

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**“DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO DE BAJO COSTO PARA EL
CRECIMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EMPLEADAS
COMO POTENCIAL AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO DE LA
PRODUCCIÓN DE OCRATOXINA A”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

I.B.I. GLORIA ANGÉLICA DOMÍNGUEZ GUTIÉRREZ

Directora: Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Comité asesor: Dra. Isabelle Perraud-Gaime
Institut de la Recherche pour le Développement (IRD, Francia)

Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

Ciudad de México

Noviembre de 2019



Diseño de un medio de cultivo de bajo costo para el crecimiento de bacterias ácido lácticas como potencial agente de control biológico contra *Stenotrophomonas* A

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 27 del mes de noviembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENOIA
DRA. ELENA ISABEL CHAMPION MARTINEZ
M. EN G. RUBÉN ESPINOSA SALGADO
DRA. LUZ MARIA ZENIT TOVAR CASTRO



S. DÑA. ANGELICA DOMÍNGUEZ GUTIÉRREZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaría la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA
DE: GLORIA ANGELICA DOMÍNGUEZ GUTIÉRREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISED
MRS. ROSALBA BERNARDO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBB
DRA. LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE
DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENOIA

VOCAL
DRA. ELENA ISABEL CHAMPION MARTINEZ

VOCAL
M. EN G. RUBÉN ESPINOSA SALGADO

SECRETARIA
DRA. LUZ MARIA ZENIT TOVAR CASTRO

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana de la Unidad Iztapalapa está incluida en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con la referencia 001466. GADG agradece el apoyo de la beca del CONACyT (CVU 868699) y de la Universidad Autónoma Metropolitana para la obtención de grado de Maestra en Biotecnología. Se agradece el apoyo del Proyecto Angelica (273656) de la parte de CONACyT (México y la Agence Nationale de la Recherche, ANR, de Francia

Agradecimientos

Al Dr. Gerardo Saucedo por su apoyo, dirección y asesoría para el desarrollo de este trabajo, así como por todas sus enseñanzas y consejos.

A la Dra. Gabriela Rodríguez por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y por la asesoría brindada.

A la Dra. Isabelle Perraud-Gaime por compartir su conocimiento conmigo y por su apoyo.

Al Dr. Héctor Escalona por su asesoría que fue de gran importancia para llevar a cabo este trabajo, así como por haber formado parte del comité de evaluación.

A la Dra. Luz Tovar, Dra. Isabel Champion y el M. en B. Rubén Espinosa por aceptar formar parte del comité de evaluación y por sus valiosos comentarios.

A todos mis compañeros y excompañeros que forman parte del grupo de trabajo del proyecto ANGELICA por su apoyo en la realización de ciertas técnicas y por su ayuda en la resolución de dudas.

A Aydín por sus comentarios, críticas constructivas y apoyo.

A mis padres que, a pesar de la distancia, siempre estuvieron conmigo y me han apoyado en todo momento, muchas gracias.

Resumen

La Ocratoxina A (OTA) es un metabolito secundario tóxico, teratogénico y posiblemente carcinógeno producido por especies de hongos filamentosos superiores de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Contamina alimentos de consumo humano, como el café que se presume como la bebida más popular del mundo después del agua. La subsistencia de 100 millones de personas en el mundo depende del café. Una estrategia para reducir la presencia de OTA en los granos de café es el control biológico mediante el uso de bacterias ácido lácticas (BAL), pues se ha demostrado que estas bacterias ejercen un efecto inhibitorio en los hongos productores de OTA; sin embargo, dichas bacterias requieren medios ricos en nutrientes para poder crecer. Una consecuencia de lo anterior es que el medio de cultivo podría resultar costoso, por lo que en el presente trabajo se desarrollaron metodologías para diseñar un medio de cultivo de bajo costo para la obtención de biomasa de BAL y su posterior aplicación como agente de biocontrol de hongos productores de OTA.

En la primera etapa experimental, se hizo un análisis de los componentes del medio MRS (De Man, Rogosa, Sharpe), especialmente de las potenciales fuentes de nitrógeno (N) alternas provenientes de cereales y granos. El extracto de carne (EC) y la peptona de carne (PC) resultaron ser los componentes más costosos (8000 \$/kg) del medio MRS y las fuentes de N alternas fueron más económicas (más de un 90 % menos del costo del EC y la PC). Posteriormente se analizó la concentración de N presente en el medio de cultivo MRS y en las fuentes de N alternas para diseñar el medio de cultivo con la finalidad de que suplieran la falta de N por la eliminación del EC y la PC.

La selección de la fuente de N alterna se realizó mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) de *Lactobacillus plantarum* presentes en

cultivos en medios formulados con dichas fuentes. De entre todas las fuentes de N estudiadas el extracto de germen de malta (EGM), residuo de la industria cervecera, resultó ser la mejor opción pues se obtuvieron concentraciones celulares cercanas a las obtenidas con el medio de referencia MRS (3×10^9 UFC/mL), el EGM se empleó como fuente de N para los siguientes ensayos.

En una segunda etapa se seleccionaron las variables importantes para el diseño del medio de cultivo mediante un diseño experimental del tipo Plackett-Burman (PB). Las variables de respuesta fueron la concentración de biomasa y su productividad. Se realizaron cinéticas de crecimiento y los datos experimentales de concentración de biomasa se ajustaron al modelo Logístico. Se observaron diferencias entre los tratamientos evaluados, con algunos se obtuvo una mejor respuesta (concentración de biomasa y productividad de biomasa) que con otros tratamientos. Se demostró que el EGM es una fuente de N alterna competitiva que puede suplir al EC y la PC. Por otro lado, los factores que ejercen un mayor efecto sobre la biomasa y la productividad de biomasa fueron la concentración de acetato de sodio y de sulfato de magnesio por lo que dichos factores se seleccionaron para la optimización de la composición del medio de cultivo.

En la tercera etapa se buscó optimizar la composición del medio de cultivo para mejorar la concentración de biomasa y la productividad de biomasa de *L. plantarum* mediante un diseño factorial central compuesto (DFCC) acoplado a la metodología de superficie de respuesta (MSR) empleando al acetato de sodio y sulfato de magnesio como factores del diseño experimental. Se realizaron cinéticas de crecimiento y formación de ácido láctico (AL), los datos experimentales se ajustaron a modelos matemáticos; no se encontraron diferencias entre los tratamientos, pero se obtuvieron valores similares a los obtenidos con el medio MRS (4 g/L de biomasa y 15 g/L de AL, respectivamente).

Se estudió a fondo el efecto de los factores sobre la concentración de biomasa y productividad mediante el diseño experimental.

La metodología de superficie de respuesta mostró cuatro niveles de los factores donde la respuesta (concentración de biomasa y productividad de biomasa) era similar y elevada por lo que se validó el modelo experimentalmente probando los niveles encontrados. Se confirmó que en dichos niveles la formación de biomasa y la productividad era la máxima resultando en un medio de cultivo mucho más económico que el medio de referencia (MRS) y teniendo la conveniencia de elegir entre las diferentes concentraciones estudiadas de los factores. Además, la viabilidad de las células se comprobó mediante conteos celulares en placas, en el medio formulado con EGM se alcanzaron valores de hasta 5×10^9 UFC/mL.

Finalmente, se comprobó el efecto inhibitorio de *L. plantarum* crecido en el medio optimizado sobre *A. carbonarius* mediante la técnica de cultivo en medios envenenados empleando por un lado el extracto libre de células (ELC) de 24 y 96 horas de cultivo y por otro a las células. El mayor efecto inhibitorio se manifestó en cultivos con ELC de 96 h, con un 50 % de inhibición de crecimiento radial del hongo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que un medio de cultivo formulado con EGM es una alternativa económica y muy competitiva con el medio de cultivo MRS dándole además un valor agregado a un subproducto de la industria cervecera; no obstante, es necesario investigar más a fondo los productos de fermentación de *L. plantarum* en un tiempo de cultivo de hasta 96 h para mejorar su capacidad inhibitoria en hongos filamentosos.

Abstract

Ochratoxin A (OTA) is a toxic, teratogenic and possibly carcinogenic secondary metabolite produced by species of higher filamentous fungi of the *Aspergillus* and *Penicillium* genera. It contaminates food for human consumption, such as coffee that is presumed to be the most popular beverage in the world after water. The livelihood of 100 million people in the world depends on coffee. A strategy to reduce the presence of OTA in coffee beans is biological control using lactic acid bacteria (LAB). As it has been shown that these bacteria exert an inhibitory effect on OTA-producing fungi; However, these bacteria require nutrient rich media to grow. A consequence of the above is that the culture medium could be expensive. It is why in the present work different methodologies were developed to design a low-cost culture medium for the obtaining of LAB biomass and its later application like agent of biocontrol of fungi producing OTA.

In the first experimental stage, an analysis was made of the cost of the components of MRS medium (De Man, Rogosa, Sharpe), specially cereals and grains as potential alternative nitrogen source (N) from cereals and grains. Meat extract (EC) and meat peptone (PC) are the most expensive components (\$ 8 000 / Kg) of MRS broth, by the other side, alternative sources of N were low cost (more than 90% less than EC and PC). Subsequently, the Nitrogen concentration present in the MRS culture medium and in the alternate sources of N were analyzed to design the culture medium that would replace the lack of N due to the elimination of EC and PC.

The selection of the alternate N source was made by counting Colony Forming Units (CFU/mL) of *Lactobacillus plantarum* present in cultures in media formulated with alternate N source. Among all the sources of N studied, the malt germ extract (EGM), a residue of the beer industry, proved to be the best option because cell

concentration attained were close to that obtained with the MRS reference medium (3×10^9 CFU / mL); EGM was used for the following tests.

In second stage, the variables important for the design of the culture medium were selected through an experimental Plackett-Burman (PB) design. The response variables were the concentration biomass and its productivity. Growth kinetics were performed, the experimental biomass concentration data were adjusted to the Logistic model. Differences were observed between the treatments evaluated, in some cases a better response (biomass concentration and its productivity) was obtained than with other treatments it was demonstrated that the EGM is a source of alternating N very competitive with the EC and the PC. Otherwise, the factors that exert a greater effect on biomass and productivity were the concentration of sodium acetate and magnesium sulfate, so these factors were selected for the optimization of the composition of the culture medium.

In the third stage, we sought to optimize the composition of the culture medium to improve the biomass concentration and biomass productivity of *L. plantarum* through a composite central factorial design (DFCC) coupled to response surface.

The response surface methodology showed four levels of the factors where the response (biomass concentration and biomass productivity) was high and similar, so the model was validated experimentally by testing the levels found. It was confirmed that at these levels the biomass formation and productivity were close the maximum resulting in a much more economical culture medium than the reference medium (MRS) and having the convenience of choosing between the different concentrations studied of the factors. In addition, the viability of the cells

grown was checked by cell count in plates, in the medium formulated with EGM reached values of up to 5×10^9 CFU / mL.

Finally, the inhibitory effect of *L. plantarum* grown in the optimized medium on *A. carbonarius* was checked by means of the poisoned media culture technique using the cell-free extract (ELC) of 24 and 96 hours of culture and on the other hand to the cells. The greatest inhibitory effect was manifested in cultures with 96 h ELC, with 50% of inhibition of radial growth of the fungus.

The results obtained in the present work demonstrate that a culture medium formulated with EGM is an economical and competitive alternative with the MRS culture medium, also giving added value to a by-product of the beer industry; however, it is necessary to further investigate the fermentation products of *L. plantarum* in a cultivation time of up to 96 h to improve their inhibitory capacity in filamentous fungi with EGM

Índice de contenido

1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Bacterias ácido lácticas	4
2.1.1 <i>Lactobacillus</i>	5
2.2 Condiciones ambientales para el cultivo de BAL.....	7
2.3 Medios de cultivo.....	8
2.4 Fuentes de nitrógeno y carbono alternas	9
2.5 Modelos cinéticos.....	11
2.5.1 Modelo Logístico.....	12
2.5.2 Modelo de Luedeking-Piret.....	13
2.6 Diseños experimentales.....	13
2.6.1 Diseño de Plackett-Burman	14
2.6.2 Diseño factorial central compuesto.....	15
3 ANTECEDENTES DIRECTOS.....	17
4 JUSTIFICACIÓN.....	19
5 HIPÓTESIS	20
6 OBJETIVOS	21
6.1 General.....	21
6.2 Particulares.....	21
7 METODOLOGÍA.....	22
7.1 Microorganismo y condiciones de activación	23
7.2 Selección de fuentes de N alternas.....	23
7.3 Concentración de C, H y N de la cepa empleada, medio MRS y fuentes de N alternas.....	24
7.4 Análisis de costos del medio MRS, fuentes alternas y su análisis de inclusión.....	26
7.5 Preparación del inóculo y fermentación.....	27
7.6 Composición del medio y condiciones de cultivo	29
7.7 Determinación de biomasa	33
7.8 Determinación de ácido láctico	35

7.9 Ajuste del modelo cinético.....	35
7.10 Análisis estadístico	37
7.11 Ensayos de inhibición de crecimiento de <i>A. carbonarius</i>	39
7.11.1 Cultivo en medios envenenados con ELC	40
7.11.2 Cultivo en medios envenenados con células de BAL.....	41
8 ENSAYOS PRELIMINARES.....	43
8.1 Análisis de costos del medio MRS y fuentes alternas de nitrógeno	43
8.2. Análisis del contenido de C, H y N	45
8.2.1 Concentración de C, H y N de <i>L. plantarum</i> y medio MRS.....	45
8.2.2 Concentración de C, H y N de las fuentes alternas de N	47
8.2.3 Análisis de inclusión de las fuentes alternas al medio MRS.....	49
8.2 Concentración de biomasa.....	51
8.4 Conclusiones parciales	53
9 SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO	55
9.1 Análisis de las cinéticas de crecimiento.....	55
9.2 Análisis de los resultados del Diseño de Plackett-Burman.....	61
9.3 Conclusiones parciales	69
10 OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.....	71
10.1 Análisis de las cinéticas de crecimiento.....	71
10.2 Análisis estadístico del Diseño Factorial Central Compuesto (DFCC).....	84
10.3 Validación del DFCC	90
10.4 Conclusiones parciales.....	98
11. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE <i>Aspergillus carbonarius</i>	100
11.1 Efecto del extracto libre de células sobre el crecimiento de <i>A. carbonarius</i>	100
11.2 Efecto de células de BAL sobre el crecimiento de <i>A. carbonarius</i>	106
11.3 Conclusiones parciales.....	108
12. CONCLUSIONES GENERALES	109
13. REFERENCIAS.....	111
14. ANEXOS	116

Índice de Figuras

Figura 2.1 Fases del crecimiento bacteriano	11
Figura 2.2 Ejemplo de arreglo del DFCC,	16
Figura 7.1 Diagrama de la estrategia experimental seguida para el diseño de cultivo de bajo costo.....	22
Figura 7.2 Arreglo de la cámara de Neubauer	29
Figura 7.3 Representación del método de diluciones sucesivas.....	34
Figura 8.1 Concentración de C, H y N de <i>L. plantarum</i> B031, el medio MRS y sus fuentes de N.....	46
Figura 8.2 Concentración de proteína reportada en la literatura de las fuentes de N alternas.....	47
Figura 8.3 Composición de N, H y C de las fuentes alternas por análisis propios.	48
Figura 8.4 Número de células en UFC/mL de <i>L. plantarum</i> B031.....	53
Figura 9.1 Curvas de crecimiento del medio MRS probado a diferentes temperaturas y pH.....	56
Figura 9.2 Curvas de crecimiento de los medios de prueba empleados para el diseño de PB.	58
Figura 9.3 Productividad de biomasa a las 24 y 48 h de los medios de cultivo alternativos (M), los controles (m) y el MRS.....	61
Figura 9.4 Diagramas modificados de Pareto para la concentración de biomasa..	64
Figura 9.5 Diagramas modificados de Pareto para la productividad de biomasa a los diferentes tiempos del cultivo.....	65
Figura 9.6 Diagramas de efecto de medias para la concentración de biomasa a las 4, 12, 18 y 24h.....	67
Figura 9.7 Diagrama de efecto de medias para la productividad de biomasa a las 4, 12, 18 y 24 h.....	68
Figura 10.1 Curvas de crecimiento de los medios empleados para el DFCC.	74
Figura 10.2 Curvas de formación de AL de los medios empleados para el DFCC.	79
Figura 10.3 Diagrama de barras para a) concentración de biomasa a las 18 h y b) productividad de biomasa a las 18 h.....	82
Figura 10.4 Diagrama de barras para a) concentración de AL a las 18 h y b) $Y_{P/X}$ a las 18 h correspondiente a los medios de cultivo empleados para el DFCC.	83

Figura 10.5 Diagramas de Pareto para las variables de respuesta a) concentración de biomasa a las 18 h y b) productividad de biomasa a las 18 h.	86
Figura 10.6 Superficies de respuesta correspondientes a a) concentración de biomasa y b) productividad de biomasa.	88
Figura 10.7 Cinéticas de crecimiento correspondientes a los medios de cultivo: a) MRS, b) V1 y v1, c) V2 y v2, d) V3 y v3, e) V4 y v4.	91
Figura 10.8 Cinéticas de formación de AL correspondientes a los medios de cultivo: a) MRS, b) V1 y v1, c) V2 y v2, d) V3 y v3, e) V4 y v4.	93
Figura 10.9 Cuenta en placa correspondiente a <i>L. plantarum</i> B031 cultivado en medio MRS, V1, V2, V3, V4 y sus respectivos controles (v1, v2, v3 y v4).....	97
Figura 11.1 Cultivo de <i>A. carbonarius</i> en medios envenenados con extracto libre de células de 24 h correspondiente a los medios MRS, V1 y v1	102
Figura 11.2 Cultivo de <i>A. carbonarius</i> en medios envenenados con extracto libre de célula de 96 h correspondiente a los medios MRS, V1 y v1	103
Figura 11.3 Inhibición del crecimiento radial de <i>A. carbonarius</i> en medios envenenados con ELC de 24 h	104
Figura 11.4 Inhibición del crecimiento radial de <i>A. carbonarius</i> en medios envenenados con ELC de 96 h	106
Figura 11.5 Cultivo de <i>A. carbonarius</i> en medios envenenados con células BAL crecida en los medios MRS, V1 y v1	107
Figura 11.6 Inhibición del crecimiento radial de <i>A. carbonarius</i> en medios envenenados con células BAL	108

Índice de Tablas

Tabla 2.1 Matriz Plackett-Burman para evaluar el efecto de 7 factores con 8 ensayos	15
Tabla 7.1 Fuentes de proteína reportados en la literatura.....	24
Tabla 7.2 Composición del medio de cultivo MRS.	27
Tabla 7.3 Formulación de medios de cultivo para la selección de la fuente de N.	30
Tabla 7.4 Formulación de medios de cultivo para el diseño de Plackett-Burman	31
Tabla 7.5 Formulación de medios de cultivo empleados para el diseño factorial central compuesto	32
Tabla 7.6 Formulación y codificación de los medios de cultivo empleados para la comprobación del DFCC.....	33
Tabla 7.7 Codificación de niveles empleados en el diseño de PB.....	37
Tabla 7.8 Valores reales de los niveles empleados en el diseño de PB.....	38
Tabla 7.9 Niveles centrales y unidad de variación empleados para el diseño PB.	38
Tabla 7.10 Valores reales y valores codificados empleados en el DFCC.....	39
Tabla 7.11 Tratamientos empleados para el cultivo en medios envenenados con ELC.....	40
Tabla 7.12 Tratamientos empleados para el cultivo en medios envenenados con células.....	42
Tabla 8.1 Costo del medio MRS y sus componentes.....	44
Tabla 8.2 Precio de las fuentes de N alternas por kg.....	45
Tabla 8.3 Concentración de proteína por el método de BCA y expresada en N de los extractos.	49
Tabla 8.4 Análisis de concentración de N requerida para el medio de cultivo alternativo.....	50
Tabla 8.5 Concentración de fuentes alternas por añadir al MRS.....	51
Tabla 9.1 Parámetros obtenidos con el modelo logístico (μ y X_{\max}) a partir de las curvas de crecimiento obtenidas en los medios MRS y los medios M_i del diseño Plackett Burman y sus respectivos controles m_i	59
Tabla 9.2 Coeficientes de determinación (R^2) correspondientes a las variables de respuesta del diseño PB.....	62
Tabla 9.3 Coeficientes de regresión para la concentración de biomasa en los distintos tiempos de cultivo.....	69

Tabla 9.4 Coeficientes de regresión para productividad de biomasa durante el cultivo de BAL.....	69
Tabla 10.1 Parámetros estimados mediante el modelo Logístico para los diferentes medios (MRS, M y m).	76
Tabla 10.2 Parámetros estimados mediante el modelo de Luedeking-Piret para los diferentes medios (MRS, M_i y m_i).	80
Tabla 10.3 Coeficientes de determinación correspondientes a las variables de respuesta del DFCC.	85
Tabla 10.4 Coeficientes de regresión correspondientes a cada variable de respuesta.	87
Tabla 10.5 Puntos experimentales para validar la ecuación de regresión correspondiente a cada variable de respuesta.....	89
Tabla 10.6 Valores predichos contra valores experimentales.	95
Tabla 10.7 Factor de incremento de los medios M comparado con los medios MRS y medios control respectivos.....	98

Abreviaturas

AL:	Ácido láctico
AM:	Amaranto
AV:	Avena
BAL:	Bacterias ácido lácticas
BCA:	Ácido bicinconínico
C:	Carbono
Ch:	Cacahuete
CEDA:	Central de abasto de la Ciudad de México
DFCC:	Diseño factorial central compuesto
EC:	Extracto de carne
EGM:	Extracto de germen de malta
EGMC:	Extracto de germen de malta de cebada
EGMM:	Extracto de germen de malta de maíz
EL:	Extracto de levadura
ELC:	Extracto libre de células
GC:	Germen de malta de cebada
GM:	Germen de malta de maíz
HS:	Harina de soya
HT:	Harina de trigo
L:	Lenteja
LP:	Levadura de pan
MCTLR:	Medio control
MEGMC:	Medio con extracto de germen de malta de cebada
MEGMM:	Medio con extracto de germen de malta de maíz
MRS:	Medio de cultivo De Man Rogosa y Sharpe
MSR:	Metodología de superficie de respuesta
N:	Nitrógeno
OTA:	Ocratoxina A
PB:	Plackett-Burman
PC:	Peptona de carne
PD:	Proteína de deportistas (aislado de suero de leche)
T:	Trigo

1 INTRODUCCIÓN

La Ocratoxina A (OTA) es un metabolito secundario tóxico, teratogénico producido por especies de hongos filamentosos superiores pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Contamina alimentos de consumo humano, principalmente cereales y derivados, bebidas alcohólicas y productos de molienda como café, cacao entre otros alimentos (Abreu *et al.*, 2011).

Esta ocratoxina induce toxicidad, incluida la nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, teratogenicidad, inmunotoxicidad, neurotoxicidad y genotoxicidad. Además, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado a la OTA como un carcinógeno del Grupo 2, es decir posible carcinógeno humano. Otros efectos que puede provocar son: el estrés oxidativo, apoptosis celular, autofagia celular, inhibición de síntesis de proteínas, alteración sobre la respiración celular, y secuestro de calcio microsomal (Zhu *et al.*, 2017).

Por otra parte, posiblemente el café es la bebida más popular del mundo después del agua. La subsistencia de 100 millones de personas en el mundo depende del café. Existen dos variedades de café, Robusta y Arábica. El proceso de secado de ambos se lleva a cabo de diferente manera, para el café Arábica se realiza por el método húmedo y para el café Robusta se realiza por método natural o seco. Este método consiste en secar la cereza entera mediante la limpieza, secado y descascarillado del fruto. Un café que no haya secado lo suficiente, será propenso a un rápido deterioro ocasionado por hongos y bacterias (ICO, 2012).

La OTA presenta un riesgo sobre la salud humana por lo que la Unión Europea ha considerado necesaria una regulación específica que permita reducir su ingesta en un rango de productos incluido el café. Los máximos niveles

permitidos de OTA en el café son 5 µg/kg para café tostado y molido y 10 µg/kg para el café instantáneo (Ec, 2000).

Se han desarrollado métodos físicos para controlar la ocurrencia de hongos ocratoxigénicos en las cerezas del café, pero aún no se ha propuesto una estrategia eficiente para reducir la presencia de OTA, pues es capaz de resistir incluso al proceso de tostado (Dalié *et al.*, 2010). La detoxificación con agentes químicos está prohibida en alimentos destinados al consumo humano por lo que una solución sería el control biológico mediante el uso de bacterias ácido lácticas (BAL), pues se ha demostrado que estas bacterias ejercen un efecto inhibitorio en los hongos productores de OTA (Belkacem-Hanfi *et al.*, 2014; Djossou *et al.*, 2011; Flores-Nájera *et al.*, 2011; Flores-Nájera *et al.*, 2011).

Las BAL son un grupo de microorganismos con la capacidad de producir ácido láctico (AL). Son grampositivas, ácidotolerantes, no forman esporas, son inmóviles, tienen forma de cocos o bacilos, crecen anaeróticamente, pero a diferencia de la mayoría de los anaerobios, crecen en presencia de O₂ como microorganismos "anaerobios aerotolerantes" (Aznar & Zúñiga, 2000). Son un antagonista biológico natural con varias aplicaciones potenciales. Tradicionalmente son empleadas en la industria alimentaria como cultivos iniciadores (starters) en la industria láctea y probióticos en suplementos dietéticos, así como agentes de bioconversión, de la misma manera como agentes conservantes para evitar el deterioro y extender la vida útil de alimentos (Zhang & Cai, 2014).

Estas bacterias tienen requerimientos nutricionales muy exigentes como carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y minerales por lo que generalmente se cultivan en medios enriquecidos y se encuentran en productos lácteos, carne y sus derivados así como en productos de cereales (Carr *et al.*, 2002). El medio de

cultivo más usado para el crecimiento de estas bacterias es el MRS (denominado así por sus formuladores Man, Rogosa y Sharpe) por su capacidad de proveer los nutrientes necesarios para su crecimiento (De Man *et al.*, 1960); sin embargo, es un medio muy caro debido a la presencia de sus componentes lo que vuelve al crecimiento de las BAL un proceso muy costoso. Una propuesta para disminuir costos del medio de cultivo es el empleo de fuentes de nitrógeno (N) provenientes de cereales o granos ricos en proteína, vitaminas, minerales y aminoácidos.

Algunos estudios han demostrado que la selección adecuada de BAL podría permitir el control del crecimiento de estos hongos y mejorar la vida útil de muchos productos como el café y, por lo tanto, reducir los riesgos para la salud debido a la exposición a la OTA (Gourama & Bullerman, 1997).

El objetivo de este trabajo es diseñar un medio de cultivo de bajo costo para la obtención de biomasa de BAL con componentes originales del MRS, pero reemplazando las fuentes costosas de nitrógeno como el extracto de carne (EC) y peptona de carne (PC) por fuentes económicas y variando concentraciones de las sales minerales del medio para que pueda ser aplicado como control biológico contra los hongos productores de OTA. Por esta razón se emplearon diseños experimentales para identificar y optimizar las variables involucradas en la respuesta de interés. Se probaron extractos con y sin células de BAL sobre los cultivos de un hongo potencialmente ocratoxigénico

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este capítulo se presenta la revisión bibliográfica relacionada con el diseño de un medio de cultivo para el crecimiento de BAL de forma económica y su posterior aplicación en hongos productores de OTA. Se revisan la clasificación de las BAL en general y se presenta la cepa empleada en particular, los parámetros que influyen en el proceso de crecimiento de éstas, los medios de cultivo empleados para el crecimiento de las BAL, así como las fuentes de N alternas que puedan sustituir al extracto y peptona de carne del medio MRS y finalmente se abordan los modelos cinéticos y diseños experimentales empleados.

2.1 Bacterias ácido lácticas

El término bacterias ácido lácticas corresponde a un grupo heterogéneo de microorganismos con la capacidad determinante de producir ácido láctico (AL) a partir de la fermentación de azúcares. Son grampositivas, ácidotolerantes, no forman esporas, son inmóviles, tienen forma de cocos o bacilos, son oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, crecen anaeróbicamente, pero a diferencia de la mayoría de los anaerobios, crecen en presencia de O₂ como microorganismos "anaerobios aerotolerantes" (Aznar & Zúñiga, 2000).

Están agrupadas en 13 géneros, entre ellos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, entre otros (Zhang & Cai, 2014). Se pueden clasificar de acuerdo con el isómero de AL producido y si éste es el producto principal de la fermentación de la glucosa. Las BAL que producen AL como su principal producto se conocen como homofermentativas, entre ellas se incluyen a los *Pediococos* y *Streptococos*; mientras que las que producen compuestos adicionales

como CO₂, etanol y ácido acético se conocen como heterofermentativas, tales como *Leuconostoc* y ciertos *Lactobacillus* (Carr *et al.*, 2002b).

Las bacterias lácticas se han venido utilizando inadvertidamente durante miles de años y son mejor conocidas por su uso como cultivos iniciadores en la industria de productos lácticos para la fermentación de alimentos tales como queso, yogurt, crema agria, entre otros. También son importantes comercialmente en el proceso de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales, como salsas, vinos, cervezas, encurtidos, entre otros (Parra, 2010).

Tienen una capacidad biosintética limitada, habiendo evolucionado en ambientes ricos en aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas, por lo que deben cultivarse en medios complejos que satisfagan todos sus requisitos nutricionales. Se pueden emplear carbohidratos fermentables y alcoholes como fuentes de energía para la producción de ácido láctico (Holzapfel & Wood, 2018).

Así mismo, diversos factores como la temperatura afectan el crecimiento de BAL en un medio de fermentación. Existe una temperatura óptima a la cual la velocidad de crecimiento es más alta y depende de las características del microorganismo, así como de las condiciones ambientales (Zhang & Cai, 2014). La cepa empleada en el presente trabajo corresponde al género *Lactobacillus*.

2.1.1 *Lactobacillus*

Lactobacillus es el género más grande entre las BAL pues incluye más de 100 especies que están presentes dondequiera que estén disponibles sustancias ricas en carbohidratos. Se distribuyen ampliamente en alimentos para animales, ensilaje, estiércol, leche y productos lácteos (Zhang & Cai, 2014).

Este género se subdivide en 3 grupos: *Betabacteria*, *Estreptobacteria*, y *Termobacteria*, los cuales son capaces de crecer en temperaturas de entre 15 y 45 °C. Los *Estreptobacteria* y *Termobacteria* son homofermentativos, mientras que los *Betabacteria* son considerados heterofermentativos (Carr *et al.*, 2002a).

La cantidad de ácido láctico producido por diferentes especies de *Lactobacillus* varía. En distintas especies, incluyendo *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. plantarum*, el metabolismo de la glucosa se describe como homofermentativo, ya que el ácido láctico es el subproducto primario, que representa al menos el 85 % de los productos metabólicos finales. Sin embargo, en otras especies, como *L. brevis* y *L. fermentum*, el metabolismo de la glucosa es heterofermentativo, el ácido láctico representa aproximadamente el 50 % de los subproductos metabólicos y el etanol, el ácido acético y el CO₂ constituyen la mayor parte del otro 50 % (Kowalczyk *et al.*, 2015).

La presencia simultánea de una fuente de C (principalmente glucosa), una fuente de N (principalmente extracto de levadura) y sales (principalmente MnSO₄, MgSO₄ y acetato de sodio) permiten alcanzar los niveles más altos de biomasa celular (Tomás *et al.*, 2010). De igual manera el pH y la temperatura juegan un papel muy importante para el crecimiento de dichas bacterias (Zhang & Cai, 2014; Carr *et al.*, 2002).

Existen varias publicaciones que demuestran los distintos componentes de los medios de cultivo empleados para el crecimiento de *Lactobacillus*, entre los cuáles se emplean fuentes alternas de N y carbono (C). Manzoor *et al.* (2017) usaron suero de queso como principal fuente de C para mejorar la producción de biomasa de una cepa de *Lactobacillus*, obteniendo una producción de biomasa un poco mayor que la obtenida con el medio MRS (12 g/L) y con un costo menor bajo condiciones de cultivo similares. Por otra parte, Hwang *et al.* (2012)

emplearon licor de maíz como fuente de C mejorando el rendimiento de la biomasa en un 107 %.

Con estos trabajos se puede dar pie al uso de fuentes alternativas de N para la generación de biomasa de *L. plantarum*, en consecuencia, se considerará emplear diferentes fuentes de N en el presente trabajo a partir de cereales o granos ricos en proteína.

2.2 Condiciones ambientales para el cultivo de BAL

El pH y la temperatura son parámetros muy importantes que se deben tomar en cuenta para el crecimiento de las BAL, pues la mayoría son ácido tolerantes y generalmente crecen en ambientes de neutros a ácidos y en temperaturas entre 25 y 37 °C, aproximadamente (Carr *et al.*, 2002a).

En varios trabajos se llevaron a cabo experimentos para comprobar las mejores condiciones de pH y temperatura para el crecimiento de las BAL. De acuerdo con Kemp *et al* (2009) y Zhou *et al.* (2015) el crecimiento de la biomasa en *Lactobacillus* se ve significativamente afectado por el pH y la temperatura, obteniendo las mejores condiciones para su crecimiento a un pH de 5.5 - 6.5 y temperaturas de 33 – 37 °C.

Por otro lado, Wee *et al.* (2005) también encontraron que la obtención de biomasa se ve influenciada por la temperatura y el pH, la biomasa máxima que se obtuvo (5 g/L) fue a 36 °C y a un pH de 6 lo cual confirma que los rangos óptimos de obtención de biomasa se encuentran entre 30 – 37°C y pH de 5 – 7.

Por su parte, Rao *et al.* (2004) estudiaron la capacidad de 4 especies de *Lactobacillus* para crecer en diferentes valores iniciales de pH, encontrando que

el mejor desempeño oscila entre 6 y 6.6. Giraud *et al.* (1991) llevaron a cabo fermentaciones de *L. plantarum* a diferentes pH (4 – 8) obteniendo como resultado un crecimiento óptimo a pH 6.

2.3 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son una mezcla equilibrada de nutrientes (fuente de C, N, S, y factores de crecimiento) que, en concentraciones adecuadas y condiciones físicas óptimas, permiten un buen crecimiento de los microorganismos (Tortora *et al.*, 2007).

