

## Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

**BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA**  
UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
Chía - Cundinamarca



El presente formulario debe ser diligenciado en su totalidad como constancia de entrega del documento para ingreso al Repositorio Digital (Dspace).

<b>TITULO</b>	Utilización de soluciones con fructooligosacáridos obtenidas por medio de un proceso fermentativo a partir de jarabes provenientes de la deshidratación osmótica de frutas como medio de cultivo para bacterias ácido lácticas		
<b>SUBTITULO</b>			
<b>AUTOR(ES)</b> Apellidos, Nombres (Completo) del autor(es) del trabajo	Caicedo Canchón, Martha Lucía		
<b>PALABRAS CLAVE</b> (Mínimo 3 y máximo 6)	deshidratación osmótica		HPLC
	potencial probiótico		biomasa
	bacterias ácido lácticas		fermentación
<b>RESUMEN DEL CONTENIDO</b> (Mínimo 80 máximo 120 palabras)	<p>En este proyecto se utilizó la bacteria ácido láctica <i>L. plantarum</i> aislada previamente de coliflor (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i>), la cual demostró tener potencial probiótico, para evaluar su crecimiento en jarabes provenientes de la deshidratación osmótica de mora de Castilla (<i>Rugos glaucus</i>) y tomate de árbol (<i>Cyphomandra betacea</i>) sin y con fructooligosacáridos (FOS) obtenidos por vía fermentativa utilizando <i>Aspergillus oryzae</i> aislado previamente y sobre los mismos jarabes. La caracterización de los FOS se realizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Estos resultados indican que los FOS obtenidos por vía fermentativa, especialmente los provenientes de jarabes de DO de mora de Castilla estimularon el crecimiento de la bacteria de estudio.</p>		

Autorizo (amos) a la Biblioteca Octavio Arizmendi Posada de la Universidad de La Sabana, para que con fines académicos, los usuarios puedan consultar el contenido de este documento en las plataformas virtuales de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

**UTILIZACIÓN DE SOLUCIONES CON FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS  
OBTENIDAS POR MEDIO DE UN PROCESO FERMENTATIVO A PARTIR DE  
JARABES PROVENIENTES DE LA DESHIDRATACIÓN OSMÓTICA DE  
FRUTAS COMO MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

MARTHA LUCÍA CAICEDO CANCHÓN

**UNIVERSIDAD DE LA SABANA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN DISEÑO Y GESTIÓN DE PROCESOS**

**Chía**

**2013**

**UTILIZACIÓN DE SOLUCIONES CON FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS  
OBTENIDAS POR MEDIO DE UN PROCESO FERMENTATIVO A PARTIR DE  
JARABES PROVENIENTES DE LA DESHIDRATACIÓN OSMÓTICA DE  
FRUTAS COMO MEDIO DE CULTIVO PARA BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

**Martha Lucía Caicedo Canchón**

**Trabajo de grado para optar al título de magister en diseño y gestión de  
procesos**

**Directores:**

**Ruth Yolanda Ruiz, Ph.D.**

**Bernadette Klotz, Ph.D.**

**Universidad de La sabana**

**Facultad de Ingeniería**

**Maestría en Diseño y Gestión de Procesos**

**Chía**

**2013**

A Dios mi amigo constante y fiel. A mis padres Gilma y Sixto, ellos me han dado en cambio toda la sabiduría que no está escrita. A mi hermano David Felipe por confiar siempre en mí. A todos los que más quiero y me alegran la vida.

Martha Lucía C.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al fondo de investigación de la Universidad de La Sabana por apoyar y financiar este proyecto.

A la Doctora Ruth Yolanda Ruiz y a la Doctora Bernadette Klotz por su invaluable colaboración y apoyo al transmitirme los conocimientos necesarios y precisos para llevar a cabo esta investigación.

Agradezco también a todos los auxiliares de laboratorio Pilar, Martica, Carolina, Jorge y Antonio por su ayuda y dedicación desinteresada.

A todas las personas que hacen parte de la Facultad de Ingeniería, quienes me acompañaron e hicieron aportes en este proceso.

La Universidad de La Sabana no se hace responsable de las ideas  
expuestas en este proyecto, ya que son de los autores

## Contenido

1. INTRODUCCIÓN .....	21
2. OBJETIVOS .....	22
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. MARCO TEÓRICO.....	23
3.1 Consideraciones teóricas de la deshidratación osmótica de frutas .....	23
3.2 Consideraciones teóricas de la producción de FOS .....	24
3.3 Bacterias ácido lácticas .....	25
3.4 Microbiología predictiva .....	28
4. ESTADO DEL ARTE .....	30
4.1 Estado de la investigación en deshidratación osmótica.....	30
4.1.1 Problemas relacionados con las soluciones osmodeshidratantes .....	30
<input type="checkbox"/> Relación fruta/solución osmótica. ....	31
<input type="checkbox"/> Pérdida de solutos y partículas provenientes de la fruta. ....	31
<input type="checkbox"/> Conservación de la solución cuando no se está realizando el proceso de deshidratación osmótica.....	31
<input type="checkbox"/> Determinación del punto final de uso.....	31
<input type="checkbox"/> Disposición final de la solución osmótica.....	31
4.1.2 Alternativas de empleo de las soluciones osmóticas .....	31
4.2 Fructooligosacaridos (FOS): tendencias en investigación .....	33
4.2.1 Producción de FOS .....	34
4.3 Crecimiento de bacterias ácido lácticas en medios con FOS .....	39
5. JUSTIFICACIÓN .....	44
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	47
6.1 PREPARACIÓN DE JARABES .....	47
6.1.1 Deshidratación osmótica .....	47
6.1.2 Preparación de fructooligosacáridos .....	49



