la resistencia a los antibióticos en el tratamiento de *H. pylori* han sido ampliamente cuestionados. Además, la terapia cuádruple generalmente tiene algunas desventajas, como la administración intrincada, muchos efectos secundarios, alto costo y mal cumplimiento del paciente [22].

### **1.7.3. Terapia BCQT**

Las guías internacionales recomiendan el uso de BCQT que consiste en IBP, sal de bismuto, tetraciclina y nitroimidazol durante 10-14 días en áreas con alta resistencia a claritromicina y metronidazol. En los últimos años, BCQT ha desempeñado un papel cada vez más importante en la terapia de primera línea porque su eficacia no se ve afectada por la resistencia a la claritromicina, el metronidazol y la levofloxacina, incluso la doble resistencia a la claritromicina y el metronidazol no afectó la tasa de erradicación. Sin embargo, este régimen también tiene sus limitaciones. En primer lugar, están los problemas comunes de la



terapia cuádruple (como la complejidad y el cumplimiento deficiente) y, en segundo lugar, la tetraciclina no está ampliamente disponible en muchas áreas [22].

#### **1.7.4. Probióticos contra *H. pylori***

Los probióticos son organismos vivos que se administran por vía oral para conferir un beneficio para la salud del huésped. En los últimos años la aplicación de probióticos en el tratamiento de la infección por *H. pylori* se ha convertido en un campo de investigación activo [24]. Ciertas cepas de *Lactobacillus*, como *L. johnsonii* MH-68 [25], *L. rhamnosus* GG [26], *L. fermentum* UCO-979C [27] y *L. acidophilus* GMNL-185 [28], poseen actividad antagonista específica de cepa contra *H. pylori*.

#### **1.8. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C**

*Lactobacillus fermentum* UCO-979C fue aislada a partir de una biopsia gástrica humana en el año 2007, para ello se incluyeron 197 pacientes chilenos mayores de 15 años, con indicaciones endoscópicas digestivas altas, para lo cual se tomaron dos biopsias gástricas, logrando aislar 48 cepas a partir del homogenizado gástrico, dentro de ellas *L. fermentum* UCO-979C [27]. La secuenciación del genoma de *L. fermentum* UCO-979C encontró un gen que codifica una proteína de unión al colágeno (CBP, siglas en inglés), la cual muestra un nivel alto de similitud de secuencia de aminoácidos con un CBP de *Lactobacillus casei*, el cual también es homólogo al CBP de *Lactobacillus fermentum* 3872, también se encontró un gen que codifica una proteína A de unión a fibronectina idéntica a la de *Lactobacillus fermentum* NB-2, además, encontraron tres contigs con un tamaño total de 40 kb que revelan similitudes significativas con los plásmidos en la cepa UCO-979C, en particular, un conting de 16,7 kb mostró identidad del 96% (cobertura del 51%) a un plásmido de *Lactobacillus salivarius* UCC118 [29].

##### **1.8.1. Caracterización probiótica de la cepa *L. fermentum* UCO-979C**

Según lo descrito por Chaudhari J & col [13], la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP, siglas en inglés), para considerar una cepa probiótica como segura, necesita evaluarse bajo los siguientes criterios: a) Identificación de géneros, especies y cepas, b) ensayos *in vitro* para evaluar tolerancia al ácido gástrico y ácido biliar, c) actividad

antimicrobiana contra bacterias patógenas, d) capacidad de inhibir la adherencia del patógeno a la superficie y poseer capacidad hidrolasa de sales biliares, e) estudios de seguridad *in vivo* en modelos animales, f) estudios de eficiencia *in vivo* en modelos animales, g) evaluar la sensibilidad a antibióticos. Por lo que *L. fermentum* UCO-979C fue sometida a diversos ensayos *in vivo* e *in vitro*, de esta forma poder establecer las condiciones suficientes para ser considerado como un probiótico [27].

En un estudio de caracterización de la cepa como potencial probiótico permitió establecer dichas características, por lo que García A. & col. [27], realizaron ensayos *in vitro* para evaluar la tolerancia de la cepa bajo condiciones ácidas y exposición a sales biliares, para ello; la resistencia a condiciones ácidas, utilizaron caldo MRS y ajustaron el pH entre 2 o 3, para evaluar la tolerancia a sales biliares en caldo MRS agregaron la sal a una concentración de 1,5 o 2,0% y confirmaron la viabilidad de la cepa por recuento en placa mediante el ensayo de la microgota a las 24 horas, para lo cual obtuvieron un recuento viable de  $4,5 \times 10^6$  UFC/ml y  $2,6 \times 10^7$  UFC/ml, respectivamente; estos resultados confirmaron la resistencia de la cepa bajo condiciones de estrés osmóticos. Además, la cepa mostró alta hidrofobicidad y agregación salina positiva y una alta capacidad de adherencia al vidrio en comparación con las cepas control, lo que confirma la capacidad de adhesión celular de la cepa.

En este mismo estudio [27], se evaluó la seguridad de la cepa, determinando la resistencia a antibióticos, la expusieron a 19 antibióticos, mostrando susceptibilidad a 18 de ellos, con la excepción de la bencilpenicilina, lo que sugirió que esta cepa no albergaba plásmidos de resistencia. Además, *L. fermentum* UCO-979C no mostró  $\alpha$ -hemólisis en ensayos de agar sangre, lo que indica que no es una cepa  $\beta$ -hemolítica, también, evaluaron la producción de aminas biógenas, para lo cual compararon la producción de estas aminas con una cepa control de *L. casei* Shirota, para el cual, no encontraron diferencias significativas en el contenido total de las aminas entre la cepa Shirota y UCO-979C.

Para evaluar la actividad bactericida de la cepa, García A. & col. [27], realizaron ensayos *in vitro* contra el patógeno *H. pylori* (cepas de referencia *H. pylori* J99, ATCC43504 y G27) en agar Columbia suplementado con sangre de caballo defibrinada al 5%, donde realizaron pozos de 6 mm y se depositó inóculos de *L. fermentum* UCO-979C, donde la cepa mostró una actividad mayor que las cepas control, obteniendo zonas de inhibición entre 5-6 mm, por

lo que bajo el criterio de Gaudana presentó características de fuerte a muy fuerte de inhibición sobre las cepas de referencia de *H. pylori* (ATCC43504, J99, G27). Además, evaluaron la actividad ureasa de *H. pylori* ATCC43504, donde mostró una fuerte inhibición cuando se expuso al patógeno frente al sobrenadante del caldo libre de células de *L. fermentum* UCO-979C, demostrando la capacidad de producir compuestos bactericidas. La capacidad de la cepa para inhibir la adhesión de *H. pylori* lo evaluaron en células AGS, por lo que concluyeron que la inhibición de adhesión se veía favorecida a medida que aumentaba la concentración celular de *L. fermentum* UCO-979C en la dosis. Los ensayos de colonización *in vivo* lo realizaron en jerbos mongoles, para lo cual, confirmaron adherencia a la mucosa gástrica por recuento bacteriano en el antro pilórico y el cuerpo de los estómagos de estos. En este estudio <sup>[27]</sup> se concluyó que la cepa probiótica presenta características importantes para ser considerado como probiótico, además, presentó particularidades importantes para inhibir o prevenir la infección por *H. pylori*.

### **1.8.2. Capacidad inmunomoduladora de *L. fermentum* UCO-979C**

Otros estudios han proporcionado características inmunomoduladoras relevantes, García V. & col [31] demostraron la capacidad de *L. fermentum* UCO-979C para modular diferencialmente la respuesta de citoquinas de células epiteliales gástricas y los macrófagos después de la infección por *H. pylori*, logrando reducir significativamente la producción de citoquinas inflamatorias y quimiocinas en las células AGS y THP-1, además, se vio aumentada la producción de citoquinas inmunorreguladoras, presentando un notable efecto antiinflamatorio. Otro estudio *in vivo* e *in vitro* [32], lograron demostrar las capacidad inmunomoduladora de *L. fermentum* UCO-979C, en el cual expusieron la capacidad de desencadenar la respuesta inmune de células epiteliales intestinales por la activación del receptor tipo Toll 4 (TLR4) a través de la modulación de la expresión de los reguladores negativos de TRL. En este mismo estudio, ensayos *in vivo* con ratones, demostraron la capacidad de la cepa para aumentar significativamente la producción de IFN- $\gamma$  intestinal, estimuló los macrófagos intestinales y peritoneales, además, aumentó la interleuquina 6 (IL-6). Estos resultados demostraron la capacidad de la cepa para regular diferencialmente las respuestas inmunes contra patógenos gástricos intestinales [31]. Los ensayos *in vivo* en modelos animales han demostrado la capacidad de *L. fermentum* UCO-979C para inhibir la colonización de *H. pylori* en el epitelio gástrico, por ejemplo; Merino J. & col. [33] evaluaron

la capacidad de *L. fermentum* UCO-979C para inhibir la colonización de la cepa *H. pylori* SS1 en *Meriones unguiculatus*, los resultados mostraron la capacidad de la cepa probiótica para inhibir la colonización de *H. pylori* en el antro intestinal, disminuyendo hasta en un 87% la colonización del patógeno en esa región.

### **1.8.3. Alternativa funcional para transferencia tecnológica de *L. fermentum* UCO-979C**

Las características anteriormente mencionadas proporcionan evidencia científica importante para considerar a *L. fermentum* UCO-979C como una cepa probiótica con características relevantes para promover la transferencia tecnológica desde el matraz (*in vitro*) a producir un alimento funcional, que presente características inmunobióticas que promuevan una respuesta inmune favorable frente al patógeno *H. pylori* y estimule la producción de citoquinas inmunorreguladoras. Un ensayo *in vitro*, Gutiérrez C. & col [34] demostraron que al encapsular la cepa probiótica *L. fermentum* UCO-979C en carragenina, para ser evaluada bajo condiciones gástricas simuladas contra *H. pylori* SS1, presenta un efecto sinérgico entre la cepa probiótica y el polímero de encapsulación al ser administrada bajo condiciones de ayuno, ya que no detectaron *H. pylori* entre las 1,5 a 2,5 horas de ensayo. En otro estudio evaluaron la capacidad *anti-H. pylori* e inmunomoduladora de esta cepa, además de la viabilidad, cuando ella se incorporaba en helados lácteos o en helados de frutas con base acuosa, en éstos la cepa mantuvo una fuerte actividad *anti-H. pylori* de la cepa probiótica aislada desde los helados de bases lácteas y una actividad leve para aquellas cepas que fueron aisladas desde helados de frutas con base acuosa, ya que las cepas aisladas desde helados de base láctea produjo en mayor cantidad citoquinas proinflamatorias TGF- $\beta_1$ ; además, incorporar la cepa al producto no modificó sus propiedades fisicoquímicas [35]. En un ensayo aleatorizado doble ciego controlado por un placebo realizado por Parra C. & col [36] administraron gelatina suplementada con *L. fermentum* UCO-979C una vez al día, cinco días a la semana, durante 12 semanas consecutivas a los distintos individuos involucrados en el estudio, demostraron que se evitó la infección por *H. pylori*, con una eficacia del 92,6% en individuos no infectados.

La importancia de lograr la transferencia desde ensayos *in vitro* hasta la producción de biomasa bacteriana, con interés industrial *L. fermentum* UCO-979C muestra relevancia por

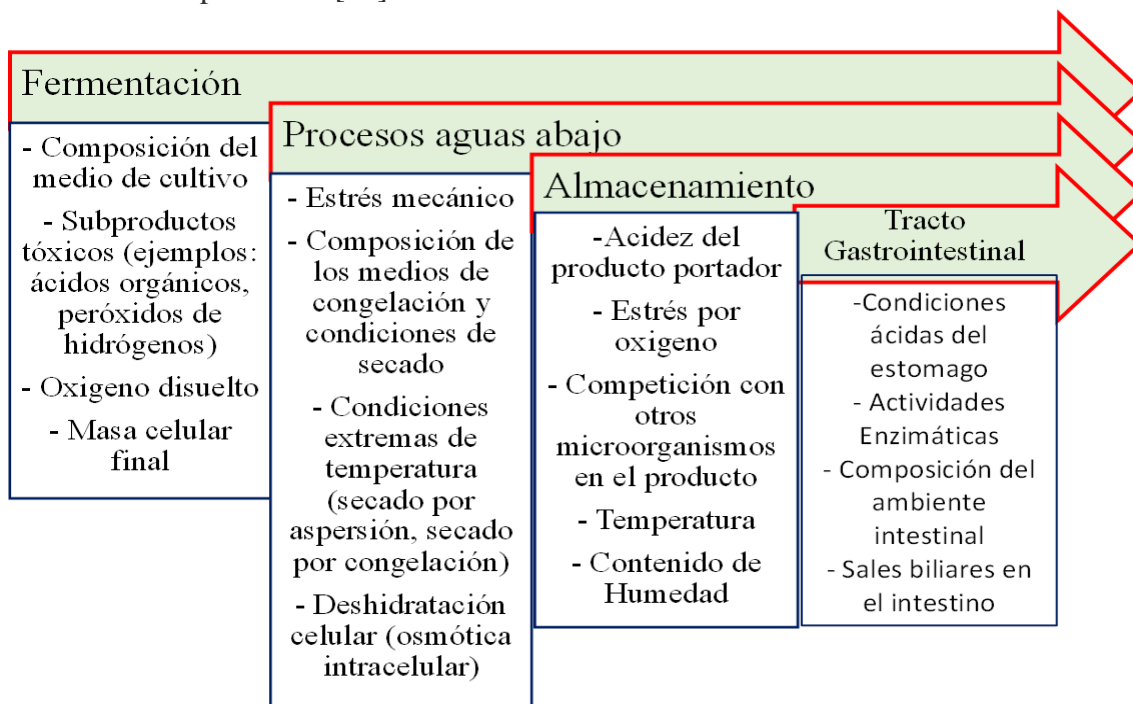
la cantidad de respaldos que existen sobre esta cepa, bajo este interés, Aguilera C. [37] realizó ensayos *in vitro* para establecer parámetros cinéticos de *L. fermentum* UCO-979C, los cuales cobran importancia cuando se consideran establecer diseños de escalamientos con interés industrial, pero el modelo cinético empleado en este estudio, no estaba descrito en función de algún reactivo limitante o producto de la fermentación, por lo que las estimaciones por este modelo se ven sobre estimadas debido a que se asume que el medio de cultivo contiene los nutrientes necesarios y en cantidades suficientes para mantener el crecimiento de la cepa bajo las condiciones evaluadas, y que solo se ve afectado por factores netamente experimentales, tales como: temperatura, pH del medio, velocidad de agitación, adaptación al medio de cultivo entre otros; situación que es contraria a las condiciones reales. Bajo estas condiciones, obtuvo un recuento máximo de UFC/ml de la cepa de  $2,20 \pm 0,23 \times 10^9$  a las 24 horas de ensayo, una fase de adaptación de 6 horas y el final de la fase exponencial de 12 horas, en caldo MRS, por lo que la velocidad máxima de crecimiento fue  $0,715 \text{ h}^{-1}$ , lo cual representa una velocidad sobre estimada, debido a que no representa las condiciones observadas de crecimiento, es decir, el cálculo de tiempo de duplicación es de 0,97 h, y un tiempo de adaptación de 1,02 h, contrario a lo observado experimentalmente.

### **1.9. Desafíos y estrategias para la producción de cepas probióticas**

Dado que los probióticos son muy sensibles a muchos factores ambientales y que la propagación de muchas cepas de origen intestinal no es sencilla, la mayoría de las cepas comerciales se seleccionan en función de sus propiedades tecnológicas, descartando algunas cepas con propiedades prometedoras para la salud. Hasta la fecha, la producción de probióticos se ha llevado a cabo casi exclusivamente mediante fermentación por lotes convencional y cultivos suspendidos, en algunos casos combinados con el uso de estrés subletal para mejorar la viabilidad celular, la adición de protectores o microencapsulación para brindar protección celular. Además, un probiótico debe exhibir altas tasas de supervivencia en los procesos posteriores (como la centrifugación y el secado) y en los productos alimenticios durante el almacenamiento [38].

También son requisitos una alta supervivencia a través del tracto gastrointestinal superior y una alta viabilidad en su sitio de acción, junto con una alta actividad en el medio intestinal. Aunque la cantidad de células necesarias para producir beneficios terapéuticos no

se conoce y puede variar en función de la cepa y el efecto sobre la salud deseado, en general se acepta un nivel mínimo de más de  $10^7$  bacterias probióticas viables por mililitro o gramo de producto alimenticio. Actualmente, las cepas comerciales se seleccionan en gran medida por sus propiedades tecnológicas, descartando algunas cepas con propiedades saludables prometedoras. En consecuencia, la demanda industrial de nuevas tecnologías que permitan un alto rendimiento celular a gran escala y aseguren la estabilidad de los probióticos en los alimentos sigue siendo fuerte, porque muchas cepas de origen intestinal son difíciles de propagar y una alta supervivencia es importante tanto por razones económicas como por efectos en la salud, la figura 05 contiene alguno de los factores que afectan la viabilidad de las cepas probióticas. Además, tecnologías más eficientes podrían conducir a una mayor eficacia del producto y diversificación de cepas con el desarrollo de cepas tecnológicamente adecuadas en productos [38].



**Figura 5.** Factores principales que afectan la viabilidad de las cepas probióticas en las diversas etapas de procesamiento, almacenamiento y producto final. Extraído y adaptado de: Lacroix C, Yildirim S, 2007 [38].

Las condiciones óptimas de temperatura y pH dan como resultado una alta producción de biomasa. Sin embargo, el uso de una temperatura o un pH de crecimiento por debajo o por

encima del nivel óptimo pueden ser relevante para producir células que muestren una mejor tasa de supervivencia durante el procesamiento, el almacenamiento y la digestión aguas abajo. Otro factor importante es el medio de cultivo, muchos lactobacilos y bifidobacterias probióticos comerciales son de origen humano o animal y poseen requisitos nutricionales complejo. Medios complejos ricos como de Man Rogosa y Sharpe (MRS), medio de clostridium reforzado (RCM) y caldo de extracto de levadura tripticasa fitona (TPY) se utilizan generalmente para producir biomasas de bifidobacterias y lactobacilos a pequeña escala [39].

La eficiencia de las aplicaciones comerciales de productos probióticos de múltiples cepas depende en gran medida del tipo de cepas utilizadas y del número de células bacterianas viables (UFC/ml o g) posteriores a la producción. Por lo tanto, es imperativo evaluar que las cepas utilizadas tengan alta productividad, concentración de esporas y sean fáciles de recuperar durante el proceso de cosecha. Esencialmente, el conteo de esporas para cada cepa individual debe exceder  $1 \times 10^{10}$  esporas por dosis. Esto es necesario para compensar la pérdida de recuento de células viables durante las actividades posteriores y el desarrollo del producto. Además, los métodos de recolección de probióticos de múltiples cepas deben ser lo suficientemente eficientes para garantizar que se recupere más del 80 % de las esporas viables [39].

En esta etapa de producción cobra relevancia el modelamiento cinético de las cepas bacterianas, que permita establecer las relaciones de productos y sustratos, que facilite la comprensión de cómo las variables de operación afectan dichos parámetros, por lo que; el uso de modelos empíricos matemáticos permiten hacer estimaciones aproximadas de los parámetros cinéticos relevantes, como: la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{máx.}}$ ), el tiempo de duplicación celular, el tiempo de adaptación celular ( $\lambda$ ) a las condiciones del medio de cultivo, la fase exponencial, el rendimiento de biomasa respecto al consumo de reactivo limitante, entre otros. La tabla 01 contiene algunos modelos matemáticos que permiten ajustar las curvas de crecimiento bacteriano [40], pero, considerar que algunos modelos presentan limitaciones, como por ejemplo; consideran que en el medio de cultivo no existen reactivos o sustratos que limiten el crecimiento, que las condiciones ambientales afectan de forma unidireccional la fermentación, es decir, la temperatura, pH y medio enriquecido

afectan solo el crecimiento de la cepa, más no la producción de metabolitos o procesos metabólicos. Existen modelos, como el de Monod [41], que describe el crecimiento microbiano en función de un reactivo limitante o en base a la producción de metabolitos en el medio de cultivo, lo que permite relacionar los procesos metabólicos de las cepas con la condiciones ambientales, las limitaciones de disponibilidad de sustrato y los procesos de inhibición por la producción de metabolitos a partir de éstos.

**Tabla 1.** Modelos matemáticos empleados para describir la cinética de crecimiento de cepas bacterianas.

Modelo	Ecuación
Logístico	$Y = \frac{A}{(1 + e^{(b-c*T)})}$
Logístico modificado	$Y = \frac{A}{(1 + e^{(\frac{4*U_m*(\lambda-T)+2}{A})})}$
Gomperzt	$Y = A * Exp(-Exp(B - C * T))$
Gomperzt modificado	$Y = A * Exp\left(-Exp\left(\left(\frac{U_m * e}{A} * (\lambda - T) + 1\right)\right)\right)$
Richards	$Y = a * (1 + V * Exp(K * (\lambda - T)))^{-\frac{1}{V}}$
Richards Modificado	$Y = A * \left(1 + V * Exp(1 + V) * Exp\left(\frac{U_m}{A} * (1 + V) * \left(1 + \frac{1}{V}\right) * (\lambda - T)\right)\right)^{\left(\frac{-1}{V}\right)}$
Stannard	$Y = a * \left(1 + Exp\left(-\frac{(1 + K * T)}{P}\right)\right)^P$
Stannard Modificado	$Y = A * \left(1 + V * Exp(1 + V) * Exp\left(\frac{U_m}{A} * (1 + V) * \left(1 + \frac{1}{V}\right) * (\lambda - T)\right)\right)^{\left(\frac{-1}{V}\right)}$
Schnute	$Y = \left(y1^b + (y2^b - y1^b) * \frac{1 - Exp(-a * (T - r_1))}{1 - Exp(-a * (r_2 - r_1))}\right)^{\frac{1}{b}}$
Schnute Modificado	$Y = \left(U_m * \frac{(1 - b)}{a}\right) * \left(\frac{1 - b * Exp(a * \lambda + 1 - b - a * T)}{1 - b}\right)^{\frac{1}{b}}$



---

**Monod**

$$r = \mu * C_B = \mu_{m\acute{a}x} * \frac{C_S}{K_S + C_S} * C_B$$

**Dónde:**  $\mu_m$ = Velocidad máxima de crecimiento (h<sup>-1</sup>),  $\lambda$ = tiempo de adaptación celular,  $A = \log_{10}(N_i/N_o)$ ,  $N_i$ = concentración celular en el momento  $i$ ,  $N_o$ = Concentración celular al inicio,  $a, b, c, v$  son parámetros de ajustes,  $T$ = tiempo en horas.  $C_s$ = Concentración de sustrato (g/L),  $C_B$ = Concentración de biomasa (g/L),  $K_s$ = Constante de Monod (g/L).

### 1.10. Simulaciones gástricas

La evaluación del metabolismo microbiano generalmente se aborda midiendo los contenidos de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y amonio. En general, la producción neta de AGCC hasta la estabilidad funcional es más alta en el compartimento del colon ascendente en correspondencia con las condiciones de exceso de carbohidratos, aunque el contenido total se acumula en los compartimentos distales debido a la falta de pasos de absorción [42].

Los ensayos *in vitro* ofrecen las capacidades necesarias, pero no suficientes para establecer relaciones simbióticas de las cepas probióticas con el entorno gástrico, aportando información relevante que permiten evaluar diversos entornos simulados del tracto intestinal, con el fin de aportar evidencias inmunomoduladoras, producción de metabolitos importantes que regulan o inhiben ciertos procesos inflamatorios, como los AGCC. En este estudio, se evaluó la capacidad de la cepa de producir AGCC en un entorno colónico simulado por fermentación de fructanos, lo que aporta evidencia sobre las capacidades metabólicas de la cepa frente a carbohidratos no digeribles en el estómago. Considerando que los modelos del colon aún no están tan desarrollados, principalmente debido a la dificultad causada por la necesidad de considerar el efecto mecánico, la absorción de agua y nutrientes y el proceso microbiano mixto anaeróbico semisólido de alta densidad que ocurre dentro de sus límites [43]. La tabla 02 contiene algunos modelos *in vitro* que se han utilizado para evaluar el metabolismo de carbohidratos para cuantificar AGCC a partir de cepas bacterianas y estudiar de forma aproximada aportes benéficos por el metabolismo celular de la microbiota presente.

**Tabla 2.** Modelos de fermentación *in vitro* para la evaluar los principales metabolitos producidos durante la fermentación detallando las principales condiciones de operación.

Etapa gástrica simulada	Modelo empleado	Inóculo	Composición del medio	Condiciones fisicoquímicas de operación	Analitos de interés en el medio de fermentación	Referencia
Colon proximal	Fermentación de cultivo por lotes anaeróbicos controlado por pH	Microbiota fecal humana (10% p/v)	2 g/L de peptona , 2 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de NaHCO <sub>3</sub> , 2 ml/L de Tween 80, 0,5 g/L de sales biliares, 0,1 g/L de NaCl, 0,04 g/L de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,04 g/L de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,01 g/L MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0,01 g/L de CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 0,05 g/L de hemina disuelta en 1 ml de NaOH 1 M , 10 µl/L de vitamina K <sub>1</sub> , 0,5 g de L-cisteína en HCl y 1 ml de resazurina (0,1 g/100 ml).	pH 5,5-6,1 (mantenido en este rango con NaOH y HCl 1M), 37°C y 24 h. Condiciones anaeróbicas con N <sub>2</sub> gaseoso	Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta, precursores de polifenoles y detecciones de metabolitos microbianos de polifenoles.	[44]
No específica	Fermentación <i>in vitro</i> por lotes Thermo Forma 1029	Microbiota fecal humana (10% p/v)		pH: No especifica, 37°C, fermentación durante 48 horas, Condiciones anaeróbicas 80% CO <sub>2</sub> , 10% N <sub>2</sub> , 10% H <sub>2</sub> .	Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta, detecciones de metabolitos no deseados.	[45]
No específica	Fermentación <i>in vitro</i>	Microbiota fecal humana (20% p/v)		Incubado en botellas anaeróbicas a 125 RPM, 37°C	Determinación de pesos moleculares, pH del medio de cultivo, carbohidratos totales, azúcares reductores y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta.	[46]
Fermentación colónica	Fermentación <i>in vitro</i>	Microbiota fecal de ratones en edad adulta y temprana (30 % v/v)		Incubado en anaerobiosis por 24 h a 37°C	Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta, metabolitos derivados de la clorofila	[47]
Fermentación colónica	Fermentación <i>in vitro</i>	Heces humanas (10% v/v)		Incubación anaeróbica a 37°C durante 24 h	Cuantificación de fenoles y ácidos grasos de cadena corta	[48]

<b>Colon distal</b>	<b>Fermentación <i>in vitro</i></b>	Microbiota fecal (10% v/v)		Incubación anaeróbica por 48 h a 37°C y pH 6,80	Crecimiento y recuento de cepas probióticas	[49]
<b>Colón proximal</b>	<b>Fermentación <i>in vitro</i> Modelo TIM-2</b>	Microbiota fecal humana (58,3% v/v)	9,0 g/L pectina, 9,0 g/L xilano , 9,0 g/L arabinogalactano ,9,0 g/L amilopectina , 43,7 g/L caseína, 74,6 g/L almidón, 31,5 g/L Tween 80, 43,7 g/L bactopecton, 0,7 g/L bilis de buey, 4,7 g/L K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O , 8,4 g/L NaCl, 0,009 g/L FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0,7 g/L MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 0,8 g/L CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O, 0,05 g/L bilis, 0,02 g/L hemina y 0,3 g/L cisteína·HCl, más 1,5 ml/L de una mezcla de vitaminas que contiene: 1 mg de menadiona, 2 mg de D-biotina, 0,5 mg de vitamina B12 , 10 mg de pantotenato , 5 mg nicotinamida , 5 mg de ácido p -aminobenzoico y 4 mg de tiamina, arabinogalactano (1 g/L), pectina de manzana (2 g/L), xilano (1 g/L), almidón de patata (3 g/L), glucosa (0,4 g/L), extracto de levadura (3 g/L), peptona (1 g/L), mucina (4 g/L) y L -cisteína (0,5 g/L). El jugo pancreático se preparó con 40 mL de una solución de 12 g/L de NaHCO <sub>3</sub> , 6 g/L de bilis fresca deshidratada y 0,9 g/L de pancreatina porcina.	Incubación anaeróbica a 37°C, pH ajustado a 5,8 durante 72 h	Ácidos grasos de cadena corta, ácidos grasos de cadena ramificada, lactato y amoniaco	[50]
<b>Colon Ascendente, transverso y descendente</b>	<b>Fermentación <i>in vitro</i> en modelo SIMGI</b>	Microbiota fecal humana (20% v/v)		Incubación anaeróbica a 37°C pH entre 5,6-6,8 durante 48 h	Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta, metabolitos fenólicos, medición de amonio, análisis de comunidad microbiana.	[51]
<b>Colon proximal</b>	<b>Fermentación <i>in vitro</i> modelo de tres recipientes continuos con etapas alimentada de la anterior</b>	Microbiota fecal humana de pacientes fallecidos por muerte súbita (20% p/v)	Almidón 5,0 g/L; pectina (cítrica) 2,0 g/L; goma guar 1,0 g/L; mucina (tipo III gástrico porcino) 4,0 g/L; xilano (espelta de avena) 2,0 g/L; arabinogalactano (madera de alerce) 2,0 g/L; inulina 1,0 g/L; caseína 3,0 g/L; agua peptonada 5,0 g/L; triptona 5,0 g/L; sales biliares nº 3 0,4 g/L; extracto de levadura 4,5 g/L; FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,005 g/L; NaCl 4,5 g/L; KCl 4,5 g/L; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,5 g/L;	Incubación anaeróbica a 37°C, pH del medio 5.5-6,8 durante 27,1 h	Utilización de carbohidratos, productos de fermentación y ecología de poblaciones bacterianas	[52]

			MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, 1,25 g/L; CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 0,15 g/L; NaHCO <sub>3</sub> 1,5 g/L; cisteína 0,8 g/L; hemina 0,05 g/L; Tween 80, 1,0 ml/L. en agua destilada.			
<b>Colon</b>	<b>Fermentación <i>in vitro</i> colónica</b>	Microbiota fecal humana (1:9 respecto al medio nutritivo)	Peptona 3,0 g/L; almidón de maíz 8,0 g/L; extracto de levadura 4,5 g/L; triptona 3,0 g/l; mucina 0,5 g/L; clorhidrato de L-cisteína 0,8 g/L; sales biliares no. 3 0,4 g/L; hemo 0,05 g/L; cloruro de sodio 4,5 g/L; Tween 80 1,0 ml/L; cloruro de potasio 2,5 g/L; fosfato dihidrógeno de potasio 0,4 g/L; cloruro de magnesio hexahidratado 4,5 g/L; cloruro de calcio hexahidratado 0,2 g/L; sulfato de magnesio heptahidratado 3,0 g/L; sulfato ferroso heptahidratado 0,1 g/L; cloruro de calcio dihidrato 0,1 g/L; cloruro de manganeso tetrahidratado 0,32 g/L; sulfato de cobalto heptahidratado 0,18 g/L; sulfato de cobre pentahidratado 0,01 g/L; sulfato de zinc heptahidratado 0,18 g/L; y cloruro de níquel hexahidratado 0,092 g/L	Incubación anaerobia a 37°C, pH controlado a 6,8, velocidad de agitación 80 RPM	Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta, actividad enzimática, Aislamiento ADN	[53]

En el marco de estas tesis se establecieron condiciones mínimas necesarias para la producción de células viables de *L. fermentum* UCO-979C en un medio rico en nutrientes, como lo es el MRS, para lo cual se hicieron modificaciones en la composición del medio de cultivo para la concentración y el tipo de fuente de carbono, con el objetivo de evaluar la cinética de crecimiento de la cepa bajo ciertas condiciones de estrés ambiental, para de esta forma correlacionar dichas variables con la producción de células viables. Se estimó una ecuación de diseño para dimensionar un biorreactor, la cual es función de la cantidad de biomasa a producir, el volumen del medio de cultivo a emplear y la fuente de carbono como reactivo limitante, que permite a partir de allí, hacer estimaciones aproximadas de la cantidad de biomasa con alta viabilidad que podrá obtenerse bajo las condiciones aquí determinadas como óptimas. Además, se empleó un modelo colónico simulado para determinar la producción de AGCC por fermentación de fructanos y glucosa como fuente de carbono.

## **HIPÓTESIS**

La fermentación de fructanos del tipo inulina o FOS por *Lactobacillus fermentum* UCO-979C favorece la producción de ácidos grasos de cadena corta en un sistema de colón simulado, además, la cinética de crecimiento de la cepa en un medio MRS modificado, permite dimensionar un biorreactor para la producción de biomasa viable en función del volumen del medio de cultivo, tiempo de fermentación y de fuente de carbono como reactivo limitante.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar las condiciones óptimas de crecimiento bacteriano, modificando la temperatura, el pH, la concentración y fuente de carbono en el medio de cultivo como parámetros controlados, a partir de la misma obtener los parámetros cinéticos relevantes que permitan dimensionar un biorreactor. Además, por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas identificar y cuantificar ácidos grasos de cadena corta en un medio colónico simulado por fermentación de fructanos y evaluar la viabilidad de la cepa en este medio.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Determinar la cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C en un medio modificado de MRS, sustituyendo la glucosa como fuente de carbono por inulina o FOS.
- 2) Dimensionar un biorreactor que permita la producción de *L. fermentum* UCO-979C.
- 3) Cuantificar la producción de ácidos grasos de cadena corta, producidos por la fermentación de los fructanos, inulina o FOS, en un sistema colónico simulado.
- 4) Evaluar la viabilidad de *L. fermentum* UCO-979C, bajo las condiciones fisicoquímicas empleadas en la simulación colónica.

## 2.0. Metodología General

*L. fermentum* UCO-979C fue aislada a partir de una biopsia gástrica de un paciente no infectado por *H. pylori*, esta cepa ha demostrado características probióticas [27], lo que la convierte en un posible coadyuvante en terapias de erradicación contra el *H. pylori*, de aquí radica su importancia para parametrizar sus particularidades en el escalamiento, y pasar de una prueba de concepto a una producción a escala semi industrial. Para describir la cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C se preparó un medio MRS modificando la fuente de carbono por inulina, FOS y glucosa como control positivo, se evaluó el crecimiento de la cepa a varias temperaturas, de manera de evaluar como las fluctuaciones de temperaturas pudiesen afectar el crecimiento de ésta, además, el pH del medio de cultivo se modificó al inicio con el fin de evaluar como esta variable puede afectar la cinética, además, se varió la velocidad de agitación en el medio de cultivo con la intención de facilitar la disponibilidad homogénea del sustrato durante el proceso de fermentación.

El medio de cultivo se preparó según lo descrito en la tabla 03, en el cual se sustituyó la fuente de carbono por inulina o FOS y se utilizó la glucosa como control positivo. El objetivo ha sido establecer las condiciones de operación bajo las cuales se obtenga una alta producción de biomasa y alta viabilidad de la cepa, de esta manera poder establecer los parámetros de operación en un biorreactor, para ello, se procedió a evaluar todos los parámetros a tres niveles (alto, medio y bajo), se estableció un régimen de variación de un factor a la vez, es decir, los ensayos se dividieron en cuatro bloques, en el bloque uno, se varió la temperatura de fermentación, por lo que; la temperatura en la cual se obtuvo una viabilidad más alta (UFC/ml) se fijó como la óptima para las condiciones subsiguientes, según lo descrito en la tabla 04, en el bloque 02 se varió la concentración de las fuentes de carbono y la fermentación se llevó a cabo a la temperatura seleccionada en el bloque 01, en el bloque 03 se varió la velocidad de agitación, por lo que las condiciones de fermentación en esta etapa de ensayos se realizó a la temperatura seleccionada en el bloque 01 y a la concentración de fuente de carbono del bloque 02 para el bloque 04 se varió el pH inicial del medio de cultivo y la fermentación se llevó a cabo a la temperatura seleccionada en el bloque 01, a la concentración



**Tabla 3.** Composición del medio de cultivo modificado preparado para determinar la cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C.

