

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUIMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACOBIOQUÍMICAS



**DISEÑO DE MEDIOS DE CULTIVO A BASE DE
GRANO DE QUINUA (*Chenopodium quinoa*) PARA
LA OBTENCIÓN DE PROBIÓTICOS A TRAVÉS DE
TECNOLOGÍA DE FERMENTACIONES**

“TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN
BIOQUÍMICA”

Elaborado por: Univ. Arturo Carita Calla

Asesoras: María Teresa Álvarez Aliaga PhD

Carla Crespo Melgar PhD

LA PAZ-BOLIVIA

2017

DEDICATORIA

*A Dios y mi familia, que sin el apoyo de ellos
no hubiese podido ser posible concluir este sueño.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme una oportunidad más, en esta vida para poder concluir un sueño más.

A esta prestigiosa casa de estudios, como es la Universidad Mayor de San Andrés, por haberme acogido durante estos años.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por abrirme sus puertas y haberme dado una oportunidad de realizar un sueño muy anhelado como es el de investigar.

A mis queridas asesoras, Dra. Carla Crespo Melgar y Dra. María Teresa Álvarez, que con una incomparable paciencia supieron guiarme durante la elaboración de este trabajo.

A mis queridos compañeros, que supieron apoyarme durante este periodo tan importante para mí.

Finalmente a mi familia, por darme tanto aliento durante estos años, que supieron apoyarme a pesar de las adversidades que atravesamos.

“Cuida el agua hoy para un mejor mañana”

Anónimo

“Cada uno es dueño y arquitecto de su vida, donde estés mañana tú lo has decidido”

“Las nuevas teorías, hipótesis o interpretaciones, no surgen de los problemas es necesario inventarlas.”

Albert Einstein

TABLA DE CONTENIDOS

Pag.

Resumen

Abstract

I.	Planteamiento del problema	1
A.	Justificación	1
B.	Objetivos	2
II.	Diseño teórico	2
A.	Marco referencial	2
1.	Antecedentes generales sobre el problema.....	2
2.	Descripción del ámbito de estudio	3
B.	Marco teórico	4
C.	Marco conceptual.....	10
III.	Formulación de la hipótesis de investigación	11
IV.	Operacionalización de las variables en estudio.....	12
V.	Diseño metodológico	12
A.	Población en estudio, ámbito y periodo de investigación	12
B.	Tipo de investigación.....	12
C.	Materiales y métodos	13
1.	Obtención y acondicionamiento de la quinua como materia prima	14
2.	Procesamiento de la materia prima.....	15
3.	Conversión biotecnológica para la producción de cepas pro bióticas.....	16
4.	Evaluación del rendimiento en la formación de producto.....	21
5.	Determinaciones analíticas.....	22
D.	Procesamiento de los datos	23
1.	Recolección	23
2.	Elaboración.....	23
3.	Análisis.....	23
VI.	Resultados y discusión	23
A.	Obtención y acondicionamiento de la quinua como materia prima.....	23
1.	Secado solar y molienda de la materia prima.....	24
B.	Procesamiento de la materia prima	25

1.	Pretratamiento fisicoquímico de la materia prima.....	25
2.	Optimización del pretratamiento ácido de la materia prima	29
C.	Conversión biotecnológica para la producción de cepas probióticas.....	31
1.	Diseño, formulación y optimización de medios de cultivo	33
2.	Producción de células probióticas a mayor escala	46
VII.	Conclusiones	55
VIII.	Bibliografía	56
IX.	Anexos	

<u>INDICE DE TABLAS</u>	Pag.
Tabla 1. Probióticos más comúnmente utilizados.....	5
Tabla 2. Composición nutricional del grano de quinua.....	6
Tabla 3. Clasificación de la quinua por diferentes métodos.....	7
Tabla 4. Productos posibles en diferentes fermentaciones.....	8
Tabla 5. Operacionalización de variables en estudio.....	12
Tabla 6. Concentraciones de los componentes en los medio formulados.....	18
Tabla 7. Características de <i>Lactobacillus casei sp. rhamnosus</i> cultivado en medio MRS con cisteína (DSMZ).....	33
Tabla 8. Viabilidad de <i>L. casei</i> (UFC/mL) a diferentes condiciones de pH en medio q-lev1 y MRS, a 37°C, en anaerobiosis durante 24 horas y 48 horas de cultivo.....	43
Tabla 9. Consumo de glucosa de cultivos de <i>L. casei</i> a diferentes condiciones de pH en medio q-lev1 y MRS, a 37°C, en anaerobiosis durante 24 horas y 48 horas de cultivo ...	44

<u>INDICE DE FIGURAS</u>	Pag.
Figura 1. Descripción del proceso de clasificación de granos de quinua y porcentajes promedios de extracción de subproductos.....	7
Figura 2. Ruta metabólica en la fermentación Láctica.....	9
Figura 3. Fermentador controlado por un software.....	9
Figura 4. Escenario del presente trabajo de investigación.....	13
Figura 5. Tipos y tamaño de quinua.....	24
Figura 6. (A) Harina de quinua y (B) Partículas de harina de quinua (con una magnificación de 1000x).....	25
Figura 7. Contenido de glucosa (g/L±DS) en hidrolizados de harina de quinua al 4% (p/v) ST con H ₂ SO ₄ , NaOH, HCl y H ₃ PO ₄ al 1% (v/v).....	26
Figura 8. Tratamiento del hidrolizado de la quinua, para la formulación de los medios de cultivos.....	28
Figura 9. (A) Glucosa y (B) proteína en proteína, en hidrolizado de quinua al 4% (p/v) ST con H ₂ SO ₄ al 1% (v/v) a los 15, 20 y 25 min de pretratamiento a 16 PSI de presión a 121°C.....	30
Figura 10. Contenido de Glucosa y proteínas (en g/L) en hidrolizados de quinua al 4% y 8% (p/v) de ST obtenidos por hidrólisis ácida H ₂ SO ₄ 1% (v/v) a 121°C, 16PSI de presión por 15 min.....	31
Figura 11. Morfología de <i>L. casei rhamnosus</i> (A) Morfología macroscópica: Colonias de <i>L. casei</i> en medio sólido MRS y (B) Morfología microscópica: tinción Gram de <i>L. casei</i> bajo observación microscópica (1000x).....	32
Figura 12. <i>Lactobacillus casei rhamnosus</i> en medios de cultivo líquido y sólido, formulados en base al hidrolizado de quinua y medio control (MRS).....	34
Figura 13. Parámetros cinéticos (UFC, DO, pH y glucosa consumida) durante el crecimiento de <i>L. casei</i> en medios MRS y medios en base a hidrolizado de quinua a concentraciones de 0, 20, 40, 60, 80 y 100 % (v/v) en condiciones anaerobias a 37°C a escala de 60 mL de cultivo.....	37
Figura 14. Parámetros de crecimiento (UFC, DO, pH, proteínas y glucosa) de <i>L. casei</i> en medios de cultivos: MRS, medio-q (q-80%), q-lev1 y q-lev2 en condiciones anaerobias, 37°C a escala de 60 mL.....	39
Figura 15. Crecimiento de <i>Lactobacillus casei sp. rhamnosus</i> a diferentes condiciones de pH en medio q-lev 1 a 37°C, en anaerobiosis durante 24 horas.....	41

Figura 16. Crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i> sp. <i>rhamnosus</i> a diferentes condiciones de pH en medio MRS a 37°C, en anaerobiosis durante 24 horas.....	42
Figura 17. Parámetros evaluados (UFC, DO, pH, proteínas y glucosa) a diferentes condiciones de pH en medio q-lev1 y MRS, a 37°C, en anaerobiosis durante 24 horas y 48 horas de cultivo.....	45
Figura 18. Parámetros evaluados durante el crecimiento de <i>L. casei</i> (UFC, DO, pH, proteínas y glucosa) en medios q-lev 1 y MRS, en condiciones anaerobias a 37°C a escala de 1 litro.....	49
Figura 19. Parámetros evaluados durante el crecimiento de <i>L. casei</i> (UFC, DO, pH, proteínas y glucosa) en medios MRS y q-lev1 en condiciones aerobias a 37°C a escala de 1 litro.....	51
Figura 20. Parámetros evaluados durante el crecimiento de <i>L. casei</i> (UFC, DO, pH, proteínas y glucosa) en medios MRS y q-lev1 en condiciones anaerobias y pH constante, a 37°C a escala de 1 litro.....	53

TABLA DE ABREVIATURAS

DNS	: ácido 3,5 di-nitro salicílico
EDAs	: enfermedades diarreicas agudas
HPLC	: high-performance liquid chromatography
LAB	: bacterias ácido lácticas
MRS	: Man, Rogosa and Sharpe
DO	: densidad óptica
OMS	: Organización Mundial de la Salud
pH	: potencial de hidrogeniones
RPM	: revoluciones por minuto
UFC	: unidades formadoras de colonias
ST	: sólidos totales

DISEÑO DE MEDIOS DE CULTIVO A BASE DE GRANO DE QUINUA
(Chenopodium quinoa) **PARA LA OBTENCIÓN DE PROBIÓTICOS A TRAVÉS**
DE TECNOLOGÍA DE FERMENTACIONES

Se preparó un hidrolizado ácido de harina de quinua (partículas 10-20 μ m, 7% de humedad obtenido por secado solar) al 8%ST (p/v) con 1% H₂SO₄ (p/v), 121°C, 16psi por 15 min. Dichas condiciones permiten una mayor liberación de glucosa (69.4 g/L) y proteínas (23,9g/L). El medio de cultivo diseñado q-lev1, contiene: hidrolizado de quinua ajustado a una concentración final (en g/L): 20 de glucosa, 2.5 levadura de cerveza y micronutrientes (2 K₂HP0₄, 5 acetato de sodio, 2 citrato de sodio, 0.2 MgSO₄7H₂O, 0.05 MnSO₄ y 0.5 L-cisteína, 1mL tween 80) a un pH 7.0 \pm 0.1. El medio formulado fue evaluado mediante la determinación de la viabilidad de *L. casei rhamnosus* obteniendo 1.6x10¹⁰UFC/mL respecto al medio control MRS (8.8x10⁹UFC/mL), durante 24 horas de incubación. Además, otros indicadores: consumo de glucosa y proteínas, variación de la densidad óptica y la reducción de pH demostraron el éxito de la fermentación. Se observó que para el cultivo de *L.casei rhamnosus* a mayor escala (1L), las condiciones óptimas de crecimiento fueron de 37°C, 80rpm, ambiente anaerobio a pH no controlado (pH inicial 7.0 \pm 0.1). Dicha fermentación fue evaluada mediante la determinación de viabilidad, obteniendo 1.6x10¹⁰UFC/mL en el medio formulado (q-lev 1) y 8.8x10⁹UFC/mL en el medio control (MRS) a las 24 horas de incubación. Los resultados obtenidos indican que es posible emplear q-lev1: 20g/L de glucosa (harina de quinua 8% ST, H₂SO₄ 1%, 121°C, 16psi, 15min), 2.5g/L levadura de cerveza y micronutrientes, como medio de cultivo para obtener una dosis probiótica de 1.6x10¹⁰UFC/mL de *L. casei rhamnosus*.

Palabras claves: *L.casei sp. rhamnosus*, quinua, hidrolisis ácida, fermentación.

DESIGN OF QUINOA-BASED MEDIUM FOR PROBIOTIC PRODUCTION THROUGH FERMENTATION TECHNOLOGY

Acid hydrolysate of quinoa flour (10-20 μ m particle size, 7% moisture content obtained by solar drying) was prepared at 8% TS (w/v) with 1% H₂SO₄ (w/v), 121°C, 16psi for 15min. These conditions allow increased release of glucose (69.4 g/L) and proteins (23.9 g/L). The designed culture medium q-lev1 contains: quinoa hydrolysate adjusted to a final concentration (in g/L): 20 glucose, 2.5 brewer's yeast and micronutrients (2 K₂HP0₄, 5 sodium acetate, 2 sodium citrate, 0.2 MgSO₄ 4 H₂O, 0.05 MnSO₄ and 0.5 L-cysteine, 1mL tween 80) at pH 7.0 \pm 0.1. The formulated medium was evaluated by determining the viability of *L. casei rhamnosus* obtaining 1.6x10¹⁰ UFC/mL with respect to MRS control medium (8.8x10⁹ UFC/mL) after 24 hours of incubation. In addition, other parameters: glucose and proteins consumption, optical density variation and pH reduction demonstrated a successful fermentation. Optimal growth conditions, of *L. casei rhamnosus* on a larger scale (1L), were 37°C, 80rpm and anaerobic environment at uncontrolled pH (pH initial 7.0 \pm 0.1). The larger fermentation was evaluated through viability determination, obtaining 1.6x10¹⁰ UFC/mL with formulated medium (q-lev 1) and 8.8x10⁹ UFC/mL with control medium (MRS) at 24 hours of incubation. The results show that it is possible to use q-lev 1: 20g/L glucose (quinoa flour 8% ST, 1% H₂SO₄, 121°C, 16psi for 15min), 2.5g/L brewer's yeast and micronutrients, as culture medium to obtain a proper probiotic dosage of 1.6x10¹⁰ UFC/mL of *L. casei rhamnosus*.

Key words: *L. casei sp. rhamnosus*, quinoa, acid hydrolysis, fermentation.

I. Planteamiento del problema

Las infecciones gastrointestinales que ocurren en nuestro medio, afectan poblaciones vulnerables debido a su condición socioeconómica. El uso inadecuado de antibióticos, ocasiona un alto índice de resistencia a antimicrobianos, lo que implica un gasto económico excedente en la salud social. Una alternativa empleada desde siempre para reducir afecciones gastrointestinales, radica en el consumo de alimentos fermentados, con alto contenido de microorganismos, como el yogurt, leches fermentadas y otros. En forma general los microorganismos benéficos que conducen a la fermentación de los alimentos son denominados probióticos. Estos microorganismos no son producidos en nuestro medio, ya que aún no es entendida la tecnología para producir los probióticos, por lo que estos deben ser importados para su implementación en los alimentos, para su consumo, este problema conlleva a altos costos de importación por el pago de: transporte, aranceles y otros y además no asegura la calidad de los mismos en cuanto a su dosis efectiva.

En respuesta a este problema, se evaluó un procedimiento biotecnológico para la producción de probióticos empleando materia prima propia de nuestra región como es el grano de quinua, y estableciendo las condiciones de cultivo necesarias, que aseguren la obtención de células probióticas viables en dosis adecuadas de consumo.

A. Justificación

Bolivia al ser un país en vías del desarrollo, es vulnerable sobre todo en infecciones respiratorias agudas (IRAs) e infecciones gastrointestinales, las cuales se dan principalmente a causa del estado nutricional deficiente de las personas. Como medida de control a esta situación, actualmente en el mundo se propone la administración de probióticos. Se prescriben, comercializan y utilizan probióticos en Bolivia, pero la tecnología para la producción de probióticos no se ha desarrollado aún.

Lo que se pretende con esta investigación es desarrollar la tecnología de producción de probióticos, utilizando como materia prima materiales crudos propios de nuestro ambiente que contienen los nutrientes requeridos para el crecimiento de los probióticos como fuente de carbohidratos y proteínas. Para que *Lactobacillus casei sp. rhamnosus* desarrolle en un medio de cultivo, se requiere que este medio de cultivo sea rico en proteínas y carbohidratos, materias primas que contenga estos componentes pueden ser utilizadas para la producción de probióticos. Una materia prima ideal es la quinua, después de su recolección en los campos de producción se realiza su clasificación en quinua de primera (grano perlado) y quinua de segunda calidad, y solamente la mejor quinua se exporta, se vende y es usada como semilla, pero la quinua de baja calidad no es utilizada y se comercializa a precios muy bajos, debido a esto se pretende emplear

quinua de baja calidad para producir un producto con valor agregado como son los probióticos.

B. Objetivos

1. Objetivo general

- Diseñar, formular y evaluar un medio de cultivo en base a grano de quinua (*Chenopodium quinoa*) para la producción del probiótico *Lactobacillus casei sp. rhamnosus*

2. Objetivos Específicos

- Caracterizar el grano de quinua como materia prima por su contenido de humedad, proteínas y glucosa para la formulación de medios de cultivos para la producción de *Lactobacillus casei sp. rhamnosus*.
- Optimizar el rendimiento de la hidrólisis del grano de quinua en base al pretratamiento fisicoquímico con ácido base, a 121°C, 16 psi por tiempos de 15, 20 y 25 min.
- Diseñar un medio de cultivo para microorganismos probióticos en base al contenido de productos obtenidos de la hidrólisis del grano de quinua.
- Optimizar el medio formulado para el crecimiento de *Lactobacillus casei sp. rhamnosus* empleando levadura de cerveza como fuente nutricional maximizando el rendimiento de células como producto.
- Optimizar el proceso de producción de *L. casei* en función a las condiciones de cultivo: pH, anaerobiosis, aerobiosis, a escala de 1L, empleando el medio formulado.

II. Diseño teórico

A. Marco referencial

El alto índice de enfermedades infecciosas respiratorias y gastrointestinales en nuestro medio es muy elevado, afecciones que son correlacionadas con el alto índice de desnutrición, que afecta a poblaciones vulnerables de nuestro país lo cual es debido a la falta de alternativas de terapia en enfermedades infecciosas debido al incremento de resistencia a antimicrobianos, el cual es creciente debido a varios factores, como el uso indiscriminado de antibióticos, la alimentación inadecuada relacionada a la pobreza

existente en nuestro medio, lo que se traduce en una alta tasa de morbimortalidad en nuestro medio especialmente de infantes menores de 5 años.

La importación de probióticos para el consumo es la realidad de nuestro país, la cual es debido a la falta de tecnología para la producción de probióticos, incrementando los costos debido a los gastos de transporte y pago de aranceles para la importación de los mismos, lo cual conduce a la inaccesibilidad a alimentos que contengan probióticos para una adecuada alimentación y prevención de enfermedades infecciosas en nuestro medio.

En nuestro país se emplean medios de cultivos importados para el crecimiento de probióticos comúnmente empleados en investigación, y si se lograría producir probióticos con estos medios de cultivo implicaría elevados costos de producción lo cual no es económicamente factible. Como alternativa, se plantea utilizar materia prima nacional para la formulación de medios de cultivos y posible producción de probióticos a mayor escala en nuestro medio.

1. Descripción del ámbito de estudio

Los probióticos son microorganismos que poseen muchas características beneficiosas para la salud de los consumidores. Al no existir la tecnología para la producción de probióticos en nuestro medio, las empresas que emplean probióticos en sus productos los importan de diferentes países. La propuesta de este estudio plantea la producción de probióticos mediante el empleo de técnicas de biotecnología, empleando materia prima propia de nuestra región como la quinua.

La quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*), es un pseudocereal nativo de las regiones andinas del Sur América (Jancurová, 2009). La quinua al ser un alimento inocuo, rico en carbohidratos y proteínas, después de su cosecha es clasificada en grano de primera y segunda calidad. Los granos más grandes se envasan y se distribuyen en el mercado local e internacional, sin embargo, los granos más pequeños se utilizan para hacer harinas o son empleados como alimento para animales según Thuresson (2015). La quinua de segunda calidad es despreciada y es comercializada en los mercados locales a precios muy bajos. El presente estudio propone un uso alternativo de la quinua y pretende emplear esta quinua de segunda calidad para darle un valor agregado. Se pretende someter al grano de quinua de baja calidad a un proceso fisicoquímico que consiste en la particulación mecánica del grano de quinua y su posterior hidrólisis (121°C, 16 PSI. durante 15min con ácido-base al 1%) para obtener una solución rica en nutrientes (azúcares, aminoácidos, oligopéptidos y otros productos) a la que se denomina hidrolizado de quinua. Esta quinua hidrolizada puede ser empleada para la formulación de medios de cultivos para el probiótico *Lactobacillus casei sp. rhamnosus*. Los medios formulados pueden ser optimizados con la adición de nutrientes de otras fuentes para

obtener un alto rendimiento en el crecimiento de las unidades formadoras de colonias (UFC) viables de *Lactobacillus casei sp. rhamnosus*.

B. Marco teórico

1. Probióticos

Al considerar, que convivimos con más de 400 especies bacterianas diferentes en nuestro tracto gastrointestinal, algunas de ellas nos ayudan a prevenir una amplia gama de enfermedades y tener una microbiota estable y bien equilibrada, la cual es una garantía de buena salud (Amores, 2004). En ese sentido es necesario aportar con medios que nos ayuden a cultivarlas para la producción de estas bacterias que poseen gran beneficio para nuestra salud.

Hurtado (2010) afirma:

En el mundo, el rotavirus es la causa principal de gastroenteritis aguda con diarrea grave y deshidratación en menores de cinco años; cada año causa 114 millones de episodios de gastroenteritis, 24 millones de consultas, 2.4 millones de hospitalizaciones en menores de cinco años (20-50% de las hospitalizaciones por diarrea) y 611.000 muertes infantiles (80% en países pobres), que a su vez representan 5% de la mortalidad infantil mundial.

Las enfermedades diarreicas son una causa importante de mortalidad y morbilidad infantil en países en vías de desarrollo (De la Hoz, 2014, OMS, 2013 y Gonzales 2009). En Bolivia, al ser un país en vías de desarrollo, las EDAs se presentan en alrededor del 30% de la población total de niños menores a 5 años, produciéndose anualmente más de 12.000 muertes (Hurtado, 2010), los niños malnutridos o inmunodeprimidos son los que presentan mayor riesgo de enfermedades diarreicas potencialmente mortales (FAO/OMS, 2011).

Diferentes estudios nos señalan, la efectividad del empleo de los probióticos como parte de terapias contra infecciones y enfermedades diarreicas (Korakli, 2002). Se ha descrito el uso de los probióticos como alternativa al tratamiento convencional de las infecciones (López-Brea, 2007). Los probióticos son eficaces en la prevención y el tratamiento de algunas enfermedades como la diarrea por rotavirus, *Clostridium difficile* o la inducida por el uso de los antibióticos y la colitis alérgica (Ferrer, 2001). Incluso Metchnikoff observó que el consumo de probióticos podría revertir la putrefacción (Stanton, 2005).

En este sentido, el término probiótico es una palabra relativamente nueva que significa “a favor de la vida” y actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales (FAO/OMS, 2006).

Los probióticos más conocidos son los lactobacilos utilizados para la fermentación de alimentos y las bifidobacterias, microorganismos predominantes en la microbiota intestinal de los niños alimentados con lactancia materna y posiblemente responsables de la menor incidencia de procesos diarreicos en este grupo (Gorbach, 1990 y Tabla 1).

Existen ciertas características para evaluar a los probióticos entre ellas sobresalen (Gonzales, 2009):

- Formar parte de la microbiota del intestino humano.
- No ser patogénico, ni toxigénico.
- Mantenerse viable en el medio ácido del estómago y en contacto con la bilis en el duodeno.
- Poseer capacidad de adhesión a las células epiteliales del tracto gastrointestinal.
- Producir sustancias antimicrobianas.
- Tener capacidad para aumentar de forma positiva las funciones inmunes y las capacidades metabólicas.

Los lactobacilos son bacterias ácido lácticas y se ubican en la familia *Lactobacillaceae*, son bacterias gram-positivas, anaerobias y estrictamente fermentativas (Caicedo, 2010).

Para los lactobacillus, los carbohidratos son indispensables para su buen desarrollo , los cuales son fermentados para dar lugar al ácido láctico (a veces otros ácidos volátiles), alcohol y dióxido de carbono como subproductos. (Caicedo, 2010).

