

EFFECTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD
PROBIÓTICA DE *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014® BAJO CONDICIONES
GASTROINTESTINALES SIMULADAS EN *Escherichia coli* O157:H7 ATCC
43888®

MEHILI DAYANA SINSAJOA TEPUD
MÓNICA LORENA NARVÁEZ RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
PASTO- COLOMBIA
2019

EFFECTO DE LA MICROENCAPSULACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD
PROBIÓTICA DE *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014® BAJO CONDICIONES
GASTROINTESTINALES SIMULADAS EN *Escherichia coli* O157:H7 ATCC
43888®

MEHILI DAYANA SINSAJOA TEPUD
MÓNICA LORENA NARVÁEZ RODRÍGUEZ

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Zootecnista

Director
HENRY ARMANDO JURADO GÁMEZ
Zoot. Esp. M.Sc. Ph.D

Codirectora
IVONNE CATALINA FAJARDO ARGOTI
Zoot.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
PASTO- COLOMBIA
2019

**“Las ideas y conclusiones aportadas en este trabajo de grado son
responsabilidad exclusiva de los 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

HENRY JURADO GÁMEZ.
Zoot. Esp. M.Sc. Ph.D
Director

IVONNE CATALINA FAJARDO ARGOTI.
Zoot.
Codirectora

VERÓNICA FERNANDA JARRÍN JARRÍN.
Ing. A.I. M.Sc
Jurado Delegado

KATIA LUZ ANDREA BENAVIDES ROMO.
MV. ESP
Jurado

San Juan de Pasto, enero de 2019

Dedicatoria

Dedico este trabajo principalmente a mi padre Eduardo Sinsajoa mi soporte, por apoyarme incondicionalmente y creer en mí, a mi madre Doris Tepud por impulsar el inicio de mi formación profesional y por su motivación, a mí hermano Nixon y mi sobrina Sofía por motivarme a ser mejor, y a toda mi familia que me ha alentado para continuar.

A un buen amigo cuya comprensión fue esencial y al cual le debo mucha gratitud, desde algún lugar del universo su esencia siempre se mantiene presente.

A mi amiga Monita por escucharme y brindarme sus sabios consejos.

A mi compañero Alberth por su apreciable compañía y constante respaldo.

A mi compañera Mónica Narváez por ofrecerme la oportunidad de realizar este trabajo junto a ella, por su gran esfuerzo, dedicación y paciencia en este proceso. Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

Mehili Dayana Sinsajoa Tepud

Dedicatoria

Dedico mi trabajo de grado a mis queridos padres Wilson Narváez y Sobeida Rodríguez, quienes a pesar de todas las dificultades para alcanzar mi formación como profesional, han sido en mí el reflejo de voluntad, tenacidad e incansable lucha para sacarme adelante durante todo este tiempo. A mis abuelos paternos y maternos, que con su cariño, apoyo incondicional y confianza, me inculcaron la fe tanto en mí como en Dios para creer en lo que hago y soy como persona. A mi inseparable y cómplice hermana Verónica, a su esposo y mi adorable sobrino Rafael que son un ejemplo a seguir, pues me enseñaron a no desfallecer ante las adversidades y a quienes admiro por su dureza y tenacidad, llenándome de aliento cada día durante el tiempo en que vivimos juntos. A mi amado Jhonathan, por su paciencia, comprensión y acompañamiento ilimitado, quien además me brinda lo más preciado que es el amor de pareja, demostrándome su valor para salir adelante juntos. A mi compañera Mehili Sinsajoa por su acompañamiento constante durante este proceso. Y en general a mi numerosa familia quien ha demostrado que la unión es el elemento indispensable para salir adelante.

Mónica Lorena Narváez Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Con el más sincero aprecio, admiración y gratitud por su colaboración, los autores agradecen a:

Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI),
Universidad de Nariño

HENRY JURADO GÁMEZ, Zootecnista, Esp., M. Sc., Ph.D.

CATALINA FAJARDO ARGOTI. Zootecnista

DAVID EDUARDO ARTURO PERDOMO, Químico, Laboratorio de Cromatografía,
Universidad de Nariño.

JAIRO ESPAÑA, Zootecnista, Técnico Laboratorios de Ciencias Pecuarias,
Universidad de Nariño.

JUAN PABLO JIMÉNEZ MORA, Químico, Laboratorio de Cromatografía,
Universidad de Nariño.

NANCY NINFA GALINDEZ SANTANDER, Bacterióloga, Profesional de
Laboratorio de Microbiología, Universidad de Nariño.

DANNY ARÉVALO, Ingeniero agroindustrial, grupo de Tecnologías Emergentes en
Agroindustria (TEA).

JHON JAIRO PARREÑO SALAS, Zootecnista.

LUÍS ALFONSO SOLARTE PORTILLA, Zootecnista, Esp. Secretario Académico

Facultad de Ciencias Pecuarias. Programa de Zootecnia de la Universidad de
Nariño. Laboratorio de Ciencias Pecuarias.

Fisiología Etología Animal y Procesos Biotecnológicos aplicados a la producción
animal. FISE-PROBIOTEC

Laboratorios Especializados Universidad De Nariño.

A todas las personas que de una u otra manera nos orientaron y sirvieron de
apoyo en todo momento, sin la ayuda de estas personas no hubiéramos podido
lograrlo.

CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	23
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GENERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MARCO TEÓRICO	28
4.1 LOS PROBIÓTICOS	28
4.3.1 Generalidades	32
4.3.2 Taxonomía y morfología	33
4.3.3 Fisiología	34
4.3.4 Bacteriocinas en <i>Lactobacillus plantarum</i>	34
4.3.5 <i>Lactobacillus plantarum</i> en la producción de alimentos.	35
4.3.6 Efecto de <i>Lactobacillus plantarum</i> sobre bacterias patógenas	36
4.4 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAS)	37
4.5 <i>Escherichia coli</i>	38
4.5.1 Generalidades	38
4.5.2 Taxonomía y morfología	39
4.5.3 Fisiología	40
4.5.4 Patogenia	41
4.5.5 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	42
4.5.6 <i>E. coli</i> O157:H7 en alimentos	44
4.5.7 Resistencia en antibióticos, mecanismos de resistencia	45
4.6.1 Microencapsulación de <i>Lactobacillus plantarum</i>	47
4.6.2 Técnica secado por aspersión (Spray Drying)	47
4.6.3 Inulina	48
4.6.4 Maltodextrina	48
5. DISEÑO METODOLÓGICO	50
5.2.1 Materiales	50
5.2.2 Vidriería	50
5.2.3 Reactivos	51
5.2.4 Equipos	51
5.3.1 Reconstitución	51
5.3.2 Siembra	52
5.3.3 Conservación	52
5.4.1 Reconstitución	52
5.4.2 Siembra	52
5.4.3 Conservación	52
5.4.4 Cultivo del inóculo de <i>Lactobacillus plantarum</i>	52

5.5 PODER DE INHIBICIÓN FRENTE A BACTERIA PATÓGENA Y COMPARACIÓN FRENTE A ANTIBIÓTICOS	54
5.5.1 Ensayos de inhibición <i>in vitro</i> y determinación de biocinas.	54
5.6 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN	55
5.6.1 Características de la cinética	55
5.6.2 Conteo de microorganismos viables en placa UFC/ 150 µL	56
5.6.3 Determinación de pH	56
5.6.4 Determinación de proteínas método de Lowry modificado	56
5.6.5 Determinación de consumo de azúcares totales.....	57
5.6.6 Determinación de producción de ácido láctico	58
5.6.7 Evaluación de la producción de biomasa	58
5.6.8 Identificación de Péptidos del Sobrenadante por HPLC – DAD.....	59
5.6.9 Identificación de aminoácidos del sobrenadante de la cepa láctica y la cepa patógena por HPLC-DAD	59
5.7 RESISTENCIA A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA.....	59
5.8 PRODUCCIÓN DE GAS	60
5.9 ACTIVIDAD DE CATALASA.....	60
5.10 MICROENCAPSULACIÓN DE <i>Lactobacillus plantarum</i>	60
5.10.1 Obtención de biomasa microbiana.....	60
5.10.2 Microencapsulación por la técnica spray drying (secado por aspersión) de <i>Lactobacillus plantarum</i>	61
5.11 ESTUDIO DEL MICROENCAPSULADO DE <i>Lactobacillus plantarum</i>	61
5.11.1 Estudio de Supervivencia y estabilidad de <i>L. plantarum</i> microencapsulado	61
5.11.1.1 Viabilidad.....	61
5.11.1.2 Eficiencia de la Microencapsulación de <i>Lactobacillus plantarum</i>	62
5.11.2 Caracterización Física	62
5.11.2.1 Humedad	63
5.11.2.2 Actividad de agua.....	63
5.11.2.3 Solubilidad	63
5.11.2.4 Humectabilidad	64
5.11.3 Caracterización estructural.....	64
5.11.3.1 Morfología y tamaño de las microcápsulas.....	64
5.11.4 Exposición a condiciones gastrointestinales simuladas	65
5.12 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	65
5.12.1 Análisis estadístico.....	65
5.12.2 Variables Evaluadas.	66
6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	68
6.1 DESCRIPCIÓN DE <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7	68
6.1.1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	68
6.1.2 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	69
6.1.3 Producción de gas y actividad de catalasa de <i>Lactobacillus plantarum</i>	69
6.2 EVALUACIÓN PODER DE INHIBICIÓN ANTIMICROBIANOS SOBRE <i>L. plantarum</i> y <i>Escherichia coli</i> O157:H7	70

6.2.1 Prueba de susceptibilidad de agentes antimicrobianos frente a <i>Lactobacillus plantarum</i> .	70
6.2.2 Prueba de susceptibilidad de agentes microbianos frente a <i>Escherichia coli</i> O157:H7.	73
6.3 ENSAYOS DE INHIBICIÓN <i>in vitro</i> DE <i>Lactobacillus plantarum</i> FRENTE A <i>Escherichia coli</i> O157:H7	76
6.3.1 Ensayo inhibición por disco de agar impregnado de <i>L. plantarum</i> frente a <i>E. coli</i> O157:H7	76
6.3.2 Ensayos de la acción inhibitoria del sobrenadante de <i>Lactobacillus plantarum</i> frente a <i>Escherichia coli</i> O157:H7	77
6.4 SUSCEPTIBILIDAD A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA	81
6.4.1 Viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> a 37°C y 45°C	81
6.5 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN	83
6.5.1 Determinación de pH	89
6.5.2 Determinación del porcentaje de ácido láctico	90
6.5.3 Determinación consumo de azúcares totales.	91
6.5.4 Determinación de proteínas <i>L. plantarum</i> .	92
6.7 IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DEL SOBRENADANTE POR HPLC – DAD en <i>L. plantarum</i> y <i>E. coli</i> O157:H7	93
6.7 IDENTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS DEL SOBRENADANTE DE LA CEPA LÁCTICA <i>Lactobacillus plantarum</i> Y LA CEPA PATÓGENA <i>Escherichia coli</i> O157:H7 POR HPLC-DAD	94
6.8 MICROENCAPSULACIÓN DE <i>Lactobacillus plantarum</i>	98
6.8.1 Estudio de supervivencia y estabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> microencapsulación por spray drying.	98
6.8.1.1 Viabilidad.	98
6.8.1.2 Eficiencia.	99
6.8.2 Caracterización física de <i>Lactobacillus plantarum</i> microencapsulado.	100
6.8.2.1 Humedad relativa	100
6.8.2.2 Actividad de agua <i>A_w</i>	101
6.8.2.3 Humectabilidad	102
6.8.2.4 Solubilidad.	103
6.8.3 Caracterización estructural	103
6.8.3.1 Morfología y tamaño de las microcápsulas.	103
6.8.4 Ensayos de susceptibilidad de <i>L. plantarum</i> microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas.	106
6.8.4.1 Viabilidad de <i>L. plantarum</i> microencapsulado a pH 3,0 durante 24 horas	107
6.8.4.2 Susceptibilidades en diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina a pH 5,5.	108
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	111

7.1 CONCLUSIONES	111
7.2 RECOMENDACIONES	112
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica <i>Lactobacillus plantarum</i>	33
Cuadro 2. Clasificación taxonómica <i>Escherichia coli</i>	39
Cuadro 3. Brotes asociados con <i>E. coli</i> O157:H7 por causas alimentarias.....	42
Cuadro 4. Composición medio de cultivo MRS.	55
Cuadro 5. Producción de gas y actividad de catalasa <i>Lactobacillus plantarum</i>	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diseño de medidas repetidas para la determinación del medio de cultivo	56
Tabla 2. Susceptibilidad de agentes microbianos frente a <i>L. plantarum</i>	71
Tabla 3. Susceptibilidad de agentes microbianos frente a <i>E. coli</i> O157:H7	73
Tabla 4. Inhibición por disco de agar impregnado de <i>L. plantarum</i> en <i>E. Coli</i> O157:H7	76
Tabla 5. Concentración y halos de inhibición producidos por el sobrenadante de <i>Lactobacillus plantarum</i> frente a <i>Escherichia coli</i> O157:H7	79
Tabla 6. Viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> en medio MRS a temperaturas de 37°C Y 45°C (UFC/150 µL).....	82
Tabla 7. Datos cinéticos del crecimiento bacteriano de <i>Lactobacillus plantarum</i> en el medio MRS	83
Tabla 8. Composición teórica del caldo MRS	84
Tabla 9. Efecto de la biomasa Ln (UFC/150 µL) sobre el tiempo del medio del cultivo <i>Lactobacillus plantarum</i>	87
Tabla 10. Regresiones de pH, % ácido láctico, consumo de azúcares y producción de proteína comparados con la variable tiempo de <i>L. plantarum</i>	93
Tabla 11. Identificación de aminoácidos de <i>Lactobacillus plantarum</i>	95
Tabla 12. Identificación de aminoácidos de <i>Escherichia coli</i> O157:H7	95
Tabla 13. Viabilidad y eficiencia de <i>L. plantarum</i> microencapsulado	100
Tabla 14. Valores caracterización física de <i>L. plantarum</i> microencapsulado.....	100
Tabla 15. Viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> microencapsulado a pH 3,0 durante 24 horas.....	107
Tabla 16. Viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> a diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina.....	108
Tabla 17. Antibióticos, sigla y cantidad	133
Tabla 18. Lectura de absorbancia para diferentes concentraciones de azúcar mg/L.....	138
Tabla 19. Regresión cuadrática consumo de azucares para <i>L. plantarum</i>	140
Tabla 20. Regresión cuadrática producción de proteína para <i>L. plantarum</i>	140
Tabla 21. Regresión cuadrática pH para <i>L. plantarum</i>	141
Tabla 22. Regresión lineal % ácido láctico para <i>L. plantarum</i>	141
Tabla 23. Medidas repetidas en el tiempo <i>L. plantarum</i>	142
Tabla 24. Correlación entre variables cinéticas	143

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A: <i>Lactobacillus plantarum</i> morfología microscópica; B: morfología macroscópica en agar MRS.....	68
Figura 2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7 morfología macroscópica.....	69
Figura 3. Susceptibilidad frente a antimicrobianos de <i>Lactobacillus plantarum</i> (agar MRS con azul de anilina).....	72
Figura 4. Susceptibilidad frente a antimicrobianos de <i>Escherichia coli</i> O157:H7 (agar MRS)	74
Figura 5. Inhibición por disco de agar con azul de anilina impregnado de <i>L. plantarum</i> frente a <i>E. coli</i> O157:H7	78
Figura 6. Crecimiento de <i>L. plantarum</i> UFC/150µL en medio MRS	84
Figura 7. Crecimiento (UFC/150µL) de <i>Lactobacillus plantarum</i> en medio MRS...	87
Figura 8. Cromatograma de <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>L. plantarum</i>	94
Figura 9. Microfotografía por microscopia electrónica de barrido (SEM) cápsulas de <i>L. plantarum</i> para observar morfología	104
Figura 10. Microfotografía electrónica de barrido (SEM) <i>L. plantarum</i> tamaño microcápsula.....	105

LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Instrucciones de uso para microorganismos KWIK-STIK™	130
Anexo B. Instrucciones de uso para microorganismos <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC® 43888™	131
Anexo C. Antibiograma por el método de Kirby – Bauer	131
Anexo D. Ensayo de susceptibilidad de agentes antimicrobianos	132
Anexo E. Ensayos de inhibición <i>in vitro</i>	133
Anexo F. Método de Antrona o Dubois	135
Anexo G. Curva patrón para determinación de azúcares totales (método de antrona)	137
Anexo H. Determinación de Proteínas “método Lowry” modificado	138
Anexo I. Curva patrón proteínas totales	139
Anexo J. Regresiones de la cinética comparadas con la variable tiempo	140
Anexo K. Medidas repetidas en el tiempo <i>L. plantarum</i> en medio MRS	142

GLOSARIO

BACTERIOCINA: son sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica y activas, sintetizados por algunas bacterias ácido láctico y presentan un amplio potencial como conservadores para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, generalmente patógenos.

BIOMASA: masa celular que puede ser medida o estimada mediante métodos directos e indirectos.

CATALASA: enzima del grupo de las cromo proteínas porfirínicas, cuya molécula contiene ion férrico y que interviene en la descomposición del agua oxigenada. Su acción catalítica es extraordinariamente rápida; existe en los tejidos vegetales y animales y también en algunos géneros de bacterias.

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

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.

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

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

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

HUÉSPED: cuerpo de un organismo que aloja a otro.

HUMECTABILIDAD: tendencia que tiene un material para hacer que los líquidos se extiendan sobre su superficie.

INHIBICIÓN: disminución de la actividad biológica de un microorganismo por la acción de un agente inhibidor.

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

MICROBIOTA: población homogénea o heterogénea de microorganismos asociados con un tejido o estructura particular.

MICROENCAPSULACIÓN: método mediante el cual pequeñas partículas, gotas de líquido o gases se envuelven con un material de cobertura para dar lugar a microcápsulas o micropartículas selladas que pueden liberar su contenido a velocidades controladas bajo condiciones específicas.

PATÓGENO: microorganismo o material que produce un malestar enfermedad o muerte.

PROBIÓTICOS: microorganismos vivos que, al ser agregados como suplemento en la dieta, afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino.

RUTA DE EMBDEN MEYERHOFF PARNAS: vía que degrada la glucosa a piruvato; en la fase de seis carbonos convierte la glucosa en fructosa 1,6 bifosfato y en la fase de tres carbonos produce ATP, transformándose el gliceraldehído 3-fosfato en piruvato.

SOLUBILIDAD: medida de la capacidad de una sustancia para disolverse en otra.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: tiempo requerido por un microorganismo o población microbiana para que duplique su número.

TINCIÓN DE GRAM: método bacteriológico que permite designar dos grupos morfológicos distintos de bacterias en (Gram negativas) y (Gram positivas). Después de la coloración de contraste las células Gram negativas son rojas, mientras que las Gram positivas permanecen azules.

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC): unidad de medida estimada para microorganismos la cual expresa el número de microorganismos viables que pueden duplicarse hasta formar colonias.

VIABILIDAD: en microbiología se define como la capacidad de un microorganismo para multiplicarse en un medio formando colonias.

RESUMEN

Las enfermedades de transmisión alimentaria son un problema sanitario común en el mundo, especialmente las de origen microbiano, como *Escherichia coli* O157:H7 causante de gran cantidad de intoxicaciones alimentarias, y considerada como un problema de salud pública.

Dentro de esta perspectiva, el tratamiento con antibióticos es empleado para inhibir el crecimiento de cepas patógenas en animales destinados para el consumo humano. De ahí que se puedan encontrar residuos de antibióticos en los alimentos de origen animal, lo que resulta indeseable y nocivo para el consumidor. Por lo que en la búsqueda de obtener alimentos inocuos para el consumo humano, se ha optado por la utilización de probióticos como una alternativa al uso de antibióticos en la alimentación animal. Puesto que, los probióticos han demostrado su capacidad inhibitoria sobre bacterias patógenas, sin embargo, su viabilidad puede ser afectada por condiciones ambientales y gastrointestinales. De ahí que, una alternativa para mitigar estos efectos es la microencapsulación, en la que se debe tener en cuenta diversos factores físicos como la temperatura, humedad y agitación, así como el material microencapsulante además de las condiciones necesarias de resistencia al proceso de encapsulación, para no afectar la viabilidad de la bacteria. Por su parte el secado por aspersión es una de las técnicas de microencapsulación que ayuda a evitar el daño térmico a los microorganismos después del secado.

En este sentido, se evaluó la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum*, frente a la bacteria patógena *Escherichia coli* O157:H7, adicionalmente se evaluó la cinética de fermentación del probiótico en un medio discontinuo. Además de determinar la viabilidad probiótica de la bacteria ácido láctica (BAL) microencapsulada bajo condiciones gastrointestinales simuladas.

Teniendo en cuenta el planteamiento anterior Inicialmente se midió la susceptibilidad a antimicrobianos de *L. plantarum* y *E. coli* O157:H7 donde las dos fueron susceptibles a cefotaxina, y ciprofloxacina. También, se evaluó el efecto inhibitorio de *L. plantarum* y su sobrenadante frente a *E. coli* O157:H7, la mayor inhibición presentó un halo de 8mm. Adicionalmente, mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC-DAD) se determinó péptidos y aminoácidos en el sobrenadante de las dos bacterias, el péptido correspondió a la secuencia VAL-TIR-VAL siendo tirosina el aminoácido predominante en las dos bacterias. Posteriormente, con el propósito de evaluar el crecimiento de *L. plantarum* se realizó su cinética de fermentación, presentando una fase exponencial a las 12:00 h con un crecimiento de 27,39 Ln UFC/150 µl. Adicionalmente, se evaluó su crecimiento a dos temperaturas (37°C y 45°C), su mayor crecimiento fue a 45°C con 3.0×10^{12} UFC/ 150 µL. Finalmente, a *L. plantarum* microencapsulada se

evaluó viabilidad, eficiencia de la microencapsulación, propiedades físicas y caracterización estructural por microscopia electrónica de barrido (SEM). Humedad relativa y actividad de agua (A_w) se midieron a los 37 días de almacenada, su humedad relativa fue 7.79% y A_w 0.400, la eficiencia fue del 46%, solubilidad 96%, humectabilidad 1:56 minutos y su viabilidad del 58%. Se valoró el efecto de la microencapsulación sobre la viabilidad probiótica de *L. plantarum* bajo condiciones gastrointestinales simuladas de pH 3.0, sales biliares al 0,3% y 1% a y bilis bovina al 0,5% a pH 5,5 por 24:00h, alcanzando crecimientos significativos de $3,0 \times 10^9$ UFC/150 μ l a pH 5.5 en bilis bovina al 0.5%.

Palabras clave: Inocuidad alimentaria, salud pública y animal

ABSTRACT

Foodborne diseases are a common health problem in the world, especially those of microbial origin, such as *Escherichia coli* O157: H7, which causes a large amount of food poisoning and is considered a public health problem.

Within this perspective, antibiotic treatment is used to inhibit the growth of pathogenic strains in animals destined for human consumption. Hence, residues of antibiotics can be found in foods of animal origin, which is undesirable and harmful to the consumer. Therefore, in the search to obtain safe food for human consumption, we have opted for the use of probiotics as an alternative to the use of antibiotics in animal feed. Since, probiotics have demonstrated their inhibitory capacity on pathogenic bacteria, however, their viability can be affected by environmental and gastrointestinal conditions. Hence, an alternative to mitigate these effects is microencapsulation, which must take into account various physical factors such as temperature, humidity and agitation, as well as the microencapsulating material in addition to the necessary conditions of resistance to the encapsulation process. So as not to affect the viability of the bacteria. For its part, spray drying is one of the microencapsulation techniques that helps prevent thermal damage to microorganisms after drying.

In this sense, the probiotic action of *Lactobacillus plantarum* was evaluated against the pathogenic bacterium *Escherichia coli* O157: H7, in addition the probiotic fermentation kinetics was evaluated in a discontinuous medium. In addition to determining the probiotic viability of the microencapsulated lactic acid (BAL) battery under simulated gastrointestinal conditions.

Taking into account the previous approach Initially the antimicrobial susceptibility of *L. plantarum* and *E. coli* O157: H7 were measured, where both were susceptible to cefotaxin, and ciprofloxacin. The inhibitory effect of *L. plantarum* and its supernatant against *E. coli* O157: H7 was also evaluated, the greater inhibition has presented an 8 mm halo. In addition, by means of High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC-DAD) the peptides and amino acids were determined in the supernatant of the two bacteria, the peptide corresponded to the VAL-TIR-VAL sequence, tyrosine being the predominant amino acid in the two bacteria. Subsequently, in order to evaluate the growth of *L. plantarum*, its fermentation kinetics was performed, presenting an exponential phase at 12:00 h with a growth of 27.39 Ln CFU / 150 µl. In addition, its growth was evaluated at two temperatures (38 ° C and 45 ° C), its highest growth was at 45 ° C with 3.0x10¹² CFU / 150 µL. Finally, a microencapsulated *L. plantarum* was evaluated viability, efficiency of microencapsulation, physical properties and structural characterization by scanning electron microscopy (SEM). Relative humidity and water activity (Aw) was measured at 37 days of storage, relative humidity was 7.79% and Aw 0.400,

efficiency was 46%, solubility 96%, wettability 1:56 minutes and its viability 58% . The effect of microencapsulation on the probiotic viability of *L. plantarum* was evaluated under simulated gastrointestinal conditions of pH 3.0, bile salts at 0.3% and 1% and 0.5% bovine bile at pH 5.5 per 24: 00h, reaching significant growths of 3.0×10^9 UFC / 150 μ l at pH 5.5 in bovine bile at 0.5%.

Key words: Food safety, public and animal health

INTRODUCCIÓN

En el mundo cada año, miles de personas enferman a causa de la bacteria *Escherichia coli* de serotipo patógeno con cuadros diarreicos y complicaciones bastante serias para el huésped, en algunos casos causando hasta la muerte. El foco principal de esta bacteria son las heces de algunos animales, como también lácteos, cárnicos y verduras contaminados con heces, así como la mala manipulación de los alimentos dada por la contaminación cruzada.

Una de las estrategias más comunes para controlar las enfermedades causadas por el serotipo patógeno de *E. coli* es el uso de antibióticos, que inhiben el desarrollo de este microorganismo, sin embargo esta medida ha perdido eficacia debido a la incorrecta utilización y dosificación de estos, que han provocado un aumento en la resistencia de cepas bacterianas frente los antimicrobianos, induciendo a una mayor patogenicidad afectando la salud del huésped (humana y animal).

De manera que una estrategia funcional puede ser la utilización de sustancias bactericidas diferentes a los antibióticos. En este caso se resalta la importancia de las bacterias ácido lácticas (BAL), que además de las características probióticas que benefician al huésped, poseen una capacidad inhibitoria frente a bacterias entéricas patogénicas. Se ha demostrado que diferentes géneros de *Lactobacillus* sp poseen esta capacidad.

En este sentido, *Lactobacillus plantarum* constituye una alternativa al uso de antibióticos para control de patógenos y de las toxiinfecciones causadas por ellos. Sin embargo, las condiciones medioambientales y gastrointestinales disminuyen la viabilidad y limitan la acción de los probióticos como microorganismos benéficos, de esta manera una solución ante esta problemática es la implementación de nuevas tecnologías como la microencapsulación que favorecen la viabilidad y la acción de los probióticos en el tracto gastrointestinal.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Los distintos brotes en el mundo han ocasionado que se considere la cepa de *Escherichia coli* O157:H7 como un problema de salud pública ya que para que se propague a nivel intestinal Margall et al¹ señala que tan solo es necesario 10^3 y 10^2 bacterias para ser una dosis infectante. *E. coli* O157:H7 causa intoxicación alimentaria al producir una enterotoxina denominada verotoxina que provoca diarreas hemorrágicas y en casos más severos síndrome hemolítico-urémico (SHU) o púrpura trombótica trombocitopénica (PTT).

Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS)², resalta que el reservorio principal de esta bacteria son animales destinados al consumo humano y mascotas, al mismo tiempo enfatizan que la principal fuente para la transmisión de esta bacteria patógena son los alimentos cárnicos mal cocidos, los lácteos y verduras contaminadas con heces de vacuno. Es decir, esta cepa representa un problema de salud pública.

Los antibióticos son un tratamiento usual para disminuir la presencia de esta cepa, puesto que diversos estudios han demostrado los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de esta cepa, no obstante Fernández et al³ resalta que el tratamiento con antibióticos está contraindicado en casos de sospecha o confirmación de infecciones entéricas con esta cepa, debido a que los antibióticos aumentan la lisis bacteriana y por ende la liberación de la toxina que complica el cuadro clínico.

The Center for Food Security and Public Health (CFSPH)⁴ resalta la importancia del tratamiento con probióticos en los animales para disminuir significativamente la presencia de esta bacteria patógena y así evitar la contaminación de la canal, leche, vegetales y agua con heces contaminadas con esta cepa.

¹ MARGALL, Núria, et al. *Escherichia coli* enterohemorrágica. En: Revista Española de salud pública. Octubre, 1997. vol. 71, no. 5, p. 437-443

² ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, OMS. *E. coli*. Nota descriptiva de la OMS. 2016

³ FERNANDEZ BRANDO, Romina, et al. Actualización en el tratamiento del síndrome urémico hemolítico endémico: Patogénesis y tratamiento de la complicación sistémica más grave de las infecciones por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Medicina (Buenos Aires). 2011. vol. 71, no. 4, p. 383-389

⁴ The Center for Food Security and Public Health (CFSPH) Ficha técnica: *E. coli* enterohemorrágica. En: Universidad de Iowa. Marzo 2005

Según Oyetayo y Oyetayo⁵ los *Lactobacillus* han sido asociados con varios efectos benéficos en la salud humana y animal, razón por la que estos microorganismos son una alternativa al uso de los antibióticos con el fin de equilibrar la microbiota intestinal al ser probióticos.

Algunas investigaciones hablan del efecto *L. plantarum* sobre *E. coli*, según Estrada et al⁶ *L. plantarum*, aislada de productos fermentados crece en medios de cultivo y produce un extracto complejo de ácidos orgánicos y péptidos con actividad bactericida, extracto que mostro capacidad bactericida frente a *E. coli*.

⁵ OYETAYO, V and OYETAYO, F. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. En: African Journal of Biotechnology. Febrero, 2005. vol. 4 (2), pp. 123-127. Citado por JURADO GÁMEZ, Henry; CALPA YAMA, Freddy; y CHASPUENGAL TULCÁN, Aura. Determinación *in vitro* de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. Rev. Med. Vet. Zoot. Septiembre, 2014. vol. 61, no. 3, p. 241-257

⁶ ESTRADA MALDONADO, Ana; GUTIÉRREZ RAMÍREZ Luz y MONTOYA CAMPUZANO, Olga. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* Contra *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín. abril, 2005. vol. 58, no. 1, p. 2601-2609

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Los distintos brotes en el mundo han ocasionado que se considere la cepa *E. coli* O157:H7 como un problema de salud pública. García⁷ menciona en su informe la notificación por parte de la Secretaría de Salud de Bogotá de casos de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) en Colombia, donde el 16.11% correspondió a Bogotá siendo el mayor notificador, seguida de Valle con el 13.60% y Nariño con el 8.90%. En Colombia, se ha demostrado la presencia de esta bacteria de acuerdo al estudio de Piedrahita et al⁸ en el que revelaron una frecuencia de aparición de la cepa O157: H7 en alimentos de origen animal. Ahora bien, los antibióticos son un tratamiento usual para disminuir la presencia de esta cepa, sin embargo Pérez et al⁹ afirman que el suministro inadecuado de antibióticos ha generado la aparición de cepas resistentes, cada vez más patógenas y con implicaciones negativas en la salud humana y animal.

En consecuencia la búsqueda de alternativas para combatir esta cepa sin afectar al ser humano se ha vuelto una constante. Tal como Vallejo et al¹⁰ que estudiaron la actividad inhibitoria sobre *E. coli* O157:H7 de seis cepas seleccionadas de *Lactobacillus* aisladas de queso ovino, el resultado de la investigación demostró que las cepas seleccionadas ejercieron la inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7 debido a la producción de ácidos orgánicos. Por esta razón, las BAL con características probióticas como *L. plantarum* pueden constituir una alternativa al uso de antibióticos para control de patógenos y de las toxiinfecciones causadas por ellos. Aunque las condiciones medioambientales y gastrointestinales disminuyen la viabilidad y limitan la acción de los probióticos como microorganismos benéficos, en este sentido una solución ante esta problemática es la implementación de nuevas tecnologías como la microencapsulación que favorecen la viabilidad y la actuación de los probióticos en el tracto

⁷ GARCÍA VESGA, Adriana. Informe brotes enfermedades transmitidas por alimentos, primer semestre de 2015, Bogotá D.C. Secretaria de salud. Julio, 2015.

⁸ PIEDRAHITA, Diego; MÁRQUEZ, Tania y MÁTTAR, Salim. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en poblaciones porcinas, canal bovina y productos cárnicos en el departamento de Córdoba. En: Revista MVZ Cordoba, vol. 6, no. 2, p. 119-126.

⁹ PÉREZ GUERRA, Nelson, et al. Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. En: Animal Feed Science and Technology. 2007, vol. 134, p. 89-107.

¹⁰ VALLEJO, M. et al. Inhibición de *Escherichia coli* O157:H7 por cepas *Lactobacillus* aisladas de queso ovino. En: Analecta Veterinaria. 2009. vol. 29, no. 1, p. 15-19.

gastrointestinal, aportando protección y prebióticos que favorecen su supervivencia.

Las BAL se han convertido en una alternativa al uso de antibióticos para combatir el efecto de microorganismos patógenos. Por lo cual se han implementado nuevas tecnologías como la microencapsulación con el propósito de que esta alternativa sea eficiente. El estudio de Montes¹¹ realizado en Colombia, evidencio que la microencapsulación presentó mayor estabilidad en *L. rhamnosus* durante su almacenamiento representado en un 73% de supervivencia. En Nariño estudios como el de Jurado et al¹² y Jarrín et al¹³ han reportado supervivencia de bacterias del género *Lactobacillus* a condiciones gastrointestinales simuladas. De ahí que en esta tesis se propone desarrollar el estudio de viabilidad de *L. plantarum* después de la microencapsulación.

Por lo anterior, se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto de la microencapsulación sobre la viabilidad probiótica de *Lactobacillus plantarum* bajo condiciones gastrointestinales simuladas y cuál es su efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli* O157: H7?

¹¹ MONTES RAMÍREZ, Luz Mary. Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469). Tesis de Magíster Ciencia y Tecnología de Alimentos. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, 2013. 71 p.

¹² JURADO GÁMEZ, H; FAJARDO ARGOTI, I y RODRÍGUEZ CAICEDO A. Evaluación in vitro de *Lactobacillus gasser* con características probióticas sobre *Staphylococcus aureus*. En: Rev Med Vet Zoot. Diciembre, 2016. vol. 63, no. 3, p. 179-187.

¹³ JURADO GÁMEZ, Henry; JARRÍN JARRÍN, Verónica y PARREÑO SALAS, John. Crecimiento de *L. plantarum* y efecto sobre *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens*, y *S. aureus*. En: Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Diciembre, 2015. vol. 13, no. 2, p. 57-66.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la microencapsulación sobre la viabilidad probiótica de *Lactobacillus plantarum* bajo condiciones gastrointestinales simuladas y su efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli* O157: H7 sin microencapsular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la microencapsulación sobre la viabilidad probiótica de *Lactobacillus plantarum*.
- Establecer las mejores condiciones de la cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en el medio comercial MRS.
- Evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Lactobacillus plantarum* sobre *Escherichia coli* O157: H7.
- Identificar el perfil de aminoácidos y péptidos de *Lactobacillus plantarum* y *Escherichia coli* O157: H7.
- Identificar la morfología y estructura de *Lactobacillus plantarum* microencapsulada mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).
- Caracterizar físicamente el microencapsulado de *Lactobacillus plantarum*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 LOS PROBIÓTICOS

Desde el punto de vista de la gramática, es una palabra que significa a favor de la vida y según la Organización de Las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)¹⁴ se utiliza para designar microorganismos vivos que tienen un efecto beneficioso para la salud de los animales y humanos.

Fuller define los probióticos como: "un aditivo alimentario microbiano vivo que afecta beneficiosamente al animal hospedero mejorando su equilibrio microbiano intestinal"¹⁵. Igualmente Penna¹⁶ resalta que estimulan las funciones protectoras del sistema digestivo y generalmente, se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales.

Adicionalmente Young¹⁷ y Dunne et al¹⁸ indican que para que un organismo sea definido como probiótico debe reunir algunas características como, ser habitante común del intestino, no causar daño a su hospedador, sobrevivir a las condiciones del sistema digestivo, proliferar en el intestino, no desplazar la microbiota nativa ya existente, buena capacidad de adhesión a las células epiteliales, producir sustancias antimicrobianas y tener capacidad de aumentar positivamente las funciones inmunes y las actividades metabólicas.

