

**CAPACIDAD INHIBITORIA DE UN SUSTRATO FERMENTADO CON
Lactobacillus acidophilus AISLADO DE TRACTO INTESTINAL HUMANO,
SOBRE *Vibrio cholerae* 01 OGAWA *In vitro***

Por

GLADYS MILENA GUERRERO FLOREZ

SANDRA SOFIA GUZMÁN SALAZAR

NUBIA YADIRA YANDAR BARAHONA

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS

PROGRAMA DE BIOLOGIA ENFASIS EN MICROBIOLOGIA

2002

**CAPACIDAD INHIBITORIA DE UN SUSTRATO FERMENTADO CON
Lactobacillus acidophilus AISLADO DE TRACTO INTESTINAL HUMANO,
SOBRE *Vibrio cholerae* 01 OGAWA *In vitro***

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Biólogo con énfasis en Microbiología**

Por

GLADYS MILENA GUERRERO FLOREZ

SANDRA SOFIA GUZMÁN SALAZAR

NUBIA YADIRA YANDAR BARAHONA

Asesor

Alvaro Pazos Moncayo M. Sc.*

*** Profesor asistente, Departamento de Biología, Universidad de Nariño**

UNIVERSIDAD DE NARIÑO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMATICAS

PROGRAMA DE BIOLOGIA ENFASIS EN MICROBIOLOGIA

2002

**“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son
responsabilidad de sus autores”**

Artículo 1° del Acuerdo N° 324 de octubre 11 de 1966, Emanado del Honorable
Consejo Directivo de la Universidad de Nariño

NOTA DE ACEPTACIÓN

MARIA CLARA YEPES
Jurado

MARIA ELENA ERAZO
Jurado

CRISTINA CERON
Jurado

ALVARO PAZOS MONCAYO
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresan agradecimientos por su valiosa colaboración para el desarrollo del trabajo a:

Alvaro Pazos Moncayo, M.Sc. Microbiología, Director (E) Departamento de Biología, Universidad de Nariño, Asesor de la investigación

María Elena Erazo, Bacterióloga, Jefe Laboratorio Clínico Hospital Departamental

María Clara Yépez, M.Sc. Ciencias Biomédicas, Directora del Centro de Estudios Superiores Universidad de Nariño – CESUN

Cristina Cerón Souza, Enfermera, Coordinadora Programa Tecnología en Promoción de la Salud, Universidad de Nariño

Martha Sofía Gonzáles, M.Sc. Sistemática Vegetal, Jefe de Laboratorios y Equipos, Universidad de Nariño

María Raquel Díaz del Castillo, Bacterióloga, Coordinadora Laboratorio Salud Pública de Nariño

Guido Ernesto Villota Calvachi, Biólogo con énfasis en Microbiología Industrial, Auxiliar del Laboratorio No. 4 de Microbiología, Universidad de Nariño.

Wilfredo Velásquez, Físico, Universidad de Nariño

Ernesto Ruíz, Ingeniero de Sistemas, Universidad de Nariño

Mario Fernando Benavides, Microbiólogo, Universidad de los Andes

Arsenio Hidalgo Troya, M.Sc. Matemáticas aplicadas, Decano Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad de Nariño

Carlos Mosquera, Ingeniero Agrónomo, Universidad de Nariño

Cristina Ramírez, M.Sc. Microbiología Industrial, Universidad del Valle

Lina María Gonzáles, Ingeniera Química, Universidad del Valle

Personal de Laboratorios de Química y Biología, Universidad de Nariño

Y a todas las personas que colaboraron de alguna manera en el desarrollo del trabajo

CONTENIDO

	pág.
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GENERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
3. ANTECEDENTES	4
4. MARCO TEORICO	7
4.1 ENFERMEDAD DIARREICA	7
4.2 CÓLERA	8
4.2.1 <i>Vibrio cholerae</i>	9
4.2.2 Identificación de <i>Vibrio cholerae</i>	10
4.2.2.1 Identificación serológica	11
4.2.2.1.1 Serogrupo de <i>V. cholerae</i> 01	11
4.2.2.1.2 Serotipos de <i>V. cholerae</i> 01	11
4.2.2.1.3 Aglutinación en lámina	12
4.2.2.2 Identificación bioquímica	12
4.2.2.2.1 Prueba de oxidasa	12

4.2.2.2.2	Prueba del hilo mucoide	13
4.2.2.2.3	Azúcares y carbohidratos	13
4.2.2.3	Identificación molecular	13
4.2.2.3.1	Perfiles de plásmidos	14
4.2.2.3.2	RFLP	14
4.2.2.3.3	Análisis de enzimas de loci múltiples	14
4.2.3	Mecanismo de infección	14
4.2.4	Prevención y tratamiento	15
4.3	BACTERIAS LACTICAS	16
4.3.1	Características morfológicas	16
4.3.2	Características fisiológicas y bioquímicas	17
4.3.3	Metabolismo de bacterias ácido lácticas	18
4.3.4	Clasificación filogenética de bacterias ácido lácticas	19
4.3.5	<i>Lactobacillus sp.</i>	21
4.3.6	<i>Lactobacillus</i> de tracto intestinal	22
4.3.6.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	22
4.3.6.1.1	Efectos antimicrobianos	23
4.3.6.1.2	Efectos inmunomodulantes	24
4.3.6.1.3	Efecto hipocolesterolémico	25
4.3.6.1.4	Intolerancia a la lactosa	25
4.3.6.2	<i>Bifidobacterium sp.</i>	26

4.3.6.2.1	Efectos en la microflora intestinal	26
4.3.6.2.2	Efectos sobre la constipación leve	26
4.3.6.2.3	Prevención de diarrea	27
4.3.6.2.4	Efectos inmunomodulantes	27
4.3.7	Propiedades antimicrobianas de BAL	27
4.3.7.1	Peróxido de hidrógeno	27
4.3.7.2	Nisina	29
4.3.7.3	Acido láctico	30
4.3.7.4	Bacteriocinas	31
4.3.7.4.1	Tipos de bacteriocinas	33
4.3.7.4.2	Ventajas de las bacteriocinas	34
4.4	PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SIMBIÓTICOS	34
4.5	ALIMENTOS FUNCIONALES CON BACTERIAS	
	ÁCIDO LÁCTICAS	37
5.	METODOLOGIA	39
5.1	FASE I. AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN, CONSERVACIÓN Y ACTIVACIÓN DE BAL DE TRACTO INTESTINAL HUMANO	40
5.1.1	Aislamiento	40
5.1.2	Purificación	42
5.1.3	Conservación	42
5.1.4	Activación	43

5.2	FASE II. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD AMILOLÍTICA E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	43
5.2.1	Determinación de capacidad amilolítica	43
5.2.2	Identificación del aislado	44
5.3	FASE III. ELECCIÓN DEL SUSTRATO	45
5.3.1	Cultivo del inóculo	45
5.3.2	Fermentación en matraz	47
5.3.3	Parámetros de fermentación	48
5.3.3.1	Determinación de la acidez del fermento	49
5.3.4	Evaluación del crecimiento bacteriano	49
5.3.4.1	Turbidimetría	49
5.3.4.2	Recuento en placa	49
5.3.5	Determinación de proteínas	50
5.3.6	Determinación de azúcares y ácido láctico por el método de HPLC	50
5.3.7	Evaluación de los parámetros de fermentación	51
5.3.8	Evaluación de la cinética de crecimiento	52
5.4	FASE IV. ENSAYO DE INHIBICIÓN ANTAGÓNICA <i>In vitro</i>	53
6.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56

7.	CONCLUSIONES	83
8.	RECOMENDACIONES	85
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	86
	ANEXOS	95

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Composición de los medios de cultivo.	96
Anexo B. Características morfológicas microscópicas de los aislados.	98
Anexo C. Resultados pruebas API CH50.	101
Anexo D. Composición bromatológica	102
Anexo E. Determinación de proteínas.	105
Anexo F. Curva de calibración y condiciones de manejo para HPLC.	107
Anexo G. Resultados de los diferentes sustratos fermentados con <i>L. acidophilus</i> .	109
Anexo H. Resultados de cinética de crecimiento de <i>L. acidophilus</i> en el medio melaza - leche en polvo y MRS comercial.	115

LISTA DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Características metabólicas de <i>Lactobacillus sp.</i>	21
Cuadro 2. Bacteriocinas producidas por BAL	32
Cuadro 3. Frecuencia de las características morfológicas para cada individuo	57
Cuadro 4. Bacterias lácticas con mejor capacidad amilolítica	61
Cuadro 5. Principales características morfológicas y fisiológicas de <i>L. acidophilus</i>	63
Cuadro 6. Pruebas bioquímicas convencionales	64
Cuadro 7. Ensayo de elección con harina de trigo	65
Cuadro 8. Ensayo de elección con harina de plátano	66
Cuadro 9. Ensayo de elección con almidón de yuca	67
Cuadro 10. Ensayo de elección con melaza	68
Cuadro 11. Ensayo de elección con harina de soya y arroz	69
Cuadro 12. Ensayo de elección con harina de yuca	70
Cuadro 13. Ensayo de elección Interensayos	71
Cuadro 14. Resultados del ANDEVA para los halos de inhibición antagónica en mm del sustrato probiótico sobre <i>Vibrio</i>	

LISTA DE FOTOGRAFIAS

	pág.
Fotografía 1. Aislamiento y purificación de BAL.	56
Fotografía 2. Conservación de BAL y <i>Vibrio cholerae</i> 01 OGAWA.	58
Fotografía 3. Activación de BAL y <i>Vibrio cholerae</i> 01 OGAWA.	59
Fotografía 4. Características microscópicas de <i>V. cholerae</i> 01 OGAWA	59
Fotografía 5. Actividad amilolítica de bacterias lácticas en agar MRS almidón.	60
Fotografía 6. Características microscópicas de <i>L. acidophilus</i>	63
Fotografía 7. Ensayos de inhibición antagónica <i>in vitro</i> .	80

LISTA DE GRAFICAS

	pág.
Gráfica 1. Promedios de los halos de hidrólisis del almidón para las bacterias lácticas y prueba de Tukey.	62
Gráfica 2. Cromatograma obtenido por HPLC para el medio melaza con leche en polvo a las 24 horas de fermentación.	72
Gráfica 3. Comportamiento cinético de <i>Lactobacillus acidophilus</i> en el medio melaza con leche en polvo.	74
Gráfica 4. Producción de proteína y formación de biomasa de <i>L. acidophilus</i> en el medio melaza con leche en polvo.	75
Gráfica 5. Consumo de azúcares y producción de ácido láctico de <i>L. acidophilus</i> en el medio melaza con leche en polvo.	76
Gráfica 6. Evaluación del pH vs tiempo de <i>L. acidophilus</i> en los medios melaza con leche en polvo y MRS comercial.	78
Gráfica 7. Promedios de halos de inhibición antagónica del producto probiótico sobre <i>Vibrio cholerae</i> 01 OGAWA y prueba de Tukey.	81
Gráfica 8. Promedios de halos de inhibición antagónica del medio MRS fermentado con <i>L. acidophilus</i> sobre <i>V.cholerae</i> 01	

GLOSARIO

α - AMILASA: enzima que lleva a cabo el ataque inicial del polisacárido almidón, acortando la cadena y reduciendo la viscosidad del polímero. Esto se llama reacción de clarificación.

Acetil CoA: combinación rica en energía de ácido acético y CoA; se produce a través de muchas vías catabólicas y es el sustrato del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la biosíntesis de ácidos grasos entre otros.

ACIDOCIS METABÓLICA: perturbación del equilibrio iónico en el organismo con tendencia a bajar el pH por debajo de 7.35 como consecuencia de pérdida de bases o aumento de ácidos

ACTIVIDAD DEL AGUA (A_w): expresión de la disponibilidad relativa del agua en una sustancia. El agua pura tiene una A_w de 1.0.

ADP: adenosina difosfato, nucleósido que se forma generalmente tras la hidrólisis del ATP, cuando suministra energía para el metabolismo.

AGENTE ANTIMICROBIANO: agente que destruye o inhibe el crecimiento de microorganismos.

AGENTES PROBIOTICOS: monocultivos o mezclas de microorganismos vivos que al ser ingeridos por el hombre o los animales actúan benéficamente, mejorando el balance microbiano y las propiedades de la microflora del intestino.

AGLUTINACIÓN: reacción entre un anticuerpo y un antígeno fijado a partículas, que da como resultado un agregado de las partículas.

ALMIDÓN: polisacárido que se desdobla en moléculas más sencillas hasta llegar a la glucosa.

AMILASA: enzima que hidroliza el almidón para la producción de glucosa a partir de este polisacárido.

AMP cíclico: nucleótido cíclico 3',5'- adenosina monofosfato cíclico. En concentraciones elevadas en el intestino provoca la salida de grandes cantidades de agua y electrolitos de las células intestinales hacia la luz intestinal, debido a la presencia de la enterotóxina del cólera.

ANABOLISMO: síntesis de moléculas complejas a partir de otras sencillas, gracias al aporte de energía.

ANAEROBIO AEROTOLERANTE: organismo que puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno, pero su metabolismo es siempre de tipo fermentativo.

ANTICUERPOS: glucoproteína producida como respuesta a un antígeno; posee la capacidad de combinarse con el antígeno que estimuló su producción. También se denomina inmunoglobulina.

ANTIGENO: sustancia extraña (externa al individuo, como una proteína, nucleoproteínas, polisacáridos o, a veces, un glucolípido) frente a la que responden los linfocitos; se denomina también inmunógeno porque induce la respuesta inmunitaria.

ANTISUERO: suero que contiene anticuerpos inducidos.

ATP: adenosina 5-trifosfato, molécula muy energética que posee un potencial de transferencia del grupo fosfato elevado, constituyendo la principal "moneda" de energía de la célula.

AUTOINMUNIDAD: es una situación caracterizada por la presencia de anticuerpos séricos y linfocitos autoreactivos. Puede ser benigna o patógena. Es una consecuencia normal del envejecimiento; es fácilmente inducida por microorganismos o fármacos y se elimina el "agente" agresor.

BACTERIOCINA: moléculas de naturaleza protéica, co-agregados de proteínas o bien glicoproteínas producidas por las bacterias lácticas que poseen una marcada acción inhibitoria sobre otras cepas bacterianas muy similares.

β - GLUCORONIDASA y β - GALACTOSIDASA: enzimas producidas a partir de la fermentación microbiana a nivel intestinal.

β - GLUCOSIDASA: o maltasa, separa residuos sencillos de glucosa de los oligosacáridos y disacáridos con enlace α (1-4), comenzando por los extremos reductores.

BIOCONVERSION: uso de organismos para modificar sustancias que no se utilizan normalmente para el crecimiento. Se denomina también biotransformación o transformación microbiana.

BIOMASA: o masa celular, se puede estimar mediante diversos métodos dependiendo del microorganismo de que se trate.

BIOSÍNTESIS: producción de los constituyentes celulares a partir de otras moléculas, generalmente más sencillas.

BIOTA INTESTINAL: microorganismos vivos que se encuentran colonizando el tracto gastrointestinal humano.

BROTE: incidencia repentina e inesperada de una enfermedad en una población determinada, en un corto período de tiempo.

CASO INDICE: primer caso de enfermedad en una epidemia, en una población determinada.

CATABOLISMO: parte del metabolismo en el que moléculas grandes, más complejas, se descomponen en otras más pequeñas y sencillas, liberando energía.

CATALIZADOR: sustancia que acelera una reacción, sin que cambie el mismo permanentemente.

CELULA VIABLE: célula que es capaz de dividirse para dar lugar a descendencia.

CEPA: población de organismos que descienden de un único organismo o de un cultivo puro.

CITOCROMOS: hemoproteínas que transportan energía, normalmente como componentes de la cadena transportadora de electrones.

COLERA: enteritis infecciosa aguda endémica y epidémica en Asia, que se extiende periódicamente a Oriente Medio, África, Sur de Europa y Sudamérica; causada por el patógeno *V. cholerae*.

COLERAGENO: toxina del cólera; es una molécula proteica muy potente producida por cepas de *V. cholerae* en el intestino delgado, por la ingestión de agua o alimentos contaminados con heces. Actúa sobre las células epiteliales, causando gran secreción de cloruro y bicarbonato, acompañada de secreción de grandes cantidades de lípidos de la superficie de la mucosa.

COLONIA: grupo o conjunto de microorganismos que se multiplican sobre una superficie sólida, como la de un medio de cultivo con agar. La colonia se observa a menudo directamente, pero también puede verse solamente con microscopio.

COLONIZACIÓN: establecimiento de una zona de multiplicación microbiana sobre una superficie inanimada u organismo, sin que tenga como consecuencia necesariamente la invasión o daño tisular.

CRECIMIENTO EQUILIBRADO: crecimiento microbiano en el que todos los constituyentes celulares son sintetizados en proporciones constantes unos respecto a otros.

CROMATOGRAMA: registro de la respuesta del detector en el HPLC; formada por una curva de respuesta frente al tiempo.

CULTIVO DISCONTINUO: cultivo de microorganismos producido al inocular un medio de cultivo en un sistema cerrado, es decir, sin una renovación de los nutrientes, ni eliminación de los residuos durante la incubación.

CULTIVO INICIADOR: inóculo compuesto por una mezcla de microorganismos seleccionados cuidadosamente, que se emplea para comenzar una fermentación.

CULTIVO PURO: o axénico, población de células idénticas porque proceden de la multiplicación de una única célula.

DOSIS INFECTIVA 50 (DI₅₀): se refiere a la dosis o número de organismos que producirán la infección del 50% de los huéspedes de un grupo experimental, en un periodo de tiempo determinado.

EFFECTOS ANTIMICROBIANOS: actividad antagonista contra patógenos por parte de una bacteria láctica, incluyendo la utilización de compuestos antimicrobianos específicos producidos por esta.

ENFERMEDAD ENDÉMICA: común o constantemente presente en una población, generalmente con una frecuencia baja, relativamente constante.

ENFERMEDAD INFECCIOSA: cualquier cambio producido en el estado de salud de un organismo, en el que parte o la totalidad del huésped no pueden desempeñar sus funciones normales por la presencia de un agente infeccioso o de sus productos.

ENTEROPATOGENOS: bacterias entéricas entre las que están muchas cepas patógenas para el humano, animales y plantas.

ENTEROTOXINA: toxina que afecta específicamente a las células de la mucosa intestinal, causando vómitos y diarrea.

EPIDEMIA: enfermedad cuya incidencia aumenta repentinamente, por encima del nivel normal, en una población determinada.

EPIDEMIOLOGIA: estudio de factores que determinan e influyen sobre la frecuencia y distribución de enfermedades, lesiones y otros procesos sanitarios y sus causas, en poblaciones humanas definidas.

ESPASMÓDICO: Contracción involuntaria y persistente de los músculos.

ESPECIE: grupo de cepas con muchas propiedades estables en común, que difieren significativamente de otros grupos de cepas.

FASE DE LATENCIA: sigue a la inoculación de microorganismos en un medio de cultivo fresco, en el cual no hay aumento del número de células o masa durante el cultivo.

FASE DE MUERTE: disminución del número de microorganismos viables que ocurre después de finalizar la multiplicación de un cultivo.

FASE ESTACIONARIA: fase de multiplicación microbiana en un cultivo en el que cesa la multiplicación de una población.

FASE EXPONENCIAL: fase de la curva de multiplicación durante la cual la población microbiana crece a ritmo constante y máximo, dividiéndose y multiplicándose a tiempos constantes.

FERMENTACIÓN ACIDOLACTICA: fermentación que produce ácido láctico como uno o principal producto final.

FERMENTACIÓN: proceso liberador de energía en el cual las moléculas orgánicas actúan tanto de dadores como de aceptores de electrones.

FOSFATASA: enzima que cataliza la liberación hidrolítica de fosfato de las moléculas.

FUENTE: lugar u objeto a partir del cual un agente patógeno se transmite inmediatamente al huésped, directamente o a través de un agente intermedio.

GÉNERO: grupo bien caracterizado de una o mas especies que se diferencian claramente de otros géneros.

GLUCÓLISIS: conversión anaeróbica de glucosa en ácido láctico por la vía de Embden Meyer-Hoff Parnas.

GLUCOSA ISOMERASA: enzima que realiza la conversión final de la glucosa en fructosa, proceso llamado isomerización.

GNOTOBIOTICO: Animales libres de microorganismos o que viven en asociación con uno o mas microorganismos conocidos.

HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN: proceso en el cual la molécula de almidón es atacada por enzimas llamadas amilasas, produciéndose de esta manera moléculas de glucosa fácilmente digeribles por los microorganismos.

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia, permite que la separación de diferentes moléculas sea realizada gracias al uso de una columna de resina, este tipo de columna consigue la separación de ácidos orgánicos, azúcares simples o complejos y diferentes alcoholes, gracias a la acción combinada de mecanismos de intercambio iónico. Tamiz molecular de interacciones hidrofóbicas.

HUÉSPED: cuerpo de un organismo que aloja a otro. Se puede considerar como un microambiente que protege y mantiene el crecimiento y la multiplicación del organismo parásito

IDIOFASE: periodo en un medio de cultivo, en la cual se sintetizan metabolitos secundarios en lugar de primarios; se corresponde generalmente con la fase estacionaria y el final de fase logarítmica.

In Batch: Fermentación discontinua que puede ser considerada como un “sistema cerrado”.

INMUNIDAD: capacidad general de un huésped para resistir una enfermedad particular; condición de ser inmune.

INOCULO: crecimiento optimizado de células microbianas que va a dar origen a un proceso fermentativo, reconocido como el “material iniciador”.

LACTOSA: disacárido utilizado por los microorganismos para producir ácido láctico.

LANTIBIOTICOS: bacteriocinas con modificaciones post-transgénicas que contienen usualmente aminoácidos como Lantionina y Metilantionina.

METABOLISMO PRIMARIO: el que se forma durante la fase primaria del crecimiento del microorganismo.

METABOLISMO SECUNDARIO: se forma cerca del final de la fase de crecimiento, frecuentemente cerca de, o en la fase estacionaria del crecimiento.

MICROBIOTA: microorganismos asociados normalmente con un tejido o estructura particular, población microbiana autóctona.

MORBILIDAD: incidencia de la enfermedad en una población, incluyendo casos mortales y no mortales.

MORTALIDAD: incidencia de muertes en una población.