Conociendo la necesidad de *Lactobacillus casei sp. rhamnosus*, de requerir carbohidratos para llevar adelante su crecimiento bacteriano, proponemos como materia prima a la quinua como un sustrato rico en carbohidratos, como se describe en la Tabla 2.

Tabla 1. Probióticos más comúnmente utilizados

<i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>B. bifidum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. boulardii</i>
<i>B. breve</i>	<i>L. bulgaricus</i>		<i>E. faecium</i>	
<i>B. lactis</i>	<i>L. casei</i>			
<i>B. longum</i>	<i>L. casei Shirota</i>			
	<i>L. johnsoniiLa1</i>			
	<i>L. plantarum</i>			
	<i>L. reuteri</i>			
	<i>L. rhamnosus GG</i>			
	<i>L. salivarius</i>			

Extraído de: López-Brea, Junio 2007, p.171

2. Quinua

La quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) es un pseudocereal nativo de las regiones andinas de Sudamérica (Jancurová, 2009).

Lozano, (La Paz 2012) afirma:

Bolivia es el mayor productor y exportador de quinua real orgánica a nivel mundial con 46 % de la producción. Esta variedad se produce únicamente en el altiplano sur de Bolivia donde la producción creció hasta en 62,9 % en los últimos 7 años (INE 2009), este incremento se realizó principalmente los años 2005 y 2006 por su gran aceptación en mercados internacionales exóticos, de productos orgánicos y de comercio justo. Las exportaciones, principalmente a Estados Unidos, Francia, Países bajos y Alemania, se incrementaron desde 4890 TM en el 2005 hasta 10 428 TM el 2008, constituyéndose en el principal cultivo de la región occidental de nuestro país.

Por sus características nutricionales, contenido de proteínas, vitaminas y minerales, constituye una de las bases en la alimentación (Meyhuay, 1997). El grano de quinua posee un valor nutritivo por cada 100 gramos de porción comestible de acuerdo a lo descrito en la Tabla 2.

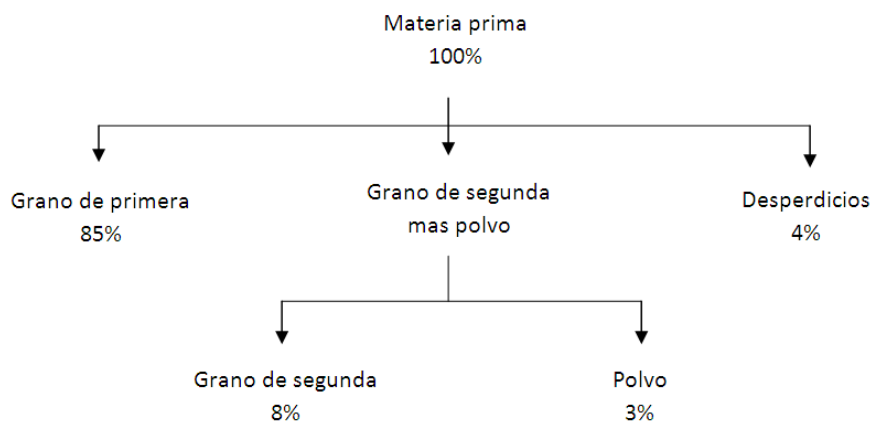
Tabla 2. Composición nutricional del grano de quinua y otros alimentos

NOMBRE COMÚN	Calorías	Agua (%)	GRAMOS			MILIGRAMOS			MSGSO (UI)	MILIGRAMOS				
			Proteína	Carbohidratos Total	Grasa Fibra	Calcio	Fosforo	Hierro	Vit. A	Vit. B	B2	Niacina	Vit. C	
Quinua	351	11	14	68	4,6	6	112	286	8	0	0.36	0.42	1.4	3
Chocho	276	46	36	18	3,8	18	54	262	2	0	0.16	0.29	1.1	5
Trigo	330	13	12	72	23	2	46	354	3	0	0.52	0.12	4.3	0
Maíz	361	11	9,4	74	1,8	4	9	290	3	70	0.43	0.10	1.9	Tr
Arroz	364	12	7,2	80	0,6	1	9	104	1	0	0.08	0.03	1.4	0
Carne de res	113	75	21	0	0	2	16	179	4	0	0.07	0.20	2.9	0
Huevo	148	75	11	3	0	10	54	204	3	125	0.14	0.37	0.1	0
Pescado	83	78	18	0	0	1	18	208	3	0	0.07	0.07	4.2	2

FUENTE: HAMMERLY, M. 1976. Viva más y mejor. Tomo II. Editora Sudamericana. Buenos Aires. p. 439-45

Después de la cosecha, la quinua es recolectada y clasificada de acuerdo al tamaño y calidad del grano, como se muestra en la Figura 1. Para que el grano de quinua pueda ser empleado como materia prima, éste debe ser de bajo costo en el mercado local, garantizando la sostenibilidad económica del proceso de fermentación para la producción de probióticos.

Figura 1. Descripción del proceso de clasificación de granos de quinua y cantidades relativas de extracción de subproductos.



Extraído de: Nieto, marzo 1992, p. 19

Tabla 3. Clasificación de la quinua por diferentes métodos.

Método clasificación	Grano primera (%)	Grano segunda (%)	Impurezas (%)
Clipper industrial	85,6	9,7	4,6
Mini clipper	88,6	4,2	7,1
Manual	86,8	9,1	4
Promedio	87	7,7	5,2

Extraído de: Parámetros de funcionamiento y eficiencia de algunos modelos de trilladoras y métodos de trilla de quinua (Nieto y Vimos, 1992)

Como se indica en la figura 1 y tabla 3 la clasificación del grano de quinua, dependiendo de la producción casi el 90% de grano de quinua se comercializa como grano de primera calidad, el cual es empleado para la exportación y como semilla, y menos del 10% de grano de segunda calidad es comercializado en el mercado local a bajos precios. Si tomamos en cuenta el 8% de 84.000 toneladas de quinua producidas por Bolivia durante el 2014, 1.92 toneladas de quinua de segunda calidad estaría disponible como materia prima para la formulación de medio de cultivo para la producción de probióticos, asegurando de esta forma la disponibilidad de materia prima, que es un condicionante en el desarrollo de todo bioproceso, en este caso la tecnología de producción de probióticos.

Las pérdidas de grano como producto comestible a causa de problemas en la cosecha y pos cosecha en muchos casos superan el 16%. (Soto, J. et al 2004), incluso este 16% de quinua perdida durante la cosecha y pos cosecha podría ser utilizado como materia prima para la formulación de medios de cultivos para la producción de probióticos.

Otra de las razones por las que se propone a la quinua como materia prima, es debido a que la producción en nuestro país es una de la más alta en el mundo junto a Perú. La quinua es uno de los cultivos más importantes en la agricultura campesina del altiplano boliviano, que se extiende por los departamentos de La Paz, Oruro y Potosí, desde el lago Titicaca hasta los salares de Coipasa y Uyuni (Soto, 2004).

3. Tecnología de Fermentaciones

La fermentación es un proceso catabólico (rompimiento de compuestos complejos a compuesto sencillos) oxidativo (intercambio de electrones) a partir del cual se obtiene un compuesto orgánico reducido. El producto final varía según el sustrato. La fermentación puede ser un proceso anaeróbico o parcialmente anaeróbico donde los carbohidratos o compuestos relacionados son oxidados para producir energía, este proceso de biotransformación en el que se llevan a cabo cambios químicos en un sustrato orgánico se desarrolla por la acción de enzimas, conocidas como catalizadores bioquímicos o biocatalizadores, sintetizadas por microorganismos (Puerta, 2010).

Un sistema fermentativo se define como el volumen de reacción limitado por un contenedor físico (biorreactor), donde se lleva a cabo la degradación biológica anaerobia, de moléculas orgánicas mediante la acción de ciertas enzimas que actúan directamente o como componentes de ciertas bacterias y levaduras. El biorreactor más simple es el matraz erlenmeyer (Hernández, 2016). En base a su alimentación, los biorreactores se pueden operar en: continuo, semicontinuo, lote y lote alimentado. En el presente trabajo se evaluó el modo operativo en lote por ser de interés en esta investigación (Sánchez, 2011).

Las fermentaciones son procesos catabólicos (ruptura de compuestos complejos a compuesto sencillos) oxidativos (intercambio de electrones) generando compuestos orgánico, como se indican en la tabla 4.

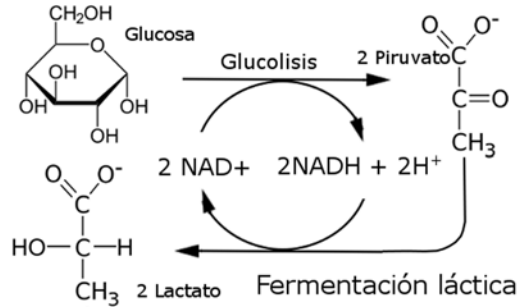
Tabla 4. Productos posibles en diferentes fermentaciones

Tipo de fermentación	Microorganismo	Producto final
Fermentación láctica	<i>Streptococcus, Lactobacillus, Bacillus</i>	Ácido láctico
Fermentación alcohólica	<i>Saccharomyces (levadura)</i>	Etanol y CO ₂
Fermentación propiónica	<i>Anaerobios</i>	Ácido propiónico Ácido acético, CO ₂ y H ₂
Fermentación formica	<i>Enterobacterias</i>	Ácido láctico, ácido fórmico Butanodiol, CO ₂ y H ₂
Fermentación butírica	<i>Clostridium</i>	Ácido butírico, Butanol, acetona, Isopropanol y CO ₂
Fermentación mixta	<i>Escherichia</i> <i>Salmonella</i>	Ácido láctico, ácido succínico Ácido acético, CO ₂ y H ₂

Adaptado de: Puerta, 2010, p. 6

La fermentación láctica, es una ruta metabólica anaeróbica que ocurre en el citosol de la célula, en la cual se oxida parcialmente la glucosa para obtener energía y ácido láctico como producto reducido, como se muestra en la figura 2.

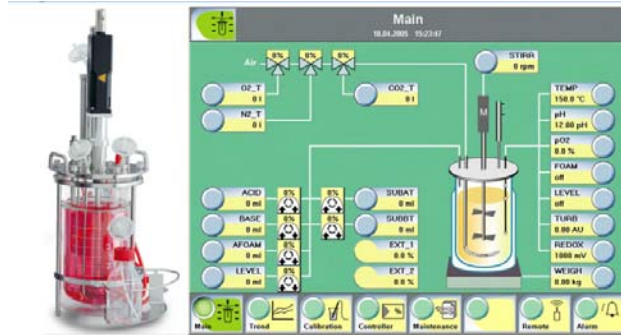
Figura 2. Ruta metabólica en la fermentación Láctica.



Extraído de: <http://commons.wikimedia.org>

Los fermentadores nos sirven para el cultivo de microorganismos y células en procesos continuos y discontinuos. El bioproceso en el presente estudio se llevó a cabo en fermentadores de 5 litros cuyas condiciones de proceso son controladas por un software, como se observa en la figura 3. Adicionalmente, el producto de la fermentación metabólica de los probióticos es el ácido láctico

Figura 3. Fermentador controlado por software



Extraído de: Sartorius, 2008

C. Marco conceptual

Probiótico: se refiere a microorganismos vivos, usados en forma de suplementos nutricionales, que mejoran el equilibrio microbiano en el intestino y tienen efectos beneficiosos sobre la salud (González, 2003). Las cepas con categoría de probiótico, dependiendo de sus características, pueden ser eficaces sobre una patología determinada u otra. Es el caso de *Lactobacillus casei sp. rhamnosus* cuya utilidad se ha demostrado en múltiples estudios para el estudio de la gastroenteritis pediátrica, diarreas asociadas a tratamiento con antibióticos (Workshop, 2009).

Prebióticos: Los prebióticos son ingredientes no digeribles de la dieta que estimulan el crecimiento o la actividad de uno o más tipos de bacterias benéficas en el colon. (Castro, 2005)

Simbióticos: Los simbióticos combinan en sus formulaciones principios prebióticos y probióticos que actúan sinérgicamente. (Castro, 2005).

Consumo de probióticos: La forma más frecuente de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos que contienen especies intestinales de lactobacilos y bifidobacterias, por los efectos benéficos adicionales a los nutritivos, estos alimentos se consideran en el grupo de los alimentos funcionales. (Palou, 2000).

Efecto de los probióticos: Una vez que los probióticos son ingeridos ocurren cambios en la micro flora intestinal que repercuten positivamente en el estado de salud del consumidor (González, 2003). *Lactobacillus casei sp. rhamnosus* cuya utilidad se ha demostrado en múltiples estudios para el estudio de la gastroenteritis pediátrica y diarreas asociadas a tratamiento de la gastroenteritis pediátrica y diarreas asociadas a tratamiento con antibióticos. (Workshop, 2009)

Medio de cultivo: Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos.

Crecimiento bacteriano: Es el aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo.

Cultivo de microorganismos: El cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada.

Quinoa: La quinoa, quínoa o kinwa (*Chenopodium quinoa*) es un pseudocereal perteneciente a la subfamilia *Chenopodioideae* de las amarantáceas.

Hidrólisis: Rompimiento de un enlace por la incorporación de uno de los iones del agua o bien de los dos en los productos de la hidrólisis (Flores, 2008), Según (Alessandra, 2012) el proceso por el cual se convierte los polímeros de biomasa a azúcares fermentables es denominado hidrólisis.

Fermentación: La fermentación es un proceso catabólico (rompimiento de compuestos complejos a compuesto sencillos) producto final varía según el sustrato, llegando a ser un proceso anaeróbico o parcialmente anaeróbico donde carbohidratos o compuestos relacionados son oxidados para producir energía. Proceso de biotransformación oxidativo (intercambio de electrones) de cuyo resultado obtenemos un compuesto orgánico.

Fermentación láctica: Es una ruta metabólica anaeróbica que ocurre en el citosol de la célula, en la cual se oxida parcialmente la glucosa para obtener energía y donde el producto de desecho es el ácido láctico.

III. Formulación de la hipótesis de investigación

El medio de cultivo formulado a base de quinoa hidrolizada, por los productos formados durante el pre-tratamiento de la quinoa, no es adecuado para el crecimiento de probióticos (Hipótesis nula).

El medio de cultivo formulado a base de quinoa hidrolizada, es adecuado para el crecimiento de probióticos previa optimización del pre-tratamiento de la quinoa y condiciones de cultivo (Hipótesis alterna).

IV. Operacionalización de las variables en estudio

Tabla 5. Operacionalización de variables en estudio

Variable	Definición conceptual	Dimensiones	Determinaciones analíticas	Indicadores
Hidrólisis	rompimiento de un enlace por la incorporación de uno de los iones del agua o bien de los dos en los productos de hidrólisis	ácido	Tiempo de hidrólisis, % sólidos totales y % ácido base temperatura de hidrólisis	1 y 2
		básico		
Crecimiento bacteriano	Aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo	Medio MRS y medio quinua	UFC/mL	3
			Densidad óptica	4
			pH	5
			Ácidos orgánicos	6
			Peso húmedo	7
			Peso seco	8

Indicadores	Tipo de variable	Unidad de medida
1. Contenido de proteína	Cuantitativa continua	g/L
2. Contenido de glucosa	Cuantitativa continua	g/L
3. Número de colonias crecidas en 24 a 48 horas de incubación a 37°C en un medio sólido	Cuantitativa discreta	UFC
4. Cantidad de luz absorbido por los microorganismos suspendidas en un medio de cultivo	Cuantitativa continua	abs
5. Cantidad de moléculas ácidas producidos en un proceso de fermentación en un tiempo determinado	Cuantitativa continua	pH
6. Cantidad de ácidos orgánicos producidos en un proceso de fermentación en un tiempo determinado	Cuantitativa continua	g/L
7. Incremento en peso materia orgánica húmedo	Cuantitativa continua	gramos
8. Incremento en peso materia orgánica seca	Cuantitativa continua	gramos

V. Diseño metodológico

A. Población en estudio, ámbito y periodo de investigación

Población en estudio: La población en estudio es *Lactobacillus casei sp. rhamnosus* y su requerimiento nutricional, compensado por la formulación de un medio de cultivo a base del grano de quinua pre-tratado.

Ámbito: El ámbito de estudio es en el área de biotecnología industrial a través del desarrollo de la tecnología de probióticos como bioproceso.

Periodo de investigación: La investigación se llevó a cabo durante la gestión 2016.

B. Tipo de investigación

Esta investigación implica el desarrollo de un *estudio analítico, longitudinal y experimental*.

Analítico, porque se estudió la variación en los componentes de los medios de cultivos formulados y su efecto en el crecimiento de los microorganismos.

Longitudinal, porque se observa la relación causa (variación de componentes) - efecto (variación en el crecimiento del probiótico en morfología celular y de colonia).

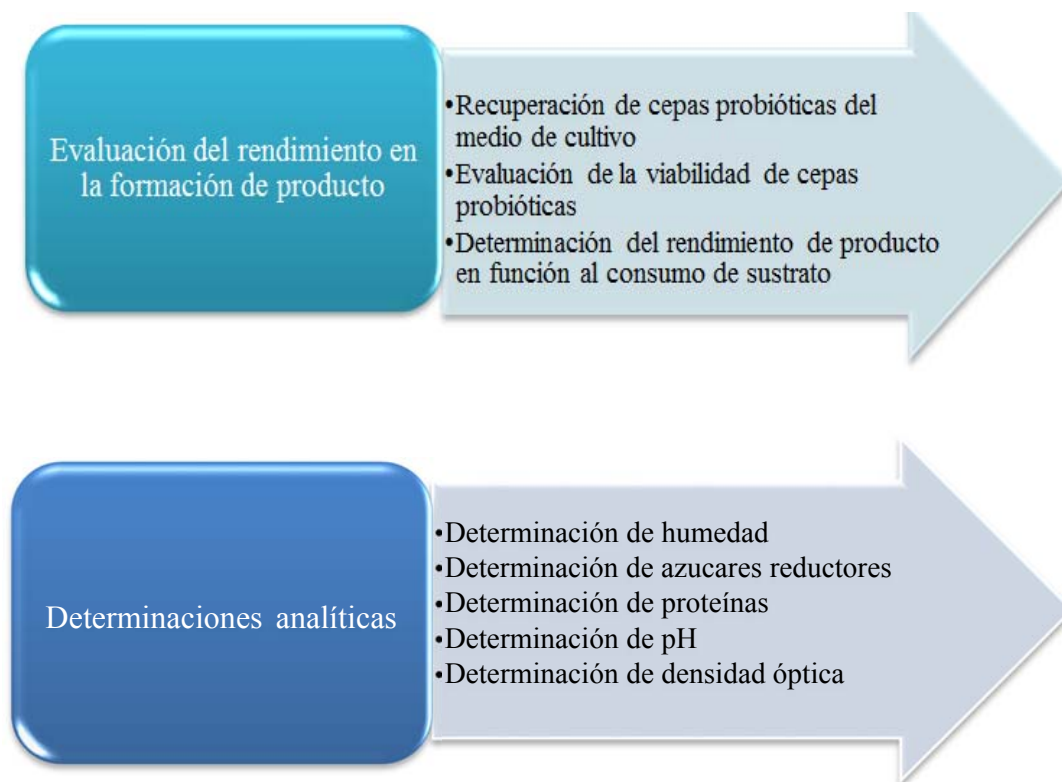
Experimental, por qué consiste en la manipulación de una o más variable durante el experimento no comprobado, en condiciones rigurosamente controladas, con el fin de describir de qué modo o por qué causa se produce una mayor cantidad de biomasa.

C. Materiales y métodos

El escenario del presente trabajo de investigación es resumido en la Fig. 4, en la cual se describe las principales etapas desarrolladas como parte experimental.

Figura 4. Escenario del presente trabajo de investigación





1. Obtención y acondicionamiento de la quinua como materia prima

Esta sección refiere al procesamiento de la materia prima (grano de quinua), hasta la obtención de harina de quinua.

a) *Adquisición de la materia prima*

La materia prima, 12.5Kg aprox., empleada en este estudio correspondió a grano de quinua crudo de baja calidad, adquirido en el mercado local 12 de Octubre, de El Alto - La Paz, Bolivia.

b) *Secado solar y molienda de la materia prima*

El grano de quinua fue sometido a secado solar como se describe en (Hames, 2008). La materia prima 12.5 Kg extendida con un espesor de 0.5cm, fue secada al aire libre sobre una superficie plana (1.2 x 1.2 m) por un tiempo de 5 horas, hasta registrar un porcentaje de humedad menor a 10%.

El grano de quinua secado fue molido de acuerdo al procedimiento descrito por (Hames, 2008 y Da Silva, 2010) en un molino industrial de cereales, hasta obtener harina de quinua con partículas de tamaño homogéneo (10 a 20 μ m.).

2. Procesamiento de la materia prima

Esta sección refiere al procesamiento de la harina de quinua, hasta la obtención optimizada del sustrato para el proceso de la fermentación.

a) *Pre tratamiento fisicoquímico de la materia prima*

Proceso por el cual, la materia prima fue convertida en un sustrato utilizable para su empleo en la producción de probióticos.

(1) Hidrolisis fisicoquímica de la materia prima

4.3g de harina de quinua, con un contenido de sólidos totales (ST) del 4%, fueron suspendidos en 100mL de NaOH, H₂SO₄, H₃PO₄ o HCl al 1% (p/v). Esta suspensión fue sometida a 121°C, 16PSI por 15 min (Autoclave, ALL AMERICAN / 25X) de acuerdo a los protocolos descritos por (Badshah, 2012; Alessandra, 2012 y Talebnia, 2010). La eficiencia del pre-tratamiento fisicoquímico empleando diferentes ácidos o álcalis fue evaluada en el hidrolizado obtenido a través de la determinación azúcares reductores y proteínas solubles liberados durante el proceso.

b) *Optimización del pretratamiento ácido de la materia prima*

(1) Optimización del tiempo de pretratamiento fisicoquímico.

Debido a que el pretratamiento fisicoquímico de la harina de quinua empleando H₂SO₄ (1%) fue el que permitió la liberación de un mayor contenido de carbohidratos y proteínas solubles (datos mostrados en la sección de resultados), este proceso fue sujeto a optimización. Para este fin, se realizó la hidrólisis de la harina de quinua (ST= 4%) con H₂SO₄ al 1%, a tiempos variados de 15, 20 y 25 minutos de exposición a 121°C, 16psi de presión, (Onyango, 2006). Los resultados son expresados en cantidad de azúcares reductores y proteínas liberadas a cada tiempo de exposición a (121°C, 16PSI de presión).

(2) Optimización de la concentración de materia prima para el pretratamiento fisicoquímico

Se hidrolizó harina de quinua al 8% de ST con H₂SO₄ al 1% a 121°C, 16PSI presión, por 15 minutos, utilizando como control harina de quinua al 4% de ST (como fue descrito en la sección previa) sometida a las mismas condiciones de presión, tiempo y temperatura. El efecto de la concentración de la materia prima (4 u 8% ST) en la liberación de azúcares reductores y proteínas solubles fue evaluado a través de un análisis *t de student*, que permitió seleccionar la mejor condición para pretratamiento.

(3) Neutralización, centrifugación y Almacenamiento del hidrolizado.