¹⁴ FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO Alimentación y Nutrición. Londres, Ontario, Canadá. 2002

¹⁵ FULLER R (1989): Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol 66: 365-378. Citado por JURADO GÁMEZ, Henry; ROMO PAZMIÑO, Sara y BENAVIDES DELGADO, Viviana. Evaluación del efecto probiótico de *Lactobacillus plantarum* en la alimentación de lechones en fase de precebo como una alternativa del uso de antibióticos: una revisión. En: Revista Investigación Pecuaria. 2013. vol. 2, no. 1, p. 55-62

¹⁶ PENNA FJ. Diarrea y probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. Rev Enfer Infec Ped 1998. vol. 11, no. 6. p. 182. Citado por: CAGIGAS REIG, Ada Lydia y BLANCO ANESTO, Jorge. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. En: Revista Cubana Aliment y Nutr. 2002. vol. 16, no. 1. p. 63-8

¹⁷ YOUNG, R and HUFFMANS, S. Probiotic use in children. J Pediatr Health Care. 2003. vol. 17, p. 277-283. Citado por: CASTRO, Luz y ROVETTO, Consuelo. Probióticos: utilidad clínica. Colombia Médica. Diciembre, 2006. vol. 37, no. 4, p.308-314

¹⁸ DUNNE, Colum, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. En: The American Journal of Clinical Nutrition. Febrero, 2001. vol.73, p. 386-392. Citado por: Ibid., p. 309.

Por otra parte Sanz et al¹⁹ menciona que los avances en disciplinas como nutrición, inmunología, ecología microbiana y genómica han permitido profundizar en las bases y la relación entre la dieta y el estado de salud, de tal forma que no sólo se atribuye al valor nutritivo de aquélla, sino también a los efectos benéficos procedentes de sus complejas interacciones con el huésped y la microbiota intestinal. En efecto, el mismo autor resalta que han surgido los alimentos funcionales que aparte de aportar nutrientes, ejercen efectos beneficiosos para el organismo al promover la salud y agrega que los probióticos hacen parte de uno de los subgrupos más destacados de los alimentos funcionales, coincidiendo a su vez con las anteriores definiciones, al ser microorganismos definidos y viables en grado suficiente para modificar la microbiota de un compartimento del huésped ejerciendo un efecto beneficioso para la salud del mismo.

En los últimos años se ha investigado mucho acerca del efecto de los probióticos en la salud humana y de los animales. Panisello²⁰ resalta la importancia de estos microorganismos que en cantidades y condiciones adecuadas brindan diversos beneficios para la salud. Así mismo, cabe resaltar que estas cepas bacterianas están relacionadas con la inhibición de bacterias patógenas. Tanto es así que Manzano et al sostiene que los probióticos "pueden modular la respuesta inmune en animales y humanos no sólo a nivel de la mucosa intestinal, sino también a nivel sistémico. Dadas sus propiedades inmunomoduladoras, actualmente se evalúa la utilidad de los probióticos en el manejo preventivo o terapéutico de enfermedades"²¹.

En cuanto a sus propiedades, estos microorganismos son Gram positivos y anaerobios o anaerobios facultativos y según Caja et al²² los probióticos más conocidos son principalmente bacterias ácido lácticas, no obstante también se incluyen las levaduras. En tal sentido Hartog y Reinder destacan que "la mayoría de las bacterias que se utilizan como probióticos en los animales de granja pertenecen a las especies *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bacillus*, aunque también se utilizan levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y mohos (*Aspergillus oryzae*)"²³.

¹⁹ SANZ, Y; COLLADO, M y DALMAU, J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. En: ACTA pediátrica Española. 2003. vol.61, no. 9, p. 58-64.

²⁰ PANISELLO ROYO, Joima. Nutrición e inversión en salud: microbioma y probióticos (los probióticos en la prevención y tratamiento de enfermedades pediátricas; evidencias científicas). En: Rev Pediatr Aten Primaria Supl. 2011. vol 13, no. 20, p. 25-41

²¹ MANZANO, Claudia; ESTUPINAN, Diana y POVEDA Elpidia. Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia. Rev Chil Nutr. Marzo, 2012. vol. 39, no 1, p. 98-110

²² CAJA, Gerardo, et al. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. En: Sitio Argentino de Producción Animal. 2003. 193, p. 1-18.

²³ HARTOG, Leo y REINDER, Sijsma. Estrategias nutricionales para reducir la contaminación ambiental en la producción de cerdos. Nutreco Agri R&D and Quality affairs the Netherlands.

Respecto a la función de los probióticos es muy variable en cada especie animal y como expresa Caja et al²⁴ existe una gran diferencia entre los monogástricos y rumiantes con respecto a la utilización de los probióticos en el organismo.

En este sentido el uso de probióticos en las dietas de los animales ha alcanzado gran importancia con el propósito de generar alimentos de origen animal inocuos, reduciendo el uso de antimicrobianos, pues muchos productores utilizan antibióticos para tratamiento de enfermedades gastrointestinales y respiratorias en los animales y su uso inadecuado según Ángel²⁵ puede dejar residuos en los productos de origen animal, lo que implica una problemática sanitaria puesto que algunas cepas patógenas ya muestran resistencia en los humanos. Así que como indica Vaca²⁶, el manejo indebido de los fármacos en animales y el incumplimiento de los tiempos de retiro constituyen un riesgo para los consumidores. Es decir pueden producir toxicidad aguda o crónica, efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas y fenómenos de resistencia bacteriana, entre otros.

Entonces la importancia de los probióticos como iniciativa para reducir el uso de antibióticos radica en el efecto que estos ejercen sobre patógenos a través de sus mecanismos de acción, que como señala Ángel²⁷ son, la competencia por adhesión debido a que se adhieren a los receptores del epitelio intestinal; producción de sustancias antimicrobianas como ácido láctico, ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrogeno, di acetilo, bacteriocinas, entre otros; producción de sustancias bacteriostáticas que inhiben la multiplicación bacteriana; competencia por nutrientes; estimulación inmunológica y alteración de los niveles de pH y oxígeno, es decir, favoreciendo el crecimiento de bacterias tolerantes al ácido y a presión baja de oxígeno favoreciendo el crecimiento de bacterias anaerobias.

Curso de especialización FEDNA. 2007. p, 19-41. Citado por: ANGEL LONDOÑO, Marlli Alexandra. Uso de probióticos en la nutrición de monogástricos como alternativa para mejorar un sistema de producción. Trabajo de grado Especialista en Nutrición Animal Sostenible. Facatativá: Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Escuela de ciencias agrícolas, pecuarias y del medio ambiente, 2013. 6 p.

²⁴ CAJA, Op. cit., p. 3.

²⁵ ANGEL, Op. cit., p. 16.

²⁶ VACA, AC. Aspectos regulatorios de los medicamentos veterinarios registrados en Colombia e incluidos en el Codex Alimentarius". Tesis Médico Veterinario, Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 2003. 49 p. Citado por: LOZANO, María y ARIAS, Diana. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. Febrero 2018. vol. 21, p. 121-135

²⁷ ANGEL, Op. cit., p. 20-23.

Dada la variabilidad entre los probióticos existen diferentes mecanismos de acción sobre los microorganismos patógenos, por lo cual es muy importante su evaluación y su estudio. Por lo tanto como señala Ángel "Es importante tener en cuenta, que no todos los microorganismos probióticos inducen el mismo tipo de efectos ni con la misma intensidad sobre la respuesta inmune o sobre los microorganismos presentes en la luz intestinal"²⁸.

4.2 GÉNERO *Lactobacillus*

Este tipo de bacterias pertenecen a la familia *Lactobacillaceae* Bergey²⁹, que se caracteriza porque sus integrantes pueden ser bacilos largos o cortos, aunque también cocos que se dividen como los bacilos, produciendo filamentos y cadenas de forma ocasional.

Son microorganismos Gram positivos, de morfología bacilar, en algunas especies algo flexionados, con longitud y grosor variado, no formadores de esporas, inmóviles, catalasa negativos, no reductores de nitratos, citocromo negativos, no licúan la gelatina, su temperatura óptima de crecimiento es de 30-40°C; está ampliamente distribuido en la naturaleza, en productos de origen vegetal y en el tracto gastrointestinal humano y animal, además presentan metabolismo homofermentativo y heterofermentativo³⁰.

Dentro de las BAL el género *Lactobacillus* es el que presenta mayor número de especies (más de 100). *Lactobacillus* es el género con más especies ácido lácticas clasificadas de acuerdo a sus propiedades fermentativas.

Esteban³¹, basándose en la secuencia de RNA ribosomal 16S propone la clasificación de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* en tres grupos:

Grupo A.

²⁸ Ibid., p. 6.

²⁹ BERGEY, D; BREED, R & AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Bacteria Classification. 7 ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co, 1957.

³⁰ MORENO GALARZA, Lizeth Johanna. Aislamiento y Selección de *Lactobacillus sp* con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Tesis de Magister en Ciencias mención Microbiología. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Posgrado Inter facultades de Microbiología, 2012. 17 p.

³¹ ESTEBAN, Carlos. Caracterización molecular de la represión por catabólico e ingeniería metabólica en *Lactobacillus casei*. Tesis de doctorado. España. Universiad de València. Departamento de Bioquímica y biología molecular, 2004.

Los *Lactobacillus* homofermentativos obligados, fermentan hexosas a ácido láctico vía Embden Meyerhof Parnas (EMP), los microorganismos poseen la enzima fructosa 1,6bifosfatoaldolasa y no la fosfocetolasa por lo que no fermentan pentosa ni gluconato. *L. delbruekii* y *L. acidophilus*.

Grupo B

Lactobacillus heterofermentativos facultativos, fermentan hexosas hasta ácido láctico vía (EMP), fermentan pentosas y gluconato vía fosfogluconato hasta ácido láctico y ácido acético. Tal como, las cepas *L. casei* y *L. plantarum*.

Grupo C

Heterofermentativos estrictos. Integrado por *Leuconostoc*, *Lactobacillus* del grupo III, *Gonococcus* y *Weissella* que son heterofermentativos estrictos. Fermentan siempre las hexosas a ácido láctico, etanol, ácido acético y CO₂ vía fosfogluconato y fermentan las pentosas a ácido láctico y a ácido acético vía fosfogluconato. Cepas de *Lactobacillus* próximos a *Leuconostoc*.

4.3 *Lactobacillus plantarum*

4.3.1 Generalidades. *L. plantarum* es una bacteria Gram positiva que se encuentra en gran variedad de nichos, como la leche, la carne, muchas fermentaciones vegetales y también se encuentra el tracto gastrointestinal humano.

Adicionalmente Ramírez et al³² declaran que esta pertenece al género *Lactobacillus* y es muy conocida en la industria alimentaria por producir fermentación láctica, además de utilizarse en la alimentación animal para la elaboración en ensilajes. Asimismo Hidalgo et al³³ destaca que se caracteriza por transformar el oxígeno que consume en peróxido de hidrógeno, el cual inhibe la actividad de otros tipos de microorganismos que compiten por alimento.

L. plantarum presenta actividad antimicrobiana ante bacterias Gram positivas y Gram negativas. Es altamente termoestable, su actividad es mayor a pH ácido y esta no se ve afectada por la presencia de proteinasa K (proteínasa capaz de digerir cabellos), agentes quelantes y detergentes.

³² RAMÍREZ RAMÍREZ, José Carmen. Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. En: Revista Fuente Año 2. Junio, 2011. no, 7, p. 1-16.

³³ HIDALGO TOGORES, José. Tratado de enología. Tomo 1, segunda edición revisada y ampliada. Ediciones Mundi Prensa Mexico. 2010.

La bacteria *L. plantarum* es perteneciente a la familia *Lactobacillaceae* y su clasificación taxonómica se encuentra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación Taxonómica *Lactobacillus plantarum*

Clasificación Taxonómica	
Reino	Bacteria
Clase	Bacilli
Orden	Lactobacillales
Familia	Lactobacillaceae
Género	<i>Lactobacillus</i>
Especie	<i>L. plantarum</i>

Fuente: HIDALGO TOGORES, José. Tratado de enología. Tomo 1, segunda edición revisada y ampliada. Ediciones Mundi-Prensa Mexico. 2010. Pag 634-644.

4.3.2 Taxonomía y morfología. De acuerdo a Melgar et al³⁴, el género *Lactobacilli* pertenece al filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Lactobacillales y familia Lactobacillaceae. Al mismo tiempo mencionan que *Lactobacillus plantarum* es un Lactobacilo facultativo heterofermentativo metabólicamente flexible y versátil, que se puede encontrar en muchos nichos ambientales con amplias aplicaciones.

El género *Lactobacillus* está dividido en tres grupos (A, B y C) y *L. plantarum* es un microorganismo anaerobio facultativo y heterofermentativo que se clasifica en el Grupo B.

Por otra parte Todorov y Franco³⁵ afirman que *Lactobacillus plantarum* es un microorganismo Gram positivo con morfología de varilla, con un tamaño aproximado de $0.9\text{--}1.2 \times 1.0\text{--}8.0 \mu\text{m}$ que se presenta solo o agrupado en cadenas cortas. También refieren que las BAL a las que pertenece *L. plantarum* son

³⁴ MELGAR LALANNE, Guiomar; RIVERA ESPINOZA, Yadira and HERNÁNDEZ SÁNCHEZ, Humberto. *Lactobacillus plantarum*: An overview with emphasis in biochemical and healthy properties. 2012. pp.1-31

³⁵ TODOROV, Svetoslav & FRANCO, Bernadette. *Lactobacillus Plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production. En: Food Reviews International. Abril 2010, vol. 26, no. 3, p. 205–229.

microaerófilas, catalasas y oxidasa negativas. Y por su parte Melgar et al³⁶ menciona que estudios serológicos han demostrado que la mayoría de las cepas de *L. plantarum* pertenecen al grupo serológico B, ya que contienen ribitol y ácido teicoico en sus paredes celulares.

4.3.3 Fisiología. Según Todorov y Franco³⁷ *L. plantarum* puede metabolizar la mayoría de los ácidos orgánicos (por ejemplo, los ácidos málico, tartárico y acético), lo que resulta en la producción de dióxido de carbono, ácido láctico y ácido acético y que la formación de ácido cítrico por *L. plantarum* solo es posible en presencia de glucosa. Igualmente declaran que esta bacteria tiene la capacidad de fermentar diferentes carbohidratos, incluidas las hexosas y los diholósidos.

Parreño et al³⁸ encontraron que *L. plantarum* es tolerante a pH bajo, considerando que se debe a la capacidad de esta bacteria para fermentar diferentes carbohidratos generando así como producto final ácido láctico que disminuye el pH del medio. Mientras que Todorov y Franco³⁹ enfatizan que *L. plantarum* es una cepa mesofílica con capacidad de crecer a un rango de temperatura de 15°C a 45°C, igualmente registraron buen crecimiento de la cepa en presencia de 4 a 6% de NaCl y a valores de pH entre 4 y 9.

Ramírez et al⁴⁰ resaltan que *L. plantarum* posee un genoma 50% más grande que la mayoría de BAL y que tiene una gran capacidad metabólica, que le permite utilizar una gran variedad de fuentes de carbono; propiedad que resulta de un gran número de genes involucrados en el transporte y utilización de azúcar, y un versátil metabolismo del piruvato.

4.3.4 Bacteriocinas en *Lactobacillus plantarum*. Al respecto Vegas et al⁴¹ mencionan que la BAL con la generación de bacteriocinas, junto la reducción del pH del medio compiten por espacio gastrointestinal con otros microorganismos evitando así su crecimiento.

³⁶ MELGAR, Op. cit., p. 6.

³⁷ TODOROV, Op. cit., p. 208

³⁸ JURADO; JARRÍN y PARREÑO. Op. cit., p. 62.

³⁹ TODOROV, Op. cit., p. 208.

⁴⁰ JURADO GÁMEZ Henry; RAMÍREZ, Cristina y AGUIRRE, Diana. Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. En: Veterinaria y Zootecnia. Diciembre, 2014, vol. 7, no. 2, p. 37-53

⁴¹ VEGAS, Carlos, et al. Efecto simbiótico del extracto de *Smallanthus sonchifolius* (yacón) y *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli*. En: Ciencia e Investigación. 2013, vol. 16, no. 2, p. 77-82.

Todorov⁴² describe a las bacteriocinas como proteínas biológicamente activas con actividad bactericida y que pueden ayudar a reducir la utilización de conservantes químicos y tratamientos físicos en la industria alimentaria.

En cuanto a *L. plantarum* Zapata et al⁴³ mencionan que es una de las bacterias más utilizadas en la producción de alimentos fermentados y que se le han descrito una gran cantidad de bacteriocinas producidas por diferentes cepas. En este sentido Todorov⁴⁴ manifiesta las bacteriocinas de *L. plantarum* son llamadas plantaricinas en su mayoría, las cuales han sido caracterizadas parcialmente y solo de algunas de ellas se han aclarado completamente su secuencia de aminoácidos.

4.3.5 *Lactobacillus plantarum* en la producción de alimentos. Montes⁴⁵ menciona que un alimento funcional afecta de manera beneficiosa una o más funciones del organismo más allá del aporte nutricional, mejorando el estado de salud y reduciendo el riesgo de enfermedades del consumidor. Al mismo tiempo destaca que entre los alimentos funcionales se encuentran los probióticos, alimentos con microorganismos vivos en una cantidad adecuada que cumplen acciones diana sobre órganos y sistemas. Al respecto Ramírez et al⁴⁶ alude que a las BAL corresponden la mayoría de los probióticos.

Por lo cual en acuerdo con Todorov y Franco⁴⁷ las BAL se distinguen por su extendida presencia en la naturaleza y por su participación en numerosos procesos de fermentación tradicionales e industriales y son muy útiles como lo describe Ramírez et al⁴⁸ como cultivos iniciadores en la elaboración y conservación de productos lácteos, así como también en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales.

Zapata et al⁴⁹ señala que *L. plantarum* es una bacteria muy empleada en la elaboración de alimentos fermentados. Por lo tanto Todorov y Franco⁵⁰ mencionan

⁴² TODOROV, Svetoslav. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action. En: Brazilian Journal of Microbiology. 2009, vol. 40, no. 2, p. 209-221

⁴³ ZAPATA, Sandra, et al. Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. En: Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 2009, vol. 16, no. 1, p. 75-82.

⁴⁴ TODOROV, Op. cit., p. 215.

⁴⁵ MONTES, Op. cit., p. 14.

⁴⁶ RAMÍREZ, Op. cit., p. 1.

⁴⁷ TODOROV & FRANCO, Op. cit., p. 210.

⁴⁸ RAMÍREZ, Op. cit., p. 2.

⁴⁹ ZAPATA, Op. cit., p. 76.

que *L. plantarum* se ha utilizado durante siglos para la preparación de yogur, productos lácteos fermentados y diferentes tipos de queso, además de ser empleada en procesos de fermentación para la preparación de aceitunas verdes y pepinos. Los mismos autores también refieren que esta bacteria se ha usado sola o en mezclas con *pediococos* y/o *micrococcos* como cultivos iniciales y cultivos protectores para producir carnes frescas y fermentadas, y que en carnes refrigeradas se puede agregar *L. plantarum* para suprimir el crecimiento de bacterias patógenas y el deterioro, prolongando la vida útil del producto.

En cuanto a la producción de alimentos para animales, Bustos⁵¹ expresa que *L. plantarum* es el inóculo para la producción de ácido láctico más común en el ensilaje, que no solo contribuye con la recuperación de la materia seca sino que con frecuencia incrementa el desempeño del animal. Además un estudio realizado por Hassan y Heath⁵² demostró que *L. plantarum* puede usarse en la fermentación de desechos de peces para producir alimentos para animales y piensos para aves.

4.3.6 Efecto de *Lactobacillus plantarum* sobre bacterias patógenas. Ringo⁵³ indica que entre los mecanismos de acción de los probióticos están la producción de sustancias inhibitorias, como ácidos orgánicos, bacteriocinas y por otra parte la competición por nutrientes esenciales o enzimas. En este sentido Bustos⁵⁴ destaca que *L. plantarum* es conocida por producir sustancias antimicrobianas como la plantaricina, que es un activo elemento contra ciertos patógenos.

Por lo cual, diferentes estudios han demostrado que *L. plantarum* inhibe el crecimiento de diferentes bacterias patógenas. Estudio como el de Jarrín et al⁵⁵ en el que observaron que *L. plantarum* manifestó buen potencial inhibitorio frente a *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. perfringens*, y *S. aureus*.

⁵⁰ TODOROV, Op. cit., p. 210.

⁵¹ BUSTOS GUTIÉRREZ, Paola Daniela. Estudio del cultivo y concentración de una cepa *Lactobacillus plantarum* autóctona empleando un reactor y membranas semipermeables. Secado y estabilización de biomasa. Doctorado en Ciencias de la Ingeniería con mención en Ingeniería Química. Concepción Chile.: Universidad de Concepción, Facultad de ingeniería. Departamento de Ingeniería Química, 2013. 14 p.

⁵² HASSAN T, & HEATH J. Biological fermentation of fish waste for potential use in animal and poultry feeds. En: *Agricultural Wastes*. 1986, vol. 15, no.1, p. 1-15.

⁵³ RINGO, Einar. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. En: *Aquaculture Research*. 2010, vol. 41, no. 4, p. 451–467.

⁵⁴ BUSTOS. Op. cit., p. 13.

⁵⁵ JURADO; JARRÍN y PARREÑO. Op. cit., p. 64.

Por su parte Nagua⁵⁶ en su estudio evaluó el efecto antagónico de *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* y la mezcla de los dos, sobre el desarrollo de *Escherichia Coli*, *Salmonella ssp.* Y *Staphylococcus Aureus* en una mezcla de cuy y harina de habas, obteniendo que *L. plantarum* fue más eficaz y específica controlando así la presencia de *salmonella spp* a las 36 horas y que igualmente la BAL sola como en la mezcla fue eficaz para controlar *E. coli*, *salmonella spp* y *S. aureus*.

Por otra parte Bustos⁵⁷ evaluó una cepa deshidrata de *L. plantarum* mediante secado por atomización, concluyendo que *L. plantarum* deshidratada presentó el mismo poder inhibitorio que una cepa fresca contra *Yersinia ruckeri*.

4.4 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (ETAS)

De acuerdo a Forero et al “Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen uno de los problemas de salud pública de mayor importancia a nivel mundial, ya que ocasionan alta morbilidad y mortalidad; se origina por la ingestión de alimentos y/o agua contaminados con agentes infecciosos específicos tales como bacterias, virus, hongos, parásitos”⁵⁸.

González y Rojas⁵⁹ mencionan que se han descrito más de 250 ETAS. Adicionalmente señalan que entre las bacterias reconocidas usualmente como responsables de ETAS están las especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, así como la cepa O157:H7 de la enterobacteria *E. coli*. Igualmente Franco et al⁶⁰ resalta que *E. coli* O157:H7 es la de mayor importancia de los cinco grupos de cepas de *E. coli*, ya que se considera una cepa patógena emergente en relación con la salud pública por ser la causante de ETAS en el mundo, al estar asociada a cuadros clínicos leves y severos.

⁵⁶ NAGUA SUAREZ, María Fernanda. “Antagonismo de microorganismos benéficos, frente a patógenos de referencia en una mezcla de cuy y harina de habas”. Tesis Ingeniera en Industrias Pecuarias. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Pecuarias, 2016. 29-44 p.

⁵⁷ BUSTOS. Op. cit., p. 108.

⁵⁸ FORERO TORRES, Yibby; GALINDO BORDA, Marisol; y RAMÍREZ Gabriel. Patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes escolares de Colombia. Revista chilena de nutrición. Agosto, 2017, vol. 44, no. 4, p. 325-332.

⁵⁹ GONZÁLEZ FLORES, Tania; y ROJAS HERRERA, Rafael Antonio. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Salud pública de México. Septiembre-octubre, 2005, vol. 47, no. 5, p. 388-390.

⁶⁰ FRANCO ANAYA, Piedad Astrith; et al. Determinación de *Escherichia Coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACIÓN. Junio, 2013, vol. 10, no. 1, p. 91-100.

Según Trujillo y Duarte⁶¹ las ETAS pueden clasificarse en infecciones alimentarias o intoxicaciones alimentarias.

Infecciones alimentarias: Rodríguez et al afirma que se presentan “cuando en el alimento está presente un patógeno que se establece y multiplica en el consumidor”⁶², también menciona que tiene dos variantes infecciones invasivas y toxiinfecciones, en la primera la bacteria coloniza tejidos y órganos del afectado y la segunda además de colonizar y multiplicarse en el tracto intestinal del huésped, excretan sus toxinas, como por ejemplo las variantes entero patógenas de *E. coli* productoras de enterotoxinas y verotoxinas.

Intoxicaciones alimentarias: según Rodríguez et al⁶³ se deben a la ingestión de alimentos contaminados con toxinas producidas por bacterias que se han multiplicado hasta una cierta concentración en un alimento.

4.5 *Escherichia coli*

4.5.1 Generalidades. Es una bacteria que se encuentra comúnmente en el intestino de animales de sangre caliente y humanos, además, su presencia en estos compartimentos es normal, es de forma cilíndrica y alargada o bacilo corto, es considerada como una bacteria Gram negativa, por lo tanto se tiñe de color rosa, pertenece a la familia de las enterobacterias, es aerobia facultativa y se beneficia unidireccionalmente de otras poblaciones bacterianas o de las superficies intestinales de los huéspedes, es decir, que es una bacteria comensal. Rodríguez⁶⁴ afirma que a pesar de ser una bacteria que se encuentra normalmente en la flora intestinal hay cepas que pueden ser patógenas y pueden causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos.

⁶¹ TRUJILLO TRUJILLO, Yesenia; y DUARTE PLATA, Néstor Javier. Diseño de estrategia sobre manipulación de alimentos en la asociación pan de vida cer. Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniero Industrial. Bogotá D.C.: Universidad Católica de Colombia, Facultad de ingeniería, Programa de ingeniería industrial, 2017. 24p.

⁶² RODRÍGUEZ TORRENS, Herlinda; *et al.* Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. Revista Electrónica de Veterinaria. 2015, vol. 16, no. 8, p. 1-27.

⁶³ Ibid., p. 4.

⁶⁴ RODRÍGUEZ ANGELES, Guadalupe. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. En: Revista Salud Pública de México. Octubre, 2002, vol. 44, no. 5, p. 464-475.

La FAO⁶⁵ indica que así como existen cepas benéficas, también existen cepas que son perjudiciales para la salud del huésped o patógenas. Que como resultado de su información genética generan toxinas, tienen capacidad de adhesión e invasión de células huésped, interferencia con el metabolismo celular y destrucción de tejidos.

4.5.2 Taxonomía y morfología. La bacteria fue descrita por primera vez por Theodor Escherich en el año de 1885, fue investigada posteriormente por otros investigadores siendo denominada finalmente como *Escherichia coli* en el año 1954 en honor a su descubridor.

Según Molina y Eslava⁶⁶ la *Escherichia coli*, pertenece a la familia Enterobacteriaceae que contiene más de 20 géneros bacterianos y aproximadamente 120 especies, el género *Escherichia* incluye siete especies tales como: *E. adecarboxylata*, *E. alberti*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* y *E. coli*. Los mismos autores indican que algunas especies son móviles, no esporuladas, fermentan la glucosa y la lactosa, son catalasa positivos, oxidasa negativos y reduce nitratos a nitritos, además, indican que poseen un tamaño de 0.5 µ de ancho por 3 µ de largo. Su clasificación taxonómica se encuentra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica *Escherichia coli*

Clasificación Taxonómica	
Reino	Bacteria
Clase	Proteobacteria
Orden	Gammaproteobacteria
Familia	Enterobacteriaceae
Género	Escherichia
Especie	<i>E. coli</i>

Fuente: ESCHERICH, T. (1885) Die darmbakterien des neugeboren und säuglings. Fortschritte der Medizin, vol.3, p.515-522,547-554. Citado por JIMENEZ SALAS, Jena e IMAN TORRES, Alexander Javier. “Actividad antioxidante y antibacteriana *In Vitro* de las hojas del *Coriandrum sativum* (culantro) y *Eryngium foetidum* (sachaculantro), frente a dos bacterias”. Trabajo de grado Licenciatura en Bromatología y Nutrición Humana. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonia

⁶⁵ Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. Prevención de la *E. coli* en los alimentos. Publicaciones Marco de Gestión de Crisis de la FAO.2011.

⁶⁶ MOLINA LÓPEZ, José y ESLAVA CAMPOS, Carlos. *Escherichia coli* diarreogénica. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de México.

Peruana. Facultad de Industrias Alimentarias. Escuela de Formación Profesional de Bromatología y Nutrición. 2016. 48 p.

4.5.3 Fisiología. *E. coli* al ser Gram negativa según Canet⁶⁷ posee una cubierta que se compone de tres elementos que constan de una membrana externa, interna y en medio de las dos un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas. Esta bacteria es mesófila y por ende soporta temperaturas de los 15°C, hasta los 35°C. Pero, siendo más específicos los límites que soporta la bacteria van desde los 7°C hasta los 70°C, y su temperatura óptima es de los 35°C hasta los 45°C que es la temperatura corporal de los animales de sangre caliente. En este sentido, esta bacteria es resistente a temperaturas bastante bajas. No obstante, respetar la cadena de frío en los alimentos puede evitar la proliferación de la bacteria en el alimento.

Sin embargo Canet⁶⁸ también sostiene que la congelación tiene pocos efectos sobre la población de *E. coli* en el alimento, y no garantiza la destrucción de un número suficiente de bacterias viables para asegurar su inocuidad, sin embargo sostiene que esta cepa es muy sensible a altas temperaturas, puesto que a partir de los 70°C estas son fácilmente eliminadas y por tanto resalta la importancia de la pasteurización de los alimentos.

El pH y la actividad de agua (A_w) pueden igualmente influir en la supervivencia de la bacteria. Canet⁶⁹ indica que los parámetros de pH óptimos de la bacteria son de 7,2 y la actividad de agua de 0.99. El mismo autor afirma, que el desarrollo de *E. coli* se detiene a pH inferiores a 3,8, o superiores a 9,5, y valores de A_w inferiores a 0,94. Por ello, el grado de acidez de un alimento puede constituir un factor de protección y garantizar la seguridad e inocuidad del alimento en cuanto a la presencia de esta bacteria.

⁶⁷ CANET, Juan José. *Escherichia Coli*: características, patogenicidad y prevención (I).Betelgeux. 2016.

⁶⁸ Ibid., p

⁶⁹ Ibid., p.

4.5.4 Patogenia. La *E. coli*, es un habitante normal del intestino de los animales y humanos desde el momento en que nacen. Pero, existen bacterias de este género y especie que son patógenas y causan cuadros diarreicos en el huésped. Srednik et al afirma: "La *Escherichia coli* es un marcador de contaminación fecal en alimentos. Dentro de la especie se encuentran patotipos los cuales pueden definirse como poblaciones de la misma especie que difieren por su capacidad patogénica y que constituyen un riesgo para la salud"⁷⁰.

La contaminación con esta bacteria en los alimentos es muy común, y debido a que es de origen fecal, la FAO indica que "se transmite a través de la contaminación fecal de los alimentos y del agua, así como también a través de la contaminación cruzada o por contacto humano directo durante la preparación de los alimentos"⁷¹.

Las bacterias patógenas se dividen en seis grupos o variedades y depende de los mecanismos de patogenicidad, además de los síndromes clínicos que presentan y son las siguientes: Enteropatogénica (EPEC) ocasiona diarrea acuosa y a veces sanguinolenta ya que se adhiere al epitelio intestinal alterando la función celular; *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) que provoca diarrea sanguinolenta; *E. coli* enterotoxigénica (ECET) provoca diarrea acuosa debido a la liberación de enterotoxinas que provocan un desbalance con el cloruro de sodio en el intestino; *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) causa diarrea sanguinolenta porque se penetra y se difunde en las células epiteliales del intestino para finalmente destruirlas; *E. coli* enteroagregativa (ECEA) causa diarreas acuosas y mucosas agudas así como también, persistentes se adhiere a la pared intestinal formando una estructura agregativa característica también, produce una toxina termoestable enteroagregativa que provoca el cuadro clínico; y para finalizar, *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) que provoca diarrea porque se adhiere de manera difusa a la superficie celular⁷².

⁷⁰ SREDNIK, M; RUMI, M. and BENTANCOR, A. Inocuidad de carne molida y presencia de cepas *Escherichia coli* causantes de lesiones de adherencia y esfacelación. En: In Vet. 2013, vol. 15, no.1, p. 123-130.

⁷¹ Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. Prevención de la *E. coli* en los alimentos. Publicaciones Marco de Gestión de Crisis de la FAO.2011

⁷² Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. Boletín de Enfermedades Transfronterizas de los Animales. Examen de la *Escherichia coli* como patógeno emergente transmitido por los alimentos. 2011. No 39. ISSN 1814-1498

4.5.5 *Escherichia coli* O157:H7. Es una cepa patógena del grupo de las *E. coli* enterohemorrágicas y según Besser et al⁷³ esta bacteria fue descubierta en 1982 como causa de enfermedad en humanos después de que un grupo de personas en Michigan y Oregon, enfermarán tras haber comido hamburguesas contaminadas con el microorganismo. Es decir, que es una bacteria que provoca infecciones que afectan la salud pública. El autor resalta que "es causante de diarrea sanguinolenta produce potentes toxinas o verotoxinas y genera lesiones típicas de adhesión y daño tisular a nivel de las microvellosidades"⁷⁴. Ocasionando a su vez otras complicaciones en el huésped.

A lo largo de los años se han presentado brotes en diversos lugares de con casos aislados a causa de consumo de alimentos, esta información se encuentra en la Cuadro 3.

Cuadro 3. Brotes asociados con *E. coli* O157:H7 por causas alimentarias.

Año	Lugar	Alimento involucrado	Número de enfermos	Número de muertes	Referencia
1982	Oregon	hamburguesas poco cocidas	26		Riley et. al., 1983
1982	Michigan		21		Riley et. al., 1983
1984	Nebraska	carne molida			Rowe et. al., 1993
1986	Wisconsin	leche bronca			Martín et. al., 1986
1986	Alberta	carne molida		Ocurrieron tres brotes	Griffin et. al., 1988
1987	Utah	carne molida			Pavia et. al., 1990
1987	Ontario	Emparedados	128	38	Carter et. al., 1987
1988	Minnesota	Hamburguesas	32		Belongia et. al., 1993
1989	Missouri	agua no clorada	243	4	Armstrong et. al., 1996
1990	Saitama, Japón	agua para beber	366	2	Hamano et. al., 1993
1990	Alberta	carne molida			Griffin et. al., 1988
1991	Canadá	persona-a-persona	15		Rowe et. al., 1994
1991	Oregon	agua de alberca	21		Keene et. al., 1994
1991	Missouri	agua para beber	243		Swerdlow et. al., 1992
1991	Massachusetts	Sidra	4		Besser et. al., 1993
1992-1993	Washington, Idaho, Nevada y California	Hamburguesas	732	4	CDC, 1993

⁷³ BESSER, R, et al. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *E.coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. En: JAMA. Mayo, 1993. vol. 269, no. 17 p. 2217-2220. Citado por: MÁTTAR, Salim; VISBAL, Jorge y ARRIETA, German. *E.coli* O157:h7 enterohemorrágico: un agente etiológico de diarrea en Colombia subestimado. Parte I. En: Revista MVZ Córdoba. 2011. vol. 6, no. 1, p. 15-23.

⁷⁴ Ibid. p. 17.

1993	Oregon	Hamburguesas	40-50		Zhao y Doyle, 1994
1993	Área de Seattle-	Tacoma, Washington hamburguesas	477		O'Brien <i>et. al.</i> , 1993
1994	Egipto	hamburguesas y productos lácteos			WHO, 1997
1994	Washington California	salami curado en seco	17		Tilden <i>et. al.</i> , 1996
1995	Oregon	carne de venado	11		Keene <i>et. al.</i> , 1997
1996	Kyoto, Japón	germinado de rábano	3328		Watanabe <i>et. al.</i> , 1999
1996	Sakai, Japón	germinado de rábano	6000	12	NIIDIDCD,1997
1997	Yokohama y Gamamori, Japón	germinado de rábano	126 -		Itoh <i>et. al.</i> , 1998
1997	Estados Unidos	semillas de alfalfa	85		Taormina <i>et. al.</i> , 2001
1998	Estados Unidos	semillas y/o germinado de alfalfa y trébol	8		Taormina <i>et. al.</i> , 2001
1999	Unidos (ocurrieron 37 brotes)	manzana, carne molida, tacos, lechuga, hamburguesas, ensalada de verduras con mayonesa, carne asada	1897	4	CDC, 2001
2000	Estados Unidos	diversos alimentos	249		CDC, 2002
2001	Estados Unidos	diversos alimentos	3294		CDC, 2003

Fuente: NOCHEBUENA PELCASTRE, Xochitl; QUIÑÓNEZ RAMÍREZ, Elsa y VÁZQUEZ SALINAS, Carlos. Enfermedad de las hamburguesas *Escherichia coli* O157:H7. En: Revista Digital Universitaria. Agosto, 2004, vol. 6, no. 4, p. 4-6

Gray indica que el proceso patogénico de esta cepa es el siguiente: "adherencia laxa al enterocito por la fimbria, seguida de adherencia íntima y lesión de la pared del enterocito por producción de la proteína íntima codificada por el gen *eae* y posterior liberación de verotoxina"⁷⁵.

Gonzales y Herrera⁷⁶ mencionan que esta cepa hace parte de las *E. coli* verotoxigénicas. Estas toxinas actúan a nivel de síntesis de proteínas, porque afectan el ribosoma 60S de las células intestinales o renales del hospedero. También, ocasionan el fenómeno de adherencia e infección. Generalmente, causan cuadros clínicos que van desde lo más leve hasta cuadros clínicos muy serios.

⁷⁵ GRAY, LD. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*. En: Murray PR editor Manual of Clinical Microbiology. 6 ed, Washington: ASM Press: 1995. p. 450-456. Citado por: MARGALL, Núria, *et al.* *Escherichia coli* enterohemorrágica. En: Revista Española de salud pública. Octubre, 1997. vol. 71, no. 5, p. 438

⁷⁶ GONZÁLEZ y HERRERA, Op. cit., p. 388.