COMPUESTO	g/L	Glucosa (control) g/L	Inulina g/L	FOS g/L
<b>Fuente de carbono</b>	-	<b>10-20-25</b>	<b>10-20-25</b>	<b>10-20-25</b>
Extracto de carne	10	10	10	10
Peptona	10	10	10	10
Acetato de sodio	5	5	5	5
Extracto de levadura	5	5	5	5
Citrato de amonio	2	2	2	2
Fosfato dipotásico	2	2	2	2
Polisorbato 80	1	1	1	1
Sulfato de magnesio	0,1	0,1	0,1	0,1
Sulfato de manganeso	0,05	0,05	0,05	0,05
Agua destilada	C.S.P un litro	C.S.P un litro	C.S.P un litro	C.S.P un litro

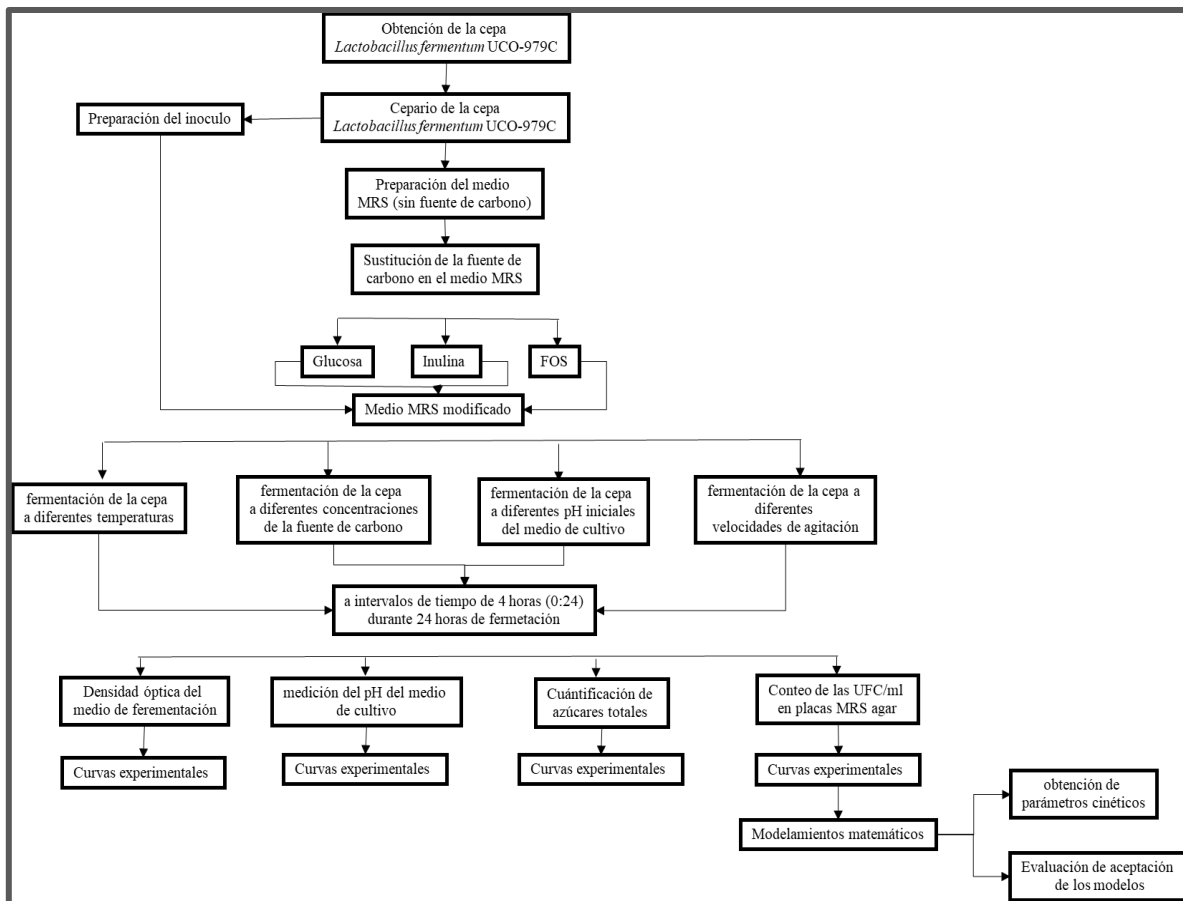
de la fuente de carbono seleccionada en el bloque 02 y a la velocidad de agitación seleccionada en el bloque 03. Finalmente, el bloque 04 define el pH a la cual se llevará a cabo la fermentación para la producción de biomasa bajo las condiciones evaluadas y consideradas como óptimas para los ensayos evaluados.

**Tabla 4.** Distribución de las experiencias experimentales para evaluar el efecto de las variables a los distintos niveles, sobre el crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C.

Bloques	Parámetro	Nivel	g/L de fuente de carbono	Velocidad de agitación (RPM)	pH inicial del medio de cultivo
<b>Bloque 01.</b>	<b>Temperatura</b>	35°C	20	50	Libre
		37°C			
		39°C			

<b>Bloque 02.</b>	<b>g/L de fuente de Carbono</b>	10 g/L	Temperatura		
		20 g/L	óptima en	50	Libre
		25 g/L	Bloque 01		
<b>Bloque 03.</b>	<b>Velocidad de agitación (RPM)</b>	50		Concentración	
		RPM	Temperatura	de fuente de	
		100	óptima en	carbono	Libre
		RPM	Bloque 01	óptima en	
		150		Bloque 02	
<b>Bloque 04.</b>	<b>pH inicial del medio de cultivo</b>	RPM		Concentración	Velocidad de
		2,70	Temperatura	de fuente de	agitación
		4,50	óptima en	carbono	óptima en
		6,80	bloque 01	óptima en	bloque 03
			bloque 02		

La figura 06 contiene de forma esquemática las etapas ejecutadas para evaluar la cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C, de esta forma se logró definir los parámetros cinéticos de la cepa bajo las distintas condiciones de operación. Una vez establecidas las condiciones bajo las cuales se obtiene una alta producción de biomasa, alta viabilidad de la cepa y se conoce la cinética de crecimiento de esta, se procede a evaluar estas condiciones de operación en un biorreactor Batch de 50 litros, para posteriormente separar y liofilizar la biomasa bajo condiciones específicas.



**Figura 6.** Flujo de trabajo para determinar la cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C en un caldo MRS al cual se le ha modificado la fuente de carbono por inulina, FOS y glucosa.

Todos los cultivos preparados se colocaron en envases de vidrio de 500 ml, para lo cual se le agregaron 250 ml de caldo de cultivo, de esta manera mantener un espacio libre dentro de los envases para que las condiciones ambientales ejercieran influencia de forma uniforme dentro del proceso. La fermentación bajo estas condiciones se llevó a cabo durante 24 horas y a intervalos de cuatro horas se tomaron muestras del cultivo, iniciando a las 0 horas. Todos los medios de cultivos preparados se esterilizaron a 115°C durante 20 minutos, el crecimiento de la cepa se midió en UFC/ml por inmovilización en placas que contenían MRS agar, por densidad óptica y el consumo de sustrato se evaluó por medición de azúcares totales, la fermentación se evaluó por medición del pH del medio de cultivo, por lo que se supuso que la fermentación produce metabolitos que acidulan el medio de cultivo.

Para la cuantificar los AGCC producidos en el medio gástrico simulado, se preparó un medio gástrico, según lo descrito en el apartado **2.11.1**, se inoculó el medio con cepa bacteriana y las condiciones del ensayo se establecieron a 37°C, bajo atmosfera de anaerobiosis en jarras, controladas con sachet durante 24 horas, las muestras se tomaron al inicio y al final del ensayo, las muestras fueron: (F1) medio con inulina, (F2) medio con FOS, (F3) medio con glucosa y (F4) medio sin fuente de carbono, la concentración de las fuentes de carbono se evaluaron a 10 y 30 g/L, la viabilidad se verificó por la técnica de microgota en agar MRS, la identificación y cuantificación de AGCC se hizo empleando estándares por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, la extracción de los AGCC se hizo por microextracción en fase sólida empleando una fibra CAR/PDMS e inyectado por desorción al GC.

## **2.1. Materiales y métodos**

### **2.1.1. Reactivos**

Peptona de carne (MERCK), Extracto de carne (MAST), extracto de levadura (MERCK), tween 80 (Sigma-Aldrich), citrato de amonio (Baker's Analyzed), fosfato dipotásico (MERCK), acetato de sodio (Sigma-Aldrich), sulfato de magnesio heptahidratado (MERCK), sulfato de manganeso (MERCK), Inulina de achicoria (Sigma-Aldrich), FOS (Orafti P90), D-glucosa (BDH Chemicals Ltd), caldo MRS (MERCK), agar MRS (MERCK), solución salina buffer de fosfato a pH=7,2 (MERCK, comprimidos), cloruro de sodio (Sigma-Aldrich), fosfato dipotásico (MERCK), fosfato monopotásico (MERCK), bicarbonato de sodio (MERCK), Cloruro de calcio hexahidratado (MERCK), Hemin (Sigma-Aldrich), hidróxido de sodio 1M (MERCK), vitamina K<sub>1</sub>, L-cisteina (Sigma-Aldrich, 97%), ácido clorhídrico 37% (Sigma-Aldrich), sal biliar (Sigma Aldrich), Resazurina (Sigma-Aldrich), ácido orto-fosfórico al 85% p/v (MERCK), amoniaco en solución al 25% (MERCK), estándar de ácido acético al 99,1% de pureza (Chemservice), ácido propiónico al 99,5% de pureza (Sigma-Aldrich), ácido butírico de 99,0 % de pureza (Sigma-Aldrich), ácido valérico de 99,2% de pureza (Chemservice), mix estándar de ácidos grasos metilados C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub> y C<sub>14</sub> al 20% p/p para cada ácido graso, marca NU-CHEK.

### **2.1.2. Medio de cultivo y variables involucradas**

El medio de cultivo empleado para la fermentación consistió en una réplica del medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) en el cual se modificó la concentración y la fuente de carbono del medio, empleando glucosa como control positivo, la Inulina y FOS como muestras de ensayos, de esta forma evaluar el efecto que causaba la fermentación de estos prebióticos sobre la producción de biomasa celular bajo ciertas condiciones de operación.

### **2.1.3. Obtención del inóculo**

*L. fermentum* UCO-979C fue aportada por el laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Universidad de Concepción. Colonias de la cepa crecidas en placas Petri que contenían agar MRS como medio, fueron inoculadas por arrastre en un caldo MRS esterilizado a 115°C durante 20 minutos e incubadas durante 24 horas a 37°C bajo condiciones de atmósfera ambiental normal. Transcurrido este tiempo se tomaron alícuotas correspondiente, se centrifugó por 5 minutos a 4500 RPM, se separó el sobrenadante y el remanente se resuspendió en Buffer de fosfato a pH 7,2 hasta una  $DO_{600\text{ nm}}$  a  $2,00 \pm 0,05$ , empleando como blanco Buffer de fosfato, posteriormente se adicionó al caldo de cultivo modificado y control a razón de 1% v/v para los ensayos a realizar.

### **2.1.4. Preparación del medio de cultivo modificado**

El medio de cultivo empleado fue una réplica del caldo de cultivo MRS, para la cual se modificó la fuente de carbono a tres niveles en el mismo, 10 g/L, 20 g/L y 25 g/L de carbohidrato, para luego incubar bajo ciertas condiciones de operación según lo descrito en la tabla 04. El medio de cultivo fue preparado según: peptona de carne 10 g/L, Extracto de carne 10 g/L, extracto de levadura 20 g/L, tween 80 1 g/L, citrato de amonio 2,0 g/L, fosfato dipotásico 2,0 g/L, acetato de sodio 5.0 g/L, sulfato de magnesio 0,2 g/L, sulfato de manganeso 0,05 g/L y la fuente de carbono: Inulina de achicoria, FOS y D-glucosa, se agregó según lo descrito en la tabla 04, como control positivo se empleó la D-glucosa en el medio modificado. Todos los medios de cultivos fueron esterilizados a 115°C durante 20 minutos.

### **2.1.5. Cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C**

El volumen de medio de cultivo modificado fue de 250 ml, preparado por duplicado para todos los medios, los cuales fueron agregados en frascos de 500 ml con el objetivo de dejar un espacio para que las condiciones ambientales ejerzan su influencia sobre el medio (atmósfera ambiental) de forma uniforme. Una vez inoculado los medios de cultivos esterilizados con *L. fermentum* UCO-979C se llevan a un Shaking Incubator, modelo BJPX-Wichita, con control electrónico de temperatura y velocidad de agitación, los parámetros de operación del ensayo se configuraron de acuerdo con lo descrito en la tabla 04. La fermentación se mantuvo durante 24 horas y se tomaron alícuotas de 5 ml del medio de fermentación a intervalos de 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas para estimaciones posteriores.

### **2.1.6. Estimación del crecimiento celular en el medio modificado**

Para la estimación del crecimiento celular en los medios modificados se agregan 100  $\mu$ L del medio de cultivo en 900  $\mu$ L de solución salina buffer de fosfato a pH 7,2, se agitan por vórtex durante 1 minuto y se preparan diluciones seriadas para hacer recuento mediante la técnica de microgota en placas Petri que contienen agar MRS, la incubación de las placas se hace en una incubadora INCUCCELL, modelo IC 111ECO, a 37°C durante 48 horas, para el conteo de colonias en placas entre 10-90 UFC/ml. El conteo se hace por triplicado para cada muestra de medio de cultivo fermentado.

### **2.1.7. Estimación de la densidad óptica del medio de cultivo**

La densidad óptica se midió en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 600 nm, para ello, se diluyeron 500  $\mu$ L del medio de cultivo en agua destilada (la muestra de 0 y 4 horas en 6500  $\mu$ L y las siguientes en 8500  $\mu$ L de agua destilada), se homogenizan en vórtex por 1 minuto y se mide la absorbancia en celdas de cuarzo, empleando como blanco agua destilada y medio de cultivo modificado en la misma relación de concentración para cada intervalo de tiempo y según el medio modificado empleado. Todas las mediciones se hicieron por triplicado para cada punto.

### **2.1.8. Cuantificación de azúcares totales**

Para cuantificar el consumo de sustrato o azúcares totales se realizó según lo descrito por Dubois M & col [54], con leves modificaciones: 2 ml de caldo de fermentación se centrifuga a 10000 RPM por 5 minutos en una centrifuga GYROZEN modelo 1580, se filtran a través de un filtro de membrana porosa de 0,22  $\mu\text{m}$ , el filtrado se agrega en un tubo de vidrio y se adiciona 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (98 %p/v) y 1 mL de una solución de fenol al 5% inmediatamente, se homogeniza en vórtex por 1 minuto y se deja reposar 10 minutos en baño de maría a 25°C, para medir la absorbancia de la muestra a 490 nm en un espectrofotómetro UV-Vis, como blanco se emplea agua destilada. La cuantificación de azúcares totales se realizó empleando una curva de calibración de concentraciones conocidas para inulina, FOS y glucosa en medios modificados, recibiendo el mismo tratamiento que la muestra problema para cada punto de la curva de calibración.

### **2.1.9. Modelamientos matemáticos**

Durante los ensayos se asume que la temperatura es constante dentro del recipiente, que la agitación es homogénea, la disponibilidad de oxígeno y nutrientes es uniforme en todos los envases, no se consideró la acumulación de metabolitos, la reposición de sustrato, ya que; se supuso que el sustrato estaba en cantidad suficiente para el desarrollo normal del proceso, y, el pH dentro del sistema solo se modificó al inicio cuando correspondió evaluar este parámetro. Además, los factores o variables que se evaluaron a los distintos niveles se suponen que afectan el cultivo de forma unidireccional, es decir, favoreciendo o afectando la producción de células viables. Los modelos matemáticos utilizados están descritos en parámetros microbiológicamente relevantes, los modelos utilizados están descritos en la tabla 01, a partir de los cuales, los parámetros de los modelos se estiman por la descripción de todo el conjunto de datos recolectados durante los ensayos, de esta forma facilitar la estimación de los mismos.

Las ecuaciones se ajustaron a los datos de crecimiento microbiano mediante regresiones no lineales por iteraciones empleando un método de resolución de ecuaciones no lineales modificado de Newton, empleando el método de minimización de la diferencia de los residuos Quasi-Newton, haciendo uso del programa estadístico STATISTICA 10.0, para lo

cual se empleó una rutina de minimización de la suma normalizada de los cuadros de los errores entre el valor estimado y el valor observado para cada iteración.

## **2.2. Escalamiento de la cepa bajo condiciones óptimas**

Se empleó un biorreactor Batch de 50 litros de capacidad máxima para el escalamiento de la cepa bajo las condiciones establecidas anteriormente, el biorreactor está equipado con bombas automáticas para la dosificación de ácido o base, electrodos para la medición de pH, temperatura y oxígeno disuelto en el medio, un agitador con regulador de velocidad, el cuerpo principal tiene chaqueta térmica, equipado con un serpentín para mantener el medio de cultivo a la temperatura de operación, emplea agua como fluido de calentamiento.

El biorreactor se operó para 30 litros de cultivo total, empleando caldo MRS como medio de fermentación, el cual fue preparado según indicaciones del fabricante, se esterilizó a 115 °C durante 25 minutos empleando vapor de agua, el cual circulo por el serpentín de la chaqueta interna del equipo. La fermentación se llevó a cabo a 100 RPM, a una temperatura de 35-36°C, pH constante en el rango de 6,50-6,80 mantenido con una solución de amoniaco al 25% y ácido orto fosfórico al 85%, según sea el caso. El tiempo de fermentación es de 12 horas continuas y se tomaron muestras del caldo de fermentación a intervalos de 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas para mediciones posteriores.

### **2.2.1. Activación de la cepa**

Se tomó una alícuota de 100 µL desde el cepario que se mantiene almacenado a -80°C del banco de cepa, esta alícuota se diluyó en 900 µL de caldo MRS y se dejó incubar a 37°C durante 24 horas en condiciones aerobias. Una segunda activación tuvo lugar bajo las mismas condiciones anteriores para 100 µL de la primera activación en 900 µL de caldo MRS por 24 horas, esta disolución permitió preparar el inoculo necesario para la obtención de biomasa liofilizada.

### **2.2.2. Inóculo inicial para el biorreactor**

Para la preparación del inoculo inicial se toma una alícuota de 100 µL de la segunda disolución activada inicialmente y se diluyen en 100 ml de caldo MRS se incuba durante 24



Horas a 37°C, transcurrido este tiempo se toman 15 ml de esta disolución y se disuelven en hasta 1500 ml de caldo MRS, esta disolución se prepara por duplicado y se incuba a 37°C durante 24 horas. El volumen del inóculo representó el 10% del volumen total de fermentación.

### **2.2.3. Control del crecimiento celular de la cepa en el proceso escalado**

Para determinar las UFC/ml viables, azúcares totales y la DO<sub>600</sub> en el caldo de fermentación durante el tiempo de ensayo a los diversos intervalos de tiempo, se realizó según lo descrito anteriormente. Para determinar el peso de biomasa seca para cada punto recolectado se empleó un analizador de humedad, modelo i-Thermo 163L, para el cual se centrifugó a 4500 RPM durante 5 minutos una muestra de 5 ml de caldo de fermentación, se separó el sobrenadante y el pellet se lavó por duplicado con agua destilada hasta 5 ml de mezcla, previa centrifugación intermedia, se suspendió el pellet nuevamente hasta 3 ml de solución con agua destilada, se llevó al vórtex por 2 minutos y se tomó una alícuota de 1 ml de la mezcla homogeneizada para ser llevada al analizador de humedad a 135°C y el tiempo de secado se detuvo cuando el contenido de humedad fuese < 99% del inicial en la muestra.

### **2.2.4. Liofilizado de la biomasa**

El liofilizado de la biomasa se realizó empleando un Freeze dryer, modelo BK-FD10PT. Para separar la biomasa obtenida en el caldo de fermentación se empleó una centrifuga GYROZEN modelo 1580, la operación se realizó a 4500 RPM durante 10 minutos a temperatura ambiente, la biomasa recolectada se lavó por duplicado con una solución salina buffer de fosfato a pH 7,2. La biomasa se resuspendió en hasta 1 litro de la misma solución salina.

Para proteger la cepa durante el proceso de liofilización se empleó una solución de leche descremada (lioprotector) e inulina (crioprotector) a razón de 2:1 en solución salina buffer de fosfato a pH 7,2, por lo que; se disolvieron 400 g de leche descremada y 200 g de inulina en hasta 2 litros de solución salina buffer de fosfato para ser mezclados con un litro de biomasa recolectada anteriormente, se congeló durante 24 horas a -20°C y se llevó al liofilizador a -55°C y una presión de vacío entre 01,-0,01 mbar durante 48 horas. La biomasa

seca obtenida se homogeneizó a través un tamiz de diámetro de paso de 0,075 mm, empleando morteros esterilizados.

### 2.2.5. Análisis estadístico

Los ensayos se han dividido en cuatro bloques principalmente, para lo cual en cada bloque se ha evaluado cada parámetro a tres niveles, todos los ensayos se realizaron por duplicado y reportados con el valor de la desviación estándar. Se ha realizado una ANOVA de dos vías a un nivel de significancia de  $\alpha= 0,05$  para determinar la influencia de las variables sobre el crecimiento de la cepa.

### 2.2.6. Evaluación de la calidad de ajuste

Los parámetros utilizados para evaluar la calidad de los ajustes de los distintos modelos ha sido el coeficiente de correlación o determinación ( $R^2$ , ecuación 01), el coeficiente de correlación o determinación corregido ( $R_c^2$ , ecuación 02), según lo descrito por Rincón A. & col<sup>[40]</sup>. Debido a la cantidad de parámetros que tienen los modelos matemáticos para lograr ajustar los datos experimentales, el coeficiente de determinación y coeficiente de determinación corregido no son suficientes para discriminar entre los modelos.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (X_{i,e} - X_{i,c})^2}{\sum_{i=1}^N (X_{i,e} - X)^2} \quad \text{Ecuación 01}$$

$$R_c^2 = 1 - \frac{N - 1}{N - k - 1} * (1 - R^2) \quad \text{Ecuación 02}$$

Por lo general, se logran mejores ajustes cuando los modelos empleados utilizan un número de parámetros mayores que otros, por lo que; se empleó el criterio de Akaike (AIC, ecuación 03) y Akaike corregido (AICc, ecuación 04), el cual evalúa un criterio de aceptación de acuerdo con el número de parámetros utilizados en la ecuación de modelado para ajustar los datos, es decir, mientras más parámetros emplea la ecuación para ajustar los datos, mayor será el número de Akaike corregido, lo que facilita la elección del modelo.

$$AIC = N * \log\left(\frac{SCE}{N}\right) + 2 * (N_p + 1) \quad \text{Ecuación 03}$$

$$AICc = AIC + 2 \frac{(N_p + 1) * (N_p + 2)}{N - N_p - 2} \quad \text{Ecuación 04}$$

**Dónde**  $N_p$ , es el número de parámetros que emplea la ecuación modelo para el ajuste,  $N$ , es el número de puntos experimentales y  $SCE$  es la suma del cuadrado de los errores entre los valores experimentales y los calculados por las ecuaciones modeladas.

### 2.3. Dimensionamiento del biorreactor

Al diseñar un biorreactor se debe de tener en cuenta las características del proceso a realizar, asegurar las condiciones necesarias para el crecimiento de los microorganismos y la obtención del producto final deseado. Se debe enfatizar en las necesidades de sustrato, homogeneidad, temperatura, pH, concentración inicial de la fuente de carbono y la reposición de medio fresco al medio (cultivos continuos).

El objetivo es predecir el comportamiento dinámico de las concentraciones de biomasa y sustrato en un cultivo por lote, considerando las cinéticas de reacción, que se asume como etapa limitante, y excluyendo los fenómenos de transferencia de calor y masa. Donde, la conducta del modelo ha sido ajustada y se compara con los datos experimentales, de modo de obtener los parámetros del modelo.

**Para la realización de este modelo, se tomaron los siguientes supuestos:**

- Se considerará que el sistema se encuentra en fase líquida y homogénea.
- Se considera que el equilibrio térmico es inmediato, además, el aislamiento térmico es perfecto, por lo que; la transferencia de calor es nula hacia el exterior.
- La agitación es suficiente para mantener el sistema homogéneo y perfectamente agitado, evitando la formación de acumulación preferencial.
- La cantidad de oxígeno en el medio de cultivo es constante y suficiente, por lo que; no se considera un reactivo limitante.
- El pH del medio de cultivo varía en un rango apropiado para la producción de cepas de *Lactobacillus* (4,5-6,5 unidades de pH).

- Se considera que la producción de biomasa no sufre cambios significativos y estará limitada por la disponibilidad de sustrato.
- La cinética de crecimiento de la cepa esta descrita por la ecuación de Monod (considera el sustrato como reactivo limitante).
- Los parámetros del modelo son constantes.
- El sistema opera de forma discontinua (Cultivo por lotes).

Una vez establecidas estas condiciones se procede a realizar los balances de masa en función de la biomasa y la cantidad de sustrato disponible en el medio de cultivo.

## 2.4. Balances de masas

### Balance de masa Global

$$\left[ \begin{array}{l} \text{Acumulación} \\ \text{de masa en} \\ \text{el sistema} \end{array} \right] = \left[ \begin{array}{l} \text{masa que} \\ \text{entra al} \\ \text{sistema} \end{array} \right] - \left[ \begin{array}{l} \text{masa que} \\ \text{sala del} \\ \text{sistema} \end{array} \right]$$

$$\frac{d(\rho V)}{dt} = F_e * \rho_e - F_s * \rho_s \quad \text{Ecuación 05}$$

Dado que estamos en un sistema cerrado o Batch, no existen flujos de entrada y salida, la densidad es constante, por lo que el balance se reduce a:

$$\frac{d(\rho V)}{dt} = 0 \Rightarrow V = \text{constante}$$

### Balance de biomasa

$$\left[ \begin{array}{l} \text{Acumulación} \\ \text{de biomasa en} \\ \text{el sistema} \end{array} \right] = \left[ \begin{array}{l} \text{Biomasa que} \\ \text{entra al} \\ \text{sistema} \end{array} \right] - \left[ \begin{array}{l} \text{Biomasa que} \\ \text{sala del} \\ \text{sistema} \end{array} \right] + \left[ \begin{array}{l} \text{Crecimiento} \\ \text{celular} \end{array} \right] - \left[ \begin{array}{l} \text{Muerte} \\ \text{celular} \end{array} \right]$$

$$\frac{d(x * V)}{dt} = F_e * X_e - F_s * X_s + \mu * X * V - \varepsilon * X * V \quad \text{Ecuación 06}$$

Dónde:

Xe= Fracción másica de biomasa en la entrada

Xs= Fracción másica de biomasa en la salida

X= Relación de conversión de sustrato a biomasa

ε= Tasa de muerte celular

Como X (dC<sub>B</sub>/dC<sub>S</sub>) es el valor de la relación de conversión de sustrato a biomasa, la ecuación diferencial que represente esta función respecto al tiempo resulta ser:

$$\frac{dC_S}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} * \frac{dC_B}{dt} \quad \text{Ecuación 07}$$

Integrando la ecuación anterior dentro de los límites para la biomasa, C<sub>B0</sub>= concentración inicial de la biomasa y C<sub>B</sub>= concentración de biomasa para cualquier tiempo T > 0 horas, para la concentración de sustrato de C<sub>S0</sub>= concentración de sustrato inicial y C<sub>S</sub>= concentración de sustrato para cualquier tiempo T>0 horas, además, Y<sub>X/S</sub>= factor de rendimiento de sustrato en biomasa celular ((g/L de células) / (g/L de sustrato)) o, lo que es igual a Y<sub>X/S</sub>=ΔC<sub>B</sub>/ΔC<sub>S</sub> para cada intervalo de tiempo. Por lo que; integrando 07 en los intervalos establecidos anteriormente resultas:

$$X = C_B = C_{B0} + Y_{X/S} * (C_{S0} - C_S) \quad \text{Ecuación 08}$$

La intención es determinar una ecuación diferencial respecto al tiempo, por lo que; evaluando la ecuación 08 para un tiempo T<sub>1</sub> (h) > 0 y próximo siguiente al valor de T=0 horas se tendrá un valor de C<sub>B1</sub>, un valor de C<sub>S1</sub>, por consiguiente, sustituyendo en la ecuación 08 se obtendrá la cantidad de biomasa producida respecto al sustrato consumido.

$$C_{B1} = C_{B0} + \frac{(C_{B1} - C_{B0})}{(C_{S0} - C_{S1})} * (C_{S0} - C_{S1})$$

Por simple observación puede notarse que para cada tiempo T > 0 horas, el valor de biomasa corresponde a la concentración de biomasa producido en ese tiempo. Esta relación será considerada en los cálculos posteriores.

Bajo las consideraciones anteriores, se modifica la ecuación 06, debido a que no existen flujos de entrada y salida, además, se asume que la muerte celular es despreciable respecto al crecimiento celular, debido a que la etapa de crecimiento de la cepa está dentro de la fase exponencial, la ecuación 06 resultante será:

$$\frac{d(x * V)}{dt} = \mu * X * V \text{ como } V = Cte$$

$$V * \frac{dX}{dt} = \mu * C_B * V = r_g \quad \text{Ecuación 09}$$

Donde

$r_g$  = Velocidad o tasa de crecimiento bacteriano en la fase de crecimiento exponencial

$\mu$  = Velocidad específica de crecimiento bacteriano en la fase exponencial

$X$  = concentración celular o de microorganismos, si  $X = C_B$  (concentración de Biomasa, g/L)

Debido a que los modelos anteriores no consideraban el consumo de sustrato en el medio de cultivo, se empleará un modelo matemático para la velocidad de crecimiento celular ( $\mu$ ) que considere el consumo de sustrato como reactivo limitante para el crecimiento celular (ecuación 07). El modelo de Monod [41], ecuación 10, es un modelo ampliamente utilizado para representar el crecimiento celular en procesos de fermentación, por lo que en este caso se considerará el sustrato limitante a la fuente de carbono.

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} * S}{K + S} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde

$\mu_{m\acute{a}x}$  = Velocidad máxima de crecimiento ( $h^{-1}$ )

$S$  = Concentración de sustrato, en este caso azúcares totales (g/L), si  $S = C_s$

$K$  = Constante de Monod (g/L), si  $K = K_s$

Una ecuación que considere la combinación del balance de masa respecto a la biomasa (ecuación 06) y el balance de masa respecto al sustrato (ecuación 07), podemos obtener una ecuación diferencial que permite describir la producción de biomasa respecto al tiempo y al consumo de sustrato. Sustituyendo la ecuación 07 en la ecuación 06, podremos obtener la relación anteriormente descrita (ecuación 11), la cual podrá resolverse numéricamente por métodos apropiados diferenciales de análisis, como, por ejemplo; métodos gráficos por igualdad de áreas, métodos por diferenciación numérica o por ajuste polinomial de los datos que describen la producción de biomasa respecto al tiempo.

$$\Gamma = \frac{dC_B}{dt} = \frac{\mu_{max} * S}{K + S} * C_B \quad \text{Ecuación 11}$$

Haciendo un arreglo matemático para obtener la linealización de la ecuación , obtendremos la ecuación 12, la cual relaciona la velocidad de crecimiento celular con el consumo de sustrato, puede notarse que la relación  $K/\mu_{max}$  es la pendiente de la recta y  $1/\mu_{max}$  es el corte, por lo que; una representación de  $C_B/\Gamma$  Vs  $1/S$  (concentración de sustrato), puede obtenerse los parámetros de la ecuación 09, lo que permite obtener el volumen del reactor, la regresión es no lineal, empleando el software Statgraphics-Centurión XVI.

$$\frac{C_B}{\Gamma} = \frac{K_S}{\mu_{max}} * \left(\frac{1}{S}\right) + \frac{1}{\mu_{max}} \quad \text{Ecuación 12}$$

La relación  $dC_B/dt$  ( $\Gamma$ ) es una ecuación diferencial, por lo que, empleando el método de diferenciación numérica, según lo descrito en [41], de esta manera, resolver numéricamente la ecuación 12 por regresión no lineal de datos.

## 2.5. Simulación gástrica

### 2.5.1. Preparación del medio colónico

La simulación gástrica se preparó según lo descrito en las referencias [111, 112] , con modificaciones, por lo que se preparó un litro de caldo gástrico con la siguiente composición: 2 g/L de peptona, 2 g/L de extracto de levadura, 2 g/L de  $\text{NaHCO}_3$ , 2 ml/L de Tween 80, 0,5 g/L de sales biliares, 0,1 g/L de  $\text{NaCl}$ , 0,04 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  , 0,04 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,

0,01 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01 g/L de  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0,05 g/L hemina disuelta en 1 ml de NaOH 1 M , 10  $\mu$ l/L de vitamina  $K_1$  , 0,5 g de L-cisteína en HCl y 1 ml de resazurina (0,1 g/100 ml), la vitamina  $K_1$  se colocó al medio una vez esterilizado, los reactivos se disolvieron en agua destilada y esterilizó el medio a 121°C por 20 minutos. Todos los envases fueron aislados del efecto de la luz externa con papel aluminio en su superficie.

### **2.5.2. Preparación del inóculo**

Colonias de la cepa inmovilizadas en placas Petri que contenían agar MRS como medio, fueron inoculadas por arrastre en un caldo MRS, el cual ha sido esterilizado a 115°C durante 20 minutos e incubadas durante 24 horas a 37°C bajo condiciones de atmósfera ambiental normal. Se separó la biomasa bacteriana por centrifugado a 4500 RPM por 5 minutos, se suspendió en PBS buffer de fosfato a pH 7,2 hasta obtener una densidad óptica de 2.0 a 600 nm de longitud de onda.

### **2.5.3. Fermentación colónica**

Para la fermentación colónica se separó el caldo en volúmenes de 90 ml en frascos tapados de 100 ml, se agregaron cantidades iguales de carbohidratos para cada ensayo antes de esterilizarlos, la fuente de carbono se evaluó a dos niveles por separado, 10 y 30 g/L, para inulina, FOS y glucosa (control), se prepararon cuatro frascos, fermentación de inulina (F1), fermentación de FOS (F2), fermentación de glucosa (F3), medio inoculado con cepa sin carbohidratos en el medio (F4), todos los envases se prepararon por triplicado. Se inocularon con 10 ml de inóculo suspendido en PBS previamente preparado y se colocaron en jarras anaerobias, controladas con sachet de anaerobiosis, se colocaron en una incubadora a 37°C por 24 horas, durante la fermentación se tomaron alícuotas de 10 ml a las 0, 12 y 24 horas de ensayo.

### **2.5.4. Viabilidad de la cepa en el medio colónico simulado**

Para evaluar la viabilidad de la cepa en el medio colónico simulado se tomaron alícuotas de 10 ml a las 0, 12 y 24 horas de fermentación, se colocó 1 ml de caldo gástrico en 9 ml de solución buffer PBS a pH 7,2 y se prepararon diluciones seriadas de la misma, se realizó siembra en placas Petri por microgota que contenían MRS agar esterilizado, se llevó a la



incubadora por 48 horas a 37°C y se hizo conteos de las UFC para cada uno de los medios preparados.

#### **2.5.5. Análisis estadístico**

Se utiliza la prueba estadística ANOVA para evaluar el crecimiento de la cepa en el medio gástrico simulado cuando se ha suplementado con inulina, FOS y glucosa como fuentes de carbono del medio y la ausencia de estos carbohidratos en el mismo.