6.2	evaluación A MICROESCALA del crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes ricos en fos obtenidos por vía fermentativa .....	51
6.2.1	Preparación del inóculo.....	51
6.2.2	Preparación de jarabes como medio de cultivo de bacterias ácido lácticas	52
6.2.3	Siembra a microescala.....	53
6.2.4	Correlación de los valores obtenidos de densidad óptica con recuento en caja de <i>L. plantarum</i> .....	54
6.2.5	Efecto de la adición de FOS comerciales.....	55
6.3	DETERMINACIÓN DE la CURVA de CRECIMIENTO mediante la técnica de peso seco DE <i>L. plantarum</i> EN JARABES CON FOS Y SIN FOS ADICIONADO CON NITRÓGENO ORGÁNICO con respecto al tiempo .....	56
6.3.1	Recuento en caja para tiempos de control .....	57
6.3.2	Determinación de consumo de nitrógeno.....	58
6.3.3	Determinación del consumo de FOS.....	58
6.3.4	Determinación de las cinéticas de crecimiento microbiano .....	58
7.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	59
7.1	Resultados de la preparación de jarabes.....	59
7.1.1	Deshidratación osmótica .....	59
7.1.2	Producción de fructooligosacáridos (FOS).....	60
7.2	Evaluación del uso de jarabes como medio de cultivo de <i>L. plantarum</i> ...	62
7.2.1	Efecto de los FOS sobre el crecimiento de <i>L. plantarum</i> a microescala	62
7.2.2	Efecto del nitrógeno .....	76
7.3	ENSAYOS PARA DETERMINACIÓN DE CURVA de CRECIMIENTO por peso seco DE <i>L. plantarum</i> EN JARABES CON FOS Y SIN FOS ADICIONADO CON NITRÓGENO ORGÁNICO .....	97
7.3.1	Modelado matemático de las curvas de crecimiento por peso seco de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de la DO con FOS y sin FOS adicionados con nitrógeno orgánico .....	102
7.3.2	Resultados de consumo de nitrógeno .....	107

7.3.3	Resultados de consumo de FOS.....	109
7.4	RESUMEN DEL MODELADO MATEMATICO.....	113
8.	CONCLUSIONES.....	117
9.	RECOMENDACIONES .....	119
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	120
11.	ANEXOS .....	128

## LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1. Modelo de Baranyi & Roberts (1994). .....	29
Ecuación 2. Determinación de contenido inicial de agua.....	48
Ecuación 3. Determinación de contenido final de agua .....	48
Ecuación 4. Determinación de pérdida de agua .....	48
Ecuación 5. Determinación de sólidos totales iniciales.....	48
Ecuación 6. Determinación de sólidos totales finales .....	48
Ecuación 7. Determinación de ganancia de sólidos.....	48
Ecuación 8. Modelo de Baranyi & Roberts (1994). .....	113

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Rendimientos reportados para la producción de FOS a partir de sacarosa.....	36
Tabla 2. Revisión bibliográfica de crecimiento de bacterias en medios con frutas y/o FOS y con potencial prebiótico .....	40
Tabla 3. Jarabes para inoculación a microescala.....	53
Tabla 4. Jarabes adionados con fuentes de nitrógeno para inoculación a microescala ...	53
Tabla 5. Horas de muestreo para curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> .....	57
Tabla 6. Datos de DO obtenidos para mora de castilla y tomate de árbol.....	59
Tabla 7. Log(UFC/mL) correspondientes a la densidad óptica alcanzada a las 53 h y porcentaje de crecimiento respecto a control positivo (MRS) para los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla y tomate de árbol sin y con FOS .....	66
Tabla 8. Densidades ópticas obtenidas en el crecimiento de <i>L. plantarum</i> en caldo MRS enriquecido con diferentes concentraciones de FOS comerciales adicionadas a caldo MRS .....	75
Tabla 9. Log(UFC/mL) correspondientes a la densidad óptica alcanzada a las 53 horas y porcentaje de crecimiento respecto a control positivo (MRS) para los jarabes provenientes de OD de mora de castilla y tomate de árbol adicionados con nitrógeno orgánico.....	79
Tabla 10. Log(UFC/mL) correspondientes a la densidad óptica alcanzada a las 53 h y porcentaje de crecimiento respecto a control positivo (MRS) para los jarabes provenientes de OD de mora de castilla y tomate de árbol adicionados con nitrógeno inorgánico.....	89
Tabla 11. Parámetros cinéticos obtenidos para el crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla y tomate de árbol a nivel microescala. ....	114
Tabla 12. Parámetros cinéticos obtenidos para el crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de OD de mora de Castilla y tomate de árbol a nivel biomasa.....	115