López y Guevara⁷⁷ señalan que los síntomas inician con calambres abdominales, pero también pueden provocar diarreas acuosas y sanguinolentas. Pero, cuando son pacientes muy susceptibles como niños menores de cinco años, causa complicaciones como el síndrome hemolítico-urémico (SHU) que sucede cuando, las toxinas o verotoxinas han atacado los glóbulos rojos causando lesión a los riñones; o púrpura trombótica trombocitopénica (PTT) que es una enfermedad en la cual se forman coágulos de sangre en los vasos sanguíneos que pueden traer complicaciones bastante serias en la salud y también se presenta en adultos.

4.5.6 *E. coli* O157:H7 en alimentos. Doyle et al⁷⁸ expresan que los medios de contaminación más frecuentes de *E. coli* O157:H7 son la carne molida de vacuno cruda o mal cocida, la leche cruda y productos obtenidos de ésta como queso fresco. No obstante según Trevisani et al⁷⁹ se ha aislado esta bacteria de otros alimentos como el yogur, ensaladas, mayonesa, embutidos fermentados artesanalmente, lechuga, espinaca, brotes de alfalfa, melones y sidra de manzana no pasteurizada.

Según el Instituto Nacional de Salud⁸⁰ se ha observado que la supervivencia de *E. coli* O157:H7 en alimentos está influenciada por la temperatura, concentración de sal y actividad de agua. Este ente menciona la *E. coli* O157:H7 sobrevive bien en alimentos congelados. De ahí que Trevisani et al⁸¹ mencione que su presencia ha sido observado en hamburguesas almacenadas a -20°C durante 9 meses. En cuanto al pH Gilbert et al⁸² señalan que *E. coli* O157:H7 puede sobrevivir a pH de 3,6 en el medio ambiente. Por su parte en cuanto a condiciones atmosféricas

⁷⁷ LÓPEZ ACUÑA, Williams and GUEVARA DUNCAN, José. Infección por *Escherichia coli* enterohemorrágica. En: Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma. 2002, vol. 3, no. 1, p. 38-41.

⁷⁸ DOYLE, Michael, et al. Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras Bacterias. *Escherichia coli* O157:H7. Zaragoza: Acribia, 2001. 177-198 p. ISBN 84-200-0933-4

⁷⁹ TREVISANI, M, et al. Detection of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine dairy herds in Northern Italy. En: International Journal of Food Microbiology. 2014, vol. 184, p. 45–49.

⁸⁰ Instituto Nacional de Salud, Grupo de Evaluación de Riesgos en Inocuidad de Alimentos. Perfil de riesgo de *Escherichia coli* enterotoxigénica y verotoxigénica en queso fresco. Bogotá, D. C., Colombia. 2015.

⁸¹ TREVISANI. Op. cit., p. 2.

⁸² GILBERT S, et al. (2017). Risk profile: shiga-toxin producing *Escherichia Coli* in raw milk. En: Institute of Environmental Science & Research Limited, Julio, 2017. p. 1-77

según Abdul et al⁸³ la sobrevivencia de *E. coli* O157:H7 en lechugas empacadas bajo condiciones de atmósferas modificadas no se ve afectada.

Por lo tanto es de gran importancia evaluar la susceptibilidad de este microorganismo patógeno, puesto que teniendo en cuenta lo mencionado se puede desarrollar en diversos ambientes y gran gama de alimentos, lo que puede conllevar a afectaciones en la salud del ser humano.

4.5.7 Resistencia en antibióticos, mecanismos de resistencia. Balcázar et al⁸⁴ plantea que los antibióticos han generado gran resistencia bacteriana, debido a que los microorganismos patógenos han conseguido adaptarse a la presencia del agente a partir de mutaciones cromosómicas o adquisición de plásmidos, siendo esta última bastante peligrosa debido a que permite rápidamente la transferencia de resistencia de una bacteria a otra.

Por lo cual Mosquito et al⁸⁵ señala que la resistencia antibiótica es un problema creciente a nivel mundial que se presenta en diversas bacterias, como en la *Escherichia coli*, que tiene altos porcentajes de resistencia para ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina, cloramfenicol y ácido nalidíxico, lo que presume complicaciones para el tratamiento antibiótico cuando este es necesario.

En este sentido Vignoli y Seija⁸⁶ afirman que la resistencia bacteriana es amplia y se pueden encontrar mecanismos de resistencia individuales, que describe la correlación molecular que se da entre la genética y el metabolismo de una célula bacteriana y un antibiótico. Los mismos autores señalan como ejemplo un gen que se encuentra naturalmente codificado en el cromosoma de *E. coli* y que codifica su betalactamasa de clase C (tipo Amp-C), capaz de fragmentar distintos antibióticos betalactámicos.

⁸³ ABDUL RAOUF, U; BEUCHAT, L, AND AMMAR, M. Survival and Growth of *Escherichia coli* O157:H7 on Salad Vegetables. En: APPL. ENVIRON. MICROBIOL. July, 1993, vol. 59, no. 7, p. 1999-2006.

⁸⁴ BALCÁZAR, José Luis, et al. The role of probiotics in aquaculture. En: Veterinary Microbiology. January, 2006, vol. 114, no. 2006, p. 173–186.

⁸⁵ MOSQUITO, Susan et al. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. En: Rev Peru Med Exp Salud Pública. Julio-Septiembre, 2011.vol. 28, no.4, p. 648-656

⁸⁶ VIGNOLI R, Y SEIJA V. Temas de bacteriología y virología médica: Principales mecanismos de resistencia antibiótica. p 649-662

4.6 MICROENCAPSULACIÓN

De acuerdo a lo mencionado por Pérez et al⁸⁷ la microencapsulación es la tecnología de empaquetamiento con materiales de recubrimiento de diferente naturaleza, de sólidos o líquidos para liberar su contenido de manera controlada y protegerlo de condiciones externas que afecten su acción. Adicionalmente Rodríguez y Guerrero⁸⁸ enfatizan en que la microencapsulación puede usarse para mantener la viabilidad de las bacterias probióticas durante el tránsito por el tracto gastrointestinal. Y como señala Villena et al⁸⁹ esta técnica es un buen método para proteger a estos microorganismos.

Según lo citado por Villena et al⁹⁰ hay numerosas técnicas para la creación de microcápsulas y plantea que estas técnicas se pueden dividir en tres grupos: Procesos físicos, como el secado por aspersión; procesos químicos, tal como la polimerización interfacial e inclusión molecular y finalmente, procesos fisicoquímicos tales como coacervación, liposomas y gelificación iónica. Entre los métodos físicos de microencapsulación Pérez et al⁹¹ hace referencia al secado por aspersión, enfriamiento por aspersión, liofilización, recubrimiento por lecho fluidizado, extrusión, fusión, cocrystalización, entre otros.

En general la microencapsulación puede contribuir a la protección de los probióticos, sin embargo, es necesario tener en cuenta que no todas las técnicas son apropiadas para los probióticos. Por consiguiente como lo señala Rodríguez et al “El secado por aspersión es considerado un método adecuado para la estabilización de probióticos, pero las altas temperaturas aplicadas sugieren el uso de sustancias termo-protectoras para mantener la viabilidad”⁹².

⁸⁷ PÉREZ LEONARD, Heidy, *et al.* Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. En: ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar. Enero-Abril, 2013. vol. 47, no. 1, p. 14-25

⁸⁸ RODRÍGUEZ GUERRERO, V. y GUERRERO BELTRÁN, J. Probióticos, resistencia gastrointestinal y microencapsulación. En: Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. 2010. vol.4, no. 2, p. 48-57.

⁸⁹ VILLENA, Martín, *et al.* Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. En: ARS Pharmaceutica. Julio, 2009. vol. 50, no.1, p. 43-50.

⁹⁰ *Ibid.*, p. 44.

⁹¹ PÉREZ, Heidy. *Op. cit.*, p. 19.

⁹² RODRÍGUEZ BARONA, Sneyder; MONTES, Luz y RAMÍREZ, Diógenes. Microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersión en presencia de prebióticos. En: Vitae. Enero-Abril, 2012. vol. 19, no. 1, p. 186-188.

4.6.1 Microencapsulación de *Lactobacillus plantarum*. La microencapsulación de *L. plantarum* se hace llamativa, por la amplia utilización de este probiótico en la industria alimentaria. Pues como indica Montes⁹³ la microencapsulación de probióticos ha permitido el desarrollo de nuevos alimentos funcionales, mejorando la estabilidad en el procesamiento y almacenamiento, además de la supervivencia de estas bacterias al pasar por el tracto gastrointestinal.

En este sentido se han desarrollado diferentes estudios de la microencapsulación de *L. plantarum*, como el estudio de Hassanzadeh et al⁹⁴ que reportó la microencapsulación de *L. plantarum* inmovilizada en base de zeolita y encapsulada en perlas de alginato-zeolita-almidón a través del método de extrusión, logrando que las células encapsuladas tuvieran mejor capacidad biológica, además de que la bacteria tuviera un aumento aproximado de 4.1 (log UFC/g) en condiciones estomacales y un aumento de 5.2 (log UFC/g) en la tasa de supervivencia en condiciones gastrointestinales.

Por otra parte Défaz y Moreira⁹⁵ evaluaron la supervivencia de *L. plantarum* encapsulado y agregado en yogur, utilizando un medio encapsulante a base de alginato de sodio gelificado mediante el método de secado por aspersión, concluyendo que la encapsulación mejoró significativamente la supervivencia del prebiótico, puesto que mantuvo una concentración bacteriana viable de 6.03 Log UFC/g durante los 30 días de vida útil del yogur.

4.6.2 Técnica secado por aspersión (Spray Drying). De Araújo et al⁹⁶ refieren que esta técnica consiste en atomizar una solución, emulsión o suspensión que contenga el compuesto o microorganismos a encapsular y un material protector dentro de una cámara con un gas caliente, el cual promueve la evaporación del líquido, logrando que los microorganismos queden dentro del material encapsulante dando lugar a la formación de micropartículas.

⁹³ MONTES. Op. cit., p. 30.

⁹⁴ MOHAMMAD HASSANZADEH, Azad, et al. Immobilization and microencapsulation of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* using zeolite base and evaluating their viability in gastroesophageal-intestine simulated condition. En: Ars Pharmaceutica. 2017. vol. 58. No. 4, p. 163-170.

⁹⁵ DÉFAZ GAVILANES, Andrés Sebastián y MOREIRA CÁLIX, Juan Fernando. Evaluación de alginato de sodio en la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en yogur sin sabor. Tesis Ing. en Agroindustria Alimentaria en el grado Académico de Licenciatura. Zamorano – Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 2017. 11 p.

⁹⁶ DE ARAÚJO, Natalia, et al. Técnicas para la microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad: Una revisión. En: Revista Alimentos Hoy. Diciembre, 2015, vol. 23, no. 36, p. 112-126.

Araújo et al⁹⁷ afirman que la viabilidad de los probióticos sometidos al secado por aspersión depende en gran medida de las temperaturas de entrada y de salida utilizadas en el proceso, dado que se puede provocar daños en la pared celular por las altas temperaturas. Por lo que Rodríguez et al⁹⁸ y Ávila et al⁹⁹ sugieren el uso de sustancias termo protectoras como la inulina que incrementa la viabilidad de los microorganismos después del secado y durante el almacenamiento y De Araújo et al¹⁰⁰ proponen la maltodextrina utilizada principalmente como material pared en el secado por aspersión por su efecto protector frente a altas temperaturas y su factor estimulante del crecimiento de los microorganismos. Es decir la inulina es un material encapsulante con características prebióticas y la maltodextrina brinda una acción protectora alrededor de la BAL.

4.6.3 Inulina. Lara et al¹⁰¹ menciona el origen de la obtención de la inulina en el año de 1804 cuando un científico alemán al hacer investigación en plantas, aisló por primera vez inulina a partir de *Inula helenium*, además la describe como un polisacárido tipo fructano, es decir compuesto de unidades de fructosa presente en numerosas especies vegetales como por ejemplo achicoria (*Cichorium intybus*), diente de león (*Taraxacum officinale*), dalia (*Dahlia sp*) entre otros. Además, es un agente con propiedades prebióticas ya que no se puede digerir.

Por su parte De Araújo et al¹⁰² manifiestan que la inulina además de brindar un efecto protector a los microorganismos sometidos a las altas temperaturas en el caso de secado por aspersión, los protege durante su paso por el tracto gastro-intestinal y adicionalmente es un prebiótico, es decir, es un carbohidrato no digerible que estimula selectivamente las cepas probióticas ayudándolas a sobrevivir e implantarse en el intestino.

4.6.4 Maltodextrina. Es un polímero de glucosa que se obtiene por la hidrólisis de almidón o fécula. Ahora bien, Lopera et al describen la maltodextrina de la siguiente forma:

Polisacárido con un peso molecular promedio de 1800 g/mol, no edulcorante, con un aporte nutricional de 4 calorías por gramo, obtenido de la hidrólisis parcial, ácida y/o enzimática del almidón de papa, arroz o maíz. Su composición química consiste en

⁹⁷ Ibid., p. 118.

⁹⁸ RODRÍGUEZ; MONTES y RAMÍREZ. Op. cit., p. 186.

⁹⁹ AVILA REYES, Sandra, et al. Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. En: Carbohydrate Polymers, 2014. 102, p. 423-430.

¹⁰⁰ DE ARAÚJO, Natalia. Op. cit., p. 118.

¹⁰¹ LARA FIALLOS, Marco, et al. Avances en la producción de inulina. En: Revista Tecnología Química. Marzo, 2017, vol. 37, no. 2, p. 220-238.

¹⁰² DE ARAÚJO. Op. cit., p. 117.

unidades de D-glucosa unidas con enlaces α (1-4) y con un bajo número de enlaces α -(1,6) en posición aleatoria. Se caracteriza por tener entre 2 y 20 equivalentes de dextrosa (DE). Se ha determinado que para microencapsulación son más efectivas las MD con 10-20 equivalentes de dextrosa. La aplicación de la MD en el proceso de encapsulación está asociada a la baja viscosidad a altos contenidos de sólidos, buena solubilidad, capacidad de formar películas y bajo costo¹⁰³.

¹⁰³ LOPERA, Seneida, *et al.* Desarrollo y caracterización de micropartículas de ácido fólico formadas por secado por aspersión, utilizando goma arábica y maltodextrina como materiales de pared. En: Revista de la facultad de química farmacéutica. Marzo, 2009, vol. 16, no. 1, p. 55-65.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 LOCALIZACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio del grupo de investigación Fise-Probiotec situado en el bloque de laboratorios de docencia y en los laboratorios especializados de la Universidad de Nariño sede Torobajo, ubicada en el municipio de Pasto, departamento de Nariño.

5.2 MATERIALES Y EQUIPOS

5.2.1 Materiales. En el trabajo de campo de esta investigación se utilizaron los siguientes materiales:

- ❖ Juego de 5 antibióticos (Cefotaxina, Penicilina, Gentamicina, Dicloxacilina, Ciprofloxacina, Cefalotina) con 50 sensidiscos cada uno.
- ❖ Cepa de *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014TM®)
- ❖ Cepa de *Escherichia coli* O157:H7®
- ❖ Agar MRS.
- ❖ Agar Müeller Hinton
- ❖ Caldo BHI (Caldo Infusión Cerebro)
- ❖ Caldo MRS
- ❖ Agar nutritivo
- ❖ Agar McConkey
- ❖ Agua peptonada buferada
- ❖ Inulina
- ❖ Maltodextrina
- ❖ Discos papel (PADS)
- ❖ Otros

5.2.2 Vidriería. Los instrumentos de vidriería adecuados para la ejecución de las pruebas de laboratorio fueron:

- ❖ Erlenmeyers de 250 mL, 500 mL, 1000 mL
- ❖ Beakers de 50 mL 100 mL y 300 mL
- ❖ Pipetas volumétricas de 1 mL, 5 mL, 10 mL
- ❖ Cajas Petri desechables
- ❖ Balones aforados de 250 mL
- ❖ Tubos de ensayo tapa rosca
- ❖ Perlas de vidrio
- ❖ Probetas de 100 mL y 500 mL

5.2.3 Reactivos. Para la realización de las pruebas del presente trabajo se destinaron los siguientes reactivos.

- ❖ Peróxido de hidrogeno H_2O_2 30% y 3,6%
- ❖ Sales biliares y bilis bovina sigma
- ❖ Glucosa anhidra
- ❖ Azul de anilina
- ❖ Reactivos tinción de Gram
- ❖ Fenolftaleína
- ❖ Antrona
- ❖ Hidróxido de sodio NaOH 0,2 N
- ❖ Ácido sulfúrico 95-97%
- ❖ Tartrato de sodio potasio
- ❖ Hidróxido de sodio 1 N
- ❖ Agua destilada
- ❖ Sulfato de cobre
- ❖ Reactivo de Folin Cicolteu
- ❖ Seroalbumina bovina

5.2.4 Equipos. Para cumplir con los objetivos planteados y desarrollar correctamente las actividades propuestas, se hizo uso de los siguientes equipos:

- ❖ Autoclave
- ❖ Equipo Spray Drying
- ❖ Balanza analítica
- ❖ Incubadora
- ❖ Cámara de flujo laminar
- ❖ Espectrofotómetro uv-vis lambda 11
- ❖ Microscopio
- ❖ pH metro
- ❖ Crio centrífuga
- ❖ Shaker
- ❖ Estufa de luz
- ❖ Vortex
- ❖ Micro pipetas volumen variable de 10-100 μ L y 100-1000 μ L

5.3 RECONSTITUCIÓN, SIEMBRA Y CONSERVACIÓN DE *Escherichia coli* O157:H7

5.3.1 Reconstitución. Se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y en un medio específico para las bacterias. (Anexo B).

5.3.2 Siembra. Trascurridas 24 horas de reconstituida la cepa se confirmó el crecimiento y desarrollo de esta y se continuó a realizar el repique en tubos con caldo BHI (Infusión cerebro corazón) y se incubó por 24-48 horas a 38°C. Este procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar tipo II, junto a mechero para evitar contaminación del medio. Al día siguiente, se revisó nuevamente su crecimiento en el caldo BHI para constatar su morfología macroscópica como microscópicamente y mediante coloración de Gram se confirmó su pureza.

5.3.3 Conservación. La conservación de las cepa de *Escherichia coli* O157:H7, posterior a la reconstitución se realizó cada ocho días, en medio líquido en tubos con caldo BHI, estos preservados se incubaron por 24 horas a 38°C luego se almacenaron refrigerados en nevera a 4°C. Así mismo cada vez que se realizó un nuevo repique o siembra se confirmó su pureza mediante coloración de Gram.

5.4 RECONSTITUCIÓN, CONSERVACIÓN, SIEMBRA Y CULTIVO DE *Lactobacillus plantarum*

5.4.1 Reconstitución. Se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y en un medio específico para la bacteria con el fin de optimizar su crecimiento y recuperación (Anexo A).

5.4.2 Siembra. Trascurridas 24 horas de reconstituida la cepa se confirmó el crecimiento y desarrollo de ella y se continuó a realizar el repique con asa de argolla por el método de estrías en cajas de agar MRS comercial con azul de anilina, y se incubó por 24 horas de 35 a 37°C. De igual manera, se hizo el repique en tubos con caldo MRS. Este procedimiento se realizó en cámara de flujo laminar tipo II, junto a mechero para evitar contaminación del medio. Al día siguiente, se revisó nuevamente su crecimiento en el agar MRS y para constatar su morfología macroscópica como microscópicamente y mediante coloración de Gram se confirmó su pureza.

5.4.3 Conservación. Posterior a la reconstitución se realizó un repique en cajas con agar MRS azul de anilina y en tubos con caldo MRS, posteriormente se incubó por 20 horas a 35-37°C, después de este tiempo se realizó una tinción de Gram. Este procedimiento se realizó cada 15 días para mantener una viabilidad adecuada de la cepa.

5.4.4 Cultivo del inóculo de *Lactobacillus plantarum*. Se inoculó una asada del cultivo en un erlenmeyer que contenía 40 mL de caldo MRS comercial estéril. Se incubaron por 24 horas a 35° a 37°C. Nuevamente se realizó un repique de 4 mL de este caldo a otros 40 mL de caldo MRS comercial y se incubó en las condiciones antes mencionadas.

Según Crueger y Crueger¹⁰⁴, el porcentaje de inóculo se debe ajustar al 10% v/v, para iniciar la fermentación. Después de este tiempo se calculó el número de bacterias por mL (Anexo C). Del caldo MRS comercial con el inóculo se tomó 1 mL y se vertió en 9 mL de solución de agua peptonada. Cuando se presentó mayor población de la establecida, se adicionó caldo estéril, teniendo en cuenta el siguiente cálculo matemático de proporcionalidad de acuerdo a Guerrero et al¹⁰⁵ y Montes et al¹⁰⁶.

M_1 = población o densidad celular que se debe ajustar

M_2 = 0,125 densidad óptica equivalente a $1,50 \times 10^8$ bact/mL. Densidad utilizada primera fermentación.

V_1 = 1 mL volumen proveniente del inóculo total (10/90)

X_1 = cantidad que contiene M_2

V_2 = lo que se agrega a 1 mL para ajustar a $1,50 \times 10^8$ bact/mL.

V_3 = 100 mL cantidad total del inóculo

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

Encontramos entonces X_1

M_1 ----- M_2

M_2 ----- X_1

¹⁰⁴ CRUEGER, W. y CRUEGER, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Traducido por Paloma Liras Padín. 3 ed. Madrid. España: Ed. Acribia, 1993, p.118. ISBN: 8420007439, 9788420007434.

¹⁰⁵ GUERRERO, Milena, *et al.* Efecto inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* sobre el enteropatógeno *Vibrio cholerae* 01 ogawa, in vitro. En: revista del centro de estudios en salud. 2002, vol. 1, no. 3, p. 8-14.

¹⁰⁶ MONTES CEBALLOS, Andrea del Rocío; SANTACRUZ BERNAL, Ayda del Pilar y SAÑUDO DIAZ, Jessie Nadenka. Efecto in vitro de *Lactobacillus casei* subsp. *rhannosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. Trabajo de grado Biólogo con énfasis en Microbiología. Pasto-Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, 2003. 146 p.

$$X_1 = \left(\frac{M_2 * V_1}{M_1} \right)$$

Encontramos entonces V_2

$$V_2 = V_1 - X_1$$

Finalmente se obtiene el valor de X_2

$$V_1 \text{ ----- } V_2$$

$$V_3 \text{ ----- } X_2$$

$$X_2 = \left(\frac{V_3 * V_2}{V_1} \right)$$

El valor de X_2 , es la cantidad que se debe agregar para ajustar la población.

5.5 PODER DE INHIBICIÓN FRENTE A BACTERIA PATÓGENA Y COMPARACIÓN FRENTE A ANTIBIÓTICOS

5.5.1 Ensayos de inhibición *in vitro* y determinación de biocinas. La selección de cepas inhibidoras de patógenos, se hizo siguiendo la metodología de Tagg y McGiven¹⁰⁷ y Ramírez et al¹⁰⁸. La inhibición se determinó por el halo producido alrededor del disco de agar impregnado de *L. plantarum* después de 12 horas de crecimiento en el medio donde creció la *E. coli* O157:H7.

El tamaño del halo se determinó teniendo en cuenta la distancia desde el borde del disco de agar de *L. plantarum* hasta el extremo del halo formado por la inhibición de *E. coli* O157:H7. El tamaño crítico del halo para determinar si hubo inhibición fue igual o superior a 2 mm de acuerdo a lo establecido por Baur et al¹⁰⁹. La prueba fue efectuada con la bacteria *E. coli* O157:H7. La determinación de la acción inhibitoria por sobrenadantes (posiblemente bacteriocinas), neutralizadas a pH 6.0 y concentraciones de 75 µL, 85 µL y 95 µL para el método de discos impregnados, 80 µL, 100 µL y 120 µL para los métodos de difusión en cilindro

¹⁰⁷ TAGG, J y MCGIVEN, A. Assay system for bacteriocins. En: Applied Microbiology. Mayo, 1971. vol. 21, no. 5, p. 943.

¹⁰⁸ RAMÍREZ, José. Op. cit., p. 9.

¹⁰⁹ BAUR, A, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardize single disk method. En: American Journal of Clinical Pathology. Agosto, 1985, no 32, p. 18.

plástico y difusión en cilindro plástico doble capa y por último concentraciones de 50 µL, 75 µL y 100 µL con el método de discos de agar impregnados del sobrenadante (Anexo E).

Los ensayos de inhibición frente a los antibióticos: Penicilina (P) 10 IU, Cefalotina (KF) 30 µg, Ciprofloxacina (CIP) 5 µg, Gentamicina (CN) 10 µg, Dicloxacilina (DCX) 1 µg, Cefotaxina (CTX) 30 µg, se realizaron para *L. plantarum* y *E. coli* O157:H7 mediante la metodología de Bauer et al¹¹⁰ (Anexo D).

5.6 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN

5.6.1 Características de la cinética. Se utilizó el medio de cultivo MRS para verificar las mejores condiciones para producción de biomasa de *L. plantarum* en la cinética de fermentación.

Cuadro 4. Composición medio de cultivo MRS.

Medio	Composición
MRS	D-glucosa 20g/L; extracto de carne 8 g/L; extracto de levadura 4g/L

Fuente: JURADO GAMEZ, Henry; AGUIRRE, Diana Marcela y RAMÍREZ TORO, Cristina. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. En: Revista MVZ Córdoba. Agosto, 2009, vol. 14, no. 2, p.1723-1735.

Las cinética de fermentación se efectuó en un Erlenmeyer con 2100 mL a 32°C, en agitación constante en shaker, no se realizó control de pH considerando que el microorganismo seleccionado es resistente a pH bajo. Las variables evaluadas durante la cinética fueron las siguientes:

- ❖ Conteo de microorganismos viables en placa (UFC/150 µL).
- ❖ Determinación de pH.
- ❖ Determinación de producción de proteínas totales.
- ❖ Determinación de consumo de azúcares totales.
- ❖ Determinación de Producción de ácido láctico.
- ❖ Evaluación de Producción de biomasa.

Las mediciones o toma de muestras se realizaron cada 3:00 horas durante 24 horas. Como son mediciones que se hicieron en el tiempo, estos datos se

¹¹⁰ BAUR. Op. cit., p. 18.

analizaron usando un diseño experimental de medidas repetidas en el tiempo y análisis de regresión lineal. La Tabla 1 muestra los tiempos en los cuales se evaluaron la cantidad de colonias por μL .

Para determinar el comportamiento de las variables a través del tiempo, se evaluaron tres modelos polinomiales (lineal, cuadrático y cúbico), teniendo en tiempo como la variable dependiente. De igual manera, para determinar la relación entre el crecimiento (Ln UFC) con las variables acidez, pH, azúcar y proteína se utilizó un análisis de correlación, y las variables significantes se modelaron con regresión.

Tabla 1. Diseño de medidas repetidas para la determinación del medio de cultivo

Tipo de bacteria		<i>Lactobacillus plantarum</i>									
Horas		0	3:00	6:00	9:00	12:00	15:00	16:00	18:00	21:00	24:00
Medio de cultivo	MRS										

5.6.2 Conteo de microorganismos viables en placa UFC/ 150 μL . La técnica de conteo en placa propicia la información del número de células viables durante el proceso en términos de UFC/ 150 μL , permitiendo determinar la evolución de la producción de biomasa. Para los conteos se diluyó 1 mL de muestra en 9 mL de agua peptonada al 0,1% y se realizó diluciones decimales; de cada dilución se transfirió a cajas de Petri con medio MRS con azul de anilina 150 μL para siembra en superficie. Las cajas se llevaron a incubación a 37°C y se observaron entre las 24 y 48 horas. Se consideraron las cajas de Petri con conteos de UFC/ μL entre 30 y 300 colonias. El número de colonias se multiplicó por el inverso de la dilución y por 10 para obtener las UFC/ μL formadas de acuerdo a lo establecido por Lanara¹¹¹.

5.6.3 Determinación de pH. La evolución del pH se verificó mediante la medición con un potenciómetro digital (Jenco® VisionPlus).

5.6.4 Determinación de proteínas método de Lowry modificado¹¹². Las proteínas reaccionaron con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un complejo color azul (debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína). La intensidad

¹¹¹ LANARA L. Métodos microbiológicos. 3ªed Brasilia: Ministerio de Agricultura; 1981.

¹¹² LOWRY, Oliver; *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. En: Journal Biological Chemistry. Mayo, 1951, vol. 193, no. 1, p. 265-275.

del color depende del número de aminoácidos presentes y enlaces peptídicos y cambió según la clase de proteína; la solución azul muestra una absorbancia máxima a 750 nm. Rango de linealidad entre 0-300 mg/L.

Se ajustó 1 mL de patrones de la curva estándar y se realizó muestras por duplicado. Posteriormente se adicionó 0.5 mL de NaOH 2N a todos los tubos, colocándolos luego en baño María a temperatura de ebullición durante 10 minutos, se dejó reposar en baño de agua fría, y luego se agregó 0.5 mL de H₂SO₄ 2.6 N. Luego de que se agrega 0.9 mL de solución A, se llevó por 10 minutos a baño María a 50°C, y se dejó reposar en baño de agua fría. Posteriormente se añadió 0.1 mL de solución B, se colocó por 10 minutos en la oscuridad, en el instante se preparó la solución C y consecutivamente se adicionó 3 mL (Anexo F).

Se preparó las soluciones de la siguiente manera:

- ✓ Solución A: Se diluyó 0.5 g de tartrato de sodio potasio, 25 g de carbonato de sodio, 125 mL de hidróxido de sodio 1 N en 125 mL de agua destilada.
- ✓ Solución B: Se disolvió 2 g de tartrato de sodio potasio, 1 g de sulfato de cobre en 10 mL de hidróxido de sodio 1 N.
- ✓ Solución C: Se preparó una solución de agua destilada y reactivo de Folin Cicolteu en proporción 14:1. (Preparada al momento de usar).
- ✓ Solución estándar de seroalbumina bovina: Se disolvió la Seroalbumina en 15 mg en 50 mL de agua destilada el resto se almacenó en congelador. Concentración final 300 mg/L.

5.6.5 Determinación de consumo de azúcares totales. La cuantificación de azúcar permite determinar el consumo para el crecimiento de los microorganismos y establecer la relación de consumo/crecimiento celular. Los azúcares fueron determinados por el método de Dubois¹¹³(Anexo G), conocido como el método de Antrona. Se preparó previamente una curva patrón con diferentes concentraciones de la solución patrón glucosa; los valores obtenidos de la lectura de densidad óptica (D.O.) a 525 nm. Se graficó versus la concentración en mg/L para obtener la ecuación de la recta.

La dosificación de los azúcares presentes en las muestras en estudio fue efectuado sobre 2.5 mL de muestra previamente diluida en agua destilada y se

¹¹³ DUBOIS, Michel, *et al.* Colorimetric method for determination of sugar and related substances. En: Anal Chem. 1956, vol. 28, no. 3, p. 350-356.

adicionó 5 mL de Antrona preparada en ácido sulfúrico. Los valores obtenidos de las muestras se calcularon por la ecuación de la recta, obtenidos en la curva patrón y fueron multiplicados por el factor de dilución.

5.6.6 Determinación de producción de ácido láctico. Se realizó aplicando el método de titulación con Hidróxido de sodio 0,1 N.

5.6.7 Evaluación de la producción de biomasa. Los resultados obtenidos permitieron determinar si la cepa fue la más adecuada en términos tiempo-tasa de crecimiento durante el proceso de fermentación para establecer el tiempo de duración en la producción de biomasa.

Los cálculos de fermentación para la cinética fueron los definidos por Crueger y Crueger¹¹⁴ y Rodríguez et al¹¹⁵. El cálculo de la velocidad específica de crecimiento ($v_{\text{máx.}}$), tiempo de duplicación y tiempo de generación y cosecha máxima se realizó de acuerdo a lo establecido por Gamazo et al¹¹⁶ modificado (15), se calculó a partir de la pendiente arrojada producto de graficar el $\ln x$ (UFC/150 μ l) vs tiempo (horas), hasta la fase logarítmica.

$$y = mx + b$$

Donde m es la pendiente y por lo tanto es $v_{\text{máx.}}$

El tiempo de duplicación celular (td), se determinó teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$td = \frac{\ln 2}{v_{\text{max}}}$$

El tiempo que tarda en duplicarse la población o tiempo de generación (g) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$g = \ln 2 / v_{\text{max}}$$

La cosecha máxima fue calculada mediante la siguiente expresión:

¹¹⁴ CRUEGER. Op. cit., p. 118.

¹¹⁵ RODRÍGUEZ, Leon et al. Rendimiento verdadero y aparente y coeficiente de mantenimiento y su importancia en la cinética de la fermentación. (Eds) New Horizons in Biotechnology. Springer, Dordrecht. 2003

¹¹⁶ GAMAZO, C; LÓPEZ, GI y DÍAZ, R. Manual práctico de microbiología. 3rd ed. Barcelona, España: Ed Masson.;2005

$$M = M_t - M_o$$

Siendo, M_t el crecimiento bacteriano en la fase estacionaria y M_o el crecimiento al inicio de la cinética de fermentación expresado en Ln UFC.

5.6.8 Identificación de Péptidos del Sobrenadante por HPLC – DAD. Las muestras para análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se prepararon de la siguiente forma:

Se cultivó la cepa en caldo MRS por 24 horas a 37°C, posteriormente se ajustó por espectrofotometría a una densidad óptica 0.125 nm en escala McFarland patrón 0,5 equivalente a una concentración de $1,5 \times 10^8$ bacterias/mL. Luego se transfirió muestras en tubos Eppendorf y se centrifugó a 18.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. Por último el sobrenadante se filtró utilizando membranas PVDF de 0,2 micras y se llevó a lectura.

5.6.9 Identificación de aminoácidos del sobrenadante de la cepa láctica y la cepa patógena por HPLC-DAD. Se cultivaron las cepas en caldo MRS y BHI respectivamente por 24 horas a temperatura entre 37°C, posteriormente se ajustaron por espectrofotometría a una densidad óptica 1.00 en escala McFarland patrón 4 equivalente a una concentración de 1.2×10^9 bacterias/mL. Luego se transfirieron las muestras en tubos Eppendorf manteniéndolas a una temperatura de 4°C. Seguidamente se pasó por filtros de jeringa de PVDF, Pall de 0,25 μ m, 1,0 mL de muestra y se llevó a lectura.

La lectura se realizó con las siguientes especificaciones: Equipo: Cromatografo Líquidos HPLC Waters- Bomba binaria 1525; Columna: C18 300Å (Júpiter, Phenomene x150 mm x 4.6 mm); Detector: PDA 2998 a 214 y 280nm Scan (200-350nm) é Inyector: Rheodyne Loop 20 μ l.

5.7 RESISTENCIA A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA

Según la metodología de Cai et al¹¹⁷ se realizaron pruebas de crecimiento de *L. plantarum*, efectuando pruebas de viabilidad en agar MRS por 48 horas a 37°C y 45°C. Fueron seleccionadas las cajas de Petri con viabilidades de 30 y 300 UFC/150 μ L y valores de dilución iguales o superiores a 10^9 UFC/mL.

¹¹⁷ CAI, Y, *et al.* Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. En: J Gen Appl Microbiol. Agosto, 1999, vol. 45, no. 4, p. 177-184.

5.8 PRODUCCIÓN DE GAS

Para verificar la producción de gas a partir de glucosa se empleó caldo MRS con 5% de glucosa anhidra usando tubos Durham para verificar la presencia de gas siguiendo el método de Cai et al¹¹⁸.

5.9 ACTIVIDAD DE CATALASA

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno (30%) sobre una gota con colonias de las bacterias lácticas; la reacción resultante se considera como positiva por la formación de burbujas de acuerdo a Dahl et al¹¹⁹.

5.10 MICROENCAPSULACIÓN DE *Lactobacillus plantarum*

5.10.1 Obtención de biomasa microbiana. El inóculo de *L. plantarum* se obtuvo de la siguiente manera: en un Erlenmeyer con 40 mL de caldo MRS estéril, se depositó una alícuota de la cepa láctica y se llevó a incubación a 35°C por 24 h (preparado A). Al terminar el periodo de incubación, se tomó 4 mL del preparado A y se depositó en un nuevo Erlenmeyer con otros 40 mL de caldo MRS estéril al cual se denominó preparado B, este se incubó a la misma temperatura y tiempo de la primera incubación. El ajuste del inóculo se realizó a 10% v/v mediante la metodología de Crueger y Crueger¹²⁰, para ello se prepararon 90 mL de caldo MRS estéril y se añadió 10 mL del preparado B. Después se realizó el conteo de bacterias por mL. Para el conteo se tomó 1 mL y se llevó a lectura directa en espectrofotómetro a 625 nm. En los casos donde la población fue mayor a la establecida, se adicionó caldo estéril mediante cálculo de proporcionalidad.

¹¹⁸ CAI, Op. cit., p.

¹¹⁹ DAHL, Thomas; MIDDEN, Robert and HARTMAN, Philip. Comparison of killing of gram-negative and gram-positive Bacteria by Pure Singlet. En: Journal of Bacteriology. Abril, 1989, vol, 171, no. p. 47.

¹²⁰ CRUEGER. Op. cit., p. 118.

5.10.2 Microencapsulación por la técnica spray drying (secado por aspersión) de *Lactobacillus plantarum*. De acuerdo a la metodología descrita por Rodríguez et al¹²¹ para la investigación se preparó para *L. plantarum* un inóculo de 400 mL al 15 %p/v (60 g de Maltodextrina y 60 g de Inulina en 280 mL de Inoculo bacteriano previamente ajustado) en relación 1:1 p/p la cuales fueron agitadas hasta homogenizar.