NISINA: péptido de 3500 Daltons de peso molecular, producida por *Streptococcus lactis*, utilizada como agente de conservación en la industria alimentaria y como agente inhibidor de microorganismos patógenos.

PANDÉMICO: aumento de la incidencia de una enfermedad en una población grande y de gran distribución geográfica (se refiere a menudo a epidemia mundial).

PATÓGENO: se refiere a un organismo o material que produce una enfermedad.

PLACAS DE PEYER: agregados linfáticos en la submucosa del intestino delgado, que contienen una gran variedad de células linforreticulares, T, B y Macrófagos.

PLÁSMIDO: molécula de DNA circular de doble cadena, que puede existir y replicarse independientemente del cromosoma o estar integrado en el mismo. Un plasmido se hereda de forma estable, pero no es necesario para el crecimiento y la reproducción de la célula huésped.

REACCION DE AGLUTINACIÓN: formación de un complejo inmunitario insoluble debido a puentes cruzados entre células o partículas.

RNA ribosomal: RNA presente en los ribosomas; estos contienen varios tamaños de rRNA monocatenarios, que contribuyen a la estructura del ribosoma y participan también, directamente en el mecanismo de la síntesis de las proteínas.

SAPROFITO: organismo que se desarrolla sobre sustancias orgánicas en descomposición.

SIMBIOSIS: consiste en la íntima asociación física de dos o más organismos diferentes.

SUSPENSIÓN CELULAR: se le denomina así a una concentración de células presentes en un cultivo líquido, el cual aparece turbio porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. Cuantas más células haya más luz se dispersa y más turbia aparece la suspensión.

DEPLESIÓN: Disminución de la cantidad de sangre del organismo.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: tiempo necesario para que una población microbiana duplique su número.

TROFOFASE: fase de crecimiento activo microbiano en un cultivo; predomina el metabolismo primario (metabolismo dirigido al crecimiento).

TURBIDIMETRÍA: método aplicado para realizar el seguimiento del crecimiento microbiano en medios totalmente solubles, la absorbancia de suspensiones celulares se determina en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540nm.

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC): número de microorganismos que pueden formar colonias cuando se cultivan en medios de cultivos sólidos; indican el número de microorganismos viables en una muestra.

VÍA DE EMBDEN MEYER-HOFF: vía que degrada la glucosa a piruvato; en la fase de 6 carbonos convierte la glucosa en fructosa 1,6 bifosfato y en la fase de 3 carbonos produce ATP, transformándose el gliceraldehído 3 fosfato en piruvato.

RESUMEN

En la última década, Colombia se ha caracterizado por una alta incidencia de enfermedades diarreicas agudas constituyendo una de las principales causas de hospitalización infantil. El cólera se encuentra dentro de este grupo de enfermedades que ha afectado en gran parte regiones costeras y lugares donde las condiciones sanitarias no son adecuadas. Hasta ahora los tratamientos adoptados son en gran medida vulnerables y no han logrado controlar este tipo de afecciones.

La microbiota gastrointestinal humana juega un papel importante en la salud del individuo. La composición y actividad de los microorganismos son responsables de funciones metabólicas de barrera e interacciones con el huésped. En este sentido las bacterias ácido lácticas autóctonas del tracto gastrointestinal humano se han usado para producir una variedad de productos alimenticios fermentados y sus metabolitos conducen a obtener alimentos de alta calidad, menos perecederos y con características organolépticas propias, contribuyendo a posibles beneficios nutricionales en la salud tales como el mejoramiento de la digestión de la lactosa y el alivio de ciertos tipos de diarrea, esta última considerada como problema de salud muy frecuente en cualquier parte del mundo y es particularmente significativa en países en vía de desarrollo.

Ante este escenario la presente investigación buscó probar el efecto inhibitorio, de un sustrato fermentado con una bacteria láctica que tuviera propiedades probióticas, sobre *Vibrio cholerae* 01 OGAWA *in vitro*.

Para lograr el objetivo se propuso un diseño experimental que se desarrollo en 4 fases metodológicas: la primera encaminada al aislamiento de una bacteria láctica de tracto intestinal humano que se caracterizó por su capacidad amilolítica; posteriormente se seleccionó un sustrato probiótico basado en melaza y leche y finalmente con el producto fermentado se realizó un ensayo de antagonismo *in vitro* contra la cepa patógena de *Vibrio cholerae*. El aislado fue identificado morfológica, fisiológica y bioquímicamente como *Lactobacillus acidophilus* la cual mediante la prueba de significancia de TUKEY, con un 95% de confiabilidad mostró los mejores resultados para la prueba de degradación del almidón, además de un alto rendimiento de ácido láctico, característica que podría ser de importancia a nivel industrial. Finalmente *Lactobacillus acidophilus* en el medio seleccionado inhibió el crecimiento del patógeno de mejor manera en la dilución 10^{-1} con una densidad celular de 35×10^6 bacterias/ml respecto al sustrato puro y a las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , así lo demostró la prueba de significancia de Tukey con un 99% de confiabilidad.

ABSTRACT

During last decade, Colombia has been characterized by a high incidence of diarrheic sharp diseases, which are one of the main infantile hospitalization causes. This diseases group includes a cholera, which affects coastal regions and places have inadequate sanitary conditions. Up to now accepted treatments are enough vulnerable and they have not been able to control this affections type.

Human gastrointestinal microbiota play an important role for individual's health. Microbial composition and activity are responsible for barrier metabolic functions and interactions with host. Therefore, lactic acid bacteria isolated of human gastrointestinal tract have been used for production of diverse fermented feeding products. Besides, the resulting metabolites permit to obtain imperishable high quality foods, which own typical organoléptics characteristics that contribute to possible nutritional effects such as enhanced lactose digestion and relief of diarrhea determined types. This last one is considered as the main health problem for entire world, and particularly significant for developing countries.

In the face of this scenario, the actual research seeks to test inhibitorial effect of fermented substrate by a lactic acid bacteria against *Vibrio cholerae* 01 OGAWA *in vitro*.

To achieve this objective, we proposed an experimental design, which was carried out in four methodological phases: the first one guided to isolating of human gastrointestinal tract lactic bacteria, which were characterized by amylolytic capacity. Below it selected a probiotic substrate based on molasses and milk. Finally, we realized an *in vitro* antagonism assay against pathogen strain of *Vibrio cholerae*. The isolating was morphological, physiological and biochemically identified as *Lactobacillus acidophilus* this exhibited optimal results for starch degradation assay (TUKEY's significance test: 95% of dependability), in addition to high production of lactic acid, useful characteristic for industry. Finally *Lactobacillus acidophilus* inhibited pathogen growth suitably in the selected medium in 10^{-1} dilution with cellular density of 35×10^6 bacteria/ml respect to pure substrate and 10^{-2} and 10^{-3} dilutions (TUKEY's significance test: 99% of dependability).

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas han sido una de las causas de mayor morbilidad y mortalidad en América. Esta enfermedad se ha asociado a diferentes factores entre los que se destacan las condiciones socioeconómicas, los hábitos alimenticios y de higiene personal, los movimientos migratorios de población, así como los cambios hidroclimáticos que se han producido en los últimos años (15,55,64).

Teniendo en cuenta que nuestro país comparte muchas de estas características y que además limita geográficamente con los países que presentaron la mayor actividad de la enfermedad en la región, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS), incrementaron los sistemas de vigilancia favoreciendo el conocimiento y control de la enfermedad (15).

En la década pasada, nuestro país se caracterizó porque las enfermedades diarreicas agudas (E.D.A), en los departamentos de Chocó, Cundinamarca, Guajira, Valle, Atlántico y Nariño, constituyendo la primera causa de hospitalización de infantes mayores de cinco años y adultos mayores de treinta años.

La presente investigación pretende proponer un alimento probiótico que en un futuro sea alternativa a bajo costo encaminado a la prevención y tratamiento de enfermedad diarreica aguda; Para tal efecto, se aisló una bacteria de tracto gastrointestinal humano, con actividad amilolítica y productora de niveles altos de ácido láctico que se identificó mediante galerías API CH 50 como *Lactobacillus acidophilus*; con la cual se obtuvo un alimento probiótico por fermentación láctica de un sustrato base compuesto por melaza y leche en polvo luego de evaluar seis sustratos amiláceos.

Los elementos metodológicos que se tuvieron en cuenta para la selección de este producto fueron parámetros de fermentación tales como pH, incremento de biomasa, consumo de azúcares, producción de proteína y rendimiento de ácido láctico.

Finalmente se realizó un ensayo de inhibición antagónica del fermento probiótico contra la cepa patógena de *Vibrio cholerae*.

Los resultados de capacidad amilolítica y antagonismo fueron evaluados mediante las pruebas estadísticas de análisis ANDEVA y análisis bifactorial combinatorio respectivamente, aplicando prueba de Tukey para determinar la significancia de los mismos, y los resultados obtenidos en el ensayo para elección de sustratos se evaluaron por medio de una matriz experimental construida con los coeficientes de una ecuación de primer orden.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Probar el efecto inhibitorio *in vitro*, de un sustrato fermentado con *Lactobacillus acidophilus*, sobre la cepa patógena de referencia *Vibrio cholerae* 01 OGAWA

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Aislar bacterias lácticas amilolíticas de tracto intestinal humano.

2.2.2 Seleccionar, identificar y caracterizar parcialmente *Lactobacillus acidophilus* como bacteria láctica con mejor capacidad amilolítica.

2.2.3 Elegir un sustrato fermentado como medio de crecimiento ideal para *L. acidophilus*.

2.2.4 Realizar ensayos de inhibición antagónica *in vitro*, entre el sustrato fermentado elegido y *Vibrio cholerae* 01 OGAWA.

3. ANTECEDENTES

En nuestro continente el cólera no había hecho su aparición hasta el año de 1991, ese año la epidemia se detectó en Piura (Perú) a finales de enero y entró a Colombia por el puerto de Tumaco en Marzo, fecha en que se confirmó el primer caso (50). Entre Marzo de 1991 y Mayo de 1995 se registraron alrededor de 31000 casos con una letalidad aproximada del 4%. Nariño, entre 1993 y 1994 fue el departamento que aportó la mayoría. A partir de 1996, los estudios mostraron una tendencia al descenso como un comportamiento general en el País (15).

Los programas de control y vigilancia de cólera se han incluido en los de Enfermedad Diarreica Aguda (E.D.A), en la mayoría de países afectados, teniendo en cuenta el comportamiento estable de las patologías causadas por *Salmonella* y *Shigella* a través de los años, de esta manera llama la atención el alto porcentaje de niños mayores de cinco años hospitalizados con diarrea pudiendo este comportamiento ser ocasionado por casos de cólera en los que no se realiza diagnóstico de la entidad sino que se maneja como un síndrome gastroentérico de cualquier otra etiología (15,50).

Desde hace varios años se cuenta con una vacuna parenteral contra el cólera, se trata de una preparación a base de bacilos muertos que es relativamente ineficaz,

su aplicación disminuye tan solo en un 50% el riesgo de cólera clínico y la protección se limita de tres a seis meses. Además, la vacuna no parece aminorar la enfermedad grave en las personas que la contraen luego de vacunarse (15). Por tanto, hoy en día se hace necesario realizar estudios para prevenir la enfermedad de manera que se proporcione un tratamiento factible de amplio espectro y bajo costo para la población.

Los avances científicos han abierto las fronteras al mejor entendimiento del Sistema Gastrointestinal (SGI) como un ecosistema complejo y balanceado que cumple funciones fundamentales en la fisiología y salud tanto humana como animal (26).

El interés científico comenzó a inicios del siglo XX cuando Elie Metchnikoff sugirió por primera vez que los lactobacilos podían contrarrestar los efectos putrefactivos del metabolismo gastrointestinal (24).

Las Bacterias Lácticas (BL) han sido utilizadas tradicionalmente para la fermentación de diversos sustratos primarios (leche, carne, vegetales, etc.), además de actuar como agentes probióticos colonizando el Tracto Gastrointestinal (TGI) y modificando este ecosistema en forma benéfica para el consumidor (45).

El principal género fermentativo *Lactobacillus*, inhibe el crecimiento de microorganismos coliformes *in vitro*, lo cual fue atribuido al ácido láctico que liberan. Estudios clínicos sugerían que este ácido era benéfico en el tratamiento

de la diarrea y se observó que los productos fermentados de la leche también tenían valor medicinal (55,57).

Estudios recientes muestran que la suplementación con bacterias benéficas puede ser muy útil para disminuir el desarrollo de disturbios gastrointestinales, infecciones del tracto urinario y vaginitis, úlcera estomacal y duodenal, causada por *Helicobacter pylori* ya que estas facilitan la absorción de nutrientes y ayudan a restablecer la resistencia a la colonización de patógenos (44,55). Además se les atribuye otros beneficios como la disminución de los síntomas de mala absorción de lactosa, hipocolesterolemia, inmunomodulación y algunos efectos antitumorales.

En Colombia, se están llevando a cabo actualmente investigaciones con probióticos, tanto a nivel clínico como industrial, así se demuestra en “Protección intestinal contra patógenos específicos a través de sustratos fermentados con *Lactobacillus casei subsp ramnosus*”; “Bacterias lácticas bacteriocinogénicas y su efecto sobre bacterias patógenas asociadas a alimentos”; “Producción de biomasa láctica a partir de harinas de Yuca”, “Selección de cepas de bacterias lácticas productoras de ácido láctico a partir de diferentes fuentes naturales” (6,39,46,53).

4. MARCO TEORICO

4.1 ENFERMEDAD DIARREICA

Se define como la pérdida excesiva de electrolitos y sales del intestino, caracterizada por fuerte el dolor abdominal y el deseo de seguir evacuando. Puede ser ocasionada por malos hábitos alimenticios, condiciones de higiene y/o agentes infecciosos generalmente enterobacterias, algunos virus y parásitos intestinales.

La diarrea aguda generalmente se debe a una causa infecciosa que puede ser viral, bacteriana o protozoaria, considerando el agente etiológico más frecuente a *Escherichia coli* enterotóxico.

Otras causas infecciosas son *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolítica*, *Clostridium perfringes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brucella mellitensis*, *Vibrio cholerae*, entre otros, agentes parasitarios como *Entamoeba histolítica* y *Giardia intestinalis*, y virus del tipo *Rotavirus* (65).

La mayoría de estos agentes patógenos producen enterotoxinas las cuales tienen gran importancia fisiopatológica en las diarreas causadas por los mismos, ya que actúan produciendo cambios bioquímicos en las células epiteliales del intestino delgado humano.

La carne de cerdo, aves, pescado y sus derivados son los vehículos de transmisión más frecuentes, las lesiones que se observan incluyen engrosamiento y acortamiento de las vellosidades, vacuolización del citoplasma e infiltración mononuclear de la lámina propia (6).

El tratamiento de diarreas moderadas y leves puede ser asintomático, en lo cual influye el uso de espasmódicos y opiáceos. En niños y pacientes ancianos o debilitados, es necesario administrar líquidos por vía intravenosa. El tratamiento de salmonelosis, shigelosis, cólera o amebiasis debe individualizarse.

4.2 COLERA

El agente causal de esta enfermedad es *Vibrio cholerae* el cual fue descubierto en 1833 por Robert Koch en heces fecales de pacientes con cólera. Microbios similares fueron descritos posteriormente en agua y alimentos contaminados (1).

La familia *Vibrionaceae* incluye 35 especies identificadas de las cuales solo 12 se han reconocido como patógenos para el ser humano (1,24).

El cólera es una enfermedad aguda bacteriana de naturaleza tóxica, no invasiva, capaz de generar epidemias y que se caracteriza por causar rápida y masiva pérdida de líquidos gastrointestinales, dolor abdominal, acidosis metabólica, colapso vascular y en casos graves la muerte (1,15,23,24,36).

La enfermedad se contrae ingiriendo alimentos o agua contaminados por material fecal de pacientes o portadores (los moluscos y copépodos son su reservorio natural). Una vez que la bacteria penetra en el organismo, el período de incubación oscila entre 24 y 72 horas.

La bacteria se adhiere a la mucosa del intestino delgado donde no invade sino que secreta colerágeno, una exotoxina producida por este vibrión.

4.2.1 *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae es un bacilo curvo, Gram negativo, en cepas recién aisladas, mide entre 0.5 – 3 μ de largo, se caracteriza porque carece de cápsula y no forma esporas; posee un único flagelo polar grueso, dos a tres veces mas largo que el cuerpo, por lo tanto tiene movilidad activa (18).

Durante el cultivo prolongado los vibriones pueden convertirse en bastoncillos rectos parecidos a bacterias intestinales (32). El cultivo en placas de agar produce colonias de superficie convexa, borde entero, opacas y granuladas; crecen bien a una temperatura de 37°C en medios que contienen sales, fuente de carbono y fuente de nitrógeno.

El agar TCBS (tiosulfato, citrato, sales biliares, sacarosa) es un medio selectivo por la presencia de inhibidores y diferencial por la habilidad para fermentar la sacarosa, en el cual *V.cholerae* produce colonias amarillas a pH básico 8.4 - 8.5 (41,65).

La activación de *V. cholerae* se realiza en caldo tripticasa y en Agua Peptonada Alcalina (APA) con ajuste de pH a 8.4. Para el transporte de muestras se recomienda con mayor eficacia el medio Cary-Blair y para la conservación de los aislados se usa preferiblemente medios que contengan sal, tales como agar base sangre, agar infusión de cerebro corazón y Agar Tripticasa de Soya (TSA) (15).

4.2.2 Identificación de *Vibrio cholerae*

La identificación mínima de *V. cholerae* O1 solo requiere la confirmación serológica de la presencia de antígenos del serotipo O1 en los aislamientos sospechosos.

Otras pruebas que ofrecen información importante en salud pública son: biotipificación, subtipificación molecular, hemólisis y sensibilidad.

La OMS recomienda que el laboratorio no sea recargado con diagnósticos de cólera; en los brotes solo se requieren los primeros diagnósticos y una vez confirmada la circulación de *V. cholerae* O1 en una localidad, se puede establecer el diagnóstico basado en la definición de caso clínico (concepto que es reevaluado periódicamente) (15).

4.2.2.1 Identificación serológica

El uso de antisueros es uno de los métodos más rápidos y específicos para la identificación de *V. cholerae* O1 aunque para el tratamiento del cólera no es necesario identificar el serogrupo y el serotipo, esta información puede ser muy importante en epidemiología y en salud pública (15).

4.2.2.1.1 Serogrupo de *V. cholerae* O1. Con base en la presencia de antígenos somáticos "O" se ha determinado que existen más de 130 serogrupos. Sin embargo, solo el serogrupo O1 se relaciona con el cólera epidémico y pandémico. Otros serogrupos se pueden relacionar con diarrea grave, pero no poseen el potencial epidémico de los aislamientos O1 y no aglutinan con antisueros O1.

4.2.2.1.2 Serotipos de *Vibrio cholerae* O1. Los aislamientos del serogrupo de *Vibrio cholerae* se han subdividido en tres serotipos: Inaba, Ogawa e Hikojima. La

identificación de estos antígenos es válida solamente con aislamientos de serogrupos O1.

4.2.2.1.3 Aglutinación en lámina. Se utiliza suero fisiológico en una laminilla, se emulsiona con el patógeno y se evalúa con antisuero. La reacción es positiva si en un lapso de 30 segundos a 1 minuto aparece una aglutinación muy intensa.

4.2.2.2 Identificación bioquímica

Cuando ya existe la confirmación serológica, rara vez es necesaria esta identificación, sin embargo, las pruebas más usadas son: oxidasa, hilo mucoso, azúcares y carbohidratos.

4.2.2.2.1 Prueba de oxidasa. Separa bacterias entéricas de bacterias oxidasa-positivo de los géneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Cardiobacterium* que pueden tener una morfología parecida.

En esta prueba las bacterias que contienen la enzima catalizan rápidamente la oxidación de la N,N,dimetil-p-fenilendiamina en un producto coloreado.

Para *Vibrio cholerae*, se lleva a cabo con colonias aisladas en un medio que no contenga carbohidratos, colocándose de 2 a 3 gotas del reactivo tetrametil para-fenilendiamina al 1%, sobre un pedazo de papel filtro en una caja petri y se

extiende el cultivo sobre el papel húmedo con un aplicador de madera estéril la reacción es positiva si el cultivo bacterial no se torna morado oscuro en 10 segundos.

4.2.2.2 Prueba del hilo mucoide. Se realiza en un portaobjetos o en una caja petri donde se suspenden colonias (obtenidas de un cultivo en un medio no inhibitorio), en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0.5%, el resultado es positivo si las células bacterianas se lisan por efecto del desoxicolato con lo cual la suspensión perderá turbidez y el DNA liberado por las células lisadas ocasionará que la mezcla se haga viscosa al retirar lentamente el asa, se forma así un hilo mucoide.

4.2.2.3 Azúcares y carbohidratos. *V. cholerae* fermenta la lactosa lentamente (después de tres días o más), pero ataca con rapidez la manosa y sacarosa, produce ácido pero no gas, posee lisina y ornitina descarboxilasas. Además fermenta la glucosa. Responde positivamente a la prueba del indol y tiene una motilidad positiva.

4.2.2.3 Identificación molecular

Las técnicas de biología molecular han sido decisivas en la subtipificación de los aislamientos de *V. cholerae*.

4.2.2.3.1 Perfiles de plásmidos. Permite diferenciar el biotipo clásico que por lo general, tiene plásmidos de resistencia a los antibióticos de 21 y 3 megadaltons de peso molecular, contrario a “El Tor” que rara vez los presenta.

4.2.2.3.2 RFLP. El polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción permite identificar la ubicación de los genes que inducen la producción de enterotoxina y de esta manera se diferencian cepas.

4.2.2.3.3 Análisis de enzimas de loci múltiples. Permite la ubicación de enzimas metabólicas. Utilizado para demostrar que la cepa *V. cholerae* O1 de América Latina se diferencia de cepas que causan enfermedad esporádica de aquellas epidémicas o pandémicas (15).

4.2.3 Mecanismo de infección

Inicialmente comprende la ingestión de *V.cholerae*, motilidad de los vibriones, atracción y penetración quimiotáctica, penetración de la capa mucosa de la superficie intestinal, adherencia a receptores en el gel del moco, quimiotaxis hacia adentro de los espacios íntervelosos mas profundos, adherencia a la superficie de células epiteliales y producción de la toxina del cólera.