Los hidrolizados obtenidos fueron neutralizados con Ca (OH)₂ en sustancia o al 1% (p/v) hasta alcanzar un pH 7.0 ±0.1 como se indican en (Barbosa, 1992 y Huang, 2009). Se sometió al hidrolizado neutralizado a 3500rpm por 10 min, cuyo sobrenadante fue filtrado al vacío a través de una membrana de 0.45um de diametro (Huang, 2009 y Da Silva, 2010). El sobrenadante neutralizado y filtrado es denominado sustrato y fue almacenado a 4 °C o -20 °C, según su utilización, para la formulación de medios de cultivo para microorganismos probióticos (Huang, 2009).

3. Conversión biotecnológica para la producción de cepas probióticas.

La conversión biotecnológica refiere al proceso de fermentación por el cual se obtienen células probióticas.

a) Activación, control axénico, caracterización y conservación de cepas probióticas

Cultivo de la cepa probiótica empleada en el presente trabajo.

(1) Activación y control axénico del inoculo.

Un criopreservado de *Lactobacillus casei* sp. *rhamnosus* Döderlein (LCR35) fue activado en medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) suplementado con 0.5g/L de L-cisteína-HCl. Esta cepa fue reactivada y sub-cultivada rutinariamente en caldo MRS

(Popova, 2012; Mogha, 2016; Mani-López, 2014) en condiciones anaerobias con atmósfera de N₂ por 24 horas a 37°C (Saarela, 2005 y Sanchez, 2007).

(2) Caracterización de la cepa probiótica

Se evaluó las características macroscópicas y microscópicas de *L. casei*. La caracterización macroscópica consistió en denotar la morfología típica de colonias de *L. casei* cultivadas en MRS agar. Las características microscópicas se evaluaron mediante tinción Gram, observada en un microscopio OLYMPUS (CX31). Otros parámetros, como acidificación del medio, turbidez y número de bacterias viables fueron evaluados a las 24 h. de cultivo, para este fin se cultivó un inóculo de *L. casei* (3%, v/v) en 60mL de caldo MRS por 24 h. a 37°C en condiciones anaerobias y aerobias, evaluando la reducción de pH, densidad óptica a 540nm (DO₅₄₀), y el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) a través de recuento en placa MRS agar (Sanchez, 2007).

(3) Conservación de la cepa probiótica

Para la preservación de *Lactobacillus casei sp. rhamnosus* fue empleada la técnica de criopreservación en glicerol (Avila, 2006; Aguilar, 2010). 3mL de un cultivo activo de *L. casei* (18 h.) en caldo MRS, fue centrifugado (3000rpm durante 10 min.) y resuspendido en 0.75mL de caldo MRS fresco y 0.25mL de glicerol, esta mezcla fue almacenada a -80°C.

b) Diseño, formulación y optimización de medios de cultivo

En base a la quinua hidrolizada, se formularon medios de cultivo similares en composición al medio comercial control MRS (Man, 1960), el cual contiene como fuente de proteínas en g/L: 10 caseína peptona, 10 extracto de carne, 5 extracto de levadura, como fuente de carbohidratos 20 g/L α -D-glucosa (glucosa comercial) adicionado con micronutrientes (1X) en g/L: 2 K₂HP0₄, 5 acetato de sodio, 2 citrato de sodio, 0.2 MgSO₄-7H₂O, 0.05 MnSO₄ y 0.5 L-cisteína, 1mL tween 80 ajustados a un pH 7.0±0.1. Para la formulación de los diferentes medios de cultivo descritos abajo, se utilizó medio base MRS conteniendo micronutrientes y exento de fuente de proteínas y carbohidratos, las cuales fueron reemplazadas por la adición del hidrolizado de quinua rico en proteínas y azúcares reductores. Como componente mayoritario de los azúcares reductores, se consideró a la glucosa denominándola q-glucosa, la cual es liberada durante el proceso de pretratamiento de la quinua.

El efecto del medio formulado a base de hidrolizado de quinua sobre el crecimiento probiótico fue evaluado bajo los siguientes parámetros: pH, DO₅₄₀, recuento de células

probióticas viables, consumo de glucosa y proteínas. A 0, 24 y 48 horas de incubación después del inóculo del 3% (v/v) de un cultivo fresco de 18 horas de crecimiento en caldo MRS comercial iniciando con un pH 7.0 ± 0.1 .

(1) Efecto de la concentración del hidrolizado sobre la producción de células probióticas

Se estudió el efecto de la concentración de hidrolizado en la producción de células probióticas a través del test de la concentración mínima inhibitoria (MIC), para evaluar la afectación del crecimiento de *L. casei* por componentes tóxicos presentes en el hidrolizado que pudieron generarse durante el pretratamiento de la quinua. Para este fin, se formularon 6 medios de cultivo líquidos en base a quinua hidrolizada, para obtener cada medio de cultivo se utilizaron 2 soluciones como se muestra en la Tabla 6: solución 1: hidrolizado de quinua al 4% ST, solución 2: glucosa comercial y micronutrientes. La solución 2, fue disuelta en agua destilada y esterilizada por separado previamente a 121°C , 16PSI por 15 min y una vez teniendo el medio se ajustó a pH 7.0 ± 0.1 .

Tabla 6. Concentraciones de los componentes en los medios formulados para la determinación del efecto de la concentración del hidrolizado sobre la producción de células probióticas.

Medio	Solución 1		Solución 2		Glucosa total (g/L)
	Hidrolizado (%)	q-glucosa (g/L)	Micronutrientes (X)	Glucosa comercial (g/L)	
1	0	0	1	20	20
2	20	4	1	16	20
3	40	8	1	12	20
4	60	12	1	8	20
5	80	16	1	4	20
6	100	20	1	0	20

Se inoculó el 3% (v/v) de un cultivo activo de *L. casei* de 18 horas de crecimiento en caldo MRS comercial, en cada uno de los medios formulados, los cuales se incubaron a 37°C en condiciones anaerobias y se evaluaron los parámetros indicados en la sección previa en función a la producción de células probióticas viables, q-glucosa (glucosa provenientes del hidrolizado de quinua) y/o glucosa comercial, q-proteínas (proteína provenientes del hidrolizado de quinua) y/o proteína comercial (caseína peptona, extracto de carne y extracto de levadura provenientes del medio MRS comercial).

(2) Efecto de la adición de levadura de cerveza sobre la producción de células probióticas

Se formuló un medio de cultivo en base al hidrolizado de quinua, conteniendo 20g/L de q-glucosa suplementado con 2.5 ± 0.1 (1X) y 5.0 ± 0.1 (2X) g/L de levadura de cerveza (marca Maprial), como fuente adicional de proteínas (medio q-lev). Los medios se prepararon a partir de 2 soluciones: la primera de micronutrientes (1X) y levadura de cerveza 1X ó 2X, y la segunda de hidrolizado de quinua 4% ST. Para luego mezclarlas y obtener el medio q-lev1 con 1X de micronutrientes, 1X de levadura de cerveza y 20 g/L q-glucosa ó q-lev2 con 1X de micronutrientes, 2X de levadura de cerveza y 20 g/L q-glucosa, ambos medios fueron ajustados a pH 7.0 ± 0.1 . La levadura de cerveza y los micronutrientes fueron disueltos en agua destilada y sometidos a 121°C, 16PSI por 15min por separado antes del mezclado con el hidrolizado. Se inoculo el 3% (v/v) de un cultivo activo de *L. casei* de 18 horas de crecimiento en caldo MRS comercial, en los medios formulados y se evaluaron los parámetros anteriormente mencionados en la sección b).

(3) Evaluación del efecto del pH sobre la producción de células probióticas

Se empleó el medio formulado q-lev1, que contenía aprox. 20 g/L de q-glucosa, 0.5 g/L de levadura de cerveza y micronutrientes, el cual fue ajustado a pH variables de 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Todos los experimentos en los medios formulados se realizaron empleando medio MRS control (composición indicada al inicio) el cual fue preparado ingrediente por ingrediente en agua destilada y esterilizada a 121°C por 15 min., 16PSI de presión, ajustando el pH final a 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Se inoculo el 3% (v/v) de un cultivo activo de *L. casei* y se evaluó midiendo el pH, DO₅₄₀, viabilidad, consumo de glucosa y proteínas.

c) Producción de células probióticas a mayor escala

Cultivo de células probióticas a mayor escala fue realizado en 2 fermentadores de 5L (Biostat A plus, marca SARTORIUS STEDIM), con un volumen de trabajo de 1L.

El fermentador empleado consta de un torre de control, bomba de sustrato, compresora, filtro eliminador de C, Vaso de 5 L que cuenta con una tapa en el cual están adaptadas: Motor, Sondas (termostato, pH, pO₂, refrigerante, gasificador y antiespumante), terminales para adaptar mediante conectores a frascos Boeco conteniendo soluciones de (antiespumante, ácido, base), además se adapta un manto atemperador, soporte metálico donde aloja al vaso y una computadora portátil donde registra los valores de pH, pO₂,

antiespumante, temperatura, también es posible adaptar tanque de gases como CO₂, N₂ y finalmente el equipo se conecta a un estabilizador.

Cultivo batch, fue utilizado como modo operacional de fermentación. Se procesó el medio experimental formulado (medio q-lev1) en uno de los fermentadores, y medio MRS como control en el segundo fermentador.

Se realizaron tres experimentos de fermentación empleando medio q-lev1 previamente estéril (cuya forma de preparación fue descrita en la sección (2)), el cual fue vertido en los fermentadores previamente esterilizados a 121°C por 15 min., 16 psi de presión, e inoculados con 3% (v/v) de cultivo activo de *L. casei* en cada medio. Posteriormente, se monitorearon el pH, DO₅₄₀, viabilidad, consumo de glucosa y proteína, a intervalos de 2 a 3 h (Saarela, 2005). A pesar de que en los experimentos de fermentación realizados a escala de 1L, se empleó el medio optimizado q-lev1, las condiciones de cultivo (anaerobiosis, aerobiosis, fermentación a pH constante) fueron evaluadas para determinar su efecto en el rendimiento de células probióticas.

(1) Fermentación anaerobia a escala de 1L empleando medio de cultivo optimizado

El medio de cultivo q-lev1, fue esterilizado y vertido en el fermentador 1 (previamente esterilizado), cuya atmosfera gaseosa fue saturada con N₂ gaseoso libre de O₂ por 5 min. El cual fue inoculado como fue descrito anteriormente, y sometido a una agitación de 80 rpm, a 37°C por aproximadamente 30 h. Se monitorearon los parámetros descritos hasta alcanzar un pH constante, como indicativo de que el cultivo probiótico alcanzó fase estacionaria “steadystate”. Se evaluaron las mismas condiciones en medio MRS, en el segundo fermentador, como control del experimento.

(2) Fermentación aerobia a escala de 1L empleando medio de cultivo optimizado

El medio de cultivo q-lev1, fue esterilizado y vertido en el fermentador 1 (previamente esterilizado), cuya atmosfera gaseosa fue conservada. El fermentador fue inoculado como fue descrito anteriormente, y sometido a una agitación de 80 rpm, a 37°C por aproximadamente 30 h. Se monitorearon los parámetros descritos hasta alcanzar un pH constante, como indicativo de que el cultivo probiótico alcanzó fase estacionaria “steadystate”. Se evaluaron las mismas condiciones en medio MRS con aire como atmósfera gaseosa, en el segundo fermentador, como control del experimento.

(3) Fermentación anaerobia a pH constante y escala de 1L empleando medio de cultivo optimizado

El medio de cultivo q-lev1, fue esterilizado y vertido en el fermentador 1 (previamente esterilizado), cuya atmosfera gaseosa fue saturada con N₂ gaseoso libre de O₂ por 5 min., fue inoculado como se describió anteriormente, y sometido a una agitación de 80 rpm, a 37°C por aproximadamente 21 h. El pH fue sometido a un ajuste constante y automático de 7.0±0.1 con NaOH (1N) (Mozzi, 2003) a lo largo de la fermentación. Se empleó también una velocidad de agitación de 80rpm, a 37°C. Se monitorearon los parámetros descritos hasta alcanzar la fase estacionaria “steadystate” del cultivo probiótico. Se evaluaron las mismas condiciones en medio MRS, en el segundo fermentador con pH ajustado automáticamente, como control del experimento.

4. Evaluación del rendimiento en la formación de producto

En esta sección evaluamos la relación del producto formado ‘células probióticas’ con respecto al sustrato consumido de origen comercial o formulado.

a) Recuperación de cepas probióticas del medio de cultivo

Para la recuperación de células probióticas a partir de los cultivos, 1mL del cultivo fue centrifugado a 3000rpm por 10 minutos, descartando el sobrenadante y re-suspendiendo las células en el mismo volumen de tampón fosfato 2mM (pH 7.0±0.1), este procedimiento fue repetido 3 veces (Perdigon, 1999; Mani-López, 2014). El resultado fue una solución de células probióticas (células lavadas), libre de componentes del medio y productos de la fermentación del cultivo.

b) Evaluación de la viabilidad de células probióticas

A partir de una suspensión de células lavadas de *L. casei*, se realizaron diluciones de 1 a 100 millones con solución estéril fisiológica o tampón fosfato 2mM (pH 7.0±0.1). 100uL de cada dilución fue sembrado en medio MRS sólido, por siembra en superficie con asa de drigalsky, e incubado a 37°C por 48 h., en un ambiente anaerobio (Cartes, 2005). Posteriormente, se realizó un recuento de colonias, células aptas y viables, para determinar las unidades formadoras de colonias por mL de medio (UFC/mL).

c) Determinación del rendimiento de producto en función al consumo de sustrato

Se determinó la relación de biomasa formada en función a la concentración de glucosa consumida, para cada uno de los experimentos incluyendo la formulación de medios y el respaldo del proceso en diferentes condiciones.

5. Determinaciones analíticas

a) *Determinación de humedad*

La determinación de humedad se realizó de acuerdo a la técnica descrita por (Sluiter, 2008). 1g de muestra, grano de quinua o harina de quinua, fue expuesto por 4h. a $105 \pm 3^\circ\text{C}$. La diferencia del peso final con respecto al peso inicial correspondió al contenido de humedad presente en la muestra.

b) *Determinación de Azúcares reductores*

La concentración de azúcares reductores presentes en las muestras, hidrolizado o medios de cultivo, fue determinada por la técnica del ácido 3,5 di-nitro salicílico (DNS) y/o por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). 0.5mL para la técnica de DNS y 1.5mL de muestra para la técnica de HPLC, fue filtrada a través de una membrana de 0.45 μm para su empleo.

Para la técnica de DNS (Bello, 2006), 0.5mL de muestra se adicionaron a 0.5mL de reactivo DNS (la composición y preparación del reactivo DNS se hallan descritas en Anexo 1). Esta mezcla fue sometida a 90°C por 5min., y enfriada a temperatura ambiente. La absorbancia a 540nm de longitud de onda fue registrada en espectrofotómetro de microplacas (Epoch-Biotek). Se emplearon como estándares soluciones de D (+)-glucosa anhidro (Riedel de Haën) de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 g/L tratadas en las mismas condiciones.

Para la determinación de la concentración de glucosa por la técnica de HPLC descrita por (Ballesteros, 2004; Da Silva, 2010; Lu, 2009), se empleó un Cromatógrafo de Líquidos (Marca Shimadzu) equipado con un detector de índice de refracción (RID-10A), una columna de intercambio iónico HPX-87P (BioRad, Aminex^R) a 80°C y agua deionizada como eluyente a un flujo de 0,6 mL/min. Se emplearon como estándares soluciones de D (+)-glucosa anhidro (Riedel de Haen) de 0, 0.5, 1, 1.33 y 2 g/L, analizadas en las mismas condiciones

c) *Determinación de proteínas solubles*

Se determinó la concentración de proteínas solubles por el método de Biuret como se indican en (Koch, 1971; Lubran, 1978; Georgiova, 2009). 0.1mL de muestra previamente filtrada a través de una membrana de 0.45 μm fue mezclada con 1mL de reactivo de Biuret (Anexo 2). Se dejó reposar esta mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente, para finalmente registrar la absorbancia a 540nm de longitud de

onda. Se emplearon soluciones de albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich) de 0, 5, 10, 15 y 20 g/L tratadas en las mismas condiciones.

d) Determinación de pH

La determinación de pH se realizó con un pH-metro (Sartorius), previamente calibrado con buffers de pH 4, 7 y 10.

e) Determinación de la densidad óptica

El grado de turbidez de las muestras fue determinado por espectrofotometría midiendo la densidad óptica a 540nm en contra de agua destilada como blanco.

D. Procesamiento de los datos

1. Recolección

Los datos se recopilaron en el transcurso o al final de cada prueba según lo requerido, los mismos fueron transcritos en la bitácora de laboratorio y tablas Excel.

2. Elaboración

Se elaboraron tablas, cuadros y gráficas a partir de los datos obtenidos en los experimentos realizados durante la investigación, utilizando el programa GraphPad, prisma versión 6.0 y Microsoft office Excel 2007.

3. Análisis

Los datos se analizaron mediante *t-student* pareado usando el programa GraphPad, prisma versión 6.0 y Microsoft office Excel 2007. Diferencias significativas entre las medias se determinaron utilizando la “prueba de Fisher” prueba de diferencia mínima significativa. Diferencias significativas se determinaron en $\alpha = 0.05$. Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

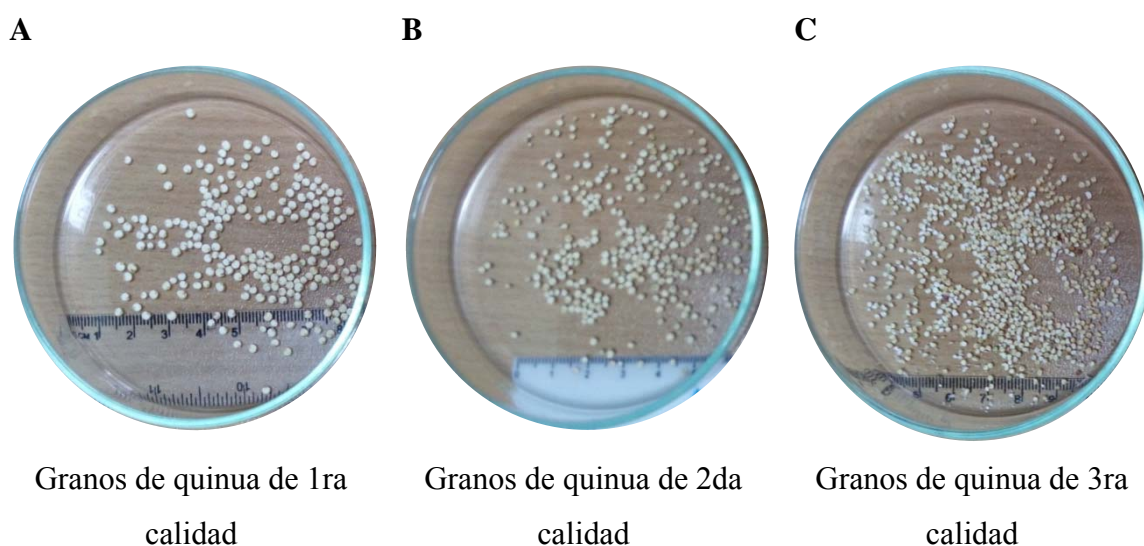
VI. Resultados y discusión

A. Obtención y acondicionamiento de la quinua como materia prima

El grano de quinua se caracteriza por ser un alimento ancestral altamente nutritivo, con contenido rico en proteínas y almidón, con un contenido íntegro de aminoácidos esenciales y una amplia gama de vitaminas y minerales (Oelke, 1992). El grano de quinua se presenta en diferentes variedades que podemos encontrar en los mercados locales de nuestra ciudad, entre las variedades más abundantes se encuentran la quinua de 1ra calidad (grano perlado, grano de oro o quinua real) que alcanza hasta un tamaño muy uniforme de 3mm (Figura 5 A), la quinua de 2da calidad la cual contiene granos

que varían entre 1.5 a 2mm de diámetro (Figura 5 B) y quinua de 3ra calidad con 1 a 2mm de diámetro que se caracteriza por poseer un conjunto de impurezas entre ellos pequeños trozos de bagazos de quinua (Figura 5 C) según Oelke (1992). En el presente trabajo se empleó como materia prima la quinua de segunda calidad, la quinua como objeto de estudio en la presente investigación fue seleccionado debido a que es despreciado por la sociedad por su tamaño y su alto contenido en saponina (amargo de la quinua) y este tipo de grano de quinua es comercializado en los mercados locales a precios bajos, además es empleado para producir harina y alimento para animales (Thuresson, 2015)

Figura 5. Tipos y tamaños de quinua.

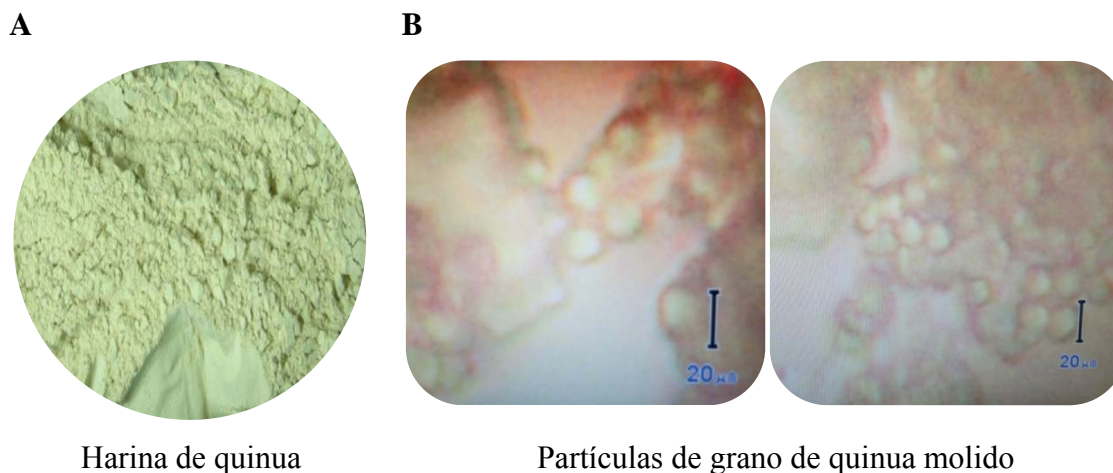


1. Secado solar y molienda de la materia prima

El grano de quinua adquirido en el mercado local, poseía inicialmente un contenido de humedad del $27.0 \pm 0.3\%$, determinado por técnicas analíticas descritas en la sección de metodología. Un alto contenido de humedad en la materia prima conduce al desarrollo, de microorganismos no deseados, que contaminan y disminuyen la calidad del producto (Finn, 2013). Debido a esta condición el grano empleado fue sometido a secado solar hasta reducir su contenido de humedad a un valor de $7.0 \pm 0.1\%$, obteniendo de esta forma una materia prima con un contenido de $93.3 \pm 0.4\%$ de ST. Según varios autores (Hammerly, 1976; Pajarito, 2005; Rodriguez-Sandoval, 2012; Ranhotra, 1993; Thuresson, 2015) la humedad del grano de quinua de exportación varía alrededor del 7-12% aprox., lo cual garantiza la estabilidad del grano y harina de quinua, exentos de contaminación microbiana.

Después de llevar a cabo el secado solar, la materia prima fue sometida a una molienda hasta obtener harina de quinua constituida por partículas de un tamaño de 10 a 20 μ m, observadas con un microscopio óptico (con una magnificación de 1000x) (figura 6 B).

Figura 6. (A) Harina de quinua y (B) partículas de harina de quinua (con una magnificación de 1000x).