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rutas metabólicas de las BAL (Caplice & Fitzgerald, 1999).....	26
Figura 2. Diluciones seriadas.....	54
Figura 3. Perfiles de reacción de obtención de FOS en los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla. GF4: FFN, GF3: nistosa, GF2: kestosa, GF: sacarosa, G: glucosa, F: fructosa.....	61
Figura 4. Perfiles de reacción de obtención de FOS en los jarabes provenientes de DO de tomate de árbol GF4: FFN, GF3: nistosa, GF2: kestosa, GF: sacarosa, G: glucosa, F: fructosa.....	61
Figura 5. Curvas de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa.....	63
Figura 6. Curvas de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de tomate de árbol sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa.....	64
Figura 7. Fase lag de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa. ....	67
Figura 8. Máxima velocidad específica de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa. ....	68
Figura 9. Valor final de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa. ....	68
Figura 10. Fase lag de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa. ....	70

Figura 11. Máxima velocidad específica de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa. ....	70
Figura 12. Valor final de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa. ....	71
Figura 13. Efecto de la adición de altas concentraciones de FOS comerciales en caldo MRS sobre el crecimiento de <i>L. plantarum</i> .....	73
Figura 14. Efecto de la adición de bajas concentraciones de FOS comerciales en caldo MRS sobre el crecimiento de <i>L. plantarum</i> .....	74
Figura 15. Curvas de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico .....	77
Figura 16. Curvas de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico. ....	78
Figura 17. Fase lag de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla adicionados con nitrógeno orgánico.....	81
Figura 18. Máxima velocidad específica de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla adicionados con nitrógeno orgánico.....	81
Figura 19. Valor final de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla adicionados con nitrógeno orgánico.....	82
Figura 20. Fase lag de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de OD de tomate de árbol adicionados con nitrógeno orgánico.....	83
Figura 21. Máxima velocidad específica de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol adicionados con nitrógeno orgánico.....	84
Figura 22. Valor final de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol adicionados con nitrógeno orgánico.....	84
Figura 23. Curvas de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno inorgánico. ....	87

Figura 24. Curvas de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS adicionados con nitrógeno inorgánico. ....	88
Figura 25. Fase lag de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla adicionados con nitrógeno inorgánico. ...	91
Figura 26. Máxima velocidad específica de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol adicionados con nitrógeno orgánico. ....	92
Figura 27. Valor final de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de OD de mora de castilla adicionados con nitrógeno inorgánico. ...	92
Figura 28. Fase lag de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol a adicionados con nitrógeno inorgánico. ...	94
Figura 29. Máxima velocidad específica de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol adicionados con nitrógeno inorgánico. ....	95
Figura 30. Valor final de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol adicionados con nitrógeno inorgánico. ...	95
Figura 31. Curva de crecimiento de BAL <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de Mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco. ....	98
Figura 32. Curva de crecimiento de BAL <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS adicionado con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco. ....	99
Figura 33. UFC/mL de <i>L. plantarum</i> correspondientes a la biomasa obtenida en los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico a nivel de peso seco. ....	100
Figura 34. UFC/mL de <i>L. plantarum</i> correspondientes a la biomasa obtenida en los jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS adicionados con Nitrógeno orgánico a nivel de peso seco. ....	101

Figura 35. Fase lag de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco. ....	102
Figura 36. Velocidad específica de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco.....	103
Figura 37. Valor final de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco. ....	103
Figura 38. Fase lag de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco. ....	105
Figura 39. Máxima velocidad específica de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco.....	105
Figura 40. Valor final de la curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco. ....	106
Figura 41. Consumo de nitrógeno punto inicial y final del crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla a nivel de peso seco. JM: Jarabe sin FOS; FM: Jarabes con FOS; JMC: Control negativo jarabe sin FOS; FMC: Control negativo jarabe con FOS. ....	108
Figura 42. Consumo de nitrógeno punto inicial y final del crecimiento de <i>L. plantarum</i> en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol a nivel de peso seco. JT: Jarabe sin FOS; FT: Jarabe con FOS; JTC: Control negativo jarabe sin FOS; FTC: Control negativo jarabe con FOS. ....	108
Figura 43. Concentración inicial y final de sacarosa, glucosa y fructosa para jarabes provenientes de DO de mora de Castilla, durante el crecimiento de <i>L. plantarum</i> .....	109



Figura 44. Concentración inicial y final de sacarosa, glucosa y fructosa para jarabes provenientes de DO de tomate de árbol durante el crecimiento de <i>L. Plantarum</i> .....	110
Figura 45. Concentración inicial y final de kestosa, nistosa y FFN en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla. ....	111
Figura 46. Concentración inicial y final de kestosa, nistosa, FFN, sacarosa, glucosa y fructosa en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol.....	112
Figura 47. UFC/mL vs biomasa g/L obtenidos para el crecimiento de <i>L. plantarum</i> en los puntos de control de jarabes provenientes de OD de mora de Castilla sin y con FOS adicionado con Nitrógeno orgánico. ....	131
Figura 48. UFC/ml vs biomasa g/L obtenidos para el crecimiento de <i>L. plantarum</i> en los puntos de control de jarabes provenientes de OD de tomate de árbol sin y con FOS adicionado con Nitrógeno orgánico. ....	132

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Identificación molecular de <i>L. plantarum</i> .....	128
Anexo 2. Curva de calibración para determinación de Log(UFC/ml) en los jarabes provenientes de DO .....	130
Anexo 3. Recuento en placa para tiempos de control.....	131