La enterotoxina “coleric toxin” (CT) que produce *V. cholerae*, es una proteína termolábil, compuesta por dos unidades, una con peso molecular de 28000 KDa y otra dividida en cinco porciones con un peso molecular de 11600 KDa cada una;

esta última se une a la superficie celular y crea las condiciones para que la otra unidad se adhiera también. Esta es la llamada porción activante ya que estimula la adenil ciclasa intracelular, la cual conduce a la producción de AMP cíclico, que es el compuesto que provoca la secreción de gran cantidad de líquido isotónico de la mucosa intestinal (23).

4.2.4 Prevención y tratamiento

El tratamiento de un enfermo de cólera es la rehidratación que en la mayoría de casos se realiza por vía oral y solo en casos graves, con vómito severo, se hace necesario la rehidratación intravenosa (15,18,36). Otra forma es el uso de antimicrobianos como la tetraciclina, el cloranfenicol, trimetoprim sulfam, eritromicina, doxiciclina, ciprofloxacina y furazolidona (1,15).

A principios de 1992, la OMS estableció medidas para el control de esta enfermedad, la mayoría de las condiciones de saneamiento ambiental, higiene de los alimentos, fomento para la salud, control de brotes y la vigilancia epidemiológica, las cuales han contribuido a que la incidencia de la enfermedad colérica a través de los años descienda considerablemente.

En la actualidad el instituto para la investigación genómica (TIGR) constituye un gran paso en lo que podría ser el desarrollo de una vacuna contra cólera. Sin embargo hay quienes consideran que incluso con el conocimiento de la composición genética es una meta no realista erradicar el cólera del mundo.

4.3 BACTERIAS LÁCTICAS

En general, representan el grupo de bacterias Gram positivas, cocos y bacilos inmóviles, no esporuladas, catalasa negativa, aerobias facultativas, unidas por una serie de características metabólicas y nutricionales (1,31,49,65).

Son sacarolíticas y diferentes en muchas rutas biosintéticas, en consecuencia tienen requerimientos nutricionales complejos que les obliga a restringirse a medios ambientes ricos en nutrientes como el tracto intestinal y la leche (59).

4.3.1 Características morfológicas

Los diversos géneros de las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido definidos en base a la morfología celular y al tipo de metabolismo fermentativo, este último influye por ejemplo en el tamaño de las colonias, aún cuando su crecimiento es exigente, son relativamente pequeñas, raramente pigmentadas como resultado de la ausencia de citocromos y de apariencia blanquecina .

Algunas especies pueden producir colonias grandes cuando crecen sobre medios que contienen sucrosa. Algunas colonias se pueden reconocer por la presencia de zonas claras debido a la alta producción de ácido (65).

4.3.2 Características fisiológicas y bioquímicas

Las bacterias lácticas son todas aerotolerantes, anaerobias facultativas, que crecen fácilmente en la superficie de medios sólidos expuestos al aire. Sin embargo, son incapaces de sintetizar adenosin trifosfato (ATP) por mecanismos respiratorios (31,65).

Algunas cepas son capaces de tomar oxígeno por medio de sistemas flavo proteína-oxidasa, produciendo peróxido de hidrógeno H_2O_2 , aunque la mayoría de las cepas carecen de catalasa y muchas disponen de H_2O_2 por medio de enzimas alternativas llamadas peroxidadasas.

La mayor parte de las bacterias ácido lácticas pueden obtener energía solo del metabolismo de los carbohidratos y compuestos relacionados, de ahí que estén restringidas a medios de cultivo en que existen azúcares.

Por lo general, tienen capacidad biosintética limitada y requerimientos nutricionales de aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (31,65). Como resultado de lo cual las BAL son usualmente cultivadas sobre medios que contienen peptona, extracto de levadura u otros materiales digeridos de plantas o animales (31). Estos medios pueden ser suplementados con carbohidratos fermentables que provean una fuente de energía.

Otra distinción fisiológica de las BAL es su alta tolerancia al ácido. Las BAL esféricas pueden iniciar su crecimiento ya sea en medios neutros o alcalinos. El crecimiento de todas las BAL continúa hasta que el pH cae a un valor de 5 o más bajo y se dispara la fermentación.

La capacidad de las bacterias lácticas para producir y tolerar concentraciones relativamente altas de ácido láctico es de gran valor selectivo por su capacidad para eliminar por competencia a otras bacterias (65).

4.3.3 Metabolismo de bacterias ácido lácticas

En 1920 S. Orla Jensen, observó que las BAL se dividían en dos subgrupos bioquímicos dependiendo de los productos que se formaran (65) así:

Homofermentativas: aquellas convierten glúcidos y producen exclusivamente ácido láctico utilizando la vía de Embden Meyer Hoff Parnás. Ejemplo: *Streptococos sp* y *Lactobacillus sp*.

Heterofermentativas: aquellas que utilizan los glúcidos y los transforman además de ácido láctico en fórmico, succínico y cantidades significativas de etanol, acetato y CO₂ a través de la vía oxidativa de las pentosas. Ejemplo, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* (49,65).

La distinción entre las especies homofermentativas y heterofermentativas esta basada inicialmente en la proporción relativa de los productos resultantes de la fermentación de azúcares: Las homofermentativas mas o menos el 90% de lactato y las heterofermentativas mas o menos el 50% lactato y otros compuestos en condiciones variables (49,65).

El balance energético para las dos vías sería:

GLUCOSA + Pi + ADP vía homofermentativa → LACTATO + ATP

GLUCOSA + Pi + ADP vía heterofermentativa → LACTATO + CO₂ + ETANOL + ATP

4.3.4 Clasificación filogenética de BAL

La filogenia de las bacterias debe basarse en la comparación de moléculas altamente conservadas que están presentes en todos los microorganismos.

Para comparar las secuencias de RNA ribosomal (RNAr) se han considerado las técnicas más influyentes y precisas para comparar el grado de relación de los microorganismos, la información disponible se basa en las secuencias de RNA ribosomal 16s y 23s. Todas las bacterias Gram positivas se agrupan en dos de las 17 filas eubacteriales.

El género *Bifidobacterium* comparte algunas características fenotípicas con las BAL típicas, utilizadas tradicionalmente y también para fines prácticos. Filogenéticamente diferentes estas muestran un contenido relativamente alto de guanina y citosina (G y C) conteniendo un porcentaje molar de 55 – 67 % en el DNA formando parte de la llamada rama de los Actinomicetos.

Las “verdaderas” BAL forman parte de la llamada rama de los *Clostridium* la cual se caracteriza por un contenido de G y C menor de 55% en el DNA.

Carnobacterium, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* y el género recientemente descrito como *Lactosphaera*, se encuentran mas estrechamente relacionados entre si que con cualquier otra BAL. *Lactococcus* y *Streptococcus* muestran estar relativamente relacionados, mientras que *Lactobacillus* es diverso filogenéticamente.

Los datos del secuenciamiento del RNAr 16s mostraron que *Lactobacillus* y *Pediococcus* están entremezclados filogenéticamente, encontrándose 5 especies del grupo de *Pediococcus* con 32 especies de *Lactobacillus* homo y heterofermentativos en los llamados grupos *Casei* y *Pediococcus*.

Con base a estos datos se indica claramente que los taxos se generan en la base de propiedades fenotípicas como son la morfología celular y el tipo de fermentación, lo cual no corresponde con el derivamiento filogenético (69).

4.3.5 *Lactobacillus sp.*

La morfología característica de este género son bastones que varían de largos y delgados a bacilos cortos y curvos. La mayor parte de las especies son homofermentativas, pero algunas son heterofermentativas. Ver cuadro 1

Cuadro 1. Características Metabólicas de *Lactobacillus sp*

HOMOFERMENTATIVOS	HETEROFERMENTATIVOS
Ácido Láctico; es el producto principal (85% Glucosa) no forma gas a partir de glucosa. Aldosa presente. (1) Crece a 45°C; pero no a 15°C, bacilos largos. Ej. <i>L. delbrueckii</i> y <i>L. acidophilus</i> (2) Crece a 15°C, desarrollo variable a 45 °C, bacilos cortos y corineformes. Ej. <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i>	Produce alrededor del 50% de ácido láctico a partir de glucosa; produce CO ₂ y etanol; aldosa ausente; bacilos largos y cortos. Ej. <i>L. fermentum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. kefir</i>

Fuente: Brock, Tomas D.

Lactobacillus sp., se encuentra en los productos lácteos y algunas cepas se emplean en la preparación de productos fermentados por ejemplo: *L. delbrueckii* se utiliza en la preparación de yogurt, *L. acidophilus* en la producción de leche acidofila y otras especies participan en la producción de col fermentada, ensilajes

y pepinillos encurtidos. La resistencia ácida de los lactobacilos los capacita para continuar el crecimiento en la fermentación láctica natural cuando el valor de pH ha descendido mucho para que otras BAL crezcan; y los lactobacilos por tanto son responsables de las etapas finales de las fermentaciones acidolácticas (57,58,59).

4.3.6 *Lactobacillus* del tracto gastrointestinal

En animales y humanos la mayoría de géneros colonizantes, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* no son considerados patogénicos. En el pasado, un número de estudios se concentraron en las funciones fisiológicas útiles de *Lactobacillus* en el colon humano considerándolo fomentador de la salud (57).

El género *Lactobacillus* constituye un porcentaje importante de la microbiota intestinal (2,46). Se distinguen siete especies importantes aisladas de tracto intestinal humano (TIH): *L. casei*, *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. acidophilus* y *L. bifidus*.

4.3.6.1 *Lactobacillus acidophilus*

Su nombre se deriva de *acidus* (ácido) y *philus* (amante). Es un bastón homofermentativo, anaerobio facultativo, cuyo producto final principal es el ácido láctico. De forma natural habita el Tracto gastrointestinal de humanos y animales, en la boca y vagina humanas y en algunas leches que se fermentan de manera tradicional tales como el Kefir.

L. acidophilus es una especie genéticamente heterogénea, su clasificación ha sido difícil, la homología DNA-DNA condujo a la identificación de seis especies principales: *L. acidophilus* (A1) *L. crispatus* (A2), *L. amilovorius* (A3), *L. gallinarum* (A4), *L. gasseri* (B1) y *L. johnsonii* (B2); que presentan diferencias claramente observables pero que constituyen el mismo grupo de *L. acidophilus* (2,56).

Estudios *In vivo* han demostrado que la supervivencia de *L. acidophilus* es superior a la de *L. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, y su habilidad para sobrevivir varía entre las diferentes especies (59).

Los efectos potenciales de *L. acidophilus* se remontan a inicios de los años 80 cuando se sugirió por primera vez sus efectos en la disminución del colesterol en humanos, a partir de lo cual se han atribuido otros diversos beneficios sobre la salud humana que incluyen efectos antimicrobianos, inmunomoduladores y anticancerígenos (55).

4.3.6.1.1 Efectos antimicrobianos. *L. acidophilus* presenta actividad antagonista contra una variedad de patógenos. Estudios *In vivo* han demostrado la inhibición de diversas bacterias tales como: *Helicobacter pylori* (55), *Yersinia pseudotuberculosis* y *Shigella sonnei* (2,9,44). Apella y colaboradores (1992), observaron que una mezcla de *L. acidophilus* y *L. casei* tiene una capacidad inhibitoria aumentada, mayor a la que se encontró con cepas individuales.

Kruglikov *et al* (1997), demostraron en ratones un pronunciado antagonismo con respecto a *V. cholerae* (37). Muchos estudios en perspectiva han probado la eficacia de *L. acidophilus* junto con otros microorganismos en forma de leches fermentadas o de cápsulas al prevenir la diarrea en los niños, diarrea asociada a los antibióticos y la diarrea del viajero (58).

Hilton y colaboradores (1997), reportan una triple disminución en la vaginitis por infecciones de *Candida* en mujeres que consumieron yogurt que contenían 10^8 UFC/ml de *L. acidophilus* durante seis meses (55).

Estos resultados se han atribuido a compuestos antimicrobianos específicos producidos por *L. acidophilus*, que incluyen desde ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno hasta compuestos parecidos a los antibióticos tales como Lactocidina y Acifilina y a bacteriocinas tales como Lactacin B y Lactacin F.

Bernet y colaboradores (1994), sugieren que la exclusión competitiva de patógenos observada en cultivos de células humanas puede estar relacionada con los receptores específicos de los patógenos por *L. acidophilus* y encontraron que la inhibición dependía de la dosis, otra explicación se puede relacionar con la estimulación del sistema inmunológico celular (6,53).

4.3.6.1.2 Efectos inmunomodulantes. *L. acidophilus*, aumenta las diversas citocinas que incluyen el interferón gamma ($IFN\gamma$), el factor de necrosis tumoral

alfa ($\text{TNF}\alpha$) y la interleucina beta ($\text{IL-}\beta$). También se ha demostrado un incremento de las células productoras de inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina G (IgG), así como una respuesta proliferativa en la mucosa intestinal y en el suero.

4.3.6.1.3 Efecto hipocolesterolémico. Estudios *in vivo* han demostrado que algunas cepas de *L. acidophilus* pueden asimilar o tomar el colesterol en presencia de bilis (57). En ratas y cerdos se determinó el efecto sobre los niveles de colesterol en dietas que contienen leches fermentadas solo con *L. acidophilus* o en conjunto con otros microorganismos, resultando una disminución en el colesterol sérico.

Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo en humanos, Schafasma y colaboradores (1997), desarrollaron un producto fermentado con *L. bulgaricus* y *S. termophilus* (cultivos de yogurt) mas *L. acidophilus* con fructooligosacáridos añadidos y un contenido de grasa alterado resultando una reducción tanto en los niveles de colesterol LDL, como en el colesterol total. Este efecto positivo se puede atribuir en parte a la presencia de *L. acidophilus* en el producto.

4.3.6.1.4 Intolerancia a la lactosa. Se ha demostrado que el consumo de leches acidófilas sonicadas permiten la digestión de la lactosa ya que se induce por rompimiento de la pared celular bacteriana la liberación de la enzima β -galactosidasa, sustancia clave en el proceso (57).

4.3.6.2 *Bifidobacterium* sp.

Tissier en 1900, descubrió por primera vez las bifidobacterias, desde entonces su clasificación ha evolucionado continuamente y en la actualidad incluye alrededor de treinta especies. En general, son bacterias Gram positivas y anaerobias estrictas, que frecuentemente tienen necesidades nutricionales especiales y crecen lentamente en la leche; producen tanto ácido láctico y acético como productos finales de su metabolismo heterofermentativo.

Bifidobacterium son un grupo de bacterias sacarolíticas del colon y constituyen hasta un 25% del total de la población en el intestino de adultos y el 95% en recién nacidos. Algunas cepas sobreviven al tránsito intestinal en cantidades suficientes para poder ejercer un efecto metabólico intestinal.

4.3.6.2.1 Efectos en la microflora intestinal. La ingestión de leches fermentadas con *Bifidobacterium* conduce a un incremento en los niveles fecales de bifidobacterias, además conlleva a disminuir la actividad de la enzima β -glucuronidasa, pero no de otras enzimas que se asocian al cáncer de colon.

4.3.6.2.2 Efecto sobre la constipación leve. El tránsito intestinal lento en mujeres se puede corregir parcialmente tras el consumo regular de leches fermentadas con cultivos de yogurt y bifidobacteria aumentando la motilidad del colon.

4.3.6.2.3 Prevención de diarrea. Se ha demostrado en niños que el consumo de una mezcla *B. bifidum* y *S. termophilus*, reduce la incidencia de diarrea en hospitales, además, de la contaminación del ambiente por rotavirus.

4.3.6.2.4 Efectos inmunomodulantes. La ingestión de leche fermentada con *B. bifidum* conlleva a un aumento en la actividad fagocítica en la sangre periférica al compararse con el consumo de leche. Una mezcla de *B. bifidum* y *L. acidophilus* disminuyó la inflamación crónica del colon sigmoideo y aumentó la inmunidad humoral en un grupo de edad avanzada (71).

4.3.7 Propiedades antimicrobianas de BAL

Los efectos inhibidores dependen de la naturaleza del fermento inhibidor, las cepas contaminantes a inhibir, las proporciones relativas de bacterias presentes y las condiciones del cultivo. El fenómeno de inhibición puede incluir uno o muchos mecanismos: competición nutricional, cambios fisicoquímicos del medio (pH, formación de agentes reductores) y formación de agentes antimicrobianos como: ácidos orgánicos, ácido láctico, H₂O₂, diacetil, nisina y bacteriocinas (57).

4.3.7.1 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

La intervención del H₂O₂ en los fenómenos de inhibición por las BAL ha sido establecida. Wheeler *et al* en 1951, colocaron en evidencia la inhibición de *Staphylococcus aureus* por *Lactobacillus lactis*, la atribuyeron a una

“Lactobacilina”. En 1952, demostraron que el agente inhibidor era en realidad el H_2O_2 producido por el lactobacilo, desde entonces se ha demostrado que las BAL liberan H_2O_2 en concentraciones suficientes para producir su autoinhibición o inhibir el desarrollo de otros microorganismos contaminantes de su entorno.

La acumulación de H_2O_2 en el medio de cultivo es el resultado de un desequilibrio entre los mecanismos de síntesis y de degradación de este compuesto tóxico.

Premmi y Botazzi (1972), demostraron que la capacidad de acumulación de H_2O_2 en determinadas condiciones de cultivo varía según las especies e incluso entre cepas de una misma especie (46).

En cuanto a su efecto sobre bacterias Gram negativas, Juffs y Babel (1975), obtuvieron una acción inhibidora con fermentos lácticos comerciales sobre *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacter*, *Achromobacter*, *Proteus*, *Alcaligenes* (44).

Los Estreptococos de los grupos A y B son muy sensibles a este efecto, mientras que para los Estreptococos lácticos (grupo N) la sensibilidad es variable.

Alais 1984 afirma que la adición a la leche de H_2O_2 en bajas concentraciones puede hacer este sistema activo contra algunas especies Gram negativas, incluso catalasa positivas como *Escherichia coli*, *Pseudomona fluorescens*, *Salmonella* (75).

4.3.7.2 Nisina

Fue descubierta en 1944 por Mattick y Hirsch, es producida por cepas de *Streptococcus lactis*; contiene aminoácidos no habituales y tiene un espectro de acción muy amplio, características que no la incluyen dentro de las bacteriocinas.

Es resistente a enzimas proteolíticas y su estructura en anillos le confiere termoresistencia. El potencial de acción de la Nisina provoca un flujo de aminoácidos, iones K⁺ y ATP provocando una caída del potencial de membrana.

El espectro de la acción inhibidora de la nisina se ha comprobado frente a *Bacillus*, *Clostridium*, algunas cepas de *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Pneumococcus*, *Staphilococcus aureus*, los Estreptococos de los grupos A, B, N y *Mycobacterium tuberculosis*.

Scott y Taylor (1981), demostraron la acción de la nisina para inhibir la germinación de esporas de *Clostridium botulinum* (75).

La nisina es utilizada en la industria alimentaria como agente de conservación y su uso como aditivo ha sido aceptado por la FAO (Food and Agriculture Organization). Se utiliza para la conservación de quesos fundidos, de queso de pasta cocida y prensada y de leches esterilizadas (75).

4.3.7.3 Ácido láctico

La tolerancia de los microorganismos respecto al pH es muy distinta. La naturaleza del ácido presente en el medio influye sobre la resistencia de los microorganismos frente a la acidez.

El efecto inhibitor específico de los ácidos orgánicos se atribuye generalmente a su forma no disociada, esta forma penetra libremente en la célula donde se ioniza, lo que induce un descenso en el pH interno y el bloqueo en algunos mecanismos de transporte Corlett y Brown (1980).

En el caso del ácido láctico las concentraciones del ácido no disociado necesario para obtener una inhibición en el medio de cultivo son: para levaduras, enterobacterias y micrococcos, superior al 0.01%; para mohos, superiores a 0.02% y para bacilos superiores a 0.03%, Baird Parker (1980).

Las BL heterofermentativas pueden producir cantidades importantes de ácidos orgánicos además de ácido láctico. Los *Leuconostoc* y los lactobacilos heterofermentativos producen la misma cantidad de acetato que de lactato O. Kandler (1983). El ácido acético, ejerce una fuerte acción inhibitor sobre la mayor parte de microorganismos.

La presencia simultánea de ácido láctico y de ácido acético podría además tener un ligero efecto de sinergismo de la acción inhibitoria. Este efecto se ha observado en *Salmonella typhimurium*, Rubin (1978) (46).

4.3.7.4 Bacteriocinas

En general, son moléculas de naturaleza proteica, coagregados de proteínas o bien glicoproteínas producidas por BAL que poseen marcada acción inhibitoria principalmente sobre bacterias Gram positivas.

Según Tagg *et al* (1976), los criterios para considerar una bacteriocina como un antimicrobiano son: que posea en su estructura un componente activo biológicamente; debe presentar un reducido espectro de inhibición generalmente sobre microorganismos relacionados taxonómicamente y tener capacidad bactericida frente a cepas sensibles (46).

Pueden ser codificadas por genes cromosomales como en el caso de Nisina, Lactocina 27, lactocina B; o bien por plásmidos como la Diplococcina, Lactococcina y Pediocina. Muchas de ellas pueden organizarse genéticamente como operones y son producidas como proteínas precursoras con una extensión N-terminal de 18 a 24 aminoácidos (26).

Estos compuestos pueden jugar un papel importante en los ecosistemas microbianos. Se ha sugerido que pueden adoptar la función de seleccionadoras de

la microflora que inicia la fermentación de numerosos productos comestibles. Además, se cree que las bacteriocinas son de importancia por la habilidad de competir en ecosistemas como el TGI (3,4).

Desde 1928, cuando se descubrió la nisina se inicio la investigación de los componentes proteicos antimicrobiales de las BAL y se han identificado y caracterizado un largo número de bacteriocina (75). Ver cuadro 2.