B. Procesamiento de la materia prima

1. Pretratamiento fisicoquímico de la materia prima

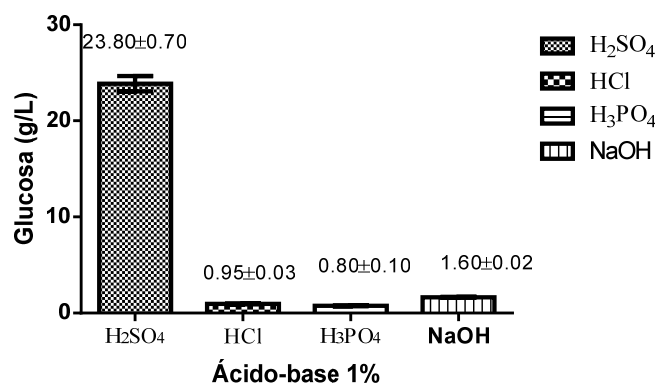
La composición aproximada del grano de quinua en base seca varía de: 75-81% de carbohidratos, 11-14% de proteínas, 5-7% de grasa cruda, 3-4% de cenizas, y 4-5% de fibra cruda (Jancurová, 2009; Doyle, 2015). El principal constituyente del grano de quinua es el almidón que representa entre el 52-60% del peso del grano (Valencia-Chamorro, 2003). El almidón está constituido por dos compuestos de diferente estructura: la amilosa formada por α -D-glucopiranosas (normalmente de 300 a 3000 unidades de glucosa) que constituye del 25 al 30 % del almidón, y la amilopectina que representa el 70-75 % restante, también formada por α -D-glucopiranosas conformando una cadena altamente ramificada (Amador, 2016).

La conversión de la biomasa amilácea, como la harina de quinua, para liberar azúcares fermentables, implica la hidrólisis del almidón (Moshi, 2013). El pretratamiento fisicoquímico de la harina de quinua consistió en: la licuefacción del almidón en una primera etapa seguida de la hidrólisis de la amilosa y la amilopectina a su unidad estructural, la glucosa. Los ácidos sulfúrico y clorhídrico son catalizadores de uso común para la hidrólisis de la biomasa vegetal (Lenihan, 2010) con el objetivo de liberar la glucosa para ser empleada como fuente de carbono, para el cultivo de

microorganismos con diferentes aplicaciones. En el presente estudio, se llevó a cabo la hidrólisis de la harina de quinua con la adición de ácido o base al medio acuoso de suspensión, para obtener moléculas de glucosa solubles que puedan ser dispuestas como fuente de carbono para el metabolismo de *L. casei*.

La concentración de glucosa liberada en los procesos de hidrólisis de harina de quinua (4%, p/v de ST) fue determinada, para cada una de las condiciones experimentales con diferentes agentes químicos al 1% (v/v): H₂SO₄, NaOH, HCl y H₃PO₄. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7. La condición que permite la liberación de una mayor concentración de glucosa a partir de harina de quinua fue obtenida empleando H₂SO₄ (1%, v/v), la cual fue de 23.9±0.8 g/L. Otras condiciones, como NaOH permitió la liberación de 1.60±0.02 g/L de glucosa, HCl liberó 0.95±0.03g/L de glucosa y H₃PO₄ permitió la liberación de 0.77±0.04 g/L de glucosa.

Figura 7. Contenido de glucosa (g/L±DS) en hidrolizados de harina de quinua al 4% (p/v) ST con H₂SO₄, NaOH, HCl y H₃PO₄ al 1% (v/v).



El rendimiento de la liberación de glucosa a partir de harina de quinua fue estimado de acuerdo a lo descrito por Holm (1986) y Moshi (2013). El rendimiento obtenido en este estudio fue de 80.2% de glucosa liberada a partir de quinua de harina seca empleando H₂SO₄ al 1% (v/v). Otros estudios reportan rendimientos de alrededor de 90% (Verardi & De Bari, 2012) en hidrolizados de grano de maíz y bagazo de caña de azúcar. Por lo cual, con los resultados obtenidos se sugiere que el método estandarizado del hidrolizado de harina de quinua, fue al (4% p/v de ST) con H₂SO₄ (1%, v/v), con el cual se obtuvo una mayor liberación de azúcares reductores.

El efecto de la hidrólisis ácida de la biomasa vegetal puede conducir a la formación o liberación de metabolitos inhibitorios altamente tóxicos (Lenihan, 2010; Valencia-Chomorro, 2003; Badshah M., 2012; Alessandra V., 2012; Huang, 2009) presentes en los hidrolizados, que pueden afectar el crecimiento de *L. casei*, entre ellos podemos

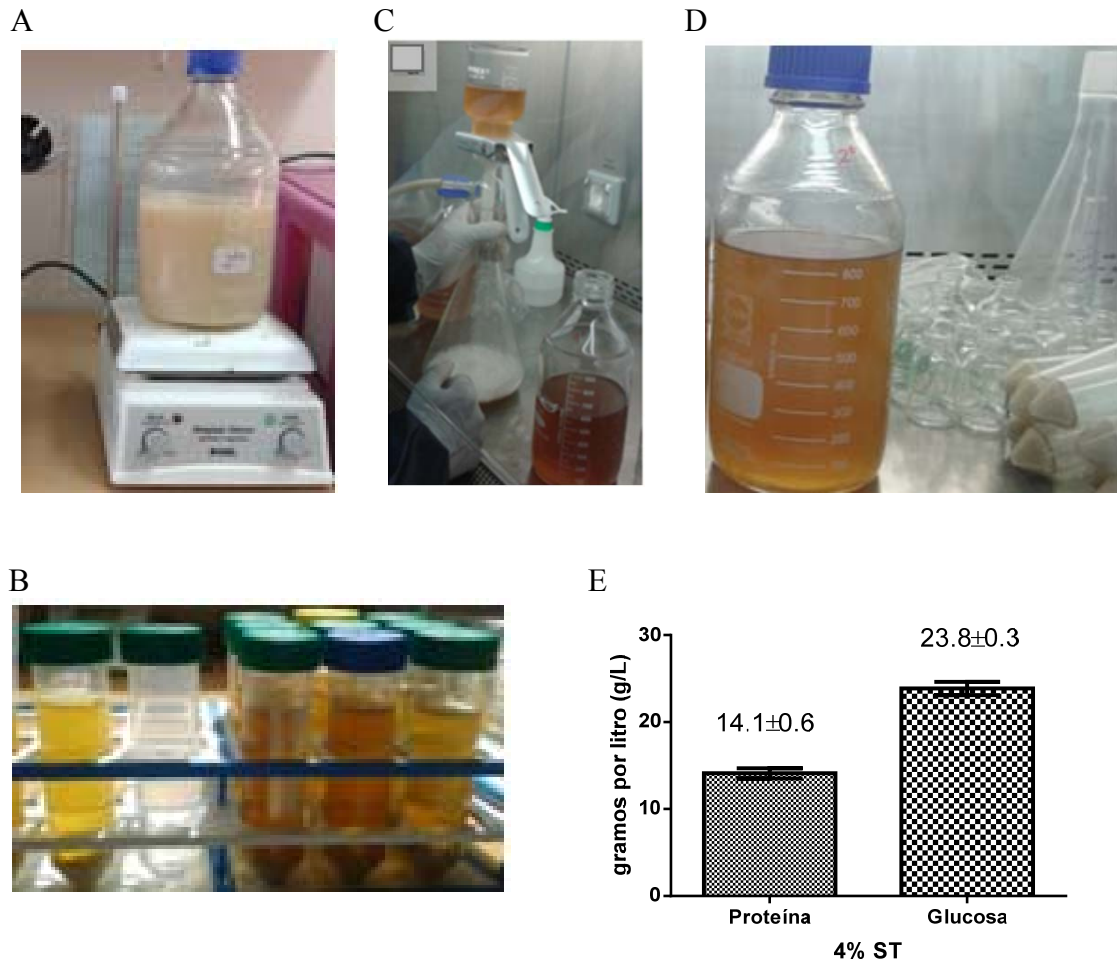
mencionar la presencia de **saponinas** (alcaloides tóxicos que crean un sabor amargo del grano) liberadas a partir de grano de quinua. La cantidad de saponinas presentes depende de la variedad de quinua (Urquizo, 2016), las cuales se hallan en una concentración de 0.1-5% (Valencia-Chamorro, 2003). En el presente estudio no se evaluó este efecto, sin embargo, fue evidenciado en estudios previos con *L. acidophilus* observando que no existió diferencia significativa en el crecimiento de esta bacteria ácido láctica en medio de cultivo sin saponina con respecto al cultivo en medio con saponina (datos no mostrados), lo que implica que la saponinas no tendrían un efecto nocivo sobre bacterias de este género. Otros estudios no reportan el empleo de quinua libre de saponinas (Thuresson, 2015; Urquizo, 2016) pero si mencionan el efecto negativo de las saponinas en la harina de quinua. En el proceso de hidrólisis ácida, empleando ácido sulfúrico en concentraciones de 1-10%, a una temperatura moderada (en el rango de 100-150°C) además de liberar glucosa y proteínas solubles, se forman otros productos secundarios que pueden afectar al crecimiento bacteriano, como el **furfural** un producto de deshidratación de pentosas y el **hidroximetilfurfural** HMF producto de la deshidratación de las hexosas (Lenihan, 2010). En el presente estudio no se realizaron determinaciones analíticas para la cuantificación de estos compuestos, sin embargo si existieron no resultaron ser nocivos para *L. casei* (resultados discutidos en la sección posterior). Otros estudios reportan la formación de estos compuestos liberados después de un pretratamiento ácido de otro tipo de biomasa, bagazo de caña, paja de trigo, y otros (Badshah M., 2012; Alessandra V., 2012; Huang, 2009). Por lo cual, sería interesante evaluar la formación de estos compuestos a partir del pretratamiento ácido de la harina de quinua en estas condiciones, ya que hasta la actualidad no se han reportado estudios con este tipo particular de materia prima.

Para el proceso de hidrólisis de la harina de quinua se realizó una suspensión de partículas de harina quinua al 4% (p/v) ST en una solución de H₂SO₄ al 1% (v/v) la cual fue agitada (de 100 a 1000 rpm) para su homogenización, y se obtuvo una suspensión lechosa como se muestra en la figura 8 A. Se procedió al pretratamiento en condiciones de 121°C y 16PSI por 15 min., condiciones similares a lo realizado en bagazo de caña de azúcar (SCB) por Badshah M. (2012). Posteriormente, el hidrolizado fue enfriado a temperatura ambiente y neutralizado con Ca(OH)₂, seguidamente se centrifugo y se obtuvo una solución con una fracción soluble de color amarillo paja y un precipitado de color café, como se muestra en la figura 8 B. El sobrenadante obtenido fue filtrado al vacío con una membrana de 0.45 µm de porosidad, como se muestra en la figura 8 C. Finalmente, se obtuvo el hidrolizado para su empleo en la formulación de medios de cultivo para *L. casei*. El hidrolizado obtenido presentó un color amarillo paja con un pH de 1.6±0.2, el cual fue procesado para su utilización. En general, se requieren las siguientes operaciones (en esta secuencia): concentración, desintoxicación, neutralización y suplementación con nutrientes según Lenihan (2010). Con el hidrolizado obtenido, debido a que poseía alta concentración de glucosa soluble, no fue

necesaria su concentración. Esta solución fue caracterizada por su contenido de glucosa y proteínas solubles, como se muestra en la figura 8E, y se obtuvo 23.9 ± 0.8 g/L de glucosa y 14.1 ± 0.6 g/L de proteína. Otros estudios, confirman que el tratamiento con ácido de una concentración superior a 1% permite mayor liberación de azúcares solubles (Badshah M. , 2012).

Así mismo, el hidrolizado obtenido no limitó el crecimiento de *L.casei* (como se describe posteriormente) por lo que no fue necesario una desintoxicación previa. Sin embargo, el hidrolizado fue suplementado con micronutrientes como se describió en la sección de materiales y métodos para su formulación como medio de cultivo.

Figura 8. Tratamiento del hidrolizado de la quinua, para la formulación de los medios de cultivos. (A) Suspensión de harina de quinua en H_2SO_4 1% (v/v) estando agitado, (B) Hidrolizado después de ser centrifugado, (C) Filtrado al vacío del hidrolizado, (D) Hidrolizado ya neutralizado y filtrado (E) Contenido de proteínas y glucosa soluble en un hidrolizado de quinua al 4% (p/v) ST con H_2SO_4 al 1% (v/v)



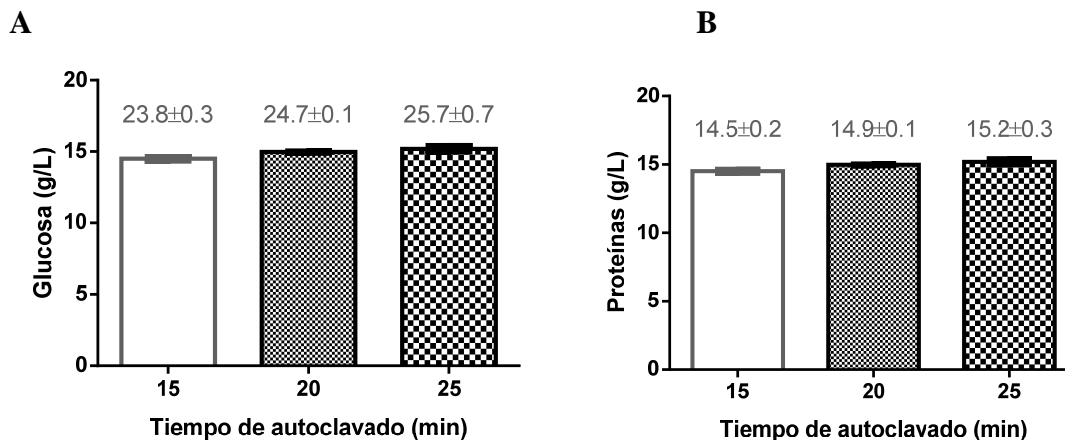
2. Optimización del pretratamiento ácido de la materia prima

a) Optimización del tiempo de pretratamiento ácido.

Durante el pretratamiento fisicoquímico de la harina de quinua (4%, p/v de ST) empleando H₂SO₄ (1%, v/v), se evaluó el rendimiento en la liberación de glucosa y proteínas solubles, sometiendo a la harina de quinua a tiempos de hidrólisis de 15, 20 y 25 min. a 121°C y 16PSI. Los mismos permitieron la liberación de 23.8±0.3 g/L de glucosa y 14.5±0.2 g. de proteínas (15 min de pretratamiento), 24.7±0.1 g/L de glucosa y 14.9±0.1 g de proteína (20 min de pretratamiento) y 25.7±0.7 g de glucosa y 15.2±0.3 g de proteína (25 min de pretratamiento) como se muestra en la Fig. 9.

Un análisis de *t de student* pareado reveló que los diferentes tiempos de pretratamiento de la harina de quinua (4%, p/v) ST con H₂SO₄ (1%, v/v), no muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a la liberación de glucosa y proteínas solubles. Por lo cual, se decidió continuar el pretratamiento por un periodo de 15 min. a 121°C y 16PSI. Proponiendo un pretratamiento ácido sencillo, que no involucre periodos prolongados de operación que podrían incrementar gastos innecesarios. Otros estudios reportan, que para el pretratamiento de bagazo de caña de azúcar a condiciones de 121°C por 15 min a una concentración de 10% de ST con H₂SO₄ mayor al 1% es óptimo para la liberación de azúcares reductores, como señala Badshah M. (2012). Además tomando en cuenta que a menor tiempo de exposición a condiciones drásticas de temperatura y presión, existe menor posibilidad de que se formen inhibidores que afecten el crecimiento bacteriano, como el furfural o HMF (hidroximetilfurfural) Lenihan (2010). Adicionalmente, se evita la formación de complejos entre la glucosa y las proteínas liberadas (reacción de Maillard) reduciendo los nutrientes disponibles para su consumo por los microorganismos como señala Bridsona (1973).

Figura 9. (A) Glucosa y (B) proteína en g/L liberados en hidrolizados de quinua al 4% (p/v) ST con H₂SO₄ al 1% (v/v) a 15, 20 y 25 min, 16 psi de presión a 121°C

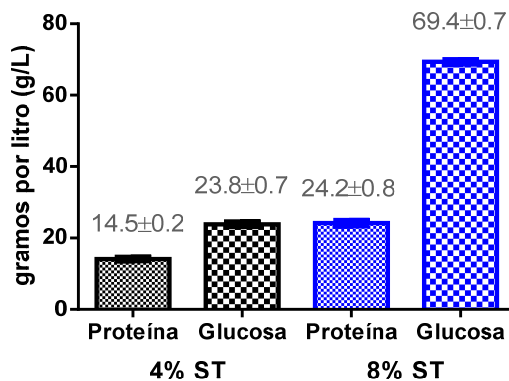


b) Optimización de pretratamiento fisicoquímico en función a la concentración de materia prima

Para la incrementar la concentración de glucosa y proteína soluble liberadas durante el pretratamiento ácido de la harina de quinua, se incrementó el contenido de sólidos totales de 4 a 8% en las suspensiones de harina de quinua para la hidrólisis ácida (H₂SO₄ al 1%). Se obtuvo una concentración de glucosa soluble de 69.4±0.7 g/L (8% ST) mayor a la liberada empleando 4% ST (23.8±0.7 g/L glucosa). En cuanto a proteína soluble se liberó 24.2±0.8 g/L (8% ST) mayor que lo obtenido al 4% ST (14.5±0.2 g/L proteína). Por lo cual, el rendimiento alcanzado fue de 80% (4% ST) y 95% (8% ST). Según otros estudios (Santos, 2016; Kemppainen, 2014) el rango de sólidos totales de 1 a 25 %, es ideal para hidrólisis de biomasa vegetal.

En el hidrolizado de harina de quinua al 8% (p/v) de ST con H₂SO₄ al 1% (v/v) se obtuvieron concentraciones de glucosa y proteínas solubles mucho mayores que al 4% (p/v) de ST las diferencias fueron significativas (p<0.05), por lo cual una concentración de ST del 8% favorece una mayor hidrólisis con resultados reproducibles, como se muestra en la Figura 10.

Figura 10. Contenido de Glucosa y proteínas (en g/L) en hidrolizados de quinua al 4% y 8% (p/v) de ST obtenidos por hidrólisis ácida H₂SO₄ 1% (v/v) a 121°C, 16 psi de presión por 15 min.

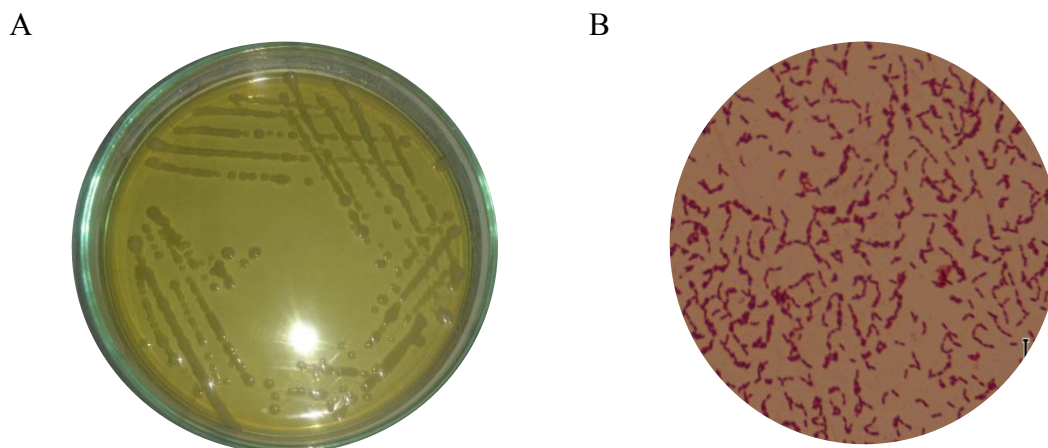


C. Conversión biotecnológica para la producción de cepas probióticas.

Lactobacillus casei es una especie de bacteria anaerobia, Gram positiva que se desarrolla muy bien en los medios formulados por Man, Rogosa y Sharpe (Medio MRS comercial). El cual es un medio de cultivo apropiado para el aislamiento y recuento de lactobacilos, que al contener: peptona, extracto de carne, extracto de levadura y glucosa constituyen la fuente nutritiva al aportar nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales; monoleato de sorbitán (tween 80) es un emulsificante de los nutrientes en el medio de cultivo y también puede ser utilizado como fuente de ácidos grasos esenciales (ácido oleico) (Rashid, 2015), fosfato de sodio que permite mantener las condiciones de pH, sales de magnesio y manganeso proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos; citrato de amonio que actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas, agar es el agente solidificante (polisacárido que se obtiene de ciertas algas marinas) se licua alrededor de los 100°C y se gelifica alrededor de los 40°C y no es atacado por las bacterias que crecen en el agar, proporcionando una superficie sólida para el desarrollo de colonias bacterianas y la L-cisteína que es adicionado al medio MRS para otorgar un ambiente reductor característico de sistemas anaerobios (Man, 1960; Zechman, 1991; DSMZ, 2012)

En esta investigación *L. casei* fue activado en caldo MRS a partir de una muestra criopreservada como es descrito por Roldán (2011), y subcultivado en medio MRS agar, obteniendo colonias blanca-amarilla de consistencia mucoide, entre 2 a 4 mm de diámetro (figura 11 A). La observación microscópica de *L. casei* permitió caracterizar bacilos gram positivos, con una magnificación 1000x (figura 11 B).

Figura 11. Morfología de *L. casei*. (A) Morfología macroscópica: Colonias de *L. casei* en medio sólido MRS y (B) Morfología microscópica: tinción Gram de *L. casei* bajo observación microscópica (1000x)



Las características de crecimiento de *L. casei* en medio MRS caldo y agar, se describen en la Tabla 7. Además, se evaluaron características de crecimiento de *L. casei* en medio MRS en condiciones aerobias y anaerobias. Se realizó un recuento bacteriano para evaluar la viabilidad de *L. casei* en ambas condiciones. Se obtuvo un mayor número de unidades formadoras de colonias (UFC) en condiciones aerobias. Considerando el número de UFC/mL de *L. casei* en condiciones aerobias, como el máximo posible alcanzando un 100% (\log_{10} UFC/mL de 9.9) de crecimiento y obteniendo un 88% (\log_{10} ufc/mL de 9.8) de crecimiento en condiciones anaerobia (Tabla 7). Según Tharmaraj (2003), el número de UFC/mL es similar en condiciones aerobias y anaerobias, cuando *L. casei* es cultivado a 37°C, 9.20-9.36 \log_{10} UFC, condición anaerobia a 37°C y 9.30-9.36 \log_{10} UFC en condición aerobia a 37°C.

Tabla 7. Características de *Lactobacillus casei sp. rhamnosus* cultivado en medio MRS con cisteína (DSMZ).