La optimización de medios de cultivo determina no sólo el mejor crecimiento, sino también las condiciones definidas y reproducibles, para no desperdiciar el uso de nutrientes. La optimización en cultivo por lote se lleva a cabo comparando la biomasa obtenida al variar los componentes de medio en un determinado tiempo (Hernández *et al.*, 2007). Las variables de respuesta incluyen el costo, la capacidad de producir una gran cantidad de células, el método de cosecha de células y el tiempo recolección deben considerarse al optimizar el medio de cultivo. En consecuencia, el diseño de un nuevo medio de cultivo de bajo costo para una mayor producción de biomasa definitivamente puede conducir a un uso en gran escala y la producción de metabolitos más económica (Collard, 1976).

El medio de cultivo de referencia para el crecimiento de las BAL es el MRS, fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe en 1960 como un medio de enriquecimiento, cultivo y aislamiento de *Lactobacillus* y otras BAL desde diferentes tipos de muestras. Ha ganado gran aceptación como un medio para todos los propósitos debido a su capacidad de soporte para una variedad de BAL.

Es un medio muy completo que contiene los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento de BAL, se caracteriza por la presencia de sales en cantidades relativamente importantes, especialmente sulfato de magnesio. El magnesio, el manganeso, polisorbato y acetato son los cofactores presentes en el medio, mientras que el citrato de amonio es un inhibidor de microbiota Gram negativa. El acetato de sodio (presente en una proporción bastante elevada) y la sustancia tensoactiva Tween-80 tienen una acción selectiva (De Man *et al.*, 1960). Debido a todos los componentes que contiene es un medio muy caro para la producción a gran escala. En diversos estudios se ha buscado reducir el costo de obtención de la biomasa utilizando materias primas renovables que contengan suficiente nitrógeno, vitaminas y azúcares como elementos del medio de cultivo (Thakur *et al.*, 2017; Tomás *et al.*, 2010).

La selección de los factores principales que afectan al crecimiento de las BAL se puede realizar mediante un diseño tipo Placket-Burman (PB), posteriormente se pueden optimizar las variables de respuesta con los factores elegidos mediante la metodología de superficie de respuesta acoplado a un diseño factorial central compuesto (DFCC).

2.4 Fuentes de nitrógeno y carbono alternas

De todos los componentes para el crecimiento celular, la fuente de C es la más importante. El rendimiento de un producto (ya sea biomasa o metabolito) está basado en el consumo de la fuente de C.

Algunas investigaciones demostraron la influencia de diversas fuentes de C como la glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, galactosa y oligosacáridos sobre el crecimiento de *Lactobacillus* y la producción de ácido láctico (Davoodi *et al.*, 2016). Estas fuentes resultan caras, razón por la que se está buscando desarrollar

medios de cultivo con nuevas fuentes de C económicas y efectivas, entre las que se encuentran suero de leche y queso, jugo de dátil, jugo de pepino, almidón de papa, entre otros (Kaavessina *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2012; Manzoor *et al.*, 2017; Passos *et al.*, 1993; Uzochukwu *et al.*, 2016).

El nitrógeno es el segundo factor más importante que determina el crecimiento de microorganismos debido a la cantidad de aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas que necesitan (Saguir & de Nadra, 2007). Las fuentes de N pueden ser sustancias orgánicas, como el extracto de levadura, la peptona, y sustancias inorgánicas, como el nitrato de amonio y el sulfato de amonio (Manzoor *et al.*, 2017). El extracto de levadura (EL), el extracto de carne (EC) y la peptona de carne (PC) han resultado ser el factor principal en el crecimiento de las BAL; no obstante, son consideradas como fuentes de N muy caras, principalmente el EC y la PC, pues contribuye hasta el 30% del costo total de producción. Se ha demostrado que un medio de cultivo con licor de maíz, extracto de semilla de algodón, harina de cacahuate o harina de pescado, junto con suplementos de crecimiento disponibles en el mercado da como resultado una producción mejorada de biomasa celular (Agarwal *et al.*, 2008; Hwang *et al.*, 2012; Thakur *et al.*, 2017).

Los granos y cereales son una fuente importante de proteínas, aminoácidos, vitaminas y minerales por lo que pueden ser un muy buen sustituto de las fuentes caras de N del MRS (Serna, 2010). Cereales como el trigo, la soya, el maíz, la cebada, entre otros contienen hidratos de carbono, vitaminas A, B1, B2, B3, B6, B9, E y C, fibra y sales minerales como potasio, magnesio, hierro, calcio, zinc, sodio y fósforo, así como aminoácidos y péptidos, por lo que son buenas fuentes de N alternativas.

2.5 Modelos cinéticos

Cuando las células de un cultivo puro son inoculadas en un medio de cultivo, comienza a producirse un incremento de la biomasa, es decir, aumenta el número de células por autoduplicación. La biomasa es un catalizador de una reacción que produce más biomasa idéntica a la de partida (Farras *et al.*, 2019).

Para poder estimar el aumento del número de células de la población se suelen emplear distintos métodos como conteo de colonias, turbidez, producción de metabolitos, peso seco, entre otros (Chiappa *et al.*, 2009), los datos obtenidos se analizan mediante una gráfica de crecimiento en la cual se presentan 4 fases representadas en la Figura 2.1: fase de latencia, fase exponencial o fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte (Zwietering *et al.*, 1990).

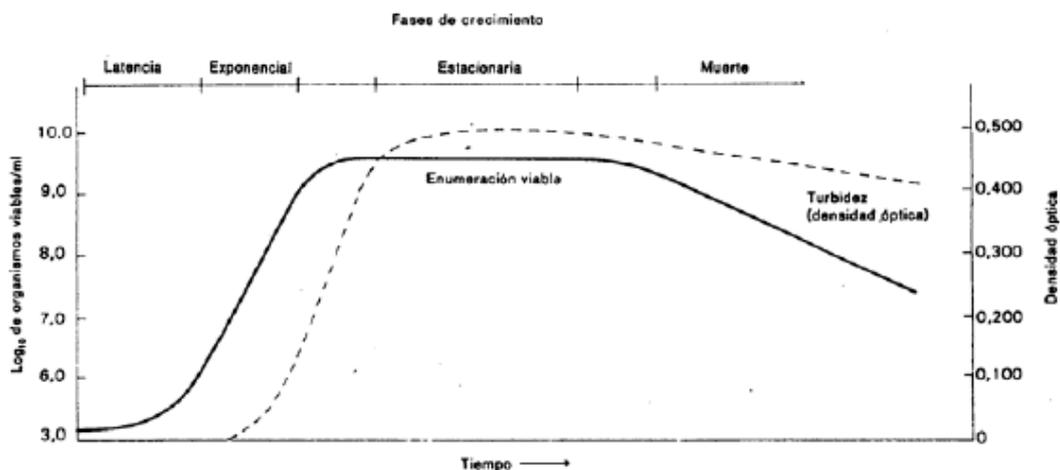


Figura 2.1 Fases del crecimiento bacteriano

Durante la primera fase las células se empiezan a adaptar al medio de cultivo y a las condiciones ambientales en que están creciendo, la duración de la fase de latencia depende del medio de cultivo y de factores ambientales (Chiappa *et al.*, 2009). Después de esta fase inicial el crecimiento de la biomasa celular es de tipo

exponencial llegando a un punto en donde el crecimiento se mantiene constante y finalmente el número de células va disminuyendo.

Existe una gran diversidad de modelos matemáticos para describir el comportamiento de los microorganismos, la elección del modelo adecuado dependerá, entre otros factores, del comportamiento del sistema. En la literatura se encuentran una gran variedad de modelos de crecimiento como el de Gompertz, Richards, Logístico y otros (Zwietering *et al.*, 1990). El modelo que se eligió para describir el crecimiento de *L. plantarum* es el modelo Logístico y para describir la formación de AL se acopló al modelo de Luedeking-Piret.

2.5.1 Modelo Logístico.

La ecuación logística fue propuesta originalmente por Verhulst y ha sido el modelo más ilustrativo para la dinámica de crecimiento, se basa en que la tasa momentánea de crecimiento de una población dada es proporcional al tamaño momentáneo de la población y a las fuentes disponibles en el hábitat (Peleg *et al.*, 2007). Se describe como la siguiente ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left[1 - \frac{X}{X_{max}} \right] \quad \text{Ecuación 2.1}$$

En donde dX/dt es la tasa de crecimiento, μ es la tasa específica de crecimiento, X es la biomasa producida, t es el tiempo y X_{max} es la máxima concentración de biomasa producida.

El parámetro más importante dentro de este modelo es la tasa específica de crecimiento llamada μ , la cual es obtenida durante el crecimiento exponencial y es afectada por factores ambientales como el pH, la temperatura, entre otros. Este

parámetro nos indica qué tan rápido crece el microorganismo durante la fase exponencial.

2.5.2 Modelo de Luedeking-Piret

Robert Luedeking y Edgar L. Piret diseñaron un modelo cinético para evaluar la producción de ácido láctico producido por la bacteria *Lactobacillus delbrueckii*, en un proceso de fermentación por lotes a pH controlado y temperatura constante. En su investigación, Luedeking y Piret encontraron que la velocidad de formación del producto depende linealmente de la tasa de crecimiento microbiano y de la concentración celular por lo que su crecimiento está directamente relacionado con la formación de producto (Luedeking & Piret, 1959), la ecuación que propusieron es la siguiente:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad \text{Ecuación 2.2}$$

En donde P es la concentración del producto, X es la concentración celular, t es el tiempo, α y β son coeficientes que están determinados por las condiciones de la fermentación, y corresponden a un parámetro asociado y no asociado al crecimiento, respectivamente.

2.6 Diseños experimentales

La evaluación de parámetros estadísticos y el diseño experimental son dos herramientas principales para las técnicas de detección y optimización. La evaluación e identificación de los parámetros más importantes en un estudio, resulta benéfica si se realiza mediante un diseño experimental y los resultados son analizados mediante un modelo apropiado (Hwang *et al.*, 2012).

2.6.1 Diseño de Plackett-Burman

En la práctica, los diseños factoriales completos o fraccionarios de dos niveles y los diseños PB a menudo se utilizan para detectar los factores importantes que influyen en alguna respuesta que se desee obtener. Estos diseños son útiles para ajustar modelos de primer orden (que detectan efectos lineales) y pueden proporcionar información sobre la existencia de efectos de segundo orden (curvatura) cuando el diseño incluye puntos centrales. La identificación de los principales factores que influyen en el crecimiento de las BAL se puede dar mediante un diseño factorial fraccional de dos niveles del tipo PB, pues tiene la ventaja de evaluar más de un factor a la vez, así como la relación entre las variables independientes, la respuesta y sus interacciones además de que resulta ser un diseño muy práctico experimentalmente (Plackett & Burman, 1946) pues con pocas corridas se pueden identificar los principales factores que afectan a una variable de respuesta.

En la Tabla 2.1 se muestra un ejemplo de este tipo de diseño, en el que se prueban 7 distintos factores con 8 tratamientos similares al que se empleó en el presente trabajo. Cada uno se encuentra codificado con los niveles + y – que indican la concentración de los componentes del MRS probados.

Tabla 2.1 Matriz Plackett-Burman para evaluar el efecto de 7 factores con 8 ensayos

Tratamientos	Factores						
	A	B	C	D	E	F	G
1	+	-	-	+		+	+
2	+	+	-	-	+		+
3	+	+	+	-	-	+	-
4	-	+	+	+	-	-	+
5	+	-	+	+	+	-	-
6	-	+	-	+	+	+	-
7	-	-	+	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-

2.6.2 Diseño factorial central compuesto

Después de elegir los factores más importantes que afectan a la producción de biomasa mediante el diseño de PB, se empleó la MSR para optimizar la producción de biomasa con la ayuda de un diseño factorial central compuesto. Los diseños centrales compuestos son un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales (también denominados puntos de estrella) que permiten estimar la curvatura. Este tipo de diseños es de los más empleados para modelar una variable de respuesta con curvatura (Montgomery, 2004) y pueden ajustarse a un modelo cuadrático completo. En la Figura 2.2 se observa un ejemplo de arreglo del DFCC en donde se visualizan los puntos centrales, los puntos axiales y los puntos del diseño factorial.

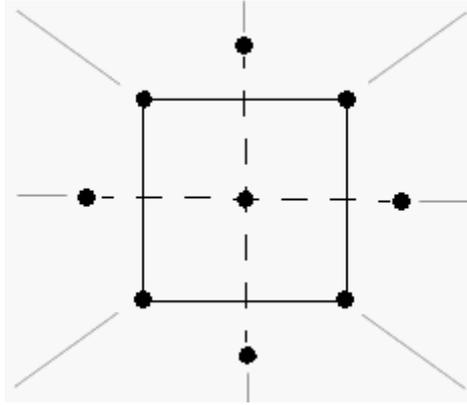


Figura 1.2 Ejemplo de arreglo del DFCC, se muestran los puntos centrales, axiales y los puntos del factorial.

Generalmente se emplean en experimentos secuenciales, es decir, tras seleccionar los factores principales mediante un diseño de cribado, se aplica un diseño experimental de este tipo pues permiten ampliar experimentos factoriales anteriores al agregar puntos axiales y centrales (Box *et al.*, 2005).

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una combinación de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para desarrollar, mejorar y optimizar los procesos, y se utiliza para evaluar la importancia relativa de varios factores que afectan incluso en presencia de interacciones complejas. Esta metodología se utiliza con frecuencia para refinar los modelos después de haber determinado los factores importantes utilizando diseños factoriales (Montgomery, 2004).

3 ANTECEDENTES DIRECTOS

El estudio de las BAL y sus metabolitos ha tenido lugar desde hace muchos años, debido a los amplios usos que tienen. Principalmente, los estudios se enfocan a la obtención de metabolitos primarios y secundarios (AL, bacteriocina, entre otros). Algunos trabajos se orientan en la obtención de la biomasa como producto principal.

En el grupo de trabajo del laboratorio de Biotecnología Alimentaria de la Universidad Autónoma Metropolitana se llevan a cabo estudios para identificar BAL antagonistas de hongos productores de OTA, así como la determinación del mecanismo de acción y estrategias para el control biológico de los mismos. El enfoque central de este proyecto es el diseño de un medio de cultivo de bajo costo para las BAL, en este sentido, se revisaron reportes cuyo objetivo principal fue emplear una estrategia de reducción de costos para el crecimiento de BAL. Dichas estrategias consisten en encontrar fuentes de N alternativas a las del MRS, así como variar las concentraciones de las sales minerales del mismo medio.

De acuerdo con Manzoor *et al.* (2017) se formuló un medio de cultivo de bajo costo en el que se probó licor de maíz y bisulfato de amonio como fuentes de N económicas en combinación con otros componentes para sustituir al extracto de levadura. De todos los factores probados, se encontró que el suero de queso (60 g/L), el licor de maíz (15 g/L), la temperatura y el pH fueron los parámetros más significativos para la obtención de biomasa (15 g/L) de una cepa de *Lactobacillus*. Se optimizaron dichos parámetros mediante un diseño de regresión polinomial prediciendo una obtención de biomasa de 16 g/L incubada a una temperatura de 40 °C y pH 6.2.

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

En otro estudio realizado por Hwang *et al.* (2012) también se probó el uso de licor de maíz como fuente alternativa de N, empleando un arreglo de Taguchi para investigar los factores principales y posteriormente un diseño de Box-Behnken para optimizar las variables de respuesta (glucosa, extracto de levadura y licor de maíz) e incrementar la biomasa producida de 7.1 a 8.9 g/L; sin embargo, se obtuvo un rendimiento menor que el trabajo antes citado.

Por su parte Juárez *et al.* (2010) formularon un medio de cultivo variando las concentraciones de glucosa, extracto de levadura, citrato de amonio, acetato de sodio, sulfato de magnesio y sulfato de manganeso para mejorar la obtención de biomasa, disminuyendo el costo del medio. Mediante un diseño central compuesto identificaron las variables principales. De acuerdo con lo anterior, consiguieron una reducción de costos del 25% comparado con el medio convencional.

Por otro lado, se ha probado el uso del extracto de germen de malta como fuente alterna de N, Hujanen *et al.* (1996) analizaron distintas fuentes de N, entre ellas, el extracto de germen de malta, resultando este último como la mejor alternativa económica para sustituir al EL del medio MRS, y obteniendo una concentración de AL de 107 g/L en 69 h.

Binbin *et al* (2010) probaron el uso de 5 fuentes alternas, entre ellas el EGM, probaron que el EGM era la alternativa más significativa para sustituir al EL y EC del medio MRS obteniendo concentraciones de biomasa óptimas de 16 g/L. Göksungur & Guvenc (1997) examinaron el efecto de 7 fuentes alternativas de N para la producción de AL y el EGM resultó ser la mejor fuente de N alterna. Finalmente, Laitila *et al* (2004) y Cejas *et al* (2017) también hicieron uso del EGM como fuente económica de N, obteniendo rendimientos de biomasa y AL similares a los obtenidos con el medio MRS.

4 JUSTIFICACIÓN

El café es un producto comercial muy importante para los países productores como México pues produce incluso más ganancias que cualquier otro producto de comercio legal, su consumo supera los 6 millones de ton al año (Organización Internacional del Café, 2016); sin embargo, desde hace varios años existe un problema de contaminación de este grano por hongos productores de OTA que presenta riesgos para la salud a largo plazo.

En 2004, la Unión Europea estableció límites máximos admisibles para OTA de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en el café tostado y molido y 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en el café instantáneo, actualmente se pretende disminuir los límites máximos por los riesgos que conlleva la OTA, dicho cambio implicaría un rechazo muy considerable de producto (Ec, 2000).

La presencia de OTA en el café puede tener graves consecuencias para la economía en el mundo: pérdida de cuota de mercado, reducción significativa de cambio de divisas, disminución significativa de los ingresos de los productores y disminución de la producción (FAO, 2017). Las medidas para evitar la contaminación de granos de café por OTA resultan casi imposible de implementarlas, por lo que una solución más confiable es el control biológico durante el procesamiento del café (secado, almacenamiento) mediante el uso de BAL, pues éstas tienen un efecto inhibitorio sobre los hongos productores de OTA.

Las BAL tienen requerimientos nutricionales muy exigentes, en consecuencia, los medios de cultivo para hacerlas crecer son muy caros, por lo cual se están buscando estrategias para el diseño y formulación de medios de cultivo económicos que permitan reducir los costos de obtención de biomasa y poder emplear las BAL de una manera más accesible para contribuir a la eliminación o disminución de OTA en granos de café verde.

5 HIPÓTESIS

El empleo de fuentes alternativas de nitrógeno por fuentes económicas (por ejemplo, el extracto de germen de malta), así como la variación en las concentraciones de otros nutrientes como sales minerales del medio de cultivo de referencia (MRS) permitirán satisfacer los requerimientos nutricionales de las BAL y disminuir los costos de producción de la biomasa de BAL sin sacrificar la productividad de obtención biomasa de BAL.

6 OBJETIVOS

6.1 General

Diseñar un medio de cultivo de bajo costo empleando una fuente alternativa de nitrógeno (extracto de germen de malta) con el que se obtengan productividades de biomasa de BAL semejantes al medio MRS.

6.2 Particulares

- ✚ Evaluar el efecto de distintas fuentes de N económicas sobre el crecimiento de la BAL.
- ✚ Identificar los principales factores que afectan el crecimiento de las BAL en un medio de cultivo mediante un diseño de Plackett-Burman.
- ✚ Optimizar la producción de biomasa y productividad celular empleando un diseño factorial central compuesto y la metodología de superficie de respuesta.
- ✚ Determinar el efecto de extractos con y sin células de BAL mediante bioensayos en hongos filamentosos potencialmente ocratoxigénicos.

7 METODOLOGÍA

En esta sección se describe la metodología empleada para el diseño de un medio de cultivo de bajo costo para el crecimiento de BAL. En la Figura 7.1 se describe la estrategia experimental que consistió primeramente en la selección de la fuente de N alterna, en segundo lugar, se realizó un diseño experimental para la identificación de los principales factores que afectan el crecimiento de la BAL, posteriormente se desarrolló un diseño de optimización de la composición del medio de cultivo y, por último, se realizaron experimentos para verificar si la BAL es capaz de inhibir el crecimiento de un hongo potencialmente ocratoxigénico.

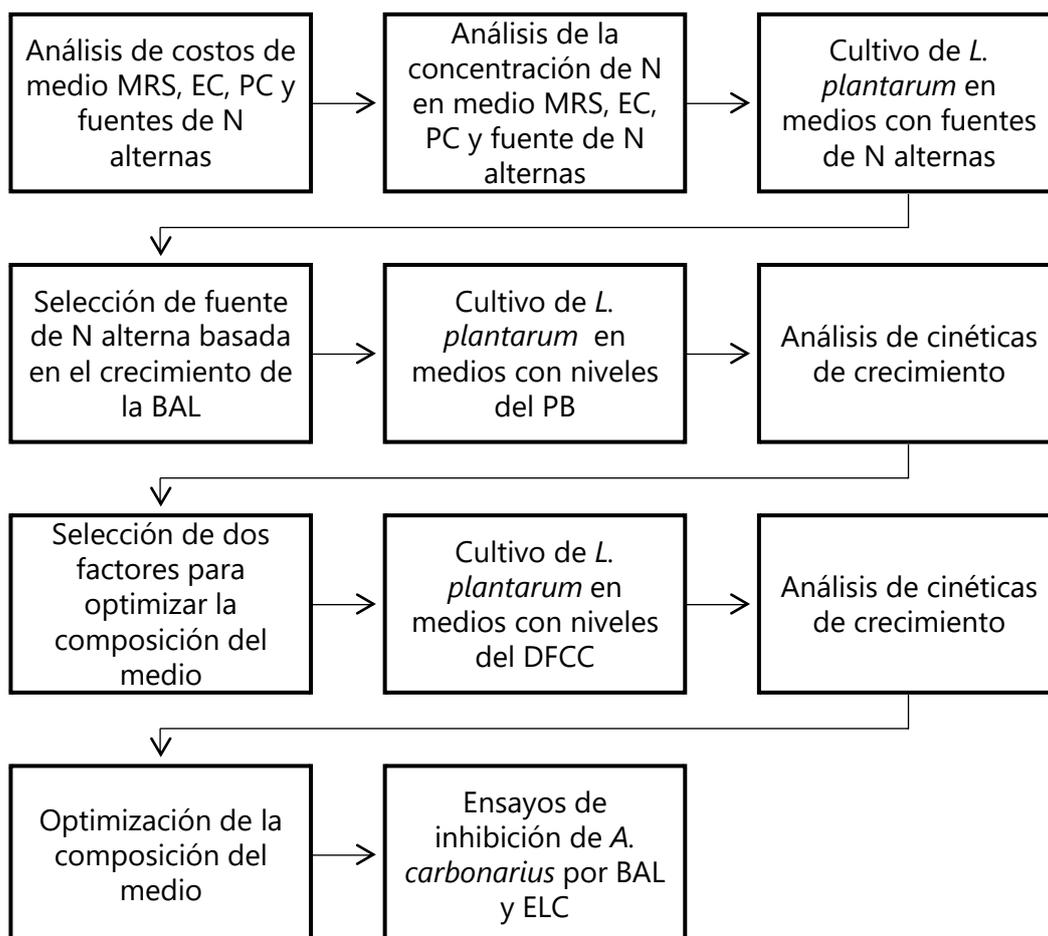


Figura 7.1 Diagrama de la estrategia experimental seguida para el diseño de cultivo de bajo costo

7.1 Microorganismo y condiciones de activación

Se utilizó una cepa bacteriana y una fúngica del cepario UAM – IRD (Universidad Autónoma Metropolitana-Institut de Recherche pour le Développement) denominada *Lactobacillus plantarum* B031 y *Aspergillus carbonarius* DO162 aisladas de ensilado de pulpa de café de Costa de Marfil y de cerezas de café respectivamente por Djssou *et al.* (2011). La cepa bacteriana se mantuvo en 50% (v/v) de glicerol y medio MRS (medio crioprotector) a -18 °C y se activó en medio estéril MRS agregando 50 µL del conservado de BAL en medio crioprotector a 9 mL de medio MRS estéril y se incubaron a 30 °C por 24 h. Esta cepa se seleccionó por su capacidad de inhibir la producción de OTA por hongos del género *Aspergillus* de acuerdo con trabajos anteriores (Amador, 2019; Djossou *et al.*, 2011b, 2011a; Belkacem-Hanfi *et al.*, 2014).

A. carbonarius se mantuvo en un medio crioprotector compuesto por 50 % (v/v) de glicerol y medio CYA (Anexo A1) y se activó en agar papa dextrosa (PDA, Difco, Anexo A1) agregando 50 µL del conservado en medio crioprotector a 30 mL de agar PDA estéril y se incubó durante 7 días a 30 °C. Esta cepa se seleccionó por ser productora de OTA.

7.2 Selección de fuentes de N alternas

De acuerdo con reportes de la literatura se seleccionaron distintos cereales y granos con alto contenido proteico (> 10 %), se evaluó su precio y la concentración de N. Se seleccionaron los cereales, granos y otros materiales que se presentan en la Tabla 7.1 los cuales fueron adquiridos en la Central de Abasto de la Ciudad de México (CEDA).

Tabla 7.1 Fuentes de proteína reportados en la literatura

Abreviatura	Nombre
AM	Amaranto
AV	Avena
Ch	Cacahuate
GC	Germen de malta de cebada
GM	Germen de malta de maíz
HS	Harina de soya
HT	Harina de trigo
L	Lenteja
LP	Levadura de pan
PD	Proteína deportistas (aislado de suero de leche)
T	Trigo

7.3 Concentración de C, H y N de la cepa empleada, medio MRS y fuentes de N alternas

Se realizó el análisis de la concentración de C, H y N del medio MRS, las fuentes de N contenidas en el mismo (extracto de carne, extracto de levadura y peptona de carne), la biomasa de *L. plantarum* y las fuentes de N alternas en un equipo PerkinElmer® 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer utilizando un estándar de acetanilida, los resultados fueron corregidos con un factor de corrección dado por el estándar. El protocolo analítico se basó en el manual de usuario del equipo. El medio MRS, el EC, el EL y la PC fueron adquiridos de Difco™.

La preparación de las muestras consistió en la molienda de los granos (lenteja, amaranto, cacahuate, avena, levadura de pan), en el caso del maíz y la cebada se llevó a cabo un proceso de malteado descrito a continuación.

Proceso de malteo de granos:

Remojo

- ✚ Lavar con agua el grano con la ayuda de un colador.

- ✚ Colocar el grano limpio en un frasco de tamaño adecuado y adicionar en relación de grano-agua, 1:2 o 1:3. El contenedor debe estar cubierto y perforado para tener la ventilación adecuada.
- ✚ Dejar remojando el grano por 12 h para poder activar la semilla.

Germinado

- ✚ Dejar germinando por 4 - 5 días a una temperatura de 16 – 20 °C.
- ✚ Detener el proceso de germinado cuando las raicillas tengan un tamaño de entre 1.0 y 1.5 cm.

Secado

- ✚ Secar el grano a 60 °C por 24 h, una vez seco el grano se denomina malta.

Las células de *L. plantarum* se activaron en medio estéril MRS y se realizaron dos subcultivos en tubos de ensaye con medio estéril MRS e incubaron a 30 °C por 24 h. Las células del segundo subcultivo se centrifugaron (3500 rpm, 4 °C, 15 min) se desechó el sobrenadante y las células se lavaron con solución salina (NaCl al 0.9 %), a continuación, se centrifugaron (3500 rpm, 4 °C, 15 min) y se desechó el sobrenadante, la biomasa se colocó en charolas de aluminio y se secó a 60 °C por 24 h. Posteriormente la biomasa se pulverizó con mortero y pistilo.

Finalmente se tomó 1 g de cada muestra (lenteja, amaranto, cacahuate, avena, levadura de pan, trigo, harina de trigo, harina de soya, aislado de suero de leche, germen de maíz, germen de cebada, biomasa, medio MRS, extracto de carne, extracto de levadura y peptona de carne) y se pasaron por un tamiz (malla 100), posteriormente fueron secadas a 60 °C por 24 h y se analizaron en un equipo CHN para determinación de concentración de C, N e H. Los resultados se expresaron en porcentaje en base seca.

Por otra parte, se realizaron extractos de los germinados de malta de maíz y de cebada que consistieron en el tamizado (malla #30) de los granos malteados con la finalidad de separar las raíces del grano. Las raíces se remojaron en agua destilada (1 L/100 g material seco) durante 5 h y finalmente se filtró con papel Whatman No. 40, se centrifugó (3000 rpm, 20 min, 10 °C) para separar el extracto de los sólidos. El sobrenadante se usó para análisis de contenido de proteína (%) mediante el método de BCA con un kit de de Thermo Fisher. La curva de calibración empleada se encuentra en el Anexo A2.

7.4 Análisis de costos del medio MRS, fuentes alternas y su análisis de inclusión

El medio de cultivo MRS fue la base de referencia del presente trabajo, se consultaron los precios de éste, así como de cada uno de sus componentes (descritos en la Tabla 7.2) por kg en distintas empresas mientras que los precios de las fuentes alternas de N se determinaron de la literatura y en distintos locales de la CEDA.

Tabla 7.2 Composición del medio de cultivo MRS.

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa	20
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Proteosa de peptona no. 3	10
Citrato de amonio	2
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Acetato de sodio	5
Fosfato dipotásico de hidrógeno	2
Tween 80	1

Se llevó a cabo un análisis para incluir los cereales y granos seleccionados al medio MRS, basados en la composición de N del MRS excluyendo la adición de EC y la PC, se calculó la concentración de cada fuente por añadir para cumplir con el N faltante y se seleccionaron los granos y cereales que no representaron el uso de cantidades muy grandes (> 150 g/L) que fueron harina de trigo, harina de soya, lenteja, cacahuete, levadura de pan, aislado de suero de leche, germen de maíz y germen de cebada.

7.5 Preparación del inóculo y fermentación

Las células de *L. plantarum* B031 se activaron agregando 50 µL del conservado de BAL en medio crioprotector (sección 7.1) en 9 mL de medio MRS estéril y se incubó a 30 °C por 24 h, posteriormente se realizó una primera resiembra tomando 1 mL del cultivo de activación y agregándolo a 9 mL de medio MRS estéril incubándolo en las mismas condiciones descritas para la activación y

finalmente se llevó a cabo una segunda resiembra adicionando 1 mL del cultivo de la primera resiembra en 9 mL de medio MRS estéril y se incubaron a 30 °C por 24 h para obtener una biomasa inicial aproximada de 1×10^6 UFC/mL.

La fermentación correspondiente a la primera y cuarta sección de resultados se llevó a cabo en tubos de ensaye con rosca, con un volumen de 10 mL. En el caso de los experimentos de la 2da y 3ra sección de resultados se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 200 mL con un volumen de trabajo de 150 mL. Para los 3 tipos de ensayos el inóculo fue del 10 % (v/v).

En el caso de *A. carbonarius* (empleado en el cuarto ensayo), tras ser activado conforme a la sección 7.1, se resembró en agar PDA estéril (resiembra), para ello las esporas del cultivo de activación se resuspendieron en 20 mL de una solución de Tween 80 al 0.1 % (v/v) estéril y se desprendieron manteniéndose en agitación constante durante 5 min con ayuda de un agitador magnético estéril, posteriormente se inocularon 500 μ L de la suspensión de esporas en 30 mL de agar PDA estéril y se incubó durante 7 días a 30 °C.

Después de los 7 días de incubación, se ajustó la suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 esporas/mL con una solución de Tween 80 al 0.1 % (v/v) siguiendo la metodología descrita anteriormente de la resiembra. El conteo de esporas se realizó en cámara de Neubauer de la siguiente manera: se preparó una dilución 1/2 de la suspensión de esporas de la primera resiembra, se vertieron 100 μ L de la dilución de esporas en una cámara de Neubauer por triplicado y se llevó al microscopio, se enfocó con el objetivo de 40X y se contó el número de esporas en 9 cuadros de 0.2 mm de lado (Figura 7.2), se calculó el valor promedio por cuadro y con la ecuación 7.1 se obtuvo la concentración de esporas/mL que finalmente fue ajustada con una solución de Tween 80 al 0.1 % (v/v) a una concentración de 1×10^6 esporas/mL.

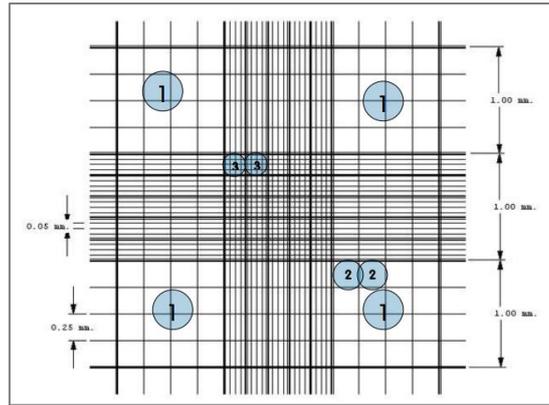


Figura 7.2 Arreglo de la cámara de Neubauer

$$\text{Concentración de esporas} = \bar{X} * 0.1 * 25 * 2 * 10^4 \quad \text{Ecuación 7.1}$$

En donde \bar{x} es el número de esporas en promedio, 0.1 es el volumen que se añade a la cámara para realizar el conteo, 25 es el número de cuadros de la cámara de Neubauer, 2 es el factor de dilución y 10^4 es el volumen del cuadrado en donde se cuentan las esporas.

7.6 Composición del medio y condiciones de cultivo

Para la primera sección de resultados se prepararon 8 medios de cultivo con las fuentes de N seleccionadas (harina de trigo, harina de soya, lenteja, cacahuate, levadura de pan, aislado de suero de leche, extracto de germen de maíz y extracto de germen de cebada) más un medio control (MCTRL) el cual no contenía a la fuente de N alterna y el medio MRS. En el caso de los medios con extracto de germen de malta de maíz y de cebada se emplearon dichos extractos en la formulación en lugar del agua destilada. Los medios contenían: glucosa (20 g/L), extracto de levadura (5 g/L), acetato de sodio (5 g/L), citrato de amonio (2 g/L), fosfato de potasio (2 g/L), sulfato de magnesio (0.1 g/L), sulfato de manganeso (0.05 g/L), Tween 80 (1 mL), además se adicionaron las fuentes de N seleccionadas

a las concentraciones de acuerdo con la Tabla 7.3. Se incubaron a 30 °C por 24 h, el pH inicial para el medio de crecimiento fue de 6.5 en todos los casos.