Cuadro 2. Bacteriocinas producidas por BAL

MICROORGANISMO	BACTERIOCINA	REFERENCIAS
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11444 NIZO 22186 CNRS 481	Nicina A Nisina Z Lacticina 481	Rogers (1998) Mulders et al (1991) Piart et al (1990)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> DPC 938	Lactocina D	Morgan & Hill (1993)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG 2081	Lactococcina G	Nissen-Meyer et al (1992)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> M46	Bacteriocina M46	Ten Brink (1990)
<i>Lactobacillus casei</i> B80	Caseicina 80	Ramelsberg & Raddler (1990)
<i>Lactobacillus plantarum</i> VII406	Plantaricina 406	Larsen et al (1993)
<i>Carnobacterium psychrola</i> UI49	Camocin UL40	Stoffels et al (1992)
<i>Pediococcus acidilactici</i> SJ-1	Pediacina SJ-1	Schved et al (1993)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> L-7230	Pediacina A	Daeschel & Klaenhammer
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> UL5	Mesenterocina 5	Daba et al (1991)
<i>Streptococcus tremophilus</i> Sfi13	Termofilina 13	Maciset & Moller 1993)
<i>Enterococcus faecalis</i> 226	Enterocina 226 NWC	Villani et al (1993)

Fuente: Parada, José Luis

4.3.7.4.1 Tipos de bacteriocinas. Se han establecido tres clases de definiciones sobre bacteriocinas basadas en la ciencia para las BAL:

Clase I: L- antibióticos : Nisin A y Z ; Lacticina 481

Clase II: para los pequeños no L- antibióticos termoestables: Lactococcina A y Lactacina F

Clase III: largas bacteriocinas termolábiles: caseicina 80

Clase IV: se ha sugerido comprendiendo una mezcla indefinida de bacteriocinas que contienen algunos lípidos o carbohidratos. Sin embargo, estas no son totalmente puras y su existencia se basa en la observación de su actividad que se neutraliza con tratamientos glicolíticos o lipolíticos y por lo tanto parece prematuro establecer una nueva clase.

Finalmente de acuerdo a la investigación hecha por Pablo Hernández (2000), las BAL de origen natural o genéticamente modificadas productoras de bacteriocinas, podrían utilizarse en la elaboración de alimentos nutraceúticos, funcionales o como aditivos en piensos para animales, lo que reduciría la presencia de microorganismos alterantes y potenciaría en los animales el desarrollo de una flora intestinal competitiva frente a la de muchos patógenos (51).

4.3.7.4.2 Ventajas de las bacteriocinas

La utilización de BAL de origen natural o genéticamente modificadas (OGM's) productoras de varias bacteriocinas, permitiría su utilización no solamente como cultivos iniciadores sino también como cultivos preservantes de muchos alimentos. La incorporación de bacterias productoras de bacteriocinas a los alimentos, permitiría eliminar o reducir la utilización de aditivos químicos de síntesis.

Las bacteriocinas son resistentes al calor, la acidez y al bajo Aw (cantidad de agua libre). Pueden utilizarse para incrementar la seguridad y la vida útil de muchos alimentos tratándose además de aditivos naturales elaborados por microorganismos considerados como seguros en los alimentos (6).

4.4 PROBIOTICOS- PREBIÓTICOS- SIMBIOTICOS

A comienzos de 1900, Elie Metchnikoff, relacionó la longevidad de ciertos pueblos caucásicos con el consumo de grandes cantidades de yogurt. A partir de 1930 se describieron diversos microorganismos que ejercen funciones probióticas (30.52,56).

Los probióticos son tradicionalmente definidos como microorganismos viables que tienen efectos benéficos en la prevención y tratamiento de condiciones patológicas y fisiológicas cuando son ingeridos (Rolfe R.D.2000).

Bifidobacterium y *Lactobacillus* son dos géneros que actúan como probióticos, estas bacterias se encuentran endógenamente a nivel del TGI pero también son consumidas alrededor del mundo como probióticos en productos fermentados, no fermentados y como suplementos (47).

Actualmente los probióticos se consideran como microorganismos vivos principalmente bacterias que al incorporarse a los alimentos ejercen beneficios que exceden sus propiedades básicas de nutrición (4,9,11,15,20,24,46). Según los expertos estos microorganismos vivos podrían ayudar a prevenir enfermedades como el cáncer, alergias y anemias.

La ingestión de probióticos puede modular significativamente la microbiota colonizante para incrementar el número de bacterias específicas y de esta manera cambiar la composición de la misma.

Un caso común de países en desarrollo es la utilización de fermentos lácticos conteniendo *Lactobacilos* o la levadura *Saccharomyces boulardii* en la prevención y tratamiento de la diarrea del viajero (3).

Los oligosacáridos no digeribles en general y los fructooligosacáridos (FOS) en particular se consideran como prebióticos, han demostrado ser estimulantes del crecimiento de bifidobacterias endógenas, que luego de un corto período alimenticio se hacen predominantes en heces humanas.

Los prebióticos son componentes orgánicos “sustancias” no digeribles de los alimentos (no microorganismos), que ejercen efectos promotores de la salud mediante el mejoramiento de las características de la flora intestinal.

Por consiguiente, un prebiótico proveería el material de sustrato para bacterias benéficas específicas en el colon. En ciertas leches fermentadas (probióticos) las BAL producen prebióticos tales como los oligosacáridos. Este efecto combinado se conoce como simbiotismo, y teóricamente podría mejorar la sobrevivencia e implantación de suplementos dietéticos de microbios vivos.

Las leches fermentadas pueden ser útiles como probióticos o simbióticos ya que proveen tanto bacterias vivas benéficas como productos de fermentación que pueden afectar de manera positiva a la microflora intestinal (49).

Las principales especies bacterianas de interés industrial participan en forma aislada, de a pares o en mezclas convenientemente preparadas en la elaboración de quesos de distinto tipo, manteca cultivada, yogur, leches y vegetales fermentados (10). Los géneros más destacados son: *Lactococcus lactis*,

Streptococcus cremoris, *Leuconostoc citrovorum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus acidophilus* (10).

4.5 ALIMENTOS FUNCIONALES CON BACTERIAS LÁCTICAS

Un alimento puede ser considerado como funcional si se logra demostrar satisfactoriamente ya sea que posee un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas en el organismo mas allá de los efectos nutricionales que mejora el estado de salud y de bienestar; o bien que reduce el riesgo de enfermedad.

El concepto de alimento funcional se encuentra presente en todas las tradiciones alimentarias. En cuanto a “mas allá de los efectos nutricionales habituales” la alimentación definida en raciones diarias recomendadas puede contener además de los alimentos usuales alimentos restaurados (restauración del contenido inicial de vitaminas y minerales) y alimentos enriquecidos; los alimentos dietéticos responden a necesidades específicas de algunos consumidores.

Los alimentos funcionales deben seguir siendo alimentos y poder consumirse en cantidades compatibles con una alimentación normal equilibrada y diversificada (51). Por otra parte se pueden considerar como alimentos designados aquellos que se adicionan a un régimen específico, estimulan determinadas funciones y

tratan una enfermedad, en cuyo caso se trata de un nutraceutico o alicamento (53).

Así, se ha demostrado que levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* y bacterias lácticas son utilizadas en la industria alimentaria; no obstante, existen yogures a los que se les ha añadido cultivos de *Bifidobacterium longum* y *L. acidophilus* que mejoran la digestión de lactosa, participan en la modulación de nuestro sistema inmunológico y previenen infecciones producidas por microbios como *Salmonella* y *Helicobacter pylori* (55).

Los alimentos funcionales o probióticos (llamados así porque contienen microorganismos benéficos para la salud) son de amplio uso, en la actualidad los expertos quieren utilizar esos potenciadores de la flora intestinal en la producción de otros alimentos como el salchichón, en fermentación de carnes para disminuir el tiempo de curado (30,52).

5. METODOLOGÍA

El desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo en cuatro fases:

1. Se realizó el aislamiento, purificación, conservación y activación de BAL de tracto intestinal humano a partir de muestras de materia fecal provenientes de cinco individuos correspondientes a una población infantil.
2. Se determinó la capacidad amilolítica de las bacterias purificadas de las cuales se escogió una de acuerdo a los halos de hidrólisis de mayor tamaño y se realizó la identificación del aislado.
3. Se estableció el mejor sustrato, al fermentar seis harinas: Harina de trigo, Harina de plátano, Harina de yuca, Harina de soya y arroz, Almidón de yuca y Melaza, con la bacteria aislada. Se tomó como control el medio comercial MRS y de acuerdo a parámetros de fermentación *in batch* tales como: evaluación de pH, formación de biomasa, producción de proteína, consumo de azúcares y rendimiento de ácido láctico se estableció la cinética de crecimiento del microorganismo en el sustrato elegido.

La determinación de estos dos últimos parámetros se llevó a cabo por el método de HPLC a través de una pasantía realizada en el laboratorio de Bioconversiones de la Universidad del Valle, aprobada mediante acuerdo marco institucional No. 1041.

4. Se realizaron ensayos de inhibición antagónica *in vitro*, mediante la técnica de los micropocillos utilizando la bacteria indicadora *Vibrio cholerae* 01 OGAWA, la cual fue suministrada por el Laboratorio de Salud Pública de Nariño- Hospital Civil, donde además se realizó la serotipificación del patógeno.

5.1 FASE I: AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN, CONSERVACIÓN Y ACTIVACION DE BACTERIAS ACIDO LACTICAS DE TRACTO INTESTINAL HUMANO

5.1.1 Aislamiento

Las bacterias lácticas fueron aisladas a partir de muestras de materia fecal de una población correspondiente a cinco infantes (I_1 = tres años de edad, I_2 = dos meses, I_3 = cuatro años, I_4 = un año y I_5 = trece años) las cuales fueron tomadas durante cinco días consecutivos para un numero total de muestras de 25.

Estos individuos se seleccionaron en base a: sus buenos hábitos alimenticios, una buena actividad metabólica y que no hayan recibido terapia con antibióticos.

Según Cathy J. Saloff – Coste (1997), la desestabilización de cualquiera de estos elementos puede conducir a un crecimiento exagerado de bacterias y a problemas en la salud del huésped; los mismos factores deben ser considerados al seleccionar los probióticos potenciales (59).

Las muestras se recolectaron en recipientes plásticos estériles con previa indicación a los donantes para la manipulación adecuada. Se procesaron en el Laboratorio 4 de Microbiología de la Universidad de Nariño en lapso máximo de dos horas para evitar la descomposición microbiológica y la alteración química de la misma. Las muestras recibieron el siguiente tratamiento:

Se pesó un gramo de materia fecal en balanza analítica OHAUS No. CT600 y se diluyó en 9 ml de solución salina peptonada (SSP) y se homogenizó con vórtex, marca Janke & Kunkel IKA Labortechnik VF₂.

A partir de la dilución 10^{-1} se realizaron subsecuentes diluciones decimales hasta 10^{-8} , en cámara de flujo laminar. De la dilución 10^{-3} a 10^{-5} se sembró 0.1 ml en Agar MRS modificado con azul de anilina (3ml/l), se extendió el inóculo con perlas de vidrio mediante movimientos giratorios de la caja y se incubó por espacio de 48 horas a 35° C. La composición de los medios se adjuntan en el Anexo A.

5.1.2 Purificación

Se tomaron colonias con morfología compatible con las bacterias lácticas de cada dilución de la muestra y se repicó en agar MRS azul de anilina hasta observar cultivos completamente axénicos. Mediante tinción de Gram se conoció la morfología microscópica de cada cultivo bacteriano, una vez confirmada su pureza, se sembraron las bacterias en medio MRS comercial para su posterior conservación.

5.1.3 Conservación

Cultivo de trabajo: en tubos inclinados que contenían medio MRS almidón 5 g/l como fuente de carbono mas agar al 1.5%, se sembró cada bacteria por punción y en superficie con asa de punta. Se incubó por un período de 48 horas a 35° C y se almacenaron a temperatura de 8 °C durante un mes.

Cultivos madres: se realizaron para garantizar la viabilidad del microorganismo. Cada bacteria se inoculó en erlenmeyers con 40 ml de caldo MRS (De Man Rogosa et Sharpe) y se incubó durante 24 horas a 35°C. Al cabo de este período se adicionó glicerol estéril al 25% y se homogenizó con vórtex Janke & Kunkel IKA Labortechnik VF₂. Se pasaron 1.5 ml del preparado en tubos Nunc estériles y se almacenaron en congelador a -25°C durante un año.

5.1.4 Activación

A partir de un cultivo madre, se tomo la totalidad del contenido y se inoculó en un erlenmeyer con 40 ml de caldo MRS. Se incubó por 24 horas a 35°C. Se evaluó la turbidez y pureza del caldo y de éste se llevaron 4 ml a otro erlenmeyer con la misma cantidad de medio de cultivo. Se incubó en iguales condiciones, seguidamente se repicó en cajas de agar MRS y se incubó por 48 horas a 35°C.

5.2 FASE II: DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD AMILOLITICA E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

5.2.1 Determinación de la capacidad amilolítica

Los aislados fueron cultivados en cajas de agar MRS almidón 20g/l por punción puntual (en un solo sitio de la caja) y punción múltiple (en varios sitios de la caja). Todas las siembras se realizaron por duplicado y se incubaron a 35°C durante cinco días, debido a que los halos fueron visibles luego de este período de incubación .

Para demostrar la hidrólisis del almidón, las cajas fueron expuestas a vapores de yodo, el cual reacciona ante la presencia de este polisacárido, formando el complejo iodo-almidón. Cuando hay hidrólisis, desaparece el color púrpura

característico del complejo y se dejan visualizar ampliamente zonas claras; las cuales se extienden a distancia de las colonias bacterianas por la producción de amilasa extracelular que difunde por el medio (15). Este proceso se llevó a cabo bajo cámara de extracción de gases. Las cajas se llevaron inmediatamente a oscuridad durante 2 minutos, tiempo al cual se lograron visualizar claramente los halos y se tomaron las mediciones respectivas.

Los resultados obtenidos se interpretaron mediante el análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de significancia de TUKEY permitiendo así la escogencia de una sola bacteria amilolítica para luego utilizarla en los ensayos de fermentación de diferentes sustratos amiláceos.

5.2.2 Identificación de BAL

Luego de escoger el microorganismo con mejor capacidad amilolítica se realizó la identificación por evaluación de la morfología celular mediante tinción de Gram, comparación de características macroscópicas de las colonias utilizando para tal fin el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey's y pruebas bioquímicas de degradación de carbohidratos en galerías API CH 50 en el Laboratorio No. 4 de Microbiología de la Universidad de Nariño.

Además se realizaron pruebas bioquímicas convencionales en el laboratorio de bacteriología del Departamento de microbiología, Universidad del Valle.

5.3 FASE III: ELECCION DEL SUSTRATO

5.3.1 Cultivo del inóculo

A partir de un stock de trabajo se tomó una asada de la bacteria láctica, se inoculó en 40 ml de caldo MRS y se incubó a 35 °C por 20 horas. El crecimiento de la bacteria se determinó por la turbidez del medio.

Según Crueger y Crueger (1993), el porcentaje de inóculo se debe ajustar al 10 % v/v. Por lo tanto, se tomaron 20 ml y se pasaron a 200 ml del mismo medio y se incubó en iguales condiciones; al cabo de este tiempo se calculó el número de bacterias por ml para lo cual se tomó 1ml del caldo MRS con el inóculo y se vertió en 9 ml de solución salina peptonada; a partir de esta dilución se tomó 0.1 ml y se pasó a la cámara Neubauer obteniéndose una población inicial de 29×10^6 bacterias/ ml para la primera fermentación.

Para los siguientes cinco ensayos de fermentación la densidad inicial fue ajustada a este valor, así cuando se presentó mayor a la establecida se adicionó caldo estéril teniendo en cuenta el siguiente cálculo matemático de proporcionalidad donde:

M_1 = población o densidad celular que se debe ajustar

$M_2 = 29 \times 10^6$ bacterias por ml. Densidad celular utilizada para la primera fermentación

$V_1 = 1\text{ml}$. Volumen proveniente del inóculo total para obtener la dilución 10^{-1}

$X_1 =$ cantidad que contiene M_2

$V_2 =$ lo que se agrega a 1ml para ajustar a 29×10^6 bacterias por ml

$V_3 = 200\text{ml}$. Cantidad total de inoculo

$X_2 =$ cantidad de caldo MRS estéril que se agrega a V_3 para ajustar la población al valor de M_2

Encontramos entonces X_1 :

$$\begin{array}{l} M_1 \text{-----} V_1 \\ M_2 \text{-----} X_1 \end{array} \quad X_1 = \frac{M_2 \times V_1}{M_1} \quad ; \quad X_1 = \frac{(29 \times 10^6 \text{ bact/ml}) \times (1\text{ml})}{62 \times 10^6 \text{ bact /ml}} = 0.47\text{ml}$$

Luego encontramos V_2 :

$$V_2 = V_1 - X_1 \quad ; \quad V_2 = 1\text{ml} - 0.47\text{ml} = 0.54 \text{ ml}$$

Finalmente se obtiene el valor de X_2 :

$$\begin{array}{l} V_1 \text{-----} V_2 \\ V_3 \text{-----} X_2 \end{array} \quad X_2 = \frac{V_3 \times V_2}{V_1} \quad ; \quad X_2 = \frac{200\text{ml} \times 0.54\text{ml}}{1\text{ml}} = 108 \text{ ml}$$

El valor de X_2 es la cantidad que se agrega a 200 ml para ajustar la población a 29×10^6 bact / ml.

Cuando la población fue inferior se reincubó en las mismas condiciones iniciales, el tiempo necesario para lograr la población requerida.

5.3.2 Fermentación en matraz

Se realizaron 6 ensayos, los cuales variaban entre si de acuerdo a la fuente de carbono y la fuente nitrógeno. Los medios se sirvieron en matraz de 250 cc, se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 lb de presión por 15 minutos. Los medios que contenían leche en polvo, se esterilizaron sin ella para evitar la desnaturalización de sus proteínas.

Medio base:

- Carbonato de calcio	4 g
- Hidrógeno fosfato de potasio	0.4 g
- Citrato de amonio	0.4 g
- Fuente de nitrógeno*	14.4 g
- Fuente de carbono**	2.99 g
- Inoculo	20 ml
- Agua destilada	200 ml

* 1 leche en polvo

2 extracto de levadura

3 extracto de carne

** A. Harina trigo

B. Harina de plátano

C. Almidón de yuca

D. Melaza

E Harina de soya y arroz

F. Harina de yuca

Medio control:

- Caldo MRS comercial 200 ml
- Inóculo 20 ml

Todos los ensayos incluidos controles se realizaron por duplicado. La composición bromatológica del tipo de sustrato y leche en polvo se especifican en el Anexo D.

5.3.3 Parámetros de fermentación

Una vez inoculada la bacteria láctica al 10% v/v en los diferentes matraces y con previa homogenización, se tomaron alícuotas de 10 ml para la medición de pH, un 1ml para la evaluar la formación de biomasa, 10 ml para la determinación del consumo de azúcares, 10 ml para evaluar la formación de proteínas y 10 ml para determinar el rendimiento de ácido láctico.

Dichos parámetros se evaluaron al tiempo 0 (cero) considerado como tal el tiempo en el cual se mezcló el inóculo con el sustrato, una vez tomadas la alícuotas se llevaron los matraces a incubación a 35°C, con agitación constante en plancha magnética Multi 15 STIRRE y se tomaron muestras a las 12 y 24 horas.

5.3.3.1 Determinación de acidez del fermento

Se determinó el pH en potenciómetro digital (691 pH meter Metrohm) con el fin de establecer la producción de ácido en el medio.

5.3.3.2 Evaluación del crecimiento microbiano

5.3.3.2.1 Turbidimetría. La absorbancia de la suspensión celular se determinó en el espectrofotómetro Perkin Elmer 35 a una longitud de onda de 540 nm para caldo MRS comercial (control) y 460 nm para el sustrato fermentado.

De las diferentes muestras se realizaron diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} y para obtener una lectura correcta, se agitaron con vórtex Janke & Kunkel IKA Labortechnik VF₂. Se trasvasó cada muestra a la cuba de lectura, partiendo de un blanco correspondiente al sustrato estéril.

5.3.3.2.2 Recuento en placa. Se diluyó 1 ml de la muestra en 9 ml de agua peptonada 0.1% , realizando diluciones sucesivas de 10^{-1} a 10^{-8} . A partir de la dilución 10^{-4} a 10^{-7} , se sembró en superficie 0.1 ml de muestra en agar MRS con perlas de vidrio y se incubó a 35°C por 48 horas. Todo por duplicado. Se realizó el conteo y se obtuvo el promedio de colonias; escogiéndose las cajas que contenían entre 30 y 300 colonias, valor que se multiplicó por el factor de dilución y por 10 para reportar el volumen por ml (12).

5.3.3.3 Determinación de proteínas

La cuantificación de proteínas totales se evaluó por el método de Lowry. Este utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu el cual posee cobre alcalino que reacciona con las proteínas a 50°C tomando una coloración azul intenso. Para evaluar la concentración de proteína, previamente se estandarizó la curva de calibración con seroalbúmina bovina de concentraciones conocidas entre 0-300 mg/l. Se tomaron las lecturas de densidad óptica (DO) en espectrofotómetro Perkin-Elmer a una longitud de onda de 750 nm. Anexo E.

5.3.3.4 Determinación de azúcares y ácido láctico por HPLC

Para determinar azúcares y ácidos orgánicos se utilizó el equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), marca Merck differential refractometer RI-71, ubicado en el laboratorio de Bioconversiones de la Universidad del Valle, el cual cuenta con una columna marca Virad Aminex HPX 87H, que permite la separación de ácidos orgánicos, azúcares simples o complejos y diferentes alcoholes gracias a la acción combinada de mecanismos de intercambio iónico, de interacciones hidrofóbicas y tamiz molecular.

Las muestras previamente se centrifugaron a 5000 r.p.m durante 10 minutos, se clarificaron con filtro Milipore 0.45 μ de diámetro. De cada muestra se tomaron 20 μ l con microjeringa de 100 μ l.

Se inyectó la muestra al equipo para realizar la lectura en el integrador marca Merck Hitachi D-2500 Chromato-integrator, reportando así concentraciones en g/l para lo cual fue necesario la elaboración previa de la curva de calibración a partir de diferentes estándares de azúcares y ácidos orgánicos. Anexo F.