Se utilizó el equipo de secado por aspersión Secador Spray Bilon 6000s®, con una temperatura de entrada de 170°C y una temperatura de salida en un rango de 65 - 67°C. Con ciclo completo de 2 horas y 30 minutos. El material microencapsulado se empacó en recipientes plásticos esterilizados oscuros y se almacenaron a temperatura ambiente (20±2 °C).

5.11 ESTUDIO DEL MICROENCAPSULADO DE *Lactobacillus plantarum*

5.11.1 Estudio de Supervivencia y estabilidad de *L. plantarum* microencapsulado. Para evaluar el efecto de los materiales microencapsulantes (Maltodextrina e Inulina) sobre la viabilidad de *L. plantarum* microencapsulado se siguió lo establecido en la metodología de Rodríguez et al¹²² donde el número de células viables fue determinado antes y después de la microencapsulación después de un periodo de 45 días de haberse almacenado a 20±2 °C. Se emplearon como criterios de estabilidad: la Viabilidad de la BAL durante el almacenamiento (>10⁸ UFC/g) y eficiencia de microencapsulación.

5.11.1.1 Viabilidad. De acuerdo a lo propuesto por Rodríguez et al¹²³ se realizó el recuento de células viables sobre 1 g de material encapsulado, rehidratado a temperatura ambiente en 9 mL de agua de peptona tamponada al 0.1 % p/v (pH 7.2±2) homogeneizado en vórtex y se dejó reposar durante 30 minutos para favorecer la liberación del microorganismo. Un volumen de 150 µL de dilución se sembró en superficie sobre agar MRS con azul de anilina (380 µL azul anilina /100 mL agua destilada) y se llevó a incubación en condiciones aerobias a 37°C por 48 horas. Los recuentos fueron realizados por duplicado y expresados como UFC/g en base seca, para cada condición experimental de acuerdo a Semniov et al¹²⁴.

¹²¹ RODRÍGUEZ BARONA, Sneyder; GIRALDO, Gloria y MONTES, Luz. Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebióticos. En: Información tecnológica. 2016, vol. 27, no. 6, p. 135-144.

¹²² Ibid., p. 137

¹²³ Ibid., p. 137

¹²⁴ SEMYONOV, D, et al. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. En: Food Research International. 2010, vol. 43 p. 193- 202.

El porcentaje de viabilidad para cada muestra se calculó según la ecuación (1).

$$\%Viabilidad = \left(\frac{N}{N_0}\right) * 100(1)$$

Donde N_0 es el número de bacterias por 150μL de solución antes del proceso y N es el número de bacterias por 150μL de solución después de la etapa de secado.

5.11.1.2 Eficiencia de la Microencapsulación de *Lactobacillus plantarum*.

Según lo descrito por Gonzales et al¹²⁵ para evaluar la eficiencia de la microencapsulación, se tomó 2 g de material microencapsulado y se diluyeron en 18 mL de agua destilada y fueron centrifugadas a 5000 r.p.m. en una criocentrífuga (HERMLE 2326K, Germany) por 15 minutos con el fin de separar las células libres de *L. plantarum*. Posteriormente, se determinó la concentración bacteriana en el sobrenadante y se calculó la eficiencia de encapsulación (%EE) con la siguiente fórmula:

$$EE (\%) = \left(\frac{A - B}{A}\right) \times 100$$

Donde A es la concentración bacteriana antes de la microencapsulación y B es la concentración de la bacteria después de microencapsular encontrada en el sobrenadante.

5.11.2 Caracterización Física. Para caracterizar físicamente el microencapsulado se valoraron cuatro variables, humedad, actividad de agua, solubilidad y humectabilidad.

¹²⁵ GONZÁLEZ CUELLO, Rafael; PÉREZ MENDOZA, Jaime, & MORÓN ALCÁZAR, Lena. Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a Jugos Gástricos Simulados. En: Información tecnológica. 2015, vol. 26, no. 5, p. 11-16.

5.11.2.1 Humedad. Para determinar la humedad se tomó 2 g de material microencapsulado y se realizó en el Determinador de Humedad KERN DBS 60-3 (Balingen – Germany) a una temperatura de 105°C con una Resolución: 0,001 g. (0.01%). El resultado se expresó en porcentaje base seca (% bs).

5.11.2.2 Actividad de agua. La actividad de agua se tomó 2 g de material microencapsulado y se determinó mediante lectura directa usando un Termohigrómetro Hygrolab Rotronic (Nürnberg-Alemania) previamente calibrado. La actividad de agua (A_w). El resultado se expresó en porcentaje base seca (% bs).

5.11.2.3 Solubilidad. La solubilidad se obtuvo al disolver 1 g de muestra en 100 mL de agua destilada, ésta solución se mantuvo durante 5 minutos a una temperatura de 30±2°C en incubadora (Mettler, Germany). La suspensión se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se tomó una alícuota de 25 mL del líquido sobrenadante y se transfirió a una caja petri previamente pesada; se llevó a una estufa (Mettler, Germany) a 105°C por 5 h hasta que alcanzó peso constante hasta observarse una muestra seca. Los sólidos recuperados se pesaron después del secado (m_f) y se calculó el porcentaje de solubilidad con la diferencia de pesos mediante la ecuación.

$$\text{Solubilidad} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) 100\% \quad (1)$$

Donde, m_i es 0,25 g (1g/100 mL=0,01 g/mL x 25 mL del líquido sobrenadante = 0,25 g).

5.11.2.4 Humectabilidad. El tiempo de humectación de *L. plantarum* microencapsulado fue determinado por el método de humectación estática Freudig et al¹²⁶ modificada por Ceballos et al¹²⁷ y Rodríguez et al¹²⁸ y adaptada por los autores. Para esto se utilizó un beaker de 100 mL de 5 cm x 7 cm. Una cantidad de microencapsulado (1 g), se colocó en una lámina portaobjetos encima del beaker. Posteriormente, se retiró el microencapsulado de la lámina y sin perturbación se puso en contacto con el agua. El tiempo de humectación expresado en minutos correspondió al tiempo que se tardó la inmersión completa de un 1 g muestra de microencapsulado depositado suavemente sobre 100 mL de agua a 20°C.

5.11.3 Caracterización estructural. En la determinación estructural del microencapsulado de *L. plantarum* se apreció los valores del tamaño de las microcápsulas, así como la forma de estas.

5.11.3.1 Morfología y tamaño de las microcápsulas. La morfología y tamaño de las microcápsulas fueron determinadas mediante un Microscopio Electrónico de Barrido FEG (Field Emission Gun) QUANTA 650 FEG. Para ello, las muestras se colocaron sobre stubs metálicos con cinta adhesiva de carbón, se recubrieron con oro en un equipo de recubrimiento Quorum 150ES. Las imágenes fueron tomadas con las siguientes características: alto vacío; voltaje de aceleración 10kV; Detector para imágenes: Electrones secundarios (SE): everhart thornley detector ETD. Para esta determinación las muestras se enviaron al Centro de Microscopia y Microanálisis, Bogotá, Colombia.

¹²⁶ FREUDIG, B; HOGEKAMP, S y SCHUBERT, H. Dispersión of powders in liquids in a stirred vessel. Chemical Engineering and Processing. 1999; 38:525–532.

¹²⁷ CEBALLOS, Adela María; GIRALDO, Gloria Inés y ORREGO, Carlos Eduardo. Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. En: Journal of Food Engineering. Febrero, 2012, 111: 360–365.

¹²⁸ RODRÍGUEZ; GIRALDO y MONTES. Op. cit., p. 138.

5.11.4 Exposición a condiciones gastrointestinales simuladas. Para exponer el material microencapsulado a condiciones gastrointestinales se realizó pruebas donde se evaluó su resistencia a pH 3,0 y a sales biliares (0.3 y 1%) y bilis (0.5%), marca Sigma, a un pH de 5,5. Para esto, las microcápsulas de *L. plantarum* (2 g), se pasaron a adicionar en 18 mL de caldo MRS mezclado con el porcentaje de bilis y sales biliares respectivamente ajustados al pH de 5,5, posteriormente se llevó a incubación a 37°C por 48 horas para la liberación y establecimiento del material microencapsulado. A continuación se efectuó la prueba de viabilidad bajo la metodología de Cai et al.¹²⁹. La variable estudiada consistió en determinar la viabilidad de las bacterias lácticas microencapsuladas expresada en concentraciones iguales o mayores de 10⁹ UFC/ 150 µL. La presencia de sales biliares y bilis, y su actividad enzimática inhibe un buen porcentaje de microorganismos durante el paso por el tracto digestivo. Como lo señala Coppola y Gil-Turnes: “Con la verificación de la viabilidad de los microorganismos después de ser sometidos a diferentes concentraciones de sales biliares, se pudo predecir si son resistentes a las condiciones de circulación por el tracto digestivo”¹³⁰.

Por otra parte la tolerancia a pH bajo es una importante característica probiótica para la sobrevivencia y crecimiento de las bacterias en el tracto digestivo. Una importante propiedad de los probióticos es que pueden sobrevivir a condiciones adversas generadas en el TGI, según Marteau et al.¹³¹ éstos pueden resistir por más de 4 horas a las enzimas proteolíticas y a los bajos valores de pH (1.8-3.2) prevaletentes en el estómago así como también a la concentración de bilis, jugos pancreáticos y mucus presentes en el intestino delgado. La tolerancia a los diferentes niveles fue medida siguiendo lo recomendado por Cai et al.¹³².

5.12 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.12.1 Análisis estadístico. Para establecer el efecto del medio MRS sobre la variable *L. plantarum* se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo, utilizando el procedimiento PROC MIXED del paquete estadístico de SAS teniendo en cuenta un nivel de significancia del 5% (p menor 0.05)

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \tau_k + (\alpha\tau)_{ik} + e_{ijk}$$

¹²⁹ CAI. Op. cit., p. 178.

¹³⁰ COPPOLA MENEZES, Mario & GIL TURNES, Carlos. Probióticos e resposta imune. En: Ciência Rural, Santa. Julio-Agosto 2004, vol. 34, no. 4, p. 1297-1303.

¹³¹ MARTEAU, P, et al. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. En: Am. J. Clin. Nutr. Febrero, 2001, vol. 73, no. 2, p. 430-436.

¹³² CAI. Op. cit., p. 178,179.

Y_{ijk} = Valor de la respuesta medida para el tiempo k en el sujeto j asignado al tratamiento i .

μ = Media general.

$\alpha_i + \tau_k + (\alpha\tau)_{ik}$ = Media para el tratamiento i en el tiempo k , asociado con los efectos fijos tratamiento (α_i), tiempo (τ_k) y la interacción tratamiento por tiempo ($\alpha\tau$) $_{ik}$.

e_{ijk} = Error aleatorio asociado al sujeto j asignado en el tratamiento i para el tiempo k .

Para modelar las variables azúcar, proteína, acidez y pH se utilizaron 3 modelos polinomiales; lineal, cuadrático y cúbico total; a través de coeficiente de determinación (r^2) y el cuadrado medio del error, se seleccionó el mejor ajuste. Los modelos matemáticos se colocan a continuación:

$$y_{ij} = \beta_0 + \beta_1(X_i) + \varepsilon_{ij}$$

$$y_{ij} = \beta_0 + \beta_1(X_i) + \beta_2(X_i)^2 + \varepsilon_{ij}$$

$$y_{ij} = \beta_0 + \beta_1(X_i) + \beta_2(X_i)^2 + \beta_3(X_i)^3 + \varepsilon_{ij}$$

y_{ij} : Ln UFC/ 150 μ l

β_0 a β_3 : Son los coeficientes de regresión

X_i : La hora de toma de muestras.

ε_{ij} : Error

5.12.2 Variables Evaluadas. Para establecer el efecto del medio MRS sobre la variable *L. plantarum* se tuvieron en cuenta las siguientes variables:

Variable 1. Conteo de microorganismos. Crecimiento de unidades formadoras de colonia (UFC / 150 μ l), para *Lactobacillus plantarum*.

Variable 2. Determinación de pH.

Variable 3. Determinación de producción de ácido láctico

Variable 4. Cuantificación de azúcar para el crecimiento de la bacteria que permita establecer la relación de consumo/crecimiento celular.

Variable 5. Cuantificación de proteína para el crecimiento de la bacteria que permita establecer la relación de producción/crecimiento celular.

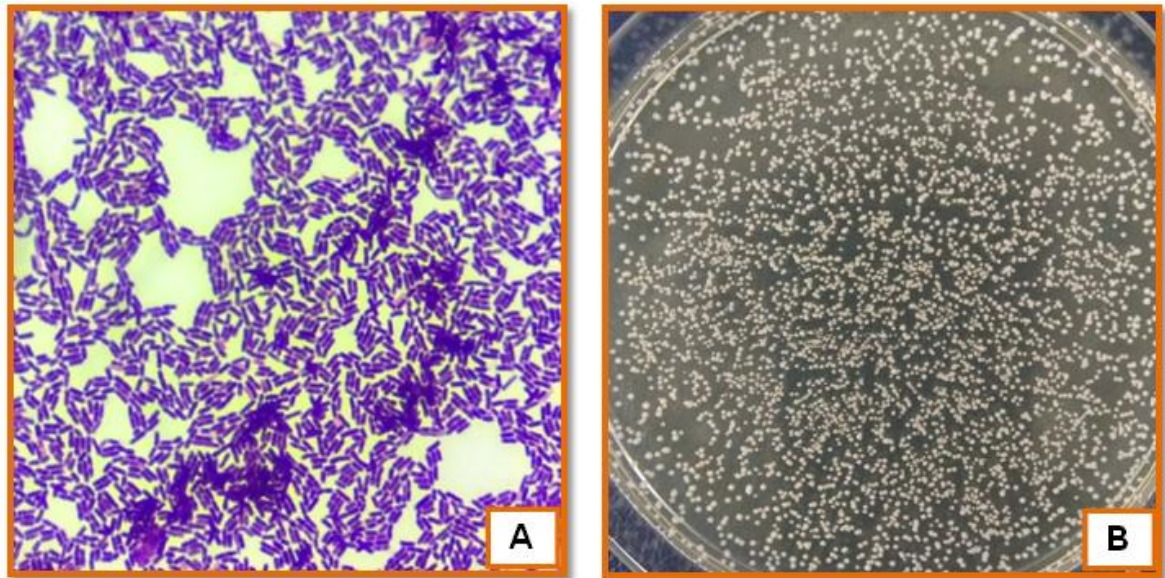
Variable 6. Producción de biomasa de las cepas probiótica en términos de tiempo.

6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 DESCRIPCIÓN DE *Lactobacillus plantarum* y *Escherichia coli* O157:H7

6.1.1 *Lactobacillus plantarum*. Después de realizar los procesos de reconstitución y cultivo de la cepa probiótica, se efectuó la tinción de Gram con el fin de establecer su pureza. Para conseguir dicho resultado, se observó en microscopio bajo objetivo de 100x con la intención de descartar la existencia de microorganismos contaminantes que afecten los resultados esperados. Además, se examinó la morfología de esta cepa en donde se observó que los bacilos poseen una morfología delgada y algunos se presentan en cadena. Asimismo, en esta muestra se aprecia que dichas bacterias son Gram positivas. Lo mencionado anteriormente, concuerda con lo indicado por Zapata et al ¹³³, donde menciona que es un microorganismo Gram positivo además en cuanto a su morfología tiene forma de varilla recta con extremos redondeados y dimensiones de $0.7\ \mu\text{m} \times 1.6\ \mu\text{m}$ lo cual hace referencia a un bacilo que es una de las características morfológicas de ésta bacteria. Lo mencionado con anterioridad es posible observarlo en la Figura 1.

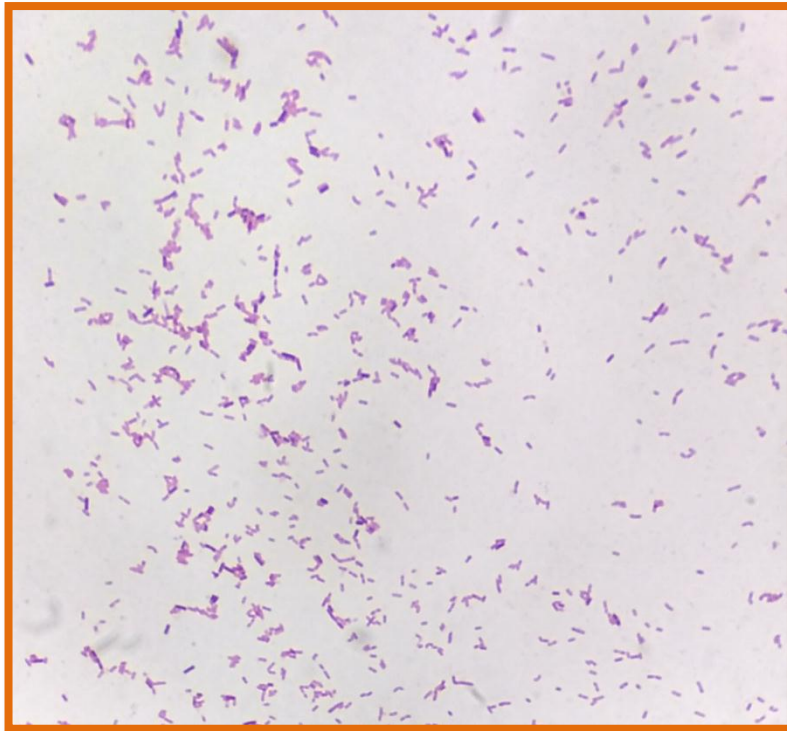
Figura 1. A: *Lactobacillus plantarum* morfología microscópica; B: morfología macroscópica en agar MRS



¹³³ ZAPATA, Op. cit., p. 78.

6.1.2 *Escherichia coli* O157:H7. La morfología microscópica de la bacteria patógena se puede observar en la Figura 2. Para lograr determinar su pureza se realizó tinción de Gram y como resultado se evidenció que la bacteria es Gram negativa, su morfología se observa como bacilos cortos y anchos lo cual concuerda con lo dicho por Rodríguez ¹³⁴ que muestra la bacteria como un bacilo Gram negativo.

Figura 2. *Escherichia coli* O157:H7 morfología macroscópica



6.1.3 Producción de gas y actividad de catalasa de *Lactobacillus plantarum*. La producción de gas para *L. plantarum* fue negativa, lo anterior se evidencio en la ausencia de gas dentro de los tubos Durham. Adicionalmente resultó catalasa negativa al no presentar efervescencia al añadir peróxido de hidrogeno (Cuadro 5).

¹³⁴ RODRÍGUEZ, Op. cit., p. 465.

Cuadro 5. Producción de gas y actividad de catalasa *Lactobacillus plantarum*

Bacteria	Actividad de catalasa	Producción de gas
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Negativa	Negativa

Los resultados previos coinciden con lo obtenido por Aguirre et al¹³⁵, lo que indica que las bacterias del género *Lactobacillus* carecen de la enzima catalasa que descompone el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y además no producen gas. Según lo señalado por Prescott et al¹³⁶ las BAL, no poseen la enzima catalasa capaz de descomponer el peróxido de hidrogeno, en oxígeno y agua debido a la ausencia de un grupo porfirínico (citocromo). También, los mismos autores resaltan que esta característica en las BAL es muy común. Del mismo modo, de acuerdo con Calpa et al¹³⁷ la producción negativa en las mismas es una característica importante en las bacterias probióticas, ya que impiden o previenen problemas gastrointestinales en el huésped como por ejemplo el timpanismo. Fajardo y Rodríguez¹³⁸, coinciden con la anterior aseveración y añaden que es característico de las bacterias del género *Lactobacillus* y que gracias a ello, no alteran las propiedades organolépticas de los productos.

6.2 EVALUACIÓN PODER DE INHIBICIÓN ANTIMICROBIANOS SOBRE *L. plantarum* y *Escherichia coli* O157:H7

6.2.1 Prueba de susceptibilidad de agentes antimicrobianos frente a *Lactobacillus plantarum*.

¹³⁵ JURADO, Henry; AGUIRRE, Diana y RAMÍREZ, Cristina. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. En: MVZ Córdoba. Mayo-Agosto, 2009. vol. 14, no. 2, p. 37-53

¹³⁶ PRESCOTT, L.; HARLEY, J. y KLEIN, D. Microbiología. 4 ed. Zaragoza: McGraw-Hill Interamericana, 1999. 515-518 p

¹³⁷ JURADO; CALPA y CHASPUENGAL. Op. cit., p. 247.

¹³⁸ FAJARDO, Ivonne Catalina y RODRÍGUEZ, Ana Elizabeth. Evaluación in vitro de *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992 con características probióticas sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 13245. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Zootecnista. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias, 2016. 56p

Tabla 2. Susceptibilidad de agentes microbianos frente a *L. plantarum*

Antibiótico	Diámetro halo de inhibición <i>L. plantarum</i> (mm)	Nivel de sensibilidad
Cefotaxina CTX 30 µg	30	S ^a
Penicilina P 10 IU	17	R ^{ab}
Gentamicina GN 10 µg	15	S ^{ab}
Dicloxacilina DCX 1µg	-	R ^{ab}
Ciprofloxacina CIP 5 µg	19	S ^{ab}
Cefalotina KF 30 µg	13	R ^{ab}

S: sensible I: intermedio R: resistente

a. CHARTERIS, W *et al.* Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. En: Journal of Food Protection. Diciembre, 1998. Vol. 6, no. 12, p.1636-1643

b. JURADO GÁMEZ, Henry *et al.* Determinación de la cinética de fermentación en dos medios probióticos, pruebas de desempeño *in vitro* y efecto de inhibición de *Lactobacillus plantarum*. En: Rev. Veterinaria y zootecnia. Enero, 2016. Vol. 10, no.1, p. 23-41

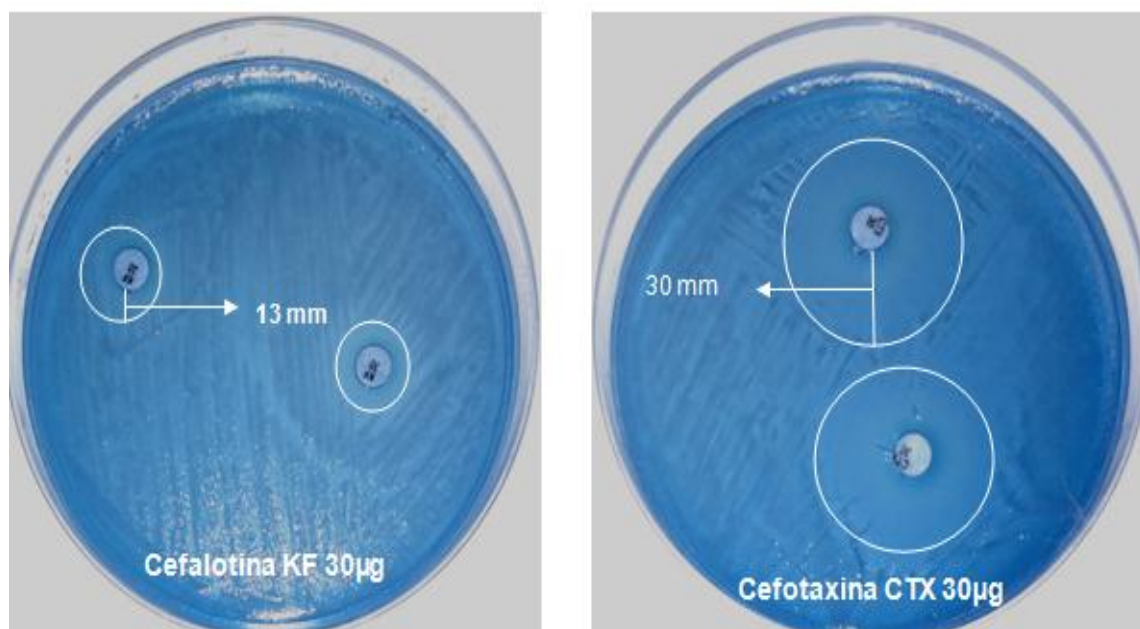
La bacteria probiótica fue sensible a antimicrobianos como el Cefotaxina CTX 30 µg, Gentamicina GN 10 µg y Ciprofloxacina CIP 5 µg. Al respecto, Calpa et al¹³⁹ reportan en su estudio pruebas de susceptibilidad de antibióticos sobre *L. plantarum* y alcanzan diámetros de inhibición similares con ciprofloxacina, en cuanto a gentamicina alcanzan un mayor diámetro. La cefotaxina es un antibiótico de amplio espectro que según Rodríguez et al¹⁴⁰ este antibiótico es muy utilizado para tratar infecciones causadas por bacterias Gram negativas y son muy efectivas en infecciones respiratorias, urinarias, abdominales y del sistema nervioso central. El uso de este antibiótico se da por su efectividad, pero se puede observar que inhibe el crecimiento de bacterias probióticas beneficiosas para el tracto gastrointestinal. Lo anterior indica que al tratar de inhibir el crecimiento de una bacteria patógena puede afectar el equilibrio microbiológico a nivel intestinal, sumado a ello la resistencia que pueden adquirir las bacterias patógenas por el uso excesivo de las mismas. Del mismo modo, la ciprofloxacina actúa como bactericida de microorganismos Gram negativos principalmente, sin embargo en el

¹³⁹ JURADO; CALPA y CHASPUENGAL. Op. Cit., p. 249.

¹⁴⁰ RODRÍGUEZ MELGOZA, Lauro et al. Estudio de Prescripción - Indicación de la Cefotaxima en un Servicio de Medicina Interna de un Hospital de Segundo Nivel. En: Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Mayo, 2013. vol. 44, no. 2, p. 17-23

estudio se puede observar que inhibe también bacterias Gram positivas como *L. plantarum*. Suarez y Vera¹⁴¹ mencionan que en medicina humana este antibiótico es utilizado indiscriminadamente y de manera inadecuada por lo tanto ha generado resistencia.

Figura 3. Susceptibilidad frente a antimicrobianos de *Lactobacillus plantarum* (agar MRS con azul de anilina)



La BAL, al ser sensible a ciertos antibióticos puede ocasionar problemas en procesos tecnológicos en los que ésta sea usada, es decir, que de acuerdo a lo descrito por Magariños¹⁴² para fabricar yogur es necesario la presencia de BAL, pero, si la leche utilizada para elaborar el producto tiene residuos antibióticos puede que exista una fermentación inadecuada y no tenga características organolépticas propias del yogur, además que los cultivos iniciadores sean reemplazados por microorganismos indeseables puede que se convierta en un producto peligroso para el consumo humano. El mismo autor resalta, que los

¹⁴¹ SUÁREZ OLIVARES, Abel y VERA VIDAL, Vivian. Uso y abuso del ciprofloxacino. En: Rev. Medisan. Marzo, 2011. vol. 15, no. 3, p. 384-392

¹⁴² MAGARIÑOS, Haroldo. Producción higiénica de la leche cruda, una guía para la pequeña y mediana empresa. 1 ed. Guatemala: Producción y servicios incorporados S.A., 2000. 53-58 p.

quesos elaborados con leche que poseen residuos de antibióticos tiene una apariencia esponjosa y sabor amargo ya que éstos pueden actuar sobre algunos componentes de la leche.

Por otro lado, la BAL muestra resistencia a Penicilina P 10 IU, Dicloxacilina DCX 1µg y Cefalotina KF 30 µg. Lo anterior coincide en su mayoría, ya que Jurado et al¹⁴³ reportan acción bactericida de *L. plantarum* con antimicrobianos como penicilina y dicloxacilina, en cuanto a cefalotina muestra en su estudio sensibilidad, Jarrín et al¹⁴⁴ muestran que *L. plantarum* es resistente a cefalotina. De acuerdo a Mora y García ¹⁴⁵ *L. plantarum* mostró halos inhibitorios desde 11.30-37.33 mm frente a penicilina natural que inhiben Gram positivos, es decir que presenta cierta sensibilidad a inhibidores de pared. No obstante, en este estudio la cepa empleada mostró resistencia a penicilina. Es decir, que la cepa usada en este estudio es adecuada para el uso de procesos tecnológicos ya que la penicilina es usada en diversos tratamientos veterinarios de acuerdo a la CFSPH¹⁴⁶.

6.2.2 Prueba de susceptibilidad de agentes microbianos frente a *Escherichia coli* O157:H7.

Tabla 3. Susceptibilidad de agentes microbianos frente a *E. coli* O157:H7

Antibiótico	Diámetro halo de inhibición <i>E. coli</i> O157:H7 (mm)	Nivel de sensibilidad
Cefotaxina CTX 30 µg	32	S ^{ab}
Penicilina P 10 IU	-	R ^a
Gentamicina CN 10 µg	17	S ^{ab}
Dicloxacilina DCX 1µg	-	R ^a
Ciprofloxacina CIP 5 µg	40	S ^a
Cefalotina KF 30 µg	18	S ^{ab}

S: sensible I: intermedio R: resistente

¹⁴³ JURADO GÁMEZ, Henry; CALPA YAMA, Freddy y CHASPUENGAL TULCÁN, Aura. Op. Cit., p. 249

¹⁴⁴ JURADO; JARRÍN y PARREÑO. Op. cit., p. 61.

¹⁴⁵ MORA PEÑAFLO, Nancy y GARCÍA GUERRERO, Andrés. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis para obtener el título de Licenciado en Química de Alimentos. Pachuca de Soto: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 2007. 107-108 p.

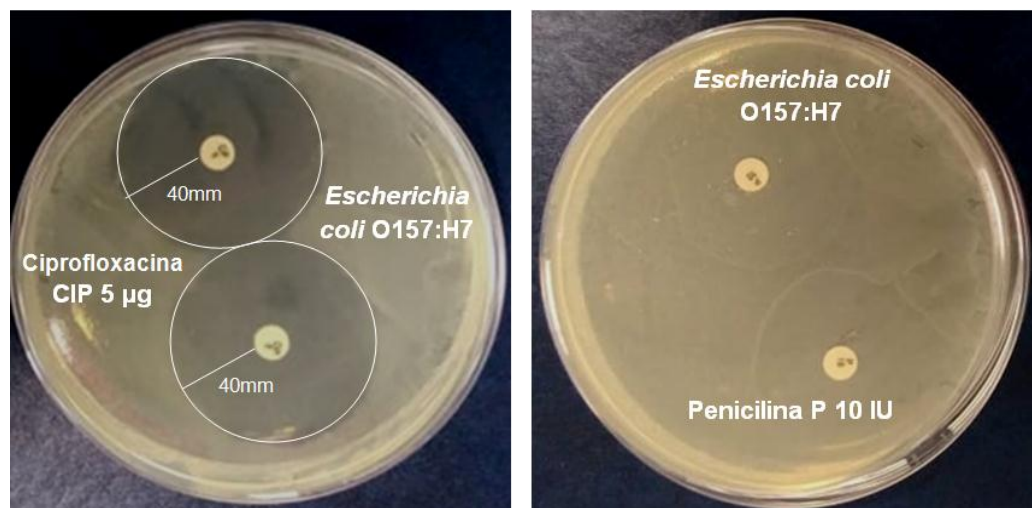
¹⁴⁶ THE CENTER FOR FOOD SECURITY Y PUBLIC HEALT. Uso de antibióticos en animales. Informe de Iowa State University, Iowa: CFSPH; 2014.

a. BERNAL, Maye y GUZMAN, Miguel. El antibiograma de discos normalización de la técnica kirby Bauer. En: Rev. Biomedica.1984. vol. 4, no. 3, p. 112-121

b. CAVALIERI, S. Manual de susceptibilidad antimicrobiana. University of Washington Seattle, Washington.2005.

La bacteria patógena resultó sensible a Cefotaxina CTX 30 µg, Gentamicina CN 10 µg, Ciprofloxacina CIP 5 µg y Cefalotina KF 30 µg (Tabla 3 y Figura 4). Los resultados anteriores coinciden con lo encontrado por Jurado et al ¹⁴⁷ ya que en su estudio obtuvieron sensibilidad de la bacteria patógena frente a gentamicina y ciprofloxacina. Además, Bernal y Guzmán ¹⁴⁸ indican que un halo superior o igual a 18mm significa que la bacteria es sensible a este antibiótico. De acuerdo a la CFSPH¹⁴⁹ la cefalotina frente a *E. coli* tiene un nivel moderadamente sensible ya que alcanza halos inhibitorios de 17mm, pero, en el presente estudio se observó halos de 18mm, es decir que presenta sensibilidad a este antibiótico la *E. coli* O157:H7. Los mismos autores, mencionan al igual que en este estudio niveles de resistencia a penicilina.

Figura 4. Susceptibilidad frente a antimicrobianos de *Escherichia coli* O157:H7 (agar MRS)



¹⁴⁷ JURADO; JARRÍN y PARREÑO. Op. Cit., p 61

¹⁴⁸ BERNAL, Maye y GUZMAN, Miguel. El antibiograma de discos normalización de la técnica kirby Bauer. En: Rev. Biomedica.1984. vol. 4, no. 3, p. 112-121

¹⁴⁹ THE CENTER FOR FOOD SECURITY Y PUBLIC HEALT. Op. Cit., p11.

En este sentido, se presentó resistencia a antimicrobianos entre los cuales se encuentran penicilina P 10 IU y Dicloxacilina DCX 1µg. García ¹⁵⁰ menciona que las penicilinas ya no tienen un efecto inhibitorio sobre *E. coli*, además resalta que los antibióticos betalactámicos como la dicloxacilina y derivados de penicilina tampoco tiene un efecto inhibitorio sobre la bacteria patógena. Del mismo modo, Guzmán et al¹⁵¹ observaron una resistencia por parte de la bacteria *E. coli* frente a antibióticos como Dicloxacilina y Penicilina. Lo anterior, indica que este serotipo es resistente a antibióticos betalactámicos, ya que dicloxacilina pertenece a esta clase de antibióticos al igual que penicilina. No, obstante es importante realizar otros estudios de inhibición de antibióticos de la clase Beta-Lactámicos ya que la utilización de dos antibióticos de esta clase no asegura que la *E. coli* sea resistente. Según Rodríguez et al¹⁵² la dicloxacilina actúa contra bacterias Gram positivas y se indica fundamentalmente para el tratamiento de infecciones dermatológicas y del tracto respiratorio en el caso de administración oral o se indica por vía intravenosa para la osteomielitis, por lo tanto éste antibiótico no está prescrito para el tratamiento de enfermedades entéricas.

Un problema a nivel mundial es el uso indiscriminado de antibióticos para el tratamiento de enfermedades entéricas o cualquier tipo de infección, tanto en humanos y animales. Existe una administración irresponsable y sin análisis o antibiograma para determinar el antibiótico específico para cualquier infección. Mosquito et al¹⁵³ resalta que la utilización indiscriminada de antibióticos puede generar resistencia y es un problema a nivel mundial, no solo en *E. coli* si no en diversas bacterias lo que supone grandes dificultades en el tratamiento antibiótico cuando éste es requerido.

En este sentido, respecto al tratamiento con antibióticos a *E. coli* O157:H7 Safdar et al¹⁵⁴ mencionan que para este serotipo se incrementa el riesgo de Síndrome

¹⁵⁰ GARCÍA ZÚÑIGA, Claudia Valeska. Resistencia antibiótica de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus sp.*, en el Hospital Regional de Occidente de Quetzaltenango. Trabajo de grado para optar por el título de Química Bióloga. Guatemala: Universidad San Carlos Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2014. 4 p.

¹⁵¹ JURADO, H. y GUZMÁN, M. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición *in vitro* de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. En: Rev. Medicina veterinaria y zootecnia. Mayo-Agosto, 2015. vol. 62, no. 2, p. 23-39

¹⁵² RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, Yaslenis; PÉREZ NAVARRO, Maikel. y SUÁREZ PÉREZ, Yania. Validación del método para control de calidad de dicloxacilina sódica en diclofenac cápsulas. En: Rev. Cubana Farm. Julio-Septiembre, 2014. vol.48, no. p.382-395

¹⁵³ MOSQUITO. Op. cit., p. 649.

¹⁵⁴ SAFDAR, N. et al. Risk of hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis: a meta-analysis. En: JAMA. 2002. vol. 288, no. 8, p. 996-1001.

Urémico Hemolítico (SUH) debido a la liberación de la toxina Shiga. Sin embargo, resaltan que es importante analizar qué categoría de antibiótico puede usarse ya que no se conoce cual se asocia al aumento de producción de toxina por parte de la bacteria patógena, ya que, algunos estudios mencionan que trimetoprim-sulfametoxazol muestra tener un efecto negativo. Pero, fosfomicina al contrario, tiene un efecto protector.

6.3 ENSAYOS DE INHIBICIÓN *in vitro* DE *Lactobacillus plantarum* FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7

6.3.1 Ensayo inhibición por disco de agar impregnado de *L. plantarum* frente a *E. coli* O157:H7. El ensayo demostró que existe inhibición por parte de la bacteria probiótica en concentraciones de 50 µL, 75 µL y 100 µL frente a la bacteria patógena en estudio, produciendo valores de halos inhibitorios en promedio con un rango de 4-6 mm. El halo de mayor dimensión se presentó en la concentración de 50 µL con un resultado de 6 mm (Tabla 4).

Tabla 4. Inhibición por disco de agar impregnado de *L. plantarum* en *E. coli* O157:H7

Medio	50 µL	75 µL	100 µL
Mueller Hinton	6 mm	5 mm	4 mm

Para determinar si existe inhibición se tomó en cuenta lo descrito por Delgado¹⁵⁵ donde mencionan que halos inhibitorios mayores a 2 mm se consideran como indicios de susceptibilidad. Lo anterior indica una inhibición muy marcada de la bacteria láctica frente a la patógena. Figura 5.