### **2.6. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta producidos por *L. fermentum* UCO 979C en el medio colónico simulado.**

#### **2.6.1. Preparación de la muestra**

Para la extracción de AGCC a partir del medio colónico simulado se tomaron alícuotas de 5 ml para las 0 horas y 24 horas de cada uno de los frascos que contenía las distintas fuentes de carbonos (inulina, FOS, glucosa y solo cepa), la muestra se centrifugo a 10000 RPM por 10 minutos, y se separa el sobrenadante para someter a extracción de AGCC por SPME, por lo que a una alícuota de 480 µL de este sobrenadante se le agregaron 10 µL de ácido clorhídrico concentrado (37%) y 10 µL de la disolución de estándar de ácido octanoico metiléster para una concentración final de 0,05 µmol/ml. Se agregaron 100 µL de la muestra en un frasco de color ámbar y se llevó a micro extracción en fase sólida (SPME).

#### **2.6.2. Extracción de ácidos grasos de cadena corta por micro extracción en fase sólida (SPME)**

Para la extracción de los ácidos grasos de cadena corta desde el medio colónico simulado se agregaron 100 µL de la muestra que ha sido enriquecida con el estándar interno ácido octanoico metil éster (mix C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>) a una concentración de 0,05 µmol/ml y acidulada con ácido clorhídrico en un vial color ámbar de 10 mL, se llevó a cabo la extracción bajo agitación a 450 RPM, 60°C por exposición de la fibra de extracción (fibra CAR/PDMS de 75 µm de SUPELCO) a través del vial durante 20 minutos en un sistema de inyección automático. Una vez transcurrido los 20 minutos se contrajo la fibra y se llevó a desorción inmediatamente al cromatógrafo de gases durante 5 minutos y 280°C a través del puerto de inyección.

### **2.6.3. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas**

Para la identificación y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta se empleó un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies 7890A, interconectado a un detector de masas marca Agilent Technologies 7000 GC/MS triple cuadrupolo, una columna cromatográfica polar capilar ZB-FFAP de 30 metros de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula. Las condiciones cromatográficas fueron: Temperatura del inyector: 280°C, el programa de temperaturas del horno del GC fue de 40°C por 5 minutos, luego sube a razón de 5°C/min hasta 150°C por 0 minutos, inmediatamente sube a razón de 45°C/min a 240°C y se mantiene por 1 minuto, para un tiempo total de 30 minutos. El gas portador fue helio a un flujo de 1,5 ml/min a una presión de 82,45 KPa, el modo de inyección splitless, la temperatura de la línea de transferencia a 200°C y de la fuente de ionización 230°C, la adquisición de datos se hizo en modo full SCAN en el rango de 40-400 m/z, la energía de ionización fue de 70 eV. La confirmación y revisión de datos se hizo con el software Agilent MassHunter Acquisition data.

### **2.6.4. Identificación de ácidos grasos de cadena corta**

Cada uno de los estándares se prepararon por separados a una concentración de 100 ppm en medio gástrico simulado sin suplementarlo con fuente de carbono y sin inóculo de la cepa, los mismos fueron extraído de la misma forma que la muestra e inyectados por desorción desde la fibra, según lo detallado anteriormente en 2.6.2. Para cada estándar de AGCC se registró el tiempo de retención y el patrón isotópico resultante de la fragmentación de la molécula a las condiciones evaluadas en la espectrometría de masas, para los cuales se consideraron los iones precursores, iones moleculares e iones productos. Una vez identificados los estándares de ácidos grasos, se preparó una mezcla de éstos a una concentración de 50 ppm para ácido butírico, 50 ppm para ácido acético, 50 ppm para ácido valérico, 50 ppm para ácido propiónico y se agregó ácido octanoico metil éster como estándar interno a 20 ppm, ésta mezcla fue extraída por SPME e inyectada por desorción en el cromatógrafo de gases bajo las mismas condiciones que la muestra.

### **2.6.5. Validación del método**

La linealidad se estudió en solución blanco, la cual consiste en una muestra que contiene todos los reactivos ocupados para la simulación colónica, excepto la fuente de carbono y la cepa bacteriana, en el rango de concentración para ácido acético de 1,67-33,33  $\mu\text{mol/ml}$  y se agregó como estándar interno una mezcla de ácidos grasos metilados ( $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ ), por lo que se hizo seguimiento al ácido octanoico metil éster, debido a la proximidad al tiempo de retención con el ácido acético, la concentración del estándar interno se agregó a razón de 0,05  $\mu\text{mol/ml}$  a cada una de las disoluciones preparadas para la curva de calibración, el número de puntos obtenidos para la curva de calibración resultaron 7, todas las extracciones e inyecciones al cromatógrafo de gases se realizaron por triplicado ( $n=21$ ) para cada uno de los puntos de la curva de calibración.

El límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se estimaron como aquella dilución que tenía la relación señal/ruido (S/N) igual a 3 y 10, respectivamente, estimadas por triplicado a partir de diluciones seriadas e incrementales del estándar de ácido acético en la muestra en blanco.

Dado que no existe ningún material de referencia certificado de AGCC disponible en disolución colónica, se utilizaron dos muestras de control de calidad ( $\text{QC}_1$  y  $\text{QC}_2$ ), preparadas en solución en blanco. La muestra  $\text{QC}_1$ , se preparó a una concentración de 1,67  $\mu\text{mol/ml}$  para ácido acético y se agregó como estándar interno una mezcla de ácidos grasos metilados ( $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ ), siguiendo al ácido octanoico metil éster como estándar interno a una concentración de 0,05  $\mu\text{mol/ml}$ ,  $\text{QC}_2$  se preparó a una concentración 5 veces mayor a  $\text{QC}_1$  respecto al ácido acético. Los QC se inyectaron por separado y aleatoriamente cada 08 inyecciones de muestra, se evalúa el coeficiente de variación para la relación de área para el ion molecular 60 m/z del ácido acético y el ion molecular 74 m/z para el ácido octanoico metil éster, por lo que se considera aceptable si el CV es  $< 10\%$ .

### **2.6.6. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta**

La cuantificación del ácido acético se hizo empleando una curva de calibración obtenida a partir de las áreas de los cromatogramas de iones extraídos y la concentración de las

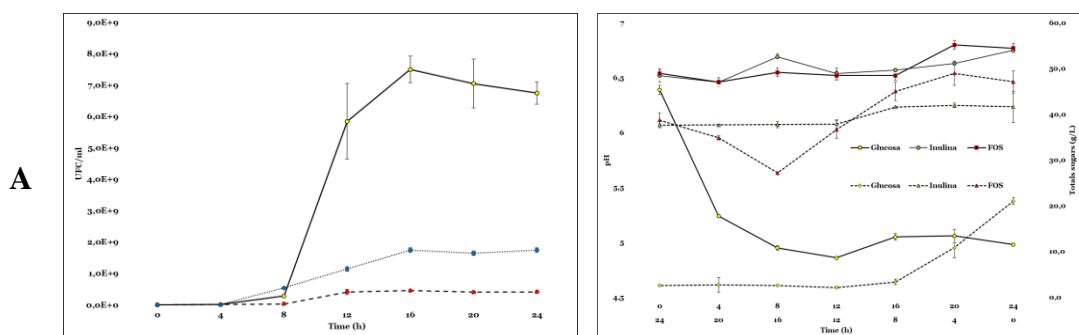
diluciones preparadas en el rango de 1,67-33,33  $\mu\text{mol/ml}$ , los cromatogramas de ion extraído se obtuvieron para el ion molecular del ácido acético 60 m/z y el ion 74 m/z para el ácido octanoico metil éster para cada dilución evaluada.

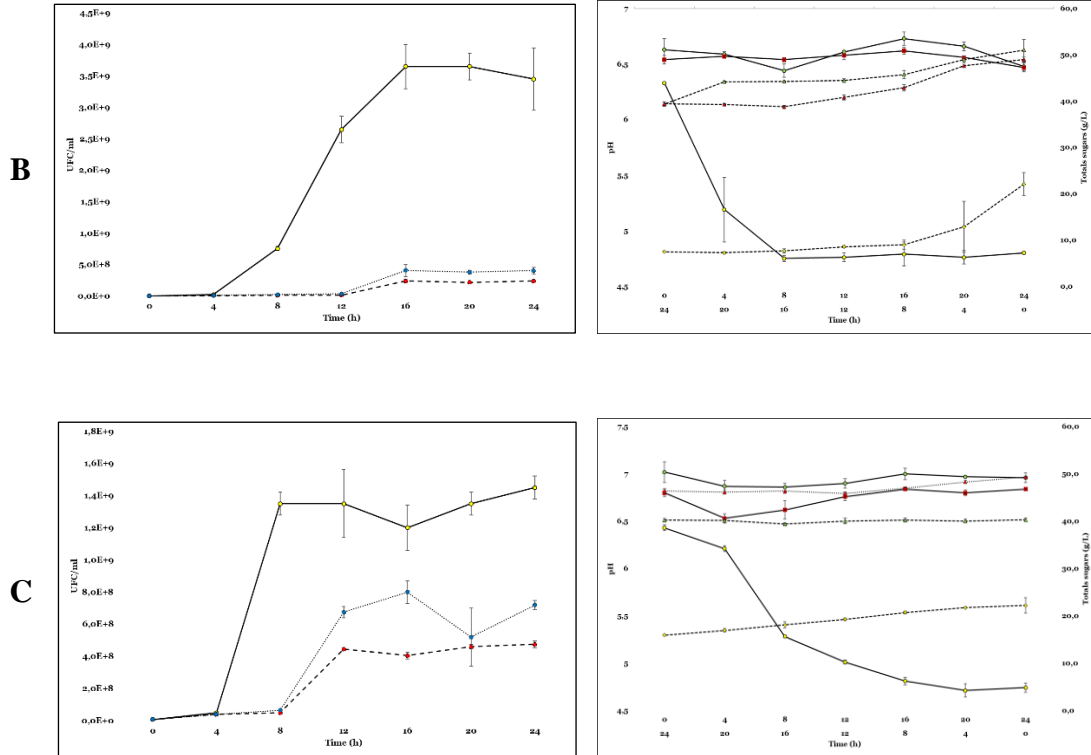
## 3.0. Resultados

### 3.1. Cinética de *L. fermentum* UCO-979C

#### 3.1.1. Cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C cuando se modifica la temperatura de fermentación (Bloque 01)

La cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C se evaluó en un caldo de cultivo MRS modificado, para ello se sustituyó la fuente de carbono por glucosa como control positivo, inulina o FOS. El ensayo de crecimiento se realizó a 20 g/L para cada una de las fuentes de carbono empleadas en el medio modificado (glucosa, inulina o FOS), por lo que; se modificó en el ensayo de fermentación la temperatura a 35°C (A), 37°C (B) y 39°C (C), manteniendo la velocidad de agitación del medio de cultivo a 50 RPM y pH inicial del medio en el intervalo de 6,20-7,00. Todos los datos recolectados han sido tomados cada cuatro (4) horas durante 24 horas de ensayo, se ha medido el contenido de azúcares totales, pH del medio y UFC/ml por inmovilización en placas que contenían agar MRS esterilizado. La figura 07 contiene la representación de las mediciones realizadas durante el ensayo de crecimiento.





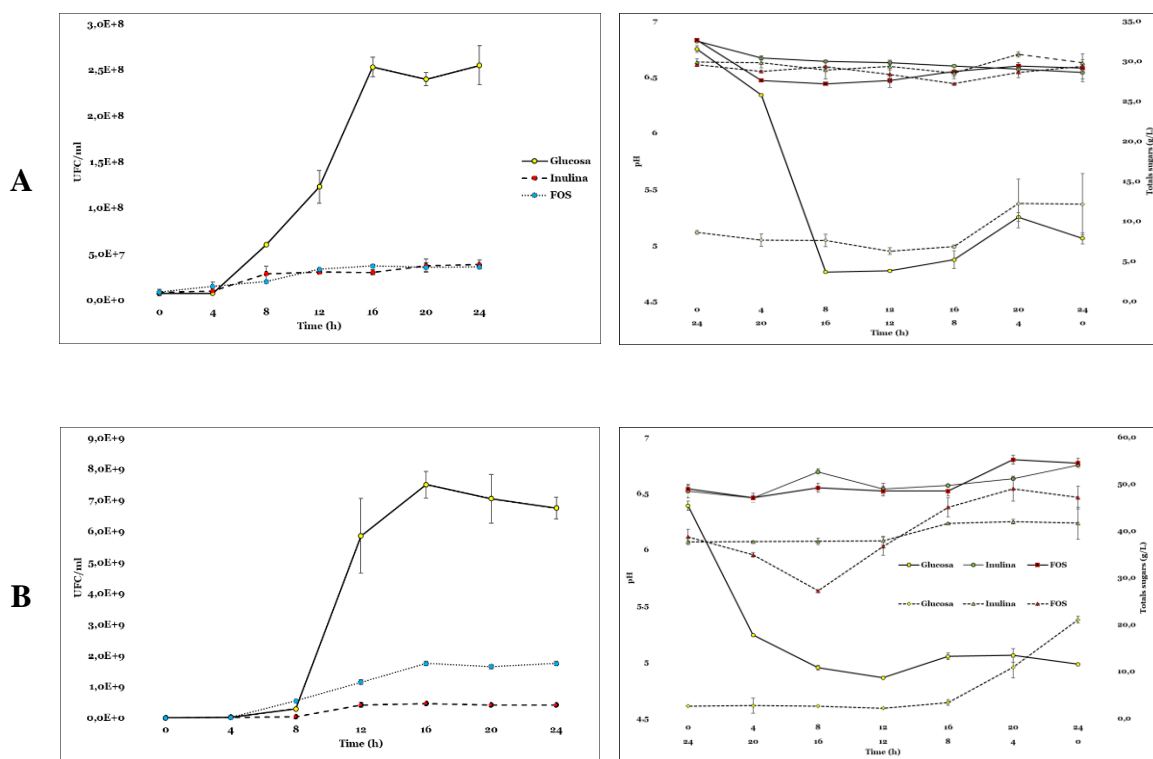
**Figura 7.** Crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C en un caldo de cultivo a 35°C (A), 37°C (B) y 39°C (C) cuando la fuente de carbono se modificó por glucosa —○—, inulina -●- o FOS ...◆... . La fermentación se llevó a cabo a 50 rpm y pH entre 6,40 y 6,50 en todos los medios de cultivo, y la concentración de fuentes de carbono fue de 20 g/l. El pH y el consumo total de azúcar del medio de cultivo (gráficos de la derecha) se representan para glucosa —○—, inulina —●—, y FOS —◆—, glucosa -◇- - -, inulina -▲- - - y FOS -△- - -, respectivamente.

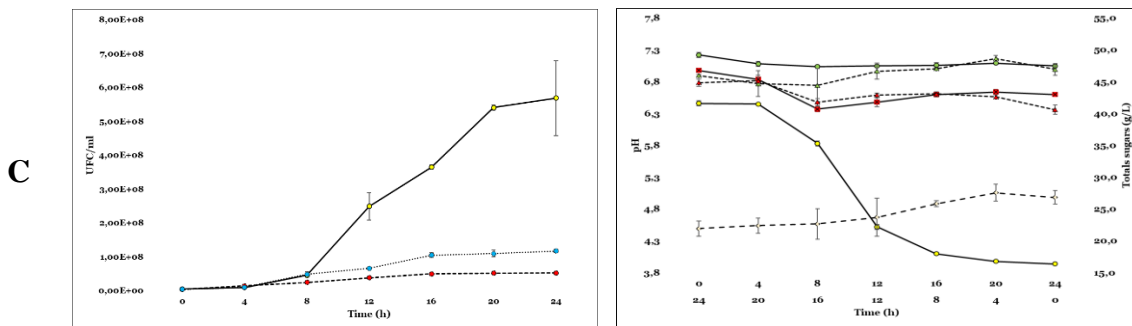
### 3.1.2. Cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C cuando se modifica la concentración de la fuente de carbono en el medio de fermentación (Bloque 02)

Al inicio de los ensayos se evaluó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de la cepa, por lo que la temperatura a la cual la cepa obtuvo el recuento viable más alto se encontró entre 35-37°C, por esto todos los ensayos posteriores se realizaron a 35°C, representa un estado de menor consumo energético para los procesos de escalamiento y facilita un amplio margen de variación para la temperatura. En el bloque 02 se evaluó el efecto que ejerce la concentración de carbohidratos sobre la cinética de crecimiento, la figura 08 contiene de

forma resumida los valores obtenidos para este bloque de ensayos, los gráficos de la izquierda representan las UFC/ml respecto al intervalo de tiempo evaluado, los gráficos de la derecha representan el consumo de azúcares totales y el pH del medio de cultivo, por lo que; la concentración de carbohidratos que favorece el crecimiento de la cepa bajo las condiciones establecidas para la fermentación, definen las condiciones a evaluar en el tercer bloque de ensayos.

En el segundo bloque, los ensayos de fermentación se evaluaron a 35°C, pH entre 6,20-7,00, concentración de carbohidratos desde 10 (A), 20 (B) y 25 (C) g/L y una velocidad de agitación de 50 RPM, todas las muestras fueron tomadas a intervalo de cuatro (4) horas, la figura 08 contiene la representación de cada uno de los parámetros medidos durante los ensayos de fermentación.

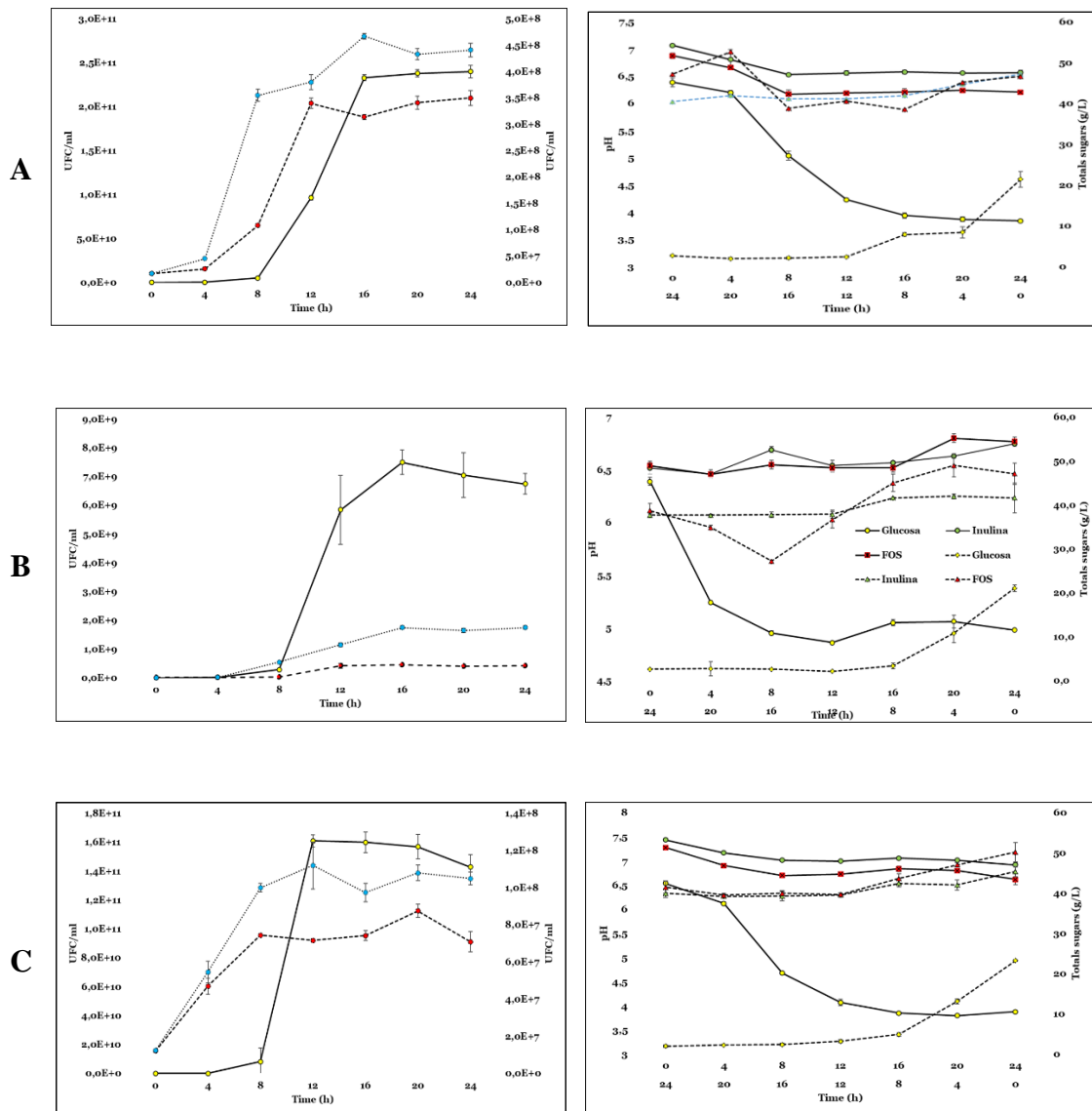




**Figura 8.** Crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C en un caldo de cultivo cuando la concentración y la fuente de carbono se cambiaron a 10 g/L (A), 20 g/L (B) y 25 g/L (C). Las curvas de crecimiento se trazan para glucosa —●—, inulina —◆— o FOS —●—...—●—. La fermentación se realizó a 35°C, 50 rpm y un pH entre 6,40 y 6,50 en todos los medios de cultivo. El pH y el consumo total de azúcar del medio de cultivo (gráficos de la derecha) se representan para glucosa —●—, inulina —●—, y FOS —◆—, glucosa —◆—, inulina —▲— y FOS —▲—, respectivamente.

### 3.1.3. Cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C cuando se modifica la velocidad de agitación en el medio de fermentación (Bloque 03)

En los primeros dos bloques se evaluaron la temperatura y la concentración de la fuente de carbono con el objetivo de evaluar cómo estas variables afectan el crecimiento y la cuantificación de células viables de *L. fermentum* UCO-979C. De los dos primeros ensayos se obtuvo alta viabilidad a 35°C y una concentración de fuente de carbono de 20 g/L y una alta viabilidad para la glucosa, por lo que; para el bloque tres, la fermentación se llevó a cabo a 35°C, 20 g/L como concentración de fuente de carbono y se varió la velocidad de agitación del medio a 0, 50 y 100 RPM, el pH del medio de cultivo se ha dejado entre 6,20-7,00. La fermentación se mantuvo bajo condiciones establecidas durante 24 horas. La figura 09 representa la cinética de crecimiento de la cepa bajo las condiciones antes mencionadas, los gráficos de la izquierda representan las UFC/ml para las distintas fuentes de carbono y los gráficos de la derecha representan el pH del medio de cultivo y el consumo de azúcares totales para las distintas fermentaciones.

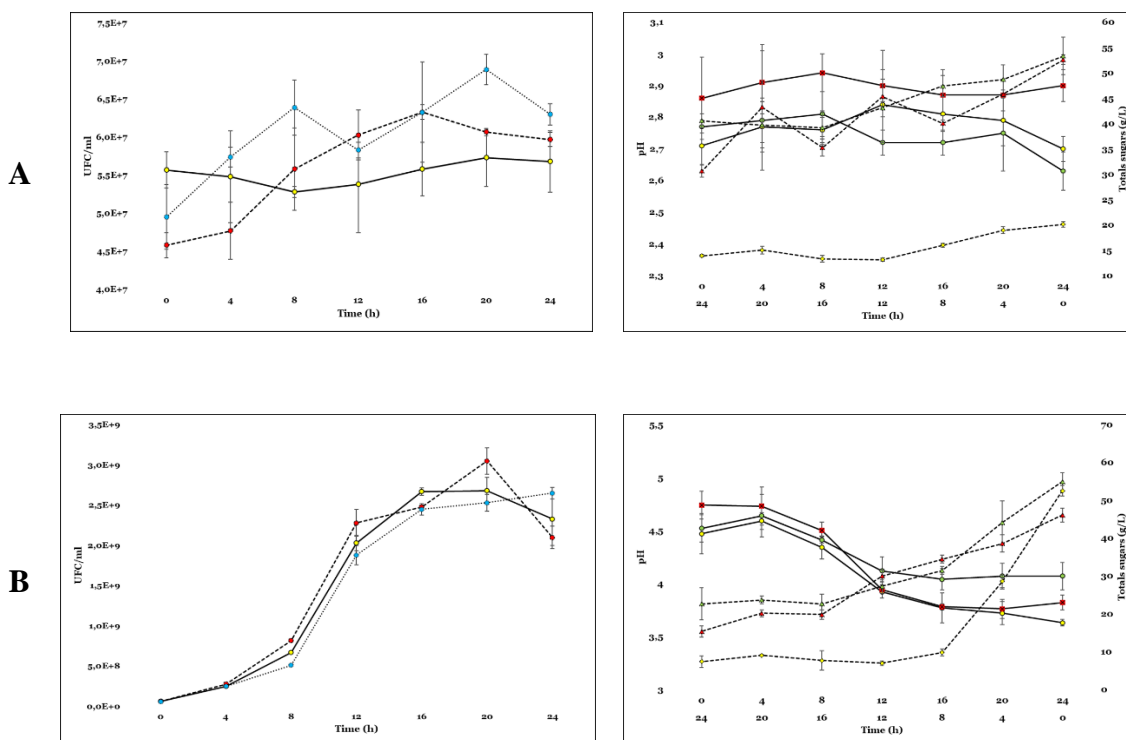


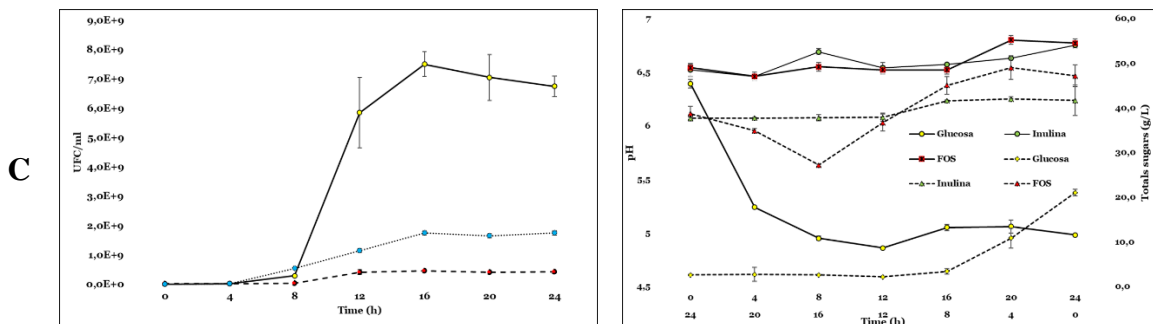
**Figura 9.** Cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C Cuando en el medio de cultivo se modifica la velocidad de agitación (gráficos de la izquierda) a (A) 0 RPM, (B) 50 RPM y (C) 100 RPM, las curvas muestran el crecimiento cuando en el medio de cultivo la fuente de carbono es glucosa —●—, inulina —◆— o FOS —■—. La fermentación se realizó a 35°C y a un pH entre 6,40 y 6,50 en todos los medios de cultivo. El pH y el consumo total de azúcar del medio de cultivo (gráficos de la derecha) se representan para glucosa —●—, inulina —◆—, y FOS —■—, glucosa —◆—, inulina —■— y FOS —■—, respectivamente.



### 3.1.4. Cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C cuando se modificó el pH inicial en el medio de fermentación (Bloque 04)

Los bloques de ensayos anteriores han definido las condiciones bajo las cuales se ha logrado obtener una viabilidad alta de *L. fermentum* UCO-979C, además, han dado detalle como las variables anteriormente evaluadas afectan la cinética y la viabilidad de la misma, es por esto, que las condiciones de fermentación en el bloque cuatro se realizaron con las variables determinadas como óptimas en los bloques anteriores, es decir, 35°C, 20 g/L de concentración de fuentes de carbono y una velocidad de agitación de 100 RPM. La figura 10 contiene detalles de la cinética de la cepa bajo las condiciones evaluadas en el bloque cuatro, para el cual se modifica el pH inicial del medio de cultivo a 2,70, 4,60 y 6,80.





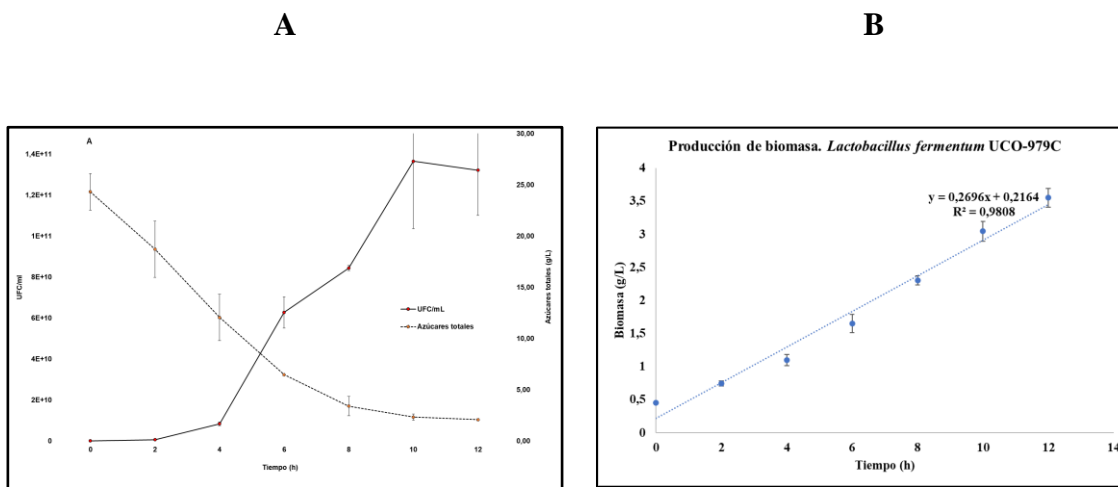
**Figura 10.** Cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C Cuando se modificó el pH inicial del medio de cultivo a pH 2,70 (A), 4,70 (B) y 6,80 (C), se representó el crecimiento de la cepa (gráficos de la izquierda) para diferentes fuentes de carbono para glucosa —○—, inulina -●- o FOS ...●... La fermentación se llevó a cabo a 35°C y a una velocidad de agitación de 100 RPM en todos los medios de cultivo. El pH y el consumo total de azúcar del medio de cultivo (gráficos de la derecha) se representan para glucosa —○—, inulina —●—, y FOS —■—, glucosa --◇--, inulina --▲-- y FOS --△--, respectivamente.

### 3.1.5. Escalamiento de la cepa en un biorreactor Batch bajo las condiciones determinadas en los bloques de ensayos

Una vez establecida la relación que existe entre las variables evaluadas y el crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C en los bloques anteriores, se decide escalar el crecimiento de la cepa bajo condiciones semi industriales, para ello se utilizó un biorreactor Batch de 50 litros de capacidad máxima, ocupando 30 litros para el ensayo de escalamiento, se realizó por duplicado, este equipo se encuentra dentro de las instalaciones del Laboratorio Pasteur, en el área de Investigación y Desarrollo (I+D).

Una vez culminado el proceso de fermentación se logró separar la biomasa según lo descrito anteriormente, la solución crio y lio-protectora consistió en una mezcla de inulina-leche descremada en polvo, se mezcló y se refrigeró durante 24 horas a -20°C y se procedió a liofilizar la biomasa por 48 horas bajo las condiciones antes especificadas, el total de biomasa seca (incluyendo la inulina y leche) para cada una de las corridas correspondió a aproximadamente 690 gramos con una viabilidad de  $2,37 \pm 0,03 \times 10^{14}$  UFC/g de biomasa

seca. La figura 11 contiene los datos recolectados para la cinética de crecimiento de la cepa en el biorreactor durante 12 horas de fermentación.

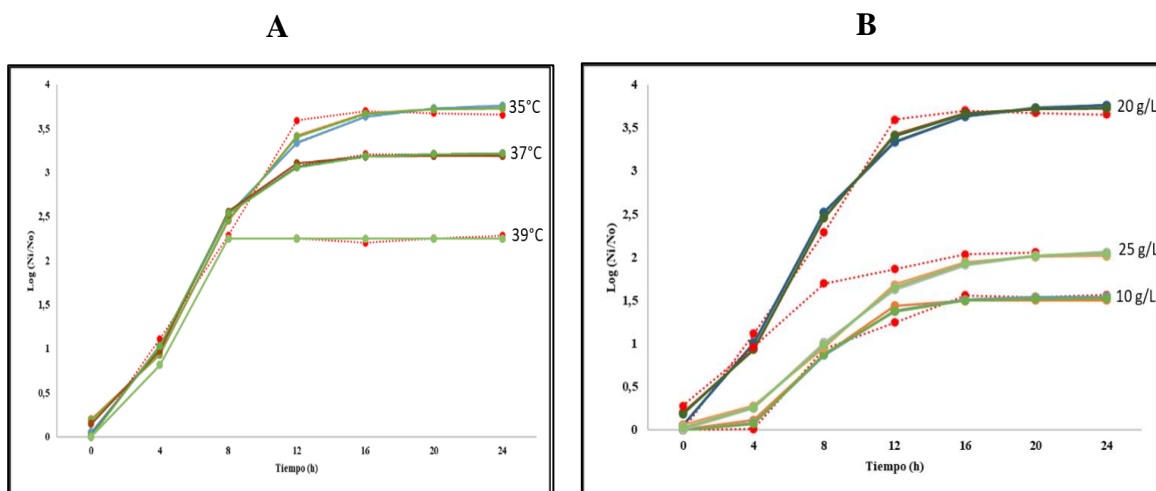


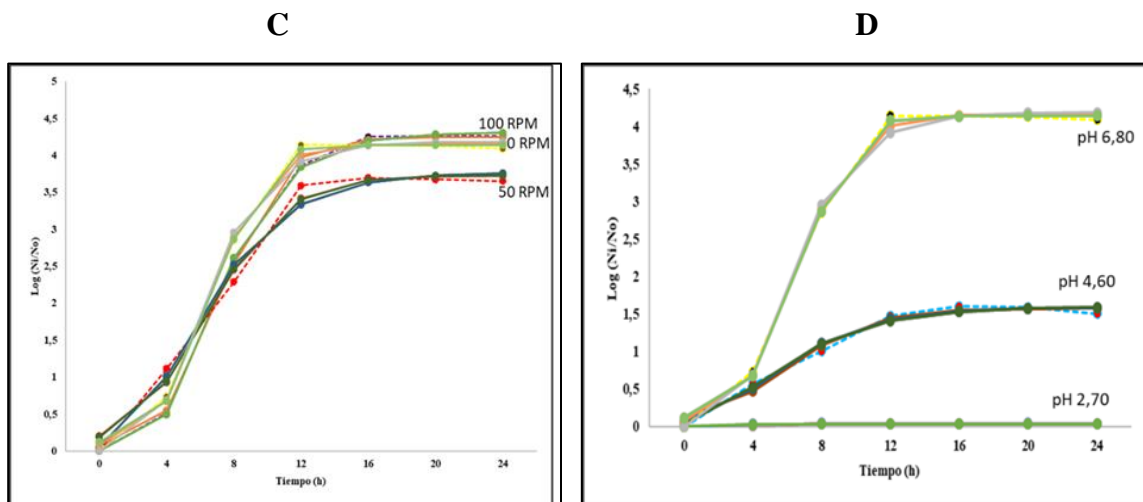
**Figura 11.** Cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C en un biorreactor Batch de 50 litros de capacidad, empleando como medio de fermentación caldo MRS comercial, durante 12 horas continuas, a una velocidad de agitación de 100 RPM, pH controlado entre 6,50-6,80, y una temperatura de fermentación de 35°C (figura 11A). La figura 11B contiene la biomasa celular por litro de cultivo contra el tiempo de ensayo.