5.3.4 Evaluación de los parámetros de fermentación

La expresión de resultados de los parámetros de fermentación se obtuvieron con base en un análisis de matrices a través de ecuaciones de primer orden , los cálculos y las unidades para elección del sustrato fueron los siguientes:

- **Biomasa:** UFC formadas = UFC finales – UFC iniciales
- **Producción de proteínas:** g/l proteínas finales – g/l proteínas iniciales
- **Rendimiento de ácido láctico:** $Y_{p/s} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f}$

P_f = g/l ácido láctico final

P_i = g/l ácido láctico inicial

S_i = g/l azúcares iniciales

S_f = g/l azúcares finales

- **Consumo de azúcares:** g/l azúcares iniciales – g/l azúcares finales

Según Raimbault (1996), en la elección del medio adecuado para el crecimiento y desarrollo de un microorganismo probiótico, se recomienda dar porcentajes de ponderación así:

Producción de proteínas totales 50%, incluyen proteína unicelular que mejoran la calidad nutricional del producto y las extracelulares que contiene a las bacteriocinas, importantes dentro de la actividad antagónica (46).

Producción de biomasa 25%, ya que un probiótico debe contener una carga pesada de bacterias viables.

Rendimiento de ácido láctico 10% ponderado, metabolito importante como agente inhibitorio del crecimiento de patógenos y saprofitos contaminantes, le confiere al producto un sabor característico y menos perecedero.

Asimilación de azúcares 5%, el microorganismo participa en el proceso de bioconversión de azúcares a proteínas, biomasa y ácido láctico.

Acidez 5% ponderado, esta imposibilita la contaminación de microorganismos indeseables o saprofitos.

5.3.5 Evaluación de la cinética de crecimiento

Para llevar a cabo la cinética de crecimiento, se realizó una fermentación *in batch* seleccionando previamente el sustrato que mejor se adaptó a las condiciones descritas anteriormente.

Para realizar el seguimiento del crecimiento microbiano se determinó la absorbancia de las suspensiones celulares en espectrofotómetro marca Perkin-Elmer a una longitud de onda de 540 nm.

Se realizaron 2 diluciones de las muestras con el fin de ubicar la lectura en un rango entre 0.1 y 0.9; la curva de crecimiento se estableció teniendo en cuenta el \ln de la densidad óptica (D.O) para obtener la ecuación de la recta calculada de los puntos correspondientes a la fase exponencial.

El valor correspondiente a la pendiente (m) de la ecuación será el valor de la tasa de crecimiento (μ); siendo $y = mx + b$, donde $m = \mu$ y el $\ln 2/\mu$ es el valor correspondiente al tiempo de duplicación (49).

Además se evaluaron todos los parámetros de fermentación de la misma manera que se explica en la sección 5.3.3, en lapsos de 2 horas durante 24 horas.

5.4 FASE IV: ENSAYO DE INHIBICIÓN ANTAGÓNICA *In vitro*

Para comprobar la capacidad inhibitoria del producto probiótico sobre *Vibrio cholerae* 01 Ogawa, se utilizó el método de Tagg *et al* (1976), o de los micropocillos, el cual involucra la inhibición del crecimiento de una cepa indicadora pasiva *V. cholerae*, causada por la cepa probiótica (46).

Tanto para el sustrato elegido como para el medio control MRS, ambos de final de fase logarítmica, se realizaron 3 diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) y para cada una de ellas se determinó la densidad celular en cámara de Neubauer.

Se vertieron 40 μ l de cada suspensión celular en pozos sellados en su fondo con agar MRS (Oxoid), se incubaron las cajas por un período de tres horas para la fijación del microorganismo a 35°C, luego se cubrió con una capa de agar TCBS (Oxoid) inoculado con 25 μ l de la cepa indicadora *Vibrio cholerae*, previamente incubada en agua peptonada pH 8.4 durante 12 horas a 35°C. Finalmente se llevó a incubación a 35°C por 48 horas.

Para el presente ensayo se aplicó un diseño irrestrictamente al azar con arreglo bifactorial combinatorio y 10 replicaciones, donde el factor A corresponde a dos niveles de sustrato: a_1 = melaza con leche en polvo y a_2 = MRS; y el factor B corresponde a cuatro niveles de dilución del sustrato a saber: b_1 = sustrato puro, $b_2 = 10^{-1}$, $b_3 = 10^{-2}$ y $b_4 = 10^{-3}$.

La unidad experimental estuvo representada por una caja petri para un total de 80 unidades experimentales.

Con el objeto de uniformizar las observaciones, previo análisis del Test de Bartley y Harley, estas se transformaron mediante raíz cuadrada de X, donde X es la observación.

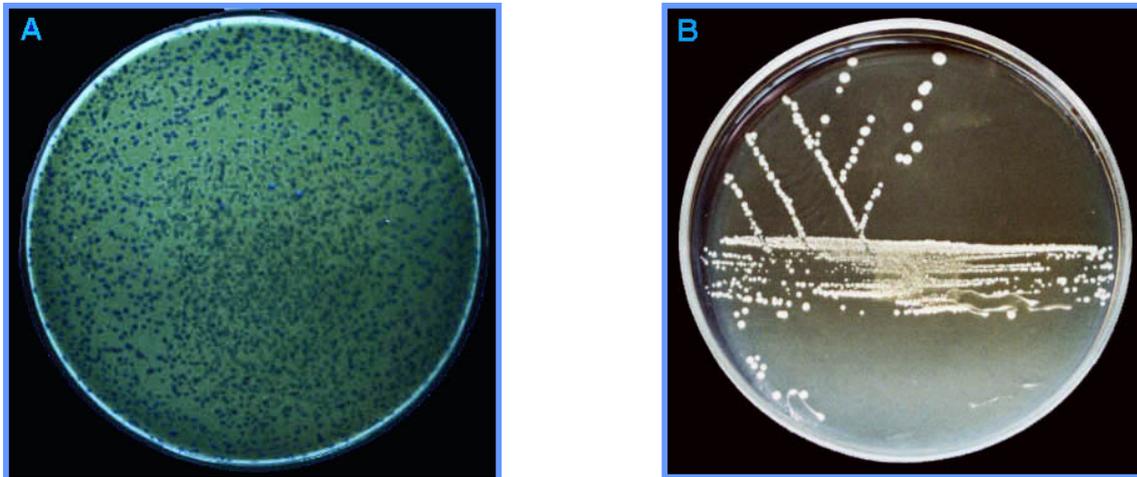
Con el fin de obtener igual número de replicas se descartaron al azar algunas de ellas para dejar diez por tratamiento.

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) y prueba de TUKEY para comparar los tratamientos en aquellas fuentes de variación que resultaron estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

6. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN

De cada muestra de materia fecal, M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , M_5 se purificaron 15 bacterias en agar MRS modificado con azul de anilina para un total de 75 aislados correspondientes a colonias cremosas de borde entero, superficie elevada, pigmentadas de color azul compatibles con bacterias ácido lácticas. Ver foto 1.



Fotografía 1: Aislamiento y purificación de BAL. a) aislamiento de BAL en agar MRS azul de anilina; b) purificación de BAL en agar MRS

La pureza de los cultivos se verificó en base a la coloración de Gram, buscando siempre bacilos Gram positivos, estas observaciones microscópicas permitieron además agrupar los aislados en siete morfologías diferentes. Ver anexo B.

Cuadro 3. Frecuencia de las características morfológicas para cada individuo

Individuos					
Coloración de Gram	M₁	M₂	M₃	M₄	M₅
Bacilos cortos- libres	5	-	-	1	3
Bacilos cortos- cadenas	-	4	5	4	4
Bacilos largos- libres	2	-	2	-	3
Bacilos largos- cadena	4	6	3	7	5
Bacilos cortos- empalizada	-	2	4	3	-
Bacilos largos- empalizada	4	-	-	-	-
Bacilos largos- pares	-	3	1	-	-

Fuente: Esta investigación

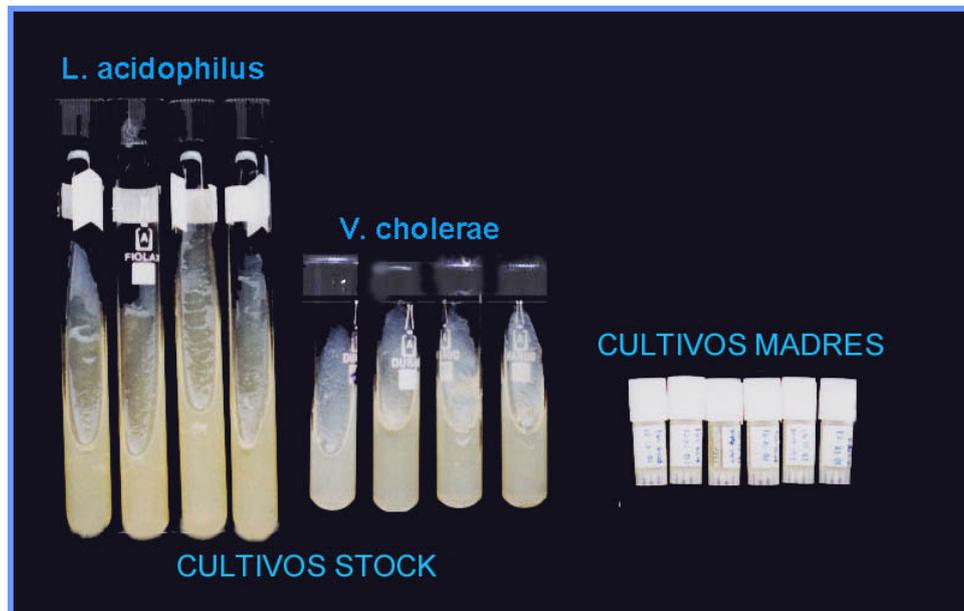
De acuerdo a la tabla 1, la morfología que predominó en las diferentes muestra fue: para M₁ bacilos cortos libres, M₂ bacilos largos en cadena, M₃ bacilos cortos en cadena, M₄ bacilos largos en cadena y M₅ bacilos largos en cadena.

6.2 CONSERVACIÓN Y ACTIVACIÓN

La estabilidad de los aislados se garantizó con los dos métodos de conservación propuestos. Los stock de trabajo almacenados a 8 °C fueron renovados cada mes para evitar la pérdida de la viabilidad del microorganismo. Los cultivos madres han mantenido la viabilidad del microorganismo a partir del aislamiento durante un año de conservación.

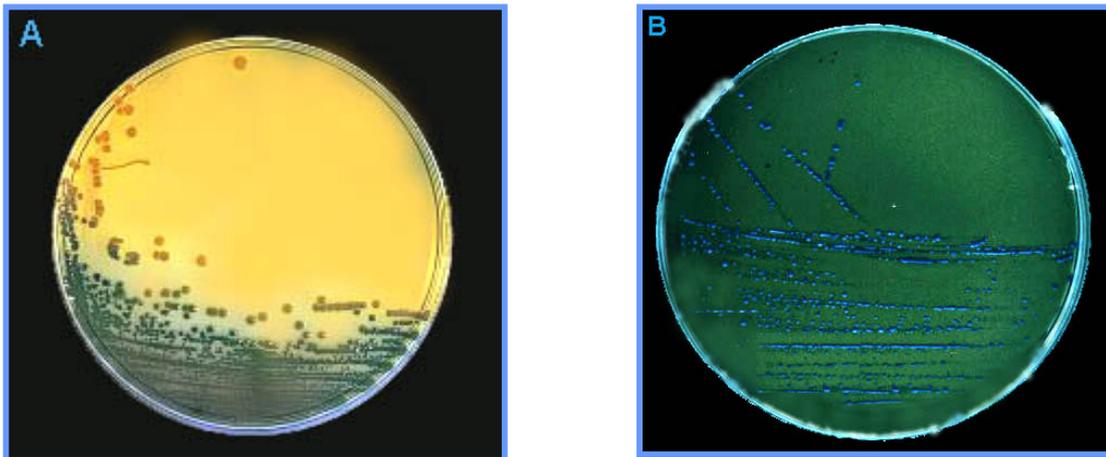
Vibrio cholerae se conservó bien en agar nutritivo con ajuste del pH a 8.4 y a temperatura ambiente durante dos meses, tiempo al cual se renovaron los stock.

Ver foto 2.



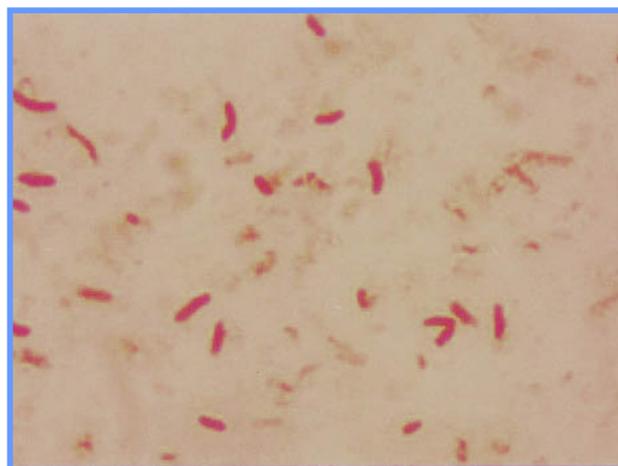
Fotografía 2: Conservación de bacterias ácido lácticas y *Vibrio cholerae* 01 OGAWA

La cepa láctica se activó completamente a las 24 horas en caldo MRS y la cepa patógena lo hizo a las 6 horas en caldo tripticasa de soya. Ver foto 3



Fotografía 3. Activación. a) *Vibrio cholerae* 01 OGAWA en agar TCBS; b) BAL agar MRS azul de anilina.

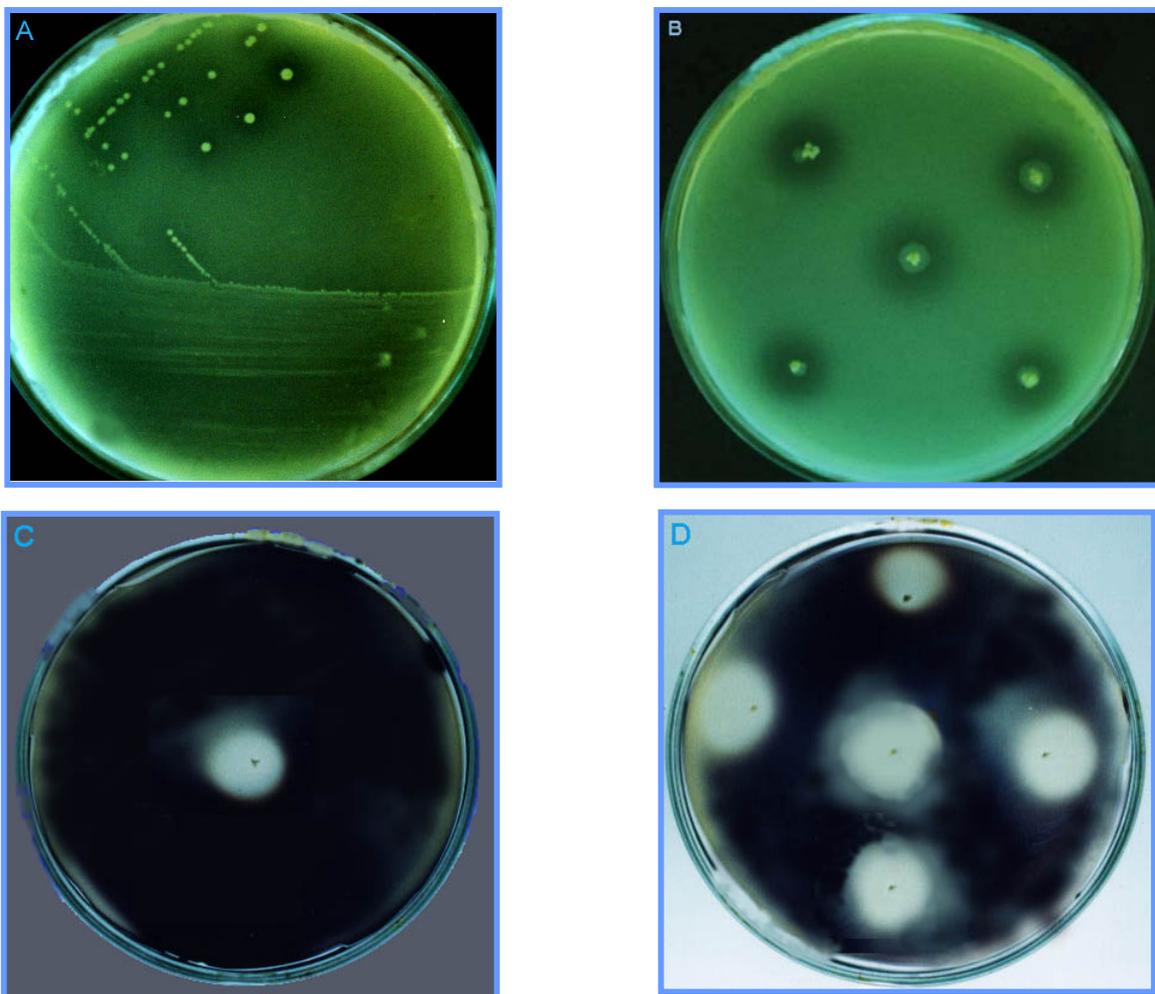
Al realizar la tinción de Gram de la cepa patógena se observaron bacilos curvos gram negativos, no esporulados y carentes de cápsula. Ver foto 4



Fotografía 4. Características microscópicas de *Vibrio cholerae* 01 OGAWA

6.3 FASE II: DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD AMIOLÍTICA

Se encontró que de los 75 aislados solo ocho respondieron positivamente a la prueba de hidrólisis del almidón. Ver foto 5.



Fotografía 5. Actividad amilolítica de bacterias lácticas en agar MRS almidón. a) Hidrólisis en estrías, de *L. acidophilus* b) Hidrólisis múltiple en MRS almidón; c,d) Hidrólisis puntual y múltiple revelada con vapores de yodo bisublimado

Su acción posiblemente fue mediada por acción de enzimas α -amilasas extracelulares o por enzimas β -amilasas o amiloglucosidasas (22). Ver cuadro 4.

Cuadro 4. Bacterias lácticas con mejor capacidad amilolítica

Muestra	Halo (mm)						
$l_2 a^5$	8	$l_2 c^5$	5	$l_2 e^4$	4	$l_4 c^5$	6
$l_2 a^5$	10	$l_2 c^5$	3	$l_2 e^4$	2	$l_4 c^5$	4
$l_2 a^5$	6	$l_2 c^5$	5	$l_2 e^4$	5	$l_4 c^5$	4
$l_2 a^5$	6	$l_2 c^5$	5	$l_2 e^4$	9	$l_4 c^5$	5
$l_2 b^5$	4	$l_2 e^3$	3	$l_2 e^5$	12	$l_4 d^3$	7
$l_2 b^5$	3	$l_2 e^3$	4	$l_2 e^5$	15	$l_4 d^3$	4
$l_2 b^5$	6	$l_2 e^3$	2	$l_2 e^5$	10	$l_4 d^3$	3
$l_2 b^5$	3	$l_2 e^3$	2	$l_2 e^5$	9	$l_4 d^3$	2

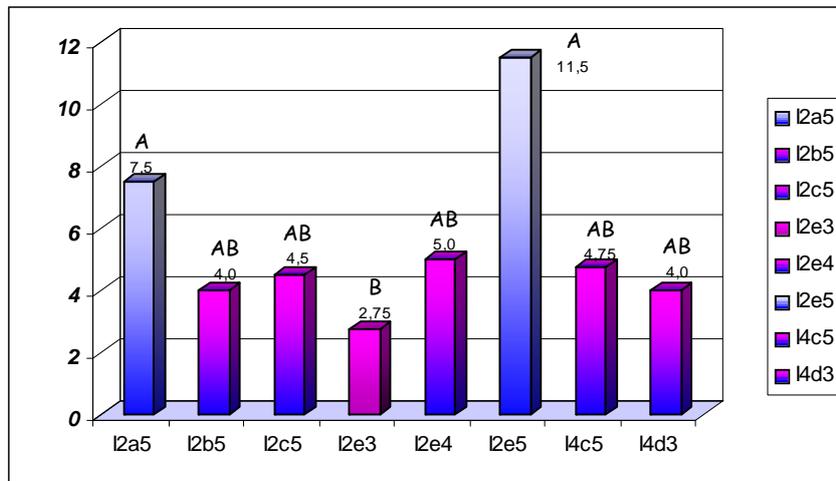
Fuente: Esta investigación

l_2, l_4 : individuo 2 e individuo 4 de los cuales se obtuvieron las muestras.

a, b, c, d, e: orden en el cual se receptaron las muestras

superíndice: dilución del aislado

La BL que presentó la mejor degradación del almidón fue el aislado l_2E^5 , la cual mostró los mejores resultados respecto a las otras siete bacterias, así lo demuestra el análisis de varianza, mediante la prueba de rangos múltiples, TUKEY que determina la diferencia de medias entre las muestras, con un 95% de confiabilidad. Ver gráfica 1.



Gráfica 1. Promedios de los halos de hidrólisis del almidón para las bacterias lácticas y Prueba de TUKEY. Promedios con la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas.

La realización de esta prueba fue importante para la escogencia de una sola BL que sería empleada más adelante en los ensayos de fermentación de sustratos amiláceos.

6.4 IDENTIFICACION DEL AISLADO

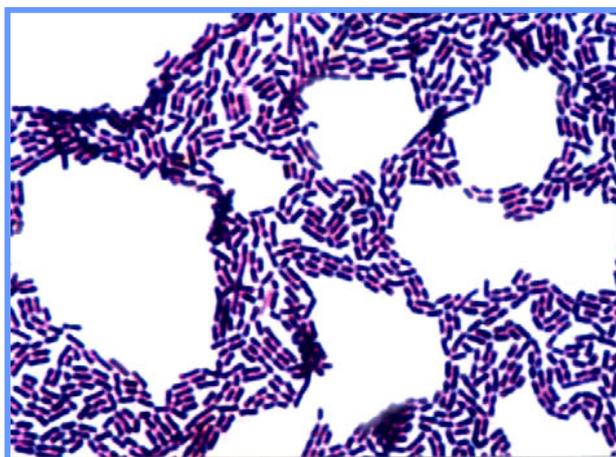
Las principales características estudiadas para la identificación del aislado se presentan a continuación:

Cuadro 5. Principales características morfológicas y fisiológicas de *L. acidophilus*

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	Bacilos Gram positivos, cortos, en empalizada, no esporulados.
CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	Colonias azules, borde entero, superficie elevada, cremosas, pequeñas.
PROPIEDADES FISIOLÓGICAS	Temperatura optima 30 - 36°C, toleran entre 18 y 40°C. pH 3.8 - 6.5 Tiempo de duplicación 7.24 horas
CARACTER AEROGÉNICO	Anaerobia aerotolerante
METABOLISMO	Homofermentativa Altamente productora de ácido láctico, alcanza hasta 67.39 g/l. Produce otros ácidos orgánicos en cantidades significativas (acético, succínico, fórmico, propiónico y cítrico).