Según el estudio de Vegas et al¹⁵⁶ obtuvo una actividad inhibitoria de *L. plantarum* sobre *E. coli*, observando que limitó el crecimiento de la bacteria patógena.

Otros estudios aplicados *In vivo* sobre bacterias enterotoxigénicas que causan diarrea, Lee et al¹⁵⁷ señalan que al aplicar en la alimentación de terneros recién

¹⁵⁵ DELGADO PALACIO, Susana. Microbiota intestinal humana: análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas. Memoria, para optar al Grado de Doctor. Oviedo: Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). 2005. p. 28, 29.

¹⁵⁶ VEGAS, Carlos et al. Efecto simbiótico del extracto de *Smallanthus sonchifolius* (YACÓN) Y *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli*. En: Rev. Ciencia e investigación. 2013.vol. 16, no. 2, p. 77-82

destetados una combinación de dos probióticos como *Lactobacillus plantarum* y *Bacillus subtilis* durante 4 semanas, el recuento de bacterias fecales disminuyó y las BAL aumentaron, por lo tanto, hubo una disminución de la incidencia de diarrea en terneros, que es causada por bacterias patógenas presentes a nivel intestinal.

Por su parte, Mangell et al¹⁵⁸ señalan que al realizar un análisis sobre el paso de manitol sobre la pared intestinal utilizando el manitol como marcador para observar la permeabilidad que ejercía *E. coli* y *L. plantarum*, detectaron que *E. coli* aumentó un 53% la permeabilidad intestinal, por el contrario la BAL disminuyó la permeabilidad ejercida por *E. coli*, por ello, según los autores apoyan el concepto de que los probióticos pueden ejercer efectos beneficiosos en el tracto gastrointestinal. Lo anterior quiere decir que las bacterias probióticas protegen la absorción inmediata de sustancias y por tanto son beneficiosas ya que ejercen un efecto barrera.

6.3.2 Ensayos de la acción inhibitoria del sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli* O157:H7. Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 5. El mayor efecto inhibitorio se obtuvo por el método de pads impregnados con sobrenadante de *L. plantarum*, método de difusión en cilindro plástico y por el método de difusión en cilindro plástico doble capa. Los resultados indicaron que el mayor halo inhibitorio fue de 7 mm en una concentración de 95 µL, 5 mm en una concentración de 80 µL y 8 mm en concentración de 120 µL.

¹⁵⁷ LEE, Yeo-Eun et al. Effect of feeding the combination with *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* on fecal microflora and diarrhea incidence of Korean native calves. En: The Korean journal of veterinary service. Diciembre, 2012. vol. 35, no. 4, p. 343-346

¹⁵⁸ MANGELL, P. et al. *Lactobacillus plantarum* 299v inhibits *Escherichia coli*-induced intestinal permeability. En: Rev.publimed. Marzo, 2002.vol. 47,no.3, p.51-516

Figura 5. Inhibición por disco de agar con azul de anilina impregnado de *L. plantarum* frente a *E. coli* O157:H7

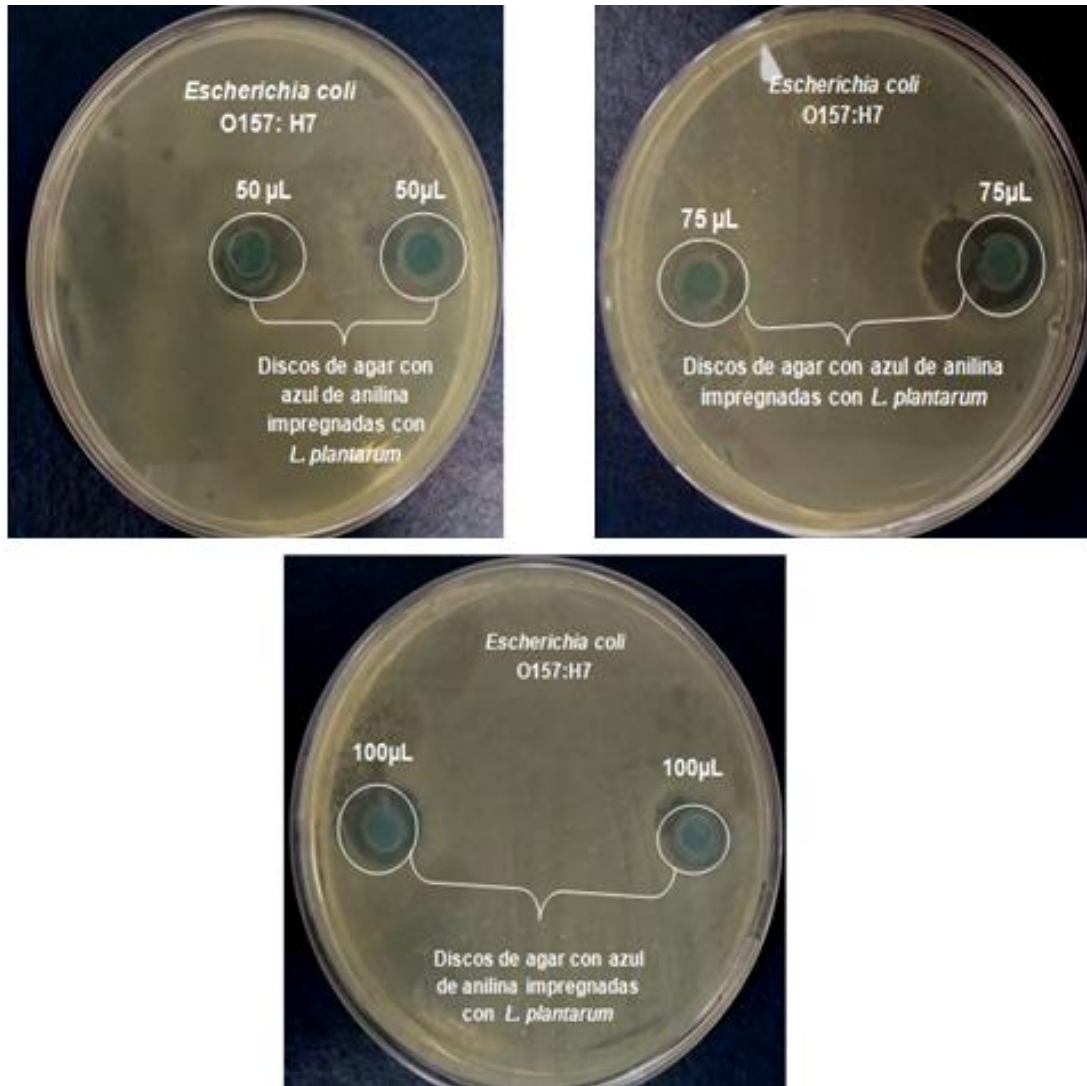


Tabla 5. Concentración y halos de inhibición producidos por el sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli* O157:H7

Método	Condición	Concentración y medida del halo (mm)		
		75 µl	85 µl	95 µl
Discos método Pads	Filtrado pH 6.0	2	2	-
	Filtrado pH 6.0 y 80°C	5	2	3
	Sin filtrar pH 6.0	2	6	2
	Sin filtrar pH 6.0 y 80°C	5	5	7
Difusión en cilindro plástico		80 µl	100 µl	120 µl
	Filtrado pH 6.0	3	5	4
	Filtrado pH 6.0 y 80°C	5	4	2
	Sin filtrar pH 6.0	-	3	2
	Sin filtrar pH 6.0 y 80°C	2	3	2
Difusión en cilindro plástico doble capa	Filtrado pH 6.0	2	4	2
	Filtrado pH 6.0 y 80°C	4	3	8
	Sin filtrar pH 6.0	-	3	4
	Sin filtrar pH 6.0 y 80°C	2	2	-

Rodríguez et al¹⁵⁹ hacen referencia a que el efecto inhibitorio del sobrenadante puede deberse a péptidos de bajo peso molecular denominados biocinas o bacteriocinas, de igual manera los *Lactobacillus* producen una serie de sustancias, entre las que se encuentra el peróxido de hidrógeno, el diacetilo, la plantaricina, los ácidos orgánicos como el láctico y el acético.

La plantaricina según Anderssen et al¹⁶⁰ es producida por *L. plantarum*, ésta es formadora de complejos de poración ya que interactúan como un sistema de dos péptidos formando poros y por ende la disipación del potencial de membrana. Es decir, que al formar complejos de poración destruyen la integridad de membrana citoplasmática provocando la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza

¹⁵⁹ FAJARDO y RODRÍGUEZ. Op. Cit., p. 68

¹⁶⁰ ANDERSSSEN, E. et al. Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK, and the induction factor plantaricin A. Appl. Environ. Microbiol. Junio, 1998. Vol. 64 p. 2269-2272.

motriz de los protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos.¹⁶¹

Gutiérrez¹⁶² destaca en su estudio el efecto inhibitorio del sobrenadante de la bacteria láctica frente a *E. coli* y que su actividad bactericida está ligada a péptidos los cuales obtuvieron halos de inhibición significativos. Por su parte Jurado et al¹⁶³ determinaron la presencia de péptidos con actividad bactericida en *L. plantarum* los cuales actúan como bacteriocinas frente a bacterias patógenas.

En este estudio al igual que el realizado por Estrada¹⁶⁴ se destaca una mayor inhibición por parte de los sobrenadantes de la BAL en comparación con la inhibición obtenida directamente con la bacteria láctica. Asimismo, Jurado et al¹⁶⁵ indican que la inhibición por parte de la BAL, se debe a la producción de compuestos antimicrobianos y productos de la fermentación presentes en el sobrenadante por ello existe mejor inhibición por parte del sobrenadante en comparación con la inhibición con la bacteria directamente.

Fernández et al¹⁶⁶ añade que las BAL además de ser muy utilizadas en la industria de alimentos porque mejoran las propiedades sensoriales y ayudan en la fabricación de alimentos, tienen un efecto inhibitorio sobre bacterias patógenas como *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

La afirmación anterior tienen gran importancia ya que según Fernández et al¹⁶⁷ y Gonzales et al¹⁶⁸ coinciden en que éstas bacterias ejercen una influencia positiva

¹⁶¹ MONTVILLE T. y CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. En: Appl Microbiol Biotechnol. 1998. vol. 50, p. 511-519.

¹⁶² GUTIERREZ RAMIREZ, Luz Adriana; MONTOYA CAMPUZANO, Olga Inés y RUIZ VILLADIEGO, Orlando Simón. Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento *in vitro* de *E. coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*. En: Revista CENIC. 2005. vol. 36, no. Especial, p 1-7

¹⁶³ JURADO GÁMEZ, Henry et al. Evaluación *in vitro* de la acción de *Lactobacillus plantarum* con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis*. En: Rev. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. Julio-Diciembre, 2014. vol. 2, no. 2, p.49-59.

¹⁶⁴ ESTRADA MALDONADO, Ana Cristina; GUTIÉRREZ RAMÍREZ, Luz Adriana y MONTOYA CAMPUZANO, Olga Inés. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. Contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. En: Rev. Fac. Nac. Agron. Abril, 2005. vol.58, no. 1, p.2601-2609

¹⁶⁵ JURADO; JARRÍN y PARREÑO. Op. Cit., p 59

¹⁶⁶ FERNANDEZ VILLA, Kelly et al. Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibitor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura. En: Rev. Biosalud. 2008-2012.vol. 13, no. 1, p. 45-61

¹⁶⁷ Ibid., p. 52

en la salud o en la fisiología del hospedero. Lo anterior, gracias a la presencia de bacteriocinas que según Gonzales et al ¹⁶⁹ es una plantaricina que además, Pérez et al ¹⁷⁰ afirma que esta bacteriocina es activa contra diversas bacterias Gram-positivas patógenas y alterantes. Por lo anterior, es importante resaltar la acción probiótica de la bacteria *L. plantarum* por su actividad bactericida frente a una bacteria patógena causante de enfermedades de tipo alimentario como lo es *E. coli*, ya que no solo existe inhibición por parte de la bacteria directamente sino también por parte de su sobrenadante. Ahora bien, los anteriores resultados se destacan ya que con el paso del tiempo el uso de antibióticos debe disminuirse ya que muchas bacterias patógenas toman resistencia por su uso indiscriminado. En este sentido, Cabrera et al mencionan lo siguiente:

La resistencia a múltiples sustancias es un problema de salud pública que se viene observando a nivel mundial después de la aparición de los antibióticos. El uso indiscriminado de los antibióticos y la presión selectiva ambiental realizada por antisépticos y desinfectantes ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos, que los capacita para evadir con eficiencia la acción bactericida de algunos agentes.¹⁷¹

6.4 SUSCEPTIBILIDAD A DIFERENTES NIVELES DE TEMPERATURA

6.4.1 Viabilidad de *Lactobacillus plantarum* a 37°C y 45°C. El crecimiento de *L. plantarum* sometido a dos temperaturas fue de 4.2×10^9 UFC/ 150 µL en 37°C y 3.0×10^{12} UFC/ 150 µL en 45°C (Tabla 6).

¹⁶⁸ GONZALES MARTÍNEZ, Blanca Edelia; GOMEZ TREVIÑO, Maribel. y JIMENEZ SALAS, Zacarías. Bacteriocinas de prebióticos. En: Rev. Salud pública y educación.2003. vol. 4, no. 2, p.1-9.

¹⁶⁹ Ibid., p. 3

¹⁷⁰ PEREZ MAYO, Baltasar et al. Secuencia y análisis del locus de la plantaricina C producida por *Lactobacillus plantarum* LL441. En: XIX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos (24-26, septiembre: Zaragoza) Memorias. Zaragoza. 2014.p. 1-2

¹⁷¹ CABRERA, Cristina; GÓMEZ, Rommel y ZUÑIGA, Andrés. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. En: Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Abril-Junio, 2007. vol.38, no.2, p. 149-158

Tabla 6. Viabilidad de *L. plantarum* en medio MRS a de 37°C y 45°C (UFC/150 µL)

FACTOR DE DILUCIÓN	<i>L. plantarum</i> (UFC/ 150 µL)	
	37°C	45°C
10 ⁵	3.0 X 10 ⁷	3.0 X 10 ⁷
10 ⁶	3.0 X 10 ⁸	3.0 X 10 ⁸
10 ⁷	4.2 X 10 ⁹	4.2 X 10 ⁹
10 ⁸	-	-
10 ⁹	-	-
10 ¹⁰	-	3.0 X 10 ¹²

El efecto que ejerce la temperatura sobre el crecimiento de una bacteria es uno de los factores más importantes para su desarrollo ya que estos poseen un margen de temperatura donde ellos pueden crecer. Las bacterias poseen una temperatura óptima de crecimiento, según lo citado por León et al¹⁷² en el género *Lactobacillus* se ha observado que el rango óptimo de temperatura para su crecimiento es de 29-50°C, lo anterior indica que se encuentra dentro del rango admitido para que la bacteria sea resistente a diferentes cambios ambientales que puedan afectar su viabilidad. Calpa et al¹⁷³ obtuvieron un buen crecimiento a una temperatura de 45°C con un resultado de 3.0 x10¹² UFC/ml en *Lactobacillus plantarum*. Asimismo, Jurado et al¹⁷⁴ demuestran crecimientos de 3x10¹² UFC/150 µL a una temperatura de 45°C. Lo anterior indica que es una bacteria donde su temperatura óptima se encuentra alrededor de los 45°C. León et al¹⁷⁵ menciona que las bacterias del género *Lactobacillus* a temperaturas de 23°C pueden presentar un estado de latencia. En efecto, se puede afirmar que la viabilidad no se puede afectar por condiciones de temperatura corporal del tracto gastrointestinal en animales. De acuerdo a lo descrito por Gänzle¹⁷⁶ frente a la viabilidad de la bacteria a diferentes temperaturas, en el género *Lactobacillus* el rango óptimo de temperatura de crecimiento entre los 23°C-50°C por debajo de la temperatura se presenta un estado de latencia. Algunos autores como Meng et al¹⁷⁷ y Ying et

¹⁷² LEÓN De la O, Dante et al. Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque. En: Facultad de Ciencia y Tecnología. Junio-Septiembre, 2013. vol.12, no.12, p.133-144

¹⁷³ JURADO; CALPA y CHASPUENGAL. Op. Cit., p. 248

¹⁷⁴ JURADO GÁMEZ, Henry et al. Op. Cit., p. 39

¹⁷⁵ LEÓN De la O, Dante et al. Op. Cit., p. 136

¹⁷⁶ GÄNZLE, Michael. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentation and food spoilage. En: Current Opinion Food Science. Marzo, 2015. vol. 2, P. 106-117

¹⁷⁷ MENG, X. et al. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. En: Food Chemistry. Febrero, 2008. vol.106, no.4, p. 1406–1416.

al¹⁷⁸ resaltan que las bacterias ácido lácticas al resistir temperaturas hasta los 50°C les otorga la capacidad de sobrevivir a la temperatura corporal, preservarse en fase de latencia a temperatura ambiente y sobrevivir a procesos tecnológicos en la elaboración de alimentos balanceados y microencapsulados por medio de secado por aspersión donde asciende hasta los 300°C.

Por lo anterior, la BAL estudiada se convierte en una alternativa al uso de antibióticos en animales ya que sobrevive a condiciones de temperatura para su uso en alimentos destinados a animales y evitar la proliferación de bacterias patógenas que afectan al animal como al consumidor de productos de origen animal.

6.5 CINÉTICA DE FERMENTACIÓN

Después de realizar la cinética de fermentación se presentaron datos cinéticos los cuales se encuentran en la Tabla 7. Las variables pH, % acidez, consumo de azúcares y producción de proteína se encuentran en la Figura 6.

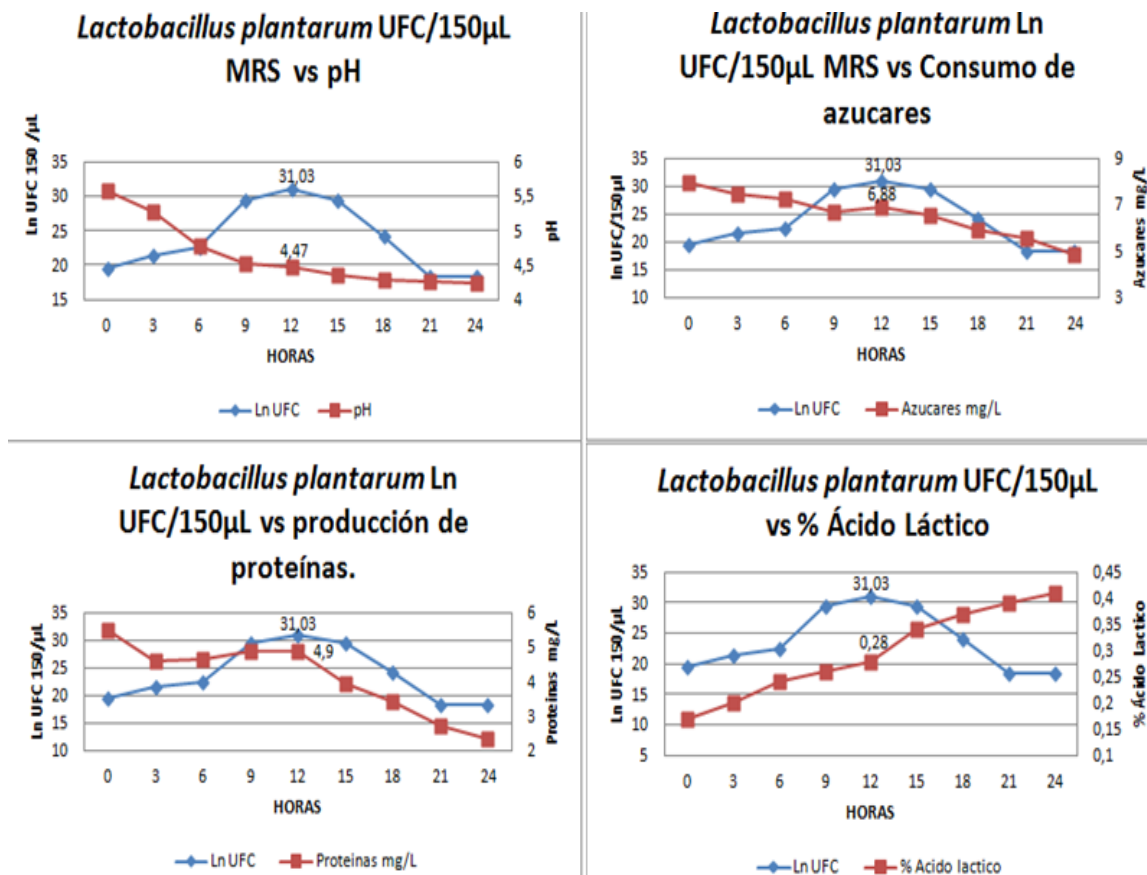
Tabla 7. Datos cinéticos del crecimiento bacteriano de *Lactobacillus plantarum* en el medio MRS

Cepa	Medio
<i>L. plantarum</i>	MRS
Fase de latencia UFC/150µl	< 3
Velocidad específica de crecimiento (μh^{-1})	3,105
Fin fase logarítmica (horas)	12:00
Tiempo de duplicación celular (minutos)	13,39
Numero de generaciones por hora	4,48
Cosecha máxima Ln UFC/150µl	9.91
Incremento celular fin fase logarítmica UFC/150µl	3,0E+14
Incremento celular total	1,2E+08
% de azúcar consumidos fin fase logarítmica	17,53
% azúcares consumidos totales	38,60
% proteína producida fin fase logarítmica	28,25
% proteína consumida total	57,31
R ² fin fase logarítmica	0,9193
pH fase logarítmica	4,47
% ácido láctico fase logarítmica	0.28

¹⁷⁸ YING, D.et al. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. En: Journal of Food Science. Noviembre- Diciembre, 2010. vol. 75, no.9, p. 588–595.

Consumo azúcares en fase logarítmica mg/L	6,88
Producción de proteína fase logarítmica mg/L	4,9

Figura 6. Crecimiento de *L. plantarum* UFC/150µL en medio MRS



Los resultados anteriores muestran que la fase exponencial se alcanzó a las doce horas con un crecimiento de 31,0.Ln UFC/ 150µL, lo cual concuerda con el estudio de Aguirre et al¹⁷⁹ que obtuvo un mayor crecimiento o fase exponencial a las 12 horas.

¹⁷⁹ JURADO; AGUIRRE y RAMÍREZ. Op. Cit., p.1731

En ésta perspectiva, Fajardo y Rodríguez¹⁸⁰ afirman que el crecimiento de las bacterias probióticas, en este caso las BAL pueden estar relacionadas de con el medio de cultivo utilizado y los diferentes contenidos, es decir que la bacteria no podría tener el mismo comportamiento al cambiar de medio de cultivo ya que los nutrientes para su alimentación y crecimiento pueden ser los adecuados en un medio y en otro sean escasos, según lo citado por los mismos autores. Los *Lactobacillus* tienen un metabolismo fermentativo, por lo tanto, son exigentes en cuanto a aminoácidos, péptidos, nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos, además resaltan que el medio de cultivo que posee la mayoría de estos nutrientes es el medio MRS. Con respecto a lo anterior el medio MRS teóricamente posee los siguientes componentes nutricionales.

Tabla 8. Composición teórica del caldo MRS

Nutriente	Extracto de carne (8g)	Extracto de levadura (4g)	D-Glucosa 20g	Aportes totales
Agua %	3,0	1,64	-	4,66
Energía Kcal	16,6	7,4	75,8	99,84
Proteína g	3,1	0,96	-	4,09
Grasa total g	0,1	0,04	-	0,18
Carbohidratos g	0,5	0,82	20	21,31
Fibra Diet. Total g	0	0,26	-	0,26
Ceniza g	1,2	0	-	1,2
Calcio mg	6,5	2,68	-	9,16
Fósforo mg	58,9	4,16	-	63,04
Hierro mg	-	0,16	-	0,16
Potasio mg	-	84,00	-	84,00
Sodio mg	-	135,20	-	135,20
Zinc mg	-	0,17	-	0,17
Magnesio mg	-	7,20	-	7,20
Tiamina mg	-	0,93	-	0,93
Niacina mg	1,9	5,10	-	6,97
Vit. C mg	-	-	-	0,00
Vit. B6 mg	-	-	-	0,00
Vit. B12 µg	-	0,02	-	0,02

Fuente. FAJARDO y RODRÍGUEZ. Op. Cit., p. 79

¹⁸⁰ FAJARDO y RODRÍGUEZ. Op. Cit., p. 80

Desde una perspectiva más general Negroni¹⁸¹, indica que la cinética de fermentación hace referencia al crecimiento bacteriano el cuál es un proceso de multiplicación celular. Por lo tanto, si éste crecimiento se organiza en un gráfico se obtiene una curva la cual se ordena en cuatro etapas: fase de latencia donde no hay un crecimiento bacteriano evidente, fase exponencial o de crecimiento logarítmico en el cual las bacterias se multiplican en progresión geométrica, fase estacionaria la cual el número de microorganismos no declina ni aumenta y por último la fase de declinación o muerte donde existe una reducción de la población microbiana. Debe señalarse, que la cinética de fermentación es la curva de crecimiento microbiano que de acuerdo a Madigan et al ¹⁸² representa la evolución del número de células viables presentes en un cultivo microbiano a lo largo del tiempo es decir, como aumenta, se establece y disminuye su número de acuerdo al consumo de nutrientes.

Agudelo et al¹⁸³ encontró en su estudio donde evaluó los parámetros cinéticos durante 48h en *L. plantarum* en medio MRS, tras realizar la prueba de comportamiento en cuanto a consumo de nutrientes del medio que *L. plantarum* después de 12 horas, éste había consumido el 77% de los azúcares disponibles y terminó con un 3,2% del azúcar total después de 36h, la fase exponencial duró desde las 12h hasta las 36h, a partir de las 36h la bacteria comenzó a consumir otros nutrientes como proteínas y grasas, a las 48 horas sustrato se agotó y la bacteria comienza su fase de muerte. En el mismo estudio mencionan que en las primeras doce horas se produce el 35% del ácido láctico y se estabiliza a las 48 horas.

Cabe destacar que los nutrientes presentes en el medio determinan el ritmo de crecimiento bacteriano, Madigan et al¹⁸⁴ indican que la nutrición microbiana se resume viendo la composición química de los medios de cultivo para que éstos puedan crecer adecuadamente. En este sentido, se comprende la importancia de realizar los parámetros cinéticos ya que a partir de este resultado se puede determinar el proceso de producción, es decir, qué sustrato usar para que exista un crecimiento óptimo además de la temperatura adecuada. Por ende, determinar su posible aplicación a nivel industrial

¹⁸¹ NEGRONI, Marta. Microbiología Estomatológica: Fundamentos y guía práctica., 2 ed., Buenos Aires; medica Panamericana., 2009, 656 p

¹⁸² MADIGAN, Michael; MARTINKO, Jhon y PARKER, Jack. Biología de los Microorganismos. 9 ed. Illinois: Pearson Educación, 2004. 593 p.

¹⁸³ AGUDELO, Claudia; ORTEGA, Rodrigo y HOYOS, José. Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y bacterias ácido lácticas de yogurt. En: Bio. Agro. Julio-Diciembre, 2010. vol. 8, no. 2, p. 8-16.

¹⁸⁴ MADIGAN; MARTINKO y PARKER. Op. Cit., p 594

Figura 7. Crecimiento (UFC/150µL) de *Lactobacillus plantarum* en medio MRS

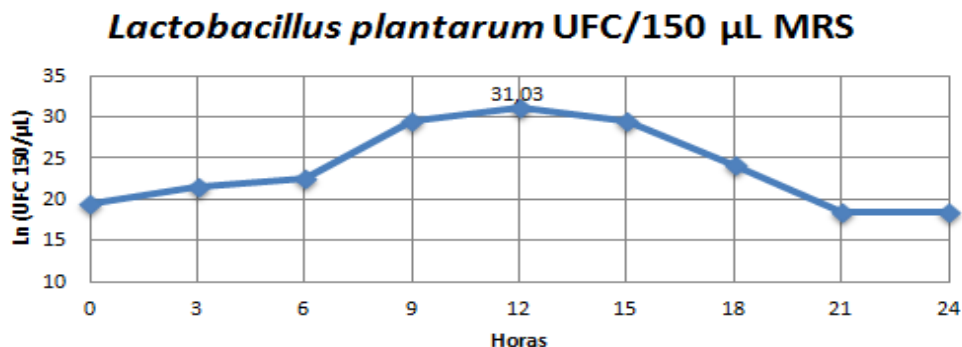


Tabla 9. Efecto de la biomasa Ln (UFC/150 µL) sobre el tiempo del medio del cultivo *Lactobacillus plantarum*

<i>Lactobacillus plantarum</i>									
Tiempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ln UFC/150µL	21,0bc	21,2bc	21,7bc	27,3ab	30,3a	29,1ab	23,3ab	18,4c	18,4c
Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa (p<0.05).									

En la Tabla 9 se observa el efecto de la biomasa Ln UFC/150µL sobre el tiempo, donde *L. plantarum* presentó diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en el tiempo 5, respecto a los tiempo 9 y 1.

Ahora bien, como se puede observar en la Figura 6 y Tabla 9. Se aprecia que el crecimiento incrementa durante las primeras 12 horas, por lo tanto, indica que la BAL está adaptada al medio de cultivo. Con una velocidad específica de crecimiento, de $3,105 \mu h^{-1}$ significa que consume y crece rápidamente además agota los sustratos energéticos hasta las doce horas. El tiempo de duplicación fue de 13,39 minutos, es decir, que la BAL tarda en duplicarse 13 minutos y que genera 4,48 generaciones por hora. Respecto a lo obtenido por Aguirre et al.¹⁸⁵ obtuvo tiempos de duplicación de 42,42 minutos en medio MRS, esto indica que la bacteria usada para el presente estudio obtuvo un mayor crecimiento, ya que el tiempo de duplicación es el tiempo que se toma cada célula en dividirse por ende al tomar 13,39 minutos para realizarlo obtiene un mayor crecimiento y número de generaciones por hora, como resultado que por cada célula se obtienen 16 células más. Sin embargo, su acelerado crecimiento provoca un agotamiento más rápido de los nutrientes presentes en el medio de cultivo.

¹⁸⁵ JURADO; AGUIRRE y RAMÍREZ. Op. Cit., p.46

Dentro de esta perspectiva, la velocidad específica de crecimiento dentro de la cinética de la fermentación está ligada según Fu y Mathews¹⁸⁶ a la concentración de nutrientes en el medio y en la transcripción y traducción del ADN, además se suman variables como la temperatura y pH, del sustrato.

La fase exponencial de *L. plantarum* se obtuvo en el tiempo 5 o a las doce horas en el medio MRS. La fase exponencial según Niño:

Es la fase de crecimiento celular y es proporcional a la concentración de células ya que en esta fase las células se dividen con máxima rapidez porque todas las rutas enzimáticas para metabolizar el medio están operando por ende los microorganismos pueden aprovechar los nutrientes de manera óptima como resultado, al final una fase de latencia donde el crecimiento celular es cero por el agotamiento de nutrientes y metabolitos indispensables¹⁸⁷.

Los resultados anteriores, destacan la posibilidad de la bacteria probiótica en colonizar el sistema digestivo durante esas doce horas que es su fase exponencial ya que existe un máximo crecimiento bacteriano, crecimiento que está ligado al medio utilizado y la aplicación que se desea para el probiótico. En este sentido, Ramírez et al¹⁸⁸ mencionan la importancia de determinar su crecimiento ya que esta información ayuda a establecer su acción inhibitoria a nivel intestinal de bacterias patógenas, además del efecto en el procesamiento de alimentos fermentados a nivel industrial y en la fermentación del ensilaje a nivel de producción pecuaria. Ahora bien, ya que su acción estaría dentro de las doce horas antes de iniciar en su fase de latencia y de muerte, Agudelo et al¹⁸⁹ señalan en su estudio una duración del crecimiento de *L. plantarum* de 48 horas y resalta que a partir de ese tiempo inicia la fase de muerte, en su estudio a partir de las 48 horas después de la siembra, disminuyó sustancialmente el sustrato inicialmente del medio de cultivo utilizado.

¹⁸⁶ FU, Wenge y MATHEWS, A.P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. En: Science Direct. Biochem Eng J. 1999. vol.3, p.163- 170

¹⁸⁷ NIÑO CASTILLO, Clara Milena et al. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. En: NOVA. Febrero-Abril, 2017. vol.15, no. 28, p 19-31

¹⁸⁸ RAMÍREZ RAMÍREZ, José et al. Bacterias Lácticas Importancia en alimentos y efectos en la salud. En: Revista Fuente. Abril-Junio, 2011. vol. 2, no. 7. p. 1-16

¹⁸⁹ AGUDELO; ORTEGA y HOYOS. Op. Cit., p. 11

En este sentido, según Orozco y Solarte¹⁹⁰ expresan en su estudio la importancia de los nutrientes disponibles para el crecimiento y desarrollo de microorganismos entonces para que una célula pueda desarrollarse y alcanzar su fase exponencial es necesario que tengan disponible carbono, nitrógeno y minerales, para formar biomasa, mantenerse y formar los productos finales de fermentación.

6.5.1 Determinación de pH. En la Figura 6 se puede observar el valor de pH de la fase exponencial en medio MRS de *L. plantarum* que fue de 4,47. Respecto a su correlación con la variable tiempo se puede observar en la Tabla 10. La correlación existente es inversa ya que a medida que el tiempo aumenta la variable pH disminuye.

Ahora bien, se observó durante la cinética que los valores de pH disminuyeron, esto quiere decir que a medida que se desarrolle o crezca la bacteria, sustancias que acidifican el medio como el ácido láctico van aumentando. Waldir et al¹⁹¹ indican que el ácido láctico es de amplio uso a nivel industrial como conservante y en bebidas en la industria alimentaria, además se usa en otros campos como en farmacia, medicina, textilería, industria del cuero y para la producción de plásticos bio-degradables.

Jurado¹⁹² menciona que las BAL son microorganismos acidúricos y que pueden crecer a pH inferiores a 5,0 el mismo autor resalta que esta capacidad es debida a mecanismos celulares como bombas de extracción de protones con el fin de mantener al pH intracelular cercano a la neutralidad. Además de ello este proceso genera energía.

Por su parte, Ramírez et al¹⁹³ manifiesta que una característica importante de *L. plantarum* es la producción de ácido láctico durante su crecimiento y que gracias a ello estas bacterias tienen un buen potencial para su utilización como probióticos ya que son ácido tolerantes. Es decir, que si la bacteria crece y acidifica el medio,

¹⁹⁰ OROZCO, M. y Solarte, J. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. Tesis Doctoral. Manizales: Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales, 2003. p. 10, Citado por JURADO GÁMEZ, Henry et al. Op. Cit., p. 33

¹⁹¹ WALDIR, Estela et al. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. En: REv. Perú Biol. Diciembre, 2007. vol. 14, no. 2, p. 271-275

¹⁹² JURADO GÁMEZ, Henry. Evaluación de bacterias ácido-lácticas con características probióticas en la alimentación de lechones en fase de precebo como alternativa al uso de antibióticos. Trabajo de Grado para optar por el título de Doctor. Santiago de Cali: Universidad del Valle. Escuela de Ingeniería de Alimentos. 2010. 85 p

¹⁹³ RAMÍREZ RAMÍREZ, José et al. Op. Cit., p 1

puede sobrevivir su paso a través del TGI sobre todo a nivel de estómago donde se presenta una mayor acidez.

En este sentido, las bacterias ácido lácticas utilizan los nutrientes presentes en el medio de cultivo y según León et al ¹⁹⁴ estas bacterias desdoblan los carbohidratos produciendo ácido láctico y otros metabolitos que favorecen el descenso del pH, estas bacterias pueden ser homofermentativas, las cuales producen principalmente ácido láctico como producto final de la fermentación o heterofermentativas que producen CO₂, etanol, acetato y ácido láctico. *L. plantarum* como se ha mencionado anteriormente es una bacteria homofermentativa¹⁹⁵.

Ahora bien, según Devlieghere et al¹⁹⁶ y Ly et al¹⁹⁷ señalan que las bacterias heterofermentativas producen solamente un 50% de ácido láctico ya que éstas fermentan 1 mol de glucosa para formar: 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂. Por lo cual, Jurado¹⁹⁸ menciona que *L. plantarum* produce un 80% de ácido láctico. Sin embargo, otros autores destacan que *L. plantarum* es heterofermentativa facultativa.

6.5.2 Determinación del porcentaje de ácido láctico. En la producción de ácido láctico se observó aumento del porcentaje de acidez y se obtuvo un incremento que va desde 0,17% en el tiempo cero hasta 0,41% hasta las 24 horas. (Figura 6) Respecto a la relación con la variable tiempo indica una correlación directa entre el tiempo y porcentaje de ácido láctico ya que a medida que avanza el primero el porcentaje de ácido láctico aumenta. (Tabla10)

Agudelo et al ¹⁹⁹ observaron que durante las primeras doce horas una producción del 35% de la cantidad total de ácido láctico en *L. plantarum*, después de este tiempo la producción se ve afectada por el crecimiento del microorganismo y el bajo consumo del sustrato, en la experimentación llevada a cabo por los mismos autores la BAL se estabilizó a las 48 horas.