Tabla 7.3 Formulación de medios de cultivo para la selección de la fuente de N.

Medio	Fuente de N alterna (g/L)
MHT (harina de trigo)	120
MHS (harina de soya)	98
ML (lenteja)	66
MCh (cacahuete)	52
MLP (levadura de pan)	38
MPD (aislado de suero de leche)	21
MEGM (extracto de germen de maíz)	1 L
MEGC (extracto de germen de cebada)	1 L

En el segundo tipo de ensayo se trabajó con el extracto de germen de malta de cebada llamado a partir de ahora extracto de germen de malta (EGM) debido a que fue la fuente de N con la que se obtuvo mayor crecimiento. Para seleccionar los factores más importantes, se decidió emplear un diseño de Plackett-Burman (PB) con 7 factores (pH, temperatura y concentración de glucosa, acetato de sodio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio y de sulfato de manganeso) y se realizaron 8 ensayos con 8 medios de cultivo diferentes (denominados medios M) preparados con EGM en lugar de agua destilada. Se establecieron 8 medios control (denominados medios m) que consistieron en la misma formulación de los medios del diseño preparados con agua destilada en lugar del EGM y 4 medios MRS probados a dos valores de pH y de temperatura (**1**: pH 5, 30 °C; **2**: pH 5, 37 °C; **3**: pH 7, 30°C y **4**: pH 7, 37°C) correspondiente a los niveles positivo y negativo de dichos factores dado por el diseño. Los medios de cultivo contenían: extracto de levadura (5 g/L), citrato de amonio (2 g/L), Tween 80 (1 mL) y glucosa, acetato de sodio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio y sulfato de manganeso a diferentes concentraciones de acuerdo con la Tabla 7.4.

Los cultivos se incubaron durante 48 h a 30 °C para los medios M1, M3, M6 y M7 y a 37°C para los medios M2, M4, M5 y M8. El pH inicial de los medios M3, M5, M6 y M8 fue de 5 mientras que para los medios M1, M2, M4 y M7 fue de 7. El pH se ajustó con una solución 0.1 M HCl o 0.1 M NaOH.

Tabla 7.4 Formulación de medios de cultivo para el diseño de Plackett-Burman

Medio	Glucosa (g/L)	Acetato de sodio (g/L)	Fosfato de potasio (g/L)	Sulfato de magnesio (g/L)	Sulfato de manganeso (g/L)
M1	25	2	1	0.4	0.3
M2	25	4	1	0.2	0.5
M3	25	4	2	0.2	0.3
M4	15	4	2	0.4	0.3
M5	25	2	2	0.4	0.5
M6	25	4	1	0.4	0.5
M7	15	2	2	0.2	0.5
M8	15	2	1	0.2	0.3

En el caso de la tercera sección de resultados se llevó a cabo un diseño factorial central compuesto similar a lo ilustrado en la Figura 2.2, consistió en 2 factores (concentración de acetato de sodio y de sulfato de magnesio), con 2 niveles (+ y -), puntos centrales (0,0) y puntos estrella (+1.41, -1.41) resultando en 10 composiciones diferentes en el medio de cultivo con EGM (medios M), en lugar de agua destilada se agregó el EGM y 10 medios control (medios m) que consistieron en la misma formulación que los medios del diseño, pero preparados con agua destilada en lugar del EGM y el medio MRS como un medio de referencia. Los medios de cultivo M y m contenían: glucosa (20 g/L), extracto de levadura (5 g/L), citrato de amonio (2 g/L), fosfato de potasio (1.5 g/L), sulfato de manganeso (0.4 g/L), Tween 80 (1 mL), acetato de sodio y sulfato de magnesio a diferentes concentraciones de acuerdo con la Tabla 7.5, adicionados de EGM (medios M) y de agua destilada (medios m). El pH de todos los medios se ajustó a 6 y se incubaron durante 24 h a 33 °C.

Tabla 7.5 Formulación de medios de cultivo empleados para el diseño factorial central compuesto

Medio	Acetato de sodio (g/L)	Sulfato de magnesio (g/L)
M1	2.5	0.06
M2	1.5	0.1
M3	3.5	0.3
M4	1.5	0.3
M5	1.1	0.2
M6	2.5	0.2
M7	3.5	0.1
M8	3.9	0.2
M9	2.5	0.34
M10	2.5	0.2

Finalmente se llevó a cabo un experimento para comprobar los niveles en donde ocurre la mayor y menor respuesta (concentración de biomasa y productividad de biomasa a las 18h) así como la composición del medio en la que se predicen valores similares a los máximos, es decir en las esquinas del DFCC. Por lo anterior, se prepararon 4 medios de cultivo codificados como V1, V2, V3 y V4 preparados con EGM en lugar de agua destilada y sus respectivos controles (v1, v2, v3 y v4) preparados con agua destilada en lugar del EGM y el medio MRS. La formulación de los medios junto con su codificación se encuentra en la Tabla 7.6. Todos los medios contenían además glucosa (20 g/L), extracto de levadura (5 g/L), citrato de amonio (2 g/L), fosfato de potasio (1.5 g/L), sulfato de manganeso (0.4 g/L), y Tween 80 (1 mL). El pH de todos los medios se ajustó a 6 y se incubaron durante 24 h a 33 °C, los medios MRS, V1 y v1 se mantuvieron por 96 h para emplear el ELC en las pruebas de inhibición de crecimiento de *A. carbonarius* (sección 11)

Tabla 7.6 Formulación y codificación de los medios de cultivo empleados para la comprobación del DFCC.

Medio	Valores reales		Valores codificados	
	Acetato de sodio (g/L)	Sulfato de magnesio (g/L)	X1	X2
V1	3.5	0.3	1	1
V2	3.5	0.1	1	-1
V3	1.5	0.3	-1	1
V4	1.5	0.1	-1	-1

7.7 Determinación de biomasa

La determinación de la concentración de la biomasa se llevó a cabo por dos métodos diferentes, para la selección de la fuente de N se realizó el método de cuenta en placa y para el diseño PB y el DFCC se determinó por el método del peso seco, mientras que para la comprobación del diseño se determinó por peso seco y cuenta en placa.

Cuenta en placa

Para realizar la cuenta en placa, se preparó agar MRS y se adicionaron 10 mL en cajas Petri de 90 mm de diámetro. Se tomó una muestra de 1 mL del cultivo de 24 h de los medios MRS, MHT, MHS, ML, MC, MLP, MEGM, MEGC y MCTRL (correspondiente al primer ensayo) y 1 mL del cultivo de 18 y 24 h de los medios MRS, V1, V2, V3, V4 y sus controles respectivos – v_i- (ensayo de comprobación) y se añadió a 9 mL de solución de Tween 80 (0.1 % v/v), se realizaron diluciones sucesivas por duplicado de 10⁻¹ a 10⁻⁸ como lo indica la Figura 7.3 (FDA, 2018).

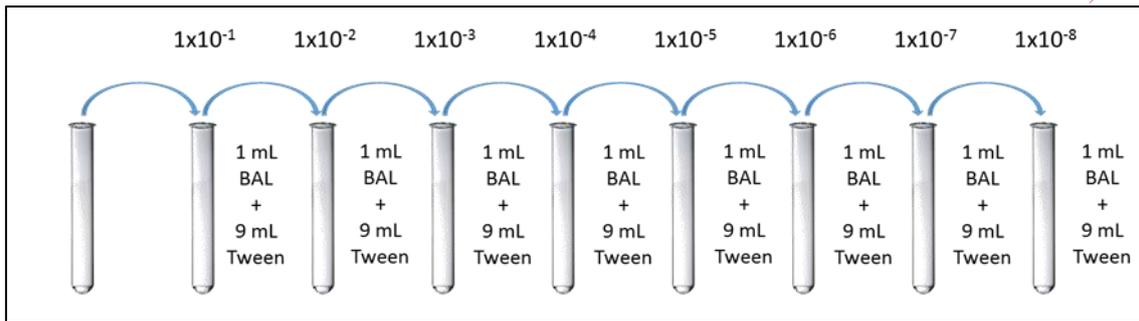


Figura 7.3 Representación del método de diluciones sucesivas

A continuación, se agregaron 20 μL de las diluciones 1×10^{-6} , 1×10^{-7} y 1×10^{-8} por triplicado a las cajas Petri y se incubaron a 30 °C por 24 - 48 h. Se realizaron conteos a las 18, 24, 36 y 48 h para los medios del primer bloque de experimentos y a las 24 h para el último experimento tomando en cuenta únicamente las diluciones que tuvieran entre 1 y 100 colonias, aquellas diluciones con más de 100 colonias se consideraron como incontables.

Terminado el conteo de colonias se aplicó la Ecuación 7.2 para determinar la biomasa como UFC/mL.

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\text{no.de colonias por placa} \times \text{factor de dilución}}{\text{mL de la muestra sembrada}} \quad \text{Ecuación 7.2}$$

Peso seco

La concentración de biomasa se determinó por el método de peso seco para los ensayos de los diseños experimentales, para ello se tomaron muestras de 15 mL en tubos cónicos previamente llevados a peso constante y se centrifugó el contenido de cada muestra a 3500 rpm por 15 min a 4 °C. El extracto libre de células (ELC) se conservó para análisis de concentración de ácido láctico. En el caso de los medios de comprobación (Tabla 7.6) el cultivo se mantuvo hasta las 96 h y separó el ELC de 24 y 96 h de la misma manera.

Las células se lavaron dos veces con solución salina (NaCl al 0.9 % p/v). Finalmente, los tubos se centrifugaron (3500 rpm, 4 °C, 15 min) y se desechó el sobrenadante del último lavado. Los tubos con el pellet se colocaron en una estufa a 60 °C hasta que se obtuvo peso constante. La concentración de biomasa se calculó por diferencia de peso y el resultado se expresó en gramos de biomasa seca por litro (g/L).

7.8 Determinación de ácido láctico

El ácido láctico se determinó por HPLC Shimadzu Prominence (Shimadzu Corp., Kyoto, Japón) equipado con un detector de índice de refracción RID-20A, columna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.), como fase móvil H₂SO₄ 5 mM y una velocidad de flujo de 0.6 mL/min a 60 °C. Para ello el ELC obtenido en el punto 7.7 se pasó por un filtro de celulosa de 0.22 µm y se realizó una curva de calibración con estándar de ácido láctico en un rango de 0 – 20 g/L. La curva de calibración se encuentra en el Anexo A3.

7.9 Ajuste del modelo cinético

Los datos obtenidos del diseño PB y el DFCC se ajustaron al modelo Logístico (Ecuación 7.3 y 7.4, esta última en su forma integrada) para el caso de la biomasa, los parámetros involucrados (X_0 , X_{max} y μ) se estimaron por minimización de la sumatoria del cuadrado de los errores, entre los datos experimentales y los del modelo, empleando la subrutina Solver de Excel 365 (Suarez, 2018).

$$\frac{dx}{dt} = \mu \left[1 - \frac{x}{x_{max}} \right] \quad \text{Ecuación 7.3}$$

$$x = \frac{x_{max}}{1 + \left[\left(\frac{x_{max} - x_0}{x_0} \right) * e^{-\mu t} \right]} \quad \text{Ecuación 7.4}$$

Una vez resuelto el modelamiento de la formación de biomasa, la ecuación integrada del modelo de Logístico se acopló al modelo de Luedeking y Piret (Ecuación 7.5 y 7.6, esta última en su forma integrada y acoplada) para la formación del ácido láctico de acuerdo con lo propuesto por Soto-Cruz *et al.* (2002).

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad \text{Ecuación 7.5}$$

$$P(X) = P_0 + \alpha(X - X_0) - \frac{\beta X_{max}}{\mu_{max}} \ln \left[\frac{X_{max} - X_0}{X_{max} - X} \right] \quad \text{Ecuación 7.6}$$

Los parámetros involucrados P_0 , β y α se estimaron por regresión multilínea usando Excel.

Se realizaron cultivos para los 8 medios del diseño PB (Tabla 7.4) con sus controles respectivos (medios sin EGM) y 4 medios MRS (a 2 valores de pH y temperatura). Se realizaron curvas de crecimiento y formación de producto (AL) para los 10 medios del DFCC (Tabla 7.5) con sus controles respectivos (medios sin EGM) y 1 medio MRS así como curvas de crecimiento y formación de producto (AL) para los medios de comprobación (Tabla 7.6) con sus controles respectivos (medios sin EGM) y 1 medio MRS. Para ello se tomaron muestras por duplicado cada 2 h durante 48 h de cada medio preparado del diseño PB (ensayo, control y MRS), muestras por triplicado a las 0, 12, 18 y 24 h de cada medio preparado del DFCC (ensayo, control y MRS) y muestras por duplicado cada 3 h durante 24 h de cada medio de los ensayos de comprobación. Se estimaron los parámetros de μ_{max} y X_{max} del modelo Logístico y α y β del modelo de Luedeking y Piret. Los resultados se expresaron en concentración de biomasa, productividad de biomasa, concentración de ácido láctico y $Y_{P/X}$ del tercer bloque de experimentos (DFCC).

7.10 Análisis estadístico

Para la segunda sección se decidió emplear un diseño cribado para identificar los principales factores que afectan el crecimiento de la BAL. Se seleccionó el diseño de Plackett-Burman (PB) con 7 factores (pH, temperatura y concentración de glucosa, acetato de sodio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio y de sulfato de manganeso) y 8 ensayos con niveles bajos y altos de acuerdo con el arreglo del diseño PB tomado de la literatura (Plackett & Burman, 1946).

En la Tabla 7.7 se muestra la codificación de los niveles empleados en el diseño, así como los valores de los niveles reales (Tabla 7.8), los valores de los niveles centrales y la unidad de variación empleados para el diseño PB se encuentran en la Tabla 7.9.

Tabla 7.7 Codificación de niveles empleados en el diseño de PB

Ensayos	Nivel del factor						
	A Glucosa	B Acetato de sodio	C Fosfato de potasio	D Sulfato de magnesio	E Sulfato de manganeso	F Temperatura	G pH
1	+	-	-	+	-	+	+
2	+	+	-	-	+	-	+
3	+	+	+	-	-	+	-
4	-	+	+	+	-	-	+
5	+	-	+	+	+	-	-
6	+	+	-	+	+	+	-
7	-	-	+	-	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 7.8 Valores reales de los niveles empleados en el diseño de PB

Factores	Niveles		
	-	0	+
A	15 g/L	20 g/L	25 g/L
B	2 g/L	3 g/L	4 g/L
C	1 g/L	1.5 g/L	2 g/L
D	0.2 g/L	0.3 g/L	0.4 g/L
E	0.3 g/L	0.4 g/L	0.5 g/L
F	30 °C	33.5 °C	37 °C
G	5	6	7

Tabla 7.9 Niveles centrales y unidad de variación empleados para el diseño PB.

Factor	Niveles centrales	Unidad de variación
Glucosa	20 g/L	5
Acetato de sodio	3 g/L	1
Fosfato de potasio	1.5 g/L	0.5
Sulfato de magnesio	0.3 g/L	0.1
Sulfato de manganeso	0.4 g/L	0.1
Temperatura	33.5 °C	3.5
pH	6	1

Las variables de respuesta fueron: la biomasa (g/L) y la productividad de la biomasa (g/L*h) definida como la biomasa obtenida a las 4, 12, 18 y 24 h entre el tiempo de cultivo respectivo. Los resultados se analizaron mediante el software STATGRAPHICS ® Centurion XVI.

En el tercer bloque de experimentos se empleó un diseño factorial central compuesto y la metodología de superficie de respuesta para encontrar una ecuación que optimizara las respuestas.

Para realizar el DFCC se fijaron los siguientes factores: temperatura (33 °C), pH (6), concentración de: glucosa (20 g/L), EL (5 g/L), citrato de amonio (2 g/L), sulfato de manganeso (0.4 g/L) y fosfato de potasio (1.5 g/L). Se variaron únicamente la concentración de sulfato de magnesio y de acetato de sodio de acuerdo con el

arreglo dado por el software STATGRAPHICS ® Centurion XVI. En la Tabla 7.10 se muestran los valores codificados y reales empleados para el DFCC.

Tabla 7.10 Valores reales y valores codificados empleados en el DFCC.

Corrida	Valores reales		Valores codificados	
	Acetato de sodio (g/L)	Sulfato de magnesio (g/L)	X1	X2
1	2.5	0.06	0	-1.41
2	1.5	0.1	-1	-1
3	3.5	0.3	1	1
4	1.5	0.3	-1	1
5	1.1	0.2	-1.41	0
6	2.5	0.2	0	0
7	3.5	0.1	1	-1
8	3.9	0.2	1.41	0
9	2.5	0.34	0	1.41
10	2.5	0.2	0	0

Las variables de respuesta fueron la biomasa (g/L) y productividad de biomasa (g/L*h) a las 18 h. Los resultados se analizaron en el software STATGRAPHICS ® Centurion XVI, las superficies de respuesta se realizaron con el software Sigma Plot 10.

7.11 Ensayos de inhibición de crecimiento de *A. carbonarius*

Con el fin de verificar si la BAL cultivada en el medio de cultivo diseñado ejerce inhibición en el crecimiento del hongo ocratoxigénico *A. carbonarius*, se llevaron a cabo dos experimentos: el primero consistió en realizar un cultivo del hongo en medios envenenados empleando el ELC y en el segundo se usaron las células de la BAL. Los cultivos de BAL empleados para ambos ensayos fueron los correspondientes al medio MRS, V1 y v1.

7.11.1 Cultivo en medios envenenados con ELC

En esta técnica se empleó el ELC de 24 y 96 h de cultivo correspondiente a los medios MRS, V1 y v1 para comprobar si los productos de fermentación de la BAL son los responsables de ejercer un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo referencia (Balouiri *et al.*, 2016). Para ello se mezcló agar PDA (adicionado con 10 g/L de agar bacteriológico) estéril con el ELC del cultivo de 24 y 96 h de los medios MRS, V1 y v1 en una proporción 50:50 (v/v). El ELC se obtuvo conforme al punto 7.7. Posteriormente se vació la mezcla de agar PDA + ELC de 24 y 96 h en cajas Petri de 90 mm de diámetro por triplicado. Se prepararon controles que consistieron en la mezcla de agar PDA adicionado del medio de cultivo (MRS, V1 y v1) sin fermentar, las mezclas quedaron conforme la Tabla 7.11, dichas mezclas se homogenizaron con ayuda de un vórtex.

Tabla 7.11 Tratamientos empleados para el cultivo en medios envenenados con ELC.

Tratamiento	Ensayo	Tiempo de cultivo (h)	Mezcla: 10 mL agar PDA +	
			Medio de cultivo (mL)	ELC (mL)
V1	Prueba	24	-	10
v1			-	10
MRS			-	10
BV			10	-
BC			10	-
BMRS			10	-
V1	Prueba	96	-	10
v1			-	10
MRS			-	10
BV			10	-
BC			10	-
BMRS			10	-

Una vez que se gelificaron las mezclas se realizaron pozos de 8 mm de diámetro en el centro de las cajas con ayuda de un molde y se inocularon con 100 μ L de la

suspensión de *A. carbonarius* con 1×10^6 esporas/mL (ajustadas conforme al punto 7.5) y se incubaron durante 6 días a 30 °C. Se midió el halo de inhibición del crecimiento y esporulación del hongo a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h de incubación con ayuda de un vernier. Finalmente se calculó la inhibición (%) del crecimiento del hongo con la Ecuación 7.7 y los resultados se analizaron con un diagrama de barras.

$$\text{Inhibición (\%)} = \left(\frac{DB-DT}{DB} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 7.7}$$

En donde DB es el diámetro en mm del blanco correspondiente y DT es el diámetro en mm del tratamiento correspondiente.

7.11.2 Cultivo en medios envenenados con células de BAL

En este ensayo se decidió emplear a las células de las BAL crecidas en los medios MRS, V1 y v1 para comparar si la inhibición se debe a las células y no a los productos de fermentación (Amador, 2019; Djossou *et al.*, 2011b). Para ello, se realizaron suspensiones bacterianas de cultivos de 24 h de los medios MRS, V1 y v1 ajustadas a 5×10^4 células/mL con ayuda de una solución de Tween 80 al 0.1 % (v/v) y se mezclaron con agar PDA (adicionado con 10 g/L de agar bacteriológico) estéril en una proporción 1:10 (v/v). Se preparó un blanco que consistió en el agar PDA sin las células de la BAL. Las mezclas se prepararon conforme a la Tabla 7.12.

Tabla 7.12 Tratamientos empleados para el cultivo en medios envenenados con células.

Tratamiento	Inóculo (células/mL)	Medio de cultivo
V1 BAL	5×10^4	V1 + agar PDA
v1 BAL	5×10^4	v1 + agar PDA
MRS BAL	5×10^4	MRS + agar PDA
Blanco	-	Agar PDA

La mezcla de agar PDA + células se vació en cajas Petri de 90 mm de diámetro por triplicado y se dejaron gelificar. Posteriormente se realizaron pozos de 8 mm de diámetro en el centro de las cajas con ayuda de un molde y se inocularon con 35 μL de la suspensión de *A. carbonarius* con 1×10^6 esporas/mL (ajustadas conforme al punto 7.5) y se incubaron durante 6 días a 30 °C. Se midió el halo de inhibición del crecimiento y esporulación del hongo a las 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h de incubación con ayuda de un vernier y se calculó la inhibición del crecimiento radial (%) con la Ecuación 7.7.

8 ENSAYOS PRELIMINARES

En esta sección de resultados se evaluó el costo del medio MRS y sus fuentes de N, así como el de las posibles fuentes alternas de nitrógeno (N). Posteriormente se llevó a cabo un análisis de inclusión de dichas fuentes al medio de cultivo MRS y se evaluó el crecimiento de la cepa en los medios alternos a fin de seleccionar una fuente de N.

8.1 Análisis de costos del medio MRS y fuentes alternas de nitrógeno

El medio MRS es uno de los medios de cultivo más caros. Este medio fue la referencia para la formulación de un medio de cultivo más económico, se realizó una búsqueda de los precios del medio MRS y sus componentes para poder decidir qué componentes sustituir. En la Tabla 8.1 se muestran los rangos de precios encontrados por kg de cada componente del medio y el costo del medio MRS. Los componentes más caros presentes en el medio MRS resultaron ser el extracto de carne (EC) y la peptona de carne (PC) pues su precio se encuentra alrededor de \$ 8 000/kg, además de que son los que se emplean en mayor cantidad después de la glucosa (Tabla 7.2), por lo tanto, se decidió sustituir esas dos fuentes de N por una más económica proveniente de granos, cereales y otros materiales.

Tabla 8.1 Costo del medio MRS y sus componentes

Componente	Rango de precios (\$/kg)
Glucosa	500 – 2000
Extracto de levadura	2000 – 4000
Extracto de carne	5000 – 8000
Proteosa de peptona 3 (peptona de carne)	8000 – 10000
Acetato de sodio	1000 – 4000
Citrato de amonio	500 – 2000
K ₂ HPO ₄	2000 – 7000
MgSO ₄	1000 – 5000
MnSO ₄	2000 – 6000
Tween 80	500 – 2500
Medio MRS	3500 – 5000

Fuente: <https://www.fishersci.es/es/es/home.html>, <https://www.sigmaldrich.com/mexico.html>, <http://www.merckmillipore.com/MX>, <https://www.neogen.com/en/>

Se consultó el precio de las posibles fuentes alternas al EC y PC en la Central de Abasto de (CEDA) la Ciudad de México. Dichas fuentes son mucho más económicas (más del 90 % menos) que el EC, la PC e incluso el EL, pues los precios oscilan entre los \$15 y \$300 por kg (Tabla 8.2). EL aislado de suero de leche presentó un precio más elevado que los otros componentes (\$1500 por kg), aun así, todos componentes analizados pueden ser buenos candidatos para reducir el precio del medio MRS.

Tabla 8.2 Precio de las fuentes de N alternas por kg.

Componente	\$/kg
Amaranto (AM)	26
Avena (AV)	60
Trigo (T)	15
Harina de trigo (HT)	20
Harina de soya (HS)	310
Lenteja (L)	40
Cacahuete (Ch)	100
Levadura de pan (LP)	120
Cebada	16
Maíz	14
Proteína de deportistas (PD)	1500

8.2. Análisis del contenido de C, H y N

8.2.1 Concentración de C, H y N de *L. plantarum* y medio MRS

Con la finalidad de saber cuánto N aporta el EL, EC y la PC al medio MRS y realizar un análisis de inclusión de las posibles fuentes de N alternas a dicho medio se llevó a cabo un análisis de la concentración de N de la cepa empleada, del medio MRS, del EL, EC, de la PC y de las posibles fuentes alternas provenientes de cereales, granos y otros materiales.

Se analizó la concentración de C, H y N de *L. plantarum* B031, del medio MRS, del EL, EC y de la PC por triplicado en un equipo PerkinElmer® 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer utilizando un estándar de acetanilida. En la Figura 8.1 se presentan los resultados obtenidos. La concentración de N de *L. plantarum* B031 es de 8.3 % (p/p), mientras que la concentración de C es de 35 % (p/p). El N en

las células bacterianas está asociado con las proteínas y ácidos nucleicos, el C por su parte está relacionado con los biopolímeros estructurales de la biomasa (Heldal *et al.*, 1996). Las fuentes de N presentes en el medio MRS (EL, EC y PC) son ricas en N pues el EC y EL contienen aproximadamente un 10 % (p/p), mientras que la PC contiene un 12 % (p/p), además, son también ricas en C pues contienen un 40 % (p/p) aproximadamente.

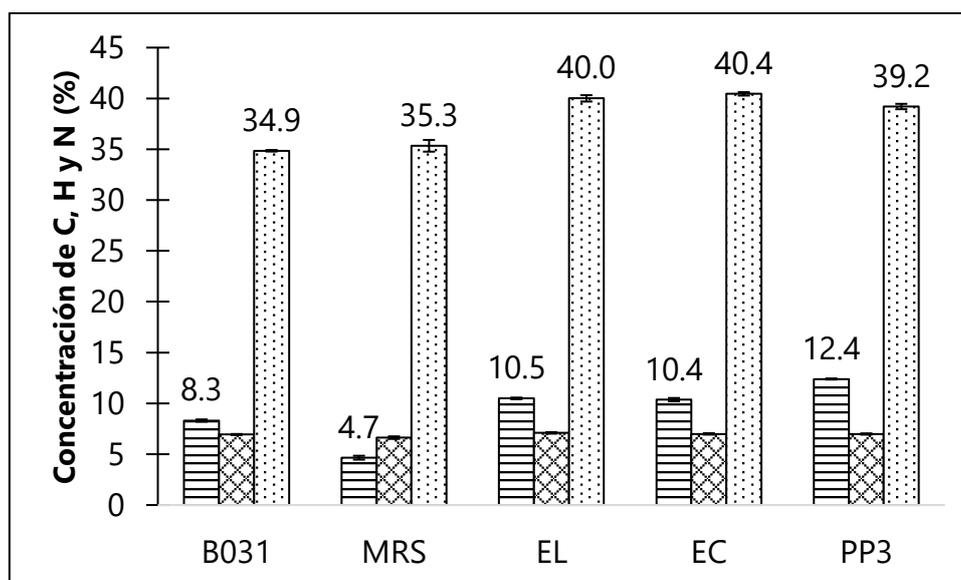


Figura 8.1 Concentración de C, H y N de *L. plantarum* B031, el medio MRS y sus fuentes de N. Las líneas negras representan las desviaciones estándar, las barras con líneas corresponden a la concentración de N, las barras con rombos a la concentración de H y las barras con puntos a la concentración de C. B031 = cepa, MRS = medio MRS, EL = extracto de levadura, EC = extracto de carne, PP3 = peptona de carne.

El medio MRS tiene una concentración de N de 4.7 % (p/p) y tiene una relación C/N de 7 aproximadamente. Debido a que la concentración de N presente en el EC y la PC es relativamente alta (> 10 % p/p) se buscaron fuentes de N alternas que pudieran satisfacer la falta de N que le aportan el EC y la PC al medio MRS y que fueran más económicas que las dichas fuentes.

8.2.2 Concentración de C, H y N de las fuentes alternas de N

Análisis reportado en la literatura

En la literatura se encontraron fuentes alternas de N provenientes de cereales, granos y otros materiales con contenido de proteína mayor al 10 % (p/p) las cuales son: trigo (T), harina de trigo (HT), harina de soya (HS), amaranto (AM), avena (AV), lenteja (L), germen de malta de maíz (GT), germen de malta de cebada (GC) cacahuate (Ch), levadura de pan (LP) y un aislado de suero de proteína (PD) (Figura 8.2). Se encontró que las fuentes con mayor contenido de proteína fueron el aislado de suero de leche (80 % p/p), seguido de la levadura de pan (30 % p/p), el germen de cebada (28 % p/p), el cacahuate (26 % p/p) y el germen de maíz (20.5 % p/p), las demás fuentes contienen del 10 – 17 % p/p de proteína por lo que son buenas candidatas para sustituir al EC y la PC (Serna-Saldivar, 2010).

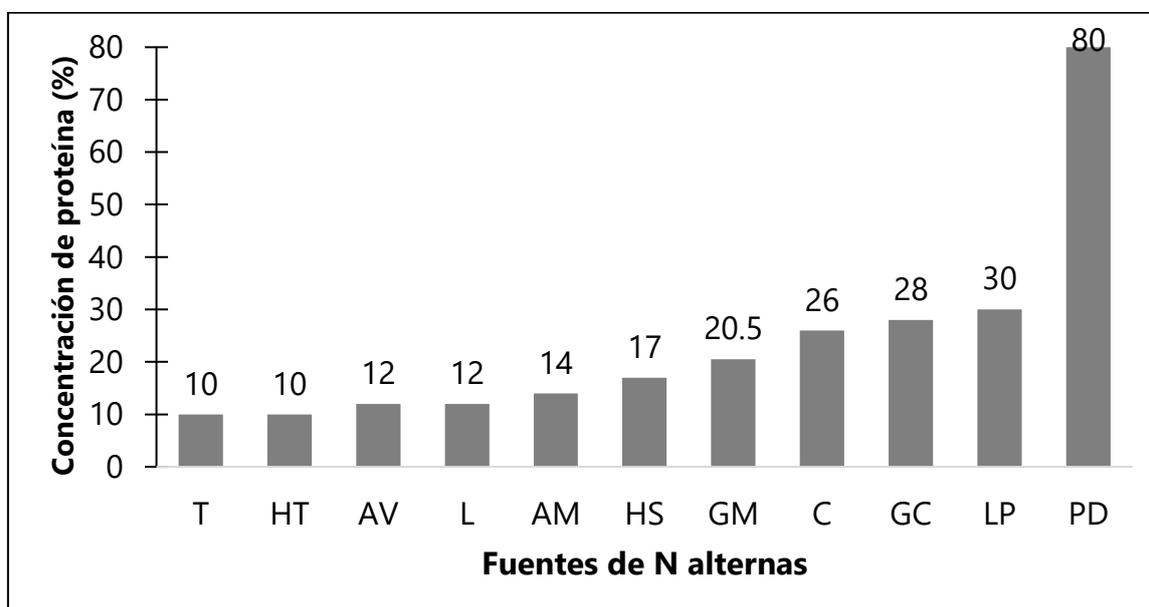


Figura 8.2 Concentración de proteína reportada en la literatura de las fuentes de N alternas. AM=amaranto, AV = avena, T = trigo, HT = harina de trigo, HS = harina de soya, GM = germen de malta de maíz, LP = levadura de panificación, GC = germen de malta de cebada, PD = aislado de suero de leche.

Análisis experimental de C, H y N

Se analizó la concentración de N de las fuentes alternas (AM, AV, T, HT, HS, LP, LP y PD) empleando un equipo CHN Perkin Elmer 2400 y en el caso de los extractos de germen de malta de maíz (EGMM) y de cebada (EGMC) se analizó el contenido de proteína por el método del BCA y se transformó a N usando un factor de conversión de 6.25 para el EGMM y 5.83 para el EGMC (Mariotti *et al.*, 2008). En Figura 8.3 se presentan los resultados obtenidos por el análisis propio de la concentración de C, H y N de las fuentes alternas y en la Tabla 8.3 la concentración de proteína de los extractos calculada por el método de BCA.

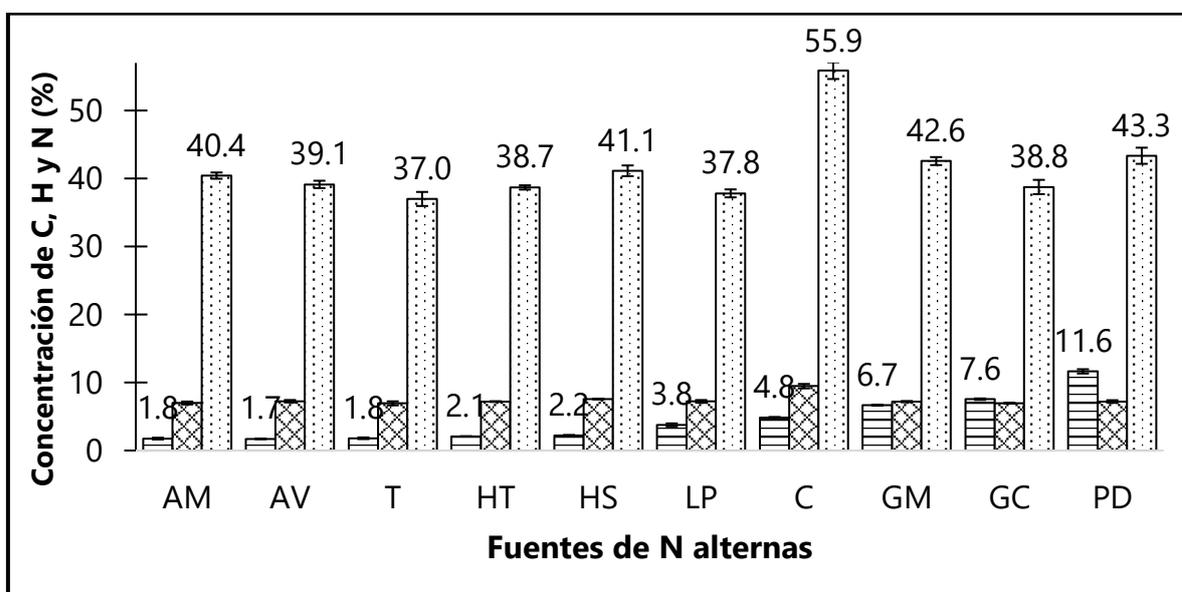


Figura 2.3 Composición de N, H y C de las fuentes alternas por análisis propios. Se muestran las desviaciones estándar en cada barra. Las barras con líneas representan la concentración de N, las barras con rombos la concentración de H y las barras con puntos la concentración de C. AM=amaranto, AV = avena, T = trigo, HT = harina de trigo, HS = harina de soya, GM = germen de malta de maíz, LP = levadura panificación, GC = germen de malta de cebada, PD = aislado de suero de leche.