Fuente: Esta investigación

De acuerdo a las observaciones microscópicas el aislado corresponde a un bacilo corto gram positivo, dispuesto en empalizada, no esporulado. Ver foto 6



Fotografía 6. Características microscópicas de *Lactobacillus acidophilus*.

Las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación del aislado se presentan en el cuadro 6.

Cuadro 6. Pruebas bioquímicas convencionales

Prueba de NaCl 10%	Negativa
Crecimiento a 45°C	Negativa
Prueba de la gelatina	Negativa
Prueba de la caseína	Negativa
Glucosa	Positiva
Sacarosa	Positivo
Trehalosa	Positivo
Lactosa	Positiva
Manosa	Positiva
Esculina	Positiva
Maltosa	Positiva
Salicina	Positiva
Rafinosa	Negativa
Ramnosa	Negativa
Xilosa	Negativa
Arabinosa	Negativa

Fuente: Laboratorio de Microbiología, Universidad del Valle

Por lo anterior y los resultados obtenidos en las pruebas API CH 50. Ver anexo C. se puede concluir que la identificación del aislado es compatible con *Lactobacillus acidophilus*.

6.5 ELECCION DEL SUSTRATO

Los resultados generales se adjuntan en el anexo G y la elección del sustrato en consideración de la evaluación de los parámetros de fermentación se muestran en los cuadros 7,8,9,10,11,12 y 13.

Cuadro 7. Ensayo de elección con Harina de trigo

Sustrato	HARINA DE TRIGO				Ponderación	Elección
	Leche en polvo	Extracto levadura	Extracto de carne	M.R.S		
Parámetros de fermentación	A ₁	A ₂	A ₃	C		
PH	5.28	6.81	6.89	4.31	5%	A ₁
Azúcares totales consumo (g/l)	7.38	1.3	1.04	5.14	10%	A ₁
Ácido láctico rendimiento (g/l)	5.20	2	1.37	2.68	10%	A ₁
Proteína total producción (g/l)	3.6	0.99	1.42	4.02	50%	A ₁
Biomasa (UFC/lm) netas	37x10 ⁸	55x10 ⁷	40x10 ⁷	26x10 ⁷	25%	A ₁
Sustrato elegido	Harina de trigo con leche en polvo				100%	A₁

Fuente: esta investigación

Se observa en la tabla 1 los mejores resultados para el sustrato de harina de trigo con leche en polvo, con un 100% de ponderación, los parámetros de fermentación en este medio respondieron de mejor manera respecto a los obtenidos en el medio control MRS, lo cual hace suponer que la harina de trigo es un buen sustrato para el desarrollo del microorganismo respecto al medio comercial. Cabe anotar que aunque se logra una baja de pH a 4.31 los demás parámetros presentan valores inferiores respecto al sustrato elegido.

Cuadro 8. Ensayo de elección con Harina de plátano

Sustrato	HARINA DE PLÁTANO				Ponderación	Elección
	Leche en polvo	Extracto levadura	Extracto de carne	M.R.S		
Parámetros de fermentación	B ₁	B ₂	B ₃	C		
PH	4.91	6.83	7.23	3.81	5%	B ₁
Azúcares totales consumo (g/l)	1.5	0.17	0.47	3.31	10%	B ₁
Ácido láctico rendimiento (g/l)	27.9	16	2.78	3.02	10%	B ₁
Proteína total producción (g/l)	4.67	1.4	5.28	1.1	50%	B ₃
Biomasa (UFC/lm) netas	58x10 ⁸	14x10 ⁸	21x10 ⁷	33x10 ⁷	25%	B ₁
Sustrato elegido	Harina de plátano con extracto de carne				50%	B₃

Fuente: esta investigación

El sustrato elegido fue harina de plátano con extracto de carne con un ponderado del 50%, correspondiente a la producción de proteínas totales. Aunque los demás parámetros se presentan de mejor manera en el medio de harina de plátano con leche en polvo. Según Raimbault (1996), al seleccionar un medio adecuado para el crecimiento y desarrollo de un probiótico se le asigna este porcentaje de ponderación a las proteínas ya que se relacionan directamente con la calidad del producto y con la presencia de bacteriocinas que son elementos claves en la inhibición contra patógenos.

Cuadro 9. Ensayo de elección con Almidón de yuca

Sustrato	ALMIDÓN DE YUCA				Ponderación	Elección
	Leche en polvo	Extracto levadura	Extracto de carne	M.R.S		
Parámetros de fermentación	C ₁	C ₂	C ₃	C		
PH	4.74	6.86	6.5	3.78	5%	C ₁
Azúcares totales consumo (g/l)	5.04	1.93	0.94	5.01	10%	C ₁
Ácido láctico rendimiento (g/l)	8.57	3.18	7.31	2.67	10%	C ₁
Proteína total producción (g/l)	2.39	0.78	0.84	1.91	50%	C ₁
Biomasa (UFC/lm) netas	30x10 ⁸	17x10 ⁷	86x10 ⁷	33x10 ⁸	25%	C ₁
Sustrato elegido	Almidón de yuca con leche en polvo				100%	C₁

Fuente: esta investigación

Se muestra al medio de almidón de yuca con leche en polvo como el mejor sustrato, con un 100% ponderación, aquí se presenta una incompleta utilización de azúcares totales disponibles, razón por la cual se podría argumentar el bajo rendimiento de ácido láctico.

Cuadro 10. Ensayo de elección con Melaza

Sustrato	MELAZA				Ponderación	Elección
	Leche en polvo	Extracto levadura	Extracto de carne	M.R.S		
Parámetros de fermentación	D ₁	D ₂	D ₃	C		
PH	5.28	5.63	5.90	3.72	5%	D ₁
Azúcares totales consumo (g/l)	2.49	1.52	1.67	7.12	10%	D ₁
Ácido láctico rendimiento (g/l)	21.9	5.55	5.97	3.25	10%	D ₁
Proteína total producción (g/l)	7.48	1.42	1.97	0.85	50%	D ₁
Biomasa (UFC/lm) netas	87x10 ⁸	22x10 ⁸	29x10 ⁸	33x10 ⁸	25%	D ₁
Sustrato elegido	Melaza con leche en polvo				100%	D₁

Fuente: esta investigación

Se observa que los parámetros de fermentación que mejor se ajustaron fueron los del medio Melaza con leche, 100% de ponderación. Ocurre la mejor producción de proteína respecto a los otros cinco ensayos. Además se presentó la mayor producción de ácido láctico 21.9 g/l, lo cual podría atribuirse al desdoblamiento de los azúcares totales disponibles que contiene este sustrato.

El recuento en placa presenta además, a este medio con la mejor formación de biomasa, lo cual es muy importante en la elección de un sustrato adecuado como probiótico ya que este debe conllevar una carga pesada de bacterias viables, según Raimbault (1996).

Cuadro 11. Ensayo de elección con harina de soya y arroz

Sustrato	HARINA DE SOYA Y ARROZ				Ponderación	Elección
	Leche en polvo	Extracto levadura	Extracto de carne	M.R.S		
Parámetros de fermentación	E ₁	E ₂	E ₃	C		
PH	4.65	5.89	6.25	3.55	5%	E ₁
Azúcares totales consumo (g/l)	4.61	1.10	0.65	2.48	10%	E ₁
Ácido láctico rendimiento (g/l)	5.90	1.30	0.7	7.37	10%	E ₁
Proteína total producción (g/l)	2.66	1.07	0.5	0.43	50%	E ₁
Biomasa (UFC/lm) netas	82x10 ⁸	16x10 ⁸	94x10 ⁷	90x10 ⁷	25%	E ₁
Sustrato elegido	Harina de soya y arroz con leche en polvo				100%	E₁

Fuente: esta investigación

Aquí se muestran los mejores resultados para el ensayo de Harina de Soya y arroz con leche en polvo, con un ponderado del 100%, destacándose además el pH más bajo respecto a todos los demás ensayos. Este parámetro es de gran importancia ya que el grado de acidez impide la contaminación por microorganismos indeseables.

Cuadro 12. Ensayo de elección con Harina de yuca

Sustrato	HARINA DE YUCA				Ponderación	Elección
	Leche en polvo	Extracto levadura	Extracto de carne	M.R.S		
Parámetros de fermentación	F ₁	F ₂	F ₃	C		
PH	4.89	6.5	6.83	3.55	5%	F ₁
Azúcares totales consumo (g/l)	2.91	0.28	1.43	4	10%	F ₁
Ácido láctico rendimiento (g/l)	7.35	4.92	5.67	4.72	10%	F ₁
Proteína total producción (g/l)	1.44	1.07	4.31	5.51	50%	F ₃
Biomasa (UFC/lm) netas	14x10 ⁸	23x10 ⁸	20x10 ⁸	11x10 ⁸	25%	F ₂
Sustrato elegido	Harina de yuca con extracto de carne				50%	F₃

Fuente: esta investigación

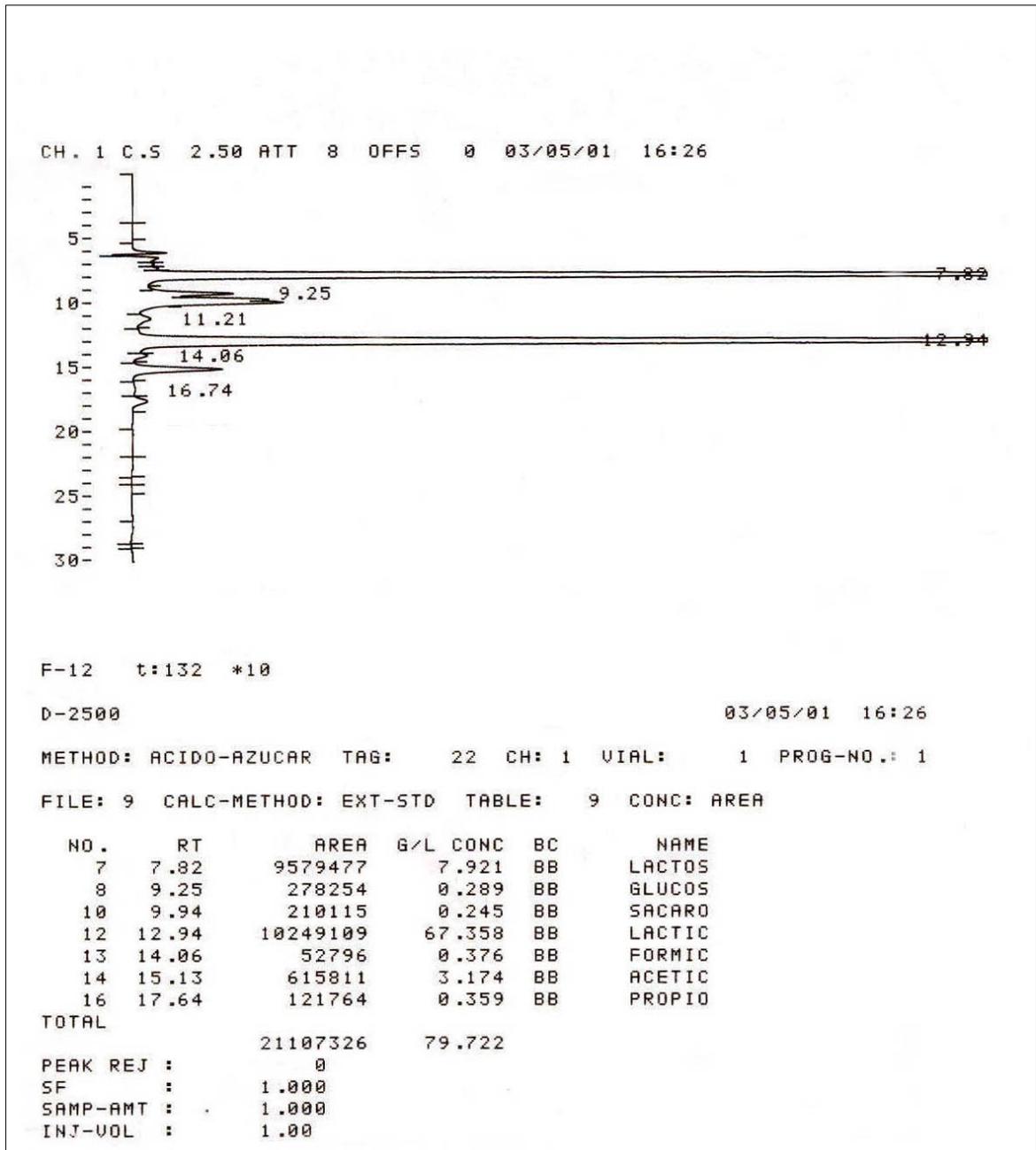
Los resultados obtenidos en este ensayo no fueron consistentes en todos los aspectos ya que los valores para pH, azúcares y ácido láctico fueron altos en el medio de Harina de yuca con leche en polvo; la biomasa fue óptima en el medio de Harina de yuca con extracto de levadura y teniendo en cuenta los parámetros para la elección de un medio adecuado se escogió el sustrato de Harina de yuca con extracto de carne ya que presentó una producción de proteína total de 4.31 g/l.

Cuadro 13. Elección de sustrato interensayo

Sustratos								
Parámetros Fermentación	A₁	B₃	C₁	D₁	E₁	F₃	Ponderación	Elección
PH	5.28	7.23	4.74	5.28	4.65	6.83	5%	E ₁
Azúcares consumo (g/l)	7.38	0.47	5.04	2.49	4.61	1.43	10%	A ₁
Ácido Láctico rendimiento (g/l)	5.20	2.78	8.57	21.9	5.90	5.67	10%	D ₁
Proteína Total producción (g/l)	3.6	5.28	2.39	7.48	2.66	4.31	50%	D ₁
Biomasa (UFC/ml) netas	37x10 ⁸	21x10 ⁷	30x10 ⁸	87x10 ⁸	82x10 ⁸	20x10 ⁸	25%	D ₁
Sustrato Elegido	Melaza con leche en polvo						85%	D₁

Fuente: esta investigación

Al comparar los resultados obtenidos de los seis sustratos se presenta el medio de Melaza con leche en polvo con los mejores porcentajes de ponderación. Es de anotar que en este sustrato se obtuvo la más alta producción de ácido láctico a las 24 horas de fermentación con un valor de 67.3 g/l evaluado mediante la técnica del HPLC, esta cantidad puede ser considerada representativa como producto final del metabolismo que realiza *L. acidophilus* y debido a su alto rendimiento el microorganismo aislado podría ser de gran importancia a nivel industrial. Ver gráfica 2.



Gráfica 2. Cromatograma obtenido por HPLC para el medio de Melaza con leche en polvo a las 24 horas de fermentación.

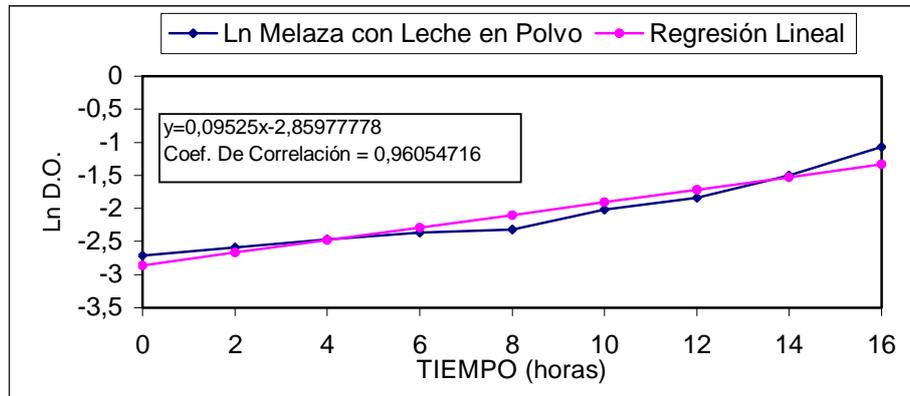
El ácido láctico así mismo, confiere buenas propiedades organolépticas a los alimentos, ayuda a su conservación brindando una mejor textura y sabor a los productos; se le atribuye además efectos antimicrobianos (13).

Al evaluar el consumo de azúcares se presenta el valor más alto en el medio de Harina de trigo con leche en polvo, lo que hace pensar que este sustrato puede contener una cantidad considerable de azúcares asimilables por el microorganismo.

Así mismo, cabe señalar que la mejor fuente de proteína para *L. acidophilus*, en casi todos los ensayos fue la leche en polvo, lo cual se podría atribuir a su alto contenido de nutrientes.

6.5.1 Evaluación de la cinética de crecimiento para *L. acidophilus* en el medio de melaza con leche en polvo

Después de realizar la fermentación *in batch*, se logró determinar el comportamiento cinético y metabólico del microorganismo en el medio seleccionado. Ver anexo H. obteniéndose los siguientes resultados:



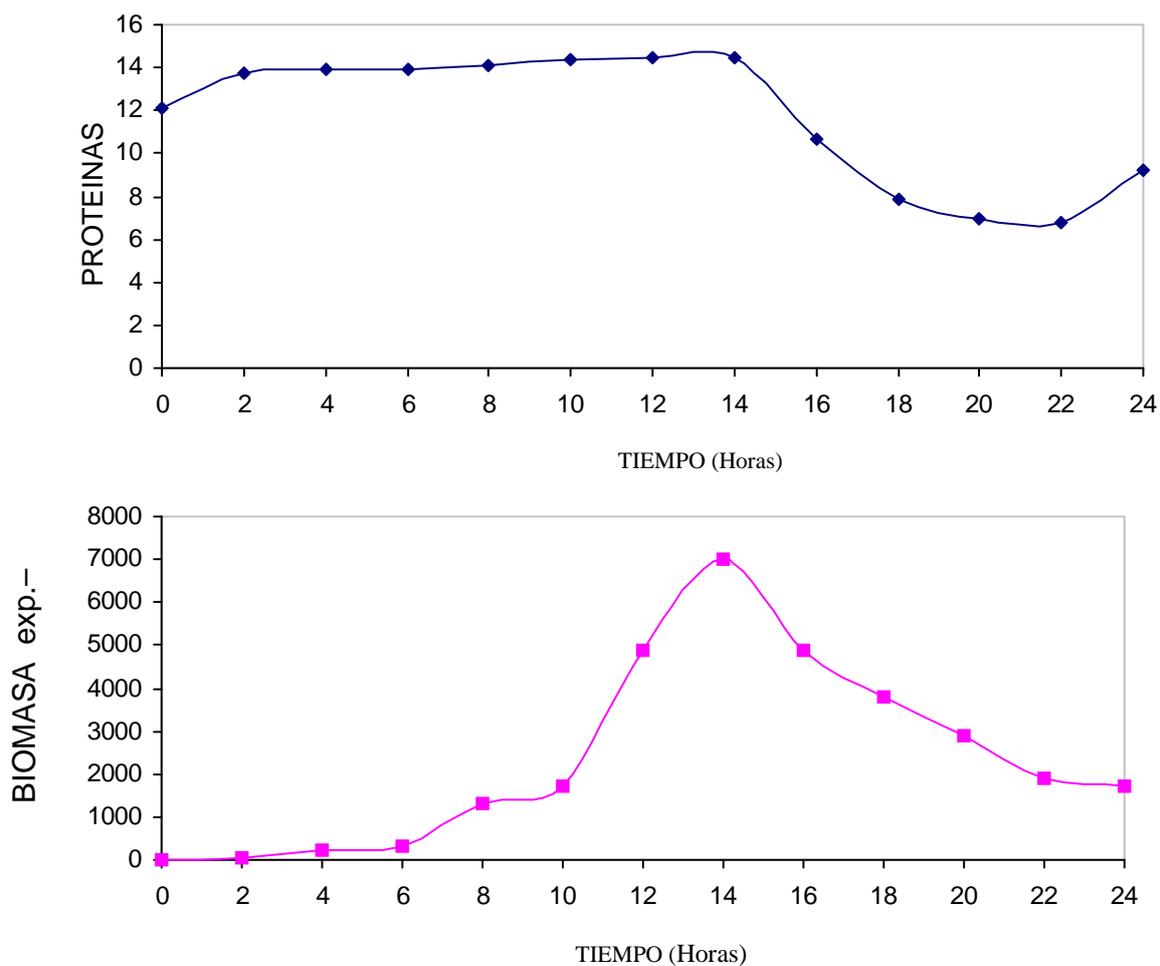
$$\mu = 0.096 \text{ h}^{-1} \quad t_d = 7,24 \text{ h}$$

Gráfica 3. Comportamiento cinético de *L. acidophilus* en el medio de melaza con leche en polvo. Ln (Logaritmo natural), D.O. (Densidad óptica).

El medio melaza con leche en polvo le proporciona a la bacteria los nutrientes necesarios para continuar su fase exponencial de crecimiento, esto se determinó luego de estimar la concentración celular a partir del tiempo de inoculación (T_0) hasta las 16 horas (T_{16}) de fermentación. Aunque la bacteria altera su comportamiento al tomar los nutrientes y secretar productos metabólicos en un nivel alto de concentración como el ácido láctico, la velocidad de crecimiento permanece constante durante esta fase con un valor de $0,09 \text{ h}^{-1}$. Ver gráfica 3.

El tiempo de duplicación de 7.24 horas, define que *L. acidophilus* en este sustrato es de crecimiento lento. Al iniciar el proceso se presenta un buen crecimiento acompañado por un alto consumo de azúcares y formación de pequeñas cantidades de ácido láctico; posteriormente a las 16 horas el crecimiento disminuye, comienza a producirse ácido láctico en altas concentraciones y el

consumo de azúcares disminuye paulatinamente. De esta manera se concluye que la trofofase e idiofase están separadas en el tiempo por lo cual se clasifica esta como una fermentación *in batch* tipo II.