¹⁹⁴ LEÓN, Ángela et al. Bacterias ácido lácticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida. En: VITAE. 2006. vol. 13, no. 2, p. 26-35

¹⁹⁵ JURADO. Op. Cit., p. 7

¹⁹⁶ DEVLIGHERE, Frank; VERMEIREN, Lieve y DEBEVERE, Johan. New preservation technologies: Possibilities and limitations. En: ELSEVIER. Abril, 2004. vol. 14, no. 4, p. 273-285

¹⁹⁷ LY, M. et al. Retention of aroma compounds by lactic acid bacteria in model food media. En: Food Hydrocolloids. Marzo, 2008. Vol. 22, no. 2, p. 211-217

¹⁹⁸ JURADO. Op. Cit., p. 49

¹⁹⁹ AGUDELO; ORTEGA y HOYOS. Op. Cit., p. 11

Según Sánchez²⁰⁰ el principal objetivo de las bacterias lácticas es provocar un aumento de la acidez debido a la producción de ácidos orgánicos y que conlleva a una disminución del pH el cual tiene un efecto de inhibición de microorganismos patógenos o alterantes en el producto en el caso de la industria de alimentos, esto debido a que son escasas las bacterias que sean capaces de crecer en los niveles de pH alcanzados por la acción de las BAL.

Según lo citado por Giraud et al²⁰¹ destacan que *L. plantarum* es una bacteria láctica capaz de mantener el pH entre el interior y el exterior de la célula en presencia de grandes cantidades de lactato, por lo que puede soportar medios acidificados y terminar completamente su proceso de fermentación *L. plantarum*, no solo utiliza el carbono disponible para producir ácido láctico, sino también en la generación de otros productos importantes tales como metabolitos, exopolisacáridos, enzimas y bacteriocinas las cuales inhiben la presencia de bacterias patógenas o Gram negativas.

6.5.3 Determinación consumo de azúcares totales. La correlación entre las variables tiempo y consumo de azúcares se encuentran en la Tabla 10 y Figura 6. Donde se destaca que existe una correlación inversa ya que a medida que el tiempo aumenta la variable consumo de azúcares va disminuyendo; esto debido a que mientras las colonias van en aumento se van disminuyendo los azúcares presentes en el medio debido a que éstas lo utilizan en su metabolismo celular.

Las BAL utilizan como sustrato para su crecimiento carbohidratos que posteriormente los transforman en ácido láctico acidificando el medio. Según, Bieleka et al²⁰² para que *L. plantarum* cumpla su acción probiótica y colonice los enterocitos es necesario que disponga de una dieta rica en sustratos prebióticos entre los cuales se destacan los de naturaleza lignocelulósica, derivados de lactosa, inulina, entre otros.

Por otro lado, de acuerdo a lo afirmado por Cabeza et al

²⁰⁰ SÁNCHEZ MARTÍNEZ, Jorge. Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: Actividad metabólica y producción de exopolisacáridos. Tesis de doctorado. Villaviciosa: Universidad de Oviedo. Departamento de Biología Funcional. 2005. 7 p.

²⁰¹ GIRAUD, Eric. CHAMPALIER, Alan, y RAIMBAULT, Maurice. Degradation the raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. En: Appl Enviro Microb. 1994. vol.60, no.12, p. 4319-4323.

²⁰² BIELEKA, María; BIEDRZYCKA, Elzbieta y MAJKOWSKA, Anna. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. En: Food Research International. 2002. vol. 35. no.2-3, p.125-131 citado por: JURADO; RAMIREZ y AGUIRRE. Op. Cit., p. 48

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos auxótrofos, es decir, requieren una serie de componentes (aminoácidos, péptidos, purinas, pirimidinas y vitaminas tales como la vitamina B, el ácido pantoténico, la biotina y el ácido fólico) que no pueden ser sintetizados por ellos mismos, debido a lo cual deben encontrarse en el medio de crecimiento. El elevado requerimiento nutritivo (mayor al de los seres humanos) y la cantidad de energía que pueden obtener por fermentación, condicionan los hábitats naturales que son propicios para el desarrollo de estas bacterias, siendo los mismos: la leche y los productos derivados de la misma, el intestino y las mucosas de humanos y animales así como también plantas intactas y en descomposición²⁰³.

El consumo de azúcares que realice la bacteria en medio de cultivo es proporcional al crecimiento bacteriano y la producción de ácido láctico ya que el principal sustrato para producir ácido láctico son los carbohidratos, García et al²⁰⁴ señala que para la producción biotecnológica de ácido láctico es necesario sustratos ricos en carbohidratos.

Almanza y Barrera²⁰⁵ deducen que las especies heterofermentativas utilizan la ruta Emden-Meyerhoff para metabolizar hexosas que inicia con la fosforilación de la glucosa para producir ácido láctico. Para el metabolismo de pentosas lo realizan por la ruta de las pentosas fosfato y hace presencia la enzima fosfocetolasas, inducibles a la presencia de pentosas en bacterias heterofermentativas facultativas y forman ácido láctico, acético y etanol. Los mismos autores mencionan que el metabolismo de las bacterias homofermentativas se realiza por la vía de la glucólisis produciendo principalmente ácido láctico.

6.5.4 Determinación de proteínas *L. plantarum*. Como resultado en la fase exponencial el valor de proteína en *L. plantarum* es de 4,9 mg/L en la Figura 6 se muestran los valores de proteína encontrados en los tiempos de la cinética de fermentación versus el crecimiento bacteriano. En cuanto a su correlación comparada con la variable tiempo se puede observar en la Tabla 10, donde indica que posee una correlación inversa pero a partir del tiempo 5 la producción de proteína va en crecimiento, pero, a partir de este tiempo la proteína decrece debido a que inicia la fase de muerte celular.

²⁰³ CABEZA, E. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. Simposio Regional de Microbiología "Microorganismos eficientes en el sector productivo", Barranquilla, 2006. Citado por: FAJARDO y RODRÍGUEZ. Op. Cit., p.88

²⁰⁴ GARCÍA, Carlos; ARRAZÓLA, Guillermo y DURANGO, Alba. Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. En: Temas Agrarios. Julio- Diciembre, 2010. vol. 2, no. 15., p. 9-26

²⁰⁵ ALMANZA, Frabrizio y BARRERA, Eduardo. Tecnología de Leches y Derivados. 1 ed. Bogotá: UNISUR. 1991 p 61

Los valores de producción de proteínas en el medio MRS son variables aunque se observa una tendencia decreciente marcada después de la fase exponencial. En la Figura 6, se puede observar que desde las 3 horas hasta las 12 horas la producción constante y elevada de proteínas para disminuir hasta las 24 horas. El resultado anterior indica un mayor producción de proteína fue a partir de las 12 horas donde es su fase exponencial por ende la gráfica posee una tendencia decreciente después del tiempo 5.

Jurado ²⁰⁶ resalta en la producción de bacteriocinas, péptidos bioactivos con propiedades antagonicas frente a bacterias patógenas ya que a nivel industrial tiene gran importancia ya que pueden ser utilizadas como aditivos en leches fermentadas para consumo humano o en alimentación animal incluyéndolas en balanceados.

Tabla 10. Regresiones de pH, % ácido láctico, consumo de azúcares y producción de proteína comparados con la variable tiempo de *L. plantarum*

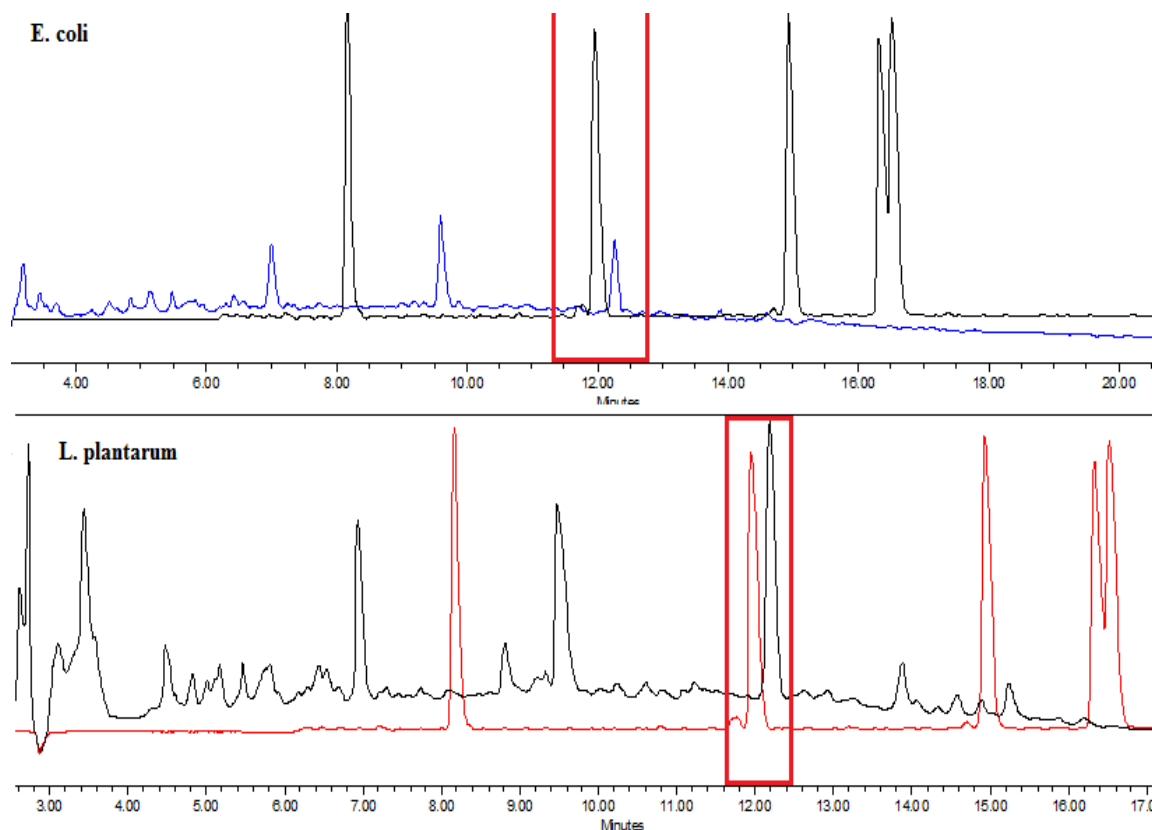
Variable	Regresión	Pendiente		Intercepto	r ²
Ph	Cuadrática	-0.136(t)	0.003(t ²)	5.572	0,978
% ácido láctico	Lineal	0.10		-0.171	0.945
Consumo de azúcares	Cuadrática	-0.677(t)	-0.020(t ²)	77.991	0.961
Producción de proteínas	Cuadrática	-0.101(t)	-0.506(t ²)	512.167	0.910

6.7 IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS DEL SOBRENADANTE POR HPLC – DAD en *L. plantarum* y *E. coli* O157:H7

Como resultado se detectó 4 picos la muestra presentó el tiempo de retención similar al pico del estándar de calibración correspondiente al péptido de composición VAL-TIR-VAL con una concentración de 0,48 mg/mL.

²⁰⁶ JURADO. Op. Cit., p. 4,12

Figura 8. Cromatogramas de *E. coli* O157:H7 y *L. plantarum*



6.7 IDENTIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS DEL SOBRENADANTE DE LA CEPA LÁCTICA *Lactobacillus plantarum* Y LA CEPA PATÓGENA *Escherichia coli* O157:H7 POR HPLC-DAD

Se obtuvo como resultado de la identificación de aminoácidos de la cepa láctica *L. plantarum* y la cepa patógena *E. coli*, con el objetivo de dar a conocer más detalladamente el análisis de péptidos, así como también la importancia del mismo en el comportamiento de las cepas. Los resultados del análisis en las muestras se encuentran en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11. Identificación de aminoácidos de *Lactobacillus plantarum*

No	Aminoácidos	Cantidad relativa %
1	Ácido aspártico	5,0
2	Serina	9,0
3	Arginina	8,7
4	Tirosina	51,6
5	Valina	15,7
6	Prolina	2,0

Tabla 12. Identificación de aminoácidos de *Escherichia coli* O157:H7

No	Aminoácidos	Cantidad relativa %
1	Ácido aspártico	4,5
2	Serina	8,9
3	Arginina	8,0
4	Tirosina	50,7
5	Valina	10

Por consiguiente, en las dos bacterias predomina el aminoácido tirosina con 51,6% en *L. plantarum* y 50,7% para *E. coli* O157:H7. En *L. plantarum* el segundo aminoácido predominante es valina con 15,7% al igual que *E. coli* O157:H7 con 10%. Pero, el aminoácido prolina en *E. coli* O157:H7 se encuentra ausente. Es decir, medios que tengan nutrientes con estos aminoácidos también favorece el crecimiento tanto de la bacteria benéfica como de la patógena.

Ahora bien, como plantea McFaddin²⁰⁷, los aminoácidos son compuestos que hacen parte estructural de las proteínas y que contienen grupos amino (-NH₂) y carboxilo (-COOH).y se caracterizan por la sustitución de un grupo amino en el residuo alquilo R-CH (-NH₂) COOH.

Para las bacterias es importante la presencia de proteínas o compuestos nitrogenados que favorezcan su metabolismo y por ende su crecimiento y desarrollo. No obstante, esta característica favorece procesos industriales como lo manifiesta Leblanc et al²⁰⁸ ya que las BAL juegan un papel muy importante durante la fermentación de la leche, principalmente en el fraccionamiento de proteínas a péptidos y aminoácidos libres, originando péptidos bioactivos, los

²⁰⁷ Mc FADDIN, Jean. BIOCHEMICAL TESTS FOR IDENTIFICATION OF MEDICAL BACTERIA, 3 ed. U.S.A: Lippincott Williams y Wilkins, Inc. 200. 66 p.

²⁰⁸ LEBLANC, J. et al. Immunomodulatory effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. En: Journal of Dairy Science. Noviembre, 2002. vol. 85, no. 11, 2733-2742

cuales tienen efectos inmunomodulantes, anticancerígeno, hipocolesterolemia. Leblanc²⁰⁹ agrega que los péptidos bioactivos como compuestos de aminoácidos con actividad inhibitoria o bacteriocinas.

Dentro de ésta perspectiva, las bacteriocinas importantes en *L. plantarum* son las plantaricinas, que como afirma Leblanc et al²¹⁰ relacionan las bacteriocinas por al crecimiento bacteriano, es decir que conforme la bacteria crece en masa mayor sería su producción de bacteriocinas, pero cuando se disminuye su crecimiento y llega a una fase estacionaria la bacteriocina decae en producción. De acuerdo a lo mencionado por Zapata et al²¹¹ la plantaricina es formadora de complejos de poración que consisten de dos péptidos diferentes que aseguran una mejor acción antimicrobiana, además agrega que el mecanismo de acción de la plantaricina frente a bacterias patógenas es a través de uniones electrostáticas con fosfolípidos cargados negativamente de la membrana celular, luego se insertan en la membrana y los monómeros de la bacteriocina forman agregados proteicos que forman el poro que propicia la salida de iones como potasio y magnesio, sale fuerza motriz de protones, ATP y aminoácidos, al no existir luego de ello transporte activo y movimiento de la célula, no existe energía y por tanto hay muerte celular.

Las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus plantarum* producen según Mohankumar y Murugalata²¹² biocinas extracelulares y ácidos orgánicos con actividad bactericida.

Lactobacillus plantarum utilizada en el presente estudio de acuerdo a Asyikin et al²¹³ menciona que las proteínas producidas por esta cepa pueden clasificarse en clase II y clase III. Beristain et al²¹⁴ resaltan que las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos heterogéneos que difieren en su actividad, acción, peso molecular y propiedades físico químicas. Ahora bien, según los mismos autores la producción de bacteriocinas ocurre en forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano y tiene una relación con la biomasa producida, la clase II de

²⁰⁹ Ibid., p 2739

²¹⁰ Ibid. p 2740

²¹¹ ZAPATA, et al. Op. Cit., p 78

²¹² MOHANKUMAR, A. y MURUGALATA, N. Characterization and antibacterial activity of bacteriocin producing *Lactobacillus* isolated from raw cattle milk sample. International Journal of biology. Julio, 2011. vol. 3, no. 3, p. 128-143

²¹³ ASYIKIN, Ismatul et al. Protein Produced by *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 during Stress. World Journal of Science and Technology Research. Octubre, 2013. vol. 1, no. 8, p. 2329-3837

²¹⁴ BERISTAIN, S., PALOU, E. y LÓPEZ, A. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos. 2012. vol. 6, no. 2, p. 64-78

bacteriocinas o no lantibioticos poseen una secuencia de 30 a 60 amino ácidos y se subdividen en tres grupos de los cuales los amino ácidos tirosina y valina se encuentra en la secuencia amino-terminal de tres de ellos (Clase IIa, clase IIb y Clase IIc). Según Zapata et al²¹⁵ *L. plantarum* tiene un gran número de plantaricinas y es diferente según la cepa utilizada. La clase III según menciona Mondragón et al²¹⁶ son péptidos con masa molecular de > a 30 KDa. Es decir, que según la investigación de Bradley et al²¹⁷ el peso molecular de la bacteriocina producida por la cepa *L. plantarum* ATCC 8014 es de 122 KDa por lo tanto se puede considerar una bacteriocina de clase III. En éste sentido, las bacteriocinas presentes en la cepa promueven la lisis bacteriana y desestabilización de la membrana celular.

Sin embargo, es necesario realizar estudios respecto a la secuencia encontrada Val-Tyr-Val para determinar la bacteriocina que se encuentra en la cepa en estudio y por consiguiente encontrar más información respecto a su mecanismo inhibitorio.

²¹⁵ ZAPATA, et al. Op. Cit., p 79.

²¹⁶ MONDRAGÓN, Guadalupe. Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. Investigación y Ciencia. Septiembre- Diciembre, 2013. vol.21, no. 59, p. 64-70

²¹⁷ BRADLEY, W., MYSLIWIEC, T. y HASSAN, G. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). Food Microbiology. Abril, 2005. vol. 22, no. 3, p. 199-204

6.8 MICROENCAPSULACIÓN DE *Lactobacillus plantarum*

6.8.1 Estudio de supervivencia y estabilidad de *Lactobacillus plantarum* microencapsulación por spray drying.

6.8.1.1 Viabilidad. Los resultados de viabilidad se encuentran en la Tabla 13. En efecto, la viabilidad obtenida de la bacteria microencapsulada es buena con respecto a lo obtenido por Rodríguez et al²¹⁸, puesto que obtuvieron porcentajes de viabilidad de 84% y 96% en *L. rhamnosus* y en *L. casei* respectivamente. Sin embargo Montes²¹⁹ obtuvo una viabilidad de 46,53% para *L. casei* sometido a 150 °C en secado por aspersión y en el presente estudio se obtuvo una viabilidad del 83,3% para *L. plantarum* sometida a 170°C con el mismo método de encapsulación y empleando los mismo materiales encapsulantes. Según Anal et al²²⁰ y Lian et al²²¹ la supervivencia de las bacterias a temperaturas altas esta sujeta a la especie bacteriana, las condiciones del proceso de secado, los materiales microencapsulantes, entre otros. Para *L. plantarum* Valero y Frutos²²² han reportado viabilidad del 93%. La viabilidad indica cuantas bacterias permanecen viables después del proceso de microencapsulación expresado en porcentaje. De manera que, al obtener viabilidad de la bacteria significativa después de haber sometido la BAL a gas caliente es significativo, ya que como lo describe De Araújo²²³ los probióticos sometidos a este proceso dependen de la temperatura de entrada y salida ya que por ello puede ocurrir daños en la membrana.

²¹⁸ RODRÍGUEZ; GIRALDO y MONTES. Op. Cit., p 138.

²¹⁹ MONTES. Op. Cit., p 24.

²²⁰ ANAL y SINGH. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, Trends Food Sci Tech, 2007. Vol. 18, no. 5, p. 240–25. Citado por: Montes. Op. Cit., p 24.

²²¹ LIAN, HSIAO y CHOU. Survival of bifidobacteria after spray-drying. En: International Journal of Food Microbiology. 2002; vol. 74, p. 79-86. Citado por: Montes. Op. Cit., p 24.

²²² VALERO CASOS, E y FRUTOS M. Efecto de diferentes tipos de encapsulación sobre la supervivencia de *Lactobacillus plantarum* durante el almacenamiento con inulina y digestión in vitro. En: Ciencia y Tecnología de alimentos. 201. Vol. 64 no. 2, p. 824-828

²²³ DE ARAÚJO, et al. Op. Cit., p 118.

En otras palabras, Peighambardoust et al²²⁴ deduce que temperaturas que estén por encima de los 90°C pueden ocasionar daños graves en la estructura celular de la cepa que se desea microencapsular, sumado a eso el tiempo sometido al calor también es un factor que afecta su viabilidad. Shokri et al²²⁵ sugiere una preadaptación de la bacteria a microencapsular, es decir someterla a condiciones de estrés y adicionando materiales protectores al medio de cultivo antes del proceso de secado para aumentar la viabilidad.

6.8.1.2 Eficiencia. El resultado de la eficiencia del microencapsulado se encuentra en la Tabla 13. En este sentido, Parra²²⁶ expresa que la mayor eficiencia de encapsulación en secado por aspersión, se encuentra entre el 96 y 100%. No obstante López et al²²⁷ encontró diferencias significativas en los valores de eficiencia utilizando el mismo método de secado de aspersión con diferentes equipos, encontrando eficiencias cercanas al 87% en el caso de equipos a escala de laboratorio. Parra²²⁸ también resalta que la eficiencia de la liberación controlada de las capsulas depende de la composición y estructura de la pared principalmente, pero también de las condiciones de operación durante la producción y uso de estas partículas (temperatura, pH, presión, humedad); de ahí que la obtención del microencapsulado puede ser alterada por diferentes factores afectando su eficiencia. Es decir, que este factor se ve afectado por la liberación del material microencapsulado ya que como agrega Ramos et al “Existen varios factores que afectan la liberación del principio activo desde estos sistemas. Entre ellos se encuentran la composición y masa molecular del polímero, el contenido de principio activo, el tamaño y porosidad de las microesferas y las características físico-químicas del principio activo”²²⁹.

²²⁴ PEIGHAMBARDOUST, S. et al. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. En: Trends in Food Science & Technology. Citado por: DE ARAÚJO, et al. Op. Cit., p 118.

²²⁵ SHOKRI, Z. et al. Factors affecting viability of *Bifidobacterium bifidum* during spray drying. En: Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015. vol. 23, no.7, p.1-9.

²²⁶ PARRA-HUERTAS R. Revisión: microencapsulación de alimentos. En: Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín. 2010.vol. 63, No.2, p. 5669-5684,

²²⁷ LÓPEZ, et al. Secado por aspersión de extracto acuoso de *Bidens alba* L. a escalas de laboratorio y banco. En: Rev Cubana Plant Med. Septiembre – Diciembre, 2008. vol.13, No. 4.

²²⁸ PARRA. Op. Cit., p 5680.

²²⁹ RAMOS PICOS, Diana; GÓMEZ CARRIL, Martha y FERNANDEZ MENA, Dianelis. Métodos de obtención de microesferas biodegradables. En: Rev. Cubana de Farmacia.Mayo-Agosto, 2001. vol. 35, no.2, p. 126-135

Tabla 13. Viabilidad y eficiencia de *L. plantarum* microencapsulado

Factor	Valor obtenido %
Viabilidad del microencapsulado	83,3
Eficiencia del microencapsulado	88,4

6.8.2 Caracterización física de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado

Tabla 14. Valores caracterización física de *L. plantarum* microencapsulado

Factor	Valor obtenido
Humedad relativa	7,79%
Actividad de agua	0,4
Humectabilidad	1:56 min
Solubilidad	96%

6.8.2.1 Humedad relativa. El valor de humedad relativa se encuentra en la Tabla 14. En esta perspectiva, Meng et al²³⁰ destacan que el porcentaje de humedad relativa del probiótico microencapsulado es una variable de importancia, que puede influir en la conservación de los microorganismos vivos. La humedad se midió a los 37 días de almacenado, obteniendo un porcentaje de 7,79%. Al respecto Páez²³¹ enfatiza que los valores de humedad deben estar entre 3,5 y 4% para que el material encapsulado se mantenga estable durante el almacenamiento. Puesto que como expresa Ying et al²³² cuando el contenido de humedad es alto, el microencapsulado se vuelve propenso al deterioro.

Montes²³³ reporta en su estudio porcentajes de humedad de 6.37% y 7.03% para de *L. casei* y *L. rhamnosus* microencapsulados en secado por aspersión y además de valores de humedad de 2,67% y 2.87% para *L. casei* y *L. rhamnosus* encapsulados por liofilización, ambos métodos emplean los mismos materiales microencapsulantes, al igual que el presente estudio. Es importante resaltar, que a pesar de que los valores superan los óptimos para el material microencapsulado, los resultados arrojados en el presente estudio son similares a lo obtenido por Montes, a pesar que se alejan de los valores óptimos no necesariamente se traduce en el detrimento del material microencapsulado, pues lo anterior se reflejó

²³⁰ MENG, X. et al. Op. Cit., p 1412.

²³¹ PAEZ, Beatriz. Desarrollo de cultivos probióticos deshidratados por secado spray para la aplicación en alimentos. Tesis de grado para obtener el título de Doctor en ciencias exactas. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires. p. 145 2013

²³² YING, D. et al. Op. Cit., p 588.

²³³ MONTES. Op. Cit., p 57, 70, 71.

en su importante viabilidad y crecimiento a través del tiempo. A su vez, no se evidenció contaminación por agentes extraños como hongos o con otras bacterias. No obstante, la humedad relativa puede afectar la conservación del microencapsulado. Es decir, cuanto más bajo sea el porcentaje de humedad mejor será su conservación. Por lo tanto, es importante analizar la técnica de microencapsulación ya que teniendo en cuenta los valores reportados en otros estudios, la técnica usada para microencapsular puede afectar la humedad presente en el producto final.

6.8.2.2 Actividad de agua A_w . El valor de A_w se encuentra en la Tabla 14. Páez²³⁴ describe que la A_w es la cantidad de agua libre en una muestra que puede ser utilizada por microorganismos u otros agentes destructivos. Esta variable se verificó a los 37 días de almacenado, obteniendo valores de A_w de 0,4. Montes²³⁵ destaca que agentes externos, como la A_w constituye un efecto adverso sobre los probióticos, que puede ser reducido con el uso de la microencapsulación, debido a que esta técnica establece una barrera que protege a los microorganismos de agentes externos. En consecuencia se puede deducir que valores bajos de A_w , son beneficiosos para la viabilidad del microencapsulado de bacterias probióticas. El mismo autor menciona que un valor de A_w que beneficie la estabilidad del microencapsulado debe ser próximo a 0.3, puesto que esto implica un menor contenido de agua libre para reacciones bioquímicas, favoreciendo la viabilidad del producto. El valor de A_w obtenido en el microencapsulado de *L. plantarum* se puede considerar aceptable puesto que no representan valores elevados, debido a que según lo mencionado por Herrera et al²³⁶ valores de A_w por encima de los 0.60 tienen susceptibilidad a contaminarse con agentes externos. Esto quiere decir que el microencapsulado se encuentra en buenas condiciones después de 37 días de almacenamiento. En su estudio Montes¹⁸⁴ indica valores de A_w con *L. casei* y *L. rhamnosus* de 0,32 y 0,38 respectivamente, con los mismos materiales microencapsulantes e igual técnica de microencapsulación que la utilizada en la presente estudio, los valores obtenidos en el estudio mencionado, se relacionan con los encontrados en esta investigación. Lo anterior, indica que la técnica de microencapsulación y sus materiales encapsulantes reducen la cantidad de agua libre favoreciendo el almacenamiento y conservación del material probiótico a temperatura ambiente.

²³⁴PAEZ. Op. Cit. p. 147

²³⁵MONTES. Op. Cit. p. 58

²³⁶ROBINSON, David. Bioquímica de los alimentos. 1 ed. Zaragoza: Acribia. 1991. 56 p

6.8.2.3 Humectabilidad. El valor encontrado de humectabilidad se encuentra en la Tabla 14. Páez²³⁷ explica que la humectación de las partículas es el proceso que controla la reconstitución y la velocidad de recuperación celular. La humectabilidad del microencapsulado de *L. plantarum* dio como resultado 1 minuto 56 segundos, tiempo que tomo 1g de polvo en sumergirse bajo la superficie de un volumen de 100 mL de agua destilada. El tiempo de humectabilidad obtenido de la muestra de *L. plantarum* microencapsulado con inulina y maltodextrina, es relativamente bajo comparado con los valores reportados en el estudio de Montes²³⁸ para bacterias del género *Lactobacillus* microencapsuladas con inulina como material prebiótico y maltodextrina como material pared con el mismo método de encapsulación (*L. casei* 6.33 min; *L. rhamnosus* 4.52 min). Montes²³⁹ enfatiza en que una lenta rehidratación dada en escenarios controlados, demuestra mejor viabilidad y maximiza la recuperación celular en comparación con la rehidratación inmediata. Por lo tanto, tiempos cortos de humectabilidad como los obtenidos pueden afectar la viabilidad y recuperación de los probióticos. El tiempo bajo de humectabilidad pudo ser debido a los valores de humedad altos obtenidos en el microencapsulado, ya que de acuerdo con Fernández et al²⁴⁰ los polvos con porcentajes de humedad altos contribuyen en la humectación debido a que el líquido penetra en los poros con mayor facilidad. Sin embargo, Susana et al²⁴¹ destaca que la humectabilidad es una propiedad muy importante en muchos problemas prácticos. Según como lo deduce Di Battista²⁴² humectabilidades superiores a cinco minutos no son muy promisorias para un material microencapsulado.

²³⁷ PAEZ. Op. Cit. p. 119

²³⁸ MONTES. Op. Cit. p.120

²³⁹ Ibid., 119

²⁴⁰ FERNANDES, R.; BORGES, S. y BOTREL, D. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulinas wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. En: Carbohydrate Polymers. Enero, 2014. vol.101, p. 524–532.

²⁴¹ SUSANA, Laura; CAMPACI, Filippo y SANTOMASO, Andrea. Wettability of mineral and metallic powders: Applicability and limitations of sessile drop method and Washburn's technique. En: Powder Technology. Agosto, 2012. vol. 226, p. 68–77.

²⁴² DI BATTISTA, Carla Agustina. Microencapsulación de Fitoesteroles Mediante Secado por Atomización. Tesis de Doctor en Ingeniería Química. Bahía Blanca: Universidad Nacional del Sur, 2016. 97 p.

6.8.2.4 Solubilidad. El resultado de solubilidad se encuentra en la Tabla 14. Sánchez²⁴³ menciona que el índice de solubilidad en agua define la habilidad de los constituyentes del microencapsulado de disolverse en el agua. El resultado que se obtuvo fue del 96% de solubilidad de la muestra, valor cercano al reportado por Montes²⁴⁴ en su estudio obtuvo la solubilidades de probióticos microencapsulados mediante el método de liofilización con los mismos materiales microencapsulantes obteniendo solubilidades de 98.99% y 96.99% para *L. casei* y *L. rhamnosus* respectivamente. La misma autora manifiesta que la alta solubilidad, está estrechamente relacionada las características químicas y estructurales, relacionadas con el número de azúcares libres y el grado de polimerización (GP). Además Montes resalta ²⁴⁵ que las propiedades de rehidratación de los polvos encapsulados, como la solubilidad pueden afectar la viabilidad de los microorganismos al ser un paso crítico en su recuperación luego de su liofilización, porque las células que se sometieron a una posible lesión subletal pueden no ser capaces de reparar dicho daño si se rehidratan en condiciones inadecuadas. Por otra parte Villena et al²⁴⁶ expresan que la solubilidad de los elementos de la pared de la capsula intervienen en la velocidad de difusión, por lo cual resaltan la importancia de elegir una matriz o membrana adecuada, que sumada a otros factores relevantes, influyen en la velocidad de liberación del contenido de las microcápsulas.

6.8.3 Caracterización estructural

6.8.3.1 Morfología y tamaño de las microcápsulas. Los resultados estructurales del microencapsulado se pueden observar en la Figura 9 y 10. El tamaño de la partícula se encuentra entre los 35,68 µm y 15,18 µm. En cuanto a su morfología describe como se una esfera simple y en algunos casos irregulares donde no se puede observar el recubrimiento ni la membrana.

Según el estudio de De Araújo²⁴⁷ el tamaño de las microcápsulas fue de 7-15µm en promedio y con una morfología circular y partículas irregulares. Lo anterior

²⁴³ SANCHEZ REINOSO, Zain. Evaluación de propiedades fisicoquímicas, morfológicas y sensoriales de microencapsulados de cacao obtenidos por spray drying. Tesis de investigación presentada para optar por el título de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia. 2016. p 42

²⁴⁴ MONTES. Op. Cit. p.74

²⁴⁵ Ibid., p. 75

²⁴⁶ VILLENA, et al. Op. Cit. p. 48.

²⁴⁷ DE ARAÚJO URIBE, Natalia. Viabilidad de los Probióticos *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* microencapsulados bajo la técnica de secado por aspersión. Trabajo de grado presentado para obtener el título de Magister en Biotecnología. Medellín: Universidad Nacional de Colombia. 2016. p. 36

coincide con el presente estudio ya que fueron llevadas a cabo por el método de secado por aspersión.

Figura 9. Microfotografía por microscopia electrónica de barrido (SEM) cápsulas de *L. plantarum* para observar morfología

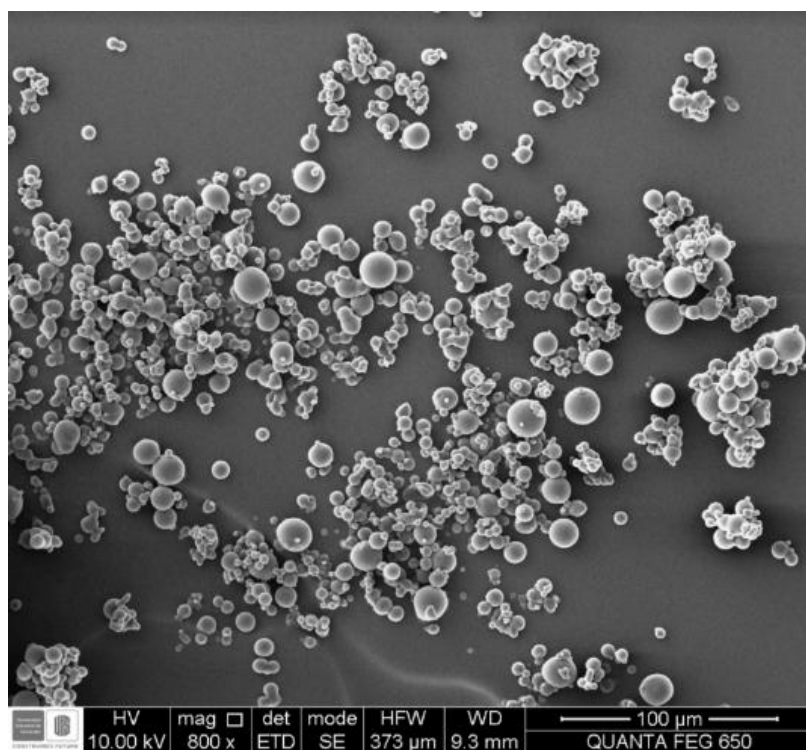
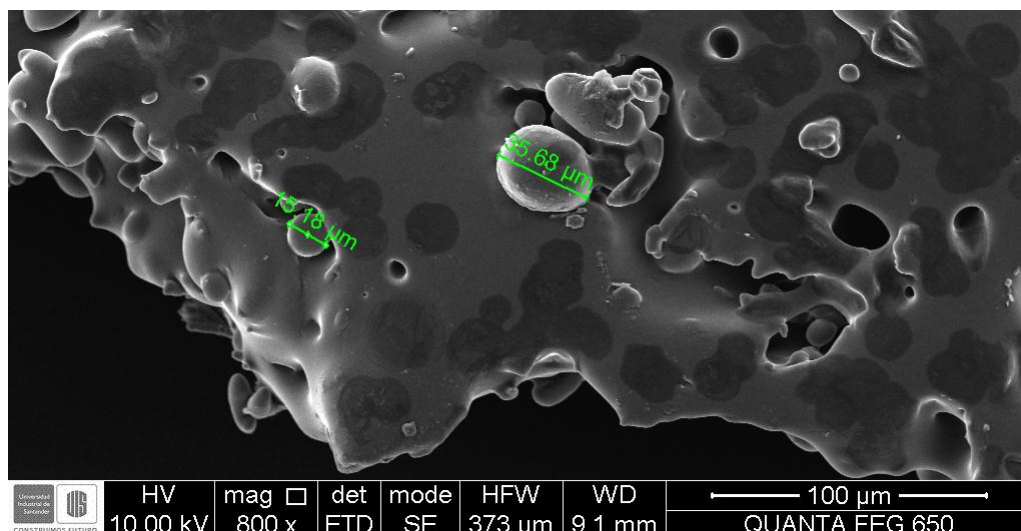


Figura 10. Microfotografía electrónica de barrido (SEM) *L. plantarum* tamaño microcápsula



El tamaño de partícula se puede comparar con los valores obtenidos en el estudio de Montes²⁴⁸ que reporta tamaños de 6,33μm y 6,86μm para *L. casei* y *L. rhamnosus*, valores que indican tamaño de partícula pequeño mediante la técnica de secado por aspersión. Rajam y Anandharamakrishnan²⁴⁹ reportan un valor de 53,99μm para *L. plantarum* microencapsulada por liofilizado por pulverización utilizando como materiales pared aislado de proteína de suero de leche y Alginato de sodio, valor relacionado al rango mayor obtenido. Todorov y Gombossy²⁵⁰ reportan un tamaño de *L. plantarum* sin microencapsular de 0,9-1,2 μm de ancho y 1,0- 8,0 μm de largo, el tamaño obtenido de la partícula microencapsulada en este estudio fue de 35,68μm, es decir, que hubo un incremento de tamaño en la partícula que según lo mencionado por Esquivel et al²⁵¹ depende del material inicial alimentado y de las condiciones de operación del secado por aspersión.