## RESUMEN

En este proyecto se utilizó la bacteria ácido láctica *L. plantarum* aislada previamente de coliflor (*Brassica oleracea var. Botrytis*) (J. Serna, 2012), la cual demostró tener potencial probiótico, para evaluar su crecimiento en jarabes provenientes de la deshidratación osmótica de mora de Castilla (*Rugus glaucus*) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*) sin y con fructooligosacáridos (FOS) obtenidos por vía fermentativa utilizando *Aspergillus oryzae* aislado previamente y sobre los mismos jarabes. La caracterización de los FOS se realizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Para el cultivo se diluyeron los jarabes a 20°Brix, se adicionaron fuentes de nitrógeno orgánica (4g/L) e inorgánica (1 y 4 g/L), y a los jarabes sin FOS se les adicionó FOS comerciales en la misma concentración obtenida en los FOS por vía fermentativa; se hicieron inicialmente pruebas a nivel de microescala con el fin de escoger los jarabes en los cuales *L. plantarum* tuviera mejor crecimiento; posteriormente la evaluación de los mismos se realizó a nivel de biomasa como peso seco. Los resultados de estos ensayos permitieron seleccionar los jarabes adicionados con nitrógeno orgánico, los cuales arrojaron resultados de biomasa del orden de 3.4 g/L, correspondiente a  $1 \times 10^8$  UFC/mL para jarabes provenientes de la deshidratación osmótica (DO) de mora de Castilla y de 3 g/L, correspondiente a  $8 \times 10^7$  UFC/mL para jarabes provenientes de DO de tomate de árbol. Estos valores fueron aproximadamente 2g/L menos que la biomasa obtenida en el medio de control que fue caldo MRS. Se realizó posterior análisis de consumo de nitrógeno, mostrando que éste no tuvo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en ninguno de los dos jarabes evaluados. El análisis de consumo de FOS mostró que en los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla solo hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para los datos de nistosa y ninguna para los jarabes provenientes de DO de tomate de árbol. Las cinéticas de crecimiento determinadas a partir de la aplicación DMFit, la cual utiliza el modelo de Baranyi & Roberts (1994), permitieron observar las mayores

velocidades de crecimiento aproximadamente del orden de  $0.086\text{h}^{-1}$  en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla con FOS adicionados con nitrógeno orgánico y  $0.068\text{h}^{-1}$  en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol con FOS adicionados con nitrógeno orgánico también, estos valores para las evaluaciones a nivel microescala y a nivel de peso seco se obtuvieron velocidades de crecimiento aproximadamente del orden de  $0.2\text{ h}^{-1}$  en los dos jarabes evaluados. Estos resultados indican que los FOS obtenidos por vía fermentativa, especialmente los provenientes de jarabes de DO de mora de Castilla estimularon el crecimiento de la bacteria de estudio.

## ABSTRACT

In this project we used the lactic acid bacterium *L. plantarum* with probiotic potential (Serna, 2012), isolated from cauliflower (*Brassica oleracea var. Botrytis*). Microorganism growth was evaluated in syrups obtained by osmotic dehydration of Andes Berry (*Rugus glaucus*) and tamarillo (*Cyphomandra betacea*). Tests were done with and without fructooligosaccharides (FOS) obtained by fermentation of syrups, with *Aspergillus oryzae*. The characterization of FOS was performed by high performance liquid chromatography. For the microbiological culture, the syrups were diluted 20 ° Brix, organic nitrogen sources (4g/L) and inorganic (1 and 4 g/L) were added. Syrups without FOS commercial FOS were added at the same concentration of FOS by fermentation. Microscale level tests were made initially to choose which syrups generated greater growth of *L. plantarum*. Then the level of biomass dry weight was used to evaluate the syrups. The results of these tests were better in syrups with organic nitrogen. Biomass values of these syrups were: 3.4 g/L, corresponding to  $1 \times 10^8$  CFU / mL for syrups by osmotic dehydration (OD) of Andes Berry and 3 g/L, corresponding to  $8 \times 10^7$  CFU / mL, for OD syrups of Tamarillo. These values were approximately 2g/L less than the biomass obtained in the control medium (MRS broth). A nitrogen consumption analysis showed no significant difference ( $p > 0.05$ ) in either syrups evaluated. The FOS consumption analysis showed that there were significant differences ( $p < 0.05$ ) in the Andes Berry syrup only for nystose data. There was no significant difference in OD syrups of tamarillo. The growth kinetics were determined from DMFit application, which uses the model of Baranyi & Roberts (1994). Kinetic in microscale level showed the highest growth rates in OD syrups: Andes Berry with FOS added with organic nitrogen ( $0.086 \text{h}^{-1}$ ) and tamarillo with FOS added with organic nitrogen ( $0.068 \text{h}^{-1}$ ). The kinetics of growth at dry weight level showed growth rates of the order of  $0.2 \text{h}^{-1}$  in the two syrups evaluated. These results indicate that FOS obtained by

fermentation, especially from Andes berry OD syrups stimulated the growth of the bacteria of study.

## 1. INTRODUCCIÓN

La deshidratación osmótica (DO) es una operación de secado parcial que permite obtener productos mínimamente procesados de alta calidad organoléptica. Sin embargo, en la industria de procesamiento de frutas, la mayor desventaja para la industrialización de esta operación es el manejo de jarabes de sacarosa, los que son considerados como desechos de alto impacto ambiental.