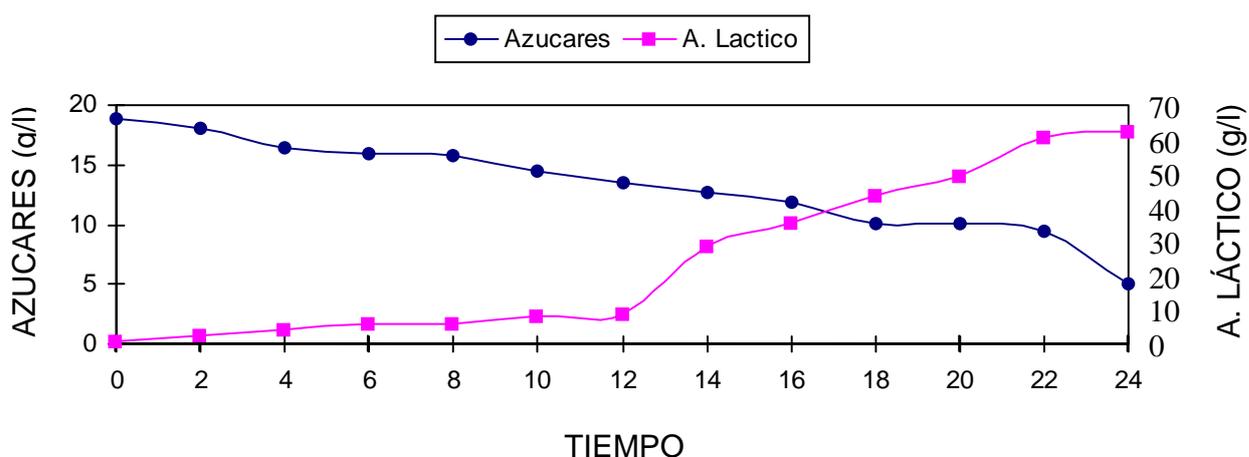
Gráfica 4. Producción de proteínas y formación de biomasa de *L. acidophilus* en el medio de melaza con leche en polvo.

Al estimar la masa celular y la producción de proteína *L. acidophilus* en el medio melaza con leche en polvo se observó un aumento constante de los mismos

desde el comienzo de la fermentación hasta las 14 horas, donde se determinó el tiempo de cosecha registrándose una biomasa de 75×10^8 UFC/ml y una concentración proteica de 14,5 g/l. Posteriormente se observó un descenso lento de estos parámetros hasta las 22 horas donde se presentó un pequeño incremento en la formación de proteínas que podría atribuirse a la estabilidad de la biomasa.

Avila y otros autores (1998), creen que este decrecimiento bacteriano podría deberse al consumo de azúcares y a la alta producción de ácido láctico que inhibe el crecimiento de las bacterias lácticas.

En el medio comercial MRS el pico más alto para la formación de la biomasa se registró a las 14 horas con 78×10^7 UFC/ml. El sustrato elegido a diferencia de este medio presenta un rendimiento óptimo para el desarrollo y metabolismo de la bacteria *L. acidophilus*. Ver gráfica 4.



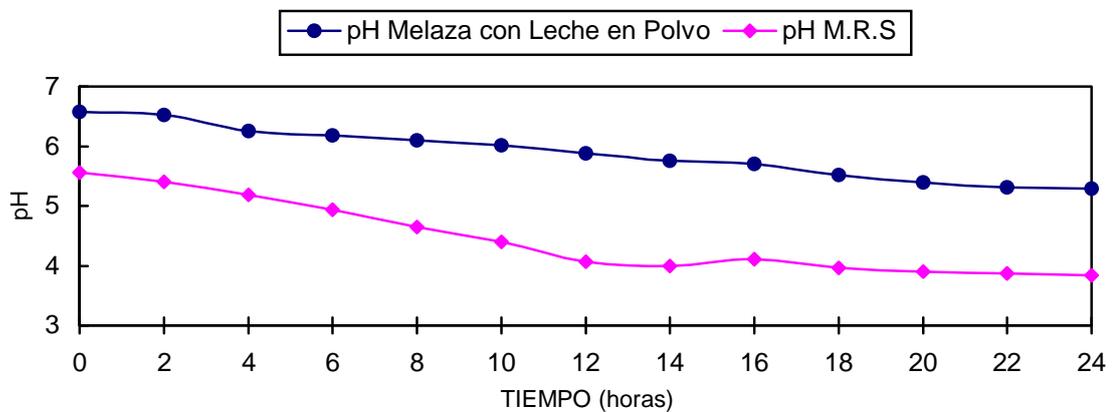
Gráfica 5. Consumo de Azúcares y Producción de ácido láctico de *L. acidophilus* en el medio de melaza con leche en polvo.

L. acidophilus presentó una alta producción de ácido láctico en el medio melaza con leche en polvo que podría deberse principalmente al consumo de azúcares el cual fue directamente proporcional con la producción de este metabolito. Al inicio de la fermentación se registró una concentración de 18.8 g/l de azúcares y 0.62 g/l de ácido láctico, a las 24 horas se habrían consumido 13.8 g/l de azúcares y producido 62 g/l de ácido láctico; cabe anotar que esta producción se hace más notable entre el tiempo 12 y 14 donde se registran concentraciones de 8.46 y 28.7 g/l respectivamente.

Avila explica que la alta producción de este ácido se debe principalmente al consumo de azúcares teniendo en cuenta que las bacterias lácticas basan su nutrición y producción de ácido láctico en la presencia de azúcares y carbohidratos. Ver gráfica 5.

Este comportamiento se logró observar también en el medio comercial MRS donde se obtuvo al final de la fermentación una producción de 36 g/l de ácido láctico, concentración baja respecto al ensayo con el medio elegido pero puede ser atribuido a la menor disposición de azúcares en el medio al inicio del proceso, 12.8 g/l.

Esto posiblemente puede haber obligado a la bacteria a disponer de manera moderada de esta fuente y así para el final de la fermentación se habrían consumido 8.67 g/l del total inicial con un remanente de 4.13 g/l.



Gráfica 6. Evaluación del pH vs. Tiempo de *L. acidophilus* en los medios melaza con leche en polvo y MRS comercial.

El pH inicial en el medio melaza con leche en polvo fue de 6.58 alcanzando a las 24 horas un valor de 5.39, igualmente para el medio comercial MRS se presentó un descenso de pH del inicial 5.56 hasta 3.84 en el mismo rango de tiempo. Se destaca un descenso moderado del pH lo cual puede ser atribuido a la presencia de carbonato de calcio en el medio el cual actúa en estos como una sustancia tampón.

Según Cathy J. Saloff – Coste (1997), *L. acidophilus* no sobrevive adecuadamente en sustratos con pH bajo y es difícil mantener un número grande de estos microorganismos en el producto. Por lo tanto el sustrato elegido puede ofrecer un ambiente adecuado para el rendimiento de biomasa, proteínas y utilización de azúcares este último implicado en la producción de ácido láctico. Ver gráfica 6.

6.6 FASE IV: ENSAYO DE INHIBICIÓN ANTAGÓNICA *In vitro*

De acuerdo con los resultados obtenidos, *L. acidophilus* en el sustrato de melaza con leche en polvo inhibe el crecimiento de *V. cholerae* 01 OGAWA en condiciones de laboratorio. Ver foto 7.

Cuadro 14. Resultados del ANDEVA para los halos de inhibición antagónica en mm del sustrato probiótico sobre *Vibrio cholerae* 01 OGAWA.

FV	GL	SC	CM	FC	FT	
					5%	1%
Tratamiento	7	144	20.571	7.074**	2.16	2.94
A	1	0.055	0.055	0.018NS	3.99	7.07
B	3	114.65	38.216	13.143**	2.75	4.12
A x B	3	29.74	9.9133	3.409*	2.75	4.12
Error	65	189	2.9076			
Total	79	333				

FV = Factor variable

** Diferencias altamente significativas

GL = Grados de libertad

* Diferencias significativas

SC = Suma de cuadrados

NS No hay diferencias significativas

CM = Cuadrado medio

FC = Frecuencia calculada

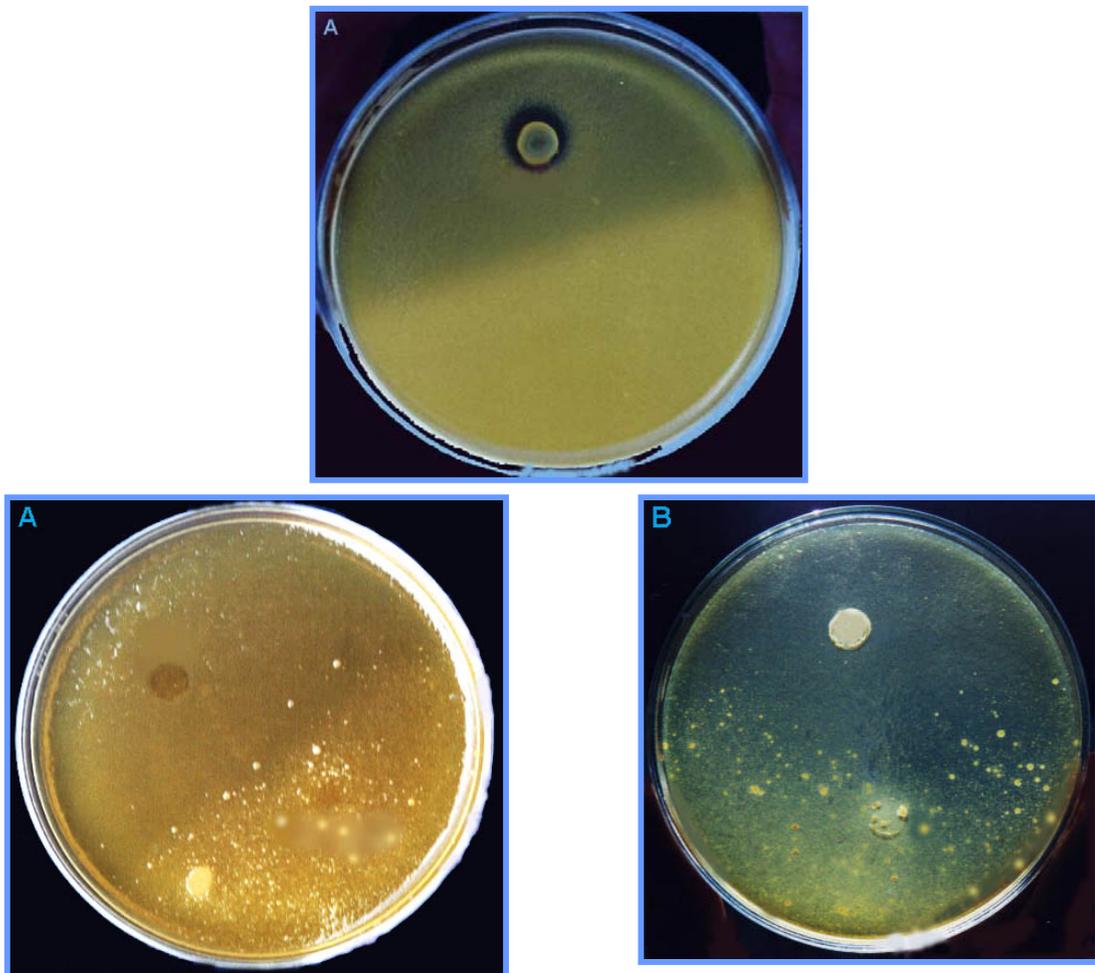
FT = Frecuencia tabulada

A = Sustratos

a₁ = Melaza con leche en polvo; a₂ = MRS

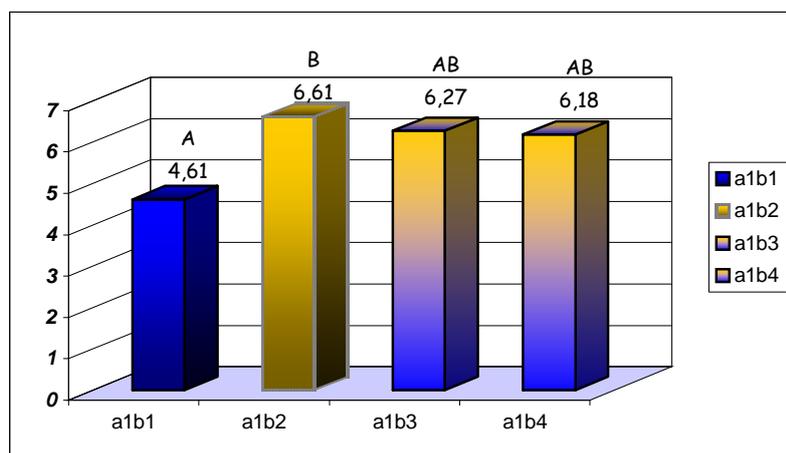
B = Niveles b_1 = Sustrato puro; b_2 = Dilución 10^{-1} ; b_3 = Dilución 10^{-2} ; b_4 = Dilución 10^{-3}

El análisis de varianza muestra diferencias altamente significativas entre los sustratos y las respectivas diluciones con un 99% de confiabilidad y un riesgo del 1%. De acuerdo con los resultados obtenidos para el factor A, *L. acidophilus* en el medio de melaza con leche en polvo inhibe el crecimiento del patógeno de manera similar a como se presentó para el medio comercial MRS.



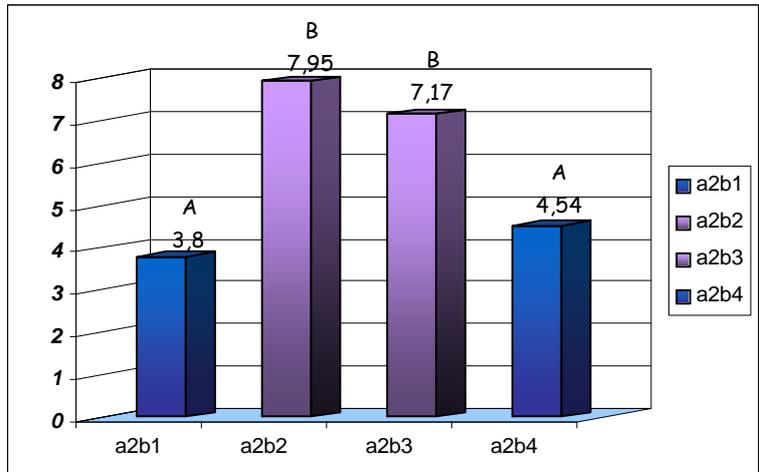
Fotografía 7. Ensayos de inhibición antagonica *In vitro*. a) *L. acidophilus* vs. *V. cholerae* b) sustrato probiótico vs. *V. cholerae* c) MRS fermentado con *L. acidophilus* vs. *V. cholerae*

Para el factor B se encontró un 99% de probabilidad de que la densidad celular contenida en los sustratos puro y sus respectivas diluciones pueden afectar el grado de inhibición del patógeno. Debido a que se presentaron diferencias significativas para la interacción de factor A por B, se realizó la prueba de Tukey mediante la cual se determinó que la inhibición del crecimiento del patógeno en 10^{-1} con una densidad celular de 35×10^6 bacteria/ ml fue la mejor con respecto al sustrato puro y a las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} . Ver gráfica 7.



Gráfica 7. Promedios de halos de inhibición antagonica del producto probiótico sobre *V cholerae* 01 OGAWA y prueba de TUKEY. Promedios con la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas.

Para el medio comercial MRS las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} con una densidad celular de 31×10^6 bacteria/ ml y 51×10^5 bacteria/ ml respectivamente inhibieron el crecimiento de *V cholerae* 01 OGAWA de mejor manera que el sustrato puro y la dilución 10^{-3} . Ver gráfica 8.



Gráfica 8. Promedios de halos de inhibición antagónica del medio MRS fermentado con *L. acidophilus* sobre *V. cholerae* 01 OGAWA y prueba de TUKEY. Promedios con la misma letra no presentan diferencias estadísticas significativas.

CONCLUSIONES

L. acidophilus, podría utilizarse como probiótico para evitar ciertos desordenes intestinales además del causado por *V. Cholerae*; ya que por el hecho de haberse obtenido de su reservorio natural, implicaría más seguridad para su adhesión, proliferación y estimulación inmune local.

Debido a la cantidad de ácido láctico, 67.3 g/L, obtenida con el microorganismo aislado y a su metabolismo homofermentativo, podría ser considerado de importancia para la producción de este metabolito a gran escala, lo que conllevaría a un mejor rendimiento y disminución del coste de producción a nivel industrial.

Los ensayos de fermentación permitieron conocer la respuesta metabólica de la bacteria *L. acidophilus* al someterse a diferentes fuentes de carbono y nitrógeno; esto se pudo evidenciar a través del análisis por ponderaciones de los diferentes parámetros en cada sustrato y se determinó que en los medios con harina de trigo, harina de soya y arroz, almidón de yuca y melaza, la mejor fuente de nitrógeno fue la leche en polvo, debido posiblemente a que este sustrato contiene un alto porcentaje de carbohidratos necesarios para la síntesis de material celular y para la producción de productos metabólicos.

El medio melaza con leche en polvo fermentado con *L. acidophilus*, podría ser considerado como un producto probiótico ya que respondió positivamente a los parámetros de fermentación, los cuales lo definen como un alimento de calidad, nutritivo, capaz de inhibir el crecimiento del patógeno *Vibrio cholerae* por contener sustancias antimicrobianas como el ácido láctico y bacteriocinas. Además este microorganismo ha sido bien estudiado por sus efectos benéficos en la salud del individuo.

Al realizar el ensayo de antagonismo *in vitro* con el sustrato puro y en dilución, se logró determinar que la cantidad de lactobacilos no afecta directamente la capacidad inhibitoria del sustrato probiótico sobre *V. cholerae*.

L. acidophilus, en el medio seleccionado inhibió el crecimiento del patógeno *V. cholerae* de mejor manera que la cepa pura.

RECOMENDACIONES

Mediante la utilización de modelos experimentales adecuados demostrar *in vivo* la efectividad del producto probiótico para prevenir enfermedad diarreica causada por *Vibrio cholerae* y así poder asegurar en un futuro su aplicación en la salud humana.

Llevar a cabo la fermentación continua en bioreactor, proporcionando condiciones controladas que aseguren el crecimiento eficaz de *L. acidophilus* mejorando el rendimiento metabólico y de esta manera lograr una mayor confiabilidad en parámetros de fermentación.

Se sugiere la utilización del medio melaza con leche en polvo para el crecimiento y desarrollo de *L. acidophilus*, y en su conjunto como producto para llevar a cabo ensayos de prevención contra patógenos intestinales como *V. cholerae*.

Se puede considerar que *L. acidophilus* podría ser importante para la obtención de ácido láctico a nivel industrial; ya que este se presenta en el sustrato elegido como principal metabolito secundario con alto rendimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Albert, M.J., Minireview: *Vibrio cholerae* 0139 Bengal. J Clin Microbiol, 1994. **32 (10)**: p. 2345 - 2349.
2. Apella, M.C.G., S.N.; Nader De Macia, M. E; Romero, N. & Oliver, G., In vitro studies on the inhibition of the growth of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. Appl Bacteriol, 1992: p. 480 - 483.
3. Aymerich, M.T.H., M & Monfort, J. M., Review: Bacteriocinogenesis lactic acid bacteria associated with meat products. Food science and technology international. 1998. **4**: p. 141 - 158.
4. _____, Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. Food science and technology international, 1998. **4**: p. 141 - 158.
5. Backer, J. M., Biotecnología: curso de prácticas de laboratorio, Edit. Acribia S. A. 1999, Zaragoza España.
6. Barney, C. E., Bacterias lácticas bacteriocinogenicas efecto sobre bacterias patógenas asociadas a alimentos, in Facultad de Salud. 1996, Universidad del Valle: Cali Colombia.
7. Basualdo, J. A. L; Torres, R., Microbiología Biomédica, Edit. Atlante. 1996, Buenos Aires.

8. Bateup Judith M., et al., Comparison of *Lactobacillus strains* with respect to bile salt hidrolase activity, colonization of the gastrointestinal tract, and growth rate of the murine host. *Applied and environmental microbiology*, 1995: p. 1147 - 1149.
9. Beliard, E. T., Propiedades antimicrobianas de las bacterias lácticas, *Microbiología Alimentaria*, Edit. Acribia S. A, 1996: Zaragoza España. p. 308 - 320.
10. Bernet, M. F. B., D; Neeser, J. R & Servin, A. L., *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured intestinal cell and inhibits cell lines and inhibits cell invasion by enterovirulent bacteria gut. *Appl Bacteriol*, 1994: p. 483 - 489.
11. Bogovic - Matijasic B. *et al.*, Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. *Applied microbiology and biotechnology*, 1998. **49**(5): p. 606 - 612.
12. Brock, T.D., *Microbiología*. 6ta ed, Edit. Prentice Hall S.A. 1993, Madrid - España.
13. Bryan, A.H.B., Charles A; Bryan, Charles G., *Bacteriology - principles and practice*. 6ta ed, Edit. B.N. inc. 1962, New York, U. S. A.
14. Burrows, William et al., *Tratado de Microbiología*. 1986.
15. CDC; OPS; OMS., *Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae**. 1994.
16. Coconnier, M; M. F; Kernels, S; Chauviere, G; Fourniat, J. & Servin, A. L., Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal CaCO-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiol. letters*, 1993: p. 299 - 306.

17. Davidson, Victor; Sittman, Donald., Biochemistry. 3 ed. Harwal Publishing. 1994. U.S.A.
18. Divo, A., Microbiología Medica. 4ta ed, ed. Trillas. 1995.
19. Dolby, V., Gut feelings reveal the true value effectiveness of probiotics. Better Nutrition Atlanta, 1996. **58**: p. 24.
20. _____ , *L. acidophilus* helps keeps your chield and yourself in balance. Better Nutrition Atlanta, 1996. **58**: p. 28.
21. Drago L. Gismondo MR, L.A., de Haen C, Gozzini L., Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. FEMS Microbiological Letters, 1997. **150**: p. 455-463.
22. Barney Medina, Carmen Elvira, Bacterias lácticas bacteriocinogenicas, efecto sobre bacterias patógenas asociadas a alimentos, Facultad de Salud. 1996, Universidad del Valle: Cali.
23. Finkelstein, R. A. Cholerae enterotoxin En: Cólera, P. 155-187. Plenum pubishy. New-York.1992.
24. Finkelstein, R.A. Cholera, *Vibrio cholerae* 01 and 0139, and other pathogenic vibrios. En: <http://129.109.112.248/microbook/cho24.htm>. medmicro chapter 24. P. 1-16. 1998.
25. Fernandez C.F. Shahani K. M & Amer, M.A., Terapeutic Role of dietari Lactobacilli and fermented dairy products. Microbiology reviews, 1987. **46**: p. 343-345.