²⁴⁸ MONTES. Op. Cit. p.56

²⁴⁹ RAJAM, R., y ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Spray freeze drying method for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*. En: Journal of Food Engineering. Diciembre, 2015. Vol. 166, p. 95–103.

²⁵⁰ TODOROV, Stetoslav y GOMBOSSY, Bernedette. *Lactobacillus Plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production. En: Food Reviews International. Abril, 2010.vol. 26, no. 3, p. 205–229

²⁵¹ ESQUIVEL GONZALES B.; OCHOA MARTINEZ L y RUTIAGA-QUIÑONES O. Microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. En: Red de Revistas Científicas de America Latina y el Caribe, España y Portugal. 2015. vol. 16, no. 2, p.180-192

Esquivel et al²⁵² menciona que el proceso de microencapsulación forma capsulas cuyo tamaño aproximado varía de 5 a 300µm de diámetro. Como lo señala Rojas²⁵³ capsulas con tamaños entre 10-100µm se consideran polvos finos y capsulas entre 2 y 3mm se denominan partículas de mayor tamaño. De acuerdo con, Rodríguez et al²⁵⁴ cuando se reportan grandes tamaños de la microcápsulas, existe mayor posibilidad de contacto con agentes externos y como consecuencia mayor deterioro durante el almacenamiento; por lo tanto el microencapsulado de *L. plantarum* obtenido puede considerarse de partícula pequeña y en consecuencia puede presentar menor deterioro durante su almacenamiento. Según Villena et al²⁵⁵ el tamaño de partícula ideal debe estar entre los 15-100µm, en un valor inferior a 15µm puede que no exista una protección adecuada para la bacteria microencapsulada y por el contrario si es mayor a 100µm es susceptible a ser atacada por agentes externos como bacterias, hongos, entre otros. Lo anterior indica que el tamaño de la partícula de *Lactobacillus plantarum* es adecuado para llevar a cabo su función protectora.

6.8.4 Ensayos de susceptibilidad de *L. plantarum* microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas. De acuerdo a Vázquez et al:

El proceso digestivo y absorción de nutrientes en el tracto gastrointestinal se encuentra favorecido por el pH de la mucosa intestinal. El pH se encuentra en un amplio rango, es decir, entre 1.0 a 8.0, dependiendo del sector involucrado. El pH del estómago varía entre 1.0 a 3.0, en el intestino delgado de 5.0 a 7.0 y en el intestino grueso es alrededor de 8.0. El mantenimiento de estos valores influyen positivamente en la homeostasis celular, así como en la absorción de nutrientes y fármacos²⁵⁶.

Para la investigación se tomó como criterio de selección un valor de pH para el estómago de 3.0, y para el intestino delgado un pH de 5,5 además en este último se evaluó la acción de sustancias secretadas por el proceso de digestión como las sales biliares y bilis.

²⁵² Ibid. p. 181

²⁵³ RODRÍGUEZ, Alejandra; ROJAS Andrés, RODRÍGUEZ, Sneyder. Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. En: Revista Biosalud. 2016.vol.15, no.2, p. 106-115

²⁵⁴ RODRÍGUEZ; GIRALDO y MONTES. Op. Cit., p. 142

²⁵⁵ VILLENA, et al. Op. Cit., p. 48.

²⁵⁶ VASQUEZ, María et al. pH de la superficie luminal de la mucosa gastrointestinal de crías de alpacas durante las primeras semanas de edad. En: Rev. investig. vet. Perú. 2012. vol. 23, no. 1, p. 20-26

6.8.4.1 Viabilidad de *L. plantarum* microencapsulado a pH 3,0 durante 24 horas La resistencia al pH de *L. plantarum* fue de 6.4×10^9 UFC/150µl, esto quiere decir que si existe crecimiento de la bacteria microencapsulada sometida a un pH ácido (Tabla 15).

Tabla 15. Viabilidad de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado a pH 3,0 durante 24 horas

pH 3,0	10^5	10^6	10^7
UFC/150 µL	4.2×10^7	5.2×10^8	6.4×10^9

Calpa et al²⁵⁷ indican que *L. plantarum* es resistente a condiciones ácidas ya que para la BAL evaluada bajo diferentes concentraciones de pH, demostró valores satisfactorios con índices altos de 2.9×10^{12} , 3.2×10^{11} y 3.3×10^{12} UFC/150 µL. A pesar de que el crecimiento de la bacteria fue mayor en el estudio realizado por Calpa, la BAL evaluada fue sometida a 45 días de almacenamiento a temperatura ambiente después de ser microencapsulada, lo cual puede afectar su acción, aun así el crecimiento obtenido es significativo. Ramírez et al²⁵⁸ Indican que las bacterias ácido lácticas que poseen un crecimiento en valores de pH bajos son resistentes al paso por los jugos estomacales, en donde la secreción de ácido gástrico es un mecanismo de defensa primario contra la mayoría de los microorganismos. Por otra parte, la bacteria mostró resistencia a pH ácido una vez microencapsulada, lo cual evidencia su capacidad de sobrevivir pH ácidos después de permanecer 45 días en almacenamiento a temperatura ambiente.

En esta perspectiva, Maurad y Harche²⁵⁹ en su estudio mencionan que tras analizar *L. plantarum* en diferentes valores de pH ácido, mostro altos porcentajes de supervivencia de 21-71% después de 2, 4 y 6 h en pH 2, todas las cepas probadas sobrevivieron un período de incubación de 2h a 6h a pH 3.0 y finalmente a pH 1 donde existió crecimiento durante dos horas. Ahora bien, al someter la bacteria microencapsulada a pH3 durante 24 horas se evidenció un crecimiento significativo indicando que la bacteria microencapsulada puede sobrevivir a las condiciones ácidas del estómago, que tiene como objetivo descomponer alimentos y es la primera barrera para la destrucción de patógenos por ello es necesario que ésta bacteria sobreviva al paso por pH bajos para que ejerza su efecto inhibitorio.

²⁵⁷ JURADO; CALPA y CHASPUENGAL. Op. Cit., p. 248

²⁵⁸ JURADO; AGUIRRE y RAMÍREZ. Op. Cit., p.1730

²⁵⁹ MAURAD, Kasem y HARCHÉ, Meriem. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria. En: GRasas y Aceites. Julio- Septiembre, 2008. vol. 59, no. 3, p. 218-224

En éste sentido, según Jurado²⁶⁰ para que los microorganismos ejerzan su acción probiótica deben cumplir con diez requisitos entre los cuales se destacan; que sean resistentes a la destrucción por secreciones gástricas o biliares, buena capacidad de adhesión al epitelio intestinal para colonizar el tracto gastrointestinal y que sean resistentes a la destrucción tecnológica. Además de que la bacteria probiótica ya posee éstas características, la microencapsulación asegura aún más su supervivencia a través del paso por el TGI y sobrevive más fácilmente a las condiciones de almacenamiento.

Como lo hace nombra, Chou y Weimer²⁶¹ para que las bacterias cumplan como probióticas deben sobrevivir a pH ácidos durante al menos 90 minutos. Es decir que en el estudio realizado con *L. plantarum* fue satisfactorio ya que fue sometida a pH ácido durante 24 horas y siguió siendo viable.

6.8.4.2 Susceptibilidades en diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina a pH 5,5. En la evaluación de *L. plantarum* microencapsulada almacenada durante 45 días sometida a sales biliares y bilis bovina a un pH de 5.5 en incubación durante 24 horas, se obtuvo un crecimiento significativo de $9,7 \times 10^8$ UFC/150µL en concentraciones de 1% de sales biliares, comparado con el crecimiento de $3,0 \times 10^8$ UFC/150 µL a concentraciones de 0,3% de sales biliares. En el caso de bilis bovina creció significativamente en las tres diluciones siendo el mayor crecimiento $3,0 \times 10^9$ UFC/150 µL. (Tabla 16)

Tabla 16. Viabilidad de *Lactobacillus plantarum* a diferentes concentraciones de sales biliares y bilis bovina

Concentración		UFC/ 150 µL	
Sales biliares			
0,3%	2,4 x 10 ⁸	3,0 x 10 ⁸	-
1%	5,36 x 10 ⁸	3,9 x 10 ⁷	9,7 x 10 ⁸
Bilis bovina			
0.5%	3.0 x 10 ⁷	3.0 x10 ⁸	3.0 x 10 ⁹

Teniendo en cuenta lo anterior, se obtuvo una resistencia significativa de la cepa microencapsulada frente a concentraciones de 1% de sales biliares y 0,5% de bilis bovina. Fajardo y Rodríguez²⁶² resaltan que esta resistencia es una característica

²⁶⁰ JURADO. Op. Cit., p. 23

²⁶¹ CHOU, Lanz-szu y WEIMER, Bart Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*. En: Journal of Dairy Science. 1999. vol. 82, no. 1. p. 23-31

²⁶² FAJARDO y RODRÍGUEZ. Op. Cit., p.48

importante en las bacterias probióticas ya que pueden sobrepasar las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal y ejercer el efecto inhibitorio esperado.

Por su parte Jurado *et al*²⁶³ obtuvieron a concentraciones de 5 % de sales biliares un crecimiento significativo de $2,2 \times 10^{12}$ UFC/150 μ L y en bilis bovina a 2% de $8,4 \times 10^{11}$ UFC/150 μ L sin realizar microencapsulación, esto indica que la bacteria es resistente a estas secreciones gástricas. Además, estudios de viabilidad de *L. plantarum* sin microencapsular revelan un buen crecimiento tal como lo encontrado por Jurado *et al*²⁶⁴ donde obtuvieron crecimientos de $3,5 \times 10^8$ - 7×10^{13} UFC/150 μ L a una concentración de 3%, valores de 3×10^7 - 1×10^{13} UFC/150 μ L al 4% y 3×10^8 - 2×10^{11} UFC/150 μ L al 5% de sales biliares. En cuanto a la viabilidad a diferentes concentraciones de bilis bovina se obtuvieron crecimientos de $3,5 \times 10^8$ - 2×10^{12} , $3,3 \times 10^8$ - 3×10^{12} , 6×10^8 , 1×10^{11} - $2,4 \times 10^{12}$ UFC/150 μ L en las concentraciones de 0,5, 1 y 2%.

Comparando con lo obtenido con De Araújo²⁶⁵ en su estudio mediante la técnica de secado por aspersión sobre *Lactobacillus delbruekii* sometidos a sales biliares al 1% y 0.5% obtuvo crecimientos de 6.56 log10 UFC/g. comparado con el máximo crecimiento de el presente estudio de 8,98 log10 UFC/ 150 μ L, esto quiere decir que el crecimiento fue mayor en éste estudio debido a que hay una mayor cantidad de UFC en una menor concentración ya que 1g representa 1000 μ L.

No obstante, la microencapsulación no solo mejora la resistencia de la bacteria a condiciones gastrointestinales, también mejora su viabilidad al someterse a condiciones de temperatura y almacenamiento asegurando su precisa acción en el intestino. Ahora bien, según menciona Mohammad *et al*²⁶⁶ la supervivencia de *L. plantarum* aumentó su viabilidad después de ser microencapsulada con zeolita-almidón con el método de extrusión. Los resultados de bajos conteos en caja Petri comparada la bacteria microencapsulada y sin microencapsular en los diferentes estudios pueden ser debido a la técnica empleada para encapsular y el número de días de almacenamiento. Por su parte, Páez²⁶⁷ en su estudio resalta que la temperatura afecta la supervivencia de los microorganismos a microencapsular, Sin embargo obtuvo excelentes resultados de crecimiento a una temperatura de 5°C, Es decir, que la bacteria es resistente a condiciones ambientales una vez

²⁶³ JURADO; CALPA y CHASPUENGAL. Op. Cit., p. 248

²⁶⁴ JURADO. Op. Cit., p. 40

²⁶⁵ DE ARAÚJO. Op. Cit. p. 36

²⁶⁶ MOHAMMAD H. *et al*. Immobilization and microencapsulation of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* using zeolite base and evaluating their viability in gastroesophageal-intestine simulated condition. En: Rev. Ars Pharmaceutica. 2017. vol.58, no.4, p. 163-170.

²⁶⁷ PAEZ. Op. Cit. p. 145

microencapsulada y sigue siendo resistente a las condiciones gastrointestinales. Autores como Rodríguez et al ²⁶⁸ estudiaron el efecto de microencapsulación sobre un probiótico donde obtuvieron resultados positivos en cuanto a viabilidad respecto al tiempo de almacenamiento, además resaltan que puede existir una viabilidad de 21 días.

La microencapsulación favorece la viabilidad de la bacteria probiótica. Los materiales microencapsulantes utilizados en éste estudio como maltodextrina e Inulina tienen una función específica la cual ha favorecido la viabilidad de la BAL en estudio. Es decir, que se utilizó maltodextrina gracias a que según Lopera et al “La aplicación de este material en el proceso de encapsulación está asociada a la baja viscosidad, altos contenidos de sólidos, buena solubilidad, capacidad de formar películas y bajo costo”²⁶⁹. Es decir, que ejerce un efecto de capa ó pared protectora, soluble y de un bajo costo. Además, para asegurar su sobrevivencia se utilizó inulina que es un material usado con el objetivo de ser un prebiótico ya que según Montes²⁷⁰ menciona que los materiales prebióticos favorecen la protección de microorganismos, su viabilidad y por consiguiente su acción a nivel de tracto gastrointestinal. Además, resalta que éstos no son digeridos por enzimas humanas por lo tanto benefician de manera selectiva el crecimiento y actividad de los microorganismos benéficos del intestino.

Los materiales microencapsulantes juegan un papel muy importante en la protección de las BAL microencapsulada, esto es fundamentado por Esquivel et al²⁷¹ ya que de acuerdo a lo descrito por estos autores el material pared afecta la estabilidad de las micropartículas, la eficiencia y la protección.

Sansone et al menciona: que: “las maltodextrinas son usadas solas o en combinación con otros materiales en alimentos, extractos de plantas, aditivos aromáticos, carotenoides y vitaminas, ya que presentan distintas funciones como son: espesante, propiedades de formación de película, retención de sabores, además de jugar un papel importante en la reducción de la permeabilidad del oxígeno del material pared”²⁷².

²⁶⁸ RODRÍGUEZ BARONA, Sneider; MONTES, Luz y RAMÍREZ, Diogenes. Microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersión en presencia de prebióticos. En: VITAE. Enero-Abril, 2012.vol. 19, no.1 p. 186-188.

²⁶⁹ LOPERA, et al. Op. Cit. p. 57.

²⁷⁰ MONTES. Op. Cit. p. 37.

²⁷¹ ESQUIVEL; OCHOA y RUTIAGA. Op. Cit. p. 184.

²⁷² SANSONE, Francesca *et al.* Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. En: Jurlan Food Engineering. Agosto, 2011. vol. 105, no. 3, p. 468-476
Citado por: Ibid., 185

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

El efecto inhibitorio obtenido por parte de la bacteria ácido láctica sobre la bacteria patógena se dio por parte de la presencia de péptidos bioactivos como la plantaricina y ácido láctico, esto contribuye de manera beneficiosa sobre investigaciones para disminuir el uso de antibióticos. La bacteria patógena resultó ser inhibida por la BAL, es decir que además de sobrevivir a condiciones ambientales y a su paso por condiciones gastrointestinales *In vitro* tiene un efecto bactericida significativo tanto en su sobrenadante como directamente con la bacteria.

La microencapsulación por la técnica secado por aspersión favoreció la acción probiótica de *L. plantarum*. Es decir, que no solo ayudo en cuanto a su viabilidad a nivel intestinal sino también a su conservación a temperatura ambiente durante más tiempo. Además, ésta bacteria demostró su acción probiótica frente a una bacteria patógena la cual es un problema de salud pública, importante como agente infeccioso asociado en la intoxicaciones alimentarias, que afectan principalmente a niños y ancianos. Su comportamiento cinético demostró que es una bacteria que puede ser usada a nivel industrial gracias a su rápido crecimiento lo cual disminuiría los costos al realizar inoculos bacterianos con esta bacteria láctica. Es importante realizar estudios *In vivo* ya que *In vitro* demostró características importantes como cepa probiótica.

7.2 RECOMENDACIONES

Ampliar el perfil de evaluación de la cepa *L. plantarum* ATCC8014 como potencial probiótico, incluyendo estudios de sus bacteriocinas.

Realizar ensayos adicionando el material microencapsulado en alimento para humanos ó animales, a fin de constituirse en la base hacia el desarrollo de productos funcionales.

Estudiar propiedades u otros materiales microencapsulantes y comparar su efecto protector para así determinar que material pared o prebiótico tiene un mejor efecto protector sobre esta bacteria.

Realizar pruebas *In vivo* tanto de la BAL sin microencapsular como microencapsulada.

BIBLIOGRAFÍA

ABDUL RAOUF, U; BEUCHAT, L, AND AMMAR, M. Survival and Growth of *Escherichia coli* 0157:H7 on Salad Vegetables. En: APPL. ENVIRON. MICROBIOL. July, 1993, vol. 59, no. 7, p. 1999-2006.

AGUDELO, Claudia; ORTEGA, Rodrigo y HOYOS, José. Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y bacterias ácido lácticas de yogurt. En: Bio. Agro. Julio-Diciembre, 2010. vol. 8, no. 2, p. 8-16.

ALMANZA, Frabritzio y BARRERA, Eduardo. Tecnología de Leches y Derivados. 1 ed. Bogotá: UNISUR. 1991 p 61

ANAL y SINGH. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, Trends Food Sci Tech, 2007. Vol. 18, no. 5, p. 240–25.

ANDERSSEN, E. *et al.* Antagonistic activity of *Lactobacillus plantarum* C11: two new two-peptide bacteriocins, plantaricin EF and JK, and the induction factor plantaricin A. Appl. En: Environ. Microbiol. Junio, 1998. Vol. 64 p. 2269-2272.

ANGEL LONDOÑO, Marlli Alexandra. Uso de probióticos en la nutrición de monogástricos como alternativa para mejorar un sistema de producción. Trabajo de grado Especialista en Nutrición Animal Sostenible. Facatativá: Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Escuela de ciencias agrícolas, pecuarias y del medio ambiente, 2013. 6 p.

ASYIKIN, Ismatul *et al.* Protein Produced by *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 during Stress. World Journal of Science and Technology Research. Octubre, 2013. vol. 1, no. 8, p. 2329-3837

AVILA REYES, Sandra, *et al.* Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. En: Carbohydrate Polymers, 2014. 102, p. 423-430.

BALCÁZAR, José Luis, *et al.* The role of probiotics in aquaculture. En: Veterinary Microbiology. January, 2006, vol. 114, no. 2006, p. 173–186.

BAUR, A, *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardize single disk method. En: American Journal of Clinical Pathology. Agosto, 1985, no 32, p. 18.

BERGEY, D; BREED, R & AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Bacteria Classification. 7 ed. Baltimore: Williams & Wilkins Co, 1957.

BERISTAN, S., PALOU, E. y LÓPEZ, A. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 2012. vol. 6, no. 2, p. 64-78

BERNAL, Maye y GUZMAN, Miguel. El antibiograma de discos normalización de la técnica kirby Bauer. En: Rev. Biomedica.1984. vol. 4, no. 3, p. 112-121

BIELEKA, María; BIEDRZYCKA, Elzbieta y MAJKOWSKA, Anna. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. En: Food Research International. 2002. vol. 35, no.2-3, p.125-131

BRADLEY, W., MYSLIWIEC, T. y HASSAN, G. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). Food Microbiology. Abril, 2005. vol. 22, no. 3, p. 199-204.

BUSTOS GUTIÉRREZ, Paola Daniela. Estudio del cultivo y concentración de una cepa *Lactobacillus plantarum* autóctona empleando un reactor y membranas semipermeables. Secado y estabilización de biomasa. Doctorado en Ciencias de la Ingeniería con mención en Ingeniería Química. Concepción Chile.: Universidad de Concepción, Facultad de ingeniería. Departamento de Ingeniería Química, 2013. 14 p.

CABEZA, E. Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estériles para la industria láctea y cárnica. Simposio Regional de Microbiología "Microorganismos eficientes en el sector productivo", Barranquilla, 2006.

CABRERA, Cristina; GÓMEZ, Rommel y ZUÑIGA, Andrés. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. En: Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Abril-Junio, 2007. vol.38, no.2, p. 149-158

CAGIGAS REIG, Ada Lydia y BLANCO ANESTO, Jorge. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. En: Revista Cubana Aliment y Nutr. 2002. vol. 16, no. 1. p. 63-8

CAI, Y, *et al.* Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. En: J Gen Appl Microbiol. Agosto, 1999, vol. 45, no. 4, p. 177-184.

CAJA, Gerardo, *et al.* Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. En: Sitio Argentino de Producción Animal. 2003. 193, p. 2-8.

CASTRO, L. and ROVETTO, C. (2006) Probióticos: utilidad clínica. Colombia Medica, vol.37, no.4, p. 308-314.

CEBALLOS, Adela María; GIRALDO, Gloria Inés y ORREGO, Carlos Eduardo. Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. En: Journal of Food Engineering. Febrero, 2012, 111: 360–365.

CHOU, Lanz-szu y WEIMER, Bart Isolation and Characterization of Acid- and Bile-Tolerant Isolates from Strains of *Lactobacillus acidophilus*. En: Journal of Dairy Science. 1999. vol. 82, no. 1. p. 23-31

COPPOLA MENEZES, Mario & GIL TURNES, Carlos. Probióticos e resposta imune. En: Ciência Rural, Santa. Julio-Agosto 2004, vol. 34, no. 4, p. 1297-1303.

CRUEGER, W. y CRUEGER, A. Biotecnología: Manual de Microbiología Industrial. Traducido por Paloma Liras Padín. 3 ed. Madrid. España: Ed. Acribia, 1993, p.118. ISBN: 8420007439, 9788420007434.

DAHL, Thomas; MIDDEN, Robert and HARTMAN, Philip. Comparison of killing of gram- negative and gram-positive Bacteria by Pure Singlet. En: Journal of Bacteriology. Abril, 1989, vol, 171, no. p. 47.

DE ARAÚJO URIBE, Natalia. Viabilidad de los Probióticos *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium* y *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* microencapsulados bajo la técnica de secado por aspersión. Trabajo de grado presentado para obtener el título de Magister en Biotecnología. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.2016. p. 36

DE ARAÚJO, Natalia, et al. Técnicas para la microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad: una revisión. En: Alimentos Hoy. Mayo-Noviembre, 2015. vol.23, no. 36, p.112-126

DÉFAZ GAVILANES, Andrés Sebastián y MOREIRA CÁLIX, Juan Fernando. Evaluación de alginato de sodio en la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* en yogur sin sabor. Tesis Ing. en Agroindustria Alimentaria en el grado Académico de Licenciatura. Zamorano – Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 2017. 11 p.

DELGADO PALACIO, Susana. Microbiota intestinal humana: análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas. Memoria, para optar al Grado de Doctor. Oviedo: Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). 2005. p. 28, 29.

DEVLIGHERE, Frank; VERMEIREN, Lieve y DEBEVERE, Johan. New preservation technologies: Possibilities and limitations. En: ELSEVIER. Abril, 2004. vol. 14, no. 4, p. 273-285

DI BATTISTA, Carla Agustina. Microencapsulación de Fitoesteroles Mediante Secado por Atomización. Tesis de Doctor en Ingeniería Química. Bahía Blanca: Universidad Nacional del Sur, 2016. 97 p.

DOYLE, Michael, *et al.* Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras Bacterias. *Escherichia coli* O157:H7. Zaragoza: Acribia, 2001. 177-198 p. ISBN 84-200-0933-4

DUBOIS, Michel, *et al.* Colorimetric method for determination of sugar and related substances. En: Anal Chem. 1956, vol. 28, no. 3, p. 350-356.

DUNNE, Colum, *et al.* In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. En: The American Journal of Clinical Nutrition. Febrero, 2001. vol.73, p. 386-392.

ESCHERICH, T. (1885) Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. Fortschritte der Medizin, vol.3, p.515-522, 547-554.

ESQUIVEL GONZALES B.; OCHOA MARTINEZ L y RUTIAGA-QUIÑONES O. Microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. En: Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. 2015. vol. 16, no. 2, p.180-192

ESTEBAN, Carlos. Caracterización molecular de la represión por catabólico e ingeniería metabólica en *Lactobacillus casei*. Tesis de doctorado. España. Universidad de Valencia. Departamento de Bioquímica y biología molecular, 2004.

ESTRADA MALDONADO, Ana Cristina; GUTIÉRREZ RAMÍREZ, Luz Adriana y MONTOYA CAMPUZANO, Olga Ines. Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus sp.* Contra *Salmonella sp.* y *Escherichia coli*. En: Rev. Fac. Nac. Agron. Abril, 2005. vol.58, no. 1, p.2601-2609

FAJARDO, Ivonne Catalina y RODRÍGUEZ, Ana Elizabeth. Evaluación in vitro de *Lactobacillus gasseri* ATCC 19992 con características probióticas sobre una cepa

de *Staphylococcus aureus* ATCC 13245. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Zootecnista. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias Pecuarias, 2016. 56p

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. Estudio FAO Alimentación y Nutrición. Londres, Ontario, Canadá. 2002

FERNANDES, R.; BORGES, S. y BOTREL, D. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulinas wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. En: Carbohydrate Polymers. Enero, 2014. vol.101, p. 524–532.

FERNANDEZ BRANDO, Romina, *et al.* Actualización en el tratamiento del síndrome urémico hemolítico endémico: Patogénesis y tratamiento de la complicación sistémica más grave de las infecciones por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Medicina (Buenos Aires). 2011. vol. 71, no. 4, p. 383-389

FERNANDEZ VILLA, Kelly *et al.* Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido lácticas y efecto inhibidor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura. En: Rev. Biosalud. 2008-2012.vol. 13, no. 1, p. 45-61

FORERO TORRES, Yibby; GALINDO BORDA, Marisol; y RAMÍREZ Gabriel. Patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes escolares de Colombia. Revista chilena de nutrición. Agosto, 2017, vol. 44, no. 4, p. 325-332.

FORERO TORRES, Yibby; GALINDO BORDA, Marisol; y RAMÍREZ Gabriel. Patógenos asociados a enfermedades transmitidas por alimentos en restaurantes escolares de Colombia. Revista chilena de nutrición. Agosto, 2017, vol. 44, no. 4, p. 325-332.

FRANCO ANAYA, Piedad Astrith; *et al.* Determinación de *Escherichia Coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACIÓN. Junio, 2013, vol. 10, no. 1, p. 91-100.

FRANCO ANAYA, Piedad Astrith; *et al.* Determinación de *Escherichia Coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los

principales supermercados de la ciudad de Cartagena. REVISTA LASALLISTA DE INVESTIGACIÓN. Junio, 2013, vol. 10, no. 1, p. 91-100.

FREUDIG, B; HOGEKAMP, S y SCHUBERT, H. Dispersión of powders in liquids in a stirred vessel. Chemical Engineering and Processing. 1999; 38:525–532.

FU, Wenge y MATHEWS, A.P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. En: Science Direct. Biochem Eng J. 1999. vol.3, p.163- 170

FULLER R (1989): Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol 66: 365-378.

GAMAZO, C; LÓPEZ, GI y DÍAZ, R. Manual práctico de microbiología. 3rd ed. Barcelona, España: Ed Masson.; 2005.

GÄNZLE, Michael. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentation and food spoilage.En: Current Opinion Food Science. Marzo, 2015. vol. 2, P. 106-117

GARCÍA VESGA, Adriana. Informe brotes enfermedades transmitidas por alimentos, primer semestre de 2015, Bogotá D.C. Secretaria de salud. Julio, 2015.

GARCÍA ZÚÑIGA, Claudia Valeska. Resistencia antibiótica de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus* sp., en el Hospital Regional de Occidente de Quetzaltenango. Trabajo de grado para optar por el título de Química Bióloga. Guatemala: Universidad San Carlos Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2014. 4 p.

GARCÍA, Carlos; ARRAZÓLA, Guillermo y DURANGO, Alba. Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. En: Temas Agrarios. Julio- Diciembre, 2010. vol. 2, no. 15., p. 9-2

GILBERT S, et al. (2017). Risk profile: shiga-toxin producing *Escherichia Coli* in raw milk. En: Institute of Environmental Science & Research Limited, Julio, 2017. p. 1-77.

GIRAUD, Eric. CHAMPALIER, Alan, y RAIMBAULT, Maurice. Degradation the raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. En: Appl Environ Microb. 1994. vol.60, no.12, p. 4319-4323.

GONZALES MARTÍNEZ, Blanca Edelia; GOMEZ TREVIÑO, Maribel. y JIMENEZ SALAS, Zacarías. Bacteriocinas de prebióticos. En: Rev.Salud publica y educación.2003. vol. 4, no. 2, p.1-9

GONZÁLEZ CUELLO, Rafael; PÉREZ MENDOZA, Jaime, & MORÓN ALCÁZAR, Lena. Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a Jugos Gástricos Simulados. En: Información tecnológica. 2015, vol. 26, no. 5, p. 11-16.

GONZÁLEZ FLORES, Tania y HERRERA ROJAS, Rafael Antonio. Enfermedades transmitidas por Alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. En: Salud pública Mex. Octubre, 2005, vol. 47, no. 5, p. 388-390.

GONZÁLEZ FLORES, Tania; y ROJAS HERRERA, Rafael Antonio. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. Salud pública de México. Septiembre-octubre, 2005, vol. 47, no. 5, p. 388-390.

GRAY, LD. *Escherichia, Salmonella, Shigella* and *Yersinia*. En: Murray PR editor Manual of Clinical Microbiology. 6 ed, Washington: ASM Press: 1995. p. 450-456

GUERRERO, Milena, *et al.* Efecto inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* sobre el enteropatógeno *Vibrio cholerae* 01 ogawa, in vitro. En: revista del centro de estudios en salud. 2002, vol. 1, no. 3, p. 8-14.

GUTIERREZ RAMIREZ, Luz Adriana; MONTOYA CAMPUZANO, Olga Inés y RUIZ VILLADIEGO, Orlando Simón. Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de *E. coli*, *Salmonella sp.* y *Listeria monocytogenes*. En: Revista CENIC. 2005. vol. 36, no. Especial, p 1-7

HARTOG, Leo y REINDER, Sijsma. Estrategias nutricionales para reducir la contaminación ambiental en la producción de cerdos. Nutreco Agri R&D and Quality affairs the Netherlands. Curso de especialización FEDNA. 2007. p, 19-41.

HASSAN T, & HEATH J. Biological fermentation of fish waste for potential use in animal and poultry feeds. En: Agricultural Wastes. 1986, vol. 15, no.1, p. 1-15.

HIDALGO TOGORES, José. Tratado de enología. Tomo 1, segunda edición revisada y ampliada. Ediciones Mundi Prensa Mexico. 2010.

Instituto Nacional de Salud, Grupo de Evaluación de Riesgos en Inocuidad de Alimentos. Perfil de riesgo de *Escherichia coli* enterotoxigénica y verotoxigénica en queso fresco. Bogotá, D. C., Colombia. 2015.

JIMENEZ SALAS, Jena e IMAN TORRES, Alexander Javier. “Actividad antioxidante y antibacteriana In Vitro de las hojas del *Coriandrum sativum*

(culantro) y *Eryngium foetidum* (sachaculantro), frente a dos bacterias”. Trabajo de grado Licenciatura en Bromatología y Nutrición Humana. Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Facultad de Industrias Alimentarias. Escuela de Formación Profesional de Bromatología y Nutrición. 2016. 48 p.

JURADO GÁMEZ Henry; RAMÍREZ, Cristina y AGUIRRE, Diana. Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. En: Veterinaria y Zootecnia. Diciembre, 2014, vol. 7, no. 2, p. 37-53.

JURADO GÁMEZ, H; FAJARDO ARGOTI, I y RODRÍGUEZ CAICEDO A. Evaluación in vitro de *Lactobacillus gasseri* con características probióticas sobre *Staphylococcus aureus*. En: Rev Med Vet Zoot. Diciembre, 2016, vol. 63, no. 3, p. 179-187.

JURADO GÁMEZ, Henry *et al.* Evaluación in vitro de la acción de *Lactobacillus plantarum* con características probióticas sobre *Yersinia pseudotuberculosis*. En: Rev. Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. Julio-Diciembre, 2014, vol. 2, no. 2, p.49-59.

JURADO GÁMEZ, Henry. Evaluación de bacterias ácido-lácticas con características probióticas en la alimentación de lechones en fase de precebo como alternativa al uso de antibióticos. Trabajo de Grado para optar por el título de Doctor. Santiago de Cali: Universidad del Valle. Escuela de Ingeniería de Alimentos. 2010. 85 p

JURADO GÁMEZ, Henry; CALPA YAMA, Freddy y CHASPUENGAL TULCÁN, Aura. Determinación in vitro de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre *Yersinia pseudotuberculosis* aislada de *Cavia porcellus*. En: Rev. Fac. Med. Vet. Zoot. Septiembre, 2014, vol. 61, no. 3, p. 241-257.

JURADO GÁMEZ, Henry; JARRÍN JARRÍN, Verónica y PARREÑO SALAS, Jhon. Crecimiento de *L. plantarum* y efecto sobre *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* y *C. perfringens*. En: Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. Julio-Diciembre, 2015, vol. 13, no. 2, p. 57-66.

JURADO GÁMEZ, Henry; ROMO PAZMIÑO, Sara y BENAVIDES DELGADO, Viviana. Evaluación del efecto probiótico de *Lactobacillus plantarum* en la alimentación de lechones en fase de precebo como una alternativa del uso de antibióticos: una revisión. En: Revista Investigación Pecuaria. 2013. vol. 2, no. 1, p. 55-62.

JURADO, H. y GUZMÁN, M. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición in vitro de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. En: Rev. Medicina veterinaria y zootecnia. Mayo- Agosto, 2015. vol. 62, no. 2, p. 23-39

JURADO, Henry; AGUIRRE, Diana y RAMÍREZ, Cristina. Caracterización de bacterias probióticas aisladas del intestino grueso de cerdos como alternativa al uso de antibióticos. En: MVZ Córdoba. Mayo-Agosto, 2009. vol. 14, no. 2, p. 37-53.

LANARA L. Métodos microbiológicos. 3ªed Brasilia: Ministerio de Agricultura; 1981.

LARA FIALLOS, Marco, *et al.* Avances en la producción de inulina. En: Revista Tecnología Química. Marzo, 2017, vol. 37, no. 2, p. 220-238.

LEBLANC, J. *et al.* Immunomodulatory ´ effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. En: Journal of Dairy Science. Noviembre, 2002. vol. 85, no. 11, 2733-2742.

LEE, Yeo-Eun *et al.* Effect of feeding the combination with *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* on fecal microflora and diarrhea incidence of Korean native calves. En: The Korean journal of veterinary service. Diciembre, 2012. vol. 35, no. 4, p. 343-346.

LEÓN De la O, Dante *et al.* Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque. En: Facultad de Ciencia y Tecnología. Junio-Septiembre, 2013. vol.12, no.12, p.133-144.

LEÓN, Ángela *et al.* Bacterias ácido lácticas (BAL) silvestres colombianas presentan propiedades adecuadas para la fabricación de masa ácida. En: VITAE. 2006. vol. 13, no. 2, p. 26-35.

LIAN, HSIAO y CHOU. Survival of bifidobacteria after spray-drying. En: International Journal of Food Microbiology. 2002; vol. 74, p. 79-86.

LOPERA, Seneida, *et al.* Desarrollo y caracterización de micropartículas de ácido fólico formadas por secado por aspersion, utilizando goma arábica y maltodextrina como materiales de pared. En: Revista de la facultad de química farmacéutica. Marzo, 2009, vol. 16, no. 1, p. 55-65.

LÓPEZ, et al. Secado por aspersión de extracto acuoso de *Bidens alba* L. a escalas de laboratorio y banco. En: Rev Cubana Plant Med. Septiembre – Diciembre, 2008. vol.13, No. 4.

LÓPEZ ACUÑA, Williams and GUEVARA DUNCAN, José. Infección por *Escherichia coli* enterohemorrágica. En: Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma. 2002, vol. 3, no. 1, p. 38-41.

LOWRY, Oliver; et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. En: Journal Biological Chemistry. Mayo, 1951, vol. 193, no. 1, p. 265-275.

LOZANO, María y ARIAS, Diana. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu. Febrero 2018. vol. 21, p. 121-135

LY, M. et al. Retention of aroma compounds by lactic acid bacteria in model food media. En: Food Hydrocolloids. Marzo, 2008. Vol. 22, no. 2, p. 211-217

MADIGAN, Michael; MARTINKO, Jhon y PARKER, Jack. Biología de los Microorganismos. 9 ed. Illinois: Pearson Educación, 2004. 593 p.

MAGARIÑOS, Haroldo. Producción higiénica de la leche cruda, una guía para la pequeña y mediana empresa.1 ed. Guatemala: Producción y servicios incorporados S.A., 2000. 53-58 p

MANGELL, P. et al. *Lactobacillus plantarum* 299v inhibits *Escherichia coli*-induced intestinal permeability. En: Rev.publimed. Marzo, 2002.vol. 47, no.3, p.51-516

MANZANO, Claudia; ESTUPINAN, Diana y POVEDA Elpidia. Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia. Rev Chil Nutr. Marzo, 2012, vol. 39, no 1, p. 98-110

MARGALL, Núria, et al. *Escherichia coli* enterohemorrágica. En: Revista Española de salud pública. Octubre, 1997. vol. 71, no. 5, p. 437-443

MARTEAU, P, et al. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. En: Am. J. Clin. Nutr. Febrero, 2001, vol. 73, no. 2, p. 430-436.