Tabla 8.3 Concentración de proteína por el método de BCA y expresada en N de los extractos.

Muestra	Concentración de proteína (mg/mL)	% N* (p/p)
Extracto de germen de malta de cebada	16.80 ± 0.16	2.88 ± 0.16
Extracto de germen de malta de maíz	9.10 ± 0.31	1.45 ± 0.31

* Factor de conversión de proteína a N: 6.25 para maíz y 5.83 para cebada

La concentración de N analizada para el amaranto, la avena y el trigo fue de 1.8 % (p/p), mientras que la harina de trigo, de soya y la levadura de pan tienen una concentración entre 2 y 3 % (p/p) aproximadamente. Las fuentes con mayor contenido de N son el cacahuate, el germen de malta de maíz y de cebada y el aislado de suero de leche con una concentración de N de 4.8 a 11.6 % (p/p) aproximadamente.

La concentración de N de las fuentes alternas es menor que la que tiene el EC (10 % p/p) y la PC (12% p/p); sin embargo, las fuentes alternas son mucho más económicas que el EC y la PC.

8.2.3 Análisis de inclusión de las fuentes alternas al medio MRS

El objetivo del primer experimento fue evaluar el crecimiento de la cepa estudiada en los medios formulados con la inclusión de fuentes de N alternas y la eliminación del EC y de la PC del medio MRS debido a su alto precio. Para formular los medios alternos, se llevó a cabo un análisis para incluir los cereales y granos seleccionados al MRS, basados en la composición de N del MRS sin EC y PC, se calculó la concentración de cada fuente por añadir para cumplir con el N faltante por la eliminación de dichos elementos.

Con el análisis de contenido de N de las fuentes alternas se formularon los medios de cultivo para evaluar el crecimiento de la cepa estudiada en el medio MRS sin EC ni PC y con la adición de las fuentes de N alternas, el aporte de N y la concentración de la fuente de N se encuentran en las Tablas 8.4 y 8.5.

Tabla 8.4 Análisis de concentración de N requerida para el medio de cultivo alternativo.

Fuente de N	N aportado al medio MRS (g/L)
EL	0.52
EC	1.04
PC	1.24
Fuente alterna	2.28

Debido a que el EC y la PC aportan 2.2 g/L de N al medio MRS se debe agregar dicha concentración de N al medio por las fuentes alternas, por lo tanto, se realizaron cálculos basados en la concentración de N obtenida anteriormente (Figura 8.3 y Tabla 8.3) de las fuentes de N alternas para reemplazar con los 2.2 g/L de N faltante.

Tabla 8.5 Concentración de fuentes alternas por añadir al MRS

Fuente	Concentración (g/L)
Avena	149.7
Amaranto	125.2
Trigo	121.9
Harina de trigo	105.6
Harina de soya	98.4
Lenteja	58.3
Cacahuate	45.4
Levadura de pan	33.0
PD	18.9
EGMC	100
EGMM	200

De acuerdo con la Tabla 8.5 las concentraciones por añadir de las fuentes alternas varían de 20 a 200 g/L. Se descarta en este punto el uso de la avena, el amaranto y el trigo como fuentes alternas de N pues representan el uso de concentraciones elevadas. Para extraer la proteína del germen de malta de maíz y de cebada y satisfacer los 2.2 g/L de N faltante, en el caso del EGMC se usan 100 g de raíces secas en 1 L de agua destilada y para el EGMM se usan 200 g de raíces secas en 1 L de agua destilada.

8.2 Concentración de biomasa

La biomasa en este punto se cuantificó por el método de cuenta en placa. Se realizaron conteos de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) a las 18, 24, 36 y 48 h. Se observó que hubo poco o nulo crecimiento en el caso de los medios formulados con harina de trigo, harina de soya, lenteja, cacahuate, levadura de pan y aislado de suero de proteína (Figuras en Anexo A4). Lo anterior pudo

deberse a que los nutrientes de estos materiales usados son poco solubles en agua por lo que la bacteria no recibió los nutrientes necesarios para crecer. Además, se presentaron interferencias por color al momento de contar las UFC, pues el color de los medios formulados con cereales y granos es muy parecido al de la biomasa y no se pudo distinguir el crecimiento íntegramente.

En el caso de los medios con EGMM Y EGMC sí se observó crecimiento. En la Figura 8.4 se presenta el crecimiento de la cepa B031 en UFC/mL en los medios MEGMC, MEGMM, MCTLR y MRS. Se observa un ligero crecimiento con el paso del tiempo en todos los casos, el crecimiento máximo se observa a las 24 h, pasando las 36 h el número de células disminuye.

La cepa creció mejor en el medio MRS con $(3.4 \pm 0.28) \times 10^9$ UFC/mL seguido del medio con EGMC con $(3.3 \pm 0.5) \times 10^9$ UFC/mL. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Laitila *et al.* (2004) en donde formularon un medio con EGM y obtuvieron una concentración celular de 4×10^9 UFC/mL. En el MEGMM el crecimiento fue de $2.60 \pm 0.26 \times 10^9$ UFC/mL, en el medio control (sin EC, PC ni la fuente de N alterna) se presentó el menor crecimiento con $(1.68 \pm 0.17) \times 10^9$ UFC/mL. Se confirma que la adición de EGMM y EGMC a los medios de cultivo tiene un efecto sobre el crecimiento de la BAL.

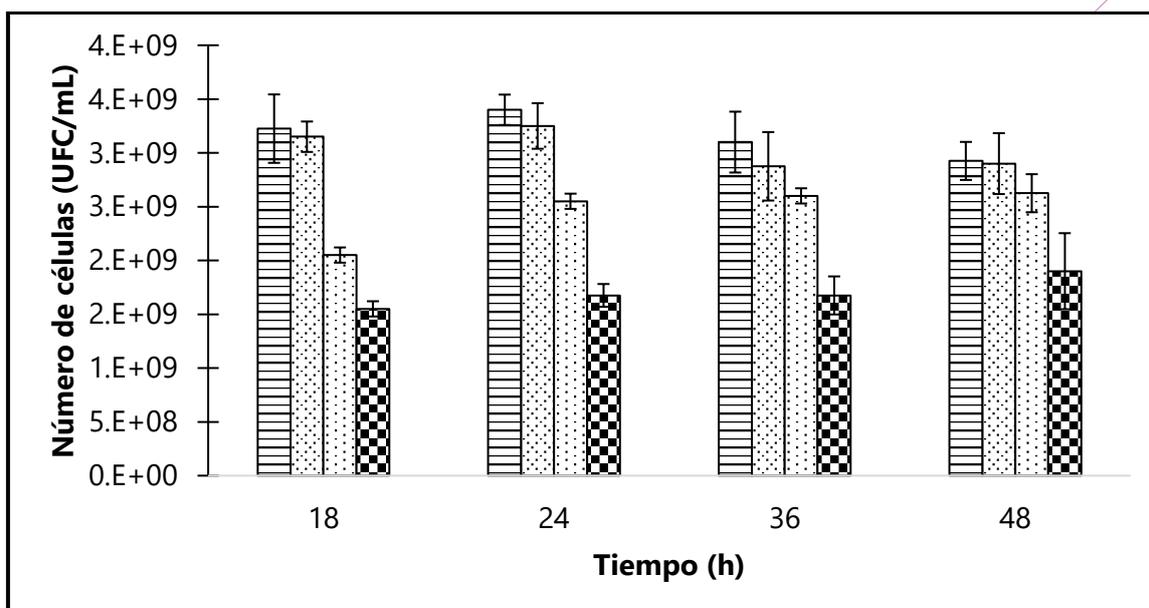


Figura 8.4 Número de células en UFC/mL de *L. plantarum* B031 en medios MRS (barras con líneas), MEGMC (barras con rombos), MEGMM (barras con puntos) y MCTLR (barras con cuadros) contadas a las 18, 24, 36 y 48 h. Las líneas negras representan las desviaciones estándar, n=3,

8.4 Conclusiones parciales

Las BAL son microorganismos que requieren de distintos nutrientes como N, C y factores de crecimiento para desarrollarse. El EC y la PC son excelentes sustratos para muchos microorganismos, contienen aminoácidos, péptidos, vitaminas solubles en agua y carbohidratos, pero son relativamente caros para su aplicación a gran escala. Por otro lado, el EGM, un extracto acuoso producido a partir de germen de cebada malteada que es además un residuo de la industria cervecera es un excelente sustrato pues contiene aproximadamente 90-92% de carbohidratos y está compuesto de hexosas (glucosa y fructosa), disacáridos (maltosa, sacarosa), trisacáridos (maltotriosa) y dextrina. Las sustancias nitrogenadas presentes en el EGM incluyen proteínas, péptidos, aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas, lo que vuelven al EGM una alternativa atractiva y económica al EC y la PC.

8. ENSAYOS PRELIMINARES

La estrategia experimental utilizada nos permitió encontrar una fuente alternativa de N más económica que el EC y la PC pues la cepa fue capaz de crecer en un medio de cultivo formulado con EGM en lugar de EC y PC. Además, el crecimiento fue similar al observado con el medio de cultivo de referencia MRS (3×10^9 UFC/mL).

9 SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

Se empleó un diseño Plackett-Burman para identificar los factores que afectan al crecimiento de *L. plantarum*, los datos experimentales de las curvas de crecimiento fueron ajustados al modelo logístico y posteriormente se analizaron los resultados del diseño PB usando la concentración de biomasa y la productividad de biomasa. Asimismo, se realizaron ensayos control en medio MRS en las condiciones de pH y temperatura del diseño PB.

9.1 Análisis de las cinéticas de crecimiento

En esta sección se presentan las curvas de crecimiento obtenidas de los medios MRS (sección 7.6) a dos pH iniciales (5 y 7) y dos temperaturas (30 y 37 °C), estos ensayos control se hicieron para compararlos con las curvas de crecimiento del diseño Plackett-Burman empleando los medios de cultivo señalados en la Tabla 7.4. Se emplearon los medios con EGM (denominados M) formulados de acuerdo con los diferentes niveles del diseño PB, y los medios control (denominados m) fueron formulados de la misma manera que los medios con EGM, pero sin EC, PC ni EGM. Los datos de crecimiento se ajustaron al modelo Logístico del cual se estimaron los parámetros μ , y X_{\max} .

En la Figura 9.1 se muestran las curvas de crecimiento obtenidas de los medios MRS a dos pH iniciales (5 y 7) y dos temperaturas (30 y 37 °C), de acuerdo con los niveles + y – del diseño PB. Las curvas de crecimiento de los medios EGM y su medio control correspondiente se muestran en la Figura 9.2.

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

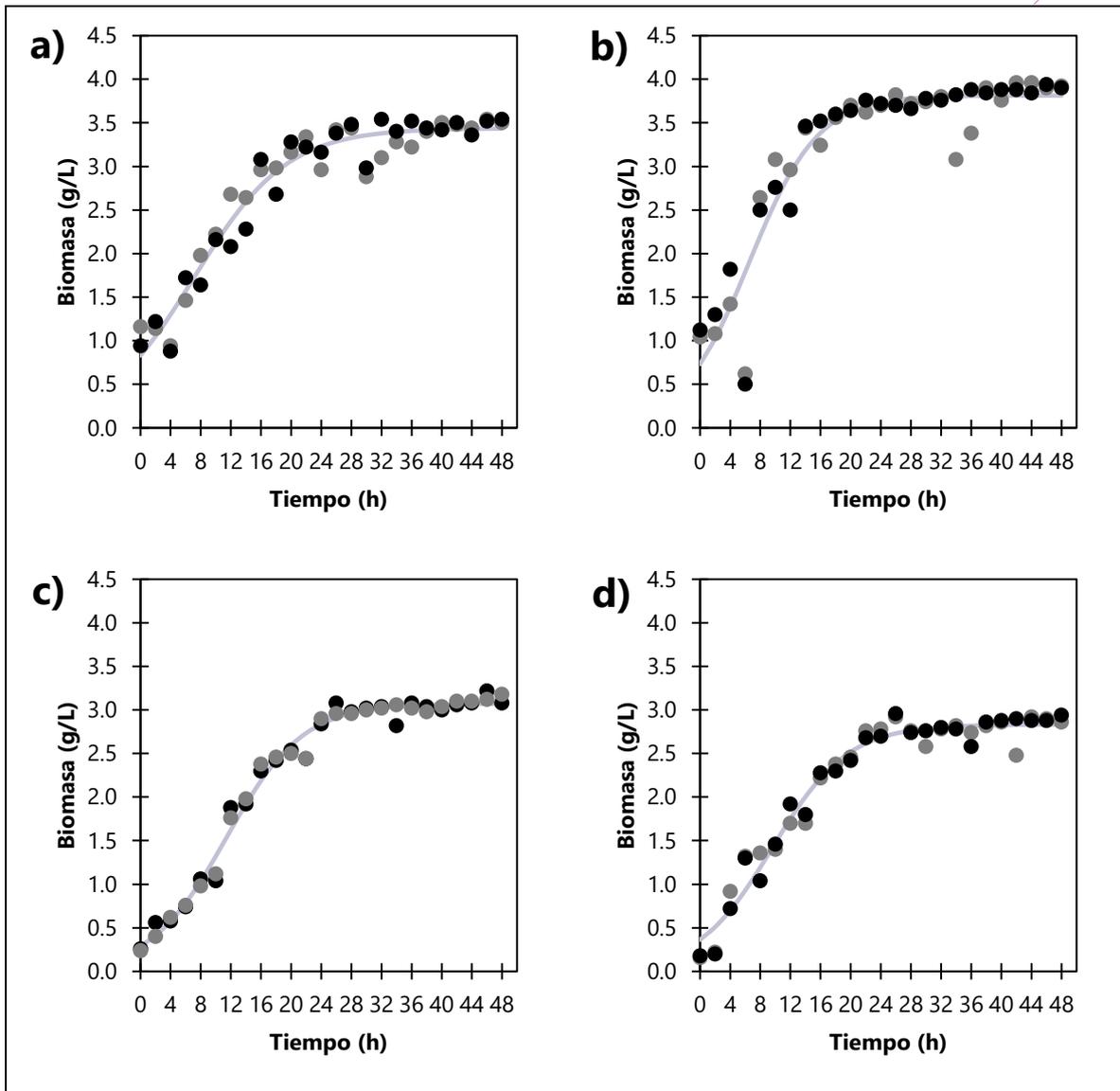
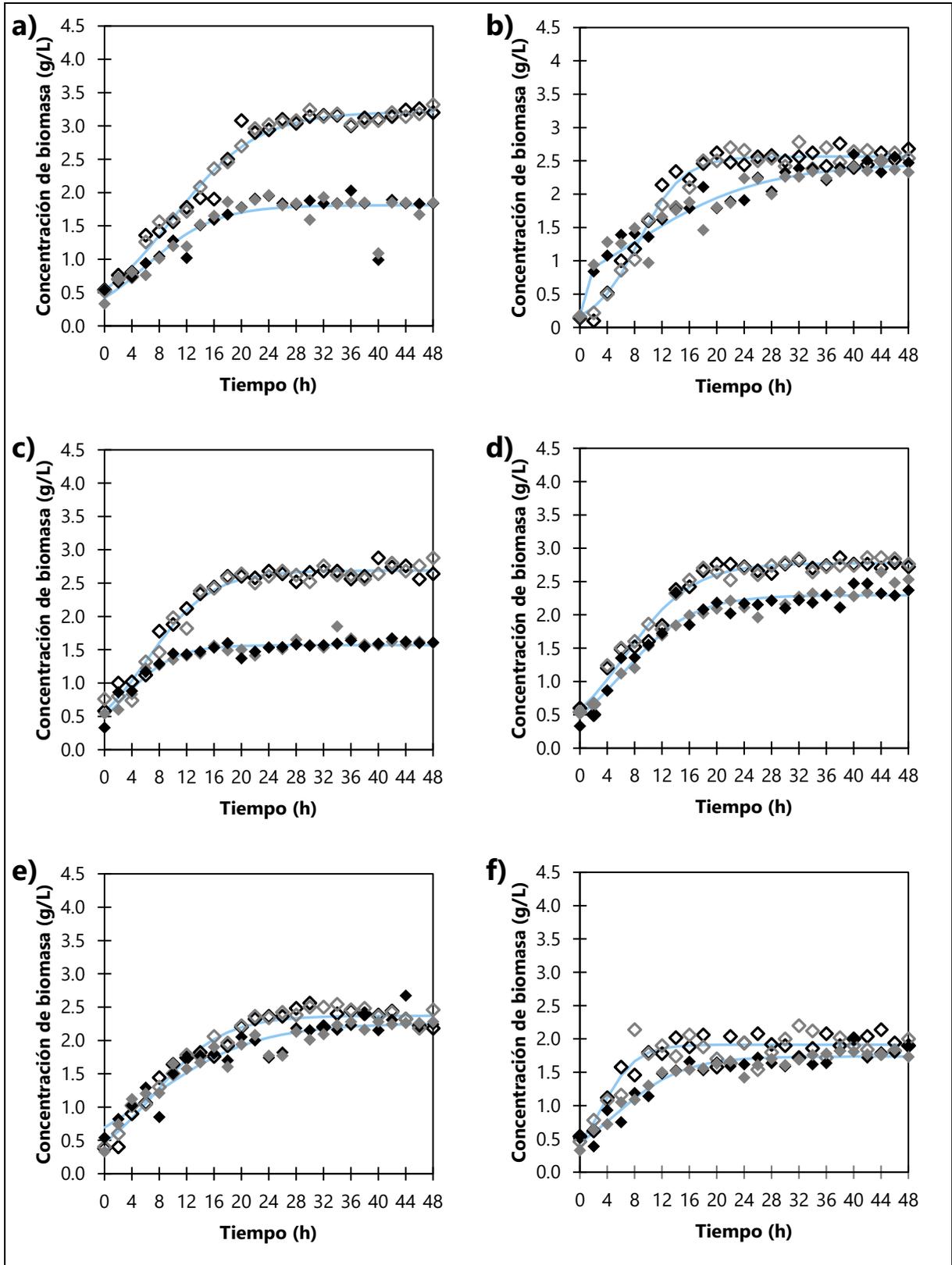


Figura 9.1 Curvas de crecimiento del medio MRS probado a diferentes temperaturas y pH, los círculos negros y grises representan a los datos experimentales por duplicado y las líneas continuas corresponden al modelo ajustado. a) MRS 1: pH 5, 30°C; b) MRS 2: pH 7, 30 °C; c) MRS 3: pH 5, 37 °C; d) MRS 4: pH 7, 37 °C.

Se aprecia que el crecimiento de la cepa se estabiliza aproximadamente a las 18 h y que creció ligeramente mejor a una temperatura de 30 °C pues se observa una biomasa de entre 3.5 y 4 g/L de las 18 a las 48 h, lo anterior coincide con Zhou *et al.* (2015) en donde comprueban que la temperatura óptima de crecimiento de las BAL es de 30 a 37 °C. Con respecto al pH la formación de biomasa fue similar a un pH de 5 y de 7, aproximadamente 3 y 4 g/L lo cual sugiere que la cepa puede crecer a los 2 pH distintos de la misma manera.

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

Diversos autores (Joshi *et al.*, 2010; Wee *et al.*, 2005) reportan una biomasa de BAL entre 3 y 4 g/L crecidas en medio MRS.



9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

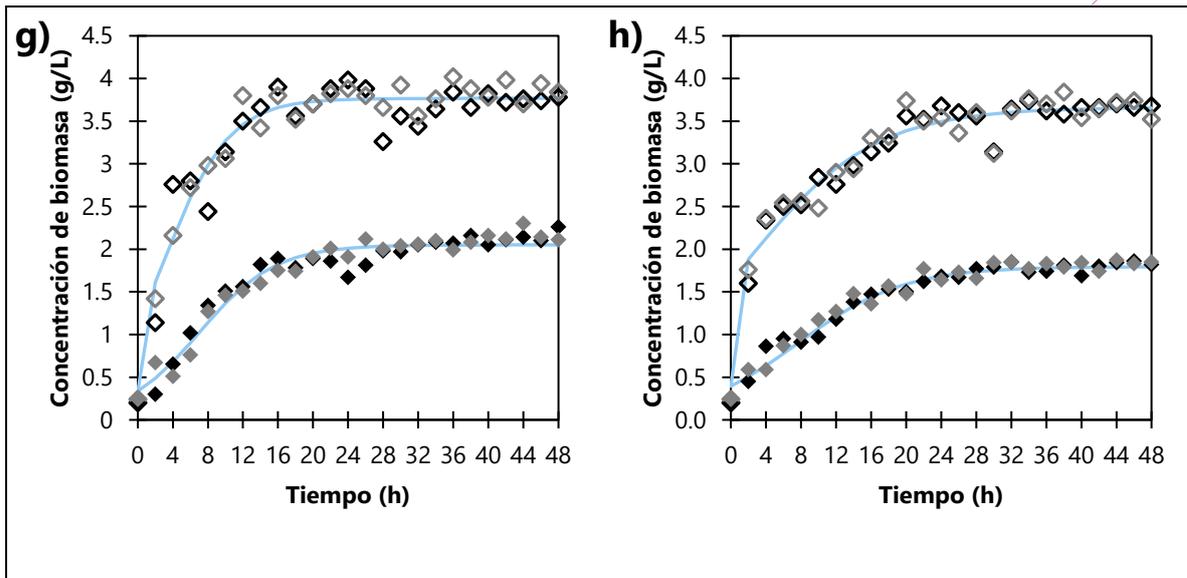


Figura 9.2 Curvas de crecimiento de los medios de prueba empleados para el diseño de PB, los datos experimentales se ajustaron al modelo Logístico. Los rombos sin relleno representan a los datos experimentales de los medios M_i , los rombos rellenos a los datos experimentales de los medios m_i , los datos se muestran por duplicado (rombos grises y negros) y las líneas continuas corresponden al modelo ajustado. Los medios con EGM (denominados M) fueron formulados de acuerdo con los diferentes niveles por el diseño PB, y los medios control (denominados m) formulados de la misma manera que los medios con EGM, pero sin EC, PC ni EGM. a) M1 y m1, b) M2 y m2, c) M3 y m3, d) M4 y m4, e) M5 y m5, f) M6 y m6, g) M7 y m7, h) M8 y m8.

Las curvas de crecimiento (Figura 9.2) muestran que a partir de las 18 h la biomasa se encuentra en fase estacionaria para todos los casos, lo mismo ocurre con el medio MRS. Los medios de cultivo con los que se obtuvo un mayor crecimiento fueron el M1, M7 y M8 con una concentración de biomasa de 3 - 4 g/L aproximadamente. Con los demás medios de cultivo se obtuvo una concentración de biomasa menor (2 a 2.5 g/L). Cabe destacar que con los medios control (medios m, sin EC, PC ni EGM) el crecimiento fue menor que con los medios con EGM (sin EC ni PC) pues en general la diferencia entre los medios M y m fue de 1 g/L. Este hecho apunta a que el EGM es una fuente de N alterna que logra satisfacer la falta de N que aportaba el EC y la PC.

La Tabla 9.1 muestra los parámetros obtenidos por el modelo Logístico, la tasa específica de crecimiento y la biomasa máxima (μ y X_{max} respectivamente) correspondientes a los medios MRS, M y m. La μ del medio MRS es de 0.2 h^{-1} en

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

promedio mientras que los medios M2, M6 y M7 presentaron valores mayores de μ a las obtenidas con el medio MRS (0.31, 0.39 y 0.27 h⁻¹ respectivamente), por otra parte, con los medios m se obtuvieron valores de μ entre 0.1 y 0.2 h⁻¹ aproximadamente. Otros autores reportan μ entre 0.2 y 0.3 h⁻¹ similares a las obtenidas con el medio MRS (Jurado-Gómez *et al.*, 2014; Passos *et al.*, 1993; Kaavessina *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2015b).

Tabla 9.1 Parámetros obtenidos con el modelo logístico (μ y X_{\max}) a partir de las curvas de crecimiento obtenidas en los medios MRS y los medios M_i del diseño Plackett Burman y sus respectivos controles m_i

Medio			Medio		
Medio	μ (h ⁻¹)	X_{\max} (g/L)	Medio	μ (h ⁻¹)	X_{\max} (g/L)
MRS 1	0.16	3.4	m1	0.20	1.8
MRS 2	0.20	3.1	m2	0.10	2.5
MRS 3	0.22	3.8	m3	0.28	1.6
MRS 4	0.20	2.8	m4	0.20	2.3
M1	0.16	3.2	m5	0.13	2.3
M2	0.31	2.6	m6	0.20	1.7
M3	0.21	2.7	m7	0.23	2.1
M4	0.20	2.8	m8	0.17	1.8
M5	0.20	2.4			
M6	0.39	1.9			
M7	0.27	3.8			
M8	0.14	3.7			

En cuanto a la biomasa máxima obtenida a lo largo del cultivo (48 h), con el medio MRS cultivado a 30 °C y pH 7 se obtuvo una biomasa de casi 4 g/L lo cual concuerda con los datos experimentales en donde a 30 °C se obtuvo la mayor concentración de biomasa. Los medios M7 y M8 presentaron X_{\max} similares a las obtenidas con el medio MRS (3.8 y 3.7 g/L), mientras que los medios con los que se obtuvo la menor X_{\max} fueron el M5 y el M6 (2.4 y 1.9 g/L, respectivamente). La X_{\max} de los medios (M_i) con EGM fue relativamente mayor que la X_{\max} de los

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

medios sin EGM (mi), lo cual indica nuevamente que el EGM es una fuente de N alterna efectiva.

La segunda variable de respuesta para el diseño PB fue la productividad de biomasa (P_r) definida como la concentración de biomasa dividida por la duración del cultivo. Se estimó la productividad de biomasa ($\text{g/L}\cdot\text{h}$) a las 24 y 48 h del cultivo (Figura 9.3). La productividad es mayor a las 24 h que a las 48 h, por lo que es recomendable cosechar las bacterias a las 24 h, se trata de un cultivo más joven además se observa que a partir de las 18 h la concentración de biomasa se mantiene constante, no hay razón para prolongar el cultivo.

La productividad de biomasa calculada para los medios MRS oscila entre 0.11 y 0.15 $\text{g/L}\cdot\text{h}$, de igual manera que con la biomasa, con los medios M1, M7 y M8 se obtuvieron las mayores productividades (0.12, 0.16 y 0.15 $\text{g/L}\cdot\text{h}$, respectivamente). Estos valores de productividad son muy similares a las obtenidas con los medios MRS (0.12 – 0.15 $\text{g/L}\cdot\text{h}$). La productividad de los medios control es mucho menor (hasta 0.1 $\text{g/L}\cdot\text{h}$ de diferencia) que la productividad de los medios con EGM.

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

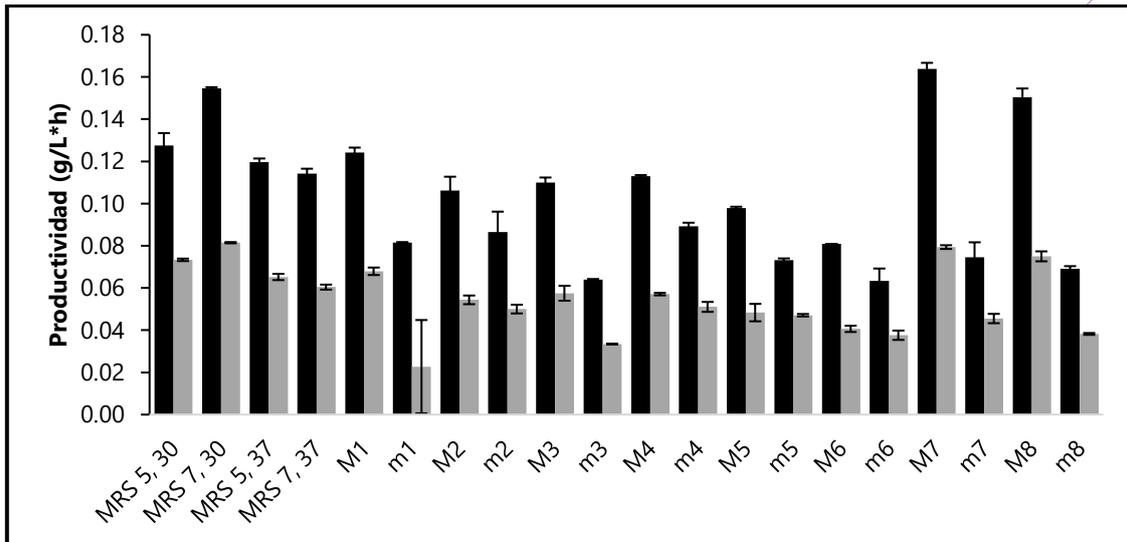


Figura 9.3 Productividad de biomasa a las 24 y 48 h de los medios de cultivo alternativos (M), los controles (m) y el MRS. Los experimentos se realizaron por duplicado, se muestran las desviaciones estándar. Las barras color negro corresponden a la productividad a las 24 h y las barras grises a la productividad a las 48 h.

En general se observan diferencias entre los tratamientos evaluados, con algunos se obtuvo una mejor respuesta (concentración de biomasa y productividad de biomasa) que con otros tratamientos, pero para estudiar con mayor profundidad el efecto de los factores evaluados sobre las respuestas se analizaron mediante análisis de varianza ANOVA.

9.2 Análisis de los resultados del Diseño de Plackett-Burman

Para identificar los factores (concentraciones de nutrientes y condiciones de operación) que tienen mayor importancia sobre las variables de respuesta (concentración de biomasa y productividad de biomasa a las 4, 12, 18 y 24 h) se empleó un diseño experimental del tipo Plackett-Burman. Los resultados de dicho diseño se analizaron mediante el software STATGRAPHICS® Centurion XVI, con el cual se obtuvo el análisis de varianza (ANOVA), los coeficientes de regresión y las gráficas de efectos (diagramas de Pareto, de efecto de medias) de cada variable de respuesta, al final se seleccionaron dos factores para realizar el siguiente diseño experimental.

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

Coeficiente de determinación

El coeficiente de determinación (R^2) es un parámetro estadístico que nos indica la variabilidad de los datos que puede explicarse por el modelo, es decir, mide la capacidad predictiva del modelo estimado, mientras mayor sea R^2 el modelo será más confiable (Cameron & Windmeijer, 1997) . En la Tabla 9.2 se presentan los coeficientes de determinación para cada variable de respuesta (concentración de biomasa y productividad de biomasa) a los distintos tiempos de cultivo (4, 12, 18 y 24 h). En todos los casos el R^2 se encuentra arriba del 97 % lo cual revela que el modelo tal como está explica más del 97 % de la variabilidad en la concentración de biomasa y productividad de biomasa a las 4, 12, 18 y 24 h, además, indica que los factores tienen un efecto importante.

Tabla 9.2 Coeficientes de determinación (R^2) correspondientes a las variables de respuesta del diseño PB

Tiempo de cultivo (h)/Variable de respuesta	R^2 (%)	
	Concentración de biomasa	Productividad de biomasa
4	97.04	96.97
12	97.67	97.66
18	99.20	99.47
24	99.16	99.25

Diagrama de Pareto

El diagrama de Pareto es una gráfica de barras que organiza los factores en orden descendente de acuerdo con el efecto que éstos presentan sobre la variable de respuesta y muestra si un efecto es estadísticamente significativo o no con una línea que determina el nivel de significancia. El tamaño de cada barra es proporcional al valor de un estadístico t calculado para el efecto correspondiente (Box *et al.*, 2005). Cualquier barra más allá de la línea vertical es estadísticamente

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

significativa en el nivel de significancia seleccionado, establecido en este caso en 5%.

Los diagramas de Pareto se modificaron arreglando todos los factores en un mismo orden (A, B, C, D, E, F y G) y en una misma escala con el fin de comparar el efecto de los factores a través del tiempo.

En la Figura 9.4 se presenta el diagrama de Pareto para la concentración de biomasa a las 4, 12, 18 y 24 h de cultivo. Durante las primeras horas de cultivo (4 y 12 h) el comportamiento de los factores varía un poco pues factores como concentración de sulfato de magnesio y pH pasan de no ser significativos a serlo, esto puede deberse a que al inicio del cultivo (4 h) la BAL se empieza a adaptar a los nutrientes del medio y a las condiciones ambientales (pH, temperatura). Sin embargo, conforme avanza el tiempo de cultivo el efecto de los factores sobre la respuesta se mantiene más estable pues la bacteria ya se adaptó por completo a las condiciones de cultivo, además de que a partir de las 18 h los cultivos entran en fase estacionaria.

Seis de los siete factores ejercen un efecto significativo sobre la concentración de biomasa. Con efecto negativo son: sulfato de magnesio, glucosa, acetato de sodio y sulfato de manganeso; y con efecto positivo la temperatura y el pH (Figura 9.4).

Los factores que se mantienen con mayor efecto significativo a las 12, 18 y 24 h son concentración de glucosa, de acetato de sodio y de sulfato de magnesio. Para todos los tiempos la concentración de fosfato de potasio no presenta efecto significativo.