Caracterización de <i>Lactobacillus casei sp. rhamnosus</i> a partir de una muestra criopreservada		
Parámetros medidos a las 24 horas de cultivo en caldo MRS con cisteína (DSMZ)	Anaerobio	Aerobio
UFC/mL inicial	2.04x10 ⁸	2.00x10 ⁸
UFC/mL final	6.23x10 ⁹	7.03x10 ⁹
pH inicial	7.0 ± 0.1	7.0 ± 0.2
pH final	3.69 ± 0.20	3.69 ± 0.10
OD Inicial	0.46 ± 0.02	0.46 ± 0.04
OD final	11.98 ± 0.01	11.79 ± 0.01
Temperatura (°C)	37.02 ± 0.03	
Tamaño Colonia	Mediana	
Forma Colonia	Convexa	
Consistencia de Colonia	Mucosa-Brillante	
Color de colonia	Blanca-Amarilla	
Tinción Gram	Bacilos Gram Positivo en cadenas cortas	

1. Diseño, formulación y optimización de medios de cultivo

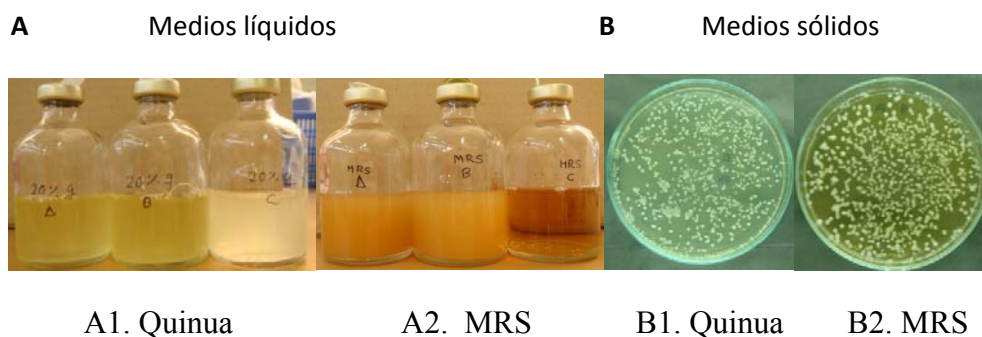
Para que un microorganismo probiótico confiera beneficios para la salud del huésped, este debe ser viable (microorganismo vivo y activo). Los probióticos son descritos como "organismos vivos, que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del huésped (FAO/WHO, 2002; Martín y col., 2014). Por lo tanto, es indispensable que se garantice que *L. casei* posea viabilidad cuando se utilizan medios de cultivos comerciales o alternativos. La evaluación de viabilidad involucra que el microorganismo, *L. casei*, sea cultivado en medio sólido e incubando en un ambiente anaerobio, obteniendo colonias con características morfológicas propias de *L. casei*, las cuales pueden ser contables (García & Serna, 2015; Trejo & Pérez, 2010).

Para este fin, se evaluaron los parámetros de crecimiento de *L. casei* en un medio formulado en base a hidrolizado de quinua empleando como control el medio comercial MRS. Se determinó el máximo crecimiento de microorganismos viables en placa (UFC/mL), expresado como logaritmo de UFC/mL (número de ciclos logarítmicos), así como el consumo de glucosa, proteína como fuentes nutricionales, la reducción de pH por efecto de los productos de fermentación excretados (ácido láctico, acético, etc) y el incremento de la turbidez como incremento de la biomasa (densidad óptica DO_{540nm}), en los periodos evaluados. Asumiendo que el medio de cultivo contiene nutrientes y factores de crecimiento necesarios, exento de microorganismos contaminantes y sustancias inhibitoras, que garantice el óptimo crecimiento de *L. casei* en el medio de

cultivo formulado, y las condiciones adecuadas como la temperatura, el grado de humedad, presión de oxígeno adecuada, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad.

Las diferencias de crecimiento por 24 h. a 37°C en un ambiente anaerobio de *L. casei* en los medios formulados en base a hidrolizado de quinua, se evaluaron al observar el incremento de turbidez con cambio de coloración del medio de blanco (el medio control abiótico vial C) a amarillo (medio con *L. casei* viales A y B), mientras que en el medio control (MRS) se observa un incremento en la turbidez del medio de un color amarillo límpido (medio control abiótico vial C) a amarillo turbio (medio con *L. casei* “viales A y B”).

Figura 12. *Lactobacillus casei* sp. *rhamnosus* en medios de cultivos líquidos (caldos) y sólidos formulados en base al hidrolizado de quinua y medio control (MRS).



a) Efecto de la concentración del hidrolizado sobre la producción de *L. casei*

Actualmente es posible tener en el laboratorio cultivos controlados de bacterias en los cuales se puede modificar la composición de los nutrientes. Permitiendo conocer y entender el efecto de los componentes en el medio de cultivo en *L. casei* (Louis, 2007).

En la presente investigación se evaluó la producción de *L. casei*, a través de su cultivo en medios formulados a base de hidrolizado de harina de quinua a las 18, 24 y 48 h de cultivo. Para los que se prepararon medios empleando 0, 20, 40, 60, 80 y 100% (v/v) de hidrolizado, a cuyos medios se los denominó: q-0%, q-20%, q-40%, q-60%, q-80% y q-100% respectivamente y de igual forma se cultivó en el medio control MRS. En la figura 13, se muestran los resultados del crecimiento promedio, obtenido de la evaluación de diferentes concentraciones de hidrolizado de quinua como medio de cultivo para el crecimiento de *L. casei*. Se observó que la viabilidad de *L. casei* en un medio q-80%, fue de 8.4×10^9 UFC/mL, similar a lo obtenido empleando el medio comercial de referencia MRS, donde se obtuvo una viabilidad de 8.3×10^9 UFC/mL, ambos a las 24 h. de incubación en un ambiente de anaerobiosis a 37°C. Mientras que la viabilidad obtenida

en los otros medios formulados fue de: 3.2×10^9 UFC/mL (q-0%), 3.1×10^9 UFC/mL (q-20%), 3.0×10^9 UFC/mL (q-40%), 4.7×10^9 UFC/mL (q-60%) y 6.0×10^9 UFC/mL (q-100%) mucho menores que el obtenido en medio MRS y q-80% (Figura 13 A)

Los resultados obtenidos del crecimiento de *L. casei* a las 18 h de incubación, muestran menor número de UFC/mL con respecto a las obtenidas con 24 h. de incubación. Esto puede ser explicado debido a que a las 18hrs. *L. casei* aún se encontraba en fase logarítmica de crecimiento. Así mismo, el número de UFC/mL obtenidas a las 48 hrs. de cultivo son menores con respecto a los obtenidos a las 24 hrs. de crecimiento, debido a que *L. casei* se encontraba en la fase de declinación o muerte. Como se muestra en la figura 13 A (Gonzales & Domínguez-Espinosa, 2008)

Inicialmente, de acuerdo a Shah (1998) y Sodini (2002), en los medios formulados se observaría el efecto de suplementación de nutrientes, donde a mayor concentración existiría menor tiempo de fermentación, Sin embargo, en el cultivo de *L. casei*, los resultados obtenidos, sugieren que *L. casei* tiene un crecimiento óptimo en el medio formulado, suplementado con 80% de hidrolizado de quinua (medio q-80%) y no a una concentración mayor, en contraste a lo expresado por Shah (1998) y Sodini (2002).

Adicionalmente, monitoreando el periodo de incubación de *L. casei* se evidenció que existió una variación en la turbidez expresada como Incremento de la turbidez en el medio formulado (DO a las 0 h-48 h): q-0% (0.09-2.13), q-20% (0.98-3.72), q-40% (1.02-3.47), q-60% (1.04-2.39) q-80% (1.04-3.80), q-100% (1.22-0.81) y MRS (0.40-1.01). Interesantemente, existió una disminución de la turbidez del medio q-100% durante el periodo de incubación de *L. casei* (Figura 13B). En otros estudios evalúan la DO de cultivos de bacterias ácido lácticas como un índice de crecimiento en distintos medios de cultivos (Man, 1960) (Ogawa y col.,2005)

Durante el cultivo de *L. casei* durante 48 horas en los medios formulados, el pH vario para cada medio desde la neutralidad hasta un pH ácido como se muestra en la figura 13 C, obteniendo un reducción de pH en q-0% (de 6.96 a 3.9), q-20% (de 6.92 a 3.31), q-40% (de 6.96 a 3.55), q-60% (de 6.95 a 3.7), q-80% (de 7.0 a 3.47), q-100% (de 7.06 a 4.06) y para el control MRS (de 6.98 a 3.91). El pH más bajo obtenido fue de 3.31, en el medio de cultivo suplementado con 20% de hidrolizado (medio q-20%). Conociendo que *L. casei* al ser una bacteria ácido láctica, en su metabolismo produce ácido láctico, ácido acético entre otros, por lo cual a medida que se van incrementando estos productos en el medio de cultivo este se acidifica, es por esa razón que en los medios desciende el pH Ammor (2007) y Man, (1960).

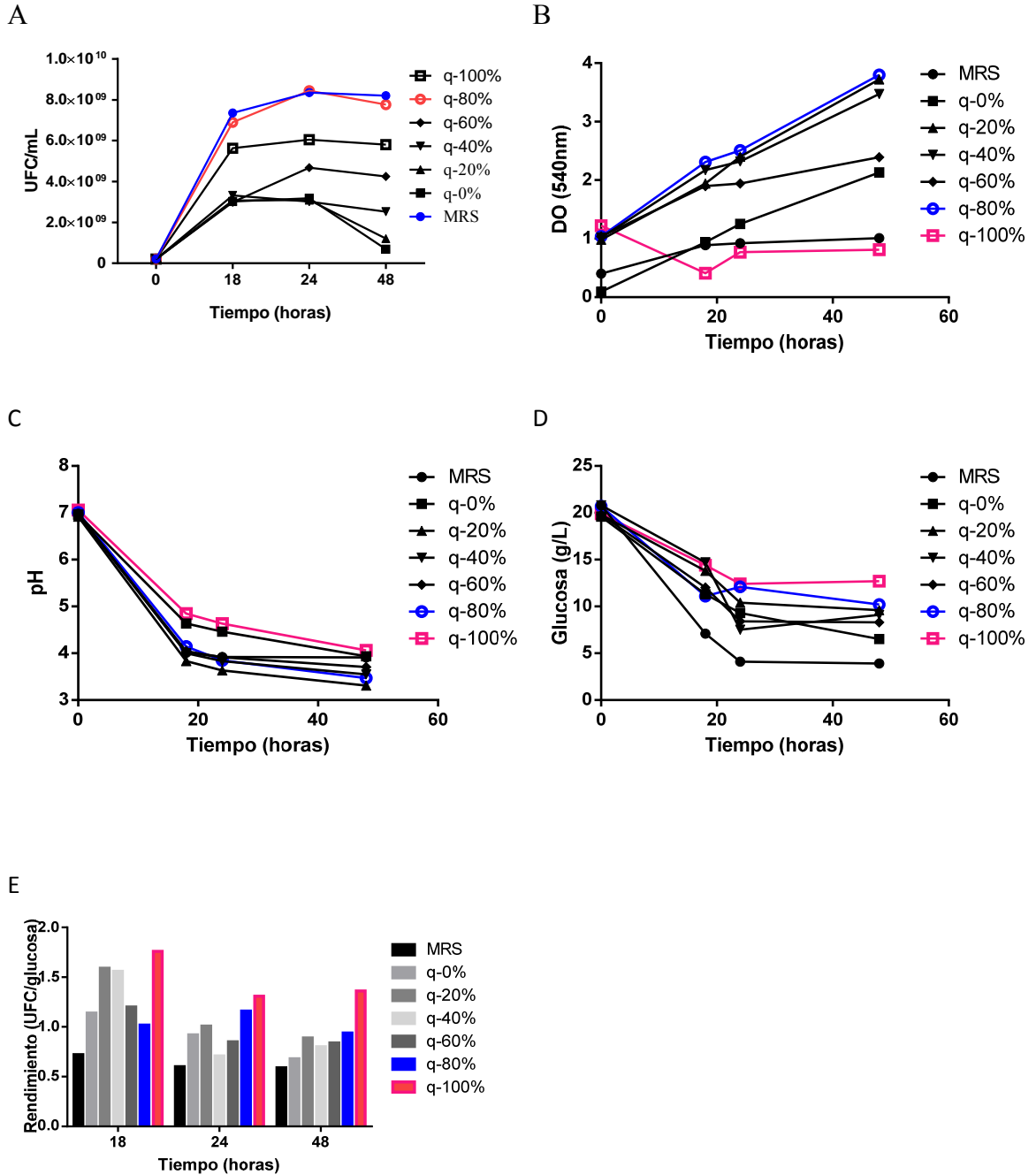
Como otros indicadores de actividad metabólica, en el cultivo de *L. casei* en los medios formulados, se determinaron el consumo de glucosa y proteínas (Louis, 2007) como se muestran en la figura 13 D y F. Los medios formulados contenían una concentración

inicial de glucosa de 20.0 ± 0.7 g/L, la cual fue consumida durante 48 h de incubación: 13.1g/L (q-0%), 10.2g/L (q-20%), 11.7g/L (q-40%), 11.5g/L (q-60%), 10.5g/L (q-80%) y 7.2g/L (q-100%) y 16.9g/L consumidos en el medio control MRS (Man, 1960; Louis, 2007). Como se observa en la Fig. 13 D, hubo menor consumo de glucosa en los medios formulados con respecto al medio control, siendo que en el medio q-100% *L. casei* consumió solo 7.2 g/L de glucosa durante las 48 horas de cultivo. En contraste, en el medio formulado q-0% se observó mayor consumo de glucosa. Este resultado es justificable, debido a que el medio q-0% era un medio sintético que contenía glucosa comercial y no glucosa proveniente de la hidrólisis de quinua como fuente de energía, lo que indicaría que en los medios formulados pudieron existir la presencia de metabolitos que afecten el consumo de glucosa, sin embargo, el presente estudio no contemplo el análisis de otros metabolitos liberados (Louis, 2007; Gandhi, 2015).

El análisis estadístico del consumo de glucosa para cada medio formulado, reveló que existe diferencia significativa entre los medios formulados con respecto al medio control ($p < 0.05$), por lo cual para seleccionar el medio formulado adecuado para *L. casei* se estimó el rendimiento ($Y_{x/s}$) obtenido de la formación de log UFC de *L. casei* en relación al consumo de glucosa durante las 48 h de cultivo. La figura 13 E, muestra que los rendimientos fueron de: 0.68 (q-0%), 0.89 (q-20%), 0.80 (q-40%), 0.84 (q-60%), 0.94 (q-80%), 1.36 (q-100%) y para MRS (0.59). Como se puede observar, los resultados muestran i) mayores rendimientos que el medio control MRS, ii) la mejor formulación para la obtención de *L. casei* fueron los medios suplementados con el 80% y 100% del hidrolizado, q-80%, q-100% respectivamente. A pesar que en el medio q-100% se obtuvo un mayor rendimiento que el obtenido en el medio q-80%, en este último, se observó un mayor número de UFC a las 24 horas de crecimiento que en el medio q-100% (Figura 13 A), además por el análisis de *t-student* no existió diferencia significativa en el consumo de glucosa entre el medio q-100% con respecto al medio q-80%, por lo que se seleccionó el medio q-80% por su óptimo rendimiento de células para posteriores experimentos.

Otros estudios similares también revelan que es posible alcanzar rendimientos mayores con medios formulados, por ejemplo en base a leche, con respeto al medio comercial MRS, para el crecimiento de bacterias ácido lácticas (Vinderola, 1999).

Figura 13. Parámetros cinéticos (UFC, DO, pH y glucosa consumida) durante el crecimiento de *L. casei* en medios MRS y medios en base a hidrolizado de quinua a concentraciones de % 0, 20, 40, 60, 80 y 100; en condiciones anaerobias a 37°C a escala de 60 mL. (A) UFC/mL, (B) densidad óptica, (C) pH, (D) Glucosa consumida (E) rendimiento de log UFC/Glucosa consumida,



b) Efecto de la adición de levadura de cerveza sobre la producción de células probióticas

Una vez estandarizado el medio q-80%, en el cual *L. casei* presentó un crecimiento adecuado, se optimizó el medio de cultivo q-80% adicionando levadura de cerveza como fuente nutricional. La levadura de cerveza empleada en este estudio poseía un aspecto granulado y de color amarillo grisáceo. La misma, contiene aprox. 8% de humedad, 45 g. proteína, 43 g. glúcidos, 6 g. grasa y 6 g. minerales por cada 100 gramos de materia seca (Ali y col., 2012; Moyad, 2007; Legras y col, 2007), debido a su composición rica en nutrientes, es un candidato excelente para optimización del crecimiento de microorganismos. En la presente investigación se formularon 2 medios de cultivo a base de q-80%: q-lev 1 y q-lev 2 cuyo contenido fue descrita en la sección de materiales y métodos y difiere en la concentración de levadura añadida. Adicionalmente, debido a que se observó que el crecimiento de *L. casei* fue óptimo a la 24 h de incubación, los parámetros de crecimiento evaluados con las formulaciones q-lev 1 y q-lev 2 fueron determinados únicamente a las 24 h. de incubación.

Durante el crecimiento de *L. casei* en los medios formulados por 24 h. a 37°C en un ambiente anaerobio, las UFC/mL obtenidas son 1.5×10^{10} (q-lev 1), 2.7×10^9 (q-lev 2), 8.35×10^9 (q-80%) y $8. \times 10^9$ (MRS), como se muestran en la figura 14 A. Cuyos resultados nos muestra que supera lo alcanzado por Man (1960) que fue de 10^7 UFC/mL, quien obtuvo en una formulación de un medio para el cultivo de lactobacillus. Se sugiere que la suplementación del medio q-80% con levadura de cerveza a una concentración de 2.5g/L mejora la producción de UFC durante el proceso de fermentación con *L. casei* (Gandhi, 2015).

Durante el cultivo de *L. casei* en los medios q-lev 1, q-lev 2, q-80% y MRS se observó una variación de la turbidez de los medios, cuyas densidades ópticas de cada medio variaron de: 11.1-13.1 (q-lev 1), 10.6-14.5 (q-lev 2), 1.04-3.80 (q-80%) y MRS (0.40-1.01), como se muestra en la figura 14 B. Obteniendo un mayor valor de DO en el medio q-lev 2 con respecto a los medios q-lev 1, q-80% y MRS. En otros estudios se evalúan la DO del medio de cultivo durante la incubación con el microorganismo como (Man, 1960). Se observo que el medio q-80% suplementado con levadura de cerveza, incremento su DO de (1.04-3.80) a (10.6-14.5) “con un incremento de 10 unidades de DO”.

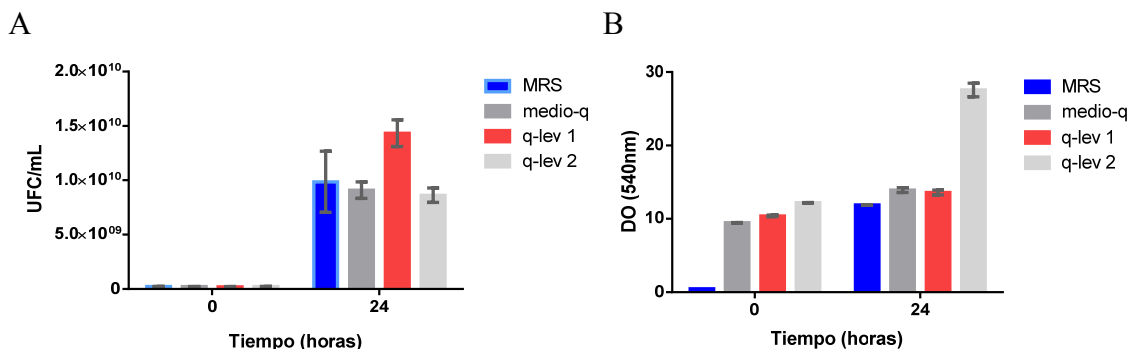
Durante el cultivo de *L. casei* en los medios q-lev 1, q-lev 2, q-80% y MRS durante 24 horas, el pH vario para cada medio desde un pH neutro hasta un pH acido, como se muestra en la figura 14 C, que disminuyeron: de 7.10 ± 0.10 hasta 3.60 ± 0.10 (q-lev 1), de 7.20 ± 0.10 hasta 3.72 ± 0.20 (q-lev 2), de 7.00 ± 0.10 hasta 3.47 ± 0.10 (q-80%), y para el control de 7.10 ± 0.01 hasta 3.90 ± 0.01 (MRS). El pH más bajo obtenido fue en el medio

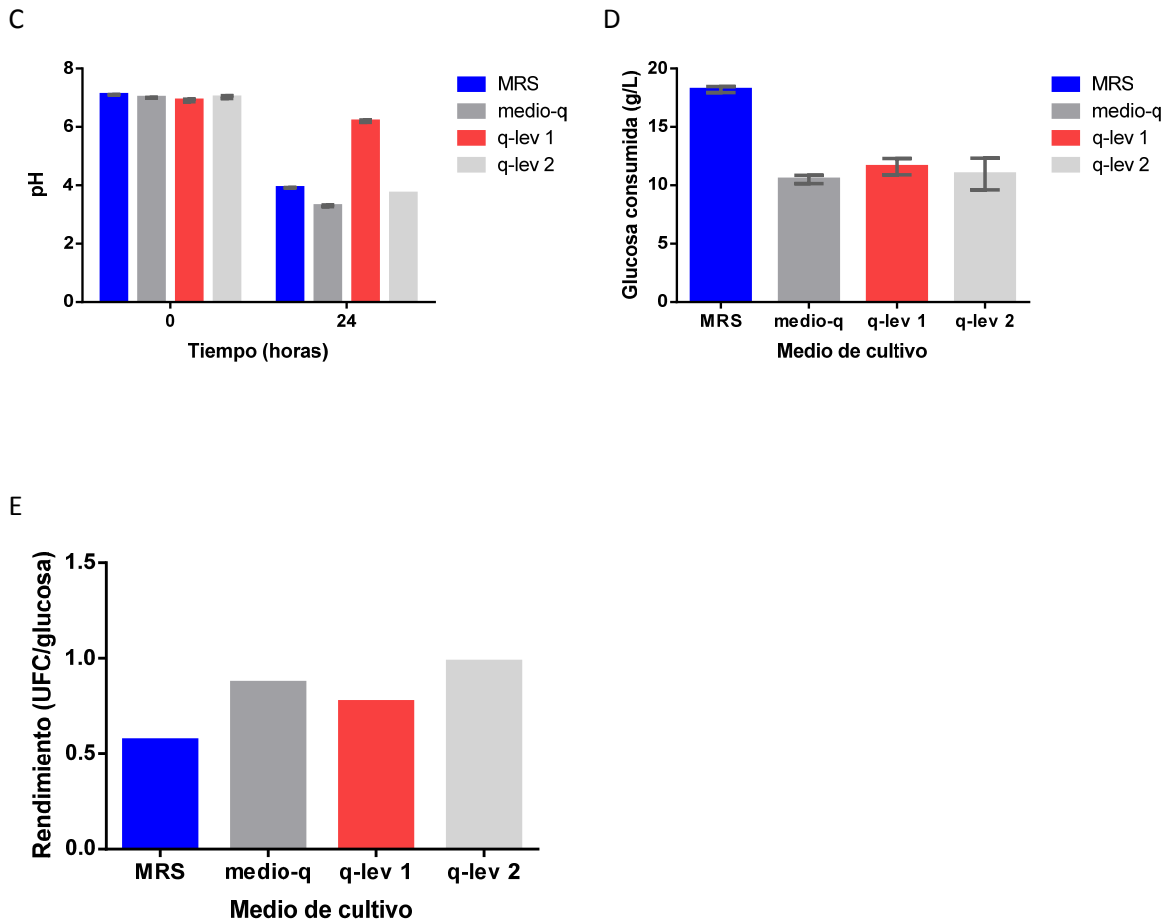
de cultivo q-80%. Los valores de pH variaron a un valor de “3.5 para (q-lev 1), 3.3 para (q-lev 2), 3.53 para q-80% y 3.2 para el medio control (MRS) y el pH más alto obtenido fue en el medio q-100% (4.06).