MAURAD, Kasem y HARCHE, Meriem. Probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains from traditional butter made from camel milk in arid regions (Sahara) of Algeria. En: GRasas y Aceites. Julio- Septiembre, 2008, vol. 59, no. 3, p. 218-224

Mc FADDIN, Jean. BIOCHEMICAL TESTS FOR IDENTIFICATION OF MEDICAL BACTERIA, 3 ed. U.S.A: Lippincott Williams y Wilkins, Inc. 200. 66 p.

MELGAR LALANNE, Guiomar; RIVERA ESPINOZA, Yadira and HERNÁNDEZ SÁNCHEZ, Humberto. *Lactobacillus plantarum*: An overview with emphasis in biochemical and healthy properties. 2012. pp.1-31

MENG, X. *et al.* Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. En: Food Chemistry. Febrero, 2008. vol.106, no.4, p. 1406–1416.

MOHAMMAD HASSANZADEH, Azad, *et al.* Immobilization and microencapsulation of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* using zeolite base and evaluating their viability in gastroesophageal-intestine simulated condition. En: Ars Pharmaceutica. 2017. vol, 58. No. 4, p. 163-170.

MOHANKUMAR, A. y MURUGALATA, N. Characterization and antibacterial activity of bacteriocin producing *Lactobacillus* isolated from raw cattle milk sample. International Journal of biology. Julio, 2011. vol. 3, no. 3, p. 128-143

MOLINA LÓPEZ, José y ESLAVA CAMPOS, Carlos. *Escherichia coli* diarrogénica. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Mexico.

MONDRAGÓN, Guadalupe. Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. Investigación y Ciencia. Septiembre- Diciembre, 2013. vol.21, no. 59, p. 64-70

MONTES CEBALLOS, Andrea del Roció; SANTACRUZ BERNAL, Ayda del Pilar y SAÑUDO DIAZ, Jessie Nadenka. Efecto in vitro de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* sobre el crecimiento de un aislado de *Helicobacter pylori*. Trabajo de grado Biólogo con énfasis en Microbiología. Pasto-Colombia: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, 2003. 146 p.

MONTES RAMÍREZ, Luz Mary. Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469). Tesis de Magíster Ciencia y Tecnología de Alimentos. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, 2013. 50 -71 p.

MONTVILLE T. y CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. En: Appl Microbiol Biotechnol. 1998. vol. 50, p. 511-519.

MORA PEÑAFLORES, Nancy y GARCÍA GUERRERO, Andrés. Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a diversos antibióticos. Tesis para obtener el título de Licenciado en Química de Alimentos. Pachuca de Soto: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 2007. 107-108 p.

MORENO GALARZA, Lizeth Johanna. Aislamiento y Selección de *Lactobacillus* sp con potencial probiótico a partir de pan de abejas. Tesis de Magister en Ciencias mención Microbiología. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Posgrado Inter facultades de Microbiología, 2012. 17 p.

MOSQUITO, Susan *et al.* Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. En: Rev Peru Med Exp Salud Pública. Julio-Septiembre, 2011.vol. 28, no.4, p. 648-656

NAGUA SUAREZ, María Fernanda. “Antagonismo de microorganismos benéficos, frente a patógenos de referencia en una mezcla de cuy y harina de habas”. Tesis Ingeniera en Industrias Pecuarias. Riobamba. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Pecuarias, 2016. 29-44 p.

NEGRONI, Marta. Microbiología Estomatológica: Fundamentos y guía práctica., 2 ed., Buenos Aires; medica Panamericana., 2009, 656 p

NIÑO CASTILLO, Clara Milena *et al.* Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. En: NOVA. Febrero-Abril, 2017. vol.15, no. 28, p 19-31

NOCHEBUENA PELCASTRE, Xochitl; QUIÑÓNEZ RAMÍREZ, Elsa y VÁZQUEZ SALINAS, Carlos. Enfermedad de las hamburguesas *Escherichia coli* O157:H7. En: Revista Digital Universitaria. Agosto, 2004, vol. 6, no. 4, p. 4-6.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. Prevención de la *E. coli* en los alimentos. Publicaciones Marco de Gestión de Crisis de la FAO.2011

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO. Boletín de Enfermedades Transfronterizas de los Animales. Examen de la *Escherichia coli* como patógeno emergente transmitido por los alimentos. 2011. No 39. ISSN 1814-1498.

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD, OMS. E. coli. Nota descriptiva de la OMS. 2016

OROZCO, M. y Solarte, J. Búsqueda del mejor medio de cultivo y modelamiento cinético para la obtención del ácido láctico a partir de glucosa por vía fermentativa. Tesis Doctoral. Manizales: Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales, 2003. p. 10

OYETAYO, V and OYETAYO, F. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. En: African Journal of Biotechnology. Febrero, 2005. vol. 4 (2), pp. 123-127.

PAEZ, Beatriz. Desarrollo de cultivos probióticos deshidratados por secado spray para la aplicación en alimentos. Tesis de grado para obtener el título de Doctor en ciencias exactas. Universidad Nacional de La Plata. Buenos Aires. p. 145 2013

PANISELLO ROYO, Joima. Nutrición e inversión en salud: microbioma y probióticos (los probióticos en la prevención y tratamiento de enfermedades pediátricas; evidencias científicas). En: Rev Pediatr Aten Primaria Supl. 2011. vol 13, no. 20, p. 25-41

PARRA-HUERTAS R. Revisión: microencapsulación de alimentos. En: Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín. 2010.vol. 63, No.2, p. 5669-5684,

PEIGHAMBARDoust, S. *et al.* Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. En: Trends in Food Science & Technology.

PENNA FJ. Diarrea y probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. Rev Enfer Infec Ped 1998. vol. 11, no. 6. p. 182.

PÉREZ GUERRA, Nelson, *et al.* Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets. En: Animal Feed Science and Technology. 2007, vol. 134, p. 89-107.

PÉREZ LEONARD, Heidy, *et al.* Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. En: ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar. Enero-Abril, 2013. vol. 47, no. 1, p. 14-25

PEREZ MAYO, Baltasar *et al.* Secuencia y análisis del locus de la plantaricina C producida por *Lactobacillus plantarum* LL441. En: XIX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos (24-26, septiembre: Zaragoza) Memorias. Zaragoza. 2014.p. 1-2

PIEDRAHITA, Diego; MÁRQUEZ, Tania y MÁTTAR, Salim. Detección de *Escherichia coli* 0157: H7 en poblaciones porcinas, canal bovina y productos

cárnicos en el departamento de Córdoba. En: Revista MVZ Cordoba, vol. 6, no. 2, p. 119-126

PRESCOTT, L.; HARLEY, J. y KLEIN, D. Microbiología. 4 ed. Zaragoza: McGraw-Hill Interamericana, 1999. 515-518 p

RAJAM, R., y ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Spray freeze drying method for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*. En: Journal of Food Engineering. Diciembre, 2015. Vol. 166, p. 95–103.

RAMÍREZ RAMÍREZ, José *et al.* Bacterias Lácticas Importancia en alimentos y efectos en la salud. En: Revista Fuente. Abril-Junio, 2011. vol. 2, no. 7. p. 1-16.

RAMOS PICOS, Diana; GÓMEZ CARRIL, Martha y FERNANDEZ MENA, Dianelis. Métodos de obtención de microesferas biodegradables. En: Rev. Cubana de Farmacia. Mayo-Agosto, 2001. vol. 35, no.2, p. 126-135.

RINGO, Einar. Lactic acid bacteria vs. pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. En: Aquaculture Research. 2010, vol. 41, no. 4, p. 451–467 .

ROBINSON, David. Bioquímica de los alimentos. 1 ed. Zaragoza: Acribia. 1991. 56 p.

RODRÍGUEZ ANGELES, Guadalupe. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. En: Salud pública de México. Septiembre, 2002. vol. 44, no. 5, p. 464-475

RODRÍGUEZ BARONA, Sneider; MONTES, Luz y RAMÍREZ, Diogenes. Microencapsulación de probióticos mediante secado por aspersión en presencia de prebióticos. En: VITAE. Enero- Abril, 2012.vol. 19, no.1 p. 186-188

RODRÍGUEZ BARONA, Sneyder; GIRALDO, Gloria y MONTES, Luz. Encapsulación de Alimentos Probióticos mediante Liofilización en Presencia de Prebióticos. En: Inf. Tecnol. Mayo-Agosto, 2016. Vol. 27, no. 6, p. 135-144

RODRÍGUEZ GUERRERO, V. y GUERRERO BELTRÁN, J. Probióticos, resistencia gastrointestinal y microencapsulación. En: Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. 2010. vol.4, no. 2, p. 48-57.

RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, Yaslenis; PÉREZ NAVARRO, Maikel. y SUÁREZ PÉREZ, Yania. Validación del método para control de calidad de dicloxacilina sódica en diclofenac cápsulas. En: Rev. Cubana Farm. Julio-Septiembre, 2014. vol.48, no. p.382-395

RODRÍGUEZ MELGOZA, Lauro *et al.* Estudio de Prescripción - Indicación de la Cefotaxima en un Servicio de Medicina Interna de un Hospital de Segundo Nivel. En: Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Mayo, 2013. vol. 44, no. 2, p. 17-23

RODRÍGUEZ TORRENS, Herlinda; *et al.* Las enfermedades transmitidas por alimentos, un problema sanitario que hereda e incrementa el nuevo milenio. Revista Electrónica de Veterinaria. 2015, vol. 16, no. 8, p. 1-27.

RODRÍGUEZ, Alejandra; ROJAS Andrés, RODRÍGUEZ, Sneyder. Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. En: Revista Biosalud. 2016.vol.15, no.2, p. 106-115

RODRÍGUEZ, León *et al.* Rendimiento verdadero y aparente y coeficiente de mantenimiento y su importancia en la cinética de la fermentación. (Eds) New Horizons in Biotechnology. Springer, Dordrecht. 2003

SAFDAR, N. *et al.* Risk of hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis: a meta-analysis. En: JAMA. 2002. vol. 288, no. 8, p. 996-1001.

SÁNCHEZ MARTÍNEZ, Jorge. Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: Actividad metabólica y producción de exopolisacáridos. Tesis de doctorado. Villaviciosa: Universidad de Oviedo. Departamento de Biología Funcional. 2005. 7 p.

SANCHEZ REINOSO, Zain. Evaluación de propiedades fisicoquímicas, morfológicas y sensoriales de microencapsulados de cacao obtenidos por spray drying. Tesis de investigación presentada para optar por el título de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia. 2016. p 42

SANSONE, Francesca *et al.* Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. En: Jourlan Food Engineering. Agosto, 2011. vol. 105, no. 3, p. 468-476

SANZ, Y; COLLADO, M y DALMAU, J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. En: ACTA pediátrica Española. 2003. vol.61, no. 9, p. 58-64.

SEMYONOV, D, *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. En: Food Research International. 2010, vol. 43 p. 193- 202.

SHOKRI, Z. *et al.* Factors affecting viability of *Bifidobacterium bifidum* during spray drying. En: Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015. vol. 23, no.7, p.1-9.

SPICKLER, Anna Rovid. Fichas de las Enfermedades. *E.Coli* enterohemorrágica. Marzo, 2009. En:<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php?lang=es>

SREDNIK, M; RUMI, M. and BENTANCOR, A. Inocuidad de carne molida y presencia de cepas *Escherichia coli* causantes de lesiones de adherencia y esfacelación. En: In Vet. 2013, vol. 15, no.1, p. 123-130.

SUÁREZ OLIVARES, Abel y VERA VIDAL, Vivian. Uso y abuso del ciprofloxacino. En: Rev. Medisan. Marzo, 2011. vol. 15, no. 3, p. 384-392

SUSANA, Laura; CAMPACI, Filippo y SANTOMASO, Andrea. Wettability of mineral and metallic powders: Applicability and limitations of sessile drop method and Washburn's technique. En: Powder Technology. Agosto, 2012. vol. 226, p. 68–77.

TAGG, J y MCGIVEN, A. Assay system for bacteriocins. En: Applied Microbiology. Mayo, 1971. vol. 21, no. 5, p. 943.

THE CENTER FOR FOOD SECURITY Y PUBLIC HEALT. Uso de antibióticos en animales. Informe de Iowa State University, Iowa: CFSPH; 2014

TODOROV, Stetoslav y GOMBOSSY, Bernedette. *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production. En: Food Reviews International. Abril, 2010.vol. 26. no. 3, p. 205-229

TREVISANI, M, *et al.* Detection of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine dairy herds in Northern Italy. En: International Journal of Food Microbiology. 2014, vol. 184, p. 45–49.

TRUJILLO TRUJILLO, Yesenia; y DUARTE PLATA, Néstor Javier. Diseño de estrategia sobre manipulación de alimentos en la asociación pan de vida cer. Trabajo de Grado para optar al título de Ingeniero Industrial. Bogotá D.C.: Universidad Católica de Colombia, Facultad de ingeniería, Programa de ingeniería industrial, 2017. 24p.

VACA, AC. Aspectos regulatorios de los medicamentos veterinarios registrados en Colombia e incluidos en el Codex Alimentarius”. Tesis Médico Veterinario, Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, 2003. 49 p.

VALERO CASOS, E y FRUTOS M. Efecto de diferentes tipos de encapsulación sobre la supervivencia de *Lactobacillus plantarum* durante el almacenamiento con inulina y digestión in vitro. En: Ciencia y Tecnología de alimentos. 201. Vol. 64 no. 2, p. 824-828

VALLEJO, M. *et al.* Inhibición de *Escherichia coli* O157:H7 por cepas *Lactobacillus* aisladas de queso ovino. En: Analecta Veterinaria. 2009. vol. 29, no. 1, p. 15-19

VASQUEZ, María *et al.* pH de la superficie luminal de la mucosa gastrointestinal de crías de alpacas durante las primeras semanas de edad. En: Rev. investig. vet. Perú. 2012. vol. 23, no. 1, p. 20-26

VEGAS, Carlos *et al.* Efecto simbiótico del extracto de *Smallanthus snchifolius* (YACÓN) Y *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli*. En: Rev. Ciencia e investigación. 2013.vol. 16, no. 2, p. 77-82

VIGNOLI R, Y SEIJA V. Temas de bacteriología y virología médica: Principales mecanismos de resistencia antibiótica. p 649-662

VILLENA, Martín *et al.* Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. En: Ars Pharm. Mayo-Junio 2009. vol.50, no. 1, p. 43-50.

WALDIR, Estela *et al.* Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. En: REv. Perú Biol. Diciembre, 2007. vol. 14, no. 2, p. 271-275

YING, D. *et al.* Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. En: Journal of Food Science. Noviembre-Diciembre, 2010. Vol. 75, no. 9, p. 588-595

YOUNG, R and HUFFMANS, S. Probiotic use in children. J Pediatr Health Care. 2003. vol. 17, p. 277-283.

ZAPATA, Sandra *et al.* Aislamiento de *Lactobacillus plantarum* LPBM10 y caracterización parcial de su bacteriocina. Revista de la Facultad de Química Farmaceutica. Enero- Junio, 2009. vol. 16, no. 1, p. 75-82.

ANEXOS

Anexo A. Instrucciones de uso para microorganismos KWIK-STIK™

- En cámara de flujo laminar tipo II, junto al mechero, y después de dejar que la bolsa KWIK-STIK™ sin abrir se equilibre temperatura ambiente, abrir la bolsa por la muesca y retirar la unidad KWIK-STIK™.
- Tirar de la lengüeta para retirar la etiqueta y colocar en la placa del cultivo principal el registro de control de calidad.
- Apretar (una sola vez) la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK™ (justo por debajo del menisco de líquido de la ampolla) situado en la tapa para liberar el líquido hidratante.
- Sujetar en posición vertical y golpear sobre una superficie dura para facilitar el flujo de líquido a través del eje hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento. Dejar que el líquido hidratante fluya a través del eje del hisopo y hacia la parte inferior de la unidad que contiene el sedimento.
- Apretar en la parte inferior de la unidad, triturando el sedimento en el líquido hasta que la suspensión del sedimento sea homogénea.
- De Inmediato, saturar bien el hisopo en el material hidratado y transferir a las cajas petri con el agar nutritivo.
- Inocular la placa del cultivo principal haciendo rodar el hisopo con suavidad sobre un tercio de la placa.
- Utilizando un asa estéril, crear vetas para facilitar el aislamiento de colonias.
- De Inmediato, llevar a incubar las cajas petri con el cultivo principal inoculado a 37°C por 24 horas.

Anexo B. Instrucciones de uso para microorganismos *Escherichia coli* O157:H7 ATCC® 43888™

- Abra el vial de acuerdo con las instrucciones adjuntas.
- Usando un solo tubo de caldo Triptona Agar Soja (TSA) (5 a 6 mL), retire aproximadamente 0,5 a 1,0 mL con una pipeta de 1,0 mL. Rehidratar todo el pellet.

- Transfiera asépticamente esta alícuota al tubo del caldo. Mezclar bien.
- Use varias gotas de la suspensión para inocular una inclinación
- Incubar los tubos y la placa a 37 ° C durante 24 horas.

Anexo C. Antibiograma por el método de Kirby – Bauer

- Para estandarizar la densidad del inóculo para una prueba de susceptibilidad, se utiliza estándar de turbidez equivalente a un estándar 0.5 McFarland equivalente a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. La densidad correcta del estándar de turbidez debe verificarse usando un espectrofotómetro con una celda de 1 cm de paso de luz con una cubeta de calibración para determinar la absorbancia. La absorbancia se realiza a 625 nm
- Los microorganismos *Lactobacillus. plantarum* y *Escherichia coli*, fueron identificados por tinción de gram y sembrados en cultivo puro con un cuatro días de antelación, así mismo se preparó el agar MRS o BHI en el cual se iba a inocular las bacterias para la realización del antibiograma.

Preparación del inóculo

- **Método de crecimiento:** Se seleccionaron 4 colonias de BAL en agar MRS o una gota de inóculo de la bacteria patógena en caldo BHI, se depositaron en 40 mL de caldo MRS (láctica) y Mueller Hinton (patógena) para incubarlas durante 24 horas a 37°C. Luego, se tomó 4mL del inóculo anterior y se depositó en 40 mL de medio de cultivo, se incubó por 24 horas y finalmente se tomó 10% del inóculo anterior y se depositó en el medio de cultivo total que se deseaba preparar para la prueba y se incubó a 24 horas a 37°C. Posteriormente se tomó 1mL de inóculo y se depositó en 9 mL de agua peptonada para realizar lectura en espectrofotómetro. Generalmente, se ajustaba un patrón de 5 (1,25 densidad óptica) la bacteria láctica y la bacteria patógena a patrón 0,5 (0,125 densidad óptica) según la escala de McFarland.
- **Inoculación de las placas:** En un lapso de tiempo óptimo después de ajustar la turbidez del inóculo, se toma un hisopo estéril de algodón el cual se sumerge en el tubo con la cepa. El hisopo se debe rotar varias veces y presionar firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Esto remueve el exceso de inóculo.
- Se inocula la superficie de una placa de agar Mueller –Hinton o MRS pasando varias veces el hisopo sobre toda la superficie. Este procedimiento es repetido dos

o más veces, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasa sobre los bordes del agar.

- **Aplicación de los sensidiscos a las placas inoculadas:** Con una pinza estéril se tomó cada disco de antibiótico los cuales deben ser distribuidos en forma constante y no debe quedar a menos de 24 mm de distancia entre centros. No más de 12 discos se deben poner por placa de 150 mm o no más de 5 en placas de 100 mm. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser relocalizado una vez que haya tomado contacto con la superficie del agar. Cada disco debe ser presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Las cajas se invirtieron para evitar la acumulación excesiva de humedad y se llevaron a incubación a 37°C por 12 horas.

- **Lectura de las placas:** Trascurrido este tiempo se realizó la lectura con una hoja milimetrada, para lo cual se mide el diámetro formado por cada sensidisco.

Anexo D. Ensayo de susceptibilidad de agentes antimicrobianos

Discos de antibióticos para antibiograma

Descripción: ANTIBIOTIC DISC son discos de papel, con características especiales, impregnadas con antibiótico, utilizados para el test de susceptibilidad según el test de antibióticos de Kirby –Bauer. Los ANTIBIOTIC DISC están previstos en una ancha variedad de configuraciones, para este caso disponible en la variante de 50 test.

Contenido de los estuches: La variante de 50 test contiene: 1 cartucho con 50 discos empaquetado en un “blíster” en presencia de un desecador.

Principio del método: Los discos se aplican en la superficie de cultivo, inoculado con el caldo de cultivo, preparado con colonias puras del microorganismo en examen. Después de la incubación, se examinan las placas, se miden los halos de inhibición alrededor de cada disco y se comparan con los diámetros de los halos de inhibición estándar: de esta manera los microorganismos se definen sensibles, intermedios o resistentes a los agentes antimicrobianos testados.

Composición: Los discos están preparados con papel de alta calidad en conformidad con las especificaciones dictadas por la OMS y la FDA. Cada disco está impregnado con cantidades estandarizadas de antibiótico.

Características del producto

Tabla 17. Antibióticos, sigla y cantidad

Antibiótico	Sigla	Cantidad
Cefotaxina	CTX	30 µg
Penicilina	P	10 IU
Gentamicina	CN	10 µg
Dicloxacilina	DCX	1µg
Ciprofloxacina	CIP	5 µg
Cefalotina	KF	30 µg

Anexo E. Ensayos de inhibición *in vitro*

Obtención del sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*

A partir de la bacteria láctica en estudio, se procedió a realizar la obtención del sobrenadante de la siguiente manera;

- Fue sembrada a partir de la bacteria láctica que fue cultivada en cajas petri con agar MRS y azul de anilina por 24 horas. posteriormente se tomó de tres a cuatro colonias y se sembró en caldo MRS a 37°C por 24 Horas
- Se hizo el ajuste de inóculo a escala MacFarland a una concentración de 1,2 x 10⁹ UFC/mL, correspondientes a un patrón 4 en la escala de McFarland, a una densidad óptica de 625 nm.
- A partir de la bacteria láctica previamente sembrada y ajustada, se tomó 1,5 ml de la muestra y se los deposito en tubos eppendorf de 2 ml.
- A continuación se llevó las muestras a centrifugar en una criocentrífuga con una temperatura controlada de 4°C, y velocidad de 13.500 rpm por 15 minutos.
- Después de este procedimiento la bacteria láctica se separó en dos fases la primera con el sobrenadante y la segunda el precipitado (en este caso es la biomasa de la bacteria láctica)
- Se procedió inmediatamente tomar una muestra cruda del sobrenadante, es decir sin filtrarlo, y otras se procedieron a filtrarlas de la siguiente manera:
 - Con una jeringa de 5 mL, se extrajo el sobrenadante y se procedió a filtrar la muestra usando membranas de 0,2 µm en tubos eppendorf previamente estériles
- Una vez filtrado los sobrenadantes se tomó tres muestras de las cuales una se la neutralizo a pH 6,0 para eliminar el efecto de los ácidos, otra muestra se

sometió a calentamiento a 80°C por 10 minutos para eliminar el efecto enzimático y finalmente una muestra que se neutralizó y se llevó a 80°C. Para las muestras sin filtrar se tomó el mismo número de ejemplares y se les hizo el mismo tratamiento.

- Previo a la realización de la prueba se sembró y verifico la pureza de la bacteria a utilizar. Se sembró la BAL y ajustó a escala MacFarland de 4 ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL)
- Posteriormente se sembraron en cajas petri con agar MRS y azul de anilina, a concentraciones de 50, 75 y 100 μ L, se llevó a incubar por 24 horas a 37°C.
- Posterior a esto se procedió a ajustar la bacteria patógena a escala Mac Farland 0.5 ($1,5 \times 10^8$ bact/mL) y sembró en cajas petri con agar Mueller Hinton.
- A continuación de las muestras sembradas a diferentes concentraciones se procedió a tomar discos de agar con la bacteria en masa colocándolos en el agar Mueller Hinton previamente impregnado con la bacteria patógena. Los discos se los tomo con un asa bacteriológica estéril.
- Se llevó las cajas de petri sembradas con la bacteria patógena y los discos de agar con la bacteria láctica a incubar a 37°C por 12 horas
- Trascurridas las 12 horas se procedió a medir los halos formados. La distancia se midió desde el borde de la bacteria láctica hasta el borde o extremos del halo. Un halo igual o superior a 2mm se considera como inhibidor del efecto de la bacteria patógena

Método de difusión en cilindro plástico

- Este método consiste en realizar una serie de pozos o hendiduras con la bacteria patógena ajustada a escala 0.5 McFarland y sembrada en cajas petri con agar Mueller Hinton, empleando un sacabocado estéril de 4 mm de diámetro.
- El número de pozos depende del halo de inhibición esperado. La base de cada pozo se sella con 0.05 mL (50 μ L) de agar nutritivo derretido,
- En seguida se procedió a depositar sobre estos cilindros plásticos diferentes cantidades del sobrenadante a razón de 80, 100 y 120 μ L. de las muestras filtradas y sin filtrar con los tratamientos ya mencionados.
- Finalmente y sin invertir las cajas se dejaron incubar por 12 horas a 37°C para realizar la lectura, la cual se basa por el tamaño del halo de inhibición formado.

- Un halo igual o superior a 2mm se considera como inhibidor del efecto de la bacteria patógena.

Método de difusión en pozos con doble capa modificado

- En cajas preparadas con agar Mueller Hinton se realizaron 2 pozos empleándose la boca de una punta estéril de 8 mm de diámetro.
- En la base de cada pozo se selló con 0,05mL (50 µl) de agar nutritivo derretido.
- Luego en cada pozo se añadió las respectivas cantidades indicada del sobrenadante filtrado y sin filtrar con los tratamientos descritos. (80, 100, 120 µL).
- Aparte se ajustó la bacteria patógena a escala 0,5 McFarland, se mezcla con agar nutritivo derretido a razón del 10% y se vertió sobre el agar formándose una doble capa.
- Las cajas se llevaron a incubar 37°C por 12 horas, tiempo transcurrido donde se midió el radio del halo formado en milímetros, un halo igual o superior a 2mm se considera como inhibidor del efecto de la bacteria patógena.

Anexo F. Método de Antrona o Dubois

Fundamento: la reacción de antrona constituye la base de un método conveniente para la determinación de hexosas, aldopentosas y ácidos hexourónicos, bien sea que estén libres o formando parte de los polisacáridos. La solución azul-verdosa muestra una absorbancia máxima a 625 nm.

Reactivos:

- Antrona
- Ácido sulfúrico 10% y 96%
- Glucosa anhidro

Lavado de vidriería con H₂SO₄ al 10%. La vidriería para las dosificaciones como para las diluciones deben estar previamente lavadas con H₂SO₄ al 10%, se dejan en remojo los tubos con el mismo ácido por 24 horas, luego se desocupa y se dejan invertidos para su secado por lo menos 3 horas.

Preparación del reactivo de Antrona: disolver 200mg (0,2 g) de Antrona en 100 mL de H₂SO₄ al 96% en un balón aforado y conservarlo cubierto con papel aluminio.

Solución Madre: Disolver 1,25 g de glucosa anhidra en un balón aforado de 250 mL hasta completar su volumen con agua destilada y esterilizada.

Solución estándar: De la solución madre transferir 1 mL en un balón aforado de 100mL, hasta completar su volumen con agua destilada y esterilizada.

Dilución patrón: se establece una curva estándar de 0 a 50 mg/L. después de efectuar una dilución de 1/10 de la solución madre (500 mg/L), depositar en una serie de tubos 0-0,25-0,50-0,75-1.0-1,25-1,50-1,75-2,0-2,5 mL de la solución madre y completar a 2,5 mL con agua destilada.

Adición de la Antrona

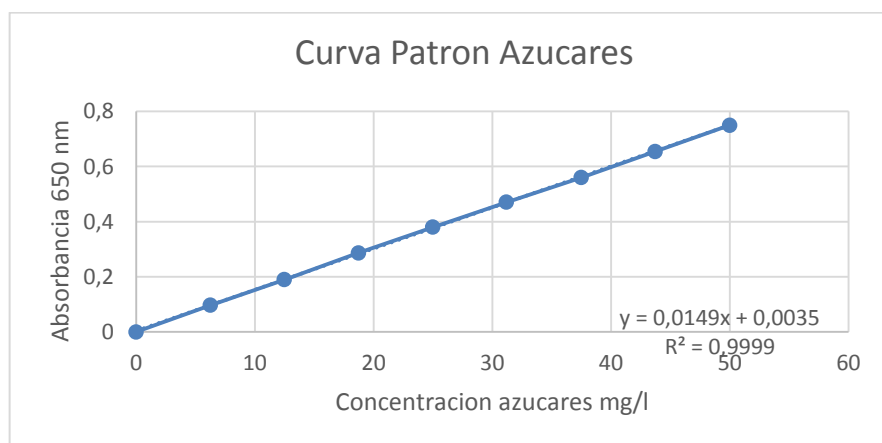
- Se depositan 5 mL de la solución preparada en cada dilución (3 tubos) de los diferentes tubos. Estos tubos se colocan perpendiculares en un recipiente con abundante hielo y agua, el tiempo máximo de permanencia en este son 2 minutos.
- Agitar en un vortex continuamente hasta homogenizar la solución.
- Llevar a ebullición por 10 minutos todos los tubos al mismo tiempo.
- Enfrían posteriormente en un recipiente con abundante hielo y agua, el tiempo máximo de permanencia en este son 2 minutos.
- Agitar en un vortex y esperar 15 minutos para eliminar las burbujas de aire y el empañamiento de los tubos.
- Llevar a lectura al espectrofotómetro a 625 nm en un periodo máximo de 30 minutos.
- El blanco se lee por duplicado. El blanco es 2,5 mL de agua destilada.

Procedimiento para azúcares totales para la muestra a evaluar

- Tanto la curva estándar como las muestras a dosificar sufren el mismo tratamiento, más la dosificación de azúcares totales es realizada sobre 2,5 mL de muestra convenientemente diluida conservados en congelación.
- Para las muestras de azúcares se hacen diluciones 10-1, 10-2, 10-3, 10-4 de cualquiera de las muestras obtenidas en los diferentes tiempos de la cinética en agua destilada, filtrada y estéril para correr D.O.

- Se escoge la dilución a trabajar correspondiente a la densidad óptica entre 0 y 1, si esta requiere se debe diluir.
- A continuación se lleva cada dilución de cada tiempo de la cinética a esta dilución.
- Una vez hechas las diluciones se procede a tomar de cada una de ellas 2,5 mL de la muestra y se deposita en un tubo de ensayo (lavado previamente con H₂SO₄ al 10% durante toda la noche).
- Posteriormente a esta muestra de 2,5 mL se le deposita 5 mL de la solución de antrona ya preparada anteriormente y se sigue el mismo procedimiento que en la curva estándar.
- El blanco se prepara con 2,5 mL de agua destilada más 5 mL del reactivo de Antrona.

Anexo G. Curva patrón para determinación de azúcares totales (método de antrona)



Ecuación curva estándar

La condición general para aplicar la ecuación de la recta debe considerar que el coeficiente de determinación sea (R^2) > 0,99.

$$Y = mx + b$$

Y = absorbancia

m= pendiente

X = concentración (mg de azúcar/L)

b = ordenada al origen

Tabla 18. Lectura de absorbancia para diferentes concentraciones de azúcar mg/L

Tiempo	Concentración mg/L	Absorbancia 625nm
0	0	0
3	6,25	0,097
6	12,5	0,19
9	18,74	0,287
12	25	0,38
15	31,2	0,471
18	37,5	0,56
21	43,74	0,655
24	50	0,75

Anexo H. Determinación de Proteínas “método Lowry” modificado

Curva estándar: se estableció una curva de 0 a 0.3 mg/L. dentro de una serie de tubos de ensayo de 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL de la solución de seroalbumina y se completó a 1mL con agua destilada.

Método:

- Se ajusta 1 mL del patrón de la curva estándar y de las muestras
- Se adiciona 0.5 mL de NaOH 2N a todos los tubos
- Colocar en baño María a temperatura de ebullición durante 20 minutos
- Reposar en baño de agua fría
- Adicionar 0.5 mL de H₂SO₄ 2.6 N
- Adicionar 0.9 mL de solución A
- Llevar por 10 minutos en la oscuridad
- En este momento de debe preparar la solución C y adicionar 3mL a la muestra problema de la siguiente manera:

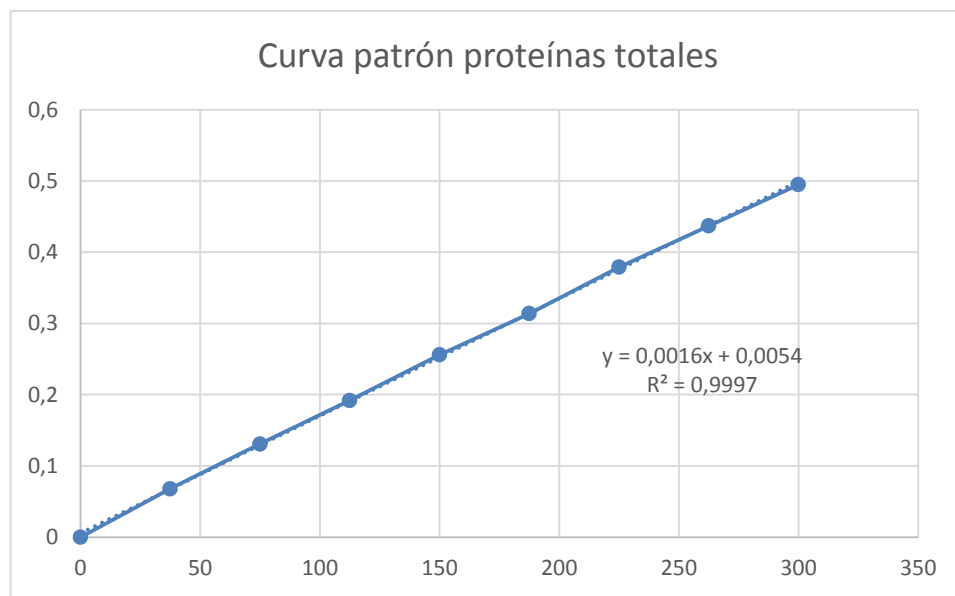
$$Volumen\ de\ Folin = \frac{Volumen\ a\ preparar}{15(\text{sumatoria de la proporción } 1:14)} \times 14$$

- A continuación se lleva 10 minutos a baño María a 50°C

- Se Reposa en agua fría
- Finalmente se lleva a leer en espectrofotómetro las absorbancias a 750 nm

Calculo: los datos de absorbancia y concentración de la curva estándar, son graficados para obtener una regresión lineal donde el coeficiente de correlación no debe ser menor de 0.99, reordenar la ecuación en términos de concentración y sustituir las lecturas D.O obtenidas de las muestras problema, teniendo en cuenta de multiplicar por el factor de dilución.

Anexo I. Curva patrón proteínas totales



Anexo J. Regresiones de la cinética comparadas con la variable tiempo

Tabla 19. Regresión cuadrática consumo de azúcares para *L. plantarum*

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
TIEMPO	-,677	,145	-,569	-4,673	,000
TIEMPO ** 2	-,020	,006	-,421	-3,458	,002
(Constant)	77,991	,746		104,586	,000

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,982	,964	,961	1,835

Tabla 20. Regresión cuadrática producción de proteína para *L. plantarum*

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
TIEMPO	,101	2,434	,008	,042	,967
TIEMPO ** 2	-,506	,098	-,964	-5,186	,000
(Constant)	512,167	12,525		40,891	,000

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,957	,915	,910	30,821

Tabla 21. Regresión cuadrática pH para *L. plantarum*

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
TIEMPO	-,136	,005	-,2306	-25,323	,000
TIEMPO ²	,003	,000	1,454	15,966	,000
(Constant)	5,572	,028		202,001	,000

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,990	,980	,978	,068

Tabla 22. Regresión lineal % ácido láctico para *L. plantarum*

	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	T	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
TIEMPO	,010	,000	,973	24,540	,000
(Constant)	,171	,006		28,262	,000

Model Summary

R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
,973	,947	,945	,020

Anexo K. Medidas repetidas en el tiempo *L. plantarum* en medio MRS

Tabla 23. Medidas repetidas en el tiempo *L. plantarum*

TIEMPO	N	Subset		
		1	2	3
21	4	18,42		
24	2	18,42		
0	4	21,00	21,00	
3	4	21,16	21,16	
6	4	21,65	21,65	
18	4	23,30	23,30	23,30
9	4		27,26	27,26
15	4		29,10	29,10
12	4			30,23
Sig.		,598	,073	,182

Tabla 24. Correlación entre variables cinéticas

		Correlations					
		Tiempo	Azu	Prot	pH	Acid	UFC
Tiempo	Pearson Correlation	1	-,993**	-,962**	-,918**	1,000**	-,204
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000	,000	,598
	N	9	9	9	9	9	9
Azu	Pearson Correlation	-,993**	1	,987**	,865**	-,993**	,318
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,003	,000	,405
	N	9	9	9	9	9	9
Prot	Pearson Correlation	-,962**	,987**	1	,773*	-,962**	,465
	Sig. (2-tailed)	,000	,000		,015	,000	,207
	N	9	9	9	9	9	9
pH	Pearson Correlation	-,918**	,865**	,773*	1	-,918**	-,201
	Sig. (2-tailed)	,000	,003	,015		,000	,603
	N	9	9	9	9	9	9
Acid	Pearson Correlation	1,000**	-,993**	-,962**	-,918**	1	-,204
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	,000	,000		,598
	N	9	9	9	9	9	9
UFC	Pearson Correlation	-,204	,318	,465	-,201	-,204	1
	Sig. (2-tailed)	,598	,405	,207	,603	,598	
	N	9	9	9	9	9	9