### 3.1.6. Modelamientos matemáticos para cada una de las cinéticas de la cepa observadas bajo las distintas condiciones de fermentación evaluadas en cada bloque de ensayo

Los modelos matemáticos utilizados (tabla 01) se ajustaron por regresión no lineal de datos, según los datos recolectados para cada una de las variables, por lo que; las curvas se ajustaron de forma adecuada a los mismos, para poder establecer una relación entre el modelo que mejor se ajusta a los datos se empleó el criterio de Akaike corregido (AICc) y el coeficiente de determinación corregido ( $Rc^2$ ), los cuales consideran el número de parámetros en los modelos para ajustar los datos experimentales con los predichos por las ecuaciones empleadas.

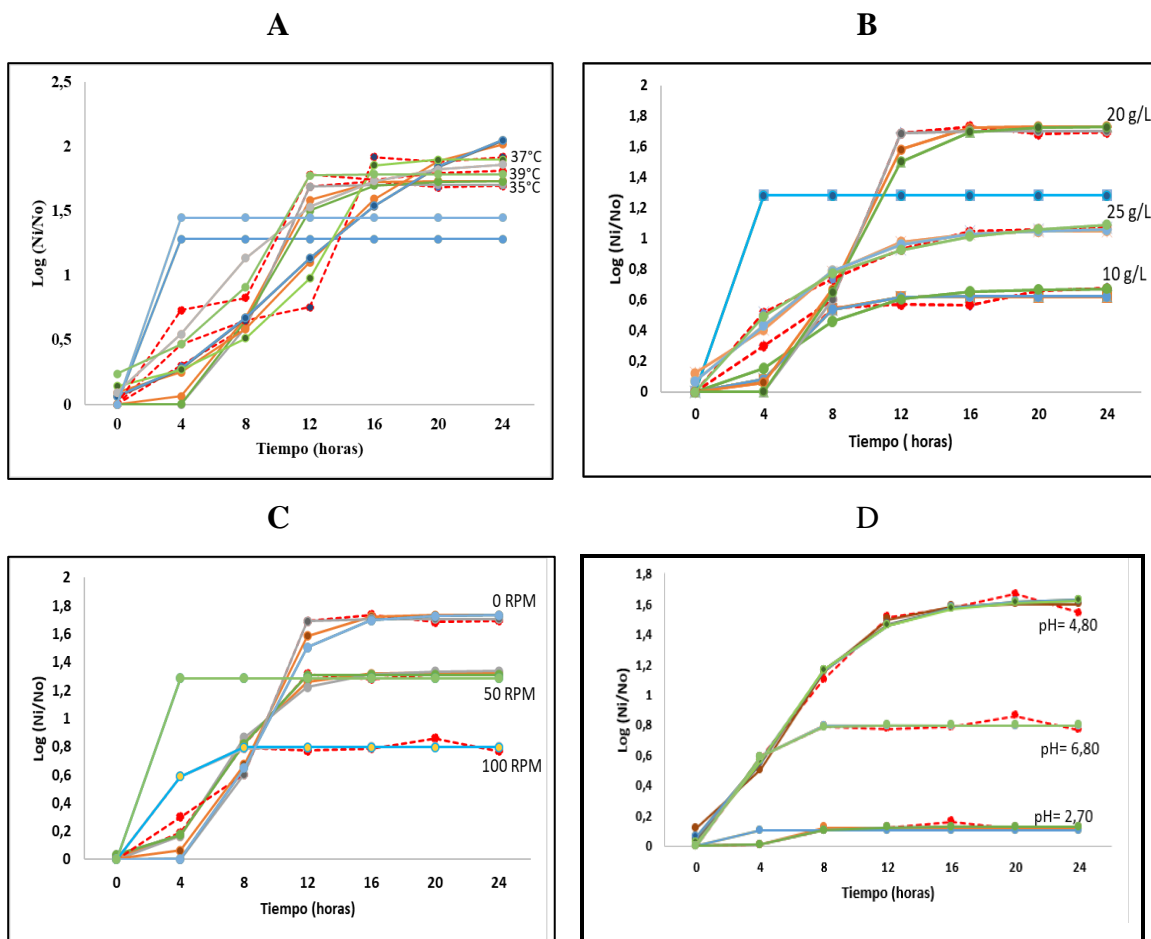
La figura 12 contiene de forma resumida las cinéticas de crecimiento de la cepa cuando en el medio de cultivo la fuente de carbono es la glucosa, evaluada a las diversas condiciones de fermentación, ésta representa la relación de crecimiento de la cepa ( $\text{Log}_{10} (\text{Ni}/\text{No})$ ) respecto al tiempo, además, muestra las curvas ajustadas según los modelos matemáticos utilizados para determinar los parámetros cinéticos de la cepa. La figura 12A describe la cinética cuando se varió la temperatura en el medio de cultivo (ANOVA de dos vías,  $p=0,01$ ), la figura 12B detalla la cinética de la cepa cuando se modificó la concentración de la fuente de carbono (ANOVA de dos vías,  $p < 0,05$ ), la figura 12C contiene la cinética de la cepa cuando se modificó la velocidad de agitación (test ANOVA,  $p=0,14$ ) y la figura 12D contiene la cinética de la cepa cuando se ha modificado el pH inicial del medio de cultivo (ANOVA de dos vías,  $p<0,05$ ). Por lo que; cuando se ha sustituido la fuente de carbono por inulina, glucosa o FOS en el medio de cultivo, existen diferencias significativas en el recuento viable de las UFC/ml de la cepa, por lo que; la cepa prefiere la glucosa como fuente de carbono, debido a la facilidad que ofrece el carbohidrato para estimular los procesos metabólicos de la misma.





**Figura 12.** Cinéticas de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C cuándo se empleó la glucosa como fuente de carbono en el medio de cultivo. Los modelos matemáticos modificados y ajustados están representados según: Experimentales  $\cdots$ , Logístico  $\square$ , Gompertz  $\circ$ , Richards  $\triangle$ , Stannard  $\diamond$ , Schnute  $\square$ .

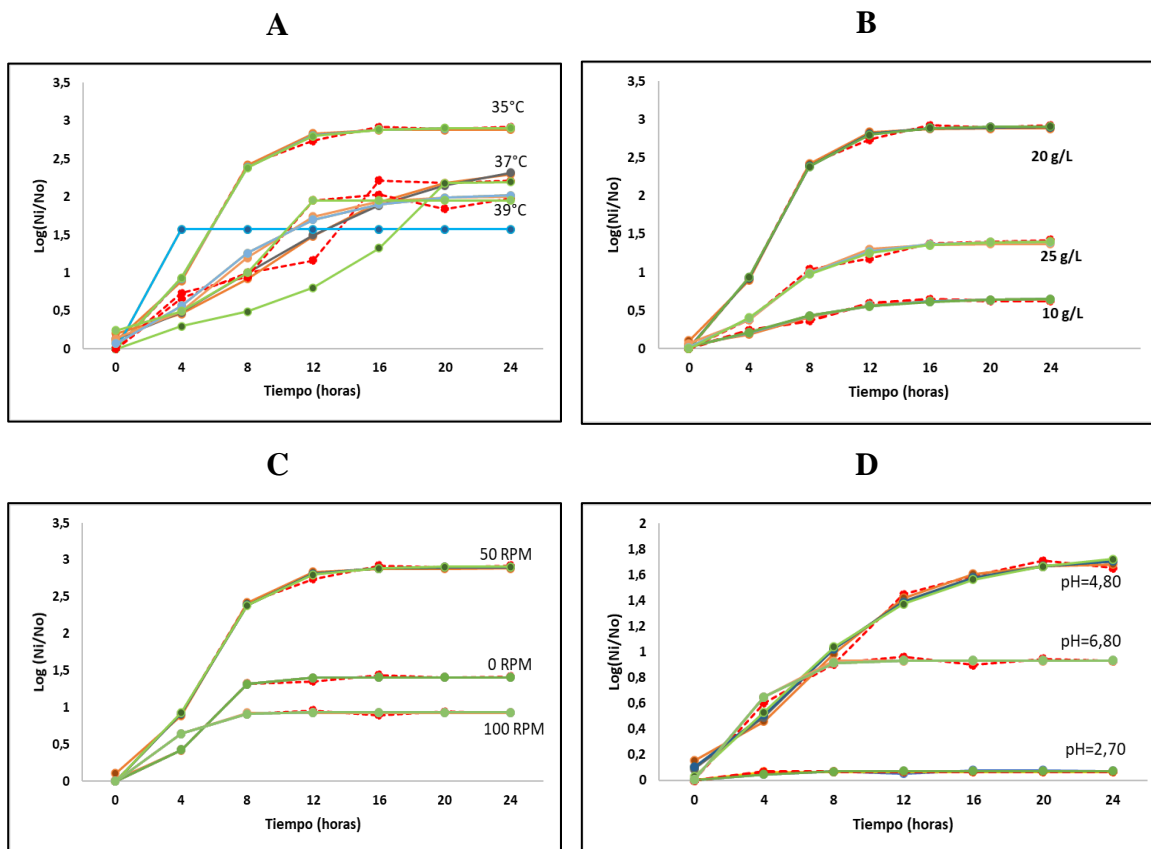
La figura 13 muestra los datos recolectados y ajustados a los modelos descriptivos para el crecimiento de la cepa cuando en el medio de cultivo se suplemento con inulina. **La figura 13A**, contiene la cinética cuando en el medio de cultivo se varió la temperatura a 35, 37 y 39°C, **la figura 13B**, representa la cinética de crecimiento de la cepa cuando se varió la concentración de la fuente de carbono en 10, 20 y 25 g/L en el medio de cultivo, **la figura 13C** muestra la cinética de la cepa cuando se varió la velocidad de agitación en el medio de cultivo en 0, 50 y 100 RPM, por lo que; **la figura 13D** muestra la cinética de la cepa cuando en el medio de cultivo se modificó el pH inicial del mismo.



**Figura 13.** Cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C cuando en el medio de cultivo se sustituyó la fuente de carbono por inulina, además, los modelos matemáticos ajustados a los datos experimentales. Los modelos matemáticos ajustados están representados según: Experimentales  $\cdots$ , Logístico  $\text{---}$ , Gompertz  $\text{---}$ , Richards  $\text{---}$ , Stannard  $\text{---}$ , Schnute  $\text{---}$ .

La figura 14 contiene los gráficos ajustados para cada uno de las variables cuando se suplemento el medio de cultivo con FOS, la figura 14A, contiene la cinética cuando en el medio de cultivo se varió la temperatura entre 35-39°C, la figura 14B, representa la cinética de crecimiento de la cepa cuando se varió la concentración de la fuente de carbono en 10, 20 y 25 g/L en el medio de cultivo, la figura 14C muestra la cinética de la cepa cuando se varió la velocidad de agitación en el medio de cultivo en 0, 50 y 100 RPM, por lo que; la figura

14D muestra la cinética de la cepa cuando en el medio de cultivo se modificó el pH inicial del medio de cultivo.

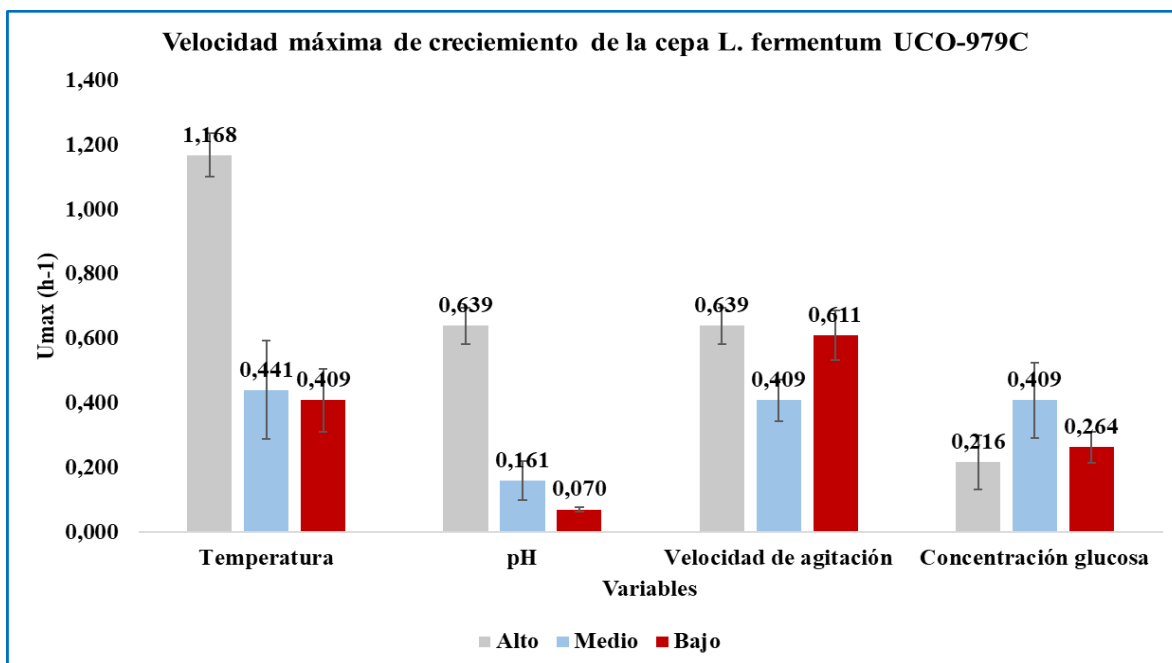


**Figura 14.** Cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C cuando en el medio de cultivo se sustituyó la fuente de carbono por FOS, además, los modelos matemáticos ajustados a los datos experimentales. Los modelos matemáticos ajustados están representados según: Experimentales  $\cdots$ , Logístico  $\text{---}$ , Gompertz  $\text{---}$ , Richards  $\text{---}$ , Stannard  $\text{---}$ , Schnute  $\text{---}$ .

### 3.1.7. Parámetros cinéticos estimados a partir de modelamientos matemáticos

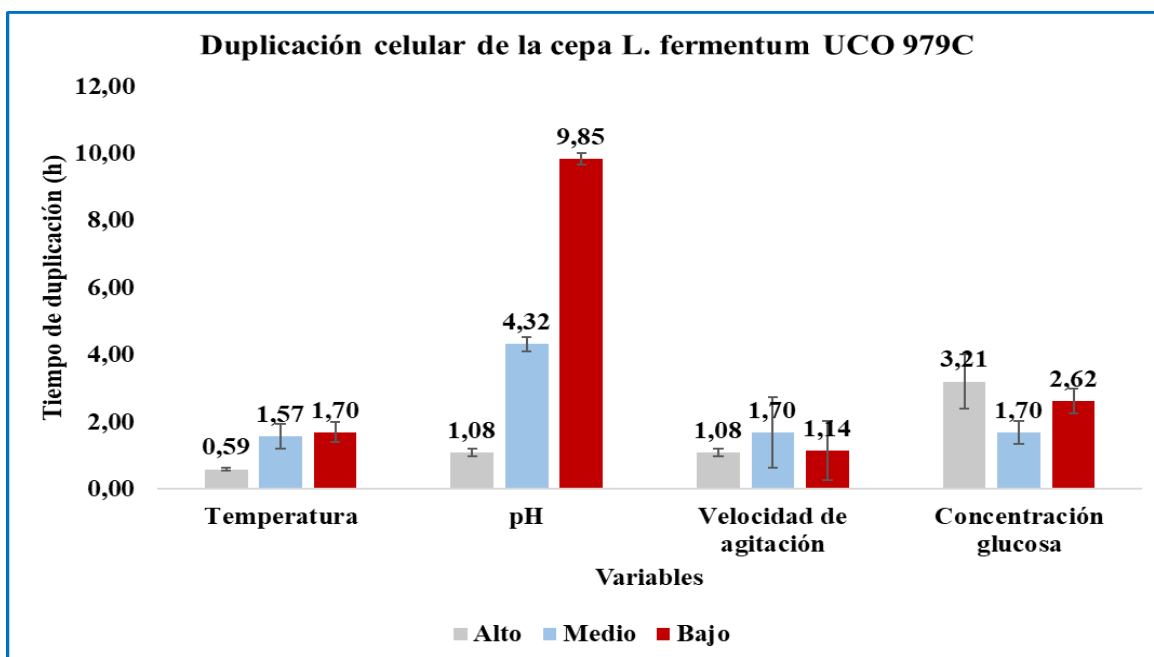
El ajuste de los datos experimentales de crecimiento microbiano a modelos matemáticos se debe principalmente al poder descriptivo de los parámetros relevantes sobre el crecimiento de la cepa bajo las condiciones de fermentación controlada, por lo que; facilita la comprensión de cómo estos parámetros limitan el crecimiento de la misma, la figura 15 contiene los valores estimados para la velocidad de crecimiento según el modelo Logistic

modificado para los tres niveles de cada una de las variables evaluadas, cuando en el medio de cultivo se utiliza como fuente de carbono glucosa, puede verse que a medida que la cepa se somete a condiciones extremas de temperatura y pH, la velocidad de crecimiento máxima disminuye su valor, afectando a la baja el recuento viable de la cepa, lo que implica que; la cepa está sometida a condiciones de estrés celular, limitando el aprovechamiento de sustrato, acelerando y limitando los procesos metabólicos, afectando de manera directa el tiempo de duplicación celular, en la figura 16 están contenidos los tiempos de duplicación celular, puede notarse que a medida que la velocidad de crecimiento máximo aumenta, los tiempos de duplicación celular disminuyen, es decir, la cepa está limitada para realizar los procesos metabólicos necesarios para aprovechar el sustrato disponible en el medio de cultivo, de esta manera poder realizar los procesos necesarios para hacer su división celular, debido a que las condiciones del medio de cultivo ofrecen condiciones desfavorables a los mismos.



**Figura 15.** Velocidad máxima de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C cuando en el medio de cultivo la fuente de carbono es glucosa y las variables se evalúan a tres niveles.





**Figura 16.** Tiempo de duplicación celular de *L. fermentum* UCO-979C cuando se han modificado el pH, la temperatura de fermentación, la velocidad de agitación y la concentración de glucosa en el medio de cultivo.

La tabla 05 contiene las diferencias significativas que existen en las velocidades máximas de crecimiento cuando se modifican las variables en el caldo de fermentación, por lo que; existen diferencias significativas cuando se modifica la temperatura y el pH del medio.

**Tabla 5.** Velocidades máximas de crecimiento de la cepa cuando se modifican las variables en el medio de cultivo. Se ha empleado Test ANOVA para evaluar diferencias significativas.

Parámetro	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	p ( $\alpha=0,05$ )
	± DE	± DE	± DE	
Nivel evaluado	Alto	Medio	Bajo	
Temperatura (°C)	1,168 ± 0,067	0,441 ± 0,153	0,409 ± 0,098	0,012
pH	0,639 ± 0,057	0,161 ± 0,060	0,070 ± 0,007	0,003
Velocidad de agitación	0,639 ± 0,057	0,409 ± 0,064	0,6106 ± 0,077	0,226
Glucosa g/L	0,216 ± 0,084	0,409 ± 0,116	0,264 ± 0,048	0,155

Las tablas 06, 07,08, 09 y 10 contienen de forma resumida los valores obtenidos para los modelos matemáticos ajustados a las cinéticas de crecimiento de la cepa *L. fermentum* UCO-979C cuando se modificó la fuente de carbono, le velocidad de agitación, el pH inicial del medio de cultivo, temperatura de fermentación y los datos recolectados durante la fermentación en el biorreactor, respectivamente.

**Tabla 6.** Parámetros cinéticos determinados para cada uno de los modelos matemáticos empleados para modelar la fermentación de la cepa cuando en el medio de cultivo se modificó la fuente de carbono y la temperatura de fermentación.

Temperatura	Modelos	Logistic Modificado			Gompertz Modificado			Richard Modificado			Stannard Modificado			Schnute Modificado		
	Parámetro	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS
T=35°C	A (Log (Ni/No))	3,7256	1,7328	2,8817	3,7741	1,7034	2,9023	3,7702	1,2837	2,9022	3,7702	1,2837	2,9022			
	Um (h-1)	0,4086	0,3050	0,4433	0,4094	0,7541	0,4731	0,0221	0,1395	0,0057	0,0221	0,1395	0,0057	0,4057	0,3058	0,4887
	λ (h)	1,9481	5,8068	2,0520	1,5399	7,2016	2,0444	1,5764	0,1243	2,0425	1,5764	0,1243	2,0425	1,8567	5,8743	2,0869
	v							0,0203	0,0031	0,0045	0,0203	0,0031	0,0045			
	a													0,4125	0,4860	0,4134
	b													-0,8329	-0,0247	0,1872
	Suma cuadrado del error	0,1398	0,0765	0,0252	0,1529	0,0920	0,0071	0,1521	2,1244	0,0071	0,1521	2,1244	0,0071	0,1396	0,1303	0,0065
	R^2	0,9901	0,9829	0,9976	0,9887	0,9846	0,9992	0,9887	0,3994	0,9992	0,9887	0,3994	0,9992	0,9901	0,9735	0,9992
T=37°C	A (Log (Ni/No))	3,1895	2,0948	2,3723	3,2165	2,3766	2,5491	3,2164	2,3793	1,5722	3,2164	2,3793	1,5722			
	Um (h-1)	0,4410	0,1379	0,1430	0,4632	0,1167	0,1340	0,0062	0,0037	0,1960	0,0062	0,0037	0,1960	0,4658	0,2970	0,2685
	λ (h)	1,8561	4,0012	1,5856	1,7718	2,2665	0,5652	1,7699	2,2292	0,2162	1,7699	2,2292	0,2162	1,7828	9,7512	7,8684
	v							0,0049	0,0117	0,0002	0,0049	0,0117	0,0002			
	a													0,3881	43,9642	44,2146
	b													0,0275	-274,464	-355,010
	Suma cuadrado del error	0,0287	0,2961	0,2760	0,0020	0,3449	0,2811	0,0020	0,3444	2,5117	0,0020	0,3444	2,5117	0,0020	0,1315	0,1838
	R^2	0,9980	0,9240	0,9406	0,9998	0,9111	0,9395	0,9998	0,9657	0,4576	0,9998	0,9657	0,4576	0,9998	0,9662	0,9609

<b>T=39°C</b>	<b>A (Log (Ni/No))</b>	2,2495	1,8465	2,0050	2,2484	1,8888	2,0399	2,2497	1,4481	2,0399	2,2497	1,4481	2,0399			
	<b>Um (h-1)</b>	1,1680	0,1589	0,1881	2,0178	0,1543	0,1823	0,7104	0,1672	0,0001	0,7104	0,1672	0,0001	2,6044	0,2922	0,3392
	<b>λ (h)</b>	3,3083	1,1753	1,6213	3,5953	0,4633	0,8938	3,2985	0,1626	0,8938	3,2985	0,1626	0,8938	3,7004	5,9201	5,9993
	<b>v</b>							0,3490	0,0143	0,0001	0,3490	0,0143	0,0001			
	<b>a</b>													6,1245	59,040	60,1252
	<b>b</b>													-2,0780	-353,389	-339,015
	<b>Suma cuadrado del error</b>	0,0035	0,1961	0,2128	0,0035	0,2021	0,2335	0,0035	1,3494	0,2335	0,0035	1,3494	0,2335	0,0035	0,1362	0,1385
	<b>R^2</b>	0,9993	0,9380	0,9446	0,9993	0,9360	0,9392	0,9993	0,5712	0,9854	0,9993	0,5712	0,9854	0,9993	0,9573	0,9392

**Tabla 7.** Parámetros cinéticos determinados para cada uno de los modelos matemáticos empleados para modelar la fermentación de la cepa cuando en el medio de cultivo se modificó la concentración y la fuente de carbono.

Concentración de Carbohidratos	Modelos Parámetros	Logistic Modificado			Gompertz Modificado			Richard Modificado			Stannard Modificado			Schnute Modificado		
		Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS
10 g/L	A (Log (Ni/No))	1,5027	0,6212	0,6417	1,5408	0,6238	0,6518	1,5408	0,6238	0,6519	1,5408	0,6238	0,6519			
	Um (h-1)	0,2641	0,1495	0,0597	0,2306	0,1503	0,0605	0,0001	0,0026	0,0004	0,0001	0,0026	0,0004	0,2376	0,0880	0,0623
	λ (h)	4,6826	3,8993	1,0129	4,1849	3,5583	0,6033	4,1861	3,5600	0,5835	4,1861	3,5600	0,5835	4,2114	2,2730	0,5575
	v							0,0001	0,0065	0,0022	0,0001	0,0065	0,0022			
	a													0,4075	0,3136	0,2177
	b													0,0710	0,2261	0,2988
	Suma cuadrado del error	0,0610	0,0098	0,0093	0,0299	0,0094	0,0081	0,0299	0,0094	0,0081	0,0299	0,0094	0,0081	0,0284	0,0210	0,0079
R^2	0,9806	0,9793	0,9759	0,9976	0,9802	0,9787	0,9976	0,9802	0,9788	0,9976	0,9802	0,9788	0,9908	0,9596	0,9791	
20 g/L	A (Log (Ni/No))	3,7256	1,7328	2,8817	3,7741	1,7034	2,9023	3,7702	1,2837	2,9022	3,7702	1,2837	2,9022			
	Um (h-1)	0,4086	0,3050	0,4433	0,4094	0,7541	0,4731	0,0221	0,1395	0,0057	0,0221	0,1395	0,0057	0,4057	0,3058	0,4887
	λ (h)	1,9481	5,8068	2,0520	1,5399	7,2016	2,0444	1,5764	0,1243	2,0425	1,5764	0,1243	2,0425	1,8567	5,8743	2,0869
	v							0,0203	0,0031	0,0045	0,0203	0,0031	0,0045			
	a													0,4125	0,4860	0,4134
	b													-0,8329	-0,0247	0,1872
	Suma cuadrado	0,1398	0,0765	0,0252	0,1529	0,0920	0,0071	0,1521	2,1244	0,0071	0,1521	2,1244	0,0071	0,1396	0,1303	0,0065

<b>del error</b>																
<b>R^2</b>	0,9901	0,9829	0,9976	0,9887	0,9846	0,9992	0,9887	0,3994	0,9992	0,9887	0,3994	0,9992	0,9901	0,9735	0,9992	
<b>A (Log (Ni/No))</b>	2,0189	1,0506	1,3728	2,0798	1,0631	1,4004	2,0512	1,0633	1,4004	2,0512	1,0633	1,4004				
<b>Um (h-1)</b>	0,2162	0,1012	0,1684	0,2049	0,1087	0,1647	0,1321	0,0025	0,0007	0,1321	0,0025	0,0007	0,2073	0,1631	0,1701	
<b>λ (h)</b>	3,5871	0,0000	1,9295	3,0459	0,0000	1,6213	3,2400	0,0007	1,6196	3,2400	0,0007	1,6196	3,2350	0,0000	1,6101	
<b>v</b>							0,3740	0,0068	0,0015	0,3740	0,0068	0,0015				
<b>a</b>														0,3248	0,1450	0,2725
<b>b</b>														-0,3748	0,9999	0,3299
<b>Suma cuadrado del error</b>	0,0131	0,0336	0,0258	0,0110	0,0167	0,0129	0,0089	0,0167	0,0129	0,0089	0,0167	0,0129	0,0089	0,0032	0,0111	
<b>R^2</b>	0,9973	0,9674	0,9876	0,9975	0,9833	0,9933	0,9980	0,9829	0,9933	0,9980	0,9829	0,9933	0,9980	0,9966	0,9943	

**Tabla 8.** Parámetros cinéticos determinados para cada uno de los modelos matemáticos empleados para modelar la fermentación de la cepa cuando en el medio de cultivo se modificó la fuente de carbono y la velocidad de agitación.

Velocidad De agitación	Modelos	Logistic			Gompertz			Richard			Stannard			Schnute		
		Modificado			Modificado			Modificado			Modificado			Modificado		
		Parámetros	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina
<b>ORPM</b>	<b>A (Log (Ni/No))</b>	4,2446	1,3227	1,4063	4,3118	1,3369	1,4083	4,3118	1,3099	1,4085	4,3118	1,3099	1,4085			
	<b>Um (h-1)</b>	0,6106	0,2045	0,318	0,5812	0,1927	0,3748	0,0044	0,3188	0,0043	0,0044	0,3188	0,0043	0,5812	0,2668	0,3758
	<b>λ (h)</b>	3,8341	3,8948	2,7185	3,3808	3,3357	2,8659	3,3841	4,9317	2,86	3,3841	4,9317	2,86	3,3776	4,9328	2,8687
	<b>v</b>							0,0028	3,5025	0,0043	0,0028	3,5025	0,0043			
	<b>a</b>													0,3651	1,41	0,7219
	<b>b</b>													0,007	-3,5063	0,0094
	<b>Suma cuadrado del error</b>	0,0211	0,0055	0,0043	0,0071	0,0131	0,0038	0,007	0,0028	0,0038	0,007	0,0028	0,0038	0,0073	0,0028	0,0038
	<b>R^2</b>	0,9991	0,9972	0,998	0,9997	0,9935	0,9982	0,9997	0,9987	0,9982	0,9997	0,9987	0,9982	0,9996	0,9987	0,9982
<b>50 RPM</b>	<b>A (Log (Ni/No))</b>	3,7256	1,7328	2,8817	3,7741	1,7034	2,9023	3,7702	1,2837	2,9022	3,7702	1,2837	2,9022			
	<b>Um (h-1)</b>	0,4086	0,305	0,4433	0,4094	0,7541	0,4731	0,0221	0,1395	0,0057	0,0221	0,1395	0,0057	0,4057	0,3058	0,4887
	<b>λ (h)</b>	1,9481	5,8068	2,052	1,5399	7,2016	2,0444	1,5764	0,1243	2,0425	1,5764	0,1243	2,0425	1,8567	5,8743	2,0869
	<b>v</b>							0,0203	0,0031	0,0045	0,0203	0,0031	0,0045			
	<b>a</b>													0,4125	0,486	0,4134
	<b>b</b>													-0,8329	-0,0247	0,1872
	<b>Suma cuadrado del error</b>	0,1398	0,0765	0,0252	0,1529	0,092	0,0071	0,1521	2,1244	0,0071	0,1521	2,1244	0,0071	0,1396	0,1303	0,0065
	<b>R^2</b>	0,9901	0,9829	0,9976	0,9887	0,9846	0,9992	0,9887	0,3994	0,9992	0,9887	0,3994	0,9992	0,9901	0,9735	0,9992
<b>100 RPM</b>	<b>A (Log (Ni/No))</b>	4,1591	0,7952	0,9287	4,1883	0,7972	0,9323	4,1394	0,7952	0,9223	4,1394	0,7952	0,9223			
	<b>Um (h-1)</b>	0,6393	0,4013	0,3787	0,6363	0,2351	0,2528	0,8184	0,6954	0,0104	0,8184	0,6954	0,0104	0,7059	0,2342	0,253
	<b>λ (h)</b>	3,3926	2,4884	2,2634	3,012	1,2592	1,2762	3,9205	3,0206	1,2711	3,9205	3,0206	1,2711	3,9207	1,2483	1,2763
	<b>v</b>							2,0736	1,8286	0,0155	2,0736	1,8286	0,0155			
	<b>a</b>													0,9008	0,7982	0,7342

<b>b</b>														-2,0738	0,0008	0,0095
<b>Suma</b>																
<b>cuadrado del error</b>	0,0324	0,0055	0,0023	0,0756	0,0054	0,002	0,0244	0,0054	0,002	0,0244	0,0054	0,002	0,0244	0,0054	0,002	
<b>R^2</b>	0,9983	0,9898	0,9984	0,9961	0,9899	0,9972	0,9989	0,9898	0,9972	0,9989	0,9898	0,9972	0,9989	0,9899	0,9972	

---



**Tabla 9.** Parámetros cinéticos determinados para cada uno de los modelos matemáticos empleados para modelar la fermentación de la cepa cuando en el medio de cultivo se modificó la fuente de carbono y el pH inicial.

pH inicial del medio de cultivo	Modelos	Logistic			Gompertz			Richard			Stannard			Schnute			
		Modificado			Modificado			Modificado			Modificado			Modificado			
	Parámetros	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS	Glucosa	Inulina	FOS	
pH=2,70	A (Log (Ni/No))	0,0411	0,1221	0,0692	0,0411	0,1271	0,0695	0,0362	0,1033	0,0653	0,0362	0,1033	0,0653				
	Um (h-1)	0,0704	0,1352	0,1336	0,0500	0,0304	0,0217	0,0501	0,1268	0,1268	0,0501	0,1268	0,1268	0,0097	0,0304	0,0135	
	$\lambda$ (h)	3,8390	4,1161	3,6543	3,7626	3,9732	1,8536	0,2236	0,1268	0,1268	0,2236	0,1268	0,1268	0,7153	3,9683	0,5517	
	v							0,2096	0,0717	0,0717	0,2096	0,0717	0,0717				
	a													0,7943	0,6467	0,5227	
	b													-0,2831	0,0093	0,0094	
	Suma cuadrado del error		0,0002	0,0002	0,0005	0,0002	0,0017	0,0005	0,0009	0,0127	0,0010	0,0009	0,0127	0,0010	0,0006	0,0017	0,0005
	R <sup>2</sup>		0,8982	0,9048	0,8917	0,8982	0,9241	0,8923	0,5507	0,4183	0,7926	0,5507	0,4183	0,7926	0,7318	0,9241	0,8952
pH=4,60	A (Log (Ni/No))	1,5769	1,5998	1,6888	1,5963	1,6202	1,7326	1,5908	1,6309	1,7354	1,5908	1,6309	1,7354				
	Um (h-1)	0,1605	0,1726	0,1398	0,1646	0,1770	0,1389	0,0748	0,0018	0,0088	0,0748	0,0018	0,0088	0,1672	0,1820	0,1457	
	$\lambda$ (h)	1,1757	1,1701	0,9491	0,8680	0,9101	0,4589	0,8925	0,6457	0,2464	0,8925	0,6457	0,2464	0,8537	0,9176	0,3536	
	v							0,2287	0,0039	0,0249	0,2287	0,0039	0,0249				
	a													0,2607	0,2670	0,1631	
	b													0,1608	0,2367	0,5021	
	Suma cuadrado del error		0,0401	0,0331	0,0538	0,3133	0,0197	0,0410	0,0314	0,0198	0,0412	0,0314	0,0198	0,0412	0,0310	0,0188	0,0377
	R <sup>2</sup>		0,9837	0,9875	0,9798	0,9866	0,9920	0,9843	0,9863	0,9922	0,9846	0,9863	0,9922	0,9846	0,9866	0,9922	0,9855
pH=6,80	A (Log (Ni/No))	4,1591	0,7952	0,9287	4,1883	0,7972	0,9323	4,1394	0,7952	0,9223	4,1394	0,7952	0,9223				

<b>Um (h-1)</b>	0,6393	0,4013	0,3787	0,6363	0,2351	0,2528	0,8184	0,6954	0,0104	0,8184	0,6954	0,0104	0,7059	0,2342	0,2530
<b>λ (h)</b>	3,3926	2,4884	2,2634	3,0120	1,2592	1,2762	3,9205	3,0206	1,2711	3,9205	3,0206	1,2711	3,9207	1,2483	1,2763
<b>v</b>							2,0736	1,8286	0,0155	2,0736	1,8286	0,0155			
<b>a</b>													0,9008	0,7982	0,7342
<b>b</b>													-2,0738	0,0008	0,0095
<b>Suma cuadrado del error</b>	0,0324	0,0055	0,0023	0,0756	0,0054	0,0020	0,0244	0,0054	0,0020	0,0244	0,0054	0,0020	0,0244	0,0054	0,0020
<b>R^2</b>	0,9983	0,9898	0,9984	0,9961	0,9899	0,9972	0,9989	0,9898	0,9972	0,9989	0,9898	0,9972	0,9989	0,9899	0,9972

---

**Tabla 10.** Parámetros determinados para cada uno de los modelos matemáticos empleados para el ajuste de datos experimentales observados durante la fermentación realizada en el biorreactor batch.