26. Gaitan, H. A; Siñeriz, F., Microorganismos para la producción de probióticos. 2000, Santa Fe de Bogota: XII Congreso internacional de Microbiología Industrial. 122 - 128.
27. Gallaher Daniel D., *et al.*, Probiotics, cecal microflora and aberrant crypts in the rat colon. J Nutr, 1996. **126**(5): p. 1362.
28. Gibson, G.R.R., M. B, Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of probiotics. Journal of Nutrition, 1995. **125** (6): p. 1401 - 1412.
29. Ginisberg, B. D et al., Tratado de Microbiología. 3ra ed, ed. S.S. A. 1984, Barcelona España. 546 -594.
30. Gomez Gil, B., et all, A review on the use on microorganism as probiotics. Revista Latinoamericana de Microbiología, 1998. **40**: p. 166 - 172.
31. Holt, J.G., Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology, ed. William and Wilkins co. Vol. 4. 1989, Baltimor U. S. A.
32. Jawetz, E. , Manual de Microbiología Medica. 2da ed, Edit. Mundo Moderno S. A. 1966, México.
33. _____ , Microbiología Medica, Editorial Manual Moderno S. A. 1992, Mexico D. F. 143.
34. Jelle, M.S *et al.*, Starter culture with added value bactoferm F-L. 1999, Bactoferm. p. 10 - 12.
35. Kamara B. J , et al., Methods for the preparation of stabile microencapsulated lactic acid bacteria. Journal of industrial microbiology, 1988. **3**: p. 253 - 257.

36. Koneman, E. W. *et al.*, The families Vibrionaceae and "Aeromonadaceae", in Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology, Edit. Williams and Wilkins, Editor. 1997: Philadelphia. p. 339 - 348.
37. Kruglikov, V.D.T., R. I; Ryzhko, I. V; Drobotkovskaia, N. V; Kuchin, V. V; Bardykh, I. D; Pushkareva, N. D., The possibility of colonizing the intestines of white mice with *Lactobacillus acidophilus* during bacterial therapy. Zh Mikrobiol epidemiol imunobiol, 1997. 1: p. 67 - 69.
38. Lansing, M.P., John B. Harley, Donald A. Klein., Microbiología. 4ta ed, Edit. Mac Graw Hill Interamericana. 1999, España.
39. Lozano Gómez, G. L., Selección de cepas de bacterias lácticas productoras de ácido láctico L(+) a partir de diferentes fuentes naturales, Facultad de Ciencias Programa de Biología. 1997, Universidad del Valle: Cali Colombia.
40. Lucas, H., Enciclopedia Medica de la Salud, Edit. Salvat. Circulo de Lectores: Blume Art. 1997, Barcelona España.
41. Mac Faddin Jean, F., Media for isolation, cultivation, identification maintenance of medical barteria, Edit. William and Wilkins co. Vol 1. 1985, Baltimore London.
42. Madigan, M.T.M., J. M; Parker, J., Biología de los Microorganismos. 8va ed, Edit. Prentice Hall. 2000, Madrid - España.
43. MERCK, Manual de Medios de Cultivo. 1994, Darmstadt, Alemania.
44. Midolo, P.D. *et al.*, In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. Appl Bacteriology, 1995: p. 475 - 479.

45. Parada, J. L., Bacterias Lácticas: Usos en fermentaciones y como probióticos. En Congreso Internacional de Microbiología Industrial. 1999. Universidad Javeriana.
46. Pazos, A.J., Protección intestinal contra patógenos específicos a través de sustratos fermentados con *Lactobacillus casei subsp ramosus* Departamento de Microbiología. Universidad del Valle. 2000
47. Pariza, M.W., Functional foods: Technology, functionality and health benefits. Lippincott/ Williams and Wilkins. Jul. 1999.
48. Pellon, J.R.H., P. E., Ingeniería genética de las bacterias lácticas. Bacteriología de productos lácteos, 1981: p. 225 - 228.
49. Ramírez, Cristina., Manual de metodologías para el seguimiento del proceso de fermentación láctica. Universidad del Valle. Departamento de ciencia y tecnología de alimentos. 2000.
50. Rivas Muñoz, F.A., Cólera en Colombia. Camino a la endemia. En. Revista Latinoamericana de saneamiento ambiental. No 1. Santa Fe de Bogotá. Nov. 1995.
51. Roberfroid Marcel P., Alimentos funcionales. Danone newsletter. Marzo. 1999.
52. _____, B., Prebiotics and probiotics: ¿Are they functional foods? American Journal of clinical nutrition, 2000. 71: p. 1682s-1687s.
53. Rodriguez, B. S., Producción de biomasa láctica a partir de harinas de yuca, in Facultad de Ciencias Departamento de Biología. 1995, Universidad del Valle: Cali Colombia.

54. Rojas, William., Inmunología. 8va ed, Edit. CIB. 1990, Medellín Colombia.
55. Rolfe, R.D, The Role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. Journal of nutrition, 2000. **130**: p. 3965-4025.
56. Roos, N.y.K., MB., Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: A review of papers published between 1988 and 1998. American Journal Clinical Nutrition, 2000. **71**: p. 405-411.
57. Saloff-Coste, C. J., La microflora gastrointestinal y las leches fermentadas. Danone Newsletter No 14.
58. _____ , Leches fermentadas: p. 100 - 106.
59. _____ , Bacterias Acido Lácticas. Danone Newsletters,1994. **5**.
60. Saltzman, J.R. *et al.*, A randomized trial of Lactobacillus acidophilus BG2FO4 to treat lactose intolerance. Am J Clin Nutr, 1999. **69**: p. 140 - 146.
61. Sánchez, C. J., Cólera: La bacteria cusal y su toxina. Centro de Investigaciones sobre enfermedades infecciosas/ INSP. 1994.
62. Sanz, J. C. U, M; Reina, J; Cardañosa, L; Vasallo, S., Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1994.
63. Skerman, V.B.D., The Genera of Bacteria. 2da ed, Edit. Williams and Wilkins co. 1967, U. S. A. 30 - 33.

64. Smulders, F. J. M. *et al.*, Review: Lactic acid: Considerations in favour of its acceptance as a meat decontaminant. *Journal of food technology*, 1986. **21**: p. 419 - 436.
65. Stanier, Roger., The lactic acid bacteria, in *The Microbial World*, Prentice Hall Editor. 1986: New Jersey. p. 496 - 500.
66. _____, *Microbiología*. 2da ed, Edit. R.S. A. 1991, Barcelona España.
67. Symons, H., Bifidobacteria as probiotics. *Danone newsletter* No 16. Noviembre 1997.
68. Tanja Pessi, Y.S, Aulis Marttinen, Erika Isolauri., Probiotics reinforces mucosal degradation of antigens in rats: implications for therapeutic use of probiotics. *American Society for Nutritional Science*, 1998: p. 2313-2318.
69. Tannock, G.W. *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. **66 (6)**: p. 2578 - 2588.
70. Torre, S., *Biostatística, principios y procedimientos*. 2da ed.
71. Valdespino Gómez, J.L. *et al.*, Perspectivas de las vacunas contra el cólera. En: *Rev. Salud pública de México*. V35 (1) Feb. 1993
72. Valdespino Gómez, J. L. *et al.*, Epidemiología y etiología de las diarreas infecciosas. El caso de México. *Revista Latinoamericana de microbiología*, 1994. **36**: p. 307 - 324.
73. Veld, H. *et al.*, Probiotics Health claims and selection criteria. *The nutrition and food research*: p. 235-243.

74. Velez, A. H. B., R. J; Restrepo, M. J; Rojas, M. William, Enfermedades infecciosas, Fundamentos de Medicina, Edit. CIB, 1986: Medellín, Colombia. p. 549 - 551.

75. Ward, O. P., Biotecnología de la fermentación, Edit. Acribia S. A. 1989, Zaragoza España.

ANEXOS

ANEXO A. COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Medio MRS glucosa.

Sulfato de manganeso monohidratado	0.5 g	
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2 g	
Hidrógeno fosfato de potasio	2.6 g	
Peptona de caseína	10 g	
Extracto de levadura	5 g	
Citrato de amonio	2 g	
Acetato de sodio	5 g	
Glucosa	5 g	
Extracto de carne	10 g	
• Agua destilada	1000 ml	para medio líquido
• Agar bacteriológico	15 g	para medio sólido

Medio MRS, modificado con azul de anilina

En 10 ml de agua destilada se disuelven 0.2 g de azul de anilina y se autoclava a 121°C y 15 lb. de presión.

Proporción: a 1 L de MRS estéril se agrega 3 ml de azul de anilina

Medio MRS almidón

Sulfato de manganeso monohidratado	0.5 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2 g

Hidrógeno fosfato de potasio	2.6 g	
Peptona de caseína	10 g	
Extracto de levadura	5 g	
Citrato de amonio	2 g	
Acetato de sodio	5 g	
Almidón	20 g	
Extracto de carne	10 g	
• Agua destilada	1000 ml	para medio líquido
• Agar bacteriológico	15 g	para medio sólido

ANEXO B. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MICROSCÓPICAS DE LOS AISLADOS

Resultados Tinción de Gram – Individuo 1

MUESTRA	FORMA CELULAR: BACILO	
	FORMA	DISPOSICIÓN
l_1a^3	cortos	libres
l_1a^4	largos	cadena
l_1a^5	largos	cadena
l_1b^3	largos	libres
l_1b^4	largos	libres
l_1b^5	largos	cadena
l_1c^3	cortos	cadena
l_1c^4	largos	cadena
l_1c^5	largos	empalizada
l_1d^3	largos	empalizada
l_1d^4	cortos	libres
l_1d^5	largos	empalizada
l_1e^3	largos	empalizada
l_1e^4	cortos	libres
l_1e^5	cortos	libres

Resultados Tinción de Gram – Individuo 2

MUESTRA	FORMA CELULAR: BACILO	
	FORMA	DISPOSICIÓN
l_2a^3	cortos	cadena
l_2a^4	cortos	cadena
l_2a^5	cortos	empalizada
l_2b^3	largos	cadena
l_2b^4	largos	cadena
l_2b^5	largos	cadena
l_2c^3	largos	pares
l_2c^4	largos	pares
l_2c^5	largos	pares
l_2d^3	largos	cadena
l_2d^4	largos	cadena
l_2d^5	cortos	cadena
l_2e^3	largos	cadena
l_2e^4	cortos	cadena
l_2e^5	cortos	empalizada

Resultados Tinción de Gram – Individuo 3

MUESTRA	FORMA CELULAR: BACILO	
	FORMA	DISPOSICIÓN
l_3a^3	cortos	cadena
l_3a^4	largos	cadena
l_3a^5	largos	pares
l_3b^3	cortos	cadena
l_3b^4	cortos	cadena
l_3b^5	largos	cadena
l_3c^3	largos	cadena
l_3c^4	largos	cadena
l_3c^5	cortos	cadena
l_3d^3	cortos	cadena
l_3d^4	cortos	empalizada
l_3d^5	cortos	empalizada
l_3e^3	largos	empalizada
l_3e^4	largos	libres
l_3e^5	largos	libres

Resultados Tinción de Gram – Individuo 4

MUESTRA	FORMA CELULAR: BACILO	
	FORMA	DISPOSICIÓN
l_4a^3	largos	cadena
l_4a^4	largos	cadena
l_4a^5	largos	cadena
l_4b^3	cortos	empalizada
l_4b^4	largos	cadena
l_4b^5	cortos	empalizada
l_4c^3	cortos	empalizada
l_4c^4	cortos	cadena
l_4c^5	cortos	cadena
l_4d^3	largos	cadena
l_4d^4	largos	cadena
l_4d^5	largos	cadena
l_4e^3	largos	empalizada
l_4e^4	cortos	cadena
l_4e^5	cortos	libres

Resultados Tinción de Gram – Individuo 5

MUESTRA	FORMA CELULAR: BACILO	
	FORMA	DISPOSICIÓN
I ₅ a ³	cortos	cadena
I ₅ a ⁴	cortos	cadena
I ₅ a ⁵	cortos	cadena
I ₅ b ³	largos	libres
I ₅ b ⁴	largos	libres
I ₅ b ⁵	cortos	libres
I ₅ c ³	cortos	libres
I ₅ c ⁴	largos	cadena
I ₅ c ⁵	largos	cadena
I ₅ d ³	largos	libres
I ₅ d ⁴	largos	cadena
I ₅ d ⁵	largos	cadena
I ₅ e ³	cortos	libres
I ₅ e ⁴	largos	cadena
I ₅ e ⁵	cortos	cadena

ANEXO C. RESULTADOS PRUEBAS API CH 50



410014R

REF. :

1 3 0 1 0 2

Origine / Source / Herkunft / Origen / Prelievo : Materia fecal



0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49			
48	-	-	-	-	V	-	-	-	-	+	+	+	+	V	-	-	-	+	V	-	-	V	-	-	+	V	V	-	+	-	-	V	+	V	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-		
COSE																																																				
	Control	Glyceral	Erythritol	D-Arabinonol	L-Arabinose	Ribose	D-Xylose	L-Xylose	Adonitol	3-Methylxypose	Galactose	D-Glucose	D-Fructose	D-Mannose	L-Sorbitol	Phannose	Dulcitol	Inositol	Mannitol	Sorbitol	D-Methyl-D-mannoside	D-Methyl-D-glucoside	N-Acetyl-glucosamine	Amygdaline	Arbutine	Epsuline	Gaitarine	Cellobiose	Vallose	Lactose	Melittose	Saccharose	Trehalose	Inulina	Melzitose	D-Raffinose	Amidon	Glycogena	Xylitol	D-Gentiobiose	D-Turanose	D-Lyxose	D-Tagatose	D-Fructose	L-Fucose	D-Arabitol	L-Arabinol	Gluconate	2-celboglucanate			
Milieu d'inoculation / Inoculation medium / Inokulationsmedium / Tenorio d'inoculo / Medio de inoculación CHL MEDIUM														Autres tests / Other tests / Weitere Tests / Altri tests / Otros tests														Ident. : Lactobacillus acidophilus																								
Température d'incubation / incubation temperature / Inkubationstemperatur / Temperatura di incubazione / Temperatura de incubación : 36°C																																																				

ANEXO D. COMPOSICIÓN BROMATOLOGICA

HARINA DE TRIGO COMERCIAL

- Fortificada con vitaminas B₁, B₂, B₃, B₉, hierro

- Información nutricional : por cada porción (100 g) de harina

Proteína %	12.00
Carbohidratos %	71.00
Grasa %	0.90
Fibra cruda %	0.70

- Miligramos por cada 100g de harina

Calorías	361.00
Calcio	39.00
Fósforo	150.00
Hierro	4.50
Tiamina (Vitamina B ₁)	0.60
Riboflavina (Vitamina B ₂)	0.40
Niacina (Vitamina B ₃)	5.50
Ácido fólico (Vitamina B ₉)	0.154

- Ingredientes: 100 % trigo de primavera

- **Fuente:** Harinera del Valle S.A.

HARINA DE PLATANO

- Contenido alimenticio en 100 g

Calorías	364
----------	-----

Proteínas	5.1 g
Grasa	1.5 g
Fibra	1.4 g
Vitamina A	327 V.I
Riboflavina	0.10 mg
Tiamina	0.09 mg
Vitamina C	170 mg
Minerales: Ca, P, Fe	122 mg

- **Fuente:** Pampa Ltda.

HARINA DE SOYA Y ARROZ

- Harina de Arroz

Harina de Soya

Vitamina A, B₁ y B₂

Tiamina

Carbonato de Calcio

Sulfato ferroso

- Contenido para 42g:

Proteínas	8.0640g
Calcio	99.5400mg
Hierro	5.8832g
Tiamina	0.7644mg
Riboflavina	0.4578mg

Niacina	5.6280mg
Vitamina A	2100 V.I
Calorías	139.02 cal

Fuente: Pampa LTDA.

ALMIDON Y HARINA DE YUCA

ANALISIS	1, Harinade Yuca		2.Almidónde Yuca	
	% B.P.S.	% B.S.	% B.P.S	% B.S.
Humedad	4,16		11,53	
Materia seca	95,84		88,47	
Ceniza	2,82	2,94	0,27	0,31
Extracto etéreo	0,71	0,74	0,02	0,02
Fibra cruda	2,08	2,17	0,45	0,51
Proteína	2,96	3,08	0,65	0,73
E.N.N.	87,27	91,06	87,08	98,43
Calcio	0,01	0,01	N.D.	
Fósforo	0,14	0,15	0,01	0,01
Magnesio	0,06	0,06	N.D.	

ANEXO E. DETERMINACION DE PROTEINAS

Método de Lowry

Reactivos:

- Solución A: 0.5g de tartrato de sodio y potasio, 2.5g de carbonato de sodio, 125ml de hidróxido de sodio 1N, 125ml de agua destilada.
- Solución B: 2g de tartrato de sodio y potasio, 1g de sulfato de cobre, 10ml de hidróxido de sodio 1N, 90ml de agua destilada .
- Solución C: Reactivo de Folin-Ciocalteu en agua destilada en proporción 1:14
- Solución estándar de seroalbúmina bovina: 15mg en 50ml de agua destilada; con una concentración final de 300mg/ml
- Curva estándar: De 0 a 300mg/l, a partir de una serie de tubos de ensayo con 0,1,2,4,8 y 7.5ml de solución seroalbúmina bovina y se completa a 10ml con agua destilada

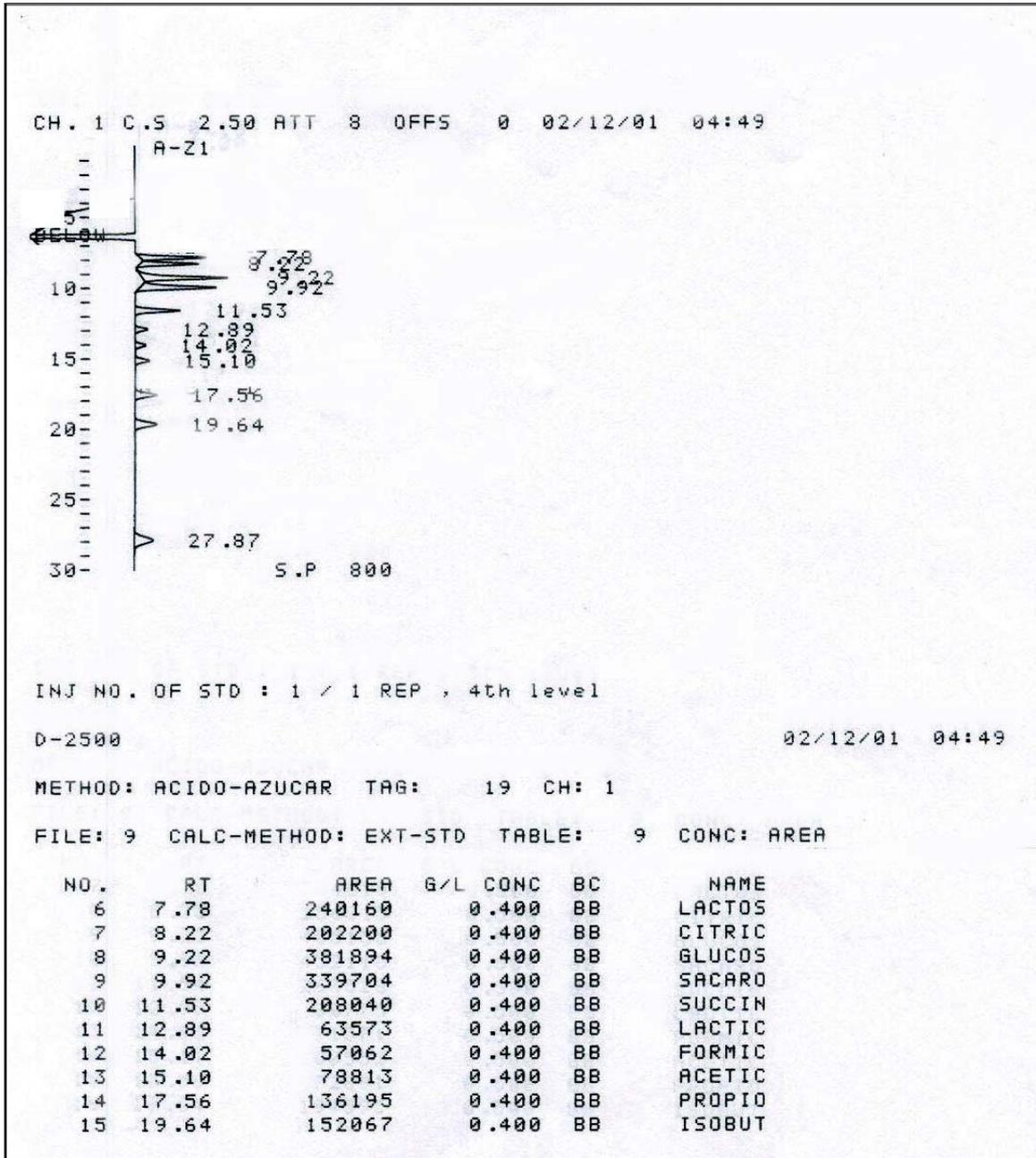
Método:

- A cada tubo se adiciona 0.5ml de NaOH 2N
- Baño de ebullición durante 10 minutos
- Enfriamiento en baño de hielo por 5 minutos
- Se adiciona 0.5ml H₂SO₄ 2.6N
- Se agrega 0.9ml de solución A
- Baño Maria a 50°C por 10 minutos
- Enfriar por 3 minutos

- Adicionar 0.1ml de solución B
 - Llevar por 10 minutos a oscuridad
 - Adicionar 3ml de solución C
 - Baño Maria a 50°C por 10 minutos
 - Enfriar por 3 minutos
 - Realizar lectura de la densidad óptica (DO) a 750nm comparando con un blanco
-
- El blanco corresponde a 1ml de agua destilada mas todas las soluciones del proceso anterior.

ANEXO F. CURVA DE CALIBRACIÓN Y CONDICIONES DE MANEJO PARA EL HPLC

Curva de Calibración



Condiciones para el manejo del HPLC

- Preparación de 1 L de solvente, que consta de agua destilada con ácido sulfúrico puro al 96%; con ajuste de pH a 1.5, previamente sonicado durante 30 minutos.
- Encendido de la bomba (LDC-3200 Constametric) y purga del equipo con paso de solvente a través de la columna.
- Control de flujo 0.6ml/mín; temperatura 65°C
- Programación del integrador
- Inyección de muestras (20µl); con microjeringa de 100µl
- Lectura