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

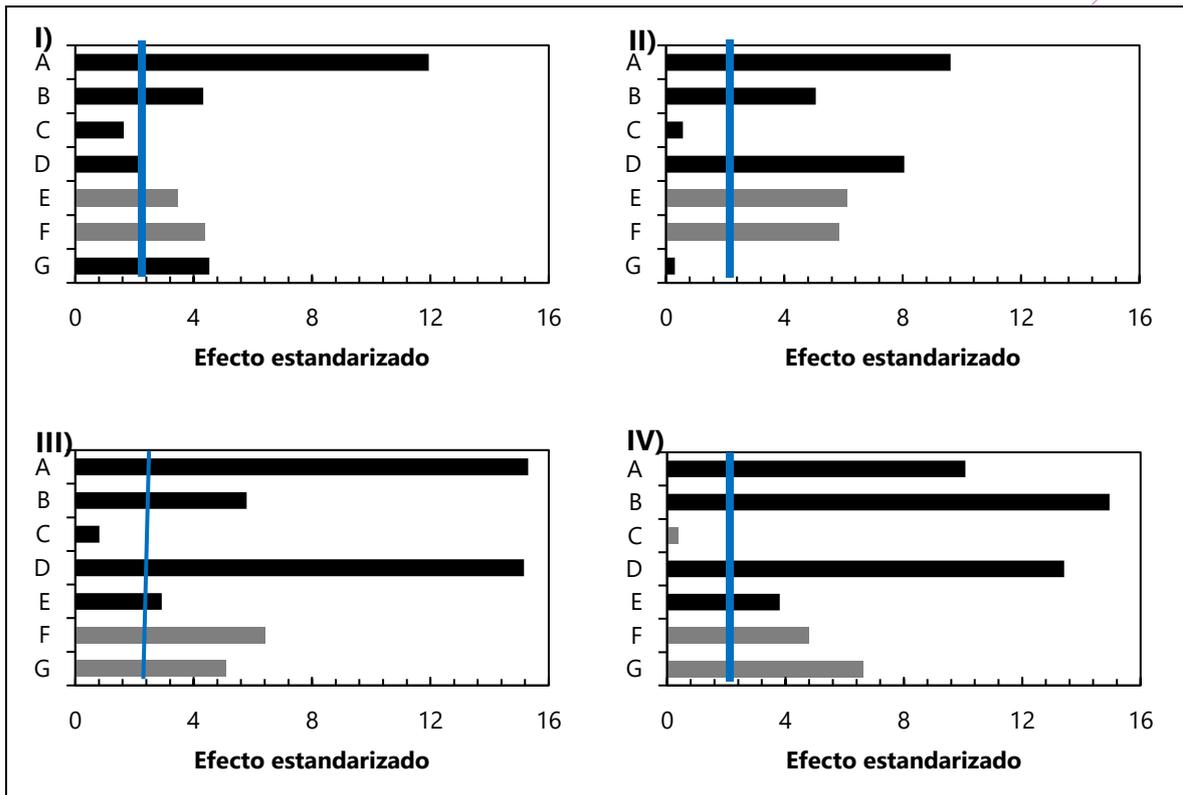


Figura 9.4 Diagramas modificados de Pareto para la concentración de biomasa. La línea azul representa el nivel de significancia. Las barras negras representan el efecto negativo y las barras grises el efecto positivo de los factores sobre la concentración de biomasa. I) $t = 4h$, II) $t = 12h$, III) $t = 18h$, IV) $t = 24h$. A) glucosa, B) acetato de sodio, C) fosfato de potasio, D) sulfato de magnesio, E) sulfato de manganeso, F) temperatura, G) pH.

En la Figura 9.5 se muestran los diagramas de Pareto modificados para la productividad de biomasa a las 4, 12, 18 y 24 h, en este caso el comportamiento del efecto de los factores es muy similar a lo que ocurre con la concentración de biomasa debido a que la productividad está definida como la concentración de biomasa dividida por la duración del cultivo.

En la mayoría de los casos (4, 18 y 24 h) seis de los siete factores ejercen un efecto significativo sobre la respuesta y los que lo hacen mayormente son la concentración de glucosa, acetato de sodio y sulfato de magnesio ejerciendo además un efecto positivo sobre la productividad de biomasa. Salvo a las 12 h de cultivo, en todos los tiempos el factor sin un efecto significativo es la

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

concentración de fosfato de potasio lo cual coincide cuando se analiza la concentración de biomasa.

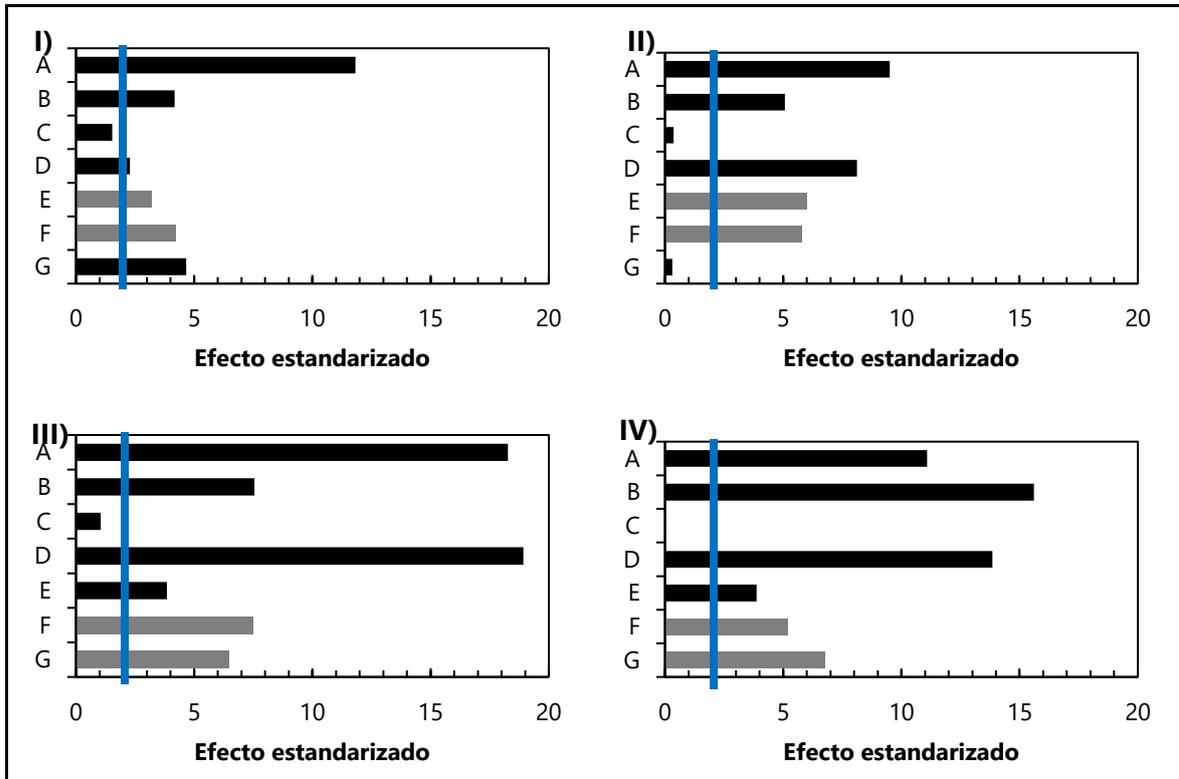


Figura 9.5 Diagramas modificados de Pareto para la productividad de biomasa a los diferentes tiempos del cultivo. La línea azul representa el nivel de significancia. Las barras negras representan el efecto negativo y las barras grises el efecto positivo de los factores sobre la productividad de biomasa[1]. I) t = 4h, II) t = 12h, III) t = 18h, IV) t = 24h. A) glucosa, B) acetato de sodio, C) fosfato de potasio, D) sulfato de magnesio, E) sulfato de manganeso, F) temperatura, G) pH.

Diagrama de efecto de medias

El diagrama de efecto de medias (o de efectos principales) estima el cambio en la respuesta cuando cada factor se mueve de su nivel bajo a su nivel alto. Las líneas indican el cambio estimado en la respuesta a medida que cada factor se mueve entre sus niveles bajo y alto mientras todos los demás factores se mantienen constantes en su valor intermedio. La pendiente muestra si hay efecto del factor sobre la respuesta, cuando la línea es horizontal no hay efecto principal, es decir, se obtiene una misma respuesta al ir de un nivel bajo a un nivel alto. En cambio, cuando la línea no es horizontal, hay un efecto principal, pues la respuesta cambia de acuerdo con los niveles alto y bajo del factor, si la pendiente

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

es positiva el efecto del factor es positivo, por el contrario, si la pendiente es negativa el efecto del factor será negativo, además mientras más inclinada sea la pendiente de la línea, mayor será la magnitud del efecto principal.

En la Figura 9.6 se presentan los diagramas de efecto de medias para la concentración de biomasa a las 4, 12, 18 y 24 h. A las 4 h el comportamiento de los factores es un poco diferente comparado con las 12, 18 y 24 h, Lo cual es similar a los diagramas de Pareto en las primeras horas de cultivo, esto podría deberse a la fase de adaptación del cultivo de BAL, mientras que a partir de las 12 h ya se encuentra adaptado.

En todos los tiempos de cultivo se observa que la concentración de fosfato de potasio no tiene un efecto principal sobre la concentración de biomasa pues la línea es horizontal, en cualquier nivel (bajo o alto) la respuesta es la misma.

Los tres factores con efectos principales significativos (concentración de glucosa, acetato de sodio y sulfato de magnesio) tienen un mayor efecto en la concentración de biomasa que los demás factores pues las líneas son más inclinadas. Por ejemplo, la concentración de biomasa promedio a baja concentración de sulfato de magnesio a las 24 h es aproximadamente 3.2 g/L, mientras que a alta concentración la biomasa promedio es aproximadamente 2.6 g/L. La diferencia de 0.6 se llama el "efecto principal" de la concentración de sulfato de magnesio. Además, con el nivel bajo de los tres factores se incrementa la respuesta, en este caso, concentración de biomasa.

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

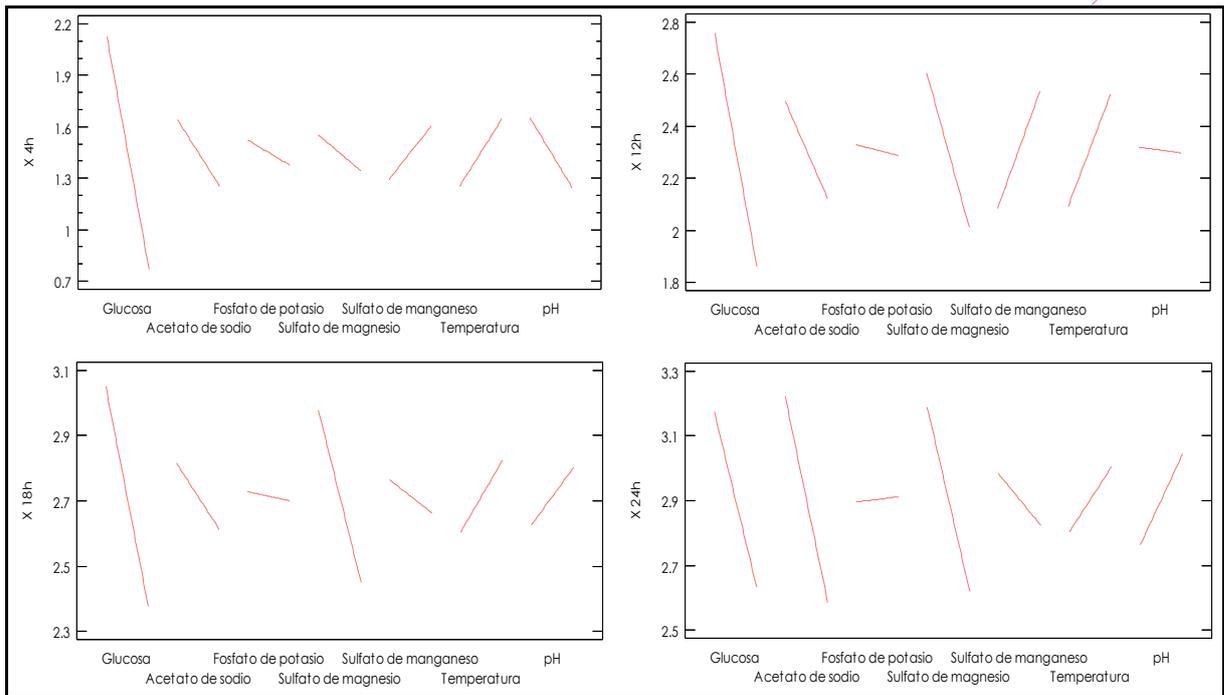


Figura 9.6 Diagramas de efecto de medias para la concentración de biomasa a las 4, 12, 18 y 24h.

En la Figura 9.7 se presentan los diagramas de efectos principales para la productividad de biomasa a las 4, 12, 18 y 24 h. Como se observa, son casi iguales que los diagramas de efectos principales de la concentración de biomasa, esto es por lo expresado anteriormente en relación con la definición de productividad. Por lo que la única diferencia será el efecto principal que ejercen los factores sobre la productividad de biomasa, por ejemplo, la productividad promedio a baja concentración de sulfato de magnesio a las 24 h es aproximadamente 0.13 g/L*h, mientras que a alta concentración la productividad promedio es aproximadamente 0.10 g/L.*h, por lo tanto, el efecto principal de la concentración de sulfato de magnesio es 0.03 g/L*h.

De igual manera se descarta que la concentración de fosfato de potasio posea algún efecto principal sobre la productividad de biomasa pues la media de la respuesta será siempre la misma en cualquier nivel (bajo o alto).

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

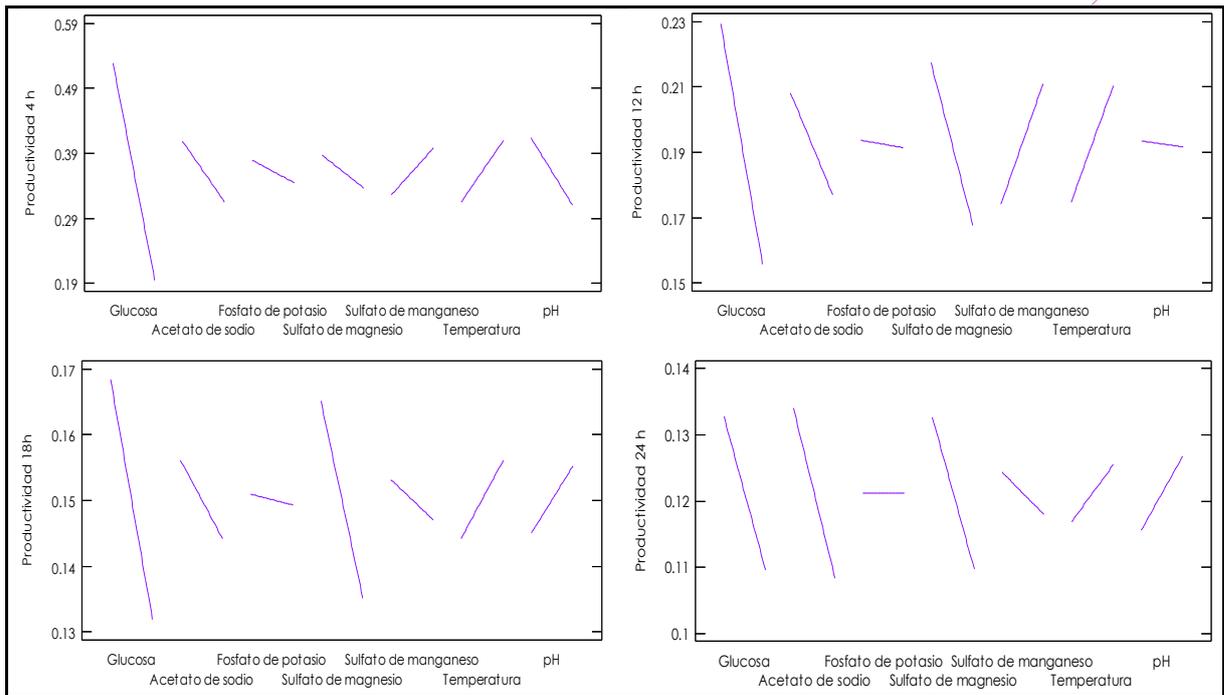


Figura 9.7 Diagrama de efecto de medias para la productividad de biomasa a las 4, 12, 18 y 24 h

Coefficientes de regresión

Los coeficientes de regresión son los valores por los que se multiplican las variables de la ecuación de regresión, el tamaño y signo nos indica qué tanto aumenta o disminuye la respuesta y la constante es el promedio de los datos experimentales de cada respuesta (Weisberg, 2005). Con ellos construimos la ecuación que nos ayuda a predecir la respuesta deseada en función de los valores de cada factor (A, B, C, D, E, F y G). Los coeficientes de regresión estimados para cada variable de respuesta (concentración de biomasa y productividad de biomasa) se encuentran en las Tablas 9.3 y 9.4, respectivamente.

Para la concentración de biomasa (Tabla 9.3) se observa que el valor promedio de la biomasa va en aumento, excepto para el tiempo de 12 h. En el caso de la productividad de biomasa (Tabla 9.4) es al contrario pues en los primeros tiempos del cultivo el denominador es más pequeño que al final.

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

Tabla 9.3 Coeficientes de regresión para la concentración de biomasa en los distintos tiempos de cultivo.

Factores	Coeficientes para los distintos tiempos de cultivo			
	4 h	12 h	18 h	24 h
Constante	3.9989	2.7100	3.8004	4.2836
A: Glucosa	-0.1357	-0.0897	-0.0673	-0.0543
B: Acetato de sodio	-0.1942	-0.1867	-0.1008	-0.3183
C: Fosfato de potasio	-0.1467	-0.0417	-0.0283	0.0167
D: Sulfato de magnesio	-1.0417	-2.9667	-2.6333	-2.8583
E: Sulfato de manganeso	1.5583	2.2583	-0.5083	-0.8083
F: Temperatura	0.0560	0.0617	0.0319	0.0290
G: pH	-0.2033	-0.0108	0.0883	0.1408

Tabla 9.4 Coeficientes de regresión para productividad de biomasa durante el cultivo de BAL.

Factores	Coeficientes para los distintos tiempos de cultivo			
	4 h	12 h	18 h	24 h
Constante	1.0164	0.2268	0.2130	0.1786
A: Glucosa	-0.0334	-0.0074	-0.0037	-0.0023
B: Acetato de sodio	-0.0467	-0.0156	-0.0060	-0.0129
C: Fosfato de potasio	-0.0342	-0.0022	-0.0017	-0.0001
D: Sulfato de magnesio	-0.2542	-0.2495	-0.1500	-0.1143
E: Sulfato de manganeso	0.3583	0.1840	-0.0305	-0.0320
F: Temperatura	0.0135	0.0051	0.0017	0.0012
G: pH	-0.0521	-0.0009	0.0052	0.0056

9.3 Conclusiones parciales

Se observaron diferencias entre los tratamientos evaluados, con algunos se obtuvo una mejor respuesta (concentración de biomasa y productividad de

9. SELECCIÓN DE VARIABLES PARA EL DISEÑO DEL MEDIO DE CULTIVO

biomasa) que con otros tratamientos demostrando que el EGM es una fuente de N alterna competitiva con el EC y la PC.

Los factores que tuvieron un mayor efecto sobre las distintas respuestas fueron la concentración de glucosa, acetato de sodio y sulfato de magnesio, Se eligió a la concentración de acetato de sodio y de sulfato de magnesio como factores para variar en el diseño de optimización porque, si bien la glucosa juega un papel muy importante en el crecimiento de las BAL debido a que es fundamental para la obtención de energía y la formación de ácidos orgánicos (Kowalczyk *et al.*, 2015), otros autores han establecido que la concentración a la que se emplea es la óptima (Agarwal *et al.*, 2008; Davoodi *et al.*, 2016), además de que el EL contiene C en su composición (40 g/L) por lo que no se consideró incluir a la glucosa como factor en el diseño de optimización.

10 OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

En esta sección se presenta un diseño factorial central compuesto y la metodología de superficie de respuesta para optimizar la concentración de biomasa y productividad de biomasa empleando al acetato de sodio y sulfato de magnesio como factores del diseño experimental. Para ello primeramente se realizaron curvas de crecimiento y se ajustaron a modelos matemáticos analizando su comportamiento y los parámetros cinéticos más importantes, posteriormente los datos experimentales se analizaron mediante el DFCC con ayuda del software STATGRAPHICS® Centurion XVI y finalmente se discutieron y validaron los resultados obtenidos.

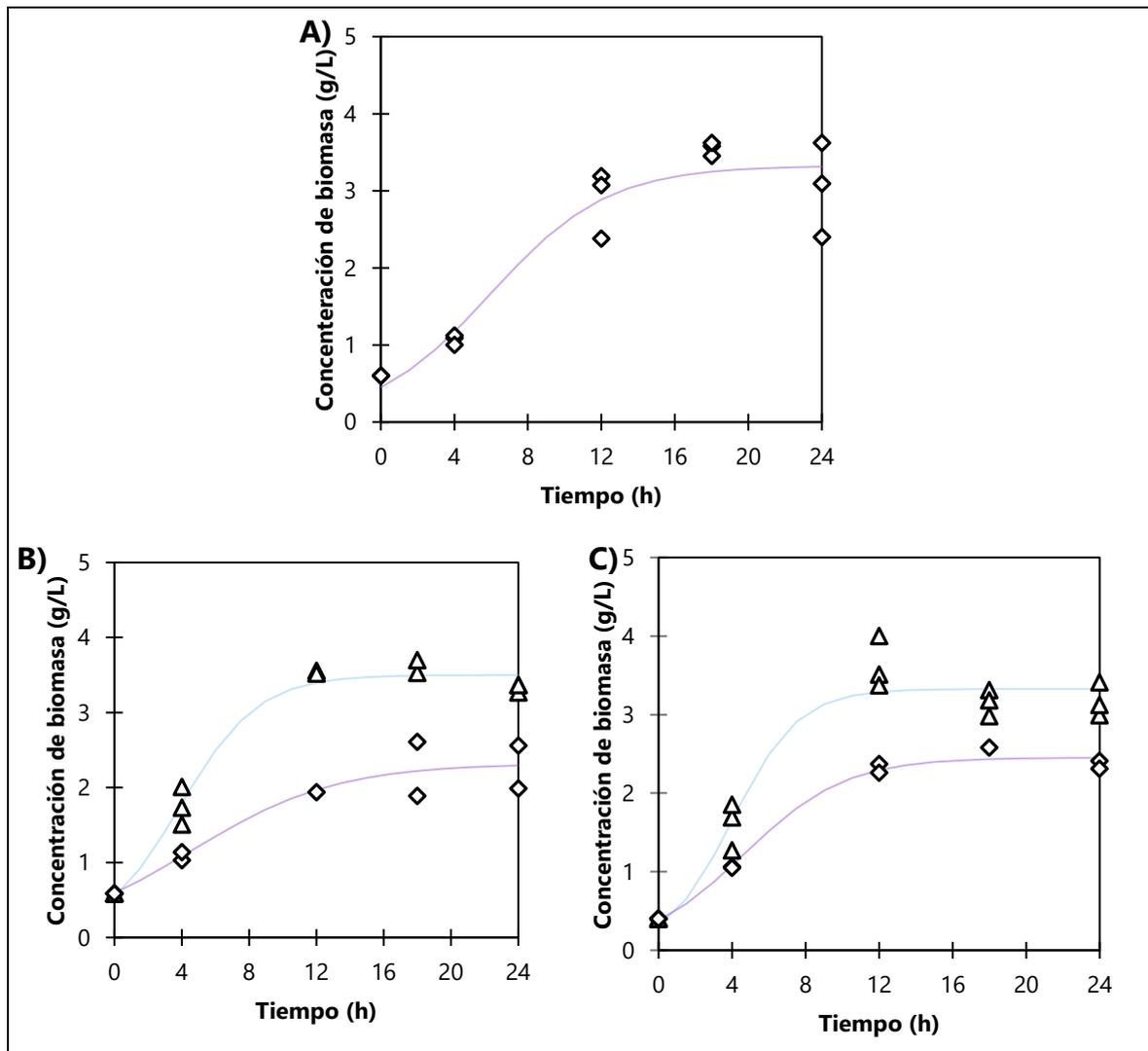
10.1 Análisis de las cinéticas de crecimiento

Para el diseño de optimización se llevó a cabo un diseño factorial central compuesto con la variación de dos factores (concentración de acetato de sodio y de sulfato de magnesio), y se llevaron a cabo 10 corridas con 2 réplicas de acuerdo con los diferentes niveles señalados en la Tabla 7.5 y 7.10 por lo que se prepararon 10 medios de cultivo con sus respectivos controles y un medio MRS. Los cultivos se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 200 mL y se monitoreó durante 24 h a una temperatura de 33 °C. Se tomaron muestras a las 0, 12, 18 y 24 h por triplicado y se les midió la biomasa por peso seco (g/L) y la formación de ácido láctico mediante HPLC. Los datos se ajustaron al modelo Logístico, para la concentración de biomasa y se estimaron los parámetros μ , y X_{max} , la formación de producto (AL) se describió con el modelo de Luedeking y Piret estimando los parámetros α y β .

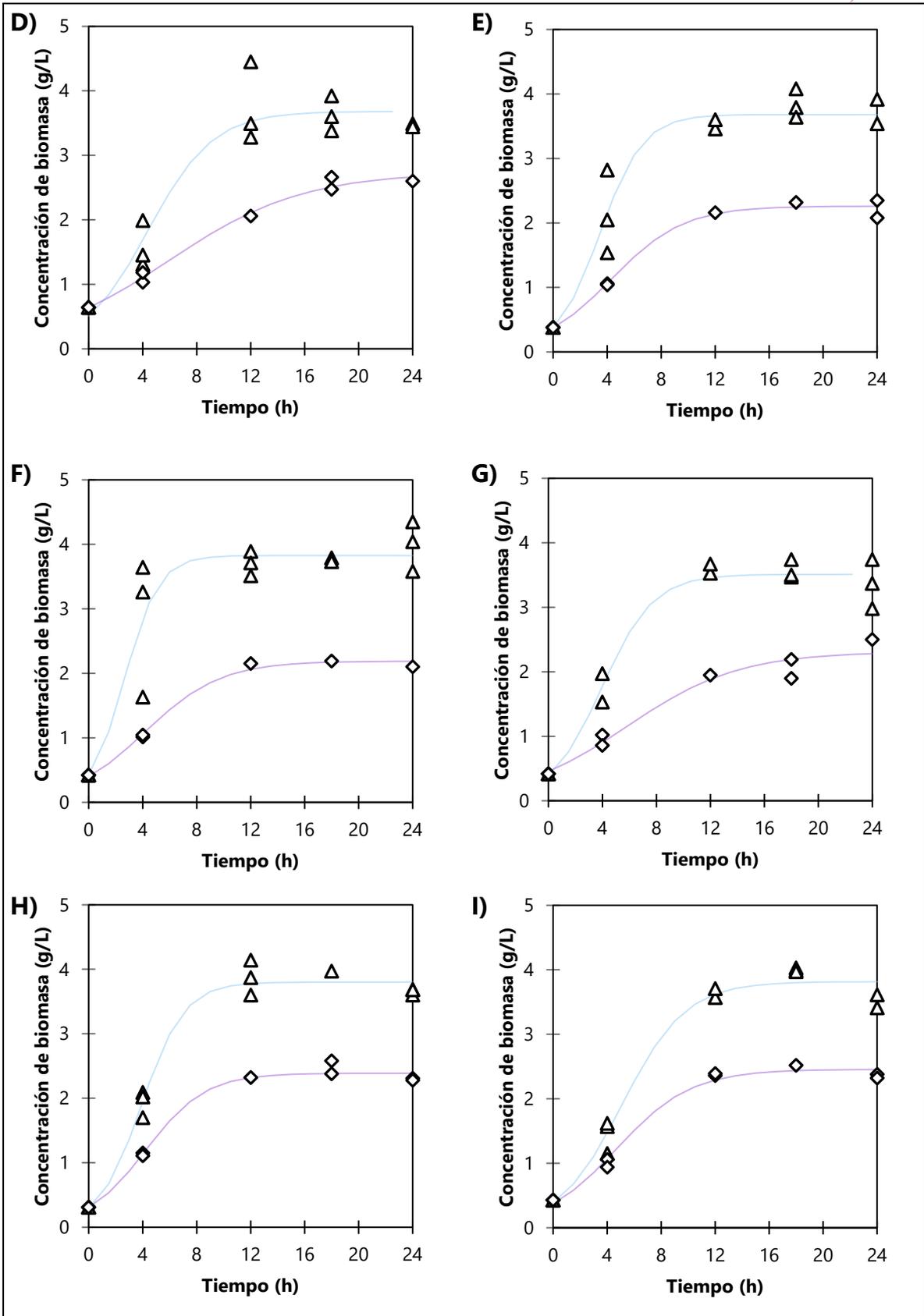
10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Formación de biomasa

En la Figura 10.1 se muestran las curvas de crecimiento resultantes correspondientes a los medios MRS como control, M_i (con EGM) y m_i (sin EGM). La fase estacionaria del cultivo se encuentra a partir de las 12 h y no a las 18 h como se había observado en las curvas de crecimiento del diseño PB, probablemente debido a que las condiciones ambientales (pH y temperatura) y las concentraciones que se establecieron a partir del diseño PB ayudaron a que la cepa se adaptara con mayor facilidad al medio de cultivo, aun así se confirma que no es necesario dejar el cultivo hasta las 48 h.



10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO



10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

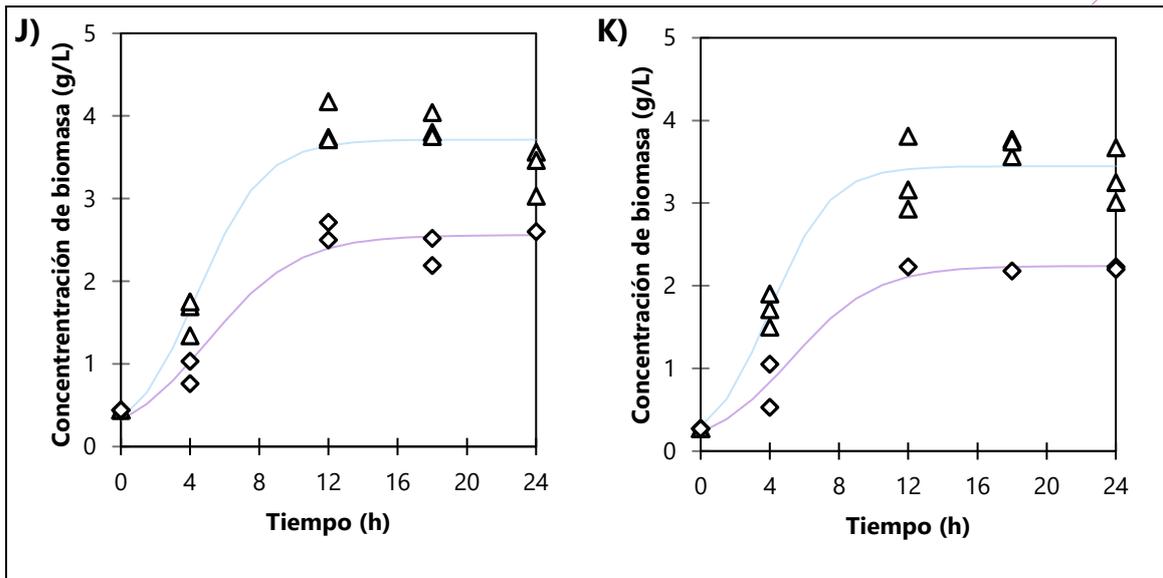


Figura 10.1 Curvas de crecimiento de los medios empleados para el DFCC, los triángulos representan a los datos experimentales de los medios M_i , los rombos representan los datos experimentales de los medios m_i y las líneas continuas corresponden al modelo ajustado (Logístico), $n=3$. A) MRS, B) M1 y m1, C) M2 y m2, D) M3 y m3, E) M4 y m4, F) M5 y m5, G) M6 y m6, H) M7 y m7, I) M8 y m8, J) M9 y m9, K) M10 y m10.

La concentración de biomasa obtenida con el medio MRS fue de aproximadamente 4 g/L, mientras que con los medios control (medios m_i , sin EGM, PC ni EC) la formación de biomasa fue de 2 a 2.5 g/L, casi la mitad de lo obtenido con el MRS. El uso del EGM como fuente alterna al EC y la PC mejoró la formación de biomasa en un 40 % aproximadamente comparado con los medios control (sin EGM) pues con casi todos los medios se obtuvieron valores muy semejantes a los obtenidos con el medio MRS, entre 3.5 y 4 g/L con lo cual podemos decir que el EGM aporta los nutrientes faltantes que el EC y la PC aportan al medio de cultivo.

Parámetros cinéticos estimados con el modelo Logístico

Los datos experimentales (concentración de biomasa) se ajustaron al modelo Logístico y de ahí se estimaron los parámetros μ (h^{-1}) y X_{max} (g/L), los valores obtenidos se encuentran en la Tabla 10.1. La X_{max} estimada para el medio MRS fue de 3.3 g/L, mientras que con los medios con EGM la X_{max} estimada se

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

encuentra entre 3.3 y 3.8 g/L que es semejante e incluso un poco mayor a la obtenida con el medio MRS, por otra parte con los medios sin EGM (medios m) se obtuvo una X_{\max} menor de 2.2 - 2.7 g/L que se encuentra aproximadamente en un 40 % por debajo de lo obtenido con los medios con EGM.

Los valores de μ para el medio MRS fue de 0.31 h^{-1} y para los medios con EGM (medios M) fueron entre 0.43 y 0.79 h^{-1} lo cual resultó ser mayor en estos medios que en el medio MRS, otros autores han obtenido valores de μ de hasta 0.7 h^{-1} con medios de cultivo formulados con fuentes alternas de N como leche de soya y salvado de trigo (Jurado-Gómez *et al.*, 2014), mientras que para los medios sin EGM (medios m) los valores de μ variaron entre 0.20 y 0.45 h^{-1} . Lo anterior confirma nuevamente que, al fijar la temperatura, el pH, la concentración de glucosa, fosfato de potasio y sulfato de manganeso en sus niveles centrales (Tabla 7.9), el cultivo empieza a crecer con mayor velocidad.

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Tabla 10.1 Parámetros estimados mediante el modelo Logístico para los diferentes medios (MRS, M y m).