Con el fin de valorizar estos residuos provenientes de la DO, y darle mayor viabilidad a la industrialización de la operación, en un estudio previo se evaluó la producción de fructooligosacáridos (FOS) a partir de jarabes obtenidos de la DO de frutas por vía fermentativa. Los resultados obtenidos demostraron la viabilidad en el proceso, ya que se lograron rendimientos de 58.51% en la producción de FOS , similares a los revisados en la bibliografía (Aachary & Prapulla, 2009).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son usadas en la industria de alimentos por su contribución significativa al sabor, olor, textura, características sensoriales y valor nutricional de los productos. Además, algunas de ellas llamadas probióticos ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedero. Por esta razón son utilizadas para la producción de alimentos funcionales previniendo y tratando trastornos gastrointestinales, intolerancia a la lactosa, modulación de la respuesta inmunitaria, valores de colesterol, entre otros.

Dado el potencial que tienen los FOS para propiciar el crecimiento de BAL, y con el fin de continuar con la valorización de los jarabes, se propuso mediante este proyecto estudiar el uso los jarabes ricos en FOS como medio de cultivo para el crecimiento de BAL.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el uso de soluciones con FOS obtenidas de un proceso fermentativo a partir de jarabes provenientes de la DO de frutas como medio de cultivo para BAL.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el efecto de los FOS obtenidos a partir de la DO de frutas sobre el crecimiento de las BAL.
- Evaluar el efecto de la adición de fuente de nitrógeno sobre el crecimiento de las BAL, en soluciones sin y con FOS obtenidas a partir de la DO de frutas.
- Evaluar el efecto de las frutas utilizadas para la DO y posterior producción de FOS sobre el crecimiento de las BAL.
- Modelar matemáticamente la cinética de crecimiento de las BAL en los medios de cultivo estudiados.



### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 CONSIDERACIONES TEÓRICAS DE LA DESHIDRATACIÓN OSMÓTICA DE FRUTAS**

La DO de alimentos, también llamada osmodeshidratación, se puede definir como una operación unitaria en la que existen flujos de materia simultáneos y en contracorriente a través de una membrana semipermeable, que en el caso de los alimentos que son en su mayoría tejidos vegetales o animales, son las membranas celulares (Chiralt & Talens, 2005; Torreggiani & Bertolo, 2001). Éstas actúan como membranas semipermeables permitiendo el paso de agua hacia el jarabe que lo circunda y que hace las veces de agente osmótico, cumpliendo así con los principios que rigen una operación de ósmosis. Debido a que la membrana celular no es perfectamente selectiva, otros compuestos también salen de la fruta en el proceso, este aspecto hace la operación de deshidratación osmótica importante no solo para eliminar agua, sino para obtener productos de mayor valor agregado presentes en el alimento, como componentes propios del sabor, color y aroma del alimento. En forma simultánea al flujo de agua y otros componentes hacia el medio osmodeshidratante, se presenta difusión de sólidos del jarabe hacia el alimento (García-Martínez, Martínez-Monzó, Camacho, & Martínez-Navarrete, 2002; Peiró, Dias, Camacho, & Martínez-Navarrete, 2006; Rastogi, Raghavarao, Niranjana, & Knorr, 2002; Valdez-Frugoso, Welte-Chancs, & Giroux, 1998).

Los elementos constitutivos de un sistema de osmodeshidratación son las soluciones osmóticas y los alimentos a deshidratar:

- Soluciones osmóticas (jarabes). Se utilizan soluciones de alta concentración en solutos que sean compatibles con los alimentos a deshidratar. Se ha estudiado el empleo de sacarosa, cloruro de sodio,

glucosa, fructosa, glicerol, etanol, entre otros (Djelveh, Gros, & Emam-Djomeh, 2001; Emam-Djomeh, Djelveh, & Gros, 2001; Ferrando & Spiess, 2001; Moreira, Chenlo, & Pereira, 2003; Sacchetti, Gianotti, & Rosa, 2001).

- Alimento. Normalmente se utilizan frutas con una estructura rígida que les permita conservar la forma durante y después del proceso de deshidratación. La estructura celular de una fruta se puede describir como una matriz sólida compuesta por las paredes y las membranas celulares, una fase líquida que es el contenido de las células y adicionalmente se consideran dos fases más: una líquida y otra gaseosa contenidas en los intersticios de la matriz de células. Algunos de estos fluidos, están compuestos principalmente de agua (Chiralt & Talens, 2005).

La relación más baja comúnmente utilizada en la deshidratación osmótica es 1:3 alimento:jarabe, esto quiere decir que por cada kilogramo de alimento deshidratado se obtendrán aproximadamente 3 kilogramos de jarabe residual.

### **3.2 CONSIDERACIONES TEÓRICAS DE LA PRODUCCIÓN DE FOS**

Los FOS son oligosacáridos de fructosa, producidos por la acción de la enzima FTasa presente en diferentes plantas y microorganismos. Los FOS se componen principalmente de 1-kestosa (GF2), nistosa (GF-3) y 1- $\beta$ -fructofuranosil nistosa (GF4), en el cual, las unidades de fructosil (F), están ambas en la posición  $\beta(2-1)$  de la molécula de sacarosa (GF) (Kaplan & Hutkins, 2000; Yun, 1996). Los FOS son obtenidos a nivel industrial por dos vías: por medio de un cultivo sumergido que utiliza como sustrato sacarosa y la transformación se logra con un hongo que posea producción de enzimas fructosiltransferasas; o a partir de inulina en un proceso enzimático (Bornet, Brouns, Tashiro, & Duvillier, 2002).