T 35°C	Modelos Parámetro	Logístico Modificado	Gompertz Modificado	Richards Modificado	Stannard Modificado	Schnute Modificado
Biorreac tor Batch	A (Log (Ni/No)	3,6747	3,7370	3,7352	3,7352	
	Um (h-1)	0,7622	0,7702	0,0213	0,0213	0,7693
	$\lambda$ (h)	0,5020	0,3518	0,3583	0,3583	0,3458
	v			0,0103	0,0103	
	a					0,5564
	b					0,0083
	Suma cuadrado del error	0,1539	0,0511	0,0521	0,0521	0,0505
	R <sup>2</sup>	0,9875	0,9959	0,9956	0,9958	0,9959

### 3.1.8. Análisis estadístico para el ajuste cinético de los modelos matemáticos

La selección del modelo matemático que mejor representa la cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C se hace por los criterios de selección de los parámetros de Akaike corregido (AICc), por lo que; el modelo que tuviese el menor valor de AICc se seleccionó como el modelo adecuado para representar los datos en el modelo matemático ajustado. Las tablas 11 y 12 contienen de forma resumida los parámetros estadísticos calculados para las variables ensayadas durante el crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C.

Todos los cálculos han sido realizados empleando una hoja de cálculo de Excel, para lo cual se ha incluido el valor medio de cada medida y se ha estimado cada uno de los parámetros con las ecuaciones 01, 02, 03 y 04 establecidas para evaluar la calidad de ajuste de los modelos

**Tabla 11.** Análisis estadístico para la discriminación del modelo matemático de ajuste para la cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C en un medio al cual se le ha

modificado la fuente de carbono, la temperatura de fermentación y la concentración de la fuente de carbono.

	Fuente de carbono: Glucosa				Fuente de carbono: Inulina				Fuente de carbono: FOS				
	Modelos	R <sup>2</sup>	Rc <sup>2</sup>	AIC	AICc	R <sup>2</sup>	Rc <sup>2</sup>	AIC	AICc	R <sup>2</sup>	Rc <sup>2</sup>	AIC	AICc
35°C	<b>Logístico</b>	0,9897	0,9793	-3,8977	<b>16,1023</b>	0,9784	0,9567	-5,7293	<b>14,2707</b>	0,9970	0,9939	-9,1100	10,8900
	<b>Gompertz</b>	0,9887	0,9774	-3,6237	16,3763	0,9740	0,9480	-5,1694	14,8306	0,9992	0,9983	-12,9843	<b>7,0157</b>
	<b>Richards</b>	0,9887	0,9662	-1,6390	58,3610	0,3994	-0,8019	6,3748	66,3748	0,9991	0,9974	-10,9704	49,0296
	<b>Stannards</b>	0,9887	0,9662	-1,6390	58,3610	0,3994	-0,8019	6,3748	66,3748	0,9991	0,9974	-10,9704	49,0296
	<b>Schnute</b>	0,9897	0,9690	-1,9015	58,0985	0,9632	0,8895	-2,1115	57,8885	0,9992	0,9977	-11,2437	48,7563
37°C	<b>Logístico</b>	0,9971	0,9942	-8,7124	11,2876	0,9236	0,8472	-1,6158	<b>18,3842</b>	0,9404	0,8808	-1,8294	<b>18,1706</b>
	<b>Gompertz</b>	0,9998	0,9996	-16,7745	<b>3,2255</b>	0,9110	0,8220	-1,1515	18,8485	0,9393	0,8786	-1,7734	18,2266
	<b>Richards</b>	0,9998	0,9994	-14,7621	45,2379	0,9111	0,7334	0,8437	60,8437	0,4576	-0,6272	6,8838	66,8838
	<b>Stannards</b>	0,9998	0,9994	-14,7621	45,2379	0,9111	0,7334	0,8437	60,8437	0,4576	-0,6272	6,8838	66,8838
	<b>Schnute</b>	0,9998	0,9994	-14,7917	45,2083	0,9661	0,8983	-2,0855	57,9145	0,7168	0,1505	4,9077	64,9077
39°C	<b>Logístico</b>	0,9999	0,9997	-15,0946	4,9054	0,9377	0,8754	-2,8688	<b>17,1312</b>	0,9445	0,8890	-2,6199	<b>17,3801</b>
	<b>Gompertz</b>	0,9999	0,9997	-15,1065	<b>4,8935</b>	0,9358	0,8715	-2,7757	17,2243	0,9391	0,8782	-2,3388	17,6612
	<b>Richards</b>	0,9999	0,9996	-13,1065	46,8935	0,5712	-0,2865	4,9955	64,9955	0,9391	0,8173	-0,3388	59,6612
	<b>Stannards</b>	0,9999	0,9996	-13,1065	46,8935	0,5712	-0,2865	4,9955	64,9955	0,9391	0,8173	-0,3388	59,6612
	<b>Schnute</b>	0,9999	0,9996	-15,1065	44,8935	0,9567	0,8701	-3,9759	56,0241	0,9639	0,8916	-3,9253	56,0747
10 g/L	<b>Logístico</b>	0,9794	0,9588	-6,4216	13,5784	0,9793	0,9586	-11,9725	8,0275	0,9750	0,9499	-12,1241	7,8759
	<b>Gompertz</b>	0,9899	0,9798	-8,5858	<b>11,4142</b>	0,9802	0,9603	-12,0972	<b>7,9028</b>	0,9784	0,9568	-12,5753	<b>7,4247</b>
	<b>Richards</b>	0,9899	0,9697	-6,5862	53,4138	0,9801	0,9404	-10,0952	49,9048	0,9784	0,9352	-10,5706	49,4294
	<b>Stannards</b>	0,9899	0,9697	-6,5862	53,4138	0,9801	0,9404	-10,0952	49,9048	0,9784	0,9352	-10,5706	49,4294
	<b>Schnute</b>	0,9904	0,9712	-6,7423	53,2577	0,9557	0,8670	-7,6543	52,3457	0,9789	0,9367	-10,6444	49,3556

<b>20 g/L</b>	<b>Logistico</b>	0,9897	0,9793	-3,8977	<b>16,1023</b>	0,9784	0,9567	-5,7293	<b>14,2707</b>	0,9970	0,9939	-9,1100	10,8900
	<b>Gompertz</b>	0,9887	0,9774	-3,6237	16,3763	0,9740	0,9480	-5,1694	14,8306	0,9992	0,9983	-12,9843	<b>7,0157</b>
	<b>Richards</b>	0,9887	0,9662	-1,6390	58,3610	0,3994	-0,8019	6,3748	66,3748	0,9991	0,9974	-10,9704	49,0296
	<b>Stannards</b>	0,9887	0,9662	-1,6390	58,3610	0,3994	-0,8019	6,3748	66,3748	0,9991	0,9974	-10,9704	49,0296
	<b>Schnute</b>	0,9897	0,9690	-1,9015	58,0985	0,9632	0,8895	-2,1115	57,8885	0,9992	0,9977	-11,2437	48,7563
<b>25 g/L</b>	<b>Logistico</b>	0,9970	0,9941	11,0866	8,9134	0,9642	0,9285	-8,2330	11,7670	0,9864	0,9728	-9,0395	10,9605
	<b>Gompertz</b>	0,9975	0,9950	11,6343	<b>8,3657</b>	0,9822	0,9645	10,3597	<b>9,6403</b>	0,9932	0,9864	11,1527	<b>8,8473</b>
	<b>Richards</b>	0,9980	0,9940	10,2790	49,7210	0,9821	0,9462	-8,3294	51,6706	0,9932	0,9796	-9,1469	50,8531
	<b>Stannards</b>	0,9980	0,9940	10,2790	49,7210	0,9821	0,9462	-8,3294	51,6706	0,9932	0,9796	-9,1469	50,8531
	<b>Schnute</b>	0,9980	0,9940	12,2788	47,7212	0,9966	0,9899	15,4027	44,5973	0,9942	0,9825	11,6076	48,3924

**Tabla 12.** Análisis estadístico para la discriminación del modelo matemático de ajuste para la cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C en un medio al cual se le ha modificado la fuente de carbono, la velocidad de agitación y el pH inicial del medio de cultivo.

	Fuente de carbono: Glucosa				Fuente de carbono: Inulina				Fuente de carbono: FOS				
	Modelos	R <sup>2</sup>	Rc <sup>2</sup>	AIC	AICc	R <sup>2</sup>	Rc <sup>2</sup>	AIC	AICc	R <sup>2</sup>	Rc <sup>2</sup>	AIC	AICc
<b>0 RPM</b>	<b>Logístico</b>	0,9990	0,9980	-9,6519	10,3481	0,9972	0,9945	-13,7288	<b>6,2712</b>	0,9979	0,9959	-14,4978	5,5022
	<b>Gompertz</b>	0,9997	0,9993	-12,9479	<b>7,0521</b>	0,9934	0,9869	-11,1029	8,8971	0,9982	0,9964	-14,8640	<b>5,1360</b>
	<b>Richards</b>	0,9997	0,9990	-10,9774	49,0226	0,9986	0,9958	-13,7756	46,2244	0,9982	0,9945	-12,8682	47,1318
	<b>Stannards</b>	0,9997	0,9990	-10,9774	49,0226	0,9986	0,9958	-13,7756	46,2244	0,9982	0,9945	-12,8682	47,1318
	<b>Schnute</b>	0,9996	0,9989	-10,8645	49,1355	0,9986	0,9958	-13,7681	46,2319	0,9982	0,9945	-12,8646	47,1354
<b>50 RPM</b>	<b>Logístico</b>	0,9897	0,9793	-3,8977	<b>16,1023</b>	0,9784	0,9567	-5,7293	<b>14,2707</b>	0,9970	0,9939	-9,1100	10,8900
	<b>Gompertz</b>	0,9887	0,9774	-3,6237	16,3763	0,9740	0,9480	-5,1694	14,8306	0,9992	0,9983	-12,9843	<b>7,0157</b>
	<b>Richards</b>	0,9887	0,9662	-1,6390	58,3610	0,3994	-0,8019	6,3748	66,3748	0,9991	0,9974	-10,9704	49,0296
	<b>Stannards</b>	0,9887	0,9662	-1,6390	58,3610	0,3994	-0,8019	6,3748	66,3748	0,9991	0,9974	-10,9704	49,0296
	<b>Schnute</b>	0,9897	0,9690	-1,9015	58,0985	0,9632	0,8895	-2,1115	57,8885	0,9992	0,9977	-11,2437	48,7563
<b>100 RPM</b>	<b>Logístico</b>	0,9983	0,9966	-8,3437	<b>11,6563</b>	0,9898	0,9796	-13,7481	6,2519	0,9969	0,9937	-16,3656	3,6344
	<b>Gompertz</b>	0,9960	0,9921	-5,7653	14,2347	0,9899	0,9798	-13,7792	<b>6,2208</b>	0,9972	0,9945	-16,7699	<b>3,2301</b>
	<b>Richards</b>	0,9987	0,9962	-7,2007	52,7993	0,9898	0,9694	-11,7477	48,2523	0,9972	0,9917	-14,7774	45,2226
	<b>Stannards</b>	0,9987	0,9962	-7,2007	52,7993	0,9898	0,9694	-11,7477	48,2523	0,9972	0,9917	-14,7774	45,2226
	<b>Schnute</b>	0,9987	0,9962	-9,2008	50,7992	0,9899	0,9697	-13,7789	46,2211	0,9972	0,9917	-16,7711	43,2289
<b>pH= 2,5</b>	<b>Logístico</b>	0,8980	0,7960	-23,6884	<b>-3,6884</b>	0,9048	0,8097	-16,6876	3,3124	0,8918	0,7835	-21,0347	-1,0347
	<b>Gompertz</b>	0,8980	0,7960	-23,6884	<b>-3,6884</b>	0,9243	0,8486	-17,3835	<b>2,6165</b>	0,8920	0,7840	-21,0417	<b>-1,0417</b>
	<b>Richards</b>	0,5506	- 0,3481	-17,1803	42,8197	0,4181	-0,7457	-9,1829	50,8171	0,7931	0,3793	-17,0651	42,9349
	<b>Stannards</b>	0,5506	- 0,3481	-17,1803	42,8197	0,4181	-0,7457	-9,1829	50,8171	0,7931	0,3793	-17,0651	42,9349

	<b>Schnute</b>	0,7200	0,1599	-18,6180	41,3820	0,9243	0,7729	-15,3835	44,6165	0,8952	0,6857	-19,1343	40,8657
	<b>Logístico</b>	0,9825	0,9650	-7,6910	12,3090	0,9860	0,9721	-8,2739	11,7261	0,9787	0,9575	-6,7997	13,2003
	<b>Gompertz</b>	0,9863	0,9727	-8,4431	<b>11,5569</b>	0,9917	0,9834	-9,8587	<b>10,1413</b>	0,9838	0,9676	-7,6296	<b>12,3704</b>
<b>pH= 4,5</b>	<b>Richards</b>	0,9856	0,9569	-6,2918	53,7082	0,9912	0,9737	-7,6857	52,3143	0,9835	0,9504	-5,5624	54,4376
	<b>Stannards</b>	0,9856	0,9569	-6,2918	53,7082	0,9912	0,9737	-7,6857	52,3143	0,9835	0,9504	-5,5624	54,4376
	<b>Schnute</b>	0,9865	0,9595	-6,4790	53,5210	0,9912	0,9737	-7,6857	52,3143	0,9854	0,9563	-5,9479	54,0521
	<b>Logístico</b>	0,9983	0,9966	-8,3437	<b>11,6563</b>	0,9898	0,9796	-13,7481	6,2519	0,9969	0,9937	-16,3656	3,6344
	<b>Gompertz</b>	0,9960	0,9921	-5,7653	14,2347	0,9899	0,9798	-13,7792	<b>6,2208</b>	0,9972	0,9945	-16,7699	<b>3,2301</b>
<b>pH=6,87</b>	<b>Richards</b>	0,9987	0,9962	-7,2007	52,7993	0,9898	0,9694	-11,7477	48,2523	0,9972	0,9917	-14,7774	45,2226
	<b>Stannards</b>	0,9987	0,9962	-7,2007	52,7993	0,9898	0,9694	-11,7477	48,2523	0,9972	0,9917	-14,7774	45,2226
	<b>Schnute</b>	0,9987	0,9962	-9,2008	50,7992	0,9899	0,9697	-13,7789	46,2211	0,9972	0,9917	-16,7711	43,2289

### 3.2.Dimensionamiento del biorreactor

La tabla 13 contiene los resultados obtenidos para la concentración de biomasa producida respecto al tiempo, además, los valores determinados para el consumo de azúcares totales, estos datos fueron obtenidos a partir del escalamiento para la producción de biomasa de la cepa en un biorreactor de 50 litros de capacidad bajo las condiciones óptimas estimadas anteriormente.

**Tabla 13.** Colección de datos para la producción de biomasa y consumo de sustrato en el biorreactor para *L. fermentum* UCO-979C a 35°C, pH 6,50-6,70, velocidad de agitación de 100 RPM y MRS caldo como medio de cultivo.

Tiempo (h)	Azúcares totales (g/L)				Biomasa (g/L)			
	Azúcares 01	Azúcares 02	Promedio	Desviación Estándar	Biomasa (g/L)	Biomasa (g/L)	Promedio	Desviación Estándar
0	23,05	25,58	24,31	1,79	0,45	0,45	0,45	0,00
2	16,77	20,65	18,71	2,75	0,72	0,77	0,75	0,11
4	10,46	13,66	12,06	2,26	1,16	1,04	1,1	0,08
6	6,47	6,46	6,46	0,01	1,75	1,55	1,65	0,14

8	2,73	4,07	3,40	0,94	2,35	2,25	2,3	0,07
10	2,12	2,55	2,33	0,30	2,94	3,15	3,05	0,15
12	2,04	2,11	2,08	0,05	3,45	3,65	3,55	0,14

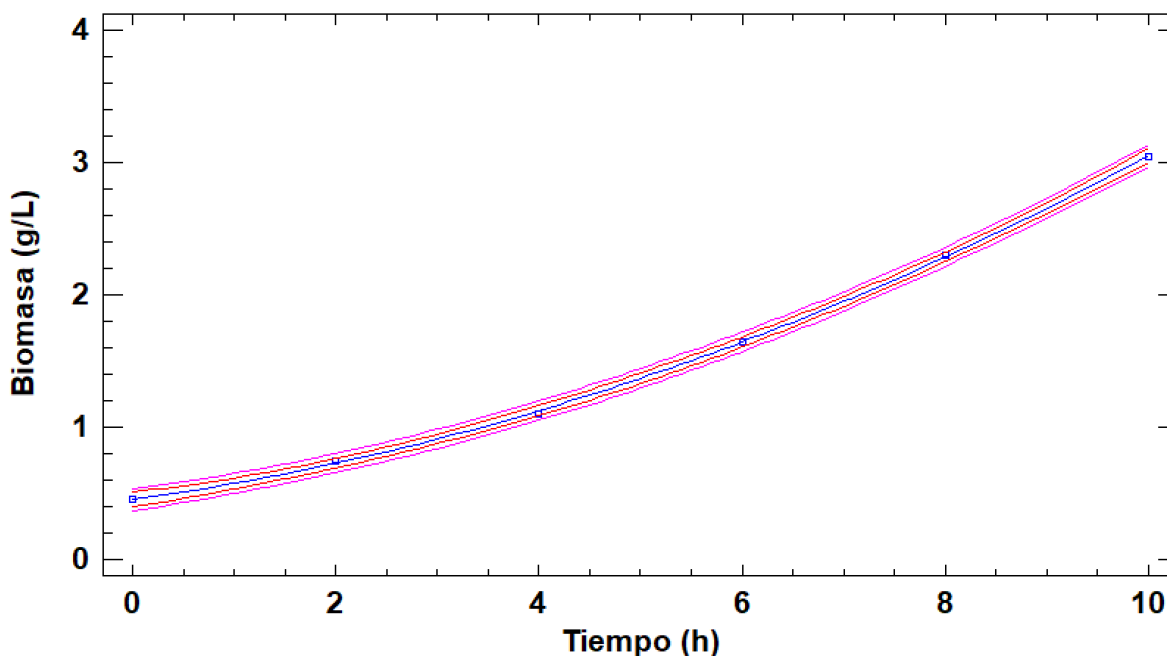
Para obtener una relación numérica de la biomasa producida respecto al tiempo se estimará por regresión no lineal de los datos una ecuación polinomial, que permita evaluar la derivada de la producción de biomasa con respecto al tiempo, de esta forma poder evaluar la ecuación de diseño del biorreactor. Además, se estimará la ecuación de diseño empleando la diferenciación numérica, estas dos formas de cálculo permiten establecer condiciones comparativas para la estimación de parámetros

### 3.2.1. Ajuste polinomial de los datos

La producción de biomasa respecto al tiempo puede modelarse por ajuste polinomial de datos, para ello; se emplea el software estadístico Statgraphics Centurion-XVI, la figura 17 contiene la representación polinomial de los datos, además, la calidad de ajuste se evalúa por análisis de varianza para determinar si existe relación entre la variable biomasa y el tiempo. Los intervalos de predicción y de confianza corresponden a los valores internos (amarillo) y externos (morado) en la figura 17 respectivamente.



**Gráfica del Modelo Ajustado**



**Figura 17.** Ajuste polinomial de los datos de biomasa respecto al tiempo para *L. fermentum* UCO-979C cuando se emplea caldo MRS como medio de cultivo en un biorreactor Batch.

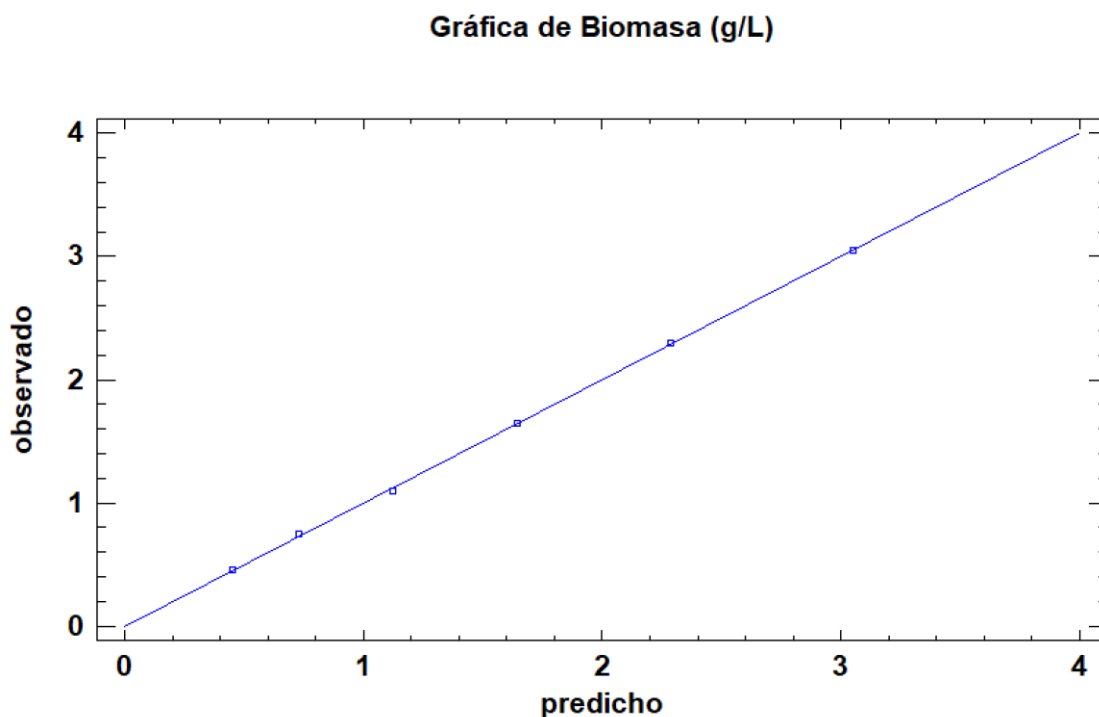
El modelo polinomial ajustado tiene la siguiente forma: **Biomasa (g/L)** = 0,453214 + 0,106732\*T+0,015313\*T<sup>2</sup>; T, en horas. Un análisis de varianza para un análisis estadístico ANOVA existe un valor p= 0,0001 < 0,05, por lo que existe una relación estadísticamente significativa entre la biomasa (g/L) y el tiempo (h) con un nivel de confianza del 95%, con un valor de R<sup>2</sup>= 0,9998, por lo que; el modelo ajustado explica el 99,98% de la variabilidad en Biomasa (g/L). La tabla 14 contiene los intervalos de confianza para cada uno de los coeficientes del modelo, los cuales muestran con que precisión pueden estimarse los coeficientes.

**Tabla 14.** Intervalos de confianza del 95,0% para los coeficientes estimados del modelo.

<b>Parámetro</b>	<b>Estimado</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Límite Inferior</b>	<b>Límite Superior</b>
<b>CONSTANTE</b>	0,453214	0,017926	0,396166	0,510262

<b>T (h)</b>	0,106732	0,008843	0,079902	0,133563
<b>T<sup>2</sup> (h)</b>	0,015313	0,000809	0,012737	0,017888

La figura 18 contiene el gráfico correspondiente a las predicciones respecto a los observados experimentalmente para la biomasa (g/L), lo cual demuestra la calidad de ajuste del modelo estimando los valores observados experimentalmente, además, el valor del error estándar de la estimación es de 0,0964, el cual puede usarse para obtener nuevos valores de predicción dentro de los límites establecidos.



**Figura 18.** Estimación del valor de biomasa (g/L) respecto a los valores predichos por el modelo.

Para establecer la relación de producción de biomasa respecto al tiempo se deriva la función polinómica en función del tiempo ( $0,0300646 \cdot T + 0,106732$ ). La tabla 15 contiene los valores estimados para el valor de la derivada y las relaciones matemáticas necesarias para dar solución numérica a la ecuación 12 del balance de masa.

**Tabla 15.** Colección de datos para evaluar la derivada de la función polinómica de la producción de biomasa respecto al tiempo.

Tiempo (h)	Cb (g/L)	Derivada de la			
		función polinómica	Cb/der	Cs	1/cs
0	0,45 ± 0,00	0,1067	4,2162	24,32 ± 1,79	0,04 ± 0,01
2	0,75 ± 0,04	0,1680	4,4350	18,71 ± 2,74	0,05 ± 0,01
4	1,10 ± 0,08	0,2292	4,7986	12,06 ± 2,26	0,08 ± 0,02
6	1,65 ± 0,14	0,2905	5,6802	6,47 ± 0,01	0,15 ± 0,01
8	2,30 ± 0,07	0,3517	6,5391	3,40 ± 0,95	0,31 ± 0,09
10	3,05 ± 0,15	0,4130	7,3732	2,34 ± 0,30	0,43 ± 0,06

Una vez obtenido los valores para las relaciones numéricas para evaluar el balance de masa se realiza una estimación no lineal de datos, para estimar los parámetros de la ecuación de la ecuación de Monod,  $K_s$  y  $\mu_{max}$ .

$$\frac{C_B}{\frac{dC_b}{dt}} = \frac{K_s}{\mu_{max}} * \left(\frac{1}{C_s}\right) + \frac{1}{\mu_{max}}$$

Empleando el software STATICGRAPHIC para realizar la regresión no lineal de datos, empleando el método de cálculo de Marquardt, el cual estima por minimización de cuadrado de los errores entre los valores predichos y los observados. La tabla 16 contiene los valores estimados para  $K_s$  y  $\mu_{m\acute{a}x}$ . con sus intervalos de confianza al 95%.

**Tabla 16.** Parámetros cinéticos del modelo del Monod para la producción de biomasa de la cepa *L. fermentum* UCO-979C.

Parámetro	Estimado	Inferior ( $\alpha= 0,05$ )	Superior ( $\alpha= 0,05$ )
$K_s$	1,9537	1,34894	2,5584

$\mu_{\text{máx.}}$ 

0,2439

0,2196

0,2683

Para dimensionar el reactor en función de la biomasa producida y el consumo de sustrato a determinado volumen de reacción se reordena la ecuación 12.

$$\frac{dC_b}{dt} = \mu_{\text{max}} * \frac{C_s}{K_s + C_s} * C_B$$

Debido a que; la solución numérica de la ecuación 12 permite estimar la cantidad de biomasa producida a partir de un volumen de caldo a emplear durante un tiempo de fermentación, se emplea los datos obtenidos para dimensionar un volumen de fermentación efectivo. En este caso se han empleado 30 litros de caldo durante 12 horas de fermentación. Reordenando la ecuación 12 podremos estimar la cantidad de biomasa total.

Para cada tiempo se sustituye los valores correspondiente y se estima el total de biomasa producida, para el tiempo 0 horas será:

**t=0 horas**,  $C_{b0}= 0,45 \text{ g/L}$ ,  $C_{s0}= 24,32 \text{ g/L}$ ,  $K_s=1,9537 \text{ g/L}$  y  $\mu_{\text{máx.}}=0,2439 \text{ h}^{-1}$

$$\frac{dC_b}{dt} = 0,2439 \text{ h}^{-1} \frac{24,32 \frac{\text{g}}{\text{L}}}{1,9537 \frac{\text{g}}{\text{L}} + 24,32 \frac{\text{g}}{\text{L}}} * 0,45 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 0,1016 \frac{\text{g}}{\text{L} * \text{h}}$$

**t=2 horas**,  $C_{b0}= 0,45 \text{ g/L}$ ,  $C_{s0}= 24,32 \text{ g/L}$ ,  $K_s=1,9537 \text{ g/L}$  y  $\mu_{\text{máx.}}=0,2439 \text{ h}^{-1}$

$$\frac{dC_b}{dt} = 0,2439 \text{ h}^{-1} \frac{18,71 \frac{\text{g}}{\text{L}}}{1,9537 \frac{\text{g}}{\text{L}} + 18,71 \frac{\text{g}}{\text{L}}} * 0,75 \frac{\text{g}}{\text{L}} = 0,1645 \frac{\text{g}}{\text{L} * \text{h}}$$

**Diferencia de las derivadas** entre t=0 horas y t=2 horas:

$$\left(\frac{dC_b}{dt}\right)_{t=0 \text{ horas}} - \left(\frac{dC_b}{dt}\right)_{t=2 \text{ horas}} = \text{biomasa producida} = 0,0629 \frac{\text{g}}{\text{L} * \text{h}}$$

La tabla 17 contiene el estimado total de las derivadas y la producción de biomasa para cada intervalo de tiempo, el cual se ha calculado por la diferencia entre el valor de la derivada al

tiempo  $t_i$  y el tiempo  $t_{i+1}$ , permitiendo obtener el total de biomasa producida en función del volumen y el tiempo de fermentación.

**Tabla 17.** Estimado de las derivadas para la producción de biomasa para el tiempo de fermentación.

<b>Tiempo</b>	<b>Derivada</b>	<b>Diferencia de las derivadas</b>
0	0,1016	
2	0,1645	0,0629
4	0,2309	0,0664
6	0,3090	0,0782
8	0,3563	0,0472
10	0,4044	0,0481
12	0,4465	0,0421
<b>Total</b>	<b>Para 12 horas: 1,9115 g/Lh</b>	<b>Para 12 horas: 0,3449 g/Lh</b>
	<b>Para 10 horas: 1,4650 g/Lh</b>	<b>Para 10 horas: 0,3028 g/Lh</b>

Cálculo del total de biomasa seca producida para 12 horas de fermentación y 30 litros de caldo MRS ocupado durante el ensayo:

$$\text{gramos de biomasa total} = 0,3449 \frac{g}{L * h} * 30 L * 12 h = 124,1640 \text{ gramos}$$

Debido a que la cantidad de biomasa seca total producida es aproximadamente 90 gramos, el error de estimación será:

$$\% \text{ Error de estimación} = \frac{(124,1640 - 90)g}{90 g} * 100\% = 37,93 \%$$

Este error de estimación es alto, se debe principalmente a que los datos de estimación de las derivadas están considerados durante las primeras 10 horas de fermentación, esto se debe principalmente a que la concentración de glucosa a las 12 horas es prácticamente el mismo valor a la concentración de glucosa a las 10 horas, por lo que; este cálculo podría estar sobre estimado, considerando a la glucosa como reactivo limitante. Si se considera la producción

de biomasa efectiva durante las primeras 10 horas de fermentación el error de estimación será:

$$\% \text{ Error de estimación} = \frac{0,3028 \frac{g}{Lh} * 30 L * 10 h - 90 g}{90 g} * 100\% = 0,93 \%$$

### 3.2.2. Solución de la derivada por el método de diferenciación numérica

La solución a la derivada por el método de diferenciación numérica se realizó según lo descrito por Fogler S. [41], el cual consiste en evaluar las derivadas para cada tiempo por ecuaciones diferenciales (ecuación 13 para el punto inicial, ecuación 14 para los puntos intermedios y la ecuación 15 para el punto final), para lo cual se obtendrá la variación numérica de la biomasa respecto al tiempo, para ello el intervalo de tiempo debe ser equidistante, la colección de datos obtenidos permite resolver numéricamente la ecuación 9, es un método bastante sencillo y rápido de resolución. La tabla 18 contiene de forma resumida los valores obtenidos por dicho método.

$$\frac{dC_b}{dt}_{T_0} = \frac{1}{2 * \Delta T} * (-3 * C_{b0} + 4 * C_{b1} - C_{b2}) \quad \text{Ecuación 13}$$

$$\frac{dC_b}{dt}_{T_i} = \frac{1}{2 * \Delta T} * (C_{b(i+1)} - C_{b(i-1)}) \quad \text{Ecuación 14}$$

$$\frac{dC_b}{dt}_{T_F} = \frac{1}{2 * \Delta T} * (C_{b4} - 4 * C_{b6} + 3 * C_{b7}) \quad \text{Ecuación 15}$$

**Dónde:**  $C_b$ , es la concentración de biomasa para cada tiempo evaluado.  $C_{b(i+1)}$ , es la concentración de biomasa correspondiente al tiempo siguiente del valor  $i$  evaluado.  $C_{b(i-1)}$ , es la concentración de biomasa correspondiente al tiempo anterior al valor  $i$  evaluado. Los subíndices 0,1,2..., corresponden al orden de toma de datos para el tiempo  $t$ .

La tabla 18 contiene los estimados para las derivadas de las concentraciones de biomasa respecto al tiempo, los cuales fueron estimados por uso de las ecuaciones 13, 14 y 15 para los diversos intervalos de tiempo. Estos resultados serán ajustados por regresión no lineal a

la ecuación 12, de esta manera estimar el volumen del reactor que permite la producción de biomasa deseada, según el tiempo de operación.

$$\frac{C_B}{\frac{dC_b}{dt}} = \frac{K_S}{\mu_{max}} * \left(\frac{1}{C_S}\right) + \frac{1}{\mu_{max}}$$

**Tabla 18.** Estimación de las derivadas por el método de diferenciación numérica.

Tiempo (h)	Cb promedio (g/L)	Cs promedio (g/L)	dCb/dt promedio (g/L*h)	Cb/(dCb/dt) promedio (h)	1/Cs Promedio (L/g)
0	0,45 ± 0,00	24,32 ± 1,79	0,14 ± 0,06	3,27 ± 1,60	0,04 ± 0,01
2	0,75 ± 0,04	18,71 ± 2,74	0,16 ± 0,02	4,62 ± 0,82	0,05 ± 0,01
4	1,10 ± 0,08	12,06 ± 2,26	0,23 ± 0,04	4,89 ± 0,59	0,08 ± 0,02
6	1,65 ± 0,14	6,47 ± 0,01	0,30 ± 0,07	5,50 ± 0,54	0,15 ± 0,01
8	2,30 ± 0,07	3,40 ± 0,95	0,35 ± 0,07	6,57 ± 1,61	0,31 ± 0,09
10	3,05 ± 0,15	2,34 ± 0,30	0,43 ± 0,00	7,09 ± 0,35	0,43 ± 0,06

Muestra de cálculo para el tiempo T=0 horas usando la ecuación 13:

$$\frac{dC_b}{dt}_{t=0 \text{ horas}} = \frac{1}{2 * 2} * (-3 * 0,45 + 4 * 0,75 - 1,10) = 0,1375 \frac{g}{L * h}$$

$$\frac{dC_b}{dt}_{t=2 \text{ horas}} = \frac{1}{2 * 2} * (1,10 - 0,45) = 0,163 \frac{g}{L * h}$$

### 3.2.3. Regresión no lineal de los datos

Haciendo uso de la ecuación 12 se realizó una regresión no lineal de los datos, empleando el software Statgraphics Centurion-XVI, por lo que; se obtiene una ecuación con dos incógnitas,  $K_S$  y  $\mu_{max}$ , el criterio de convergencia es la minimización de la suma de los cuadrados de los residuos de los valores estimados y los valores observados, empleando el método de estimación Gauss-Newton, además, considerar que el incremento importante de biomasa se realiza durante las primeras 10 horas, puede notarse en la tabla 13 que el valor de la

concentración de carbohidrato es aproximadamente igual al valor de las 12 horas, considerando a la glucosa como reactivo limitante, no se considera este valor para el análisis de datos. Para la estimación de  $K_s$  y  $\mu_{max}$  se consideraron los datos entre 0-10 horas de proceso, debido a que en ese intervalo se encuentra la fase exponencial de crecimiento.