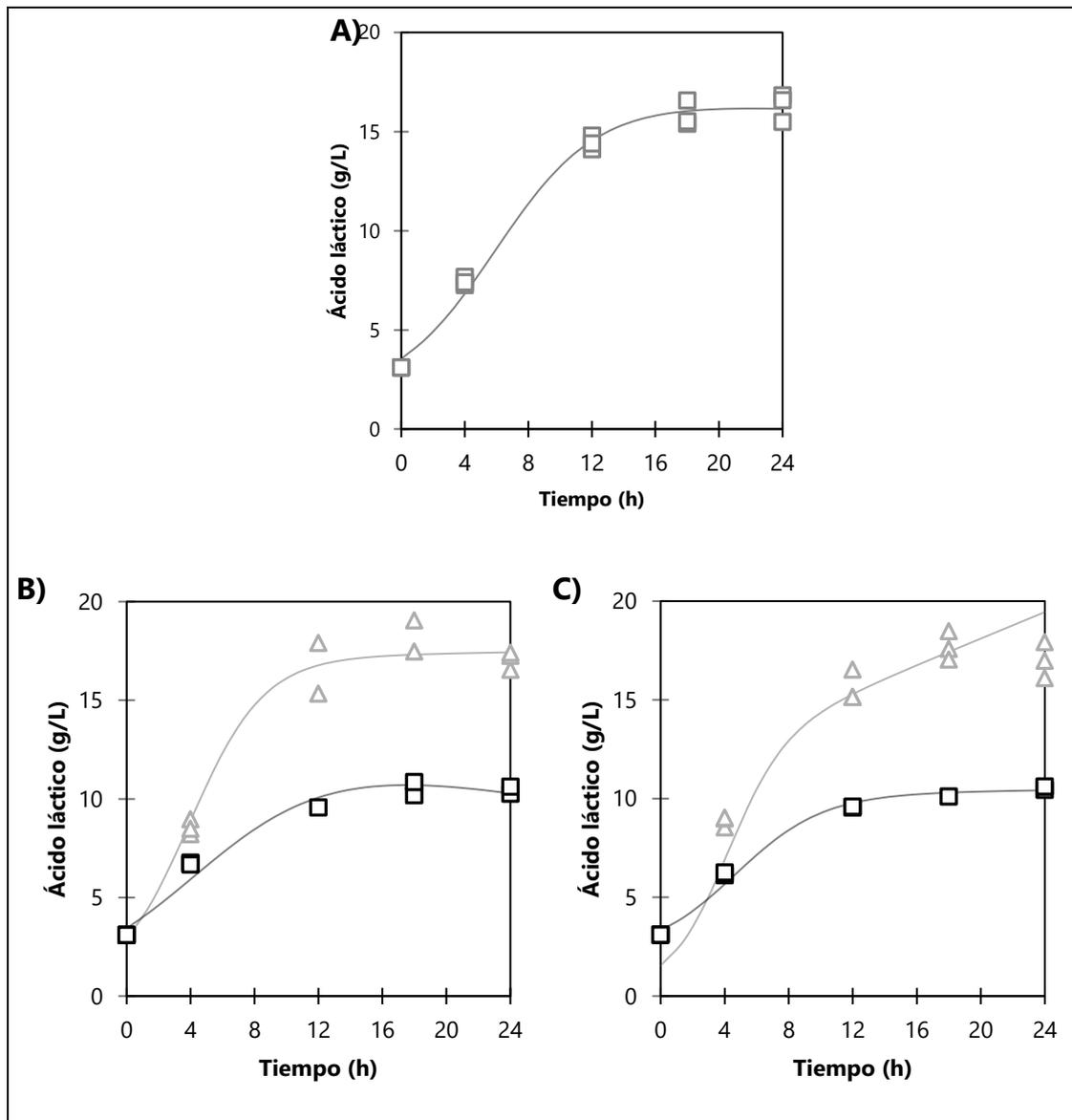
Medio	X_{max} (g/L)	μ (h⁻¹)	Medio	X_{max} (g/L)	μ (h⁻¹)
MRS	3.33	0.31			
M1	3.50	0.43	m1	2.32	0.23
M2	3.33	0.56	m2	2.45	0.37
M3	3.68	0.42	m3	2.73	0.20
M4	3.68	0.63	m4	2.26	0.37
M5	3.83	0.79	m5	2.19	0.36
M6	3.51	0.52	m6	2.31	0.24
M7	3.80	0.63	m7	2.39	0.45
M8	3.82	0.43	m8	2.46	0.36
M9	3.71	0.52	m9	2.56	0.39
M10	3.45	0.58	m10	2.24	0.41

Formación de ácido láctico

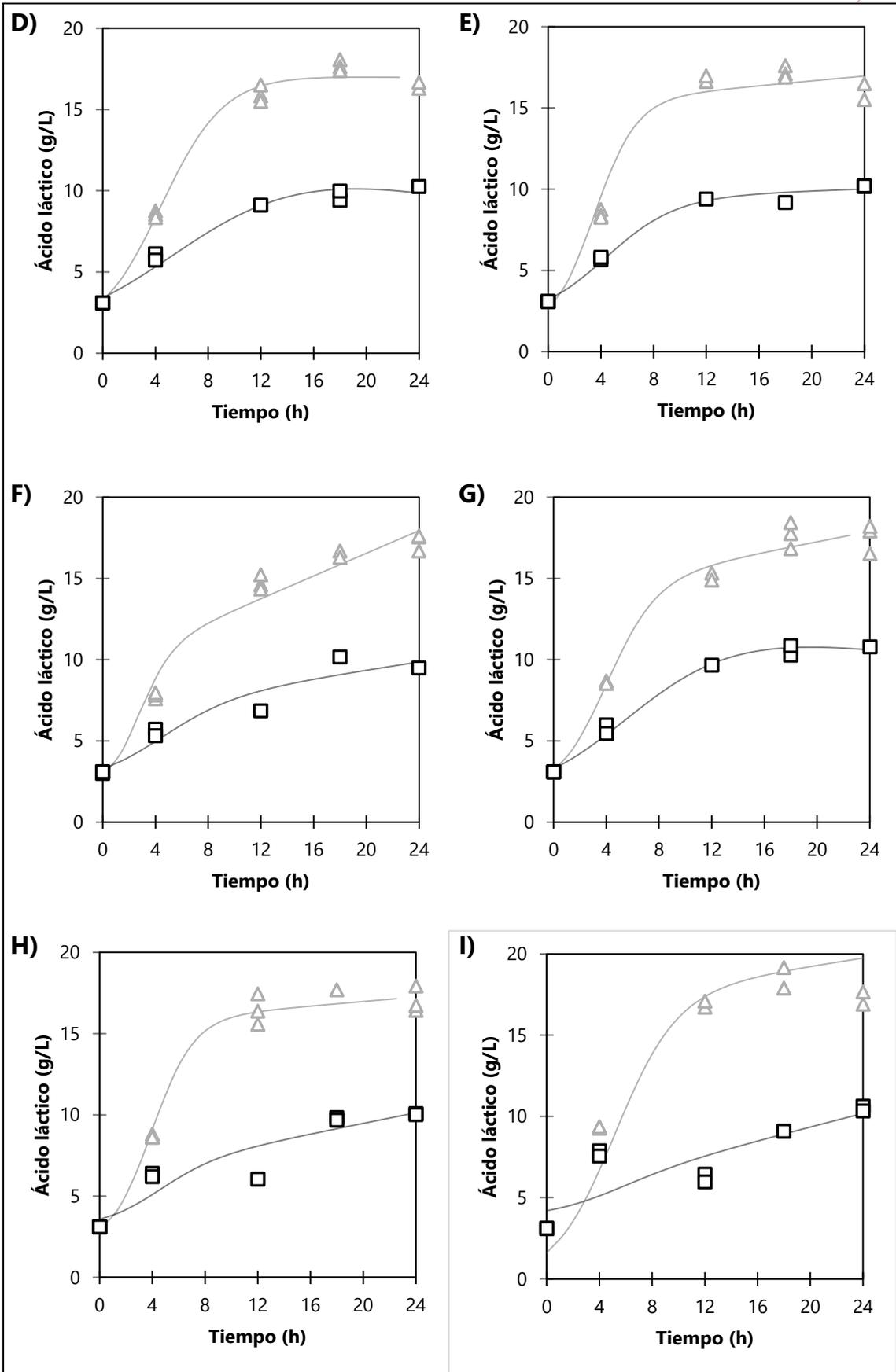
Los datos experimentales correspondientes a la formación de producto (AL) se ajustaron al modelo de Luedeking-Piret de acuerdo con la propuesta de Soto-Cruz *et al* (2002). Las cinéticas correspondientes al modelo ajustado se encuentran en la Figura 10.2. A diferencia de la formación de biomasa, se observa que la formación de AL aumenta después de las 24 h excepto en los medios M1, y M3. Se han reportado valores máximos de AL hasta después de 96 h de cultivo (Lee, 2007; Thakur *et al.*, 2017), esto se puede explicar porque después de las 24 h la biomasa deja de formarse dando lugar a la producción de AL posiblemente asociado al mantenimiento celular.

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Con el medio MRS se obtuvo una concentración de AL de alrededor de 17 g/L a las 24 h, mientras que con los medios control (medios m_i , sin EC, PC ni EGM) la concentración de AL a las 24 h fue de 10 g/L aproximadamente. Por otro lado, no se observaron diferencias entre la formación de AL en los tratamientos de los medios M_i (con EGM) y en comparación con el medio MRS. Sin embargo, la producción de AL aumentó en un 40% aproximadamente comparado con los medios m_i ; de manera similar a lo ocurrido con la formación de biomasa. En los medios formulados con fuentes de N alterna como licor de maíz y suero de queso se ha producido hasta 20 g/L de AL a las 24 h empleando BAL (Thakur *et al.*, 2017; Agarwal *et al.*, 2008).



10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO



10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

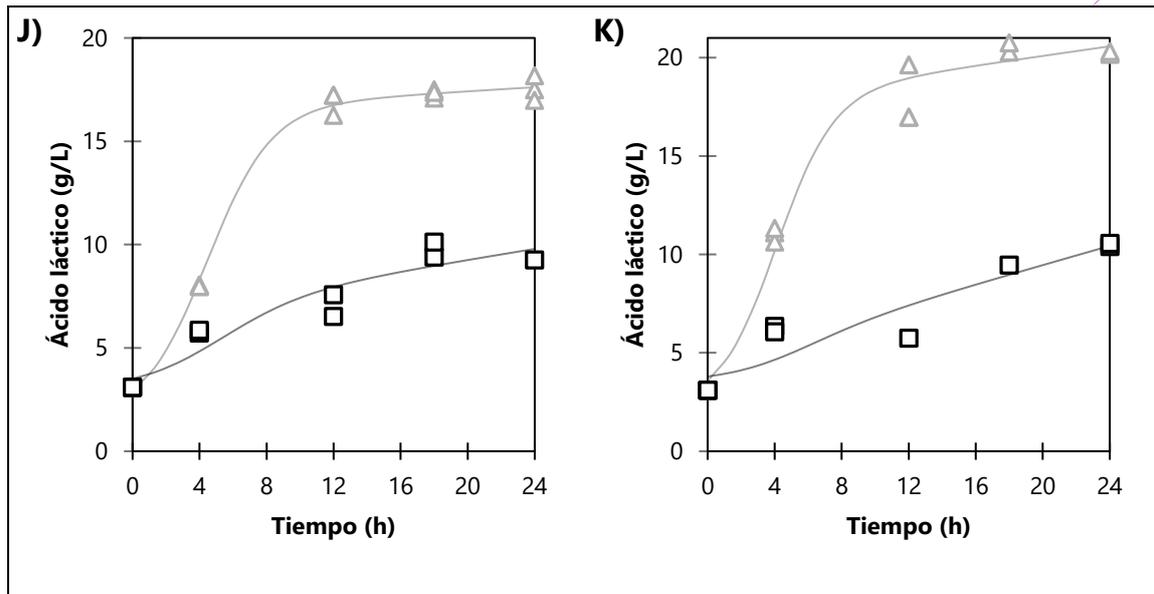


Figura 10.2 Curvas de formación de AL de los medios empleados para el DFCC, los triángulos representan a los datos experimentales de los medios M_i , los cuadrados representan los datos experimentales de los medios m_i y las líneas continuas corresponden al modelo ajustado, $n=3$. A) MRS, B) M1 y m1, C) M2 y m2, D) M3 y m3, E) M4 y m4, F) M5 y m5, G) M6 y m6, H) M7 y m7, I) M8 y m8, J) M9 y m9, K) M10 y m10.

Parámetros cinéticos estimados con el modelo de Luedeking-Piret

A continuación, se estimaron los parámetros α y β con el modelo de Luedeking-Piret, dichos parámetros son los coeficientes asociado y no asociado al crecimiento respectivamente pues la formación de AL es función de la división celular y la concentración de biomasa (Luedeking & Piret, 1959). Esta expresión de dos parámetros ha demostrado ser extremadamente útil y versátil para simular la formación de productos de diferentes fermentaciones y caracterizar su cinética. Este es un comportamiento esperado cuando el producto es el resultado del metabolismo energético. Según este modelo, la tasa de formación del producto depende linealmente de la tasa de crecimiento y la concentración celular, dichos parámetros dependen y varían con la dinámica de fermentación (Gaden, 1959).

Los parámetros estimados se encuentran en la Tabla 10.2. El coeficiente asociado al crecimiento (α) para el medio MRS fue de 4.59 y el coeficiente no asociado al crecimiento (β) fue de -0.01, En el caso de los medios alternativos (medios M_i con

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

EGM) α tuvo valores de 2.27 a 4.83 y β arrojó valores menores a 0.1. Mientras que para los medios control (medios m_i , sin EGM) los valores de α variaron de 1 a 5.5 y los valores de β fueron menores a 0.1. Lo anterior indica que la formación de AL se encuentra parcialmente relacionada con el crecimiento microbiano.

Tabla 10.2 Parámetros estimados mediante el modelo de Luedeking-Piret para los diferentes medios (MRS, M_i y m_i).

Medio	α	β	Medio	α	β
MRS	4.59	-0.01			
M1	4.83	0.00	m1	5.51	-0.06
M2	3.74	0.10	m2	3.33	0.00
M3	4.41	0.00	m3	4.53	-0.06
M4	3.88	0.02	m4	3.33	0.01
M5	2.27	0.09	m5	2.33	0.06
M6	3.71	0.05	m6	4.95	-0.04
M7	3.70	0.02	m7	1.63	0.07
M8	4.61	0.03	m8	0.98	0.09
M9	4.06	0.01	m9	1.70	0.05
M10	4.63	0.04	m10	1.06	0.11

Diagramas de barras

Por último, se determinó que para realizar el análisis estadístico del DFCC, se tomaría el tiempo de cultivo de 18 h, ya que la concentración de biomasa es cercana a la máxima, lo cual se traduce en una elevada productividad y en ahorro de tiempo y recursos. Se realizó un diagrama de barras de la concentración de biomasa, productividad de biomasa, concentración de AL y $Y_{P/x}$ a las 18 h en los medios de cultivo MRS, medios alternativos (medios M_i) y sus respectivos controles (medios m_i).

En la Figura 10.3 se presentan los diagramas de barras correspondientes a la concentración de biomasa y productividad de biomasa a las 18 h. Con el medio MRS se alcanzó una concentración de biomasa de 3.5 g/L aproximadamente, mientras que con los medios alternativos (medios M_i) casi no se presentaron

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

diferencias entre los 10 medios de cultivo, pues la biomasa formada fue de 3.5 a 4 g/L, sólo con el M2 se obtuvo una biomasa de 3 g/L (Figura 10.3a). El valor promedio de biomasa obtenido con los medios control (medios m_i) fue de 2.5 g/L, aproximadamente un 40 % menos que la biomasa de los medios MRS y los medios alternativos (M_i).

Respecto a la productividad de biomasa (Figura 10.3b) se observa algo similar a lo ocurrido con la concentración de biomasa en donde la productividad de biomasa en los medios alternativos (medios M_i) no presentan diferencias significativas entre los tratamientos, pero se obtienen valores similares al medio MRS (0.20 g/L*h) y mayores a los obtenidos con los medios (m_i) control (0.14 g/L*h). Lo anterior confirma que el EGM es una fuente de N alterna efectiva y competitiva con el EC y la PC pues satisface la falta de nutrientes aportados por dichas fuentes.

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

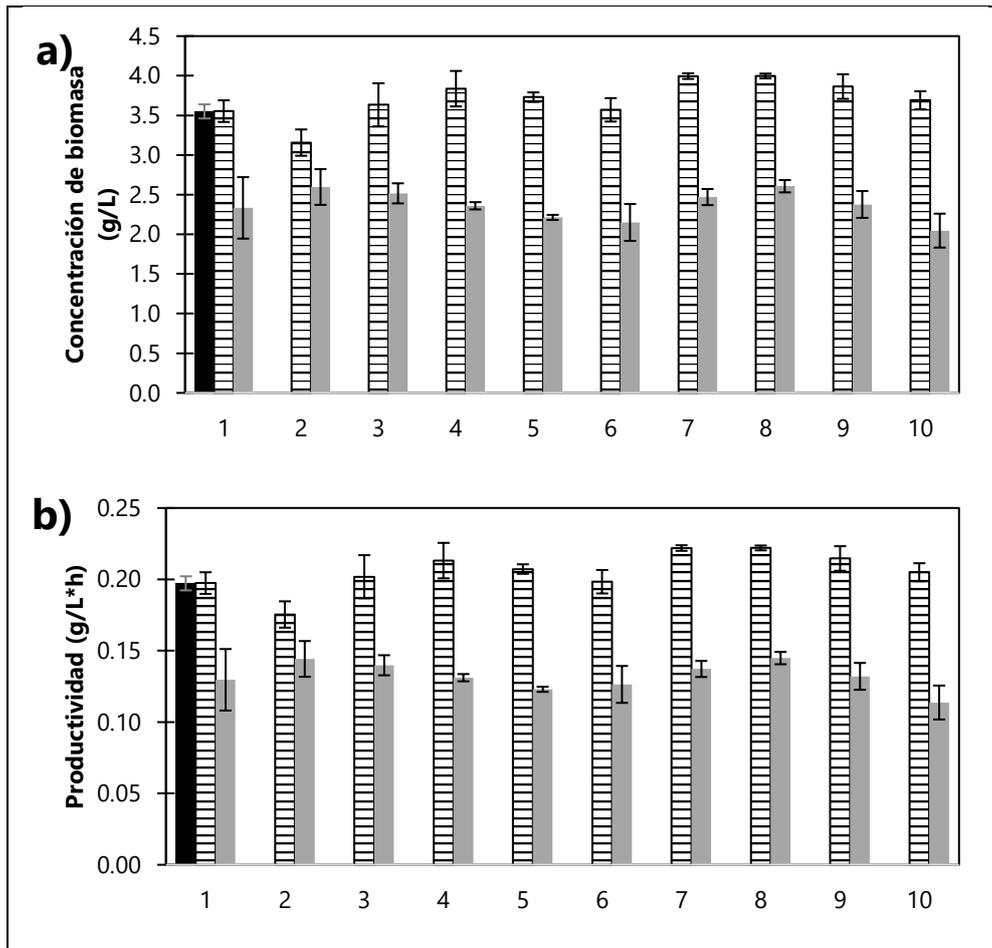


Figura 10.3 Diagrama de barras para a) concentración de biomasa a las 18 h y b) productividad de biomasa a las 18 h correspondiente a los medios de cultivo empleados para el DFCC. Las líneas negras muestran la desviación estándar, $n = 3$. La barra color negra corresponde al medio MRS, las barras con líneas a los medios M y las barras color gris a sus respectivos controles, medios m. Los números en el eje X representan los tratamientos.

La Figura 10.4 muestra los diagramas de barras para la formación de ácido láctico y el rendimiento de producto por biomasa ($Y_{P/X}$). Con el medio MRS se obtuvo una concentración de AL de 16 g/L aproximadamente a las 18 h, por su parte con los medios control (medios m_i) se obtuvieron 10 g/L de AL a las 18 h. Con los medios alternativos (medios M_i) se logró formar hasta 20 g/L de AL a las 18 h (Figura 10.4a), lo cual es de suma importancia pues se demuestra que el EGM promueve la producción de AL.

El rendimiento de formación de producto por biomasa se calculó dividiendo la concentración de AL a las 18 h menos la inicial (0 h) entre la concentración de

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

biomasa a las 18 h menos la inicial (0 h). Este parámetro nos indica qué tanto producto se forma por biomasa producida. El medio MRS tuvo un $Y_{P/X}$ de 4 g AL/g X aproximadamente mientras que con el medio M10 se alcanzó un rendimiento similar al del MRS. En el caso de los demás medios de cultivo el $Y_{P/X}$ fue de alrededor de 3 g AL/g X superior en 1 unidad al rendimiento obtenido con los medios control (m_i).

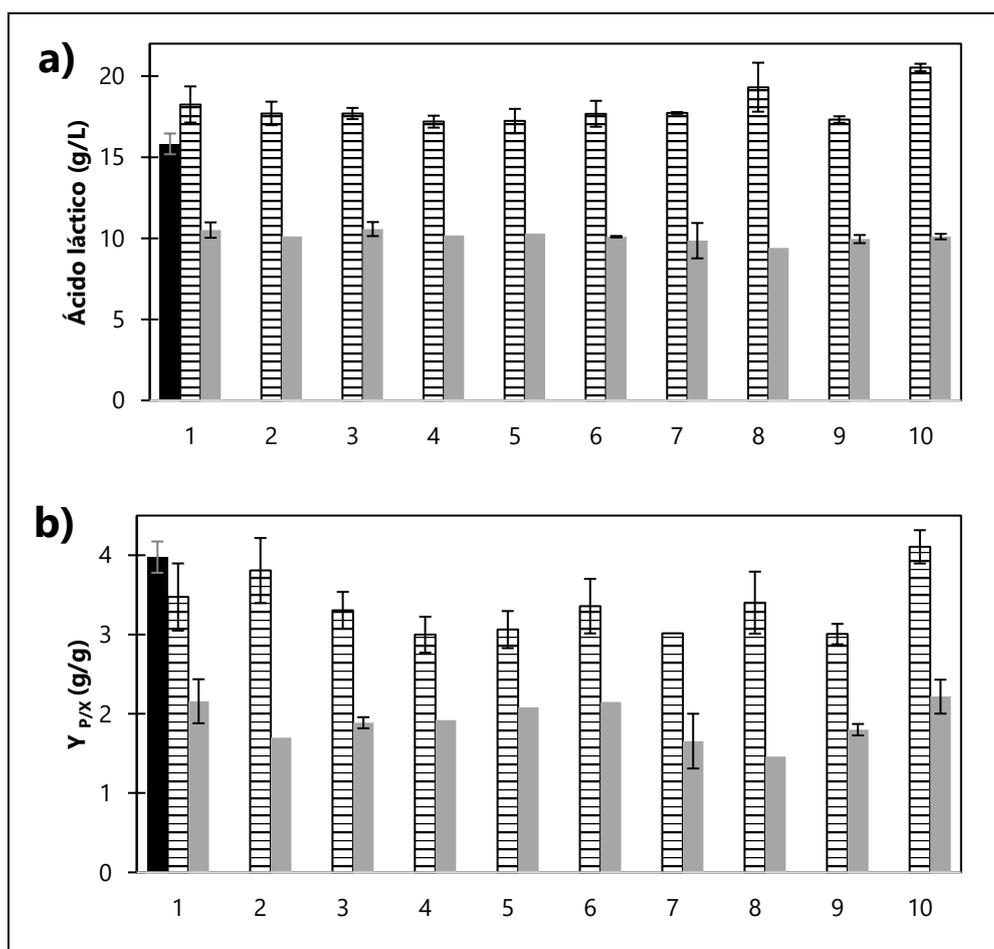


Figura 10.4 Diagrama de barras para a) concentración de AL a las 18 h y b) $Y_{P/X}$ a las 18 h correspondiente a los medios de cultivo empleados para el DFCC. Las líneas negras muestran la desviación estándar, $n = 3$. La barra color negro corresponde al medio MRS, las barras color con líneas a los medios M y las barras color gris a sus respectivos controles, medios m. Los números en el eje X representan los tratamientos.

En suma, los distintos tratamientos empleados para el crecimiento de la BAL empleada y la formación de ácido láctico mostraron ser mejores que sus controles y a pesar de que con casi todos los medios M_i se observa un resultado similar, se

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

demuestra nuevamente que la adición del EGM al medio de cultivo proporciona los nutrientes necesarios para el buen desarrollo de la BAL.

10.2 Análisis estadístico del Diseño Factorial Central Compuesto (DFCC)

Para evaluar el efecto de los diferentes niveles de la concentración de acetato de sodio y de sulfato de magnesio y optimizar las respuestas (concentración de biomasa y productividad de biomasa a las 18 h), se realizó el análisis del DFCC mediante el ANOVA y acoplado la metodología de superficie de respuesta con el uso del software STATGRAPHICS® Centurion XVI del cual se obtuvieron los diagramas de Pareto y las ecuaciones de regresión, las superficies de respuesta que se prepararon con el software SigmaPlot 10.

Coeficiente de determinación

Como se ha explicado anteriormente el coeficiente de determinación (R^2) es un estadístico que mide la capacidad explicativa del modelo estimado (Cameron & Windmeijer, 1997). En la Tabla 10.3 se presentan los coeficientes de determinación para cada variable de respuesta (concentración de biomasa y productividad de biomasa a las 18 h)

El coeficiente de determinación para la concentración de biomasa y productividad de biomasa a las 18 h es de 70 % lo cual revela que el modelo tal como está explica más del 70 % de la variabilidad en la concentración de biomasa y productividad de biomasa a las 18 h, por lo que sólo se puede explicar el 70 % de la variabilidad en las variables de respuesta lo cual, si bien no es muy confiable, da una idea de cómo afectan los factores a las respuestas.

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Tabla 10.3 Coeficientes de determinación correspondientes a las variables de respuesta del DFCC.

Respuesta	Coeficiente de determinación R² (%)
Concentración de biomasa	70
Productividad de biomasa	70

Diagramas de Pareto

La Figura 10.5 muestra los diagramas de Pareto para la concentración de biomasa y la productividad de biomasa a las 18 h. Los dos diagramas son similares pues la productividad está definida como la concentración de biomasa dividida entre el tiempo. Los 2 factores (concentración de acetato de sodio y de sulfato de magnesio), junto con su interacción son estadísticamente significativos. La interacción de la concentración del acetato de sodio con el sulfato de magnesio es el único factor con efecto negativo, todos los demás ejercen un efecto positivo sobre la concentración de la biomasa y la productividad de biomasa. En contraparte, en el diseño PB se había observado que la concentración de acetato de sodio y de sulfato de magnesio presentaron un efecto negativo sobre las respuestas, es decir, el diseño sugiere que con los niveles menores de los factores se obtienen mejores respuestas, pero en este caso fue al contrario.

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

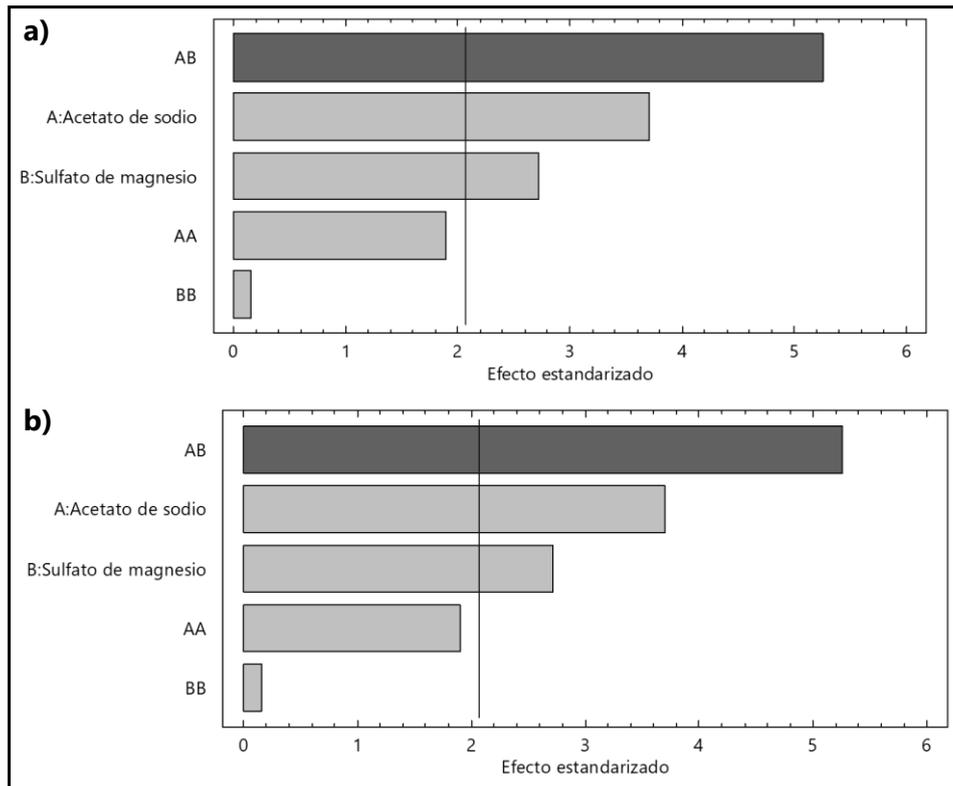


Figura 10.5 Diagramas de Pareto para las variables de respuesta a) concentración de biomasa a las 18 h y b) productividad de biomasa a las 18 h. Las barras en color gris representan el efecto positivo y las barras en color gris oscuro el efecto negativo de los factores sobre las respuestas. La línea azul indica el nivel de significancia.

Coefficientes de regresión

Anteriormente se había establecido que los coeficientes de regresión permiten construir la ecuación que predice la respuesta prevista por el modelo. La Tabla 10.4 muestra dichos coeficientes, con los cuales se construyeron las ecuaciones de regresión para crear las superficies de respuesta.

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Tabla 10.4 Coeficientes de regresión correspondientes a cada variable de respuesta.

Factores	Coeficientes de regresión	
	Concentración de biomasa	Productividad de biomasa
Constante	3.63	0.20
A: Acetato de sodio	0.13	0.01
B: Sulfato de magnesio	0.09	0.01
AA	0.08	0.00
AB	-0.26	-0.01
BB	0.01	0.00

Las ecuaciones de regresión que se construyeron con los coeficientes de determinación son las siguientes:

- ✚ Concentración de biomasa @ 18h = $3.63 + 0.127461*A + 0.093647*B + 0.0845352*A^2 - 0.262308*A*B + 0.00703477*B^2$
- ✚ Productividad de biomasa @ 18h = $0.201667 + 0.00708163*A + 0.00519191*B + 0.00470888*A^2 - 0.0145689*A*B + 0.000392189*B^2$

Superficies de respuesta

El objetivo final de la MSR es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable de respuesta. Esto se logra al localizar las condiciones óptimas de operación del proceso (Box & Wilson, 1951). En este caso se aplicó dicha metodología para optimizar la concentración de biomasa y productividad de biomasa. Para ello, con la ecuación de regresión correspondiente a cada variable de respuesta se construyó la superficie de respuesta.

En la Figura 10.6 se muestra la superficie de respuesta correspondiente a: a) concentración de biomasa y b) productividad de biomasa. En ambos casos vemos el mismo comportamiento por lo ya explicado. La curva se muestra casi en un plano en donde en los niveles -1.41 y 1.41 de cada factor (concentración de

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

acetato de sodio y de sulfato de magnesio), se obtiene la mayor respuesta posible (concentración de biomasa y productividad de biomasa), hasta 4.5 g/L y 0.24 g/L*h, respectivamente. Lo anterior sugiere que es posible moverse de los niveles negativos a los positivos de los dos factores y obtendremos la misma respuesta, lo cual representa un beneficio pues se pueden usar distintas formulaciones del medio dentro del rango establecido y se seguirá teniendo la respuesta óptima.

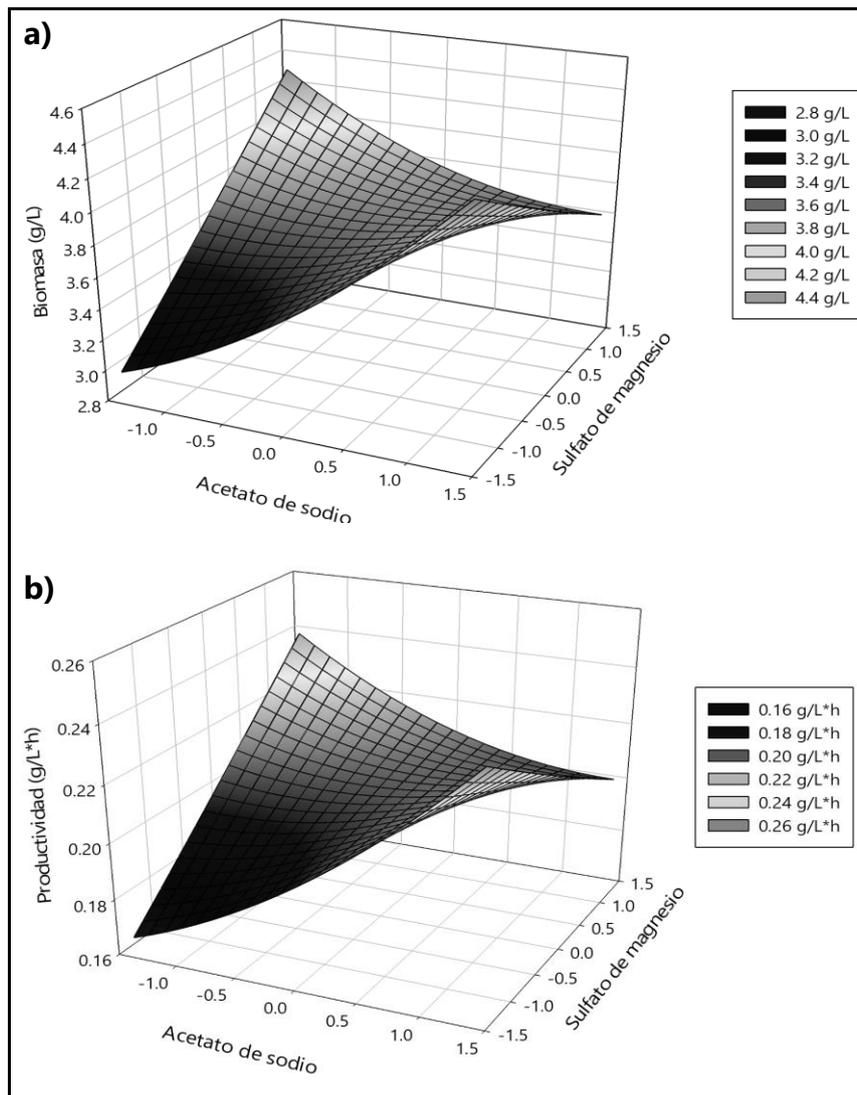


Figura 10.6 Superficies de respuesta correspondientes a a) concentración de biomasa y b) productividad de biomasa.