La producción de FOS en cultivo sumergido se puede representar en dos etapas: la primera donde se hace la producción de la biomasa o la enzima fructosiltransferasa (FTasa) a partir de diferentes tipos de microorganismos, y la segunda que es la producción de los FOS por la acción de la enzima fructosiltransferasa empleando una solución de sacarosa (Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2005; Sánchez, Guio, Garcia, Silva, & Caicedo, 2008; Yun, 1996). Adicionalmente los FOS también se pueden obtener mediante la hidrólisis de inulina empleando inulinasas.

La producción de la enzima fructosiltransferasa a nivel industrial se hace por cultivo sumergido, utilizando algunas cepas de hongos, como *Aureobasidium pullulans* y *Aspergillus niger*. Las condiciones de operación, para obtención de la enzima son: el pH de 5.5, la temperatura de aproximadamente 30 °C y la mejor fuente de carbono es la sacarosa, y las condiciones conocidas para la producción posterior de FOS a partir de la biomasa son: 18 h y un pH de mezcla de reacción de 5.15 (Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2005b; Koji Nishizawa, Nakajima, & Nabetani, 2001; Yun, 1996).

Para la caracterización de FOS se utiliza principalmente la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), normalmente realizada con detector de índice de refracción, se ha reportado el uso de diferentes tipos de columnas.

### **3.3 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS**

Las BAL son bacterias gram-positivas, anaerobias facultativas, catalasa negativa y no formadoras de esporas. Las funciones en la tecnología de alimentos son formación de sabor ácido, inhibición de organismos patógenos, gelificación de la leche, reducción del contenido de lactosa, formación de aroma, producción de gas

requerida para la formación de “ojos” en los quesos, también han sido muy utilizadas como probióticos (Parra Huertas, 2010).

Las BAL se clasifican según la fermentación de la lactosa en homofermentativas y heterofermentativas. Las homofermentativas como las *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, utilizan la ruta Embden-Meyerhoff para convertir glucosa en ácido láctico. Las heterofermentativas como las *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, producen cantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono y etanol (Parra Huertas, 2010) (Figura 1).

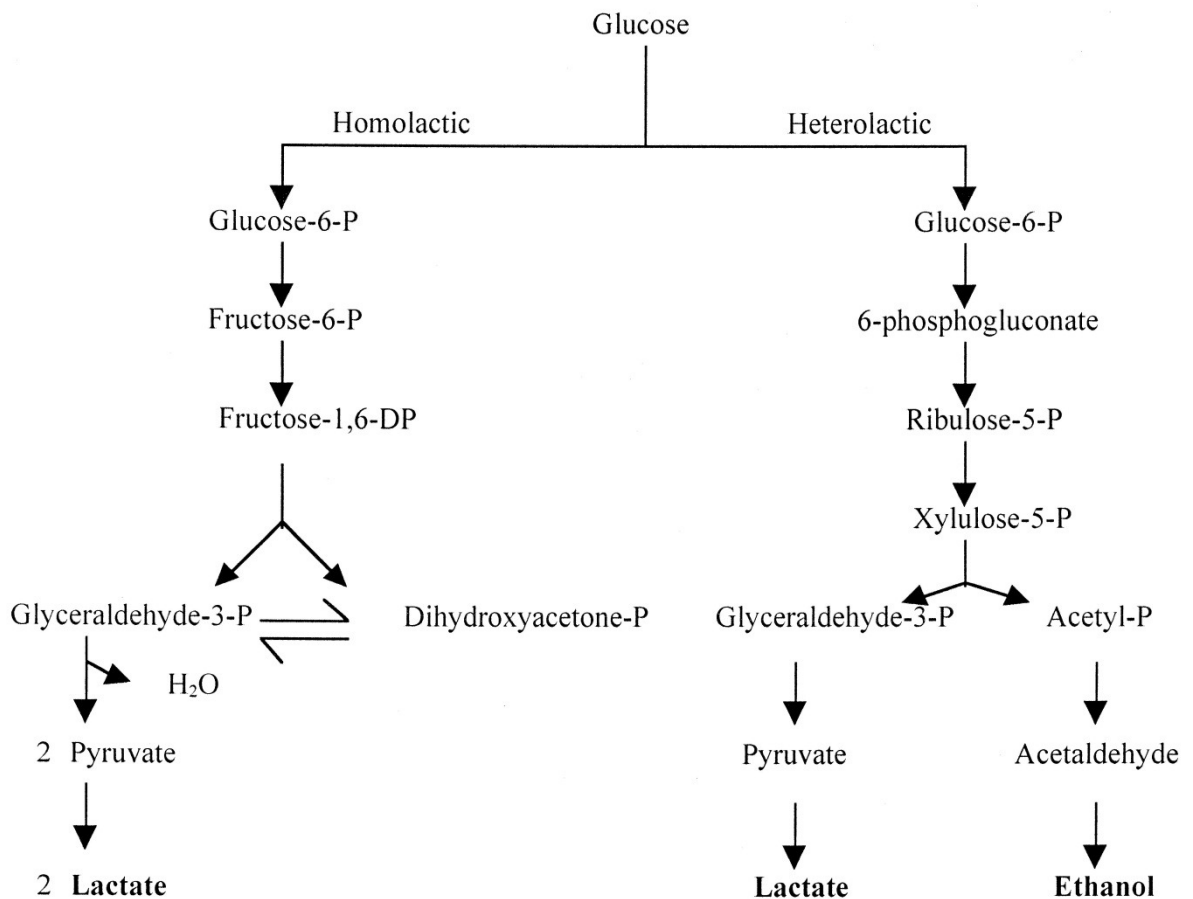


Figura 1. Rutas metabólicas de las BAL (Caplice & Fitzgerald, 1999)