Sustituyendo para cada tiempo  $t$ , el valor correspondiente a su valor de derivada contenidos en la tabla 18 en la ecuación 12, además, el valor de la concentración glucosa y la concentración de biomasa para cada tiempo.

$$\frac{C_B}{\frac{dC_b}{dt}} = \frac{K_s}{\mu_{max}} * \left(\frac{1}{C_S}\right) + \frac{1}{\mu_{max}} \quad \mathbf{1 \ Ecuación, 2 \ incognitas (K_s, \mu_{max})}$$

Haciendo regresión no lineal de los datos se obtiene el valor de  $K_s$  y  $\mu_{max}$ , el cuadrado medio del error resultó ser de 0,2862, el cual es el criterio de convergencia, el estadístico  $R^2=0,8757$ , de esta manera el ajuste explica el 87,57% de la variabilidad en el término  $C_b/(dC_b/dt)$  en la ecuación 12. Estos valores estimados para la cinética de la cepa permite relacionar la velocidad de crecimiento microbiano con el consumo de sustrato en el medio, la tabla 19 contiene un resumen de los parámetros cinéticos estimados para la cepa cuando se considera el consumo de sustrato en el medio, es importante notar que la velocidad máxima de crecimiento es **0,2567 h-1** por la ecuación de **Monod**, a diferencia del valor obtenido para el modelo de **Gompertz y Logistic modificado** para el cual se obtuvo **0,7702 h-1 y 0,7622 h-1** para la velocidad máxima de crecimiento, los cuales representan valores sobreestimados, la ecuación de Monod considera este parámetro con el metabolismo de sustrato de la cepa en el proceso de fermentación.

**Tabla 19.** Parámetros cinéticos de la cepa *L. fermentum* UCO-979C estimadas por la ecuación de Monod.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor ± DE</b>
<b>Constante de Monod, <math>K_s</math> (g/L)</b>	2,1065 ± 0,3820
<b>Velocidad máxima de crecimiento, <math>U_{max}</math> (h-1)</b>	0,2567 ± 0,0174
<b>Tiempo de duplicación (h)</b>	2,7002 ± 0,1955



<b>Rendimiento, <math>Y_{x/s}</math> (gramos de biomasa/gramos de glucosa)</b>	$0,1181 \pm 0,0012$
<b>Tiempo de adaptación, <math>\lambda</math> (h)</b>	$0,3518 \pm 0,0071$

Por lo que reacomodando la ecuación 12 para estimar la velocidad de reacción para la cinética de producción de biomasa de la cepa en cuestión, en función del consumo de sustrato, tiempo de operación y volumen de caldo de fermentación, será:

$$\frac{dC_b}{dt} = \mu_{max} * \frac{C_s}{K_s + C_s} * C_B$$

$$\frac{dC_b}{dt} = \frac{0,2567}{h} * \frac{C_s}{2,1065 \frac{g}{L} + C_s} * C_B$$

Empleando la ecuación 12 y sustituyendo los valores correspondientes para  $C_{s_i}$ ,  $C_{b_i}$  puede estimarse la producción de biomasa seca para el proceso de fermentación, considerando 30 litros de caldo de cultivo, además, sustituyendo los valores de  $\mu_{max}$  y  $K_s$ , podemos estimar la cantidad biomasa que se producirá hipotéticamente para intervalo de tiempo.

Para cada tiempo se sustituye los valores correspondiente y se estima el total de biomasa producida, para:

**t=0 horas**,  $C_{b_0} = 0,45$  g/L,  $C_{s_0} = 24,32$  g/L,  $K_s = 2,1065$  g/L y  $\mu_{m\acute{a}x.} = 0,2567$  h<sup>-1</sup>

$$\frac{dC_b}{dt} = 0,2567 \text{ h}^{-1} * \frac{24,32 \frac{g}{L}}{2,1065 \frac{g}{L} + 24,32 \frac{g}{L}} * 0,45 \frac{g}{L} = 0,1063 \frac{g}{L * h}$$

**t=2 horas**,  $C_{b_1} = 0,75$  g/L,  $C_{s_0} = 18,71$  g/L,  $K_s = 2,1065$  g/L y  $\mu_{m\acute{a}x.} = 0,2567$  h<sup>-1</sup>

$$\frac{dC_b}{dt} = 0,2567 \text{ h}^{-1} * \frac{18,71 \frac{g}{L}}{2,1065 \frac{g}{L} + 18,71 \frac{g}{L}} * 0,75 \frac{g}{L} = 0,1730 \frac{g}{L * h}$$

**Diferencia de las derivadas** entre t=0 horas y t=2 horas:

$$\left(\frac{dC_b}{dt}\right)_{t=0 \text{ horas}} - \left(\frac{dC_b}{dt}\right)_{t=2 \text{ horas}} = \text{biomasa producida} = 0,0667 \frac{g}{L * h}$$

**Tabla 20.** Valores estimados para el balance de masa por el método de regresión no lineal de los datos observados experimentalmente.

Tiempo (h)	Cb (g/L)	derivada calculada	Diferencia de las derivadas
0	0,45	0,1063	
2	0,75	0,1730	0,0667
4	1,1	0,2404	0,0673
6	1,65	0,3195	0,0791
8	2,3	0,3645	0,0451
10	3,045	0,4109	0,0464
12	3,55	0,4528	0,0418
<b>Total</b>		<b>Para 12 horas: 2,0674</b>	<b>Para 12 horas: 0,3465</b>
		<b>Para 10 horas: 1,6147</b>	<b>Para 10 horas: 0,3046</b>

Cálculo del total de biomasa seca producida para 12 horas de fermentación y 30 litros de caldo MRS ocupado durante el ensayo:

$$\text{gramos de biomasa total} = 0,3465 \frac{g}{L * h} * 30 L * 12 h = 124,7400 \text{ gramos}$$

Debido a que la cantidad de biomasa seca total producida es aproximadamente 90 gramos, el error de estimación para 12 y 10 horas de proceso, respectivamente, será:

$$\% \text{ Error de estimación} = \frac{(124,7400 - 90)g}{90 g} * 100\% = 38,60 \%$$

$$\% \text{ Error de estimación} = \frac{0,3046 \frac{g}{Lh} * 30 L * 10 h - 90 g}{90 g} * 100\% = 1,53 \%$$

Por lo que considerando que hasta ese momento se han producido aproximadamente 90 gramos de biomasa (690 gramos de biomasa que contiene 400 g de leche y 200 gramos de inulina), lo que permite determinar el error de estimación para la ecuación 12, el cual resulta ser de 38,60% cuando se consideran 12 horas de proceso y de 1,53% cuando se consideran 10 horas de proceso. Las consideraciones y simplificaciones que se han considerado parecen no ejercer un efecto significativo para la producción de biomasa bajo las condiciones establecidas, por lo que; el cálculo indica que se requiere como mínimo un volumen de 30 litros de caldo de fermentación para producir  $3,05 \pm 0,15$  gramos de biomasa por litro de caldo de fermentación, considerando que estas estimaciones están establecidas para el final de la fase exponencial o inicio de la fase de latencia. Además, el volumen del biorreactor a utilizar debe ser estimado con un porcentaje de sobredimensionamiento (generalmente 30%), el volumen del reactor a ocupar debe ser de por lo menos 40 litros.

#### **3.2.4. Dimensionamiento del biorreactor**

Para el dimensionamiento del biorreactor se supondrá una superficie inferior circular y cuerpo recto, por lo que; se estimará el volumen del reactor con la ecuación 16, para lo que se considera que el valor del diámetro del biorreactor será de  $2/3$  el valor de la altura, según la ecuación 17.

$$V = \frac{\pi}{4} * D^2 * H \quad \text{Ecuación 16}$$

$$D \approx \frac{2}{3} H \quad \text{Ecuación 17}$$

Dónde:

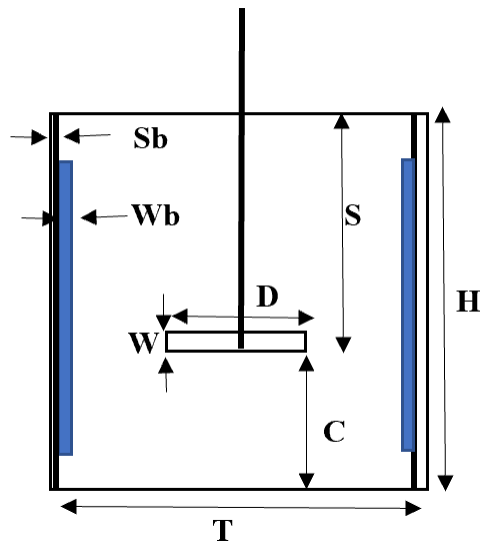
**D:** diámetro del área transversal del biorreactor, m<sup>3</sup>

**H:** Altura del biorreactor, m

Empleando el volumen determinado anteriormente de 40 litros para el biorreactor, podemos determinar las dimensiones del biorreactor empleando las ecuaciones 16 y 17, si se sustituye la ecuación 17 en la ecuación 16, podremos determinar la altura del biorreactor, el cual resulta ser:

$$H = \sqrt[3]{\frac{V * 9}{\pi}} = \sqrt[3]{\frac{0,040 \text{ m}^3 * 9}{\pi}} = 0,49 \text{ metros}$$

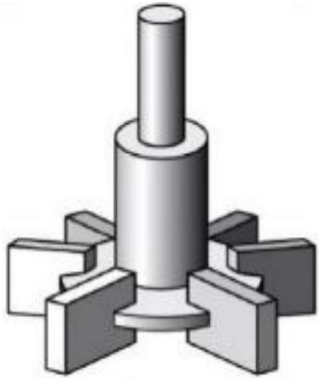
Aproximando el valor de la altura efectiva a 0,5 metros se estima el diámetro del biorreactor y se recalcula el volumen del biorreactor, para lo que; el diámetro será 0,33 metros y un volumen del equipo de 43 litros aproximadamente.



**Figura 19.** Dimensionamiento interno del biorreactor.

Para el dimensionamiento del agitador se emplean las ecuaciones de la tabla 21 para una turbina de disco. Las relaciones aquí descritas corresponden a dimensiones geométricas estándares para fermentadores reales. En el caso de un sistema agitado con alimentación de aire (este no fue el caso) es necesario establecer las condiciones de flujo que mantenga un régimen turbulento ( $Re > 1100$ ), bajo las condiciones de operación (temperatura, pH, viscosidad del medio), en este caso se operó con un motor de 0,55KW, por lo que opera para una velocidad máxima de agitación de 3000 RPM (50 Hz), velocidad de agitación suficiente para mantener el caldo en régimen turbulento.

**Tabla 21.** Dimensiones y geometría del agitador de turbina de disco para la agitación del caldo de fermentación.

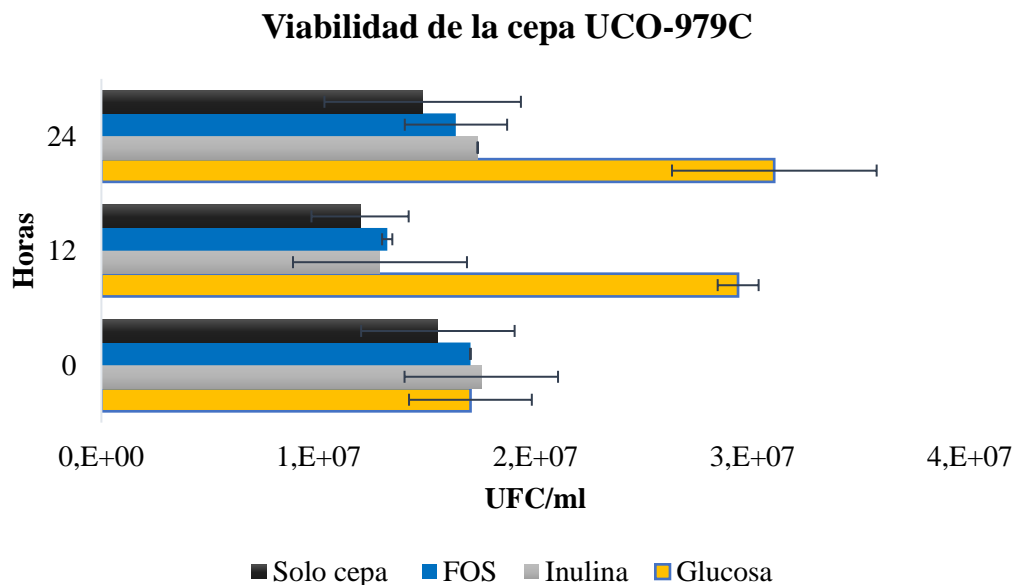
<b>Agitador turbina de disco</b>				
Definición	Nomenclatura	Forma de estimar	Cálculo	Modelo del agitador
Diámetro del biorreactor (m)	T	Ecu 16, 17	0,50	
Ancho del deflector (m)	Wb	T/12	0,028	
Separación pared- deflector (m)	Sb	T/60	0,005	
Diámetro del agitador (m)	D	T/3	0,111	
Distancia del agitador a la base del reactor (m)	C	T/3	0,111	
Longitud útil del agitador (m)	S	2T/3	0,222	
Altura del biorreactor (m)	H	0,5	0,5	
Número de alabes	n	6	6	
Ancho del alabe (m)	W	D/5	0,022	
Longitud del alabe	L	D/4	0,028	

Se requieren dos turbinas de agitación debido a la altura del biorreactor, esto porque el espacio donde van las turbinas está limitado por la altura del equipo, por lo que será suficiente para mantener la agitación uniforme en el caldo de fermentación

### 3.3.Simulación gástrica *in vitro*

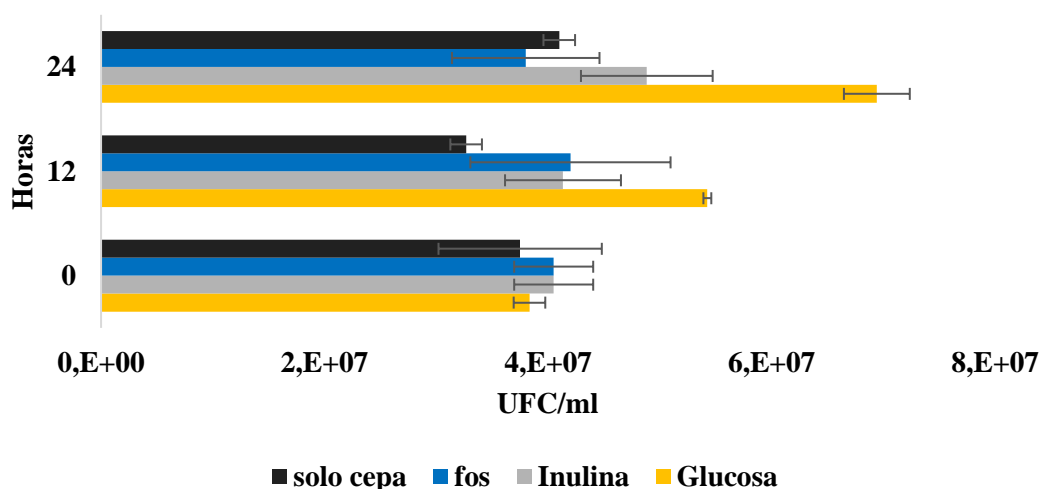
#### 3.3.1. Viabilidad de la cepa en el medio colónico simulado

Para la determinar la viabilidad de la cepa en el medio colónico simulado se tomaron alícuotas del mismo a las 0, 12 y 24 horas de fermentación, a partir de este se prepararon diluciones serias para ser inoculadas por microgotas en placas Petri que contenían MRS agar esterilizado según lo descrito anteriormente, se cuantificaron las colonias en el rango de 10-90 UFC/ml. La figura 20 y 21 contienen las UFC/ml de caldo cuando el medio de cultivo se complementó con 10 y 30 g/L de carbohidratos, respectivamente.



**Figura 20.** Viabilidad de *L. fermentum* UCO 979-C en un medio colónico simulado, el cual ha sido suplementado con 10 g/L de fuente de carbono (inulina, FOS o glucosa). Se realizó la prueba de ANOVA, mostrando que existen diferencias significativas en el crecimiento de la cepa por presencia de los carbohidratos en el medio ( $p < 0,05$ , para un IC de 95%).

## Viabilidad de la cepa UCO-979C

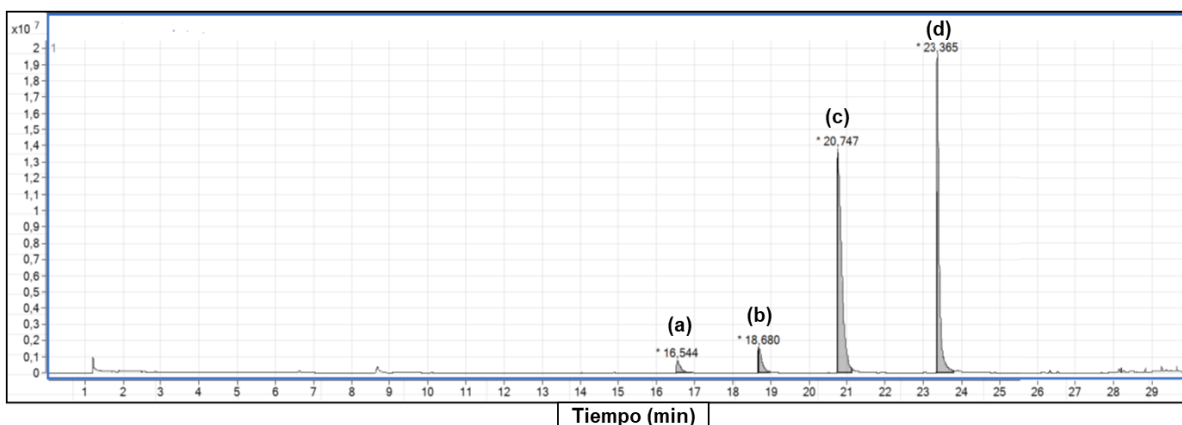


**Figura 21.** Viabilidad de *L. fermentum* UCO-979C en un medio colónico simulado, el cual ha sido suplementado con 30 g/L de fuente de carbono (inulina, FOS o glucosa). Se realizó la prueba de ANOVA, mostrando que existen diferencias significativas en el crecimiento de la cepa por presencia de los carbohidratos en el medio ( $p < 0,05$ , para un IC de 95%).

### 3.4. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta producidos por *L. fermentum* UCO 979C en el medio colónico simulado.

#### 3.4.1. Identificación de ácidos grasos de cadena corta por cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas

Para la identificación de cada uno de los ácidos grasos de interés (ácido butírico, ácido valérico, ácido propiónico y ácido acético) se inyectaron por separado, de esta manera poder identificar sus tiempos de retención y el patrón isotópico de fragmentación de cada uno de los estándares. Todos los estándares de ácidos grasos fueron inyectados bajo las mismas condiciones que cada una de las muestras y se inyectaron por triplicado para su identificación. Una vez identificados se inyectó una mezcla de estos estándares de ácidos grasos, la figura 22 contiene el cromatograma de iones totales obtenido para la mezcla de estándares que han sido inyectados al cromatógrafo de gases.

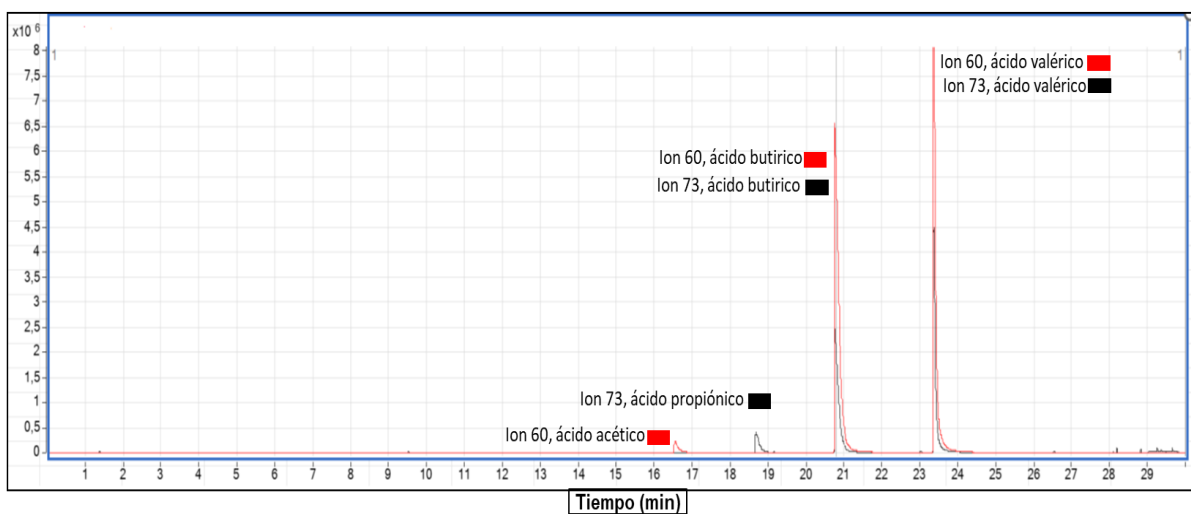


**Figura 22.** Cromatograma de mezcla de estándares de ácidos grasos de cadena corta. (a) ácido acético, (b) ácido propiónico, (c) ácido butírico y (d) ácido valérico.

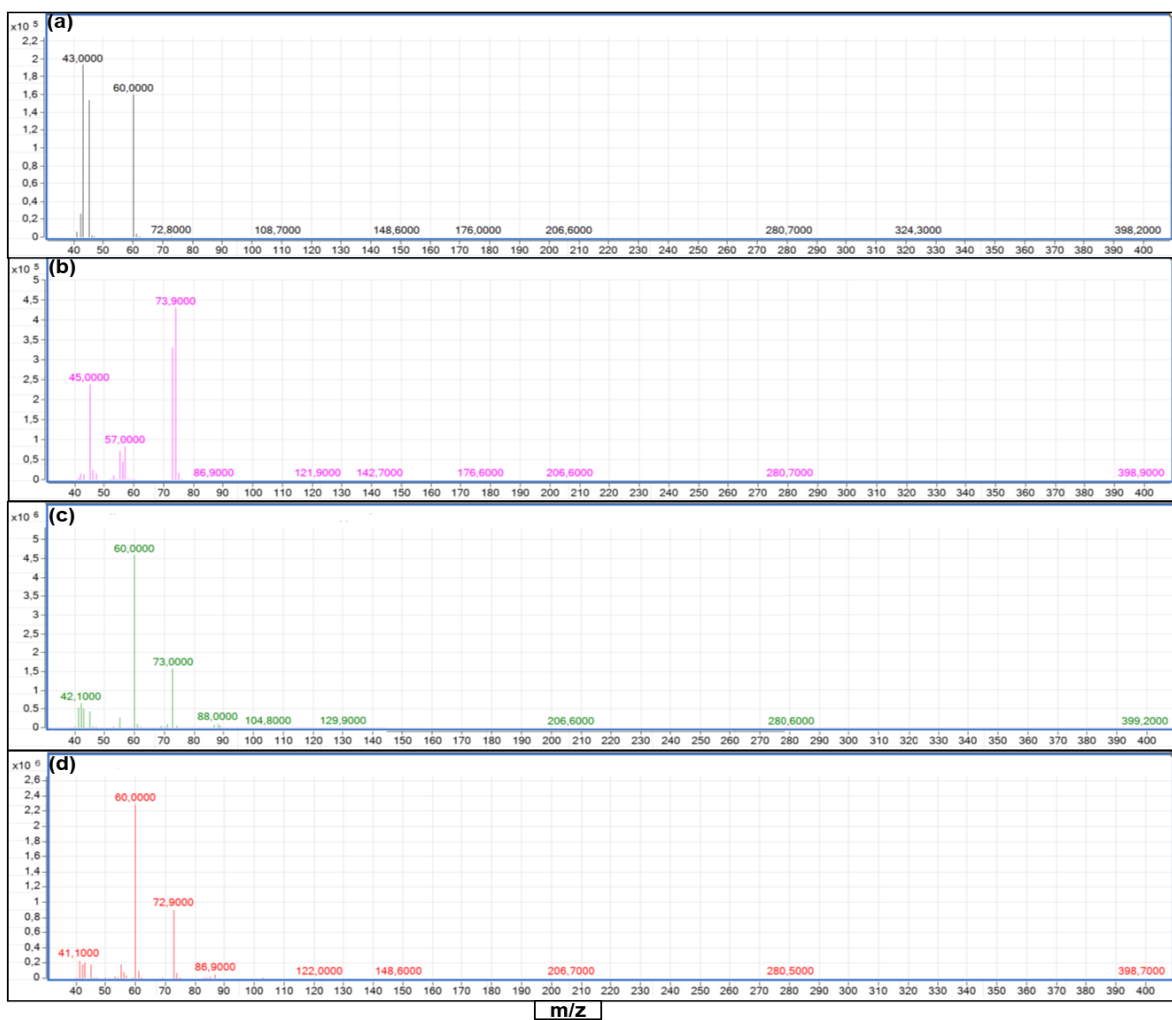
Los espectros de masa se registraron en modo de exploración completa (40-400 m/z) para recolectar los cromatogramas de corriente iónica total (TIC, siglas en inglés). La identificación (solo ácido acético pudo ser confirmado como ácido de interés producido por la cepa) se llevó a cabo utilizando los cromatogramas de iones extraídos (EIC) contenidos en la figura 23, seleccionando iones de fragmentos calificadores y cuantificadores de los analitos estudiados. La figura 24 contiene los espectros de masas para el patrón de fragmentación de cada uno de los ácidos grasos de cadena corta de interés.

Todos los ácidos grasos fueron identificados por su tiempo de retención y su patrón isotópico de fragmentación, por lo que para el ácido acético resultó un tiempo de retención de 16,544 min, el espectro de masa revela el ion precursor para el ácido acético de 43 m/z, para el ácido propiónico el tiempo de retención resultó ser de 18,680 y el ion precursor es el ion 73,9 m/z, para el ácido butírico el tiempo de retención resultó ser de 20,747 min y el ion precursor resultó ser 60 m/z y para el ácido valérico el tiempo de retención resultó ser de 23.365 y el ion precursor resultó ser 60m/z.





**Figura 23.** Cromatograma de iones extraídos (EIC) para los estándares de ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico.



**Figura 24.** Espectros de masas para estándares de ácidos grasos de cadena corta. (a) ácido acético los iones 43 y 60 m/z, (b) ácido propiónico los iones 74, 45 y 57 m/z, (c) ácido butírico los iones 73, 42 y 60 m/z, (d) ácido valérico los iones 73, 60 y 41 m/z.

### 3.4.2. Cuantificación de ácidos grasos de cadena corta en el medio colónico simulado

Para la cuantificación de los ácidos grasos de cadena corta producidos por fermentación de los carbohidratos suplementados como fuente de carbono en el medio colónico simulado, se empleó una curva de calibración para el único ácido de interés identificado, ácido acético, para ello; se empleó como estándar interno una mezcla de ácidos grasos metilados (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>) haciendo seguimiento al ácido octanóico metil éster, la curva obtenida permite determinar la relación lineal que tiene la concentración del analito de interés respecto a la señal de

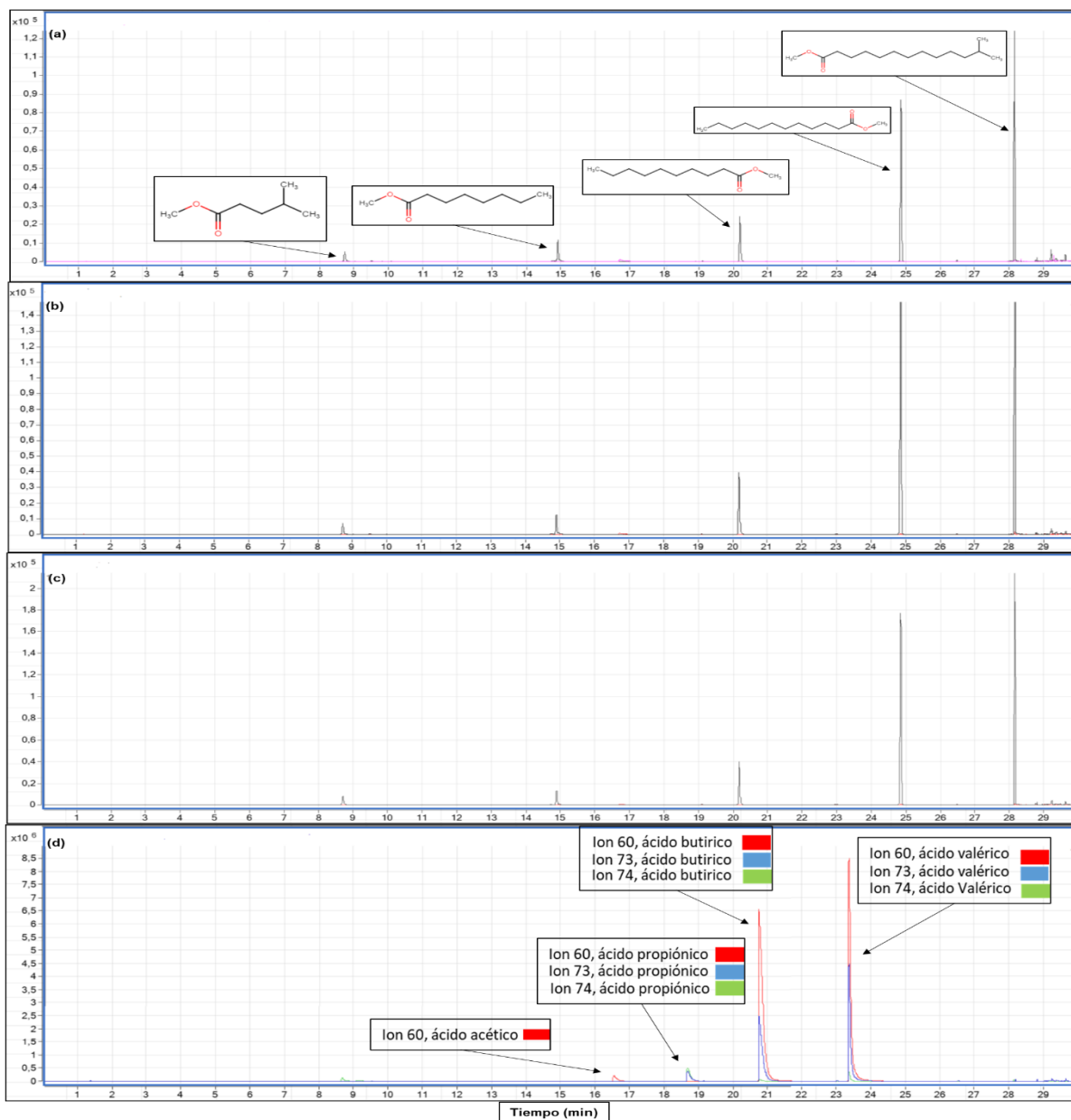
detección del instrumental empleado. La figura 27 contiene la curva de calibración obtenida para el estándar de ácido acético, el cual ha sido preparado en medio gástrico sin suplemento de fuente de carbono o cepa bacteriana (blanco).

### **3.4.3. Cuantificación de ácido acético producido por fermentación de la glucosa (control positivo) en el medio colónico simulado**

Se ha empleado la glucosa como control positivo, debido a que los medios de cultivos convencionales empleados están suplementados con este carbohidrato, por lo que *L. fermentum* UCO 979C aprovecha la glucosa como sustrato de fuente de carbono para promover los procesos metabólicos necesarios para la multiplicación celular, por lo que en la microbiota intestinal (ocupada por una comunidad bacteriana diversa) se generan una serie de metabolitos de interés, a los cuales se les ha aducido un sinnúmero de beneficios inmunomoduladores en el huésped, con el fin de identificar y cuantificar la producción de AGCC producidos por *L. fermentum* UCO-979C en el medio colónico simulado a través de cromatografía de gases. La figura 24 contiene el cromatograma de iones extraídos en el tiempo 0 horas para cada uno de los metabolitos de interés cuando se ha suplementado el medio gástrico con glucosa, inulina, y FOS a una concentración de 10 g/L en todos los casos, además, un medio sin fuente de carbono al cual se le han agregado inóculo bacteriano como control negativo (figura no mostrada), esto con el fin de identificar la producción de los metabolitos de interés por fermentación de estos carbohidratos por parte de la cepa en el medio gástrico simulado.

La **figura 25** contiene los cromatogramas de iones extraídos para los analitos de interés cuando se ha suplementado el medio colónico simulado con una fuente de carbono como glucosa (a), inulina (b) y FOS (c) al inicio del ensayo de fermentación de los mismos (tiempo 0 horas), puede observarse que no existe presencia de los iones 60, 73 y 74 m/z en las muestras (cromatogramas a, b, c) que coincidan con los tiempos de retención para los estándares de ácidos grasos contenidos en el cromatograma de iones extraídos d, por lo que; los iones que están presente en los cromatogramas a, b y c corresponden a los iones 60 m/z (no está presente en el mix estándar de ácidos metilados) y 74 m/z, puede notarse que solo el ion 74 m/z está presente en la fragmentación de los estándares metilados (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>) que se

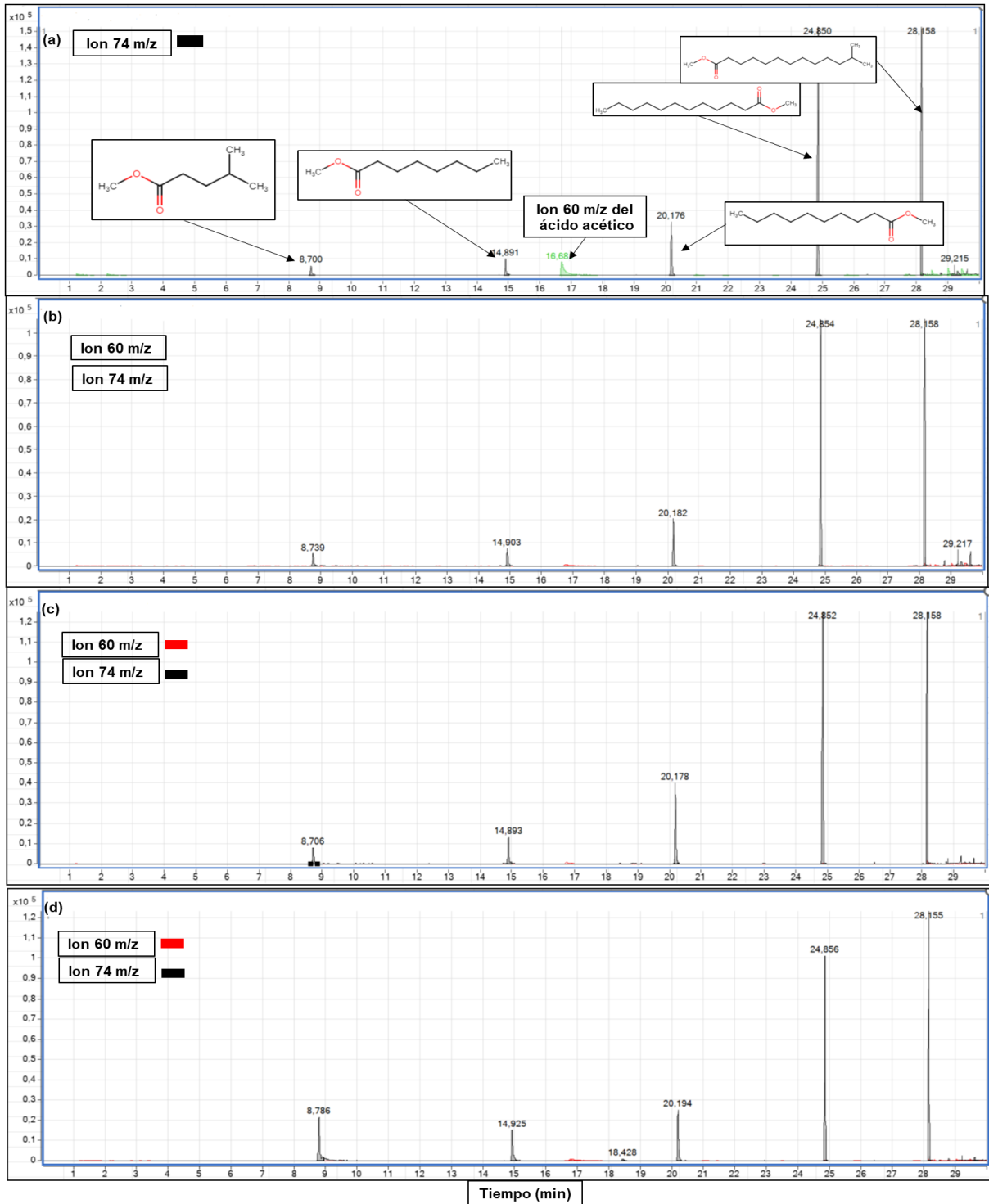
utilizó como estándar interno. Además, no se muestra el cromatograma de iones extraídos cuando solo se ha colocado la cepa en el medio colónico simulado debido a que presenta las mismas características a los cromatogramas anteriores (a, b y c), por consecuente no se muestran los cromatogramas de iones extraídos cuando se ha suplementado el medio gástrico con los carbohidratos a una concentración de 30 g/L para evitar redundar en la información mostrada al inicio del ensayo.