Cabe mencionar que la superficie de respuesta sugiere que con los niveles -1.41 de acetato de sodio y 1.41 de sulfato de magnesio, se optimizará la respuesta. Al

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

usar los valores de -1.41 de los dos factores el valor predicho será de 3 g/L para concentración de biomasa y 0.16 g/L*h para productividad de biomasa. Lo mismo ocurre con el nivel 1.41 de los dos factores en donde se predice una concentración de biomasa de 3.6 g/L y una productividad de 0.2 g/L*h.

Tabla 10.5 Puntos experimentales para validar la ecuación de regresión correspondiente a cada variable de respuesta.

Ensayo	Factor	Nivel	Valores predichos	
			Concentración de Biomasa (g/L)	Productividad de biomasa (g/L*h)
1	Acetato de sodio	+1.41	3.60	0.20
	Sulfato de magnesio	+1.41		
2	Acetato de sodio	+1.41	4.28	0.23
	Sulfato de magnesio	-1.41		
3	Acetato de sodio	-1.41	4.38	0.24
	Sulfato de magnesio	+1.41		
4	Acetato de sodio	-1.41	2.97	0.16
	Sulfato de magnesio	-1.41		

En las cuatro combinaciones de niveles se predice una respuesta similar de concentración de biomasa y de productividad de biomasa, en dos de ellos (ensayos 1 y 3) la respuesta predictiva es un poco mayor que en las otras dos.

En general, el comportamiento de las superficies de respuesta fue en forma de un plano en donde ya sea con los niveles -1.41 y 1.41 de los factores se obtiene una respuesta similar, por lo que, para la validación de la optimización de cada

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

variable de respuesta, se consideró experimentar en cuatro puntos de acuerdo con los niveles descritos en la Tabla 10.5.

10.3 Validación del DFCC

Para validar el diseño se llevaron a cabo experimentos de acuerdo con los puntos descritos en la Tabla 10.5. Se realizaron cinéticas de crecimiento de biomasa y de formación de producto, los datos experimentales se ajustaron a los modelos Logístico y de Luedeking-Piret, respectivamente, y por último se midió el crecimiento por cuenta en placa para determinar las células viables.

Cinéticas de crecimiento

En la Figura 10.7 se presentan las cinéticas de crecimiento correspondientes al medio MRS, los medios de validación codificados como V1, V2, V3 y V4 (Tabla 7.6) y sus respectivos controles codificados como v1, v2, v3 y v4. Las curvas de crecimiento de todos los medios de cultivo permiten comprobar que a partir de las 12-16 h la formación de biomasa se estabiliza, continúa creciendo, pero más lentamente llegando a su fase estacionaria.

Se aprecia que con el medio MRS (Figura 10.7a) se formó una concentración biomasa de 3.5 g/L aproximadamente a las 18 h y a las 24 h llegó a casi 4 g/L. Con los medios de validación (Figura 10.7) se produjo una biomasa de 3.5 g/L en promedio mientras que con los medios control (Figura 10.7) la biomasa producida fue de 2 g/L en promedio con lo que se comprueba que, con los medios alternativos (medios con EGM como fuente de N alterna), se forma una concentración de biomasa similar a la que se produce con el medio MRS y que el EGM es una fuente de N alterna efectiva.

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

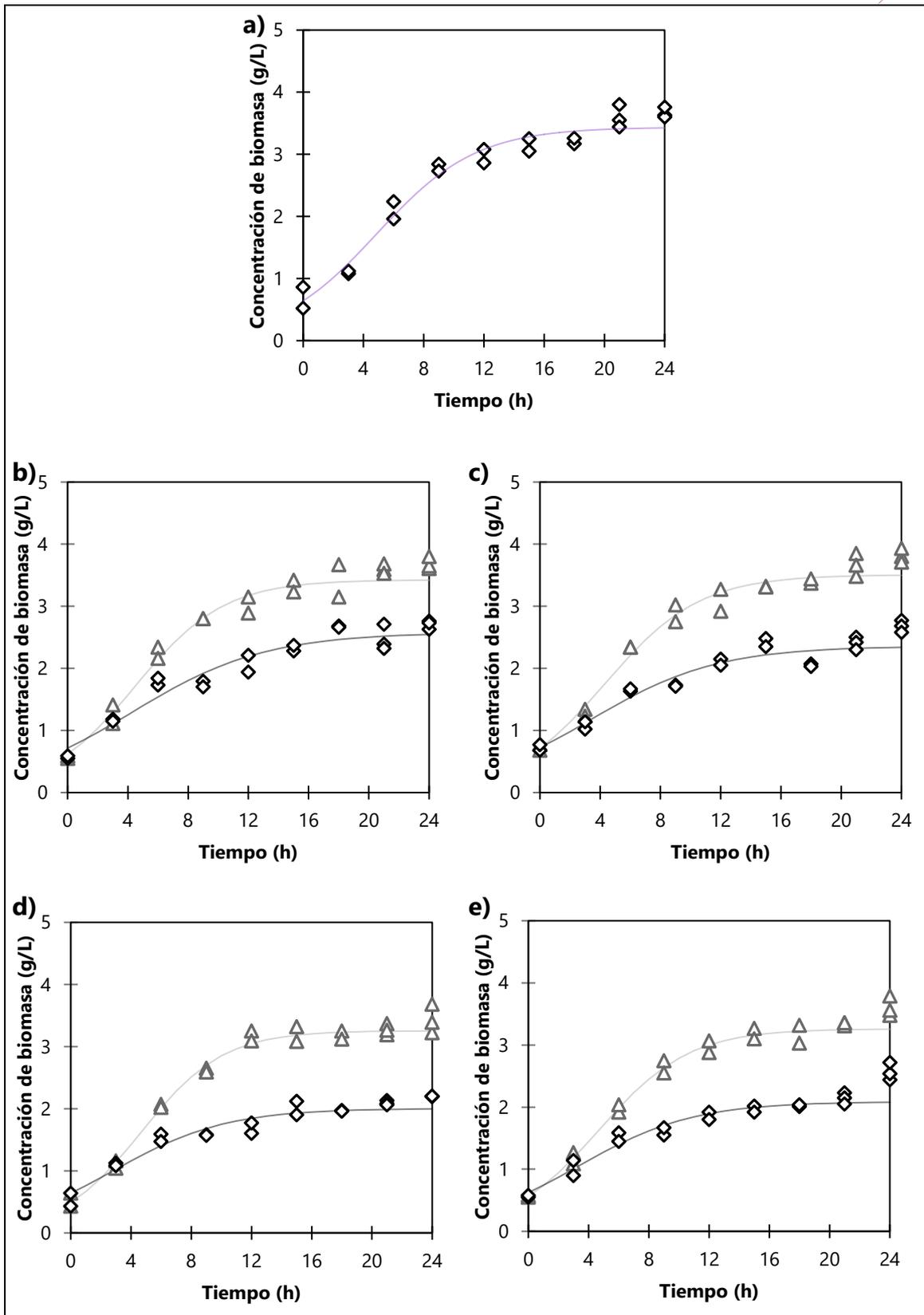


Figura 10.7 Cinéticas de crecimiento correspondientes a los medios de cultivo: a) MRS, b) V1 y v1, c) V2 y v2, d) V3 y v3, e) V4 y v4. Los datos experimentales se ajustaron al modelo Logístico representado por la línea continua. Los triángulos representan a los datos experimentales de los medios V_i y los rombos corresponden a los datos experimentales de los medios v_i , $n = 2$.

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Por otra parte, se obtuvieron las cinéticas de formación de AL correspondientes al medio MRS, los medios de validación codificados como V1, V2, V3 y V4 y sus respectivos controles codificados como v1, v2, v3 y v4 (Tabla 7.6) los cuales se encuentran en la Figura 10.8.

Con el medio MRS (Figura 10.8 a) se obtuvo una producción de AL de 12 g/L aproximadamente a las 24 h, por su parte con los medios de validación (Figura 10.8 b1, c1, e1 y d1) la producción de AL fue de cerca de 14 g/L a las 24 h, casi un 40 % más de lo producido con los medios control (8 g/L aproximadamente). Diversos reportes demuestran que, a diferencia de la formación de biomasa, el AL continúa formándose hasta después de las 24 h obteniendo concentraciones máximas hasta en 96 h (*Joshi et al.*, 2010; Lee, 2007), por lo que se recomendaría aumentar el tiempo de cultivo hasta las 96 h si el objetivo fuera producir AL.

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

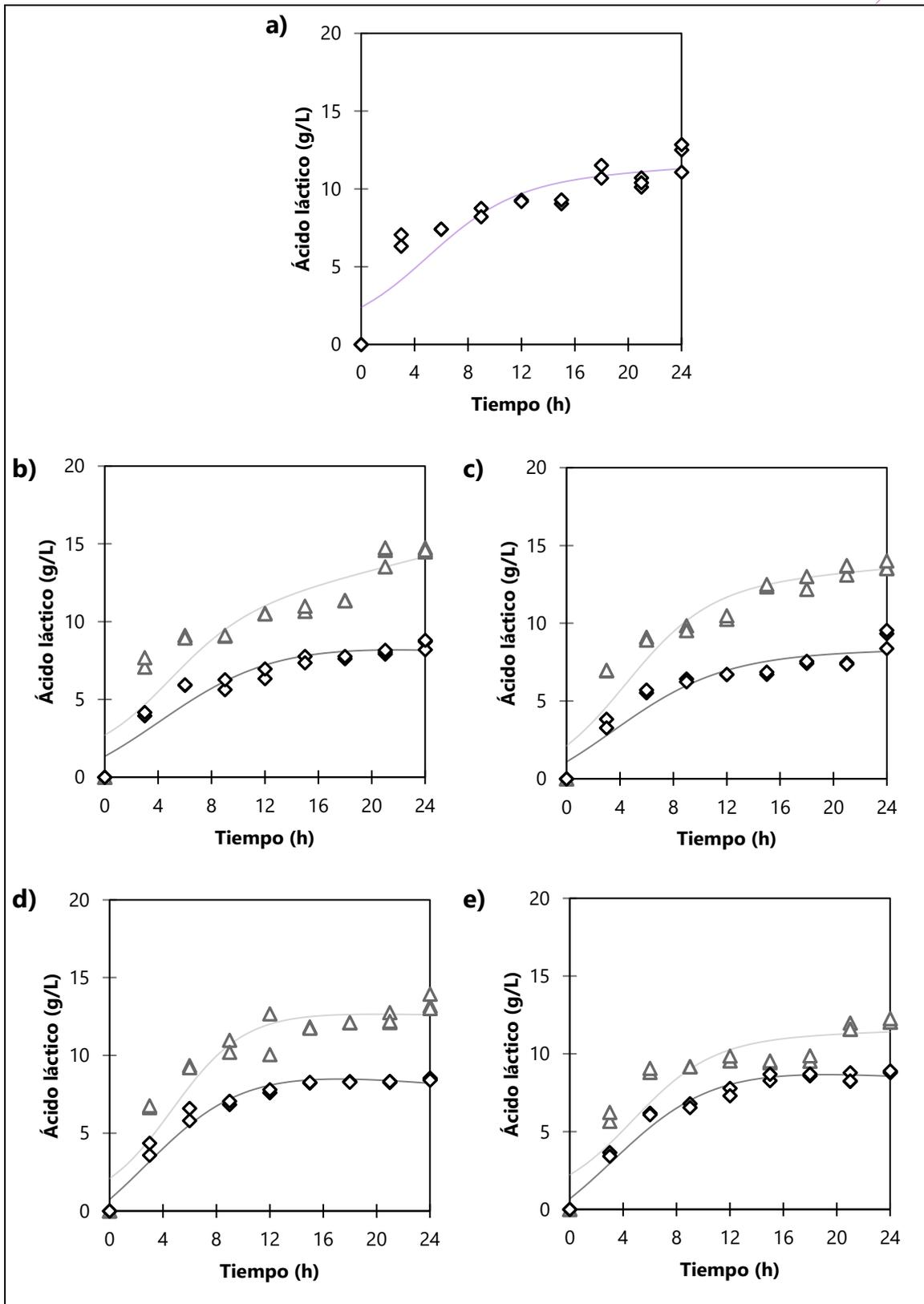


Figura 10.8 Cinéticas de formación de AL correspondientes a los medios de cultivo: a) MRS, b) V1 y v1, c) V2 y v2, d) V3 y v3, e) V4 y v4. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de Luedeking-Piret representado por la línea continua. Los triángulos representan a los datos experimentales de los medios V_i y los rombos corresponden a los datos experimentales de los medios v_i , $n = 2$.

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

En la Tabla 10.6 se muestra la concentración de biomasa y productividad de biomasa a las 18 h correspondiente a lo predicho por el modelo y lo obtenido experimentalmente. Los medios de cultivo con los que se predecía la mayor respuesta eran el V2 y el V3 que corresponden a los niveles 1.41 de concentración de acetato de sodio y -1.41 de concentración de sulfato de magnesio; sin embargo, al realizar la validación experimentalmente se observa que la formación de biomasa es similar entre tratamientos pues se obtienen valores de 3.1 a 3.4 g /L para la biomasa a las 18 h en todos los medios.

Ocurre lo mismo con la productividad de biomasa a las 18 h, pues, a pesar de que se predecían valores de 0.24 g/L*h con los mejores medios de cultivo, con casi todos se obtuvo una productividad de 0.17 g/L*h en promedio. Lo anterior indica que, al tener una respuesta similar usando cualquier nivel establecido, se puede decidir usar el nivel que se desee, pero se recomienda usar los niveles más bajos pues representan el uso de cantidades menores de acetato de sodio y de sulfato de magnesio lo que representa un mayor ahorro en la formulación del medio de cultivo.

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Tabla 10.6 Valores predichos contra valores experimentales.

Factor	Nivel del factor	Medio de cultivo	Concentración de biomasa (g/L)		Productividad de biomasa (g/L*h)	
			Predichos	Observados	Predicho	Observados
Acetato de sodio	+1.41					
Sulfato de magnesio	+1.41	V1	3.60	3.67±0.36	0.20	0.20±0.02
Acetato de sodio	+1.41					
Sulfato de magnesio	-1.41	V2	4.28	3.40±0.04	0.23	0.18±0.04
Acetato de sodio	-1.41					
Sulfato de magnesio	+1.41	V3	4.38	3.18±0.09	0.24	0.17±0.005
Acetato de sodio	-1.41					
Sulfato de magnesio	-1.41	V4	2.97	3.17±0.20	0.16	0.17±0.01
Acetato de sodio						
Sulfato de magnesio	N/A	MRS		3.7±0.06		0.20±0.003

Las respuestas obtenidas con los medios alternativos son similares a lo obtenido con el medio MRS y se debe considerar que se logró eliminando las fuentes más costosas del medio y adicionando una fuente más económica, que aporta nutrientes en forma similar que el EC y la PC, además los valores observados fueron cercanos a los valores predichos.

Verificación de viabilidad en células

Finalmente, se comprobó la viabilidad de las células bacterianas crecidas en los medios MRS, V1, V2, V3, V4 y sus respectivos controles (v1, v2, v3 y v4) mediante

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

la técnica de la cuenta en placa descrita en el punto 7.7. Se sembraron cultivos de 18 y 24 h para comparar en qué tiempo de cultivo hay más células viables, las siembras se realizaron por cuadruplicado para las diluciones 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 , los resultados se encuentran en la Figura 10.9.

Con el medio MRS se obtuvo una concentración de células de $(4 \pm 0.4) \times 10^9$ UFC/mL a las 18 h mientras que con los medios V1, V2 y V4 se observó una mayor cantidad de células viables a las 18 h, incluso más que con el medio MRS alcanzando concentraciones de $(5 \pm 0.2) \times 10^9$ UFC/mL aproximadamente. En contraparte en el medio V4 se observaron menos células $(3 \pm 0.4) \times 10^9$ UFC/mL; sin embargo, se presentó un mayor crecimiento con los medios alternos (medios Vi) que con sus respectivos controles, pues en promedio se observaron $(2 \pm 0.3) \times 10^9$ UFC/mL.

Por otro lado, en algunos casos hubo una mayor concentración de UFC/mL a las 24 h que a las 18 h como en el medio MRS y el V1 que además fue el medio donde se observaron el mayor número de células de la cepa $(5.5 \pm 0.3) \times 10^9$ UFC/mL. También en el medio V3 se observó mayor valor de UFC/mL a las 24 que a las 18 h con casi $(4 \pm 0.2) \times 10^9$ UFC/mL. Es el mismo caso para los medios v1 y v2 donde se alcanzaron $(2.5 \pm 0.3) \times 10^9$ UFC/mL.

En los demás casos (medios V2, V4, v3 y v4) las UFC/mL fue mayor a las 18 h en comparación con las 24 h. Lo anterior puede deberse a que, en esos casos, las células comienzan a morir porque ya no hay nutrientes disponibles, lo cual concuerda con lo observado en las cinéticas de crecimiento en donde entre las 12 y 18 h comenzaba la fase estacionaria.

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

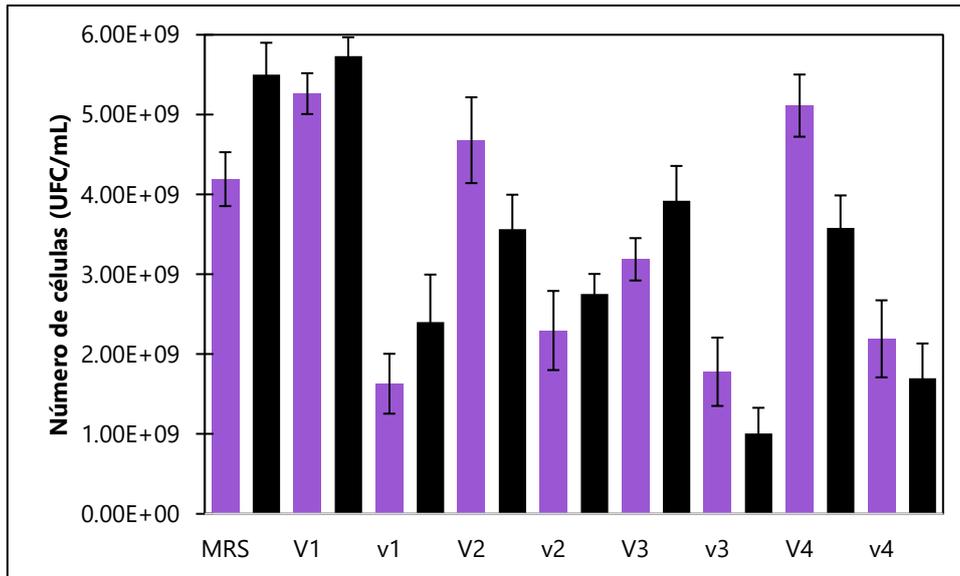


Figura 10.9 Cuenta en placa de células viables correspondiente a *L. plantarum* B031 cultivado en medio MRS, V1, V2, V3, V4 y sus respectivos controles (v1, v2, v3 y v4). Los datos muestran los promedios, n = 12, las líneas negras representan a la desviación estándar. Las barras moradas pertenecen a los cultivos de 18 h y las negras a los cultivos de 24 h.

Asimismo, se analizó el factor de incremento del número de células viables en UFC/mL comparando el medio MRS con los medios alternos (medios V_i) y los medios control (medios v_i) contra los medios alternos (medios V_i), de esta manera se contrastó la magnitud del aumento en el número de células viables a las 18 y 24 h de cultivos sembrados. En la Tabla 10.7 se muestran dichos análisis.

Los medios de cultivo que presentaron un ligero aumento comparados con el medio MRS fueron el medio V1, V2 y V4 con un 26, 12 y 22 % más de células que lo obtenido con el medio MRS sembrado de un cultivo de 18 h. En cambio, en cultivos de 24 h no se observaron aumentos de células comparando con el medio MRS sino una disminución del 25 % aproximadamente de los medios alternos (medios V_i).

Por otra parte, en comparación con los medios control respectivos (medios v_i) en todos los casos se presentó un aumento de entre 2 y 3 veces con los medios alternos (medios V_i), el mayor aumento se presentó en cultivos de 18 h, excepto

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

para el medio V3 en donde hubo un mayor aumento en cultivos de 24 h. Esto puede ser un indicio de que los nutrientes en los medios alternos se encuentran más disponibles que en el medio MRS y en los controles pues la cepa crece mejor y más rápido en un tiempo de cultivo de 18 h comparado con un cultivo de 24 h por lo que la recomendación al emplear dicho medio de cultivo es cosechar las células a las 18 h.

Tabla 10.7 Factor de incremento de los medios M comparado con los medios MRS y medios control respectivos.

Medio	Factor de incremento	
	18 h	24 h
MRS vs V1	1.26	1.04
MRS vs V2	1.12	0.65
MRS vs V3	0.76	0.71
MRS vs V4	1.22	0.65
V1 vs v1	3.23	2.23
V2 vs v2	2.04	1.30
V3 vs v3	1.79	3.90
V4 vs v4	2.33	2.11

Con estos resultados se compró la viabilidad de las células crecidas en los medios alternos por lo que el EGM es una fuente de N y demás nutrientes que aporta los nutrientes de manera similar que el EC y la PC y cuyos costos son mucho menores (alrededor de un 90 % menos del costo del EC y la PC).

10.4 Conclusiones parciales

El establecimiento de las condiciones ambientales (pH y temperatura) y de concentraciones de otros componentes del medio MRS así como la combinación de los niveles del acetato de sodio y sulfato de magnesio permitió diseñar un medio de cultivo de bajo costo con el que se obtuvieron concentraciones de biomasa y productividades semejantes a las obtenidas con el medio MRS,

10. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

mediante el uso de metodologías estadísticas con lo que se mostró que los términos cuadráticos y lineales de los factores tuvieron un efecto significativo sobre las respuestas.

También se pudo comprobar que el EGM promueve el buen desarrollo de células viables frente al medio MRS gracias a los nutrientes que contiene. La combinación del uso de diseños experimentales como el PB y el DFCC acoplado a la MSR se pueden aplicar también para optimizar la producción de metabolitos por BAL y biomasa en niveles industriales.

11. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE *Aspergillus carbonarius*

Debido a que el objetivo de crecer a la BAL en un medio de cultivo diseñado es emplearla como agente de control biológico contra la producción de OTA, se llevaron a cabo pruebas de inhibición del crecimiento de *A. carbonarius*. Para ello se realizaron cultivos de *A. carbonarius* empleando la técnica de medios envenenados por una parte con el extracto libre de células (ELC) y por otra a las células de la BAL correspondientes a los cultivos de los medios MRS, V1 y v1, pues es en donde se encontró el mayor número de células viables.

11.1 Efecto del extracto libre de células sobre el crecimiento de *A. carbonarius*

En esta técnica se empleó el ELC de 24 y 96 h de uno de los tratamientos empleados en la validación del modelo (medio V1), su control respectivo (medio v1) y el medio MRS. Se prepararon cajas Petri de acuerdo con lo señalado en la Tabla 7.11.

Se observó y midió el crecimiento radial del hongo cultivado en medios envenenados con ELC de 24 y 96 h cada 24 h durante 6 días. En la Figura 11.1 se muestra el crecimiento radial de *A. carbonarius* en los medios envenenados con ELC de 24 h.

Se puede apreciar el crecimiento radial de *A. carbonarius* durante su cultivo. Se distingue mayormente la inhibición con el medio MRS con agar PDA pues, comparado con su respectivo control, el crecimiento micelial y la formación de esporas es mucho menor, además, la coloración de las esporas es de color café, que no es el característico color negro probablemente por la disminución o

11. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE *A. carbonarius*

ausencia de melanina debida a un mecanismo de defensa del hongo contra los productos de fermentación de las BAL (Bloomfield & Alexander, 1967).

Por otro lado, el crecimiento de *A. carbonarius* en el medio formulado con EGM (medio V1) y agar PDA se ve ligeramente disminuido comparado con su control; en contraparte con lo observado en el medio MRS, se observa el desarrollo de esporas de manera acelerada, posiblemente como un mecanismo de defensa del hongo en contra de los ácidos orgánicos y otros compuestos producidos por la BAL (Breakspear & Momany, 2007).

En el caso de los cultivos formulados con agar PDA y el medio sin EGM (medio v1) no se observó un efecto inhibitorio, de hecho, el hongo creció más en presencia de ELC que con su respectivo control probablemente debido a que en dicho medio, la BAL no produjo suficientes ácidos orgánicos debido a la falta de nutrientes en el medio de cultivo lo cual permitió que el hongo se desarrollara casi de manera normal.

11. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE *A. carbonarius*

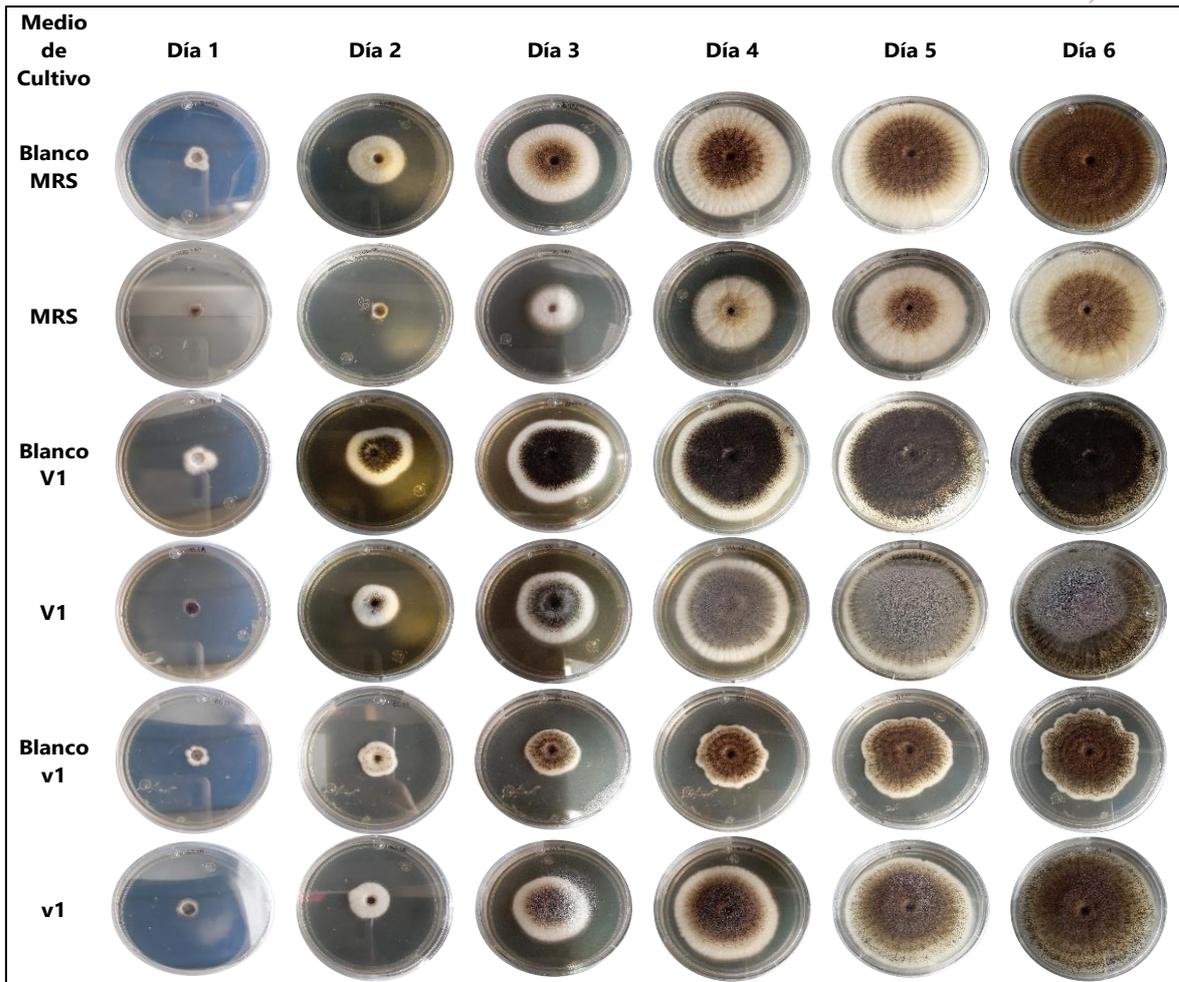


Figura 11.1 Cultivo de *A. carbonarius* en medios envenenados con extracto libre de células de 24 h correspondiente a los medios MRS, V1 y v1.

En la Figura 11.2 se muestra el crecimiento radial de *A. carbonarius* en los medios envenenados con ELC de 96 h. En este caso se muestra algo similar a lo ocurrido con los ELC de 24 h pues tanto con el medio MRS con PDA y con el medio con EGM y PDA se observa el crecimiento radial del hongo un poco menor que con sus respectivos controles, en cambio, hay un mayor crecimiento radial del hongo con el medio sin EGM (medio v1) y PDA que con su respectivo control.

Por otra parte, a partir del sexto día de cultivo, el hongo alcanzó a colonizar toda la superficie de la caja Petri en todos los casos por lo que el efecto inhibitorio se presenta del primer día hasta el quinto. En otros estudios también se había encontrado que a partir del quinto día de cultivo el efecto inhibitorio disminuye

11. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE *A. carbonarius*

probablemente por la pérdida de actividad de los metabolitos de la BAL y se concluyó que el biocontrol que ejerce la BAL es de tipo fungiestático (Amador Hernández, 2019; Belkacem-Hanfi *et al.*, 2014; Djossou *et al.*, 2011a).

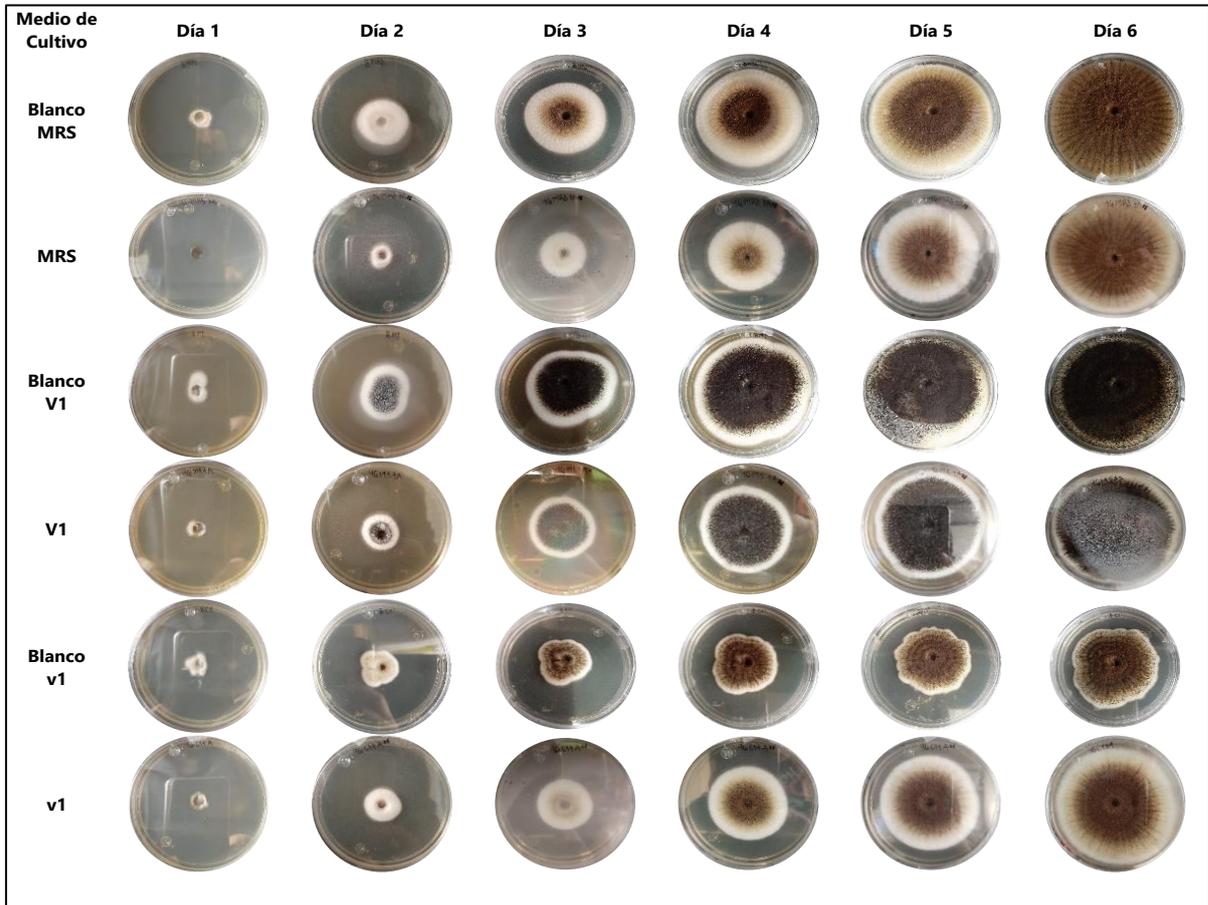


Figura 11.2 Cultivo de *A. carbonarius* en medios envenenados con extracto libre de células de 96 h correspondiente a los medios MRS, V1 y v1.

Para estudiar cuantitativamente el efecto del ELC sobre el crecimiento de *A. carbonarius* se midió el crecimiento radial en todos los tratamientos y se calculó la inhibición (%) como se describe en el punto 7.11.1. La Figura 11.3 muestra la inhibición del crecimiento radial del hongo (%) cultivado en medios envenenados con ELC de 24 h.

Se muestra un efecto inhibitorio de los medios con ELC del medio con EGM (medio V1) del día 1 hasta el día 4 con una disminución de la inhibición del

11. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE *A. carbonarius*

crecimiento a través del tiempo, en el segundo y tercer día la inhibición fue de 30 y 20 % respectivamente por lo que presentó un menor efecto inhibitorio comparado con el ELC del medio MRS en donde la inhibición fue del doble (70 y 60 % en el segundo y tercer día). Lo anterior pudo deberse a que la BAL produjo en pocas cantidades o no fue capaz de producir los ácidos orgánicos con actividad fungiestática como el ácido propiónico, el ácido acético y otros compuestos (Batish & Roy, 1997) en el medio formulado con EGM aunque en este estudio no se midió la formación de dichos ácidos; sin embargo, se mantuvo, muy probablemente, un bajo pH debido a la formación de AL lo que propició un ambiente desfavorable para el crecimiento del hongo.

El ELC del medio sin EGM (medio v1) presentó un efecto inhibitorio sólo hasta el segundo día de cultivo, posiblemente debido a que no se formaron los ácidos orgánicos y otros compuestos con capacidad fungiestática y el AL se formó en pocas cantidades (< 10 g/L) por lo que no fue capaz de inhibir el crecimiento del hongo.