Durante el cultivo de *L. casei* por 24 horas en los medios q-lev 1, q-lev 2, q-80% y MRS a 37°C en un ambiente anaerobio, se observó que el consumo la glucosa y proteína solubles presentes en los medios se consumieron desde un valor de 20g/L de glucosa y la controversia que se observó en la determinación en la cuantificación de proteínas, en los medios suplementados con levadura de pan. Donde el medio de cultivo tomo un aspecto turbio con sedimento al no solubilizarse la levadura en el medio de cultivo y a la hora de filtrarla para ser cuantificada se obtiene una solución límpida lo cual nos impidió la cuantificación real de la concentración de proteínas,

Se observó un consumo de glucosa de: 10.2 g/L (q-lev 1), 12.9 g/L (q-lev 2), 11.4 g/L (q-80%) y 16.4 g/L (MRS) mostrados en la figura 14 D. Dichos resultados muestran un menor consumo de glucosa por *L. casei* en los medio suplementaos con levadura de pan con respecto al medio control “MRS” y los rendimientos obtenidos con respecto a las UFC formadas en cada medio fue de 0.98 (q-lev 1), 0.77 (q-lev 2), 0.87 (q-80%) y 0.57 (MRS) como se indica en la figura 14 E. Lo cual nos sugiere que los medios suplementados con levadura de pan dan mayores rendimientos en la formación de UFC por el consumo glucosa.

Figura 14. Parámetros de crecimiento (UFC, DO, pH, proteínas y glucosa) de *L. casei* en medios de cultivos: MRS, medio-q (q-80%), q-lev 1 y q-lev 2 en condiciones anaerobias, 37°C a escala de 60 mL: (A) unidades formadoras de colonias/mL, (B) densidad óptica a 540nm, (C) pH, (D) glucosa consumida y (E) rendimiento de log UFC por el consumo de glucosa.





Según los resultados obtenidos, se sugiere que el medio de cultivo q-80% suplementado con 2.5g/L de levadura de cerveza, es un medio óptimo para el cultivo de *L. casei*. En estudios similares se muestran que se formulan medios de cultivos en base a semilla de date suplementado con extracto de levadura a concentraciones de 0, 10 y 20 g/L son realizados para el cultivo de *Lactobacillus casei sp. rhamnosus*, donde obtienen mayores resultados en los cultivos de mayor suplementación (Nancib, 2005),

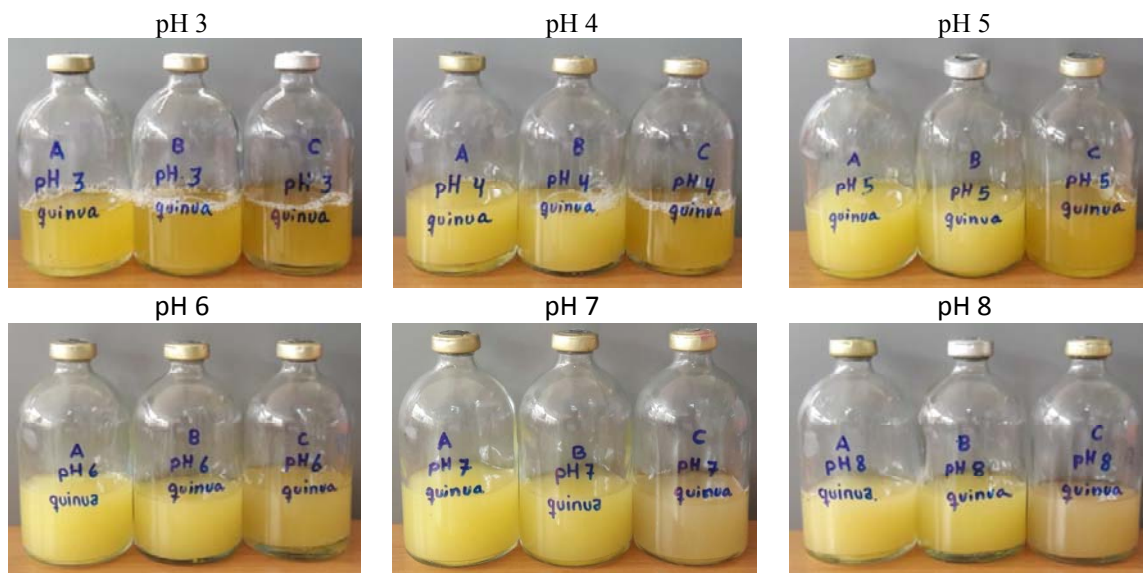
c) Evaluación del efecto del pH sobre la producción de células probióticas

Se observó el efecto del pH (3, 4, 5, 6, 7 y 8) en el crecimiento de *L. casei* en los medios de cultivos q-lev 1 y MRS a valores de pH como se muestran en las figuras 15 y 16, para posteriormente realizar el cultivo de *L. casei*

En los cultivos de *L. casei* en los medio q-lev 1 a distintos valores de pH (3, 4, 5, 6, 7 y 8), se observó en los controles abióticos (viales C, figura 15) que la intensidad de color varió de acuerdo al ajuste pH en el medio: de amarillo-intenso (pH 3) a café-claro (pH

8), dicho efecto puede ser debido a la desnaturalización de las proteínas en el medio de cultivo por la acides del medio (Smith, 1996), mientras que en los medios a pH (viales A y B, figura 15), existió una variación de un color amarillo-fluorescente (pH 3) a amarillo blanquecino (pH 8) debido a la diferencia de una condición de alta concentración de ácidos libres (H^+), la cual ocasionaría la inhibición del crecimiento de *L. casei*, como se observa en la fig. 15, resultados similares a los obtenidos por Menconi, (2014)

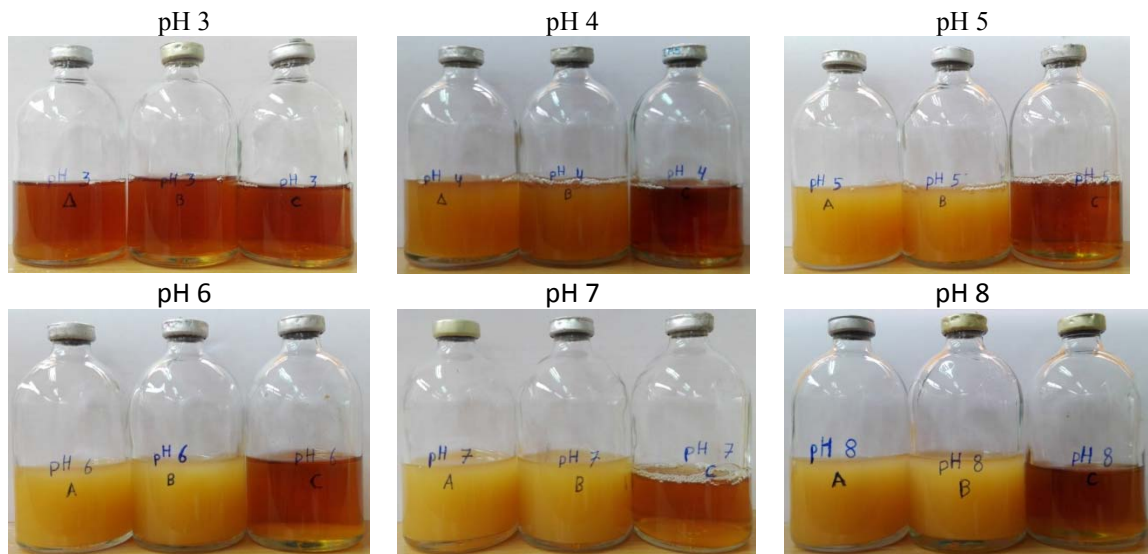
Figura 15. Crecimiento de *Lactobacillus casei sp. rhamnosus* a diferentes condiciones de pH en medio q-lev 1a 37°C, en anaerobiosis durante 24 horas.



Sin embargo, en los cultivos de *L. casei* (a 37°C, por 24 h., en un ambiente anaerobio) en los medios MRS como control a distintos valores de pH (3, 4, 5, 6, 7 y 8) se observó en los controles abióticos (viales C, figura 16) poca diferencia en color y turbidez (café-amarillo, de aspecto límpido) como en el caso de los medios q-lev 1. Mientras que en los medios con *L. casei* (viales A y B, figura 16), esto es debido a la alta concentración de

Ácidos libres (H^+), causando la inhibición del crecimiento de *L. casei* (Menconi, 2014). El cual vario de un color café-amarillo, de aspecto límpido (pH 3) a amarillo-blanquecino, turbio (pH 8). Se observó que a mayor pH mayor turbidez, lo que indica directamente que existió crecimiento de la población de *L. casei*.

Figura 16. Crecimiento de *Lactobacillus casei* sp. *rhamnosus* a diferentes condiciones de pH en medio MRS a 37°C, en anaerobiosis durante 24 horas.



En el cultivo de *L. casei* en el medio q-lev 1 a valores de pH de 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se observó un comportamiento similar al observado en el medio control MRS. Donde se vio que el crecimiento de *L. casei* es inhibido a pH bajos en especial en el de pH 3, lo cual es explicable que debido a la concentración alta de H^+ pueden inhibir el crecimiento bacteriano (Menconi, 2014), mientras que a pH próximos a la neutralidad el crecimiento *L. casei* es óptimo (Mozzi, 1994; Russell, 1980; Duncan, 2009; Hwang, 1999; Charalampopoulos, 2003). Datos mostrados en la tabla 8, 9 y 10. A pH 7, el crecimiento de *L. casei* es óptimo para el cultivo de *L. casei* en el medio q-lev 1. En la tabla 8 se comparó el número de veces que se incrementó las UFC de *L. casei* con respecto a la carga inicial, después de un cultivo de 24 y 48 horas, en el medio q-lev 1 con respecto al medio MRS, cabe resaltar que se observó una mayor formación de UFC en el medio q-lev 1 que el medio control a pH 7.

Tabla 8. Viabilidad de *L. casei* (UFC/mL) a diferentes condiciones de pH en medio q-lev 1 y MRS, a 37°C, en anaerobiosis durante 24 horas y 48 horas de cultivo.

pH	Tiempo (horas)	q-lev1 (UFC/mL)		MRS (UFC/mL)	
3	0	2.2x10 ⁸	1.0X	2.2x10 ⁸	1.0X
	24	5.0x10 ⁷	0.2X	1.9x10 ⁶	0,008X
	48	5.0x10 ⁷	0.2X	2.0x10 ⁴	0,00009X
4	0	2.5x10 ⁸	1.0X	2.3x10 ⁸	1.0X
	24	1.1x10 ⁹	4.2X	4.3x10 ⁸	1.9X
	48	7.4x10 ⁸	2.9X	3.5x10 ⁸	1.6X
5	0	2.4x10 ⁸	1.0X	2.3x10 ⁸	1.0X
	24	4.1x10 ⁹	17.3X	5.0x10 ⁹	21.34X
	48	5.7x10 ⁹	23.8X	4.1x10 ⁹	17.60X
6	0	2.3x10 ⁸	1.0X	2.5x10 ⁸	1.0X
	24	8.3x10 ⁹	36.4X	5.4x10 ⁹	21.6X
	48	7.8x10 ⁹	34.0X	4.2x10 ⁹	16.7X
7	0	2.4x10 ⁸	1.0X	2.3x10 ⁸	1.0X
	24	1.7x10 ¹⁰	71.7X	7.0x10 ⁹	30.7X
	48	6.6x10 ⁹	27.3X	6.8x10 ⁹	29.7X
8	0	2.3x10 ⁸	1.0X	2.5x10 ⁸	1.0X
	24	1.6x10 ¹⁰	69.7X	6.9x10 ⁹	28.0X
	48	8.0x10 ⁹	35.2X	6.0x10 ⁹	24.6X

Los valores descritos con una X, hacen referencia al número veces equivalentes a la población inicial total (1X).

En los cultivos a pH de 3, 4, 5, 6 y 8 se obtuvieron población inferiores de *L. casei* con relación a los obtenidos en los cultivos a pH 7, Obteniendo como un decrecimiento de *L. casei* en los medios a pH 3 de 5.0x10⁷ UFC/mL, la cual equivaldría a 0.02 veces a la población inicial en el medio q-lev 1 y 1.9x10⁶ UFC/mL en el medio MRS la cual tendría una equivalencia de 0.008 veces a la población con la que se inicio el cultivo a las 24 horas de cultivo descendiendo mas, a las 48 horas de cultivo de 2.0x10⁴ UFC/mL la misma que tendría una equivalencia de 0.00009 veces a la población con la cual se inició. Se obtuvo una mayor población de 1.7x10¹⁰ UFC/mL de *L. casei* a pH 7, en el medio q-lev 1 la cual equivaldría a 71 veces a la población inicial de *L. casei* con la que se inició, mientras que en el medio MRS se obtuvo como mayor población de 7.0x10⁹ a pH 7, la cual equivaldría a 30.7 veces a la población de *L. casei* con la que se inicio el cultivo (tabla 8).

Tabla 9. Consumo de glucosa de cultivos de *L. casei* a diferentes condiciones de pH en medio q-lev1 y MRS, a 37°C, en anaerobiosis durante 24 horas y 48 horas de cultivo.

pH	Tiempo (horas)	q-lev1		MRS	
		Glucosa (g/L)	Y _{s/x}	Glucosa (g/L)	Y _{s/x}
3	0	0.0		0.0	
	24	2.8	2.8	2.6	2.4
	48	3.4	2.3	3.6	1.2
4	0	0.0		0.0	
	24	6.3	1.4	6.5	1.3
	48	8.1	1.1	9.9	0.9
5	0	0.0		0.0	
	24	8.9	1.1	15.6	0.6
	48	10.0	1.0	18.4	0.5
6	0	0.0		0.0	
	24	10.8	0.9	17.8	0.5
	48	12.5	0.8	19.3	0.5
7	0	0.0		0.0	
	24	11.0	0.9	19.2	0.5
	48	12.3	0.8	19.7	0.5
8	0	0.0		0.0	
	24	12.4	0.8	15.9	0.6
	48	13.0	0.8	17.9	0.6

Y_{s/x}/s Rendimiento (log UFC/glucosa consumida)

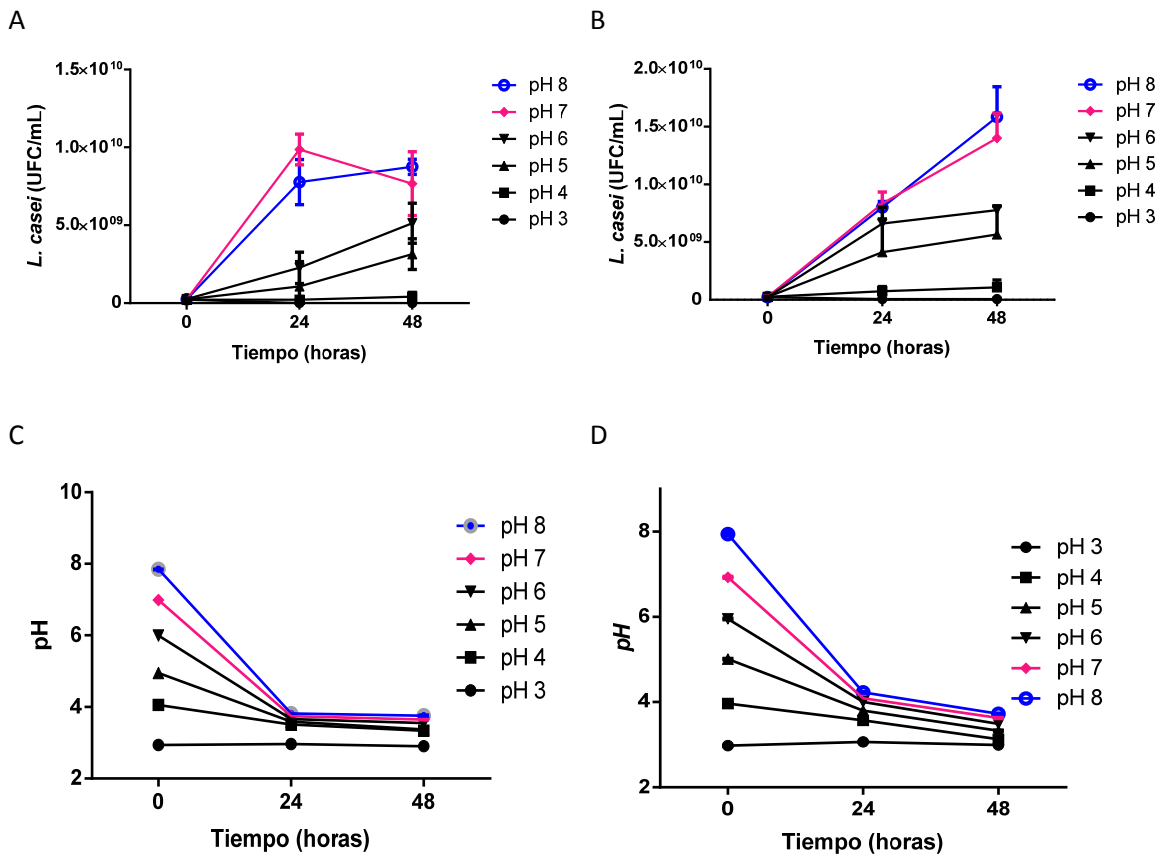
Se observó una mayor formación de UFC de *L. casei* a las 24 horas de cultivo a pH 7 de 1.7×10^{10} UFC/mL con un consumo de 11 g/L de glucosa, con un rendimiento de 0.9 y en el medio MRS se obtuvo 7.0×10^9 UFC/mL con un consumo de 19.2 g/L de glucosa y un rendimiento de 0.5 en el medio MRS, con un ciclo logarítmico mayor en el medio q-lev1 con respecto al medio control MRS y un consumo de 8 g/L menos en el medio q-lev1 con respecto al medio MRS. Por estos resultados obtenidos (datos mostrados en la tabla 9 y en la figura 17).

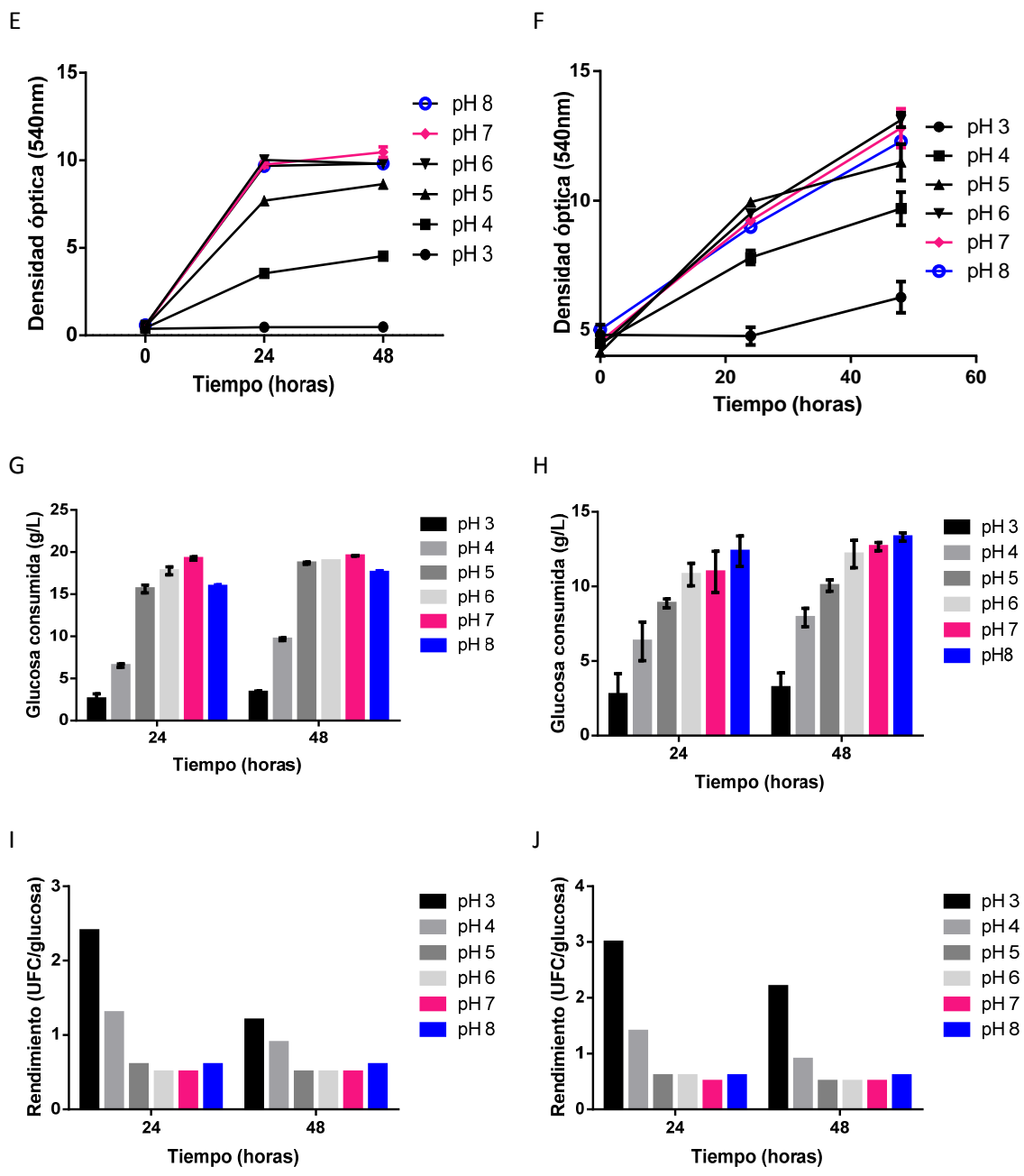
Además de las UFC formados y la glucosa consumida en los cultivos, se analizaron otros parámetros como el grado de turbidez y variación de pH durante el periodo de incubación de las 24 y 48 horas datos mostrados en la tabla 10 y en la figura 17. Donde los resultados obtenidos del grado de turbidez de los cultivos nos indican un ascenso claro a mayor tiempo de incubación a pesar de la diferencia de turbidez con la que se inició del medio q-lev 1 con respecto al medio MRS. Y en los cambios de pH se observan un descenso hasta un valor de aprox. de tres en los medios de pH 4, 5, 6, 7 y 8

lo cual es claro que el medio se acidifica debido a los productos formados durante el proceso fermentativo.

Donde los cultivos a pH 3, 4, 5, 6, 7 y 8 alcanzan aprox. un pH 3 ya sea a los 24 o 48 horas del proceso fermentativo, lo cual nos indica la formación los productos del proceso de la fermentación exceptuando en el medio de pH 3 que se mantuvo en su pH de inicio datos mostrados en la tabla 10 y en la figura 17 C y D, en ambos medio q-lev 1 y MRS.

Figura 17. Parámetros evaluados (UFC, DO, pH, proteínas y glucosa) a diferentes condiciones de pH en medio q-lev1 y MRS, a 37°C, en anaerobiosis durante 24 horas y 48 horas de cultivo. **(A)** UFC/mL en medio MRS, **(B)** UFC/mL en medio q-lev1, **(C)** variación de pH en medio MRS, **(D)** variación de pH en medio q-lev1, **(E)** Variación de la densidad óptica en medio MRS, **(F)** Variación de la densidad óptica en medio q-lev 1, **(G)** Glucosa consumida en medio MRS **(H)** Glucosa consumida en medio q-lev 1, **(I)** Rendimiento “UFC/glucosa” en medio MRS y **(J)** Rendimiento “UFC/glucosa” en medio q-lev1.