Las BAL han sido utilizadas para la producción de probióticos que son suplementos dietarios microbianos, definidos por la FAO-OMS (2002) como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto beneficioso sobre el hospedero. Algunos de los efectos fisiológicos y características probióticas relacionadas con éstas bacterias son los siguientes (Parra Huertas, 2010):

Producción de ácido propiónico: esta fermentación la efectúan bacterias heterofermentativas utilizadas en quesería donde el ácido láctico es transformado en ácido propiónico y acético con desprendimiento de CO<sub>2</sub>.

Fermentación de ácido cítrico: esta fermentación la efectúan bacterias heterofermentativas, utilizadas en mantequillas y quesos, ya que transforman el ácido cítrico en productos aromatizantes como la acetoína y el diacetilo.

Producción de ácido láctico: es el más importante producido por estas bacterias. Es el primer ácido orgánico funcionalmente versátil producido biotecnológicamente teniendo un amplio rango de aplicaciones, como acidulante, inhibidor de esporas, en alimentos como dulces, pan, bebidas no alcohólicas, sopas, sorbetes, mayonesas y gelatinas.

Como características probióticas se destacan:

Sustancias antimicrobianas: producen componentes antimicrobianos los cuales inhiben el crecimiento de organismos esporádicos relevantes.

Peróxido de hidrógeno: es metabólicamente producido por el grupo de *Lactococcus* a través de la acción de NADH oxidasa la cual cataliza la oxidación de NADH por oxígeno molecular.

Bacteriocinas: la utilización de BAL y/o sus metabolitos para la preservación de alimentos es generalmente aceptado por consumidores como algo natural y promotores de salud.

El medio adecuado para el aislamiento y cultivo de bacterias ácido lácticas es Man Rogosa Sharpe que contiene los nutrientes, vitaminas, sales y carbohidratos necesarios para su crecimiento. El medio está constituido por peptona, extracto de levadura, extracto de carne, glucosa, acetato de sodio, tween 80, citrato de triamonio, fosfato dipotasio de hidrógeno, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso, (De Man, Rogosa, & Sharpe, 1960). A partir de estos componentes, se pueden derivar diferentes medios de cultivo dependiendo del estudio que se quiera realizar, como por ejemplo los estudios de Georgieva, Koleva, Nikolova, Yankov, & Danova (2009), que tomaron MRS sin extracto de carne y tween 80 y lo suplementaron con galactooligosacáridos y fructooligosacáridos, con el fin de determinar parámetros de crecimiento de una cepa probiótica de *Lactobacillus plantarum*, obteniendo buenos resultados.

### **3.4 MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA**

Como describe Zwietering & Den Besten (2010) el modelado en microbiología de los alimentos se basa en el desarrollo y uso de ecuaciones matemáticas para describir procesos biológicos, utilizados para describir fenómenos, diferencias cinéticas, correlaciones, entre otros.

Estos modelos se clasifican en primarios, secundarios y terciarios. Los primarios establecen el cambio en el número de microorganismos en el tiempo bajo ciertas condiciones ambientales. Los modelos secundarios establecen cambios en los parámetros de crecimiento frente a los factores ambientales y los modelos

terciarios incorporan tanto modelos primarios como secundarios y dada esta complejidad generalmente se desarrollan en sistemas de software.

Actualmente se encuentran aplicaciones disponibles como las que tiene [www.combase.cc](http://www.combase.cc), en la que se destaca el DMFit que ajusta el modelo de Baranyi & Roberts (1994), a los datos experimentales. Este modelo tiene cuatro parámetros principales que son valor inicial, fase de latencia, velocidad máxima específica de crecimiento y valor final. Este modelo se describe con la ecuación 1.

$$y(t) = y_0 + \mu_{m\acute{a}x} t + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \ln(e^{-v*t} + e^{-h_0} - e^{-v*t-h_0}) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{mt\mu_{m\acute{a}x} + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \ln(e^{-v*t} + e^{-h_0} - e^{-v*t-h_0})} - 1}{e^{m(y_{m\acute{a}x} - y_0)}} \right)$$

Ecuación 1. Modelo de Baranyi & Roberts (1994).

Donde  $y(t)$  es la concentración celular o el diámetro de las colonias,  $y_0$  es la concentración o diámetro inicial,  $\mu_{m\acute{a}x}$  velocidad específica de crecimiento  $h^{-1}$ ,  $m$  es un parámetro de curvatura para caracterizar la transición de la fase exponencial,  $v$  es un parámetro de curvatura para caracterizar la transición de la fase exponencial y  $h_0$  es un parámetro adimensional que cuantifica el estado fisiológico inicial de las células. De donde el tiempo de latencia  $h$  es calculado como  $h_0/\mu_{m\acute{a}x}$ .