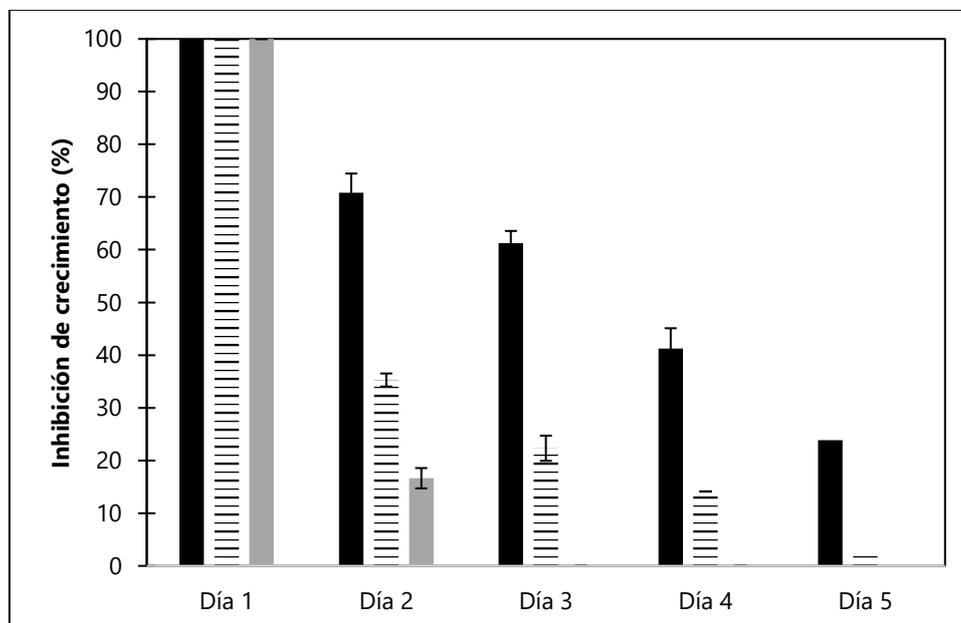


Figura 11.3 Inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius* en medios envenenados con ELC de 24 h. Las barras color negro corresponden al ELC del medio MRS, las barras con líneas son del ELC del medio V1 y las barras color gris pertenecen al ELC del medio v1. La línea negra representa la desviación estándar, n = 3.

11. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE *A. carbonarius*

Para comprobar si los metabolitos formados por la BAL a las 96 h tenían un mayor o menor efecto inhibitorio sobre el crecimiento radial del hongo se estimó la inhibición (%) de la misma manera que para el ensayo anterior. La Figura 11.4 muestra la inhibición usando medios envenenados con ELC de 96 h.

Comparado con el ELC de 24 h, se mostró una mayor reducción del crecimiento radial con ELC de 96 h del medio con EGM (medio V1) pues en el segundo y tercer día se inhibió un 50 y 30 % respectivamente, en el caso del ELC del medio MRS la inhibición se mantuvo igual que en cultivos de 24 h. Una posible razón sería que la BAL requiere más tiempo de cultivo para producir todos los metabolitos responsables de la actividad fungiestática como el ácido acético y ácido propiónico, por lo tanto, una recomendación es medir la producción de estos metabolitos en medio con EGM hasta las 96 h y comprobar lo sugerido.

Por el contrario, el ELC del medio sin EGM (medio v1) no presentó inhibición después del segundo día, de la misma manera que había ocurrido con ELC de 24 h lo cual indica que la BAL no fue capaz de producir más metabolitos en ningún tiempo de cultivo (24 y 96 h) por la carencia de nutrientes disponibles en el medio.

11. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE *A. carbonarius*

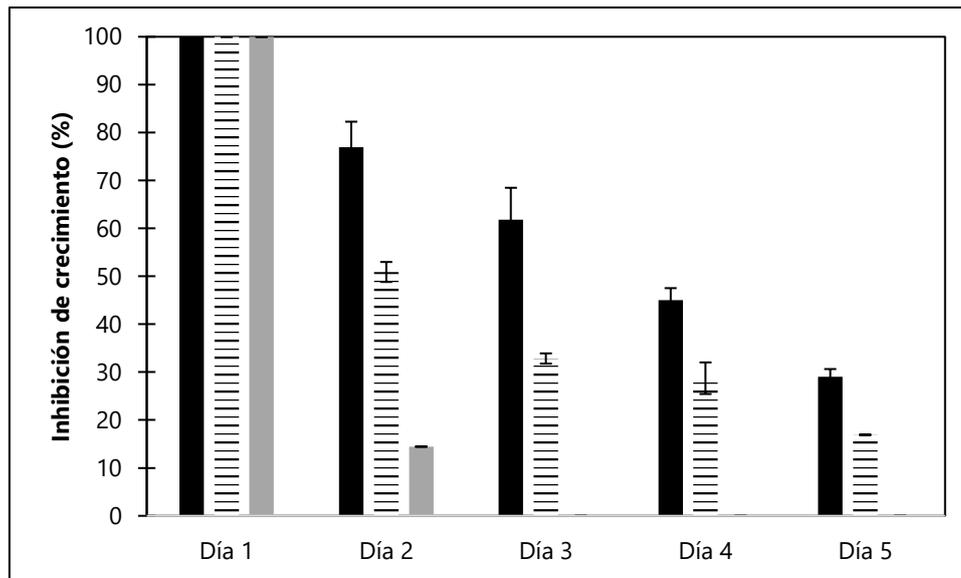


Figura 11.4 Inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius* en medios envenenados con ELC de 96 h. Las barras color negro corresponden al ELC del medio MRS, las barras con líneas son del ELC del medio V1 y las barras color gris pertenecen al ELC del medio v1. La línea negra representa la desviación estándar, $n = 3$.

11.2 Efecto de células de BAL sobre el crecimiento de *A. carbonarius*

En esta técnica se emplearon las células del cultivo de 24 h de uno de los tratamientos empleados en la validación del modelo (medio V1), su control respectivo (medio v1) y el medio MRS. Se prepararon placas Petri de acuerdo con lo señalado en la Tabla 7.12.

Se midió el crecimiento radial del hongo cada 24 h durante 6 días y se estimó la inhibición (%) como se describe en el punto 7.11.1. En la Figura 11.5 se muestra el crecimiento radial de *A. carbonarius* en los medios envenenados con células BAL de 24 h. El desarrollo normal del crecimiento del hongo (medio control) es diferente de lo observado en el medio MRS y V1 pues se observa la formación de halos concéntricos de esporas en los medios control y v1, mientras que bajo condiciones de estrés (medio MRS y V1) se refleja la sobre producción de esporas pues el hongo acelera su desarrollo para desplazar a la BAL (Valerio *et al.*, 2009).

11. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE *A. carbonarius*

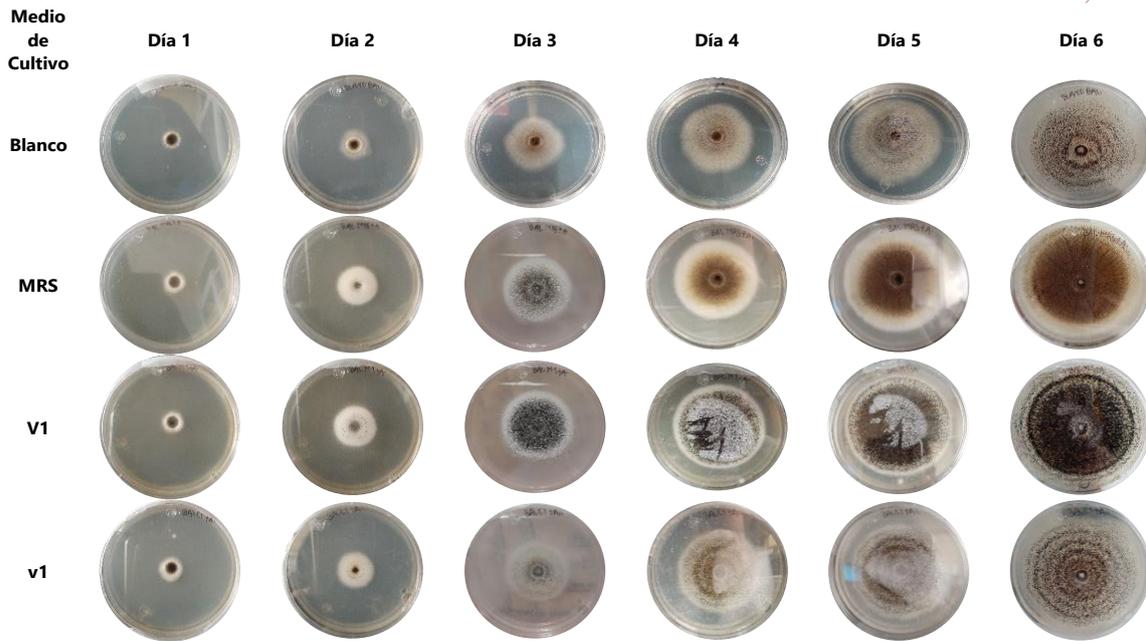


Figura 11.5 Cultivo de *A. carbonarius* en medios envenenados con células BAL crecidas en los medios MRS, V1 y v1.

De manera similar a lo estudiado con el ELC, se calculó la inhibición (%) de crecimiento radial del hongo en medios con células de BAL, los resultados se muestran en la Figura 11.6. El efecto inhibitorio es mucho menor que el presentado con el ELC, pues aún con las células del medio MRS la inhibición es baja en el segundo y tercer día (20 y 10 % respectivamente), por otra parte, el medio con EGM (medio V1) no mostró un efecto inhibitorio considerable (< 10 %), en cambio las células del medio sin EGM (medio v1) presentaron un efecto inhibitorio mayor que el de las células del medio con EGM aunque muy bajo (10 %). Además, después del tercer día de cultivo no se observó inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius*.

Se ha estudiado que un posible mecanismo antifúngico de las BAL es debido a la adhesión superficial de éstas sobre esporas fúngicas provocando daño superficial en esporas (Amador-Hernández, 2019); sin embargo, en este caso probablemente las células no pudieron adherirse bien al hongo y por eso presentaron un menor efecto inhibitorio que el ELC, por lo que se recomienda realizar un análisis más

11. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE *A. carbonarius*

profundo de la interacción de las BAL cultivadas en medio con EGM con las esporas del hongo.

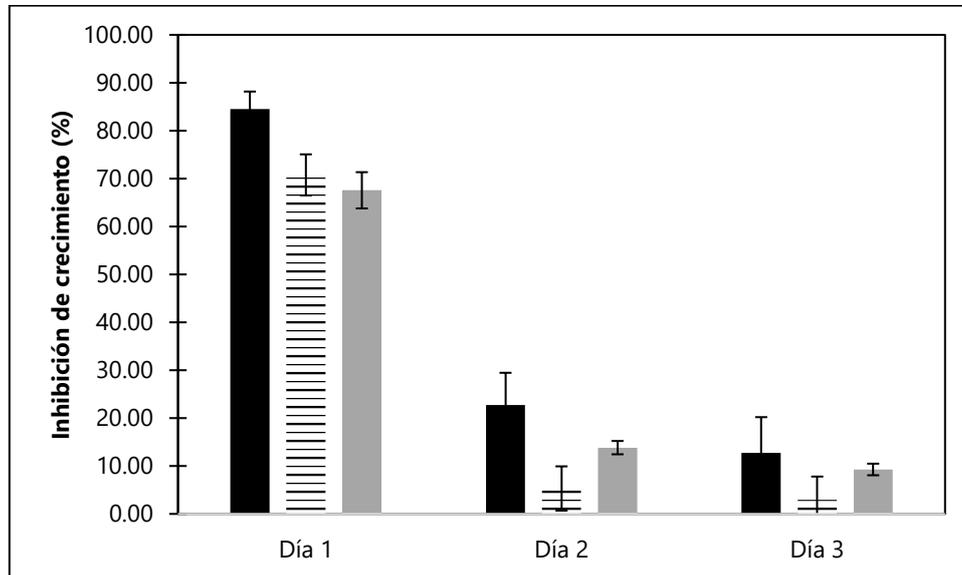


Figura 11.6 Inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius* en medios envenenados con células de BAL. Las barras color negro corresponden a las células del medio MRS, las barras con líneas representan a las células del medio V1 y las barras color gris pertenecen a las células del medio v1. La línea negra representa la desviación estándar, n = 3.

11.3 Conclusiones parciales

Se compró la actividad antifúngica de *L. plantarum* sobre *A. carbonarius* con el ELC de 24 y 96 h de cultivo de BAL; sin embargo, el mayor efecto inhibitorio se muestra con el ELC de 96 h por lo que se recomienda realizar análisis de la formación de ácidos orgánicos y otros metabolitos producidos por la BAL en tiempos de cultivo más prolongados (hasta 96 h) y buscar estrategias para mejorar la producción de dichos metabolitos en un medio formulado con EGM.

Por otro lado, es importante llevar a cabo ensayos de absorción de OTA por BAL cultivadas en el medio con EGM para confirmar a profundidad no sólo el efecto inhibitorio del crecimiento sino de la eliminación de OTA por BAL.

12. CONCLUSIONES GENERALES

L. plantarum B031 mostró un desarrollo similar al medio MRS para la producción de biomasa y productividad en presencia de EGM, además, el medio MRS, que permite cultivar lactobacilos, no es adecuado para su uso en grandes cantidades debido a su alto costo. Por lo tanto, en este estudio se presenta un medio de cultivo económico que tiene el potencial de poder ser empleado a gran escala, no solo para la cepa de estudio *L. plantarum* sino también para otras BAL.

En el presente estudio, los componentes costosos del medio de cultivo MRS fueron reemplazados por EGM. El germen de malta es un residuo de la industria cervecera que en ocasiones se usa como alimento para rumiantes por su composición rica en proteínas, péptidos, aminoácidos, purinas, pirimidinas y vitaminas, lo que vuelven al EGM una alternativa atractiva y económica al EC y la PC.

En general, se observaron diferencias entre los tratamientos evaluados, demostrando que los factores que tuvieron un mayor efecto sobre las distintas respuestas fueron la concentración de glucosa, acetato de sodio y sulfato de magnesio por lo que la estrategia experimental utilizada nos permitió encontrar una fuente alternativa de N más económica que el EC y la PC, pues la cepa fue capaz de crecer en un medio de cultivo formulado con EGM.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que un medio de cultivo formulado con EGM es una alternativa económica y muy competente con el medio de cultivo MRS. El costo final del medio se estimó en aproximadamente un 30 % menos que el medio MRS.

12. CONCLUSIONES GENERALES

Se comprobó el efecto inhibitorio de *L. plantarum* sobre *A. carbonarius* con el ELC de 24 y 96 h de cultivo de BAL; sin embargo, el mayor efecto inhibitorio se muestra con el ELC de 96 h por lo que se recomienda realizar análisis de la formación de ácidos orgánicos y otros metabolitos producidos por la BAL en tiempos de cultivo más prolongados (hasta 96 h) y buscar estrategias para mejorar la producción de dichos metabolitos en un medio formulado con EGM.

Es necesario investigar más a fondo los productos de fermentación de *L. plantarum* en un tiempo de cultivo prolongado para mejorar su capacidad inhibitoria de hongos filamentosos y probablemente suplementar al medio de cultivo para apoyar la actividad fungiestática.

13. REFERENCIAS

- Abreu, A. R., Rubio Armendáriz, C., Gutiérrez Fernández, A. J., & Hardisson De La Torre, Y. A. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión Ochratoxin A in foods for human consumption: review. *Nutr Hosp. Nutr Hosp*, 2626(6).
- Agarwal, L., Dutt, K., Meghwanshi, G. K., & Saxena, R. K. (2008). Anaerobic fermentative production of lactic acid using cheese whey and corn steep liquor. *Biotechnology Letters*, 30(4), 631–635.
- Amador Hernández, J. U. (2019). *Análisis de las interacciones fisicoquímicas y ecológicas en los mecanismos de antagonismo entre hongos ocratoxigénicos presentes en cerezas de café y bacterias ácido lácticas*. (Tesis de Maestría) Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, CDMX.
- Aznar, R., & Zúñiga, M. (2000). ¿Que son las bacterias Lácticas? *Istituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC)*, 1–8.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
- Batish, V. K., & Roy, U. (1997). Ram Lal & Sunita Grower (1997) Antifungal attributes of Lactic Acid Bacteria-a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(3), 209–225.
- Belkacem-Hanfi, N., Fhoula, I., Semmar, N., Guesmi, A., Perraud-Gaime, I., Ouzari, H.-I. Roussos, S. (2014). Lactic acid bacteria against post-harvest moulds and ochratoxin A isolated from stored wheat. *Biological Control*, 76, 52–59.
- Bloomfield, B. J., & Alexander, M. (1967). Melanins and resistance of fungi to lysis. *Journal of Bacteriology*, 93(4), 1276–1280.
- Box, George E. P., Hunter, Stuart J., Hunter, W. G. (2005). *Statistics for experimenters: Design, Innovation, and Discovery*. (Wiley, Ed.) (2nd ed.). United States of America.
- Box, G. E. P., & Wilson, K. B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*. WileyRoyal Statistical Society.
- Breakspear, A., & Momany, M. (2007). *Aspergillus nidulans* conidiation genes dewA, fluG, and stuA are differentially regulated in early vegetative growth. *Eukaryotic Cell*, 6(9), 1697–1700.
- Calinoiu, L.-F., Vodnar, D.-C., & Precup, G. (2014). The probiotic bacteria viability under different conditions. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 73(2), 55–60.
- Cameron, A. Colin, Windmeijer, F. A. G. (1997). An R-squared measure of goodness of fit for some common nonlinear regression models. *Journal of Econometrics*, 77, 329–342.
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002a). The lactic acid bacteria: A literature survey.

- Critical Reviews in Microbiology.*
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002b). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. CRC Press LLC.
- Chiappa Xavier, Galindo Maria del Carmen, C. A. (2009). *Introducción a los modelos matemáticos de crecimiento con aplicaciones en sistemas biológicos*. (Tesis de doctorado) UNAM.
- Collard, P. (Patrick J. (1976). *The development of microbiology*. Cambridge University Press.
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., & Richard-Forget, F. (2010, April 1). Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*. Elsevier.
- Davoodi, S., Behbahani, M., Shirani, E., & Mohabatkar, H. (2016). Influence of sucrose, glucose, stevia leaf and stevioside on the growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus casei*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, 40(4), 275–279.
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135.
- Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Lakhel Mirleau, F., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S., ... Roussos, S. (2011b). Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe*, 17(6), 267–272.
- Ec. (2000). This document is meant purely as a documentation tool and the institutions do not assume any liability for its contents. *Official Journal of the European Communities*, L 269(September 2000), 1–15.
- FAO. (2017). Food safety and quality: Ochratoxin A contamination in coffee.
- Farras I, Ramon Parés, G. A. J. (2019). Cinética del crecimiento. En *Bioquímica de los microorganismos* (pp. 30–36).
- FDA. (2018). Bacteriological analytical manual (BAM) | FDA. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>
- Flores-nájera, A., Teresa, M., Mancera, T., Saucedo-Castañeda, G., Roussos, S., Autónoma, G. R. U., ... De, I. (2011). Effect of addition of *Lactobacillus* sp 031 on growth and sporulation of *Aspergillus carbonarius* DO162 in solid fermentation, (2001), 2011.
- Flores-Nájera, A., Torres-Mancera, M. T., Gaime-Perraud, I., Roussos, S., Saucedo-Castañeda, G., & Rodríguez-Serrano, G. (2011). Inhibition of growth and sporulation of *Aspergillus carbonarius* 089 and do162 by lactic acid bacteria isolated from coffee pulp.
- Gaden, E. L. (1959). Fermentation process kinetics. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1(4), 413–429.
- Gourama, H., & Bullerman, L. B. (1997). Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudopantarum*. *International Journal of Food Microbiology*, 34(2),

- 131–143.
- Heldal, Mikal, Norland, Svein, Magne Fagerbakke, Kjell, Thingstad, Frede, Bratbak, G. (1996). The elemental composition of bacteria: A signature of growth conditions? *Marine Pollution Bulletin*, 33(1–6), 3–9.
- Hernández Alicia, Alfaro Iliena, A. R. (2007). Microbiología Industrial.
- Holzapfel, W. H., & Wood, B. J. B. (2018). Introduction to the Lab Session.; (Chapter 32), 1–12.
- Hwang, C. F., Chang, J. H., Hwang, J. Y., Tsai, C. C., Lin, C. K., & Tsen, H. Y. (2012). Optimization of medium composition for improving biomass production of *Lactobacillus plantarum* Pi06 using the Taguchi array design and the Box-Behnken method. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 17(4), 827–834.
- ICO. (2012). Procesamiento de campo. International Coffee Organization. <http://www.ico.org>
- Joshi, D. S., Singhvi, M. S., Khire, J. M., & Gokhale, D. V. (2010). Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for D -lactic acid production, 517–520.
- Jurado-Gámez, H., Calpa-Yamá, F., & Chaspuengal-Tulcán, A. (2014). Determinación de parámetros cinéticos de *Lactobacillus casei* en dos medios probióticos. *Veterinaria y Zootecnia*, 8(2), 15–35.
- Kaavessina, M., Khanifatun, F., & Alzahrani, S. M. (2017). Lactic acid production from date juice using *Lactobacillus casei* ATCC 393 in batch fermentation. *Matec Web of Conferences*, 101,02002.
- Kowalczyk, M., Mayo, B., Fernández, M., & Aleksandrak-Piekarczyk, T. (2015). Updates on metabolism in lactic acid bacteria in light of "Omic" technologies. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications: Second Edition*, (2015), 1–24.
- Kumar, M., Jain, A. K., Ghosh, M., & Ganguli, A. (2012). Industrial whey utilization as a medium supplement for biphasic growth and bacteriocin production by probiotic *Lactobacillus casei* LA-1. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(3), 198–207.
- Laitila, A., Alakomi, H. L., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Haikara, A. (2002). Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology*, 93(4), 566–576.
- Laitila, A., Saarela, M., Kirk, L., Siika-aho, M., Haikara, A., Mattila-Sandholm, T., & Virkajarvi, I. (2004). Malt sprout extract medium for cultivation of *Lactobacillus plantarum* protective cultures. *Letters in Applied Microbiology*, 39(4), 336–340.
- Lee, C. W. (2007). Production of D-lactic acid by bacterial fermentation of rice, 8(6), 571–578.
- Luedeking, R., & Piret, E. L. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1(4), 393–412.
- Manzoor, A., Qazi, J. I., Haq, I. U., Mukhtar, H., & Rasool, A. (2017). Significantly

- enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS-14) by developing low cost media cultivation strategy. *Journal of Biological Engineering*, 11(1), 1–10.
- Mariotti, F., Tomé, D., & Mirand, P. P. (2008). Converting Nitrogen into Protein—Beyond 6.25 and Jones' Factors. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(2), 177–184.
- Montgomery, D. (2004). *Diseño y análisis de experimentos*. EUA, LIMUSA Wiley.
- Organización Internacional del Café, O. (2016). *Informe del mercado de Café*. <http://www.ico.org>
- Passos, F. V., Fleming, H. P., Ollis, D. F., Hassan, H. M., & Felder, R. M. (1993). Modeling the specific growth rate of *Lactobacillus plantarum* in cucumber extract. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(1).
- Peleg, M., Corradini, M. G., & Normand, M. D. (n.d.). The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited.
- Piard, J., & Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. *1.Oxygen metabolites and catabolism end-products*. *Lait* (Vol. 71).
- Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305–325.
- Saguir, F. M., & de Nadra, M. C. M. (2007). Improvement of a chemically defined medium for the sustained growth of *Lactobacillus plantarum*: nutritional requirements. *Current Microbiology*, 54(6), 414–418.
- Serna-Saldivar, S. O. (2010). *Cereal Grains: Properties, Processing, and Nutritional Attributes*. CRC Press.
- Soto-cruz, O., Favela-torres, E., & Saucedo-Castañeda, G. (2002). Modeling of growth, lactate consumption, and volatile fatty acid complex media, (1), 193–200.
- Suarez Ospina, D. (2018). *Análisis de datos cinéticos para la producción de ácido láctico a partir de Lactobacillus acidophilus en un sustrato complejo*. (Tesis de doctorado), Universidad de América.
- Thakur, A., Panesar, P. S., & Saini, M. S. (2017). I(+)-Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* using low cost agro-industrial Waste as carbon and nitrogen sources. *Waste and Biomass Valorization*, 0(0), 1–11.
- Tomás, M. S. J., Bru, E., Wiese, B., & Nader-Macías, M. E. F. (2010). Optimization of low-cost culture media for the production of Biomass and Bacteriocin by a Urogenital *Lactobacillus salivarius* Strain. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(1), 2–11.
- Tortora, G., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Médica Panamericana.
- Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias, R. A. P. (2010). Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial. *Ingresar a La Revista*, 8(1), 93–105.
- Uzochukwu, G. A., Schimmel, K., Pinder, T., & Ibrahim, S. A. (2016). *Proceedings of the 2013 National Conference on Advances in Environmental Science and*

- Technology.*
- Valerio, F., Favilla, M., De Bellis, P., Sisto, A., de Candia, S., & Lavermicocca, P. (2009). Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. *Systematic and Applied Microbiology*, 32(6), 438–448.
- Wee, Y.-J., Kim, J.-N., Yun, J.-S., & Ryu, H.-W. (2005). Optimum conditions for the biological production of lactic acid by a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus* sp. RKY2. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 10(1), 23–28.
- Weisberg, S. (2005). *Applied linear regression*. Wiley-Interscience.
- Zhang, H., & Cai, Y. (2014). *Lactic acid bacteria: Fundamentals and practice. Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice.*
- Zhou, K., Zeng, Y., Han, X., & Liu, S. (2015a). Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* BC-25 in response to temperature and pH in batch fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(6), 1627–1637.
- Zhu, L., Zhang, B., Dai, Y., Li, H., & Xu, W. (2017). A review: Epigenetic mechanism in ochratoxin a toxicity studies. *Toxins*, 9(4), 1–12.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881.

14. ANEXOS

Anexo 1. Composición de medio de cultivo CYA, Czapek concentrado y PDA.**Tabla A1.1** Composición de medio de cultivo CYA

Ingrediente	Cantidad (g/L)
K ₂ HPO ₄	1
Extracto de levadura	5
Sacarosa	30
Agar bacteriológico	8 g
Czapek concentrado*	10 mL

Tabla A1.2 Composición del medio de cultivo Czapek concentrado

Ingrediente	Cantidad (g/L)
KCl	5
NaNO ₃	20
Sulfato ferroso	0.1
Sulfato de magnesio	5

Tabla A1.3 Composición del medio de cultivo PDA

Ingrediente	Cantidad (g/L)
Infusión de Papa a partir de 200 g	4 g*
Dextrosa	20
Agar bacteriológico	15
*4.0 g de extracto de papa es equivalente a 200 g de infusión de papas	

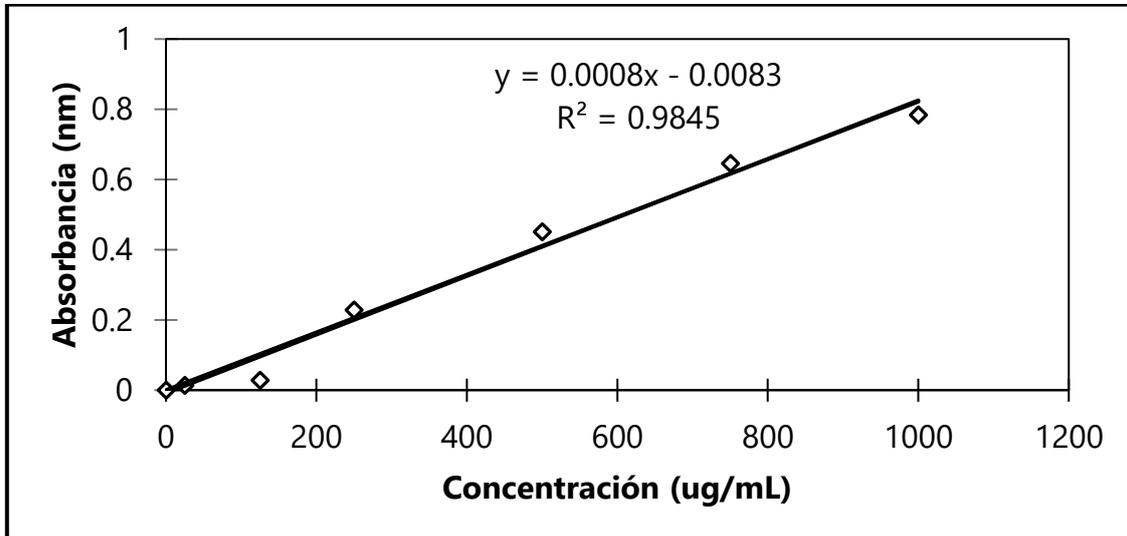
Anexo 2. Curva de calibración para cuantificación de proteína por el método del BCA

Figura A2.1 Curva de calibración para cuantificación de proteínas con estándar de albúmina sérica bovina (BSA por sus siglas en inglés).

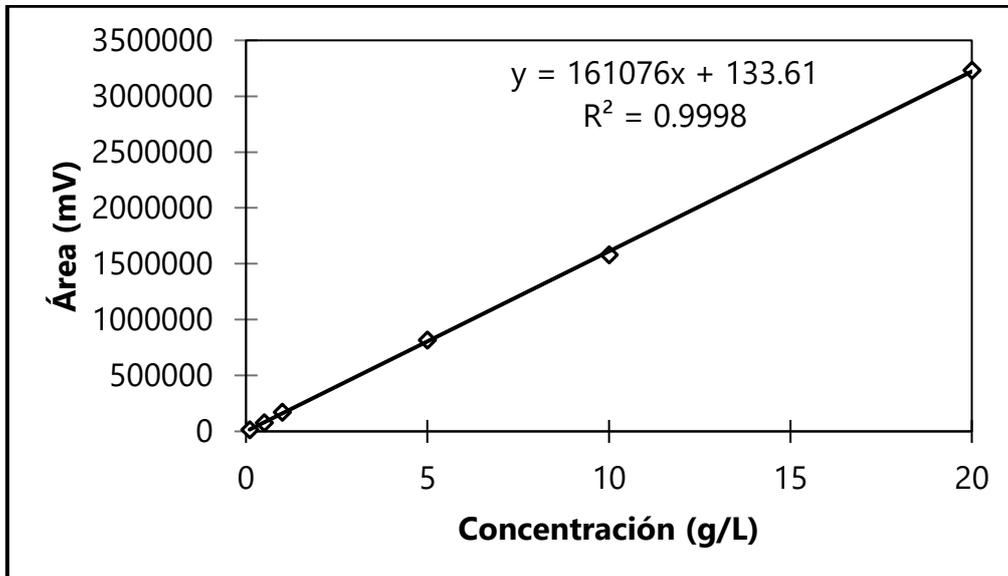
Anexo 3. Curva de calibración para la cuantificación de ácido láctico

Figura A3.1 Curva de calibración para la cuantificación de ácido láctico con estándar de ácido láctico

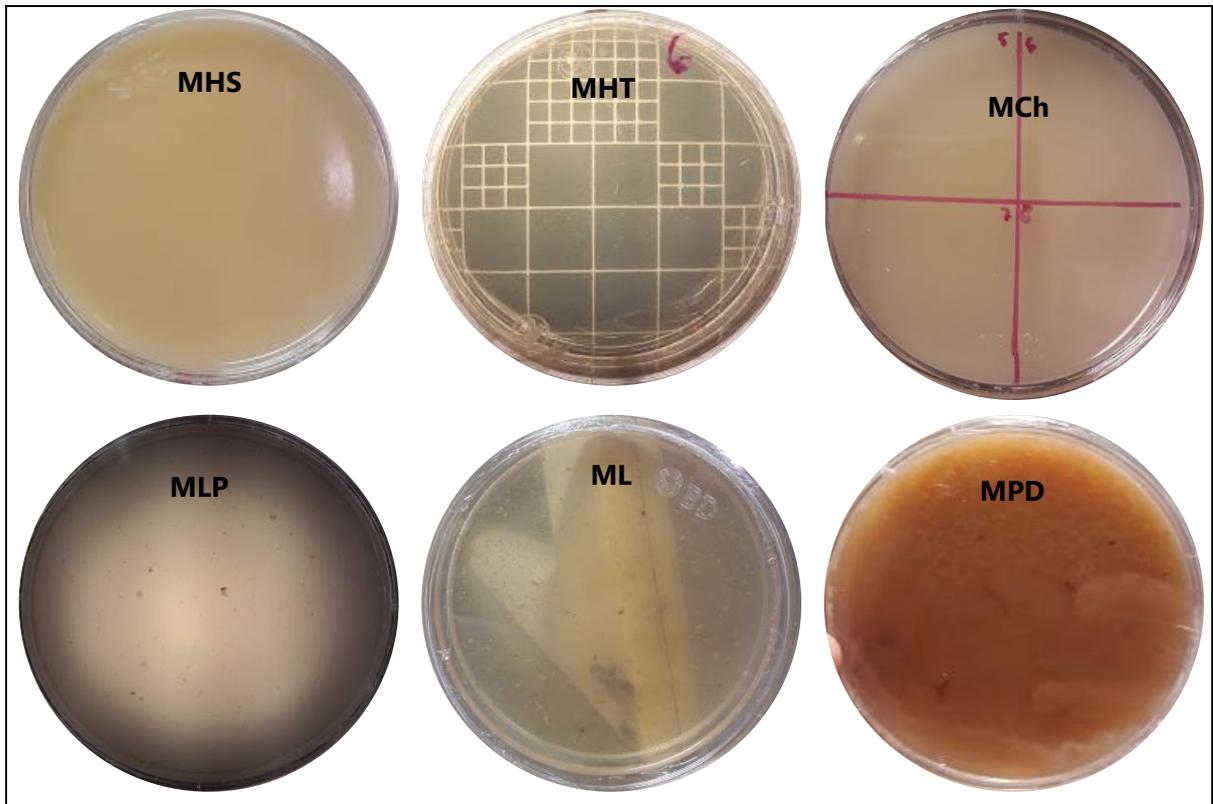
Anexo 4. Cajas Petri con medios formulados con fuentes de N alternas

Figura A4.1 Cajas Petri con medios de cultivo formulados con harina de soya, harina de trigo, cacahuete, levadura de pan, lenteja y aislado de suero de leche.