Nota: En las gráficas de la figura 17 se resaltan valores que pertenecen a las variables dependientes de pH 8 (azul) y pH 7 (rojo) los demás resultados del efecto de las variables pH 3, 4, 5 y 6 se presentan en escala de grises

2. Producción de células probióticas a mayor escala

Una vez estandarizado el medio de cultivo q-lev 1, para el crecimiento de *L. casei* y observado su crecimiento óptimo a pH neutro a escala de 60mL, se cultivó a *L. casei* en

medio q-lev1 y MRS a escala de 1 L (como es descrito en la sección de materiales y métodos). Para evaluar el crecimiento de *L. casei* en fermentadores de 5L de capacidad, se realizó 3 procesos de fermentación: en el primero se evaluó el crecimiento de *L. casei* en un ambiente *anaerobio*, en el segundo experimento en un ambiente *aerobio* y el tercer experimento se evaluó en un ambiente anaerobio a pH constante de 7.0 ± 0.3 . Las condiciones en las que se cultivaron a *L. casei* fue en medio q-lev1 y MRS de un volumen de 1 litro en fermentadores de 5 L de capacidad a condiciones de un pH inicial 7.0 ± 0.3 con una agitación de 80 rpm a $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$.

a) *Fermentación anaerobia a escala de 1L empleando medio de cultivo optimizado*

Para el cultivo de *L. casei* en un ambiente anaerobio se saturó la atmosfera del fermentador con N_2 gaseoso por un tiempo de 5min, (para crear un ambiente reductor), se procedió a inocular *L. casei* ($2.3 \times 10^8 \pm 1.2 \times 10^7$ UFC/mL) el cual desarrolló hasta lograr un estado invariable (pH constante y consumo de glucosa), esto fue a un tiempo de 18h para el medio q-lev1 y 23 h para el medio de MRS. Las diferencias del tiempo de fermentación se debieron a que estos procesos de fermentación se monitorearon durante el tiempo, el proceso fue detenido una vez que el pH y el contenido de glucosa se mantuvieron constantes, lo cual directamente indica que *L. casei* llego al umbral de su crecimiento (fase estacionaria).

Los resultados de UFC/mL en el medio q-lev 1 se describen en la figura 18 B, donde se observa que a las 18h de cultivo se alcanzó un mayor número de 1.56×10^{10} UFC/mL, en el cual la fermentación fue detenida al no observar cambios en el pH y el consumo de glucosa. Sin embargo, el número de UFC/mL en el medio MRS (figura 18 A) alcanzo hasta 8.77×10^9 UFC/mL, obteniendo una mayor cantidad de UFC/mL a las 15h de cultivo. Es importante mencionar que se obtuvo una mayor cantidad de células viables (UFC/mL) en el medio q-lev1 que en el medio MRS, lo cual indica que el medio q-lev 1 en condiciones anaerobia a escala de 1L. es un medio óptimo para el crecimiento de *L. casei* si es comparado con el medio MRS comercial empleado como control.

Como parámetros adicional en el cultivo de *L. casei* en el medio q-lev 1 se analizó la densidad óptica a 540nm (DO_{540}) (figura 18 B), la cual varió de: 6.07 (0h) a 7.75 (18h); Como se puede observar se inició con una DO_{540} elevada, la cual disminuyo en las primeras 5 horas de ahí en adelante se incrementó (figura 18 B), lo cual se puede explicar debido a que la turbidez inicial del medio de cultivo es dada por suspensión de la levadura de cerveza (componente medio q-lev1) el cual es asimilado por *L. casei* desde las 5 h de cultivo. Sin embargo, en el medio MRS la DO_{540} (figura 18 A) vario de: 0.43 (0h) a 13.54 (21h) a las 21h de cultivo de *L. casei* en MRS. Con este indicador podemos observar indirectamente el crecimiento de la población de *L. casei*.

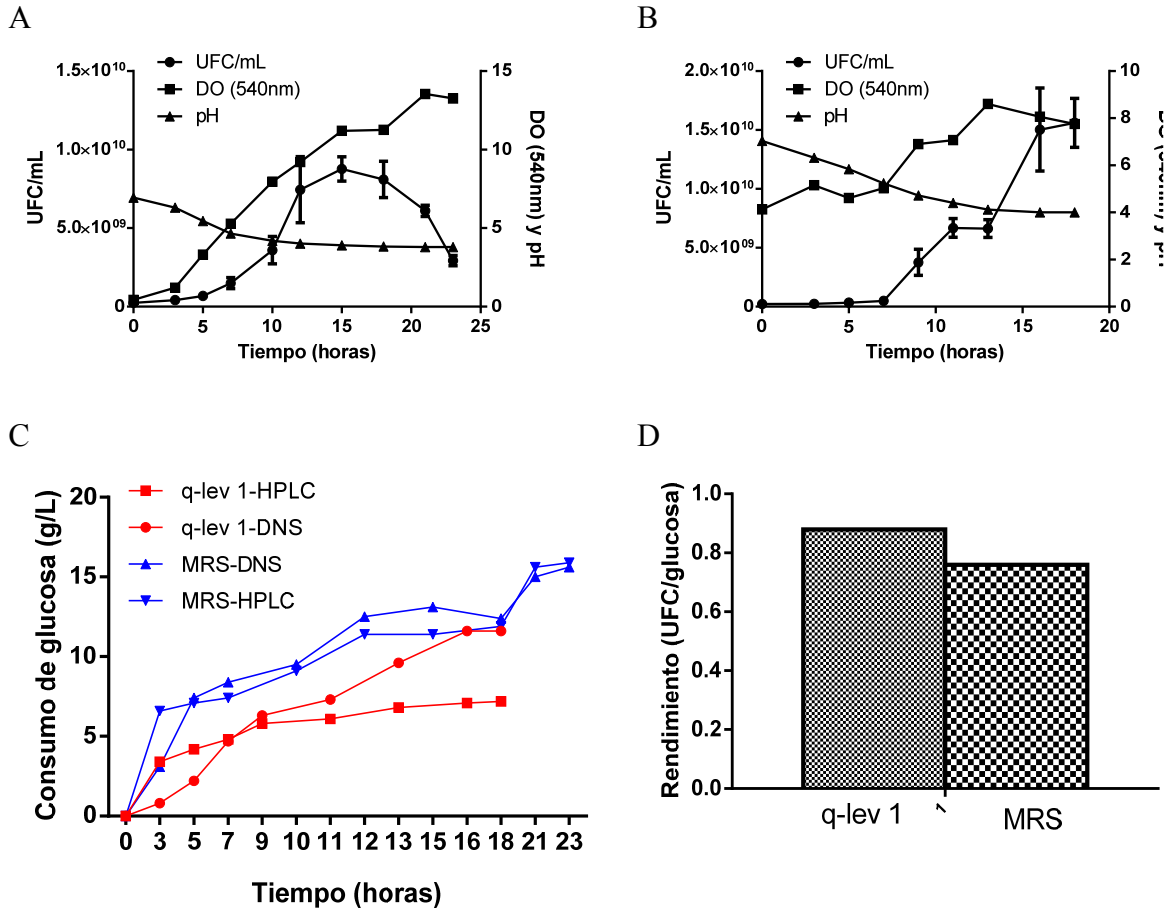
Durante el cultivo de *L. casei* en el medio q-lev1 en condiciones anaerobias, también se observó un descenso de pH (figura 18 B) desde 7.04 (0h) a 4.01 (18h), mientras que en el cultivo de *L. casei* en el medio MRS los valores de pH (figura 18 A) variaron desde: 6.95 (0h) 3.79 (21h) debido a la formación de los productos de fermentación como el ácido láctico, ácido acético y otros. Con lo cual se puede asumir que *L. casei* en el medio q-lev 1 alcanza fase estacionaria en menor tiempo que en el medio control, esto podría deberse al crear un medio enriquecido y óptimo para el crecimiento de *L. casei*.

Durante el proceso de la fermentación de *L. casei* en el medio q-lev 1, se observó el consumo de glucosa (figura 18 C), el cual fue cuantificado por métodos de DNS y HPLC como fue descrito en materiales y métodos, en los distintos tiempos de cultivo donde se registró un consumo de glucosa en g/L de: 0.0 (0h) a 11.61 ± 0.08 (18h), lo que indica que no hubo un consumo total de la glucosa del medio, quedando un remanente de aprox. 8 g/L. Los resultados obtenidos del consumo de glucosa en el medio MRS (figura 18 C) son en g/L de: 0.0 (0h) a 15.6 ± 0.6 (23h), donde también se observó un remanente de glucosa de aprox. 4 g/L, resultados similares también fueron descritos previamente por Nancib, (2005). El consumo incompleto de la glucosa puede correlacionarse con la acidificación del medio, debido a los productos formados del proceso de fermentación como el ácido láctico, ácido acético los cuales actuarían como limitantes del crecimiento de *L. casei*.

Los rendimientos obtenidos de la formación del log de las UFC/mL por consumo de glucosa (figura 18 D): en el medio q-lev 1 y MRS, fueron de 0.88 y 0.76 respectivamente, como se puede observar se obtiene similares rendimiento del medio q-lev 1 y el medio control MRS. Con los rendimientos obtenidos del log UFC de *L. casei* con respecto al consumo de glucosa, una vez más se demuestra que el medio q-lev 1 es un medio óptimo para el cultivo de *L. casei*.

En condiciones anaerobias a escala de 1L. a 37°C a un pH inicial de 7.0 ± 0.1 , con una agitación de 80rpm.

Figura 18. Parámetros evaluados durante el crecimiento de *L. casei* (UFC, DO, pH, proteínas y glucosa) en medios q-lev 1 y MRS, en condiciones anaerobias a 37°C a escala de 1 litro: (A) UFC/mL, DO y pH en medio MRS, (B) UFC/mL, DO y pH en medio q-lev 1, (C) Glucosa consumida determinada según el método de HPLC y DNS y (D) Rendimiento de UFC con respecto a glucosa y proteína en los medio MRS y q-lev 1



b) Fermentación aerobia a escala de 1L empleando medio de cultivo optimizado

Para el cultivo de *L. casei* en un ambiente aerobio, se inoculo con $(2.2 \times 10^8 \pm 5.3 \times 10^6)$ UFC/mL) de *L. casei* los medios de cultivos de q-lev 1 y MRS, el cual se desarrolló durante un periodo de 30h. El tiempo del proceso de fermentación se monitoreó hasta registrar pH y consumo de glucosa constantes, lo cual indica que *L. casei* concluyo la fase logarítmica de crecimiento.

Las condiciones en las que se cultivaron a *L. casei* en 1L de medio q-lev 1 y MRS fueron de pH inicial 6.9 ± 0.1 con una agitación de 80 rpm a $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ y en un ambiente aerobio.

Los resultados de UFC/mL en el medio q-lev 1 se describen en la figura 19 B variaron de 2.15×10^8 (0h) a 1.18×10^{10} (30h). Sin embargo, el número de UFC/mL obtenidas en el medio MRS (figura 18 A) vario de 2.26×10^8 (0h), a 6.52×10^9 (21h). Se obtuvo una mayor cantidad de UFC en el medio q-lev 1 que en el medio MRS pero a un tiempo mucho mayor que en el medio control, lo cual nos indica que el medio q-lev 1 en condición aerobia, escala de 1L., a 37°C a 80rpm de agitación, es un medio óptimo para el crecimiento de *L casei*, a 30 horas de incubación.

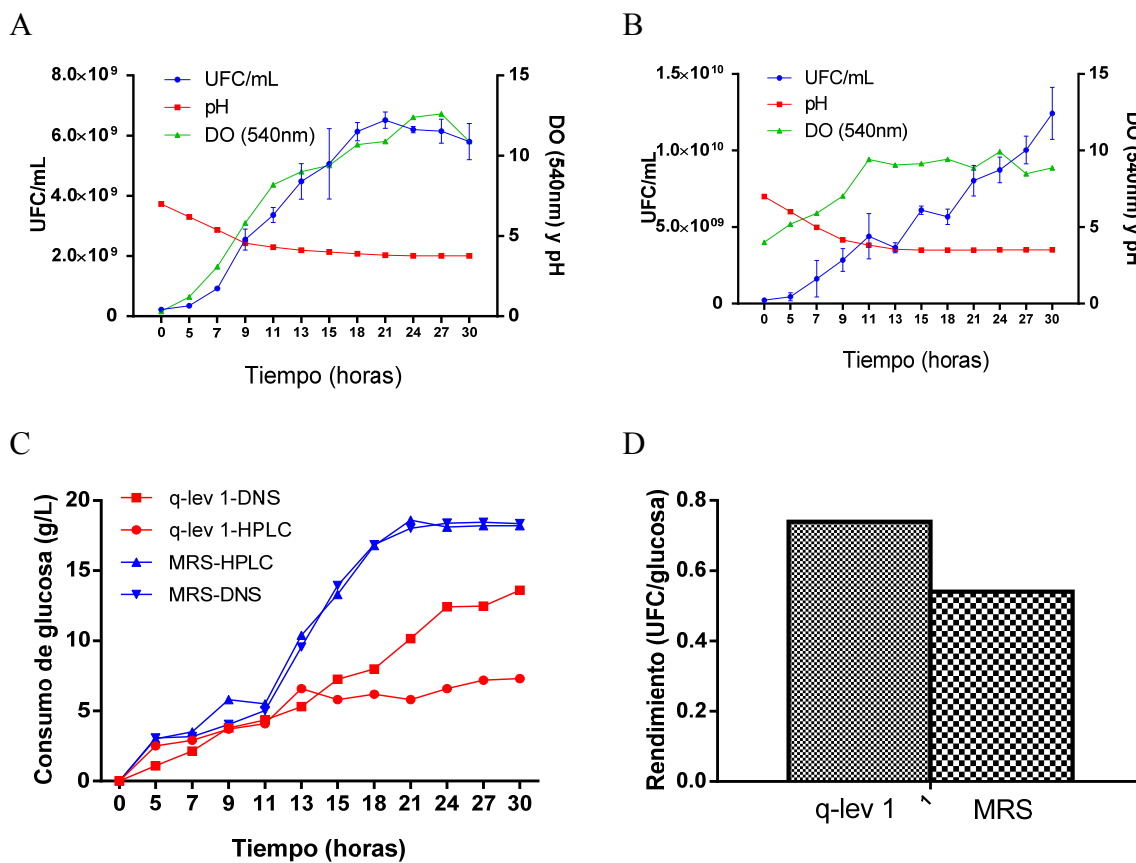
Otro parámetro de control del crecimiento de *L. casei* en el medio q-lev 1 es la DO_{540} , la cual vario de: 4.0 (0h) a 9.9 (24h) (mayor valor alcanzado). Mientras que en el medio MRS la DO_{540} vario de: 0.4 (0h), 12.6 (27h). En un cultivo de *L. casei* en medio q-lev 1 y MRS en condiciones aerobias, 37°C , 80rpm de agitación, el proceso de fermentación es más extendido en el tiempo que en condiciones anaerobias. La densidad óptica alta del medio q-lev 1 es debida a la suspensión de células de levadura.

Durante el cultivo de *L. casei* en el medio q-lev 1 en condiciones aerobias, se observó el cambio de pH de: 6.99 (0h) a 3.54 (13h) (figura 19 B), manteniéndose en 3.5 ± 0.1 hasta las 30h de cultivo y en el medio control MRS se observó una variación de: 6.99 (0h) a 3.77 (24h) (figura 19 A), de igual forma que en el medio q-lev 1. En un cultivo de *L. casei* en medio q-lev 1 en condiciones aerobias, 37°C , 80rpm de agitación, se puede observar un descenso del pH en mayor tiempo que lo obtenido en el sistema anaerobio, esto puede deberse a que *L. casei* crece mucho mejor en un ambiente reductor que en un ambiente oxidante.

Con *L. casei* en el medio q-lev 1, se observó el consumo de glucosa, el cual se cuantificó en los distintos tiempos de cultivo (figura 19 C), donde se tuvo en g/L de: 0.0 ± 0.0 (0h) a 13.6 ± 0.02 (30h), se observa que el consumo de glucosa no es completo, quedando un remanente de aprox. 7g/L.; en el medio MRS, el consumo de glucosa soluble fue en g/L de: 0.0 ± 0.0 (0h) a 18.30 ± 0.06 (30h), de la misma forma no se consumió la glucosa por completo, quedando un residuo de un remanente de aprox. 2 g/L. lo cual se explicaría por la formación de un ambiente muy ácido del medio q-lev 1, el cual interfiere con el crecimiento de *L. casei*, quedando mayor concentración remanente de glucosa en el medio q-lev 1 (de aprox. 7g/L), que en el medio control (de aprox. 2 g/L). Los rendimientos obtenidos de la formación del log de las UFC/mL por unidad de glucosa consumida (figura 19 D): en el medio q-lev 1 y MRS, fueron de 0.74 y 0.54 respectivamente, como se puede observar se obtiene similares rendimientos en ambos medios, sin embargo son menores a los obtenidos en condiciones anaerobias. Con los

rendimientos obtenidos del log UFC/mL de *L. casei* con respecto al consumo de glucosa, q-lev 1 es un medio propicio para el cultivo de *L. casei* en condiciones aerobias.

Figura 19. Parámetros evaluados durante el crecimiento de *L. casei* (UFC, DO, pH, proteínas y glucosa) en medios MRS y q-lev 1 en condiciones aerobias a 37°C a escala de 1 litro. **(A)** UFC/mL, DO y pH en medio MRS, **(B)** UFC/mL, DO y pH en medio q-lev 1, **(C)** Consumo de glucosa determinado por el método de HPLC y DNS y **(D)** Rendimiento Log UFC con respecto al consumo de glucosa y proteínas en los medio MRS y q-lev 1.



c) Fermentación anaerobia a pH constante y escala de 1L empleando medio de cultivo optimizado

La razón por la cual se desarrolló un proceso de fermentación a pH constante, es porque en estudios previos obtienen resultados óptimos pero con medios de cultivos distintos y condiciones diferentes a los empleados en esta investigación Mozzi (1994), que a pH neutral, se obtuvo mayor crecimiento de *L. casei*, ya que estos microorganismos en su proceso de fermentación producen ácido láctico cuya acumulación conduce a un descenso de pH del medio reduciendo la actividad metabólica de *L. casei*.

Como se obtuvo 1.80×10^{10} UFC/mL de *L. casei* durante el cultivo anaerobio, para optimizar estos resultados se cultivó a *L. casei* en un ambiente anaerobio, pero a pH controlado con la adición automática de NaOH (1M) como se describe en la sección de materiales y métodos.

En el cultivo de *L. casei* en los medios q-lev 1 y MRS (medio control), en un ambiente anaerobio, a $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$, 80rpm a pH controlado 7.01 ± 0.15 , se inició con un inóculo de: $2.3 \times 10^8 \pm 5.0 \times 10^6$ UFC/mL, el cual desarrolló durante un periodo de 21h. monitoreado de acuerdo al consumo de glucosa, el proceso fue detenido una vez que cesó el consumo de glucosa, lo cual indica que *L. casei*, llegó al umbral de la fase logarítmica de crecimiento (fase estacionaria).

Los resultados de UFC en el medio q-lev1 se muestran en la figura 20 B, el cual varío de (en UFC/mL): 2.35×10^8 (0h) a 1.37×10^{10} (15h), como fue descrito anteriormente, este proceso fue detenido al registrar una concentración constante de glucosa. El número de UFC/mL obtenido en el medio MRS (figura 20 A) varío de: 2.25×10^8 (0h) a 4.88×10^9 (15h). Obteniéndose una mayor cantidad de UFC/mL en el medio q-lev 1 que en el medio MRS y al comparar las UFC/mL obtenidas en condiciones anaerobias a pH controlado 1.37×10^{10} (15h) y 1.56×10^{10} UFC/mL (18h) no controlado, obteniéndose mayores UFC/mL en condiciones anaerobias a pH no controlado, lo cual nos indica que el medio q-lev1 en condición anaerobia a 37°C , con un pH no controlado es un medio óptimo para el crecimiento de *L. casei*.

Como parámetro adicional, en el cultivo de *L. casei* en los medio q-lev 1 y MRS se determinó el incremento de la DO_{540} (figura 20 B), el cual varío en el medio q-lev 1 de: 4.1 (0h) a 8.1 (21h). Se observó un incremento en la DO durante las 21 h de fermentación. Mientras que en el medio MRS la DO_{540} varío de (Figura 20 A): 0.4 (0h), a 8.4 (15h), lo cual nos indica que la DO_{540} es un parámetro reproducible a la formación de biomasa de *L. casei* en las condiciones mencionadas. Durante las 21 h del proceso de fermentación, el pH se mantuvo constante en 7.01 ± 0.15 (figura 20 A y B), el cual se realizó automáticamente con un dosificador de adición de álcali (descritos en la sección de materiales y métodos), el volumen total de base que se fue automáticamente añadido fue de 77mL (q-lev 1) y 146mL (MRS) (figura 20 D), dichos volúmenes se tomaron en cuenta como un factor de dilución del medio y fue utilizado para corregir los parámetros medidos. El volumen añadido al medio MRS fue el doble que el añadido al medio q-lev 1, este fenómeno puede ser explicado debido a que el contenido de complejos proteicos (no cuantificados en esta investigación), del medio q-lev 1, procedentes del hidrolizado y la levadura de cerveza, estarían actuando como mejores agentes que los del medio MRS.

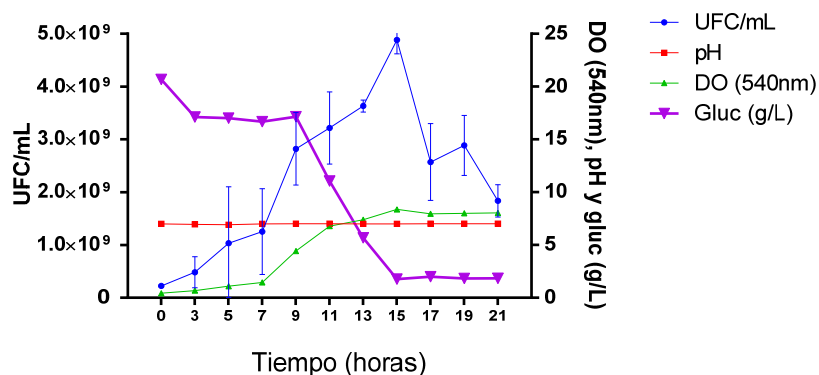
Durante el proceso de la fermentación de *L. casei* en el medio q-lev 1, se observó el consumo de glucosa, el cual fue cuantificado por métodos de DNS y HPLC, como fue

descrito en materiales y métodos, en los distintos tiempos de cultivo varió de en g/L de: 20.1 ± 0.3 (0h) a 8.0 ± 0.1 (19h); de igual forma que cultivando a *L. casei* en ambientes aerobio y anaerobio a pH no controlado, donde se registró un remanente de glucosa de aprox. 8.0 g/L esto puede ser explicado debido a que contenga el hidrolizado de quinua contiene además otros azúcares reductores utilizables. Los resultados obtenidos en el medio MRS del consumo de glucosa fueron en g/L de: 20.6 ± 0.2 (0h) a 1.6 ± 0.01 (19h): En el cultivo de *L. casei* a pH controlado se puede observar un consumo casi del total de glucosa, dejando como remanente aprox. de 1.5g/L Los rendimientos obtenidos de la formación del log UFC/mL por consumo de glucosa (figura 20 C): en el medio q-lev 1 y MRS, fueron de 1.81 y 0.51 respectivamente, obteniéndose en el medio q-lev 1 un rendimiento de 3 veces superior al obtenido en el medio control, por lo cual una vez más se comprueba la efectividad del medio formulado q-lev para el crecimiento de *L. casei*.