## **4. ESTADO DEL ARTE**

### **4.1 ESTADO DE LA INVESTIGACIÓN EN DESHIDRATACIÓN OSMÓTICA**

Las primeras investigaciones reportadas acerca de la DO fueron las realizadas por Ponting y colaboradores en 1966 (Rastogi, Raghavarao, Niranjana & Knorr 2002), en muchas de estas investigaciones se demuestra el potencial de la técnica para ser utilizada industrialmente. Sin embargo, varios autores coinciden en que la restricción más importante en la implementación a nivel industrial de la deshidratación osmótica es el manejo de las soluciones osmodeshidratantes (García-Martínez, Martínez-Monzó J., Camacho M.M. & Martínez-Navarrete N., 2002; Rosa & Giroux, 2001; Torreggiani & Bertolo, 2001; Valdez-Frugoso A., Weltichans J. & Giroux F, 1998), entendiéndolo como la recirculación a la misma operación de osmodeshidratación, el envío como materia prima a otros procesos o su disposición final.

#### **4.1.1 Problemas relacionados con las soluciones osmodeshidratantes**

Al finalizar la operación de osmodeshidratación se obtiene una solución con menor concentración de sólidos solubles debido a la salida de agua del alimento y a la entrada de sólidos al mismo. Igualmente el jarabe se enriquece con otras sustancias que salen del alimento.

Como se mencionó anteriormente, García-Martínez et al. (2002) y Valdez-Frugoso et al. (1998) consideraron estos jarabes provenientes de la deshidratación osmótica como un residuo industrial, lo que hace que se dificulte la industrialización de la operación a gran escala. Sin embargo, Rosa & Giroux (2001) analizaron que los volúmenes y características de estas soluciones



dependen en gran parte de aspectos operacionales, dentro de los cuales sobresalen:

- Relación fruta/solución osmótica.
- Pérdida de solutos y partículas provenientes de la fruta.
- Conservación de la solución cuando no se está realizando el proceso de deshidratación osmótica.
- Determinación del punto final de uso.
- Disposición final de la solución osmótica.

#### **4.1.2 Alternativas de empleo de las soluciones osmóticas**

Una de las alternativas para reducir el volumen de las soluciones osmóticas y que se presenta atractiva en términos económicos y ambientales es la reutilización del jarabe en el proceso de osmodeshidratación durante un número de ciclos sin reconcentración previa. Algunos resultados obtenidos mediante esta alternativa se exponen a continuación:

García-Martínez et al. (2002) realizaron un estudio con soluciones osmóticas de sacarosa provenientes de la DO de kiwi. Se realizaron diez reutilizaciones de la solución osmótica sin realizar una reconcentración de la misma y se midieron variables como la actividad del agua, la concentración de sólidos solubles y el pH, sobre la fruta y el jarabe al inicio y al final de cada ensayo. Adicionalmente, se midieron la densidad y la viscosidad se realizaron pruebas microbiológicas a la solución osmótica. El estudio se realizó con tres relaciones fruta/solución osmótica (1/20, 1/10 y 1/5) y la fruta se deshidrató durante una hora en cada ciclo de uso

del jarabe. Como conclusión del estudio se obtuvo que el jarabe puede ser utilizado durante diez ciclos sin ser reconcentrado, obteniendo siempre una fruta con un nivel de actividad de agua similar, que no alteraba el color de ésta y no producía contaminación microbiológica apreciable. De otro lado, la relación fruta/jarabe no tuvo una incidencia apreciable en la reutilización de la solución y fue posible establecer relaciones matemáticas entre las propiedades del jarabe y el número de ciclos de uso. Sin embargo, en lo referente al grado de dilución de la solución, el cambio en la concentración tras su uso repetido si fue apreciable, lo que puede modificar la velocidad de deshidratación.

El objetivo del trabajo de Peiró et al. (2006), fue cuantificar la cantidad de micro nutrientes, como ácidos, minerales y pectinas, que se extraen en la deshidratación osmótica de toronja con jarabes de sacarosa reutilizados sin reconcentración previa del jarabe en cada ciclo. La relación fruta jarabe utilizada fue 1/5 y la DO se realizó durante 3 h, con pulso de vacío inicial. El jarabe se reutilizó durante ocho ciclos sin ningún tratamiento. Se detectaron, midiendo sobre la fruta directamente, pérdidas de ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido galacturónico, minerales como calcio, magnesio, potasio, sodio y fósforo. También se cuantificaron estas sustancias en el jarabe. Como resultado se obtuvo que el jarabe sufrió dilución durante el proceso, lo que afectó la cinética de deshidratación, la fruta obtenida mostró diferencias significativas en lo relativo a la humedad pero no se detectaron cambios apreciables sobre la actividad de agua, lo que permite concluir que el jarabe puede ser reutilizado durante ocho ciclos, bajo las condiciones del estudio, sin alterar la estabilidad del alimento deshidratado obtenido. Por último, se propone que puede ser utilizado en la formulación de otros productos una vez haya sido reutilizado.

De estas investigaciones se puede concluir que bajo las condiciones de experimentación, es factible realizar la reutilización del jarabe sin concentración

previa, sin afectar de manera significativa la condición de actividad de agua final del producto. Sin embargo, debe notarse que una relación fruta/jarabe elevada no beneficia el costo de la operación y causa una dilución significativa del jarabe, lo que a su vez disminuye la velocidad de