**Figura 25.** Cromatograma de iones extraídos para el ácido acético (ion molecular 60 m/z), ácido propiónico (iones 60,73,74 m/z), ácido butírico (iones 60,73,74 m/z) y ácido valérico (iones 60,73, 74 m/z). El cromatograma de iones extraídos (a) corresponde a glucosa como fuente de carbono en el medio gástrico a las 0 horas (iones 60, 74 m/z), El cromatograma de iones extraídos (b) corresponde a inulina como fuente de carbono en el medio colónico a las 0 horas (iones 60, 74 m/z), El cromatograma de iones extraídos (c) corresponde a FOS como fuente de carbono en el medio gástrico a las 0 horas (iones 60, 74 m/z), El cromatograma de

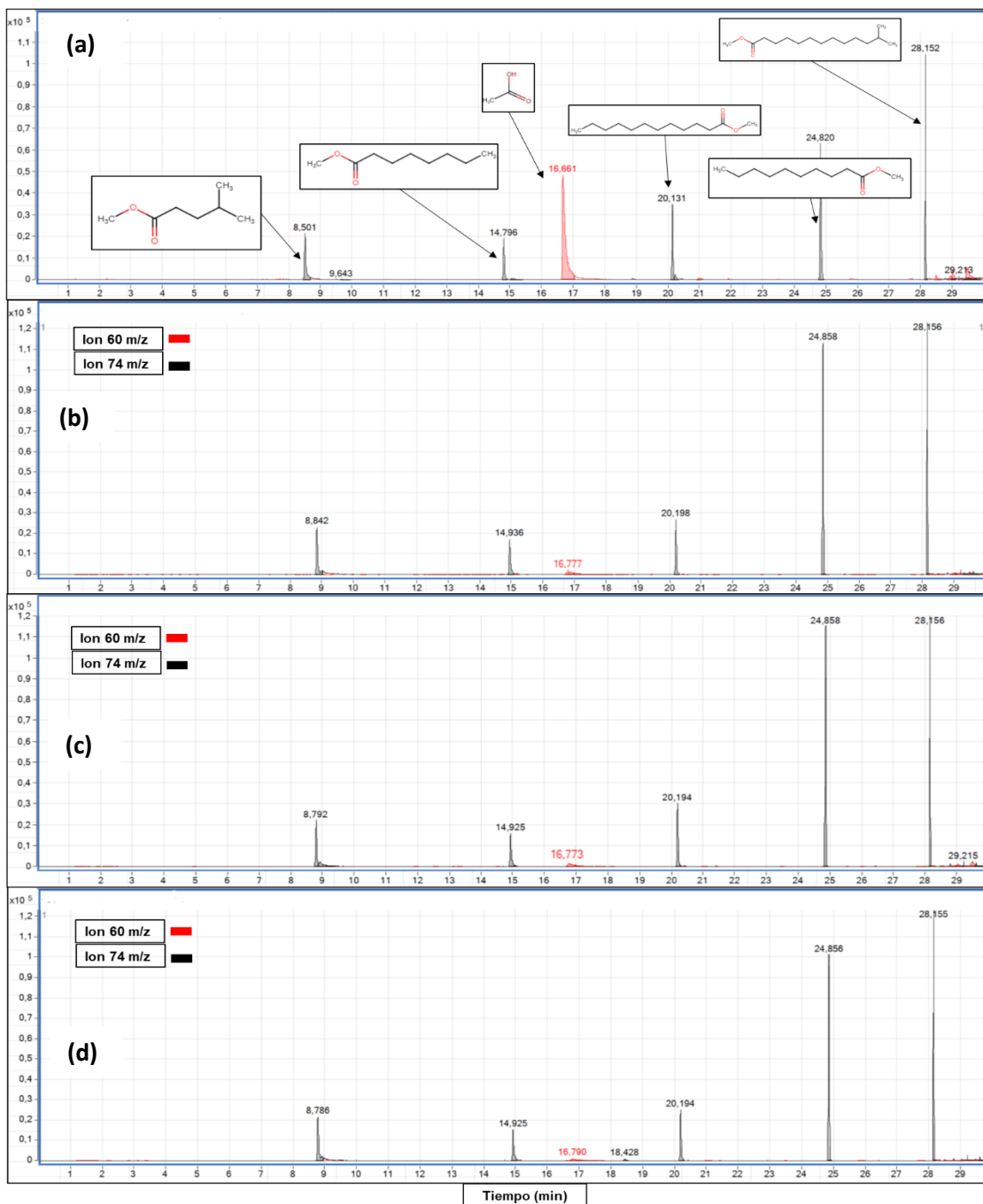
iones extraídos (**d**) corresponde a la mezcla de estándares de ácidos grasos de cadena corta (iones 60, 74, 73 m/z).

La **figura 26** contiene el cromatograma de iones extraídos para las muestras correspondientes a la simulación colónica cuando se ha suplementado con glucosa (a), inulina (b) y FOS (c) en el medio como fuente de carbono a una concentración de 10 g/L, además, el cromatograma (d) corresponde a la muestra en la cual solo se ha agregado la cepa (sin suplemento de fuente de carbono), todos estos análisis cromatográficos corresponden a los ensayos cuando han transcurrido 24 horas de fermentación. Puede notarse que no existen peaks que permitan la identificación del ácido propiónico, ácido butírico, ácido valérico, solo existe un peak de ácido acético ((a), tiempo de retención 16,861 minutos) presente cuando se ha suplementado glucosa en el medio simulado, por lo que; en los cromatogramas posteriores (b, c y d) no se observa ningún peak para los analitos de interés, por lo que puede notarse que la cepa utiliza la fuente de carbono glucosa como sustrato para la producción de ácido acético, siguiendo una ruta metabólica específica que permite la producción de este metabolito, pero no se promueve la producción de ácido propiónico, ácido butírico o ácido valérico. La cepa no utiliza los fructooligosacáridos inulina o FOS para promover sus procesos metabólicos en el medio gástrico simulado, esto puede deberse a las estructuras complejas de estos carbohidratos, por lo que la cepa podría carecer de las enzimas necesarias que permitan hidrolizar estos azúcares en estructuras más simples que puedan ser aprovechadas por la cepa como sustrato.



**Figura 26.** Cromatograma de iones extraídos para los iones  $m/z$  74 y 60. (a) Fuente de carbono glucosa, (b) Fuente de carbono Inulina, (c) fuente de carbono FOS, (d) sin fuente de carbonos en el medio colónico simulado, solo cepa, cuando han transcurrido 24 horas a una

concentración de carbohidratos de 10 g/L. El cromatograma de color negro corresponde al ion m/z 74 presente en el estándar mix de ácidos grasos metilados, el cual ha sido utilizado como estándar interno (EI), el cromatograma de color rojo (gráficos b, c y d) y verde en el cromatograma (a) corresponden al ion m/z 60 para identificar el ácido acético, además, dicho ion no está presente en el estándar interno.





**Figura 27.** Cromatograma de iones extraídos para los iones m/z 60 y 74. (a) Fuente de carbono glucosa, (b) Fuente de carbono Inulina, (c) fuente de carbono FOS, (d) sin fuente de carbonos en el medio colónico simulado, solo cepa, cuándo han transcurrido 24 horas y se ha suplementado los carbohidratos a razón de 30 g/L en el medio colónico simulado. El cromatograma de color negro corresponde al ion 74 m/z presente en el estándar mix de ácidos grasos metilados, el cual ha sido utilizado como estándar interno (EI), el cromatograma de color rojo (gráficos a, b, c y d) corresponde al ion m/z 60 para identificar el ácido acético y que no está presente en el estándar interno.

Los cromatogramas se obtuvieron en modo Full Scan para cuantificar el ácido acético producido en el medio colónico simulado cuando se ha suplementado el mismo con una fuente de carbono, la tabla 22 contiene los datos recolectados para las cromatografías realizadas para los dos niveles de concentración de fuentes de carbono al tiempo 0 horas y 24 horas de fermentación. La concentración del estándar interno en todas las muestras fue de 0,051  $\mu\text{mol/ml}$  en el medio gástrico simulado.

**Tabla 22.** Resumen de datos obtenidos para la curva de calibración por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, los valores fueron obtenidos por los cromatogramas de iones extraídos (CIE, modo Full Scan) para el ácido acético y el estándar interno ácido octanoico metil éster.

Analito	Inyección	concentración ( $\mu\text{mol/ml}$ ácido acético)	área	área Ác. Acé./EI	Valor medio de las áreas
Ácido octanoico metil éster <sup>a</sup>	1	1,67	121501,85	0,47	
Ácido acético			57527,39		
Ácido octanoico metil éster <sup>a</sup>	2	1,67	72456,80	0,47	0,46
ácido acético			33712,92		
Ácido octanoico metil éster <sup>a</sup>	3	1,67	87654,23	0,45	
ácido acético			39445,12		
Ácido octanoico metil éster <sup>a</sup>	1	4,17	68951,28	1,22	1,23

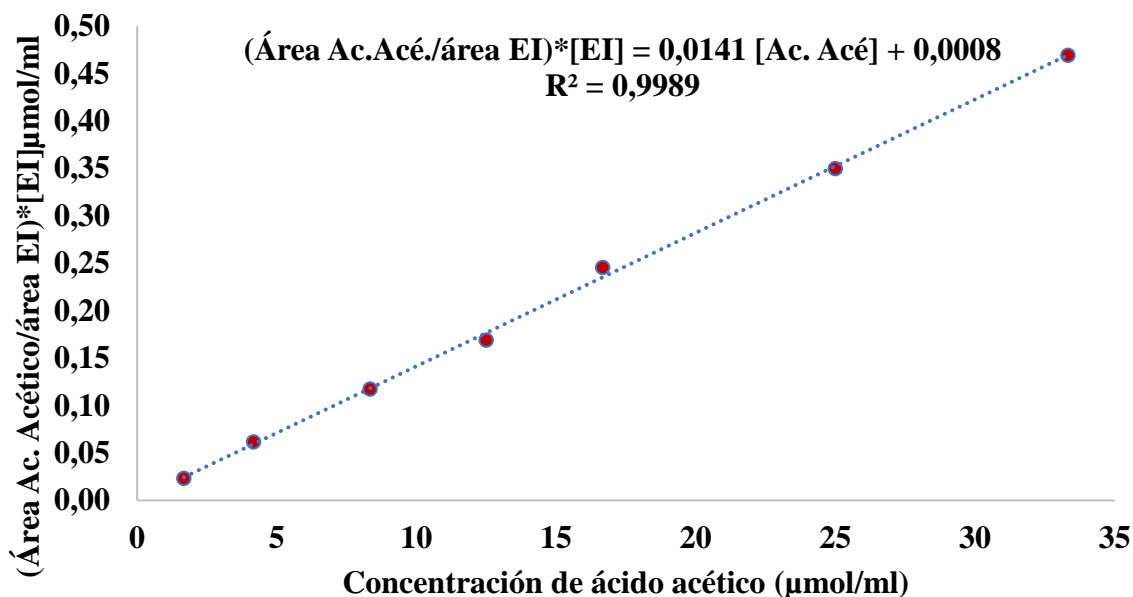
Ácido acético			84012,55		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	2	4,17	69672,25	1,22	
ácido acético			85093,62		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	3	4,17	107654,04	1,26	
ácido acético			135798,18		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	1	8,34	68951,28	2,41	
ácido acético			166511,62		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	2	8,34	117638,22	2,29	2,35
ácido acético			268999,34		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	3	8,34	102654,32	2,34	
ácido acético			240211,11		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	1	12,5	69345,42	3,38	
ácido acético			234446,46		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	2	12,5	71042,48	3,36	3,38
ácido acético			238529,21		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	3	12,5	95461,05	3,41	
ácido acético			325542,18		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	1	16,67	69661,57	5,26	
ácido acético			366347,99		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	2	16,67	78826,44	4,63	4,91
Ácido acético			365150,46		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	3	16,67	99574,73	4,84	
ácido acético			481954,70		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	1	25	71162,85	7,25	
ácido acético			516107,23		6,99
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	2	25	85955,88	6,60	
Ácido acético			567221,51		

Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	3	25	78932,54	7,13	
Ácido acético			562989,01		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	1	33,33	68625,13	9,92	
Ácido acético			680803,02		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	2	33,33	76668,27	9,30	9,39
Ácido acético			713071,63		
Ácido octanóico metil éster <sup>a</sup>	3	33,33	80204,62	8,94	
Ácido acético			717046,31		

**a:** estándar interno a una concentración 0,051  $\mu\text{mol/ml}$ .

Para la cuantificación del ácido acético en el medio colónico simulado por fermentación de carbohidratos por *L. fermentum* UCO-979C se estableció en función de la relación lineal que existe entre la señal analítica y la concentración del analito de interés en la muestra, además, se empleó un estándar interno, de esta manera correlacionar el factor de respuesta del instrumento analito frente a un analito de concentración conocida, la figura 28 contiene la curva de calibración obtenida por cromatografía de gases acoplada a masas y resumida en la tabla 23. Se ha hecho un análisis estadístico de la curva de calibración empleando el test ANOVA con un nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0,05$ ) con el software STATGRAPHICS, para lo cual resultó un valor  $p < 0,05$ , lo que implica que existe una relación lineal entre la relación de áreas de los analitos y la concentración del ácido acético en las muestras evaluadas, además, el estadístico  $R^2$  resultó en un valor de 0,9989, para lo cual indica que el modelo explica el 99.89% de la variabilidad de la concentración en relación de las áreas.

### Curva de calibración para estándar ácido acético



**Figura 28.** Curva de calibración para el ácido acético en el rango de 1,67-33,33 µmol/ml en medio colónico simulado (sin suplemento de carbohidratos).

Los resultados obtenidos para los análisis de cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas para las muestras de la simulación colónica suplementadas con carbohidratos a dos concentraciones diferentes están resumidos en la tabla 23, puede notarse que la concentración del ácido acético se ve aumentada cuando se ha suplementado el medio gástrico simulado con glucosa a los dos niveles de concentración evaluados. Para cuantificar la concentración de ácido acético en las muestras se utiliza la ecuación de la curva obtenida en la figura 28, en la cual, “Y”, es la relación de áreas para el ácido acético y el estándar interno (ácido octanoico metil éster) multiplicado por la concentración del estándar interno (0,051 µmol/ml), X, es la concentración del ácido acético en la muestra problema en µmol/ml. Haciendo los arreglos matemáticos necesarios y empleando las relaciones de áreas de los analitos involucrados (ácido acético/estándar interno(EI)), además, la concentración de EI agregada a las muestras, puede determinarse la concentración de ácido acético en cada muestra.

**Tabla 23.** Datos obtenidos para la cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas para las muestras de la simulación colónica cuando se ha suplementado con carbohidratos a dos niveles de concentración. El valor del área corresponde al ion cuantificador del CIE.

Fuente de carbono	g/L	Tiempo (horas)	Analito	Área (iny. 01)	Área (iny. 02)	Área (iny. 03)	Relación de áreas 01	Relación de áreas 02	Relación de áreas 03	Relación de áreas promedios x concentración EI (y)	Concentración de ácido acético ( $\mu\text{mol/ml}$ ) (x) $\pm$ DE
Glucosa	10	0	Ácido octanoico metil éster	40814,77	54643,88	43542,53	--	--	--	--	ND
			Ácido acético	ND	ND	ND					
		24	Ácido octanoico metil éster	50481,08	46691,03	65322,95	1,41	1,66	1,34	0,074	5,16 $\pm$ 0,60
			Ácido acético	70945,09	77687,73	87312,02					
	30	0	Ácido octanoico metil éster	49753,25	43225,25	52843,72	--	--	--	--	ND
			Ácido acético	ND	ND	ND					
		24	Ácido octanoico metil éster	51324,99	50777,01	78934,87	8,91	7,05	7,52	0,39	27,60 $\pm$ 3,43
			Ácido acético	457461,73	358065,12	594322,65					

		Ácido octanoico	56850,34	48555,98	70409,43	--	--	--	--	ND
	0	metil éster								
	10	Ácido acético	ND	ND	ND					
<b>Inulina</b>	24	Ácido octanoico	50660,63	61098,21	47508,22	--	--	--	--	<LOQ
		metil éster								
		Ácido acético	< LOQ	< LOQ	< LOQ					
	0	Ácido octanoico	42878,07	50188,10	72311,94	--	--	--	--	ND
		metil éster								
	30	Ácido acético	ND	ND	ND					
<b>FOS</b>	24	Ácido octanoico	35796,02	45137,54	54128,43	--	--	--	--	<LOQ
		metil éster								
		Ácido acético	< LOQ	< LOQ	< LOQ					
	0	Ácido octanoico	58450,73	43950,63	63956,31	--	--	--	--	ND
		metil éster								
	10	Ácido acético	ND	ND	ND					
<b>FOS</b>	24	Ácido octanoico	58815,82	54976,50	44956,71	--	--	--	--	<LOQ
		metil éster								
		Ácido acético	< LOQ	< LOQ	< LOQ					

		Ácido octanoico metil éster	32947,28	42874,42	58732,09	--	--	--	--	ND
<b>30</b>	0	Ácido acético	ND	ND	ND					
	24	Ácido octanoico metil éster	35118,09	43963,20	50322,76	--	--	--	--	<LOQ
		Ácido acético	<LOQ	<LOQ	<LOQ					
	0	Ácido octanoico metil éster	55460,73	43566,80	73098,56	--	--	--	--	ND
<b>Solo cepa</b>	<b>N/A</b>	Ácido acético	ND	ND	ND					
	24	Ácido octanoico metil éster	49178,10	41372,61	35985,12	--	--	--	--	<LOQ
		Ácido acético	<LOQ	<LOQ	<LOQ					

<LOQ: corresponde a un valor de relación de área del analito respecto al ruido menor a 10 (S/R<10). ND: No Detectado el analito. Test ANOVA indican que hay diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) cuando se sustituye la concentración y la fuente de carbono respecto a la concentración de ácido acético producido por fermentación de los carbohidratos.

### 3.4.4. Precisión del método

Para evaluar la precisión del método se emplearon dos muestras como control de calidad (QC<sub>1</sub> y QC<sub>2</sub>), las cuales ha sido inyectadas cada ocho (8) inyecciones de muestras consecutivas en días diferentes (una inyección por día), evaluando la relación de áreas del estándar de ácido acético y el estándar interno ácido octanoico metil éster, considerando aceptable para un valor de % CV < 10 %. La tabla 24 contiene de forma resumida los valores de áreas obtenidos para las áreas de los analitos anteriormente mencionados. La muestra de control de calidad QC<sub>1</sub> fue preparada en el medio colónico simulado sin suplemento con carbohidratos, se ha añadido estándar de ácido acético a una concentración de 1,67 µmol/ml y ácido octanoico metil éster como estándar interno a una concentración de 0,051 µmol/ml para QC<sub>1</sub> y para QC<sub>2</sub>, 5 veces la concentración de QC<sub>1</sub> respecto al ácido acético con 0,05 µmol/ml para el estándar interno (EI).

**Tabla 24.** Valores obtenidos por análisis cromatográficos acoplado a espectrometría de masas para la muestra de control de calidad.

Inyección	QC <sub>1</sub>			QC <sub>2</sub>		
	Área ácido acético	Área EI	Relación de áreas	Área ácido acético	Área EI	Relación de áreas
1	25000,31	54082,23	0,46	245986,03	97211,65	2,53
2	62993,05	128794,84	0,49	199652,91	85362,64	2,34
3	26795,15	49150,00	0,55	301045,52	124097,12	2,43
4	53025,89	118591,64	0,45	376450,82	144204,88	2,61
5	50485,41	120163,52	0,42	179233,76	63273,81	2,83
6	29279,86	59461,63	0,49	387139,04	143267,54	2,70
7	57114,76	105678,31	0,54	188231,66	73521,32	2,56
8	64641,21	133087,33	0,49	202102,67	70098,04	2,88
9	36487,92	75956,04	0,48	265092,79	108544,02	2,44

% CV QC<sub>1</sub>= 8,37 %, DE= 0,04. %; CV QC<sub>2</sub>= 7,08%, DE=0,18.



### 3.4.5. Límite de identificación y límite de cuantificación (LOD y LOQ)

Estos parámetros se determinaron utilizando el método señal/ruido (S/R). Para esto se preparó una disolución con estándar de ácido acético en medio colónico simulado sin adicionar fuente de carbonos o inóculo de la cepa bacteriana, la concentración de la disolución a evaluar es de 0,0167  $\mu\text{mol/ml}$  para ácido acético, preparada diluyendo 100  $\mu\text{L}$  de la solución de estándar de ácido acético de 1,67  $\mu\text{mol/ml}$  y se diluyó en hasta 10 ml de solución en blanco, se prepararon 10 réplicas de ésta muestra, por lo que; la desviación estándar de 10 inyecciones de ésta muestra resultó ser 0,085  $\mu\text{mol/ml}$  para lo cual se encontró que el límite de detección (LOD) fue de 0,081  $\mu\text{mol/ml}$  y 0,270  $\mu\text{mol/ml}$  para el límite de cuantificación (LOQ). Se evaluó por triplicado el valor de límite de cuantificación y se aceptó un valor de % CV < 10% para esta muestra. El cálculo de los límites de detección y cuantificación se estimaron según lo descrito por EURACHEM, empleando las ecuaciones siguientes:

$$S_o' = \frac{S_o}{\sqrt{n}}$$

$$S_o' = \frac{0,085}{\sqrt{10}} = 0,0269 \mu\text{mol/ml}$$

**Dónde:** n, es el número de réplicas de observaciones que han sido obtenidas siguiendo enteramente el procedimiento de medición,  $S_o$ , es la desviación estándar estimada de n resultados individuales cerca de la concentración cero para el analito,  $S_o'$ , es la desviación estándar utilizada para determinar LOD y LOQ.

$$LOD = 3 * S_o'$$

$$LOD = 3 * 0,0269 = 0,0810 \mu\text{mol/ml}$$

$$LOQ = 10 * S_o'$$

$$LOQ = 10 * 0,0269 = 0,2700 \mu\text{mol/ml}$$

**Tabla 25.** LOQ para blanco fortificado con estándar de ácido acético a una concentración de 0,2700  $\mu\text{mol/ml}$ .

<b>Parámetros</b>	<b>Inyección 01</b>	<b>Inyección 02</b>	<b>Inyección 03</b>
<b>Concentración (<math>\mu\text{mol/ml}</math>)</b>	0,2700	0,2700	0,2700
<b>Área (UA)</b>	6783,07	5989,41	5342.87
<b>Desviación estándar (UA)</b>		561,20	
<b>%CV (coeficiente de variación)</b>		8,79%	

## 4.0. DISCUSIÓN

### 4.1. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus fermentum* UCO-979C

Para evaluar el efecto de las fuentes de carbono y la temperatura del proceso sobre *L. fermentum* UCO-979C se hicieron conteos de las Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) en el caldo de fermentación a intervalos de tiempo, por lo que la figura 07 representa los valores para la colección de esos datos, un análisis de varianza ANOVA de dos vías dio detalles de las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) existentes cuando en el medio de cultivo se sustituye la glucosa como fuente de carbono por inulina o FOS, por lo que la inulina y el FOS representan polímeros de cadenas largas o ramificadas, para lograr la hidrólisis a oligómeros de estructuras más simples, se hace necesario la presencia de enzimas como las polisacaridasas, glicosidasas, proteasas y peptidasas bacterianas [71]. De esta manera, estos fructanos resistentes podrían ser metabolizados por la microbiota presente. El efecto deficiente que ejercen los fructanos sobre el crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C, puede ser explicado debido a la incapacidad de ésta para producir el mecanismo o los procesos enzimáticos necesarios para la hidrólisis de estos fructanos, de esta manera aprovechar dicho sustrato para producir sus procesos metabólicos y su división celular, dado que la fermentación de estos carbohidratos representa la fuerza principal para estimular dichos procesos [63].

La capacidad de la cepa para crecer en el rango de temperatura evaluado (35-39°C) representó una diferencia significativa (ANOVA de dos vías,  $p = 0,02$ ) cuando se empleó la glucosa como fuente de carbono, o un crecimiento deficiente cuando se empleó la inulina o el FOS. El pH del medio y el consumo de azúcares totales en el caldo de fermentación se midió para corroborar la presencia de productos promovidos por la fermentación de los carbohidratos, por lo que puede notarse en la figura 07, gráficos de la derecha, que el consumo de azúcares totales fue relevante cuando en el medio la fuente de carbono era la glucosa ( $p < 0,05$ ), para la inulina y el FOS, el pH y la cantidad de azúcares totales (g/L) no representó un cambio sustancial que adujera la presencia de productos de fermentación, de esta manera se confirma la incapacidad de la cepa de hidrolizar dichos fructanos.

Al evaluar el efecto en el crecimiento de la cepa causado por la temperatura y la sustitución de la fuente de carbono en el medio de cultivo, se puede establecer que la cepa no presenta dificultad para crecer a temperaturas inferiores a 37°C, sería interesante evaluar la temperatura más baja a la cual la cepa presenta una viabilidad alta, de esta manera minimizar los consumos energéticos necesarios para mantener el proceso dentro de los rango de operación.

Para evaluar el efecto que tiene la concentración de los carbohidratos sobre el crecimiento de la cepa se modificó la concentración de estos a tres niveles (10, 20 y 25 g/L), de esta manera establecer una relación entre la cantidad de sustrato y la viabilidad de la cepa en el caldo de fermentación. La figura 08 contiene de forma acotada los gráficos obtenidos para esta experiencia. Cuando se sustituye la fuente de carbono por inulina o FOS en el rango de concentraciones anteriormente mencionadas, existieron diferencias significativas en el crecimiento de la cepa respecto a la glucosa como fuente de carbono en el medio de fermentación ( $p < 0,05$ ), por lo que la cepa a concentraciones bajas limita el recuento viable de unidades formadoras de colonia, a su vez, a concentraciones más altas de estos fructanos mantiene su incapacidad de aprovechar dicho sustrato para sus procesos metabólicos.

La concentración de los carbohidratos representa un parámetro a considerar, ya que ofrece el sustrato esencial para que los procesos metabólicos de la cepa se produzcan. Una concentración deficiente limita o afecta dichos procesos y, por ende, la producción de biomasa [72]. Una concentración alta de carbohidrato en el medio de fermentación afecta el crecimiento de la cepa, viéndose limitada la producción de biomasa debido a que los procesos osmóticos que ocurren en el interior de las células se ven afectados producto de un desequilibrio en la regulación electrolítica para que los procesos normales se lleven a cabo. En la Figura 14 puede notarse cómo la fermentación del sustrato representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para cada concentración de fuente de carbono empleada. Del mismo modo se observan diferencias significativas ( $p = 0,002$ ) cuando se sustituye la fuente de carbono en el mismo rango de concentraciones, por lo que puede concluirse que la fuente de carbono representa una limitante importante en la producción de biomasa durante el proceso de fermentación.

La velocidad de agitación es un factor relevante en el crecimiento microbiano, facilita un medio homogéneo, evita la formación de acumulados o agregados dentro del proceso y mantiene el sistema con una cantidad importante de oxígeno disuelto en el medio, lo cual representa un parámetro importante a considerar cuando la cepa crece bajo condiciones aerobias. *L. fermentum* UCO-979C puede crecer bajo condiciones microaeróbicas (preferente) como aerobias, por lo que presenta características de ser una cepa anaeróbica facultativa, lo que facilita los procesos de escalamiento para este tipo de microorganismos. En la Figura 09 puede notarse el crecimiento de la cepa en función del tiempo, además, el consumo de azúcares totales y la variación de pH del medio de cultivo, por lo que, la velocidad de agitación no representa una variable a considerar para el crecimiento de la cepa ( $p=0,14$ ). Además, la fuente de carbono al ser sustituida por inulina o FOS representa una diferencia significativa respecto a la glucosa ( $p<0,05$ ) para el crecimiento de la cepa.

El pH del medio de fermentación representa una variable importante en el medio de cultivo, por lo que el pH del medio limita el aprovechamiento de nutrientes, regula las reacciones químicas y causa estrés o limita la adaptación de la cepa en el medio, por lo que es importante definir un pH óptimo para la producción de biomasa durante la fermentación.

La Figura 10 muestra la cinética de crecimiento cuando se modifica el pH inicial del medio de fermentación. Es importante notar que a pH bajo (2.70) la cepa mantiene una viabilidad prácticamente constante cuando la fuente de carbono es la glucosa, un leve crecimiento cuando la fuente de carbono es inulina, lo que podría deberse a que la fracción hidrolizada del fructano por efecto del pH es mayor en un medio ácido, los enlaces glicosídicos se rompen y la fracción de fructosa puede verse aumentada en el medio. Sin embargo, el pH inicial no permite la fermentación de estos fructanos lo que posiblemente esté limitando las reacciones químicas y los procesos necesarios para la disponibilidad de los nutrientes. Cuando el pH inicial del medio se ajusta cerca de 4.60 puede notarse que las curvas de crecimiento para las fuentes de carbono describen una cinética parecida. Este comportamiento se debe a que el medio contiene una fracción hidrolizada mayor de los fructanos, aunque, el pH sigue siendo una limitante para la iniciación de procesos bioquímicos ya que, el pH del medio sigue disminuyendo por efecto de la fermentación de los fructano, por lo que los metabolitos producidos limitan el crecimiento de la cepa. Cuando el pH inicial se ajustó a un valor

cercano a 6.80, la cepa crece de forma óptima cuando la fuente de carbono es glucosa, y muestra un comportamiento limitado para el crecimiento de la cepa cuando en el medio se sustituyó la fuente de carbono por inulina o FOS. Es importante establecer el rango de pH en el cual debe mantenerse el medio de cultivo para la producción de biomasa. Cuando el pH inicial del medio de cultivo se varía en el rango establecido existen diferencias significativas en el crecimiento de la cepa ( $p < 0,05$ ), además, la sustitución de la fuente de carbono en el medio de cultivo para los distintos pH evaluados mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en el recuento viable de la cepa.

Una vez establecido como las variables evaluadas afectan la cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C, se hace relevante intuir el modelo que rige la cinética cuando estas variables ejercen las limitantes dentro del sistema en estudio, para de esta forma, establecer los parámetros y objetivos a considerar para los procesos de escalamiento (velocidad de crecimiento máxima, concentración celular máxima, tiempo de retraso, entre otros). La Figura 12A, contiene la cinética de *L. fermentum* UCO-979C cuando en el medio de cultivo la fuente de carbono es la glucosa y se varió la temperatura de fermentación desde 35, 37 y 39°C, debido a que en este fue el sustrato se obtuvo la mayor producción de biomasa y la viabilidad más alta ( $p < 0,05$ ), a diferencia de la inulina o FOS. Además, se han graficado los distintos modelos matemáticos (descritos en la Tabla 01) ajustados a las curvas experimentales para el crecimiento de la cepa en función del tiempo. Para el crecimiento de la cepa han sido reportados como una relación logarítmica de la concentración celular a cualquier tiempo respecto a la concentración inicial, es decir,  $\text{Log}_{10} (N_i/N_0)$ .

La Figura 12B, contiene la cinética de crecimiento de *L. fermentum* UCO-979C cuando en el medio de fermentación se varió la concentración de la fuente de carbono. En este caso solo se representa la cinética para la glucosa por las razones antes explicadas, además, se grafican los modelos matemáticos ajustados para los datos experimentales, con el objetivo de comparar las curvas estimadas y las experimentales obtenidas en las diversas experiencias.

Los modelos matemáticos, según los datos estimados para la cinética de crecimiento en cuestión, ajustan de forma adecuada para las distintas experiencias, con ciertas desviaciones observados en algunos casos ( pH bajo los modelos presentaron  $R^2 < 0,5$  cuando la fuente de

carbono es inulina o FOS), por lo que; al aplicar el criterio de selección de Akaike corregido, el número de modelo se ve ajustado a solo dos, los de Gompertz y Logístico que describen bastante bien, respecto a los criterio de selección, el coeficiente de correlación corregido ( $Rc^2 >$  a los otros modelos) y factor de Akaike adecuados ( $AICc <$  a los otros modelos). Estos son modelos de tres parámetros que describen bastante bien los parámetros de interés según las variables que afectan la cinética de crecimiento. En el 58,33% de los casos la cinética de crecimiento evaluada se ajustó al modelo de Gompertz cuándo la fuente de carbono era la glucosa, representando los datos experimentales, y el otro 41,67% lo representó bastante bien el modelo Logístico modificado. Ambos presentaron velocidades máximas de crecimiento parecidas, ajustándose a los datos experimentales ( $Rc^2 >$  respecto a los otros modelos). El modelo de cuatro parámetros que mejor ajustó los datos fue el de Schnute. Este es un modelo matemático que contiene a los demás, por lo que su ajuste en todos los casos era esperado, aun cuando presenta un  $Rc^2$  menor a los modelos de tres parámetros.

Para la fermentación llevada a cabo en el biorreactor se logró representar los datos con la ecuación de Gompertz, obteniendo los siguientes parámetros cinéticos: la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) fue de  $0.7702 \text{ h}^{-1}$ , el tiempo de duplicación celular ha sido  $0,9001 \text{ h}$ , la concentración máxima celular ( $A, \text{Log} (Ni/No)$ ) de  $3.7370$  y una fase de adaptación o Lag de  $0.3518 \text{ h}$ , los datos modelados se han resumido en la Tabla 10 y los criterios estadísticos que permitieron la selección del modeló están representados en las tablas 11 y 12. El proceso de escalamiento ha permitido la producción de la cepa *L. fermentum* UCO-979C, por lo que el crecimiento celular fue representativo en el biorreactor respecto a los observados en matraces ( $p= 0,4599$ ) bajo las condiciones preestablecidas como óptimas para la mayor viabilidad celular de la cepa.

Es importante considerar que los modelos matemáticos empleados consideran que existe sustrato suficiente para el crecimiento microbiano, además, que dicho sustrato no representa una variable limitante para la división celular, por lo que dichas ecuaciones representan una cinética teórica o ideal de la cepa, pero, facilitan la comprensión de como las variables controladas afectan el mecanismo metabólico para aprovechar el sustrato disponible, afectando en mayor o menor medida la viabilidad y el recuento de las unidades formadoras de colonias. Estos resultados obtenidos por los modelos matemáticos son comparables a los

obtenidos por Gamze Ücok & Col [55], para la cual obtuvieron los parámetros cinéticos para *Lactobacillus plantarum* L14 en caldo MRS por 28 horas de fermentación a 37°C, donde estimaron que el tiempo de duplicación celular fue de 1,26 h, y la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) como 0,551 h<sup>-1</sup>. En otro estudio, Giulia Bisson & col. [56] evaluaron el efecto del pH, la temperatura, la concentración de sacarosa y cloruro de sodio en el medio de cultivo sobre la cinética de crecimiento de cuatro probióticos, *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Lactiplantibacillus plantarum*, para ello emplearon el modelo de Gompertz modificado, donde pudieron relacionar la influencia de estas variables sobre la velocidad de crecimiento máximo ( $\mu_{\max}$ ), la relación de crecimiento A (Log (Ni/No)) y el tiempo de retraso, concluyeron que la cepa al estar sometida a condiciones de estrés la velocidad máxima decae, lo que conlleva a tener tiempos de retraso o adaptación largos, por lo que; cuando la concentración de sales aumenta el valor de A se ve disminuido, por ejemplo, para *Lacticaseibacillus casei*, cuando la concentración de cloruro de sodio aumentó de 1% a 5% en el medio de cultivo, el valor de  $\mu_{\max}$  disminuyó desde 0,10 a 0,04 h<sup>-1</sup>, lo que conlleva un aumento de tiempo de adaptación ( $\lambda$ ) desde 10,52 horas hasta 42,97 horas, respectivamente. Estos resultados son comparables con lo observado en este estudio, por lo que; el efecto que ejercen las variables operacionales y fisicoquímicas del medio de cultivo, influyen directamente sobre proceso de fermentación limitando la producción favorable de biomasa.

Los modelos matemáticos empleados no consideran el consumo de sustrato o la producción de algún producto de fermentación, lo que limita de forma importante el balance de masa, las relaciones de rendimiento, lo que conlleva a obtener parámetros cinéticos sobre estimados, lo que hace necesario el uso de modelos matemáticos que relacionen el consumo de sustrato, como el modelo de Monod, la cual es una ecuación que está descrita en función del reactivo limitante, en este caso se considerará la fuente de carbono. Esta relación permite estimar parámetros más ajustados para el dimensionamiento del biorreactor.



## 4.2. Modelado y dimensionamiento del biorreactor por balance de masas y modelo de Monod

La fermentación de glucosa por parte de *L. fermentum* UCO-979C en un biorreactor Batch durante 12 horas permitió recolectar datos de producción de biomasa en función del tiempo, además, el consumo de sustrato permite establecer el rendimiento de biomasa respecto al sustrato disponible en el medio, dichos datos han permitido obtener una ecuación de diseño para un reactor Batch, para lo cual se podrá estimar la cantidad de biomasa viable seca a producir a partir del volumen de caldo de fermentación a emplear en el proceso de fermentación, teniendo en cuenta que el proceso de fermentación se ha considerado para 12 horas y como reactivo limitante la fuente de carbono. Se ha estimado la ecuación de velocidad de producción de biomasa de dos formas, por integración numérica y por ajuste de los datos a una ecuación polinómica empleando el software Statgraphic, considerando que todos los valores empleados han sido obtenidos al derivar la ecuación polinómica respecto al tiempo, es importante notar que las ecuaciones estimadas permiten calcular con un bajo error la cantidad de biomasa a producir para el volumen de reacción (<2%) cuando se considera el proceso por 10 horas de fermentación, por el contrario, si se consideran 12 horas de proceso, el error de estimación se ve aumentado (<39%). Las formas de estimar las relaciones diferenciales de producción de biomasa respecto al tiempo no mostraron diferencias significativas en el cálculo de los parámetros de la ecuación de Monod ( $p=0,12$ ), por lo que; los valores estimados están dentro del intervalo de confianza ( $\alpha=0,05$ ) para cada uno de los valores de  $K_s$  y  $\mu_{m\acute{a}x}$ . determinado en cada forma de cálculo, este resultado es de esperar, debido a que la forma de cálculo de ambos métodos es el mismo, solo que; las estimaciones por el método numérico se hacen empleando ecuaciones determinadas para datos colectados de forma equidistantes respecto al tiempo de recolección de los mismos, por otro lado, el ajuste polinomial es una forma sencilla de resolución, pero se debe tener cuidado, principalmente al escoger el orden del polinomio, porque es posible sobre ajustar el polinomio a los datos, lo que conlleva a que se consideren áreas sobre estimadas, lo que conlleva a errores de estimación.

Los valores obtenidos para la velocidad de crecimiento máximo en este estudio son comparables a los obtenidos por Abhay Sharma & col. [57] en el cual evaluaron la cinética de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* CRA52 en distintos caldos de cultivo, empleando como control caldo MRS, para dicho medio de cultivo estimaron que la velocidad máxima de crecimiento resultó ser  $0,24 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ , concentración de biomasa de  $2,15 \pm 0,18 \text{ g/L}$  y un factor de rendimiento de biomasa respecto al consumo de sustrato ( $Y_{x/s}$ ) de 0,11, el cultivo se realizó a condiciones estáticas a  $37^\circ\text{C}$ , por lo que; los resultados obtenidos en nuestro estudio están en concordancia a los observados en otros estudios para cepas de la especie lactobacilos. En otro estudio Messens W. & Col [58] determinaron los parámetros cinéticos de *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 en un medio de cultivo preparado y enriquecido con fructosa y maltosa como fuente de carbono, determinaron que a temperaturas entre 30 a  $37^\circ\text{C}$  el valor de la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\text{max}}$ ) fue de  $0,25 \text{ h}^{-1}$ . Para determinar los parámetros cinéticos de *Lactobacillus plantarum* Gupta S. & Col [59] determinaron, mediante modelamiento matemático, empleando la ecuación de Gompertz modificado, la velocidad máxima de crecimiento de la cepa bajo diferentes condiciones de fermentación de algas marinas en agua destilada como medio de cultivo, por lo que; la velocidad máxima de la cepa estuvo en el rango de  $0,19 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$  y  $0,40 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ , estimaron un tiempo de retraso en el rango de 0,46-0,72 h bajo condiciones de agitación entre 0-100 RPM a  $37^\circ\text{C}$ .

#### **4.3. Viabilidad de la cepa bacteriana y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el medio colónico simulado**

La microbiota y sus metabolitos ejercen un papel importante en la salud intestinal, por lo que es significativo estimular la producción de metabolitos que aporten un efecto benéfico al huésped, dentro de estos metabolitos están incorporados los AGCC, los cuales se han descrito ampliamente en la literatura como moléculas que promueven efectos antiinflamatorios, inmuno-reguladores, antiobesidad, antidiabéticos y anticancerígenos. Por lo que; los procesos metabólicos de bacterias probióticas promueven la producción de estos metabolitos, teniendo en cuenta que dicha fermentación se realiza por mecanismos metabólicos específicos. En nuestro estudio *L. fermentum* UCO-979C mostró incapacidad para utilizar los carbohidratos inulina o FOS como fuentes de carbono como sustrato aprovechable para

sus procesos metabólicos que influyan positivamente en la producción de biomasa viable y estimule la producción de metabolitos de interés, como los ácidos grasos de cadena corta en cantidades cuantificables, esto se atribuye principalmente a la estructura química de los fructooligosacáridos, por lo que la cepa carece del mecanismo enzimático que permite hidrolizar dichos carbohidratos en azúcares más simples, para de esta forma poder aprovechar dicho sustrato. Estos resultados son consistentes con lo informado por Özer D & Col [60] en el cual suplementaron yogures con inulina y lactulosa para estimular el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 y *Bifidobacterium bifidum* BB-02, los resultados demostraron que la inulina no estimuló el crecimiento de *L. acidophilus* LA-5, pero, cuando se suplementó el yogurt con lactulosa hubo un crecimiento de la cepa *Lactobacillus acidophilus* LA-5 con diferencias significativas respecto al día uno del ensayo, pero, la inulina estimuló el crecimiento de la cepa *Bifidobacterium bifidum* BB-02 en aproximadamente 7,5 veces, además, cuando se suplementó el yogurt con lactulosa el crecimiento de esta cepa se vio incrementado entre 10-14 veces el valor inicial, esto se debe principalmente a la actividad intracelular 2,1  $\beta$ -D fructano-fructanohidrolasa de las cepas *Bifidobacterium* [61]. En revisiones bibliográficas en las cuales se han sometidos diversas cepas probióticas a medios de cultivos, al cual se le ha modificado la fuente de carbono por diversos fructooligosacáridos de un mayor o menor grado de polimerización (aumento o disminución del número de fructosa dentro de la estructura química de la molécula) influye de forma importante en la viabilidad y crecimiento de estos probióticos, esto se debe esencialmente a la exigencia de poder hidrolizar dicho sustrato, estas observaciones fueron hechas por Hiroyuki Ito & Col [62] en la cual prepararon una dieta para ratas suplementada con fructanos de diversos grados de polimerización, pudiendo observar que los fructanos con un grado de polimerización menor estimulaban la producción de lactobacilos en el ciego de las ratas y los fructanos que tenían un mayor grado de polimerización promovían especialmente el crecimiento de bifidobacterias, por lo que; concluyeron que los lactobacilos tienen un potencial bajo para metabolizar fructanos de alto grado de polimerización.

Para aprovechar de forma eficiente los sustratos es necesario que estos estén disponibles en estructuras químicas adecuadas, por lo que la comunidad bacteriana intestinal debe ser lo más diversa posible, de esta forma poder establecer un consorcio bacteriano que permita la

hidrolisis de estos fructanos poliméricos, para así, obtener azúcares con estructuras más simples que puedan ser utilizados como sustrato para la producción de estos metabolitos. Los resultados obtenidos en nuestro estudio confirman el uso de la glucosa como sustrato adecuado para estimular el crecimiento de la cepa y promueve la producción de ácido acético como metabolito de interés por fermentación de este sustrato.

Valenzuela JF. & Col [63] han descrito *L fermentum* UCO-979C como una cepa heterofermentativa facultativa, es decir, la ruta metabólica de azúcares incorpora principalmente rutas de síntesis de pentosas, por lo que estimula la producción de lactato, etanol, acetato y dióxido de carbono. El ingreso de la glucosa a la célula bacteriana se ve mediado por permeasas expresadas en la superficie celular, para posteriormente reaccionar con una molécula de ATP mediado por la enzima glucoquinasa (glucokinase) la cual facilita la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato, posteriormente, por acción de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, cataliza la reducción de la  $\text{NADP}^+$  a expensas de la deshidrogenación de la glucosa-6-fosfato en 6-fosfogluconato y  $\text{NADPH}$ , para posteriormente, por acción enzimática de 6-fosfogluconato deshidrogenasa cataliza la descarboxilación oxidativa del 6-fosfogluconato a ribulosa 5-fosfato, mediante la acción enzimática de la ribulosa-fosfato 3-epimerasa cataliza la interconversión de D-ribulosa-5-fosfato y D-xilulosa 5-fosfato, por reacción enzimática, mediada por D-xylulose-5-fosfocetolasa cataliza la reacción de d-xilulosa-5-fosfato para formar acetilfosfato y el d-gliceraldehído-3-fosfato, la reacción del d-gliceraldehído-3-fosfato con 2 moléculas de ATP (proceso de glicolisis requiere energía) produciendo lactato, en el caso del acetilfosfato, se presume que la enzima fosfato acetiltransferasa media la conversión de acetilfosfato en acetil-CoA, el cual interviene en la producción de acetaldehído mediado por la enzima acetaldehído deshidrogenasa en la oxidación de  $\text{NADPH}$  a  $\text{NADP}^+$ , el acetaldehído producido sufre la conversión a etanol mediado por la enzima alcohol deshidrogenasa mediante la oxidación de una molécula de  $\text{NADPH}$  a  $\text{NADP}^+$ , por otra parte, el acetilfosfato puede sufrir una conversión a ácido acético por la acción mediadora de la enzima acetato quinasa mediante la liberación de una molécula de ATP. El proceso metabólico descrito facilita la comprensión del mecanismo necesario para el aprovechamiento del sustrato, lo

cual hace relevante la disponibilidad de azúcares simples en el medio, de esta forma poder permitir la actividad enzimática y metabólica en la cepa.

*L. fermentum* UCO-979C aprovecha la glucosa para metabolizar ácido acético, produciendo  $27,60 \pm 3,47$  mM en el medio gástrico simulado cuando se ha suplementado con la concentración más alta de carbohidrato (30 g/L), este resultado es comparable por lo informado por Yu Eun Cheong. & Col [64], en este estudio propiciaron la fermentación de fucosa, un monosacárido de seis (6) átomos de carbono, con la intención de dilucidar el metabolismo de *Lactobacillus rhamnosus* GG empleando como medio de cultivo MRS, modificando la fuente de carbono por este azúcar bajo condiciones anaeróbicas, logrando cuantificar 23,22 mM (1,393 g/L) de ácido acético en este medio simulado. En otro estudio [70], evaluaron en ensayos *in vitro* la Influencia de las estructuras de galactooligosacáridos y fructooligosacáridos en la fermentación por la microbiota intestinal humana de los mismos, en base a la selectividad de sustrato cuantificaron la producción de ácidos grasos de cadena corta, para lo cual el ácido acético resultó estar en el rango de 24,79-42,79 mM a las 24 horas de ensayo, esto se debe principalmente a la disponibilidad y dificultad para hidrolizar dichos carbohidratos, por lo que la comunidad microbiana presente en el ensayo facilita la hidrólisis de los mismos, propiciando un efecto sinérgico en el medio, además, observaron que existe una modificación en la relación de las poblaciones de bifidobacterias y lactobacilos, aduciendo que este cambio en la población promueve la producción de ácido acético, además, concluyeron que la producción de ácido acético se vio disminuida cuando en el medio simulado se fortificaba con FOS de grado de polimerización medio.

La importancia de los ácidos grasos de cadena corta radica en el beneficio que aportan a la homeostasis intestinal, ejercen un efecto inmunomodulador y se asocian a diversos efectos benéficos a la salud en general, por lo que *L. fermentum* UCO-979C es un microorganismo probiótico que produce ácido acético en cantidades importantes, lo que la convierte en una cepa de gran relevancia. El acetato es el ácido graso que alcanza mayor concentración sistémica, para evaluar el efecto benéfico del acetato se promovió la inflamación neutrofílica en un modelo de gota en ratones, la cual se caracteriza por la deposición de urato monosódico (UMS) en las articulaciones, y observaron que el pretratamiento oral con acetato indujo una reducción dependiente de la dosis en los neutrófilos inducidos por cristales de UMS en la

cavidad de la rodilla y redujo la hipernocicepción a las 15 h después de la inyección del estímulo, en comparación con los ratones que recibieron cristales de UMS solos, además, el acetato indujo la apoptosis de neutrófilos que inducen inflamación [65]. Otro estudio informó que el acetato disminuyó la acumulación de lípidos y mejoró la función hepática, además de aumentar la eficiencia mitocondrial. En el tejido adiposo blanco, inhibió la lipólisis, aumentando la capacidad termogénica que condujo a una reducción de la adiposidad corporal en ensayos con ratones [66]. En otro estudio evaluaron como los trastornos sistémicos relacionados con el envejecimiento natural en ratones mejoraron cuando se suplementaron con acetato, donde encontraron que el acetato revirtió significativamente el número agotado de células caliciformes ileales, redujo la expresión de la proteína mucina-2 y el aumento de la infiltración de linfocitos en el tejido del íleon de ratones viejos. Otro estudio demostró el efecto benéfico del ácido acético y propiónico sobre la supervivencia de las células de cáncer colorrectal en ensayos *in vitro* [67].

La técnica analítica empleada para identificar y cuantificar los AGCC ha sido por excelencia la cromatografía de gases (GC), es el más confiable entre los métodos con respecto a LOQ, precisión, exactitud, preparación de la muestra y volumen de la muestra requerida para la medición. En nuestro estudio se lograron límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) que son comparables a los obtenidos por Fiori J. & Col. [68], en el cual ocuparon una fibra de extracción compuesta por CAD/PDMS (Carboxeno/Polidimetilsiloxano), una columna con características similares en su composición a la utilizada en nuestro estudio, para lo que obtuvieron un LOD y LOQ de 0,068 y 0,226  $\mu\text{mol/g}$ , y un rango lineal entre 0,3-60  $\mu\text{mol/g}$  para el ácido acético. Otro estudio informó un límite de detección para el ácido acético de 20 mg/L (0,333  $\mu\text{mol/ml}$ ) [69], por lo que los límites de detección y cuantificación están dentro de los rangos informados por otros autores para ensayos similares.

## 5.0. CONCLUSIONES

- 1) Este estudio permitió establecer las condiciones óptimas de producción de células viables de *L. fermentum* UCO-979C cuando el medio de cultivo es MRS caldo, además, se obtuvieron parámetros cinéticos relevantes empelando modelos matemáticos por ajuste de datos no lineales a los mismos.
- 2) Se ha obtenido un modelo matemático a partir del balance de masas y la ecuación de Monod para estimar la producción de biomasa viable durante 12 horas de fermentación, cuando el medio de cultivo es caldo MRS, lo que facilita el dimensionamiento de biorreactores para procesos productivos batch.
- 3) La producción de células viables en los procesos de fermentación está fuertemente mediado por la fuente de carbono. Cuando se sustituyó la fuente de carbono en el medio de cultivo por fructanos de estructuras químicas más complejas que la glucosa, la cepa no pudo aprovechar dicho sustrato para sus procesos metabólicos que promuevan la multiplicación celular. Por lo que se acepta la hipótesis nula, en la cual se establece que los fructanos no ofrecen un sustrato aprovechable por la cepa para su crecimiento o metabolismos.
- 4) *L. fermentum* UCO-979C se mantiene viable bajo las condiciones simuladas del colón durante las 24 horas de ensayos, favoreciendo una alta producción de ácido acético cuando se suplementa el medio con glucosa, siendo dependiente de la concentración de sustrato. La cepa no aprovecha la inulina o FOS en el medio colónico simulado.
- 5) Se han establecidos las bases fundamentales para producir a *L. fermentum* UCO-979C a escala semiindustrial o industrial, pudiendo obtener un producto con alta capacidad de reproducibilidad, bajo condiciones mínimas de cultivo, favoreciendo una alta viabilidad en el producto final.
- 6) Los retos posteriores deben estar enfocados en evaluar distintos medios de cultivos, que promuevan una alta recuperación viable de la cepa, de bajo costo, de fácil implementación y, la cepa mantenga las características relevantes que la hacen una cepa probiótica de gran importancia contra *H. pylori*.

## 6.0. BIBLIOGRAFIA

- [01] Prashar A., Lozano-Ruf A., L. Jones N. *Helicobacter pylori* Infection (Including Pediatric), Encyclopedia of Gastroenterology (Second Edition), Academic Press, 2020.
- [02] Megraud F., Lehours P. *Helicobacter pylori*, Encyclopedia of Gastroenterology (Second Edition), Academic Press, 2020.
- [03] O'Toole P, Lane M, Porwollik S, *Helicobacter pylori* motility, Microbes and Infection, Volume 2, Issue 10, 2000.
- [04] Eaton K.A., Morgan D.R., Krakowka S., *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets, Infect. Immun. 57 (1989) 1119–1125.
- [05] Moodley Y, Linz B, Bond RP, Nieuwoudt M. Age of the Association between *Helicobacter pylori* and Man. May 2012.
- [06] Greenfield L.K., Jones N. L. Modulation of autophagy by *Helicobacter pylori* and its role in gastric carcinogenesis. Trends in Microbiology, 21(11), 2013.
- [07] El español, revista digital. Alerta sanitaria: esta es la frecuente infección de estómago que eleva el riesgo de cáncer. Consultado desde: Alerta sanitaria: esta es la frecuente infección de estómago que eleva el riesgo de cáncer (elespanol.com) el día 22-01-22.
- [08] Muñoz G. *Helicobacter pylori* y Medicina basada en la evidencia. Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Departamento de medicina, Universidad Autónoma de Barcelona. 2019.
- [09] Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan



- GG, Ng SC. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* (2017).
- [10] Gholizadeh J, Gowhari A, Banach M, Jamialahmadi T, Penson P, Johnston T, Sahebkar A. The interaction of *Helicobacter pylori* with cancer immunomodulatory stromal cells: New insight into gastric cancer pathogenesis, *Seminars in Cancer Biology*, 2021.
- [11] Ansari S, Yamaoka Y. Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory. *Helicobacter*. 2017.
- [12] Jaehoon Cho, Akriti Prashar, Nicola L. Jones, Steven F. Moss, *Helicobacter pylori* Infection, *Gastroenterology Clinics of North America*, Volume 50, Issue 2, 2021.
- [13] Capurro, M.I., Greenfield, L.K., Prashar, A. *et al.* VacA generates a protective intracellular reservoir for *Helicobacter pylori* that is eliminated by activation of the lysosomal calcium channel TRPML1. *Nat Microbiol* 4, 1411–1423 (2019).
- [14] Willhite D.C. Blanke S.R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. Department of Biology/Biochemistry, University of Houston, Houston, Texas. February 2004.
- [15] Stein M, Ruggiero P, Rappuoli R, Bagnoli F. *Helicobacter pylori* CagA: From Pathogenic Mechanisms to Its Use as an Anti-Cancer Vaccine. *Inmunol front*. 2013.
- [16] Moon JY, Kim GH, You HS et al. Levofloxacin, Metronidazole, and Lansoprazole Triple Therapy Compared to Quadruple Therapy as a SecondLine Treatment of *Helicobacter pylori* Infection in Korea. *Gut Liver* 2013.
- [17] Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y. Gen promotor de úlcera duodenal de *Helicobacter pylori*. *Gastroenterología*. 2005.

- [18] Takahashi-Kanemitsu, A., Knight, C.T. & Hatakeyama, M. Anatomía molecular y acciones patogénicas de *Helicobacter pylori* que sustentan la carcinogénesis gástrica. *Cell Mol Immunol* 17, 50–63 (2020).
- [19] Michael Sigal, Michael E. Rothenberg, Catriona Y. Logan, Josephine Y. Lee, Ryan W. Honaker, Rachel L. Cooper, Ben Passarelli, Margarita Camorlinga, Donna M. Bouley, Guillermo Alvarez, Roeland Nusse, Javier Torres, Manuel R. Amieva, *Helicobacter pylori* Activates and Expands Lgr5+ Stem Cells Through Direct Colonization of the Gastric Glands. *Gastroenterology*, Volume 148, Issue 7, 2015.
- [20] Correa P. Gastritis crónica: una clasificación clínico-patológica. *Am J Gastroenterol*. 1988 Mayo.
- [21] Collisson, E. A. C. J., Campbell, J., Brooks, A., Berger, A., Lee, W., Chmielecki, J. & Helman, E. (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma: The cancer genome atlas research network. *Nature*, 511(7511), 543-550. 31 July 2014.
- [22] Liu C, Wang Y, Shi J, Zhang C, Nie J, Li S, Zheng T. The status and progress of first-line treatment against *Helicobacter pylori* infection: a review. *Therap Adv Gastroenterol*. 2021.
- [23] Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Am J Gastroenterol*. 2017.
- [24] Cremonini F, Di Caro S, Covino M, Armuzzi A, Gabrielli M, Santarelli L, Nista EC, Cammarota G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Effect of different probiotic preparations on *anti-Helicobacter pylori* therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol*. 2002
- [25] Shan P. H, Chun Y. Chun Chen Y., Su-Fen T., Chung-Mou O, An-Erl V. Eradication of *Helicobacter pylori* Infection by the Probiotic Strains *Lactobacillus*

*johnsonii* MH-68 and *L. salivarius* ssp. *salicinius* AP-32. Wiley Online Library, Volume17, 6 December 2012.

- [26] Westerik N, Reid G, Sybesma W, Kort R. The Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* for Alleviation of *Helicobacter pylori*-Associated Gastric Pathology in East Africa . *Frontiers in Microbiology*. Volume 9, 2018.
- [27] García A, Henríquez P, Retamal C, Pineda S, Delgado C, González C. propiedades probióticas de *Lactobacillus spp* aislados de biopsias gástricas de pacientes con y sin infección por *Helicobacter pylori*. *Revista médica Chilena SCIELO*, Volumen 137, paginas 367-376. Año 2009.
- [28] Chen, Yi-Hsing, Wan-Hua Tsai, Hui-Yu Wu, Chun-Ya Chen, Wen-Ling Yeh, Ya-Hui Chen, Hui-Ying Hsu, Wei-Wei Chen, Yu-Wen Chen, Wen-Wei Chang, Tzu-Lung Lin, Hsin-Chih Lai, Yu-Hsin Lin, and Chih-Ho Lai. Probiotic *Lactobacillus spp.* Act Against *Helicobacter pylori*-induced Inflammation" *Journal of Clinical Medicine*. 2019.
- [29] Karlyshev A, Villena J, González C, Albarracín L, Barros J, Garcia A. Draft Genome Sequence of a Probiotic Strain, *Lactobacillus fermentum* UCO-979C. *ASM Journals*, Volume 03, N° 06, 10 december 2015.
- [30] Chaudhari K, Mohan M, Saudagar P, Sable C, Shinde S, Bedade D. In vitro and in vivo evaluation of probiotic potential and safety assessment of *Bacillus coagulans* SKB LAB-19 (MCC 0554) in humans and animal healthcare. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Volume 133, august 2022.
- [31] Garcia V, Zelaya H, Ilabaca A, Espinoza M, Komatsu R, Albarracín L, Kitazawa H, García A, Villena J. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Benef Microbes*. 2018

- [32] García V, Komatsu R, Clua P, Indo Y, Takagi M, Salva S, Islam MA, Alvarez S, Takahashi H, Garcia A, Kitazawa H, Villena J. Evaluation of the Immunomodulatory Activities of the Probiotic Strain *Lactobacillus fermentum* UCO-979C. *Front Immunol.* 2019 June.
- [33] Merino J, García A, Pastene E, Salas A, Saez K, González CL. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strongly inhibited *Helicobacter pylori* SS1 in *Meriones unguiculatus*. *Benef Microbes.* 2018 June.
- [34] Gutiérrez C, González M, Díaz G, Smith CT, González C, García A. Increased anti-*Helicobacter pylori* effect of the probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strain encapsulated in carrageenan evaluated in gastric simulations under fasting conditions. *Food Res Int.* 2019 July.
- [35] Paucar C, Espinoza M, Gutiérrez C, Sánchez K, Carvajal RI, Rogel C, Sáez K, García A. Incorporation of *Limosilactobacillus fermentum* UCO-979C with Anti-*Helicobacter pylori* and Immunomodulatory Activities in Various Ice Cream Bases. *Foods.* 2022 Jan 25.
- [36] Parra C, Sánchez K, Olivares J, Gutiérrez C, Smith CT, Carvajal R, Sáez K, González C, García A. Consumption of a Gelatin Supplemented with the Probiotic Strain *Limosilactobacillus fermentum* UCO-979C Prevents *Helicobacter pylori* Infection in a Young Adult Population Achieved. *Foods.* 2022 June.
- [37] Aguilera C. Producción de las cepas *Lactobacillus rhamnosus* UCO-25A y *salivarius* UCO-979C, de origen gástrico humano, en medios alternativos de bajo costo. Facultad de biología, Universidad de Concepción, 2019.
- [38] Lacroix C, Yildirim S, Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality, *Current Opinion in Biotechnology*, Volume 18, Pages 176-183, 2007.

- [39] Grattepanche F, Lacroix C. Production of viable probiotic cells. Woodhead Publishing Limited, 2013.
- [40] Rincón A, Cuellar A, Valencia F, Sánchez O. Kinetics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* Growth Using Cane Molasses and Sucrose: Assessment of Kinetic Models. *Acta biológica colombiana*, volumen 24, pág 38-57. 2019.
- [41] Fogler Scott H. Elementos de ingeniería de las reacciones químicas. Editorial PEARSON, 4<sup>ta</sup> edición. Capítulo 5, Recolección y análisis de datos de velocidad, pág. 262-263. 2008.
- [42] Martínez M. C, Peláez C, Requena T. Laboratory Simulators of the Colon Microbiome. Department of Food Biotechnology and Microbiology, Institute of Food Science Research, CIAL (CSIC), Madrid, Spain. *Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications*. 2019.
- [43] Hernalsteens S, Huang S, Hua Cong H, Dong Chen X. The final fate of food: On the establishment of in vitro colon models, *Food Research International*, Volume 150, Part A, 2021.
- [44] Diotallevi C, Gaudio G, Fava F, Angeli A, Lotti C, Vrhovsek U, Rinott E, Shai I, Gobbetti M, Tuohy K. Measuring the effect of Mankai (*Wolffia globosa*) on the gut microbiota and its metabolic output using an in vitro colon model, *Journal of Functional Foods*, Volume 84, 2021.
- [45] Ji X, Chang K, Chen M, Zhu L, Osman A, Yin H, Zhao L, In vitro fermentation of chitooligosaccharides and their effects on human fecal microbial community structure and metabolites, *LWT*, Volume 144, 2021.
- [46] Xujiao L, Rui G, Xuejiao W, Xin L, Lianzhong A, Sheng Y, Song Z, Yan W, Dynamic digestion of tamarind seed polysaccharide: Indigestibility in

- gastrointestinal simulations and gut microbiota changes in vitro, *Carbohydrate Polymers*, Volume 239, 2020.
- [47] Li Y, Lu F, Wang X, Hu X, Liao X, Zhang Y. Biological transformation of chlorophyll-rich spinach (*Spinacia oleracea* L.) extracts under in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation, *Food Research International*, Volume 139, 2021.
- [48] Wua Y, Hana Y, Taaa Y, Lia D, Xieb G , Showc P , Ying Lee S. In vitro gastrointestinal digestion and fecal fermentation reveal the effect of different encapsulation materials on the release, degradation and modulation of gut microbiota of blueberry anthocyanin extract. *Food Research International*, 11 February 2020.
- [49] Rodríguez S, Cardelle A, Roca P, Porto J, Miranda J, Cepeda A, In vitro evaluation of the prebiotic effect of red and white grape polyphenolic extracts, *J Physiol Biochem*, 12 June 2017
- [50] Bussolo de Souza C, Roeselers G, Troost F, Jonkers D, Koenen M, Venema K. Prebiotic effects of cassava bagasse in TNO's in vitro model of the colon in lean versus obese microbiota, *Journal of Functional Foods*, Volume 11, 2014.
- [50] Bussolo de Souza C, Roeselers G, Troost F, Jonkers D, Koenen M, Venema K. Prebiotic effects of cassava bagasse in TNO's in vitro model of the colon in lean versus obese microbiota, *Journal of Functional Foods*, Volume 11, 2014.
- [51] Cueva C, Jiménez A, Muñoz I, Fernández A, Gil I, Dueñas M, Martín P, Pozo M, Bartolomé B, Moreno M. Application of a new Dynamic Gastrointestinal Simulator (SIMGI) to study the impact of red wine in colonic metabolism. *Food Research International*, Volume 72, Pages 149-159. 2015.
- [52] Macfarlane G. T, Macfarlane S, Gibson G. R. Validation of a Three-Stage Compound Continuous Culture System for Investigating the Effect of Retention

- Time on the Ecology and Metabolism of Bacteria in the Human Colon. *Microb Ecol*, volume 35:180–187. 1998.
- [53] Xu Y, Xiang S, Ye K, Zheng Y, Feng X, Zhu X, Chen J and Chen Y. Cobalamin (Vitamin B12) Induced a Shift in Microbial Composition and Metabolic Activity in an *in vitro* Colon Simulation. *Frontier Microbiology*, 2018, 16 November.
- [54] Dubois M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. Colorimetric Method for Determination of Sugars, and related Substances. *Analytical Chemistry*, Volume 28, N° 3, March 1956.
- [55] Gamze Üçok, Durmuş Sert. Growth kinetics and biomass characteristics of *Lactobacillus plantarum* L14 isolated from sourdough: Effect of fermentation time on dough machinability. *LWT*, vol 129. 2020.
- [56] Giulia Bisson, Marilena Marino, Denise Poletti, Nadia Innocente, Michela Maifreni, Turbidimetric definition of growth limits in probiotic *Lactobacillus* strains from the perspective of an adaptation strategy, *Journal of Dairy Science*, Volume 104, Issue 12, 2021.
- [57] Abhay Sharma, Sandipan Mukherjee, Subbi Rami Reddy Tadi, Aiyagari Ramesh, Senthilkumar Sivaprakasam, Kinetics of growth, plantaricin and lactic acid production in whey permeate based medium by probiotic *Lactobacillus plantarum* CRA52, *LWT*, Volume 139, 2021.
- [58] Winy Messens, Patricia Neysens, Wim Vansieleghem, Johan Vanderhoeven y Luc De Vuyst. Modeling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in response to temperature and pH values used for sourdough fermentations. *AEM*, march 2002
- [59] Shilpi Gupta, Nissreen Abu-Ghannam, Amalia G.M. Scannell, Growth and kinetics of *Lactobacillus plantarum* in the fermentation of edible Irish brown seaweeds, *Food and Bioproducts Processing*, Volume 89, Pages 346-355, 2011.

- [60] Özer D, Akin S, Özer B. Efecto de la inulina y la lactulosa en la supervivencia de *Lactobacillus acidophilus* LA-5 y *Bifidobacterium bifidum* BB-02 en yogur *Acidophilus-Bifidus*. *Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, volumen 11(1):19-24. 2005.
- [61] Marcel B. Roberfroid, Jan A.E. Van Loo, Glenn R. Gibson, The Bifidogenic Nature of Chicory Inulin and Its Hydrolysis Products, *The Journal of Nutrition*, Volume 128, Pages 11-19, 1998.
- [62] Hiroyuki Ito, Naoki Takemura, Kei Sonoyama, Hirokazu Kawagishi, David L. Topping, Michael A. Conlon, and Tatsuya Morita. Degree of Polymerization of Inulin-Type Fructans Differentially Affects Number of Lactic Acid Bacteria, Intestinal Immune Functions, and Immunoglobulin A Secretion in the Rat Cecum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**.
- [63] Valenzuela JF, Pinuer L, Cancino AG, Yáñez RB. Effect of pH and dilution rate on specific production rate of extra cellular metabolites by *Lactobacillus salivarius* UCO-979C in continuous culture. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015.
- [64] Yu Eun Cheong, Jungyeon Kim, Yong-Su Jin, Kyoung Heon Kim, Elucidation of the fucose metabolism of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG by metabolomic and flux balance analyses, *Journal of Biotechnology*, Volume 360, Pages 110-116. 2022.
- [65] Vieira, A.T.; Galvao, I.; Macia, L.M.; Sernaglia, E.M.; Vinolo, M.A.R.; Garcia, C.C.; Tavares, L.P.; Amaral, F.A.; Sousa, L.P.; Martins, F.S.; et al. Dietary fiber and the short-chain fatty acid acetate promote resolution of neutrophilic inflammation in a model of gout in mice. *J. Leukoc. Biol.* Pages 275–284. 2017.
- [66] Sahuri-Arisoylu, M., Brody, L., Parkinson, J. Reprogramación de la acumulación de grasa hepática y "pardeamiento" del tejido adiposo por el acetato de ácidos grasos de cadena corta. *Int J Obes* **40**, 955–963. 2016.



- [67] Casanova, M.R.; Azevedo-Silva, J.; Rodrigues, L.R.; Preto, A. Colorectal cancer cells increase the production of short chain fatty acids by propionibacterium freudenreichii impacting on cancer cells survival. *Front. Nutr.* 2018.
- [68] Jessica Fiori, Silvia Turrone, Marco Candela, Patrizia Brigidi, Roberto Gotti, Simultaneous HS-SPME GC-MS determination of short chain fatty acids, trimethylamine and trimethylamine N-oxide for gut microbiota metabolic profile, *Talanta*, Volume 189, Pages 573-578. 2018.
- [69] F. Bianchi, M. Dall'Asta, D. Del Rio, A. Mangia, M. Musci, F. Scazzina, Development of a headspace solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometric method for the determination of short-chain fatty acids from intestinal fermentation, *Food Chemistry*, Volume 129, Pages 200-205. 2011.
- [70] Wei Li, Keqi Wang, Yi Sun, Hong Ye, Bing Hu, Xiaoxiong Zeng, Influences of structures of galactooligosaccharides and fructooligosaccharides on the fermentation in vitro by human intestinal microbiota, *Journal of Functional Foods*, Volume 13, 2015.
- [71] Wahlgren M, Axenstrand M, Håkansson Å, Marefati A, Lomstein Pedersen B. *In Vitro* Methods to Study Colon Release: State of the Art and An Outlook on New Strategies for Better *In-Vitro* Biorelevant Release Media. *Pharmaceutics*. 2019 Feb 22.
- [72] Macfarlane G, Macfarlane S. Bacteria, Colonic Fermentation, and Gastrointestinal Health. *Journal of AOAC International* Vol. 95, No. 1, 2012.