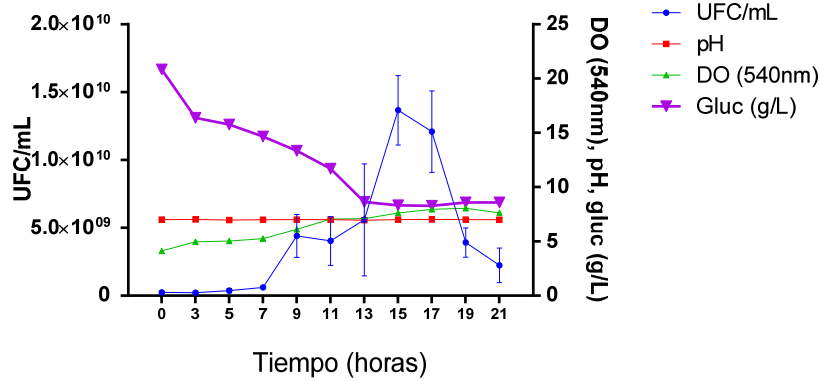
Es posible observar que existe un menor consumo la glucosa por *L. casei* en los medios de cultivo, analizados por el técnica de HPLC con relación a las obtenidas por el método de DNS, esto es debido a que la técnica de DNS permite cuantificar azúcares reductores totales. Sin embargo la exactitud y precisión de la técnica el de HPLC permite separar, detectar y cuantificar exclusivamente glucosa. En los medios formulados en base al hidrolizado de quinua, es presumible la presencia de otros azúcares reductores las que fueron cuantificados por el método de DNS y no así por el método de HPLC.

Figura 20. Parámetros medidos (UFC, DO, pH, proteínas y glucosa) durante el crecimiento de *L. casei* en medios MRS y q-lev 1 en condiciones anaerobias a pH constante, a 37°C a escala de 1 litro. (A) UFC/mL, DO, proteína y glucosa en medio MRS, (B) UFC/mL, DO, proteína y glucosa en medio q-lev 1, (C) Rendimiento del log UFC con respecto a glucosa consumida en los medios MRS y q-lev 1, (D) volumen gastado de NaOH 1M en los medio MRS y q-lev 1 y (E) consumo de glucosa determinado por el método de HPLC y DNS. Igual corregir de acuerdo a las correcciones de arrib

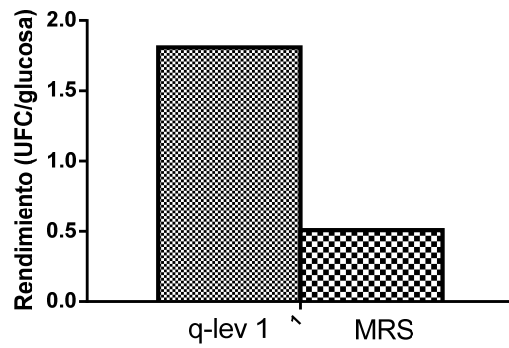
A



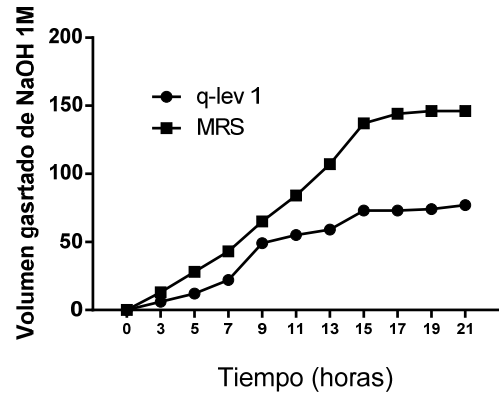
B



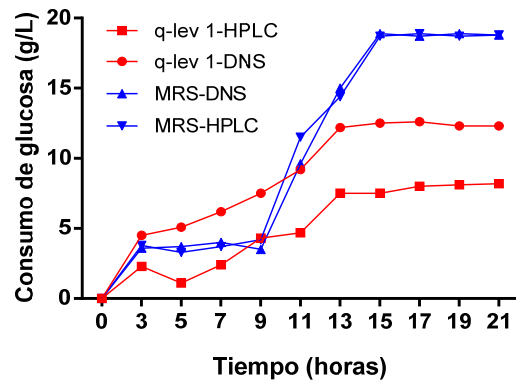
C



D



E



Se sugiere como las condiciones óptimas para el cultivo de *L. casei sp. rhamnosus* en el medio q-lev1 a: 37°C, 80rpm de agitación, en un ambiente anaerobio a pH no controlado, a escala de 1 L. En estudios similares se obtuvo también un crecimiento óptimo de *L. casei sp. rhamnosus* empleando otro sustrato, como el suero de leche de

vacuno (Escobar, 2010), y empleando condiciones similares a las empleadas en esta investigación, con una agitación mayor de 150rpm (Nancib, 2005)

VII. Conclusiones

Se diseñó un medio de cultivo óptimo (q-lev 1) el cual contiene: “hidrolizado de quinua ajustado a una concentración final de 20g/L de glucosa; en g/L: 2 K₂HP0₄, 5 acetato de sodio, 2 citrato de sodio, 0.2 MgSO₄-7H₂O, 0.05 MnSO₄ y 0.5 L-cisteína, 1mL tween 80 a un pH 7.0±0.1 y levadura de cerveza 2.5 g/L” para el cultivo de *L. casei rhamnosus*, el cual se formuló en base al hidrolizado de harina de quinua (constituidas por partículas de 10 a 20µm) al 4%ST (p/v) con H₂SO₄ al 1% (p/v) a condiciones de: 121°C, 16PSI por 15 min. Dichas condiciones permiten una mayor liberación de glucosa (69.4 g/L) y proteínas (23.9g/L), durante el proceso de hidrólisis. La humedad obtenida en el grano de quinua fue de 27% el cual se lo redujo mediante secado solar a 7% tanto el grano y la harina de quinua, se obtuvo una mayor liberación de glucosa (69.4 g/L) y proteínas (23.9g/L), durante el proceso de hidrólisis de la harina de quinua al 4%ST (p/v) a condiciones de: 121°C, 16PSI por 15 min

Se obtuvo un medio optimizado del medio formulado “hidrolizado de quinua ajustado a una concentración final de 20g/L de glucosa; en g/L: 2 K₂HP0₄, 5 acetato de sodio, 2 citrato de sodio, 0.2 MgSO₄-7H₂O, 0.05 MnSO₄ y 0.5 L-cisteína, 1mL tween 80 a un pH 7.0±0.1” enriqueciéndolo con levadura de cerveza granulada a una concentración de 2.5 g/L, como fuente de nitrógeno adicional.

Los medios formulados fueron evaluados mediante la determinación de viabilidad de *L. casei* expresado en unidades formadoras de colonias, obteniendo 1.6x10¹⁰UFC/mL en el medio formulado (q-lev1) y 8.8x10⁹UFC/mL en el medio control (MRS), durante un periodo de 24 horas de incubación, además otros indicadores como el consumo de glucosa y proteína, variación de la densidad óptica y la reducción de pH demostraron el éxito de la fermentación.

Se observó que para el cultivo de *L. casei rhamnosus* a mayor escala (1L), las condiciones óptimas de crecimiento fueron de 37°C, 80rpm, ambiente anaerobio a pH no controlado (pH inicial 7.0±0.1). Dicha fermentación fue evaluada mediante la determinación de viabilidad, obteniendo 1.6x10¹⁰UFC/mL en el medio formulado (q-lev 1) y 8.8x10⁹UFC/mL en el medio control (MRS) a las 24 horas de incubación. Los resultados obtenidos indican que es posible emplear q-lev1: 20g/L de glucosa (harina de quinua 8% ST, H₂SO₄ 1%, 121°C, 16PSI, 15min), 2.5g/L levadura de cerveza y micronutrientes, como medio de cultivo para obtener una dosis probiótica de 1.6x10¹⁰UFC/mL de *L. casei rhamnosus*.

VIII. Bibliografía

- FAO/OMS. (2011). *Leche y productos lácteos*. Roma Italia: Viale delle Terme di Caracalla.
- Aguilar, O. (2010). Evaluation of Natural and Commercial Probiotics for Improving. *JOURNAL OF THE*, 447-455.
- Alessandra, V. (2012). Bioethanol. In P. M. Lima, *Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass*: (pp. 1-29). Italia: INTECH.
- Ali, A., Shehzad, A., Khan, M. R., & Amjid, M. A. (2012). Yeast, its types and role in fermentation during bread making process-A . *Pakistan Journal of Food Sciences* , 171-179.
- Amador, J. y. (2016). Obtención de azúcares reductores (glucosa) a partir en granos de quinua (*Chenopodium quínoa*) usando hidrólisis enzimática, ácida y el metabolismo de la embriogénesis vegetal. *CON-CIENCIA*, 61-71.
- Ammor, M. S. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter. *Meat Science* , 138–146.
- Amores, R. C.-H. (2004). Probióticos. *Revista Española de quimioterapia*, 131-139.
- Avila, L. (2006). FUNDAMENTOS DE CRIOPRESERVACIÓN. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* , 291-300.
- Badshah, M. (2012). Bioresource Technology. En M. Badshah, *Evaluation of process parameters and treatments of different raw materials for biogas producción* (págs. 262-269). Lund: Lund University.
- Badshah, M. (2012). The biomethane potential of chemically defined substrates evaluated. *Department of Biotechnology, Lund University.*, 1-14.
- Ballesteros, M. (2004). Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous. *Process Biochemistry* , 1843–1848.
- Barbosa, M. (1992). Efficient Fermentation of Pinus sp. Acid Hydrolysates by an. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 1382-1384.
- Bello, D. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método de ácido 3,5 dinitrosalicílico. (*ICIDCA*) *Instituto Cubano de Investigaciones de los*, 45-50.
- BRIDSONA, E. Y. (1973). ISterilization of Culture Media. En E. Y. BRIDSONA, *Design and Formulation of Microbia* (págs. 230-297).

- By J. Holm. (1986). A rapid Method for the Analysis of Starch. *Department of*, 224-226.
- Carrasco, C. (2015). SO₂-catalysed steam pretreatment of quinoa. *J Chem Technol Biotechnol* , 64-71.
- Cartes, P. (2005). Viabilidad de las Cepas de *Lactobacillus casei shirota* y. *UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE*, 1-88.
- Charalampopoulos, D. (2003). Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 133 – 141.
- Crittenden, R. (2001). Selection of a Bifidobacterium strain to complement resistant. *Journal of Applied Microbiology* , 268-278.
- Da Silva, A. (2010). Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*, 7402–7409.
- Doyla Arzapalo Quintoa, K. H. (2015). EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ALMIDÓN DE TRES. *Rev Soc Quím Perú*, 44-54.
- DSMZ, M. (2012). MRS medium whit cysteine.
- Duncan, S. (2009). The role of pH in determining the species composition. *Environmental Microbiology*, 2112–2122.
- Escobar, L. F. (2010). EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus casei* Y PRODUCCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO USANDO. *Rev. Invest. Univ. Quindío*, 42-49.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in. *Food and Agriculture Organization*, 1-11.
- Farnworth, E. (2007). Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *International Journal of Food Microbiology* , 174-181.
- Fernandes, T. (2009). Effects of thermo-chemical pre-treatment on anaerobic biodegradability. *Bioresource Technology*, 2575–2579.
- Fernando, M. (2010). Co-culture with potentially probiotic microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* , 19-29.
- Gandhi, A. a. (2015). Effect of salt on cell viability and membrane integrity of *Lactobacillus*. *Food Microbiology*, 197-202.

- Garcia, G. E., & Serna, C. L. (2015). Viabilidad de una bacteria láctica encapsulada e incorporada en una matriz de cobertura de chocolate. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7.
- Garcia, M. (2015). Isolation and in vitro selection of actinomycetes strains as potential. *Veterinary World, EISSN*, 2231-0916.
- Georgiova, T. (2009). Comparison of the Results of Serum Total Protein Concentration. *Tubitak*, 67-70.
- Gonzales, B. A., & Domínguez-Espinosa, R. (2008). Aloe vera. *Cienc.* , 152-157.
- Gonzales, M. R. (2009). "Aislamiento y selección de cepas del género *lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora". Barcelona.
- Hames. (2008). *Preparation of Samples for Compositional Analysis*. Colorado: National Renewable Energy Laboratory.
- Hames, B. (2008). preparation of samples for compositional analysis. *Midwest Research Institute*, 1-9.
- Hames, B. (2008). Preparation of Samples for Compositional Analysis. *National Renewable Energy Laboratory*, 1-12.
- Hammerly, M. (1976). *Viva más y mejor*. (Vol. Tomo II). Buenos Aires: Sudamericana.
- Hera, E. D. (2012). Influence of maize flour particle size. *J Sci Food Agric*, 1-9.
- Hernández, R. J. (2016). Fixed-bed bioreactors in the kinetics of glucose isomerization. *Agronomía Colombiana*, 266-269.
- Huang, C. (2009). Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology* , 4535–4538.
- HWANG, J. W. (1999). Effects of pH and Dissolved Oxygen on Cellulose Production by. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 183-188.
- Jancurová. (2009). Quinoa. *Department of Food Science and Technology*, 71-79.
- Kemppainen a, K. †. (2014). Hydrolysis and composition of recovered fibres fractionated from solid. *Bioresource Technology*, 88-95.
- Kneifel, W. (2009). In vitro growth behaviour of probiotic bacteria in. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 27-34.

- Koch, A. a. (1971). Sensitive Biuret Method for Determination of Protein. En A. a. Koch, *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (págs. 239-245). Indiana: Department of Microbiology, Indiana University.
- Korakli, M. G. (2002). Metabolism by bifidobacteria and lactic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 958-965.
- LEGRAS, J.-L., MERDINOGLU, D., & KARST, J.-M. C. (2007). Blackwell Publishing Ltd Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity. *Molecular Ecology*, 2091-2102.
- Lenihan, P. A. (2010). Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chemical Engineering Journal*, 395-403.
- Lorna J Smith, L. J., & Klaus M Fiebig, H. S. (1996). The concept of a random coil. *Address: Oxford Centre for Molecular Sciences and New Chemistry*, 95-107.
- Louis, K. S. (2007). Understanding the effects of diet on bacterial metabolism. *Journal of Applied Microbiology*, 1364-5072.
- Lu, X. (2009). Optimization of H₂SO₄-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw. *Bioresource Technology*, 3048-3053.
- Lubran, M. (1978). The Measurement of Total Serum Proteins. *Institute for Clinical Science*, 106-111.
- Lucas, A. (2004). Probiotic cell counts and acidification in fermented milks. *International Dairy Journal*, 47-53.
- Man, R. a. (1960). A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. *oppl. Bact.*, 130-135.
- Mani-López, E. (2014). probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented. *American Dairy Science association*, 2578-2590.
- Marlene, I. (1998). On the Iron Requirement of Lactobacilli Grown in Chemically. *CURRENT MICROBIOLOGY*, 64-66.
- Martin, M. J., Lara-Villoslada, F., & Ruiz, M. A. (2014). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1-35.
- MENCONI, A. (2014). Identification and Characterization of Lactic Acid. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 25-30.
- Meyhuay, M. (1997). *QUINUA*. Perú: AGSI/FAO.

- Mogha, K. (2016). Probiotics for treating bacterial vaginosis. *Reviews in Medical Microbiology 2016*, 27:87–94, Probiotics for treating bacterial vaginosis.
- Moshi, y. c. (2013). High bioethanol titre from *Manihot glaziovii* through fed-batch simultaneous. *BIOFUELS AND BIOREFINERIES*, 1-25.
- Moyad, M. A. (2007). Brewer's/Baker's Yeast. *Complementary and preventive medicine*, 560-561.
- Mozzi, F. (1994). Effect of culture pH on the growth characteristics and polysaccharide production by *Lactobacillus casei*. *Milchwissenschaft*, 667-669.
- Mozzi, F. (2003). UDP-galactose 4-epimerase: a key enzyme. *Journal of Applied Microbiology* , 175-183.
- Nancib, A. (2005). Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation. *Bioresource Technology 96 (2005) 63–67*, 63-67.
- Oelke, E. (1992). quinoa. *Field crops manual*, 1-4.
- Ogawa, T., Asai, Y., & R. Tamai. (2005). Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei ssp. casei*. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*, 103-109.
- Onyango, C. (2006). Influence of incubation temperature and time on resistant starch. *Carbohydrate Polymers*, 494–499.
- Otero, M. (2000). Tecnología para la utilización integral de la levadura de cerveza en la industria alimenticia. *Archivos latinoamericanos de la nutrición*, 361-365.
- Oxoid, m. p. (2001-2017). MRS BROTH (DE MAN, ROGOSA, SHARPE). *Thermo Scientific*, 1.
- Pajarito, J. (2005). OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA. *Departamento de Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química*, 1-45.
- Park, S. H. (2005). Effect of whole quinoa flours and lipase on the chemical, Rheological and Breadmaking Characteristics of wheat flour. *The japanese society of applied glycoscience*, 337-343.
- Perdigon, G. (1999). Study of the Possible Mechanisms Involved. *Journal of Dairy Science* , 1108-1114.
- Popova, M. (2012). Beneficial effects of probiotics in upper respiratory tract. *Journal of Applied Microbiology* , 1364-5072.

- QuimiNet. (2011). La glucosa líquida o jarabe de glucosa en la industria. *QuimiNet*, 1.
- Ranhotra, G. (1993). Composition and protein nutritional quality of quinoa. *American Association of cereal chemists, Inc*, 303-306.
- Rashid, R. y. (2015). Effect of hydroxypropylcellulose and Tween 80 on physicochemical properties and bioavailability of ezetimibe-loaded solid dispersion . *Carbohydrate polymers*, 1-25.
- Rodriguez-Sandoval, E. (2012). EFFECT OF QUINOA AND POTATO FLOURS. *Brazilian Journal*, 503-510.
- Roldán, L. M. (2011). Efecto inhibidor de. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 37-41.
- RUSSELL, J. B. (1980). Effect of pH on the Efficiency of Growth by Pure Cultures of. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,, 604-610.
- Saarela, M. (2005). Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell. *Journal of applied microbiology*, 1330–1339.
- Sanchez, B. (2007). Adaptation and Response of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 6757-6767.
- Santos, J. (2016). Biomass Pretreatment with Oxalic acid for Value-Added Products. En S. I. Mussatto, *Biomass fractionation technologies for a lignocellulosic feedstock based biorefinery* (págs. 57-77). Amsterdam: Sarah Jane Watson.
- Sarah Finn, O. C. (2013). Mechanisms of survival, responses, and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. *Frontiers in Microbiology*, 1-28.
- SHAH, D. A. (1998). Ingredient Supplementation Effects on Viability. *Journal of Dairy Science*, 2804–2816.
- Shah, N. T. (2003). Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*., *American Dairy Science Association*, 2288–2296.
- Sluiter, A. (2008). *Determination of Total Solids in*. Union Sovietica: National Renewable Energy Laboratory.
- Sodini I., A. L. (2002). Effect of Milk Base and Starter Culture on Acidification, Texture, and. *American Dairy Science Association*, 2479–2488.
- Stanton, C. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their. *Current Opinion in Biotechnology*, 198–203.

- Talebna, F. (2010). Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment,. *Bioresource Technology*, 4744–4753.
- Tharmaraj, N. a. (2003). Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*,. *American Dairy Science Association*, 2288–2296.
- Thuresson, C. (2015). Development and studies on a gluten free, liquid suspension. *Swedish University of Agricultural Sciences*, 1-43.
- Trapezar, M. (2011). The use of a porcine intestinal cell model system for. *Acta pathologica, microbiologica et immunologica escandinavica* , 877-884.
- Trejo, F. M., & Pérez, P. F. (2010). Co-culture with potentially probiotic microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* , 19-29.
- Urquizo, F. (2016). Desarrollo de una bebida a base de quinoa fermentado. *Ciencia de los Alimentos y Nutrición*, 1-6.
- Valencia-Chomorro. (2003). Encyclopedia of food Science and Nutricion. *Academic Press, Amsterdam*, 4895-4902.
- Verardi, A., & De Bari, I. (2012). Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass:. En M. A. Lima, *Bioethanol* (págs. 95-122). Croacia: INTECH.
- Vinderola, C. G. (1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum*. *International Dairy Journal* 9 (1999) 497-505, 497-505.
- Yang, T. A.-T. (2002). production of L(+)-Lactic Acid From Glucose and Starch by Immobilized Cells of *Rhizopus oryzae* in a Rotating Fibrous Bed Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 1-12.
- Zechman, L. a. (1991). Journal of food science. *Journal of food science*, 1408-1412.

ANEXOS

ANEXO 1

Preparación del reactivo del ácido 3,5 dinitrosalicílico

Se pesan 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 150 g de tartrato de Na-K y 8 g de NaOH. Se disuelve el NaOH en 200 ml de agua destilada y se añade en agitación el tartrato de Na-K lentamente. Se completa con agua destilada hasta 400 ml y se comienza a añadir lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico. Se deja en agitación toda la noche, se enrasa a 500 ml y se filtra.

ANEXO 2

Preparación del reactivo de Biuret

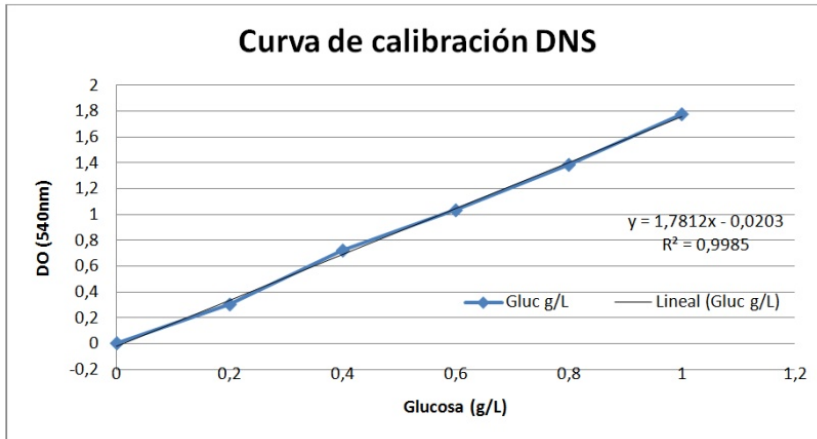
Contenido del reactivo de Biuret: NaOH, 6M (disolver 240 grs. NaOH en 800ml de agua destilada. Enfriar y diluir a 1 l.).

Reactivo	Concentración	Volumen o peso
NaOH		
100ml	1M	100mL
CuSO ₄ .5H ₂ O		8grs.
KOOC-(CHOH) ₂ -COONa.4H ₂ O		9grs.
KI		5grs.
Agua destilada c.s.p.		1000mL

Disolver 3 grs. CuSO₄.5H₂O en aproximadamente 500 ml de agua. Adicionar 9 grs. tartrato sódico potásico [KOOC-(CHOH)₂-COONa.4H₂O] y 5 grs. KI. Cuando la solución esta claro adicionar 100 ml NaOH 6 M y diluir a 1 l. con agua destilada

ANEXO 3

Curva de calibración DNS



ANEXO 4

Curva de calibración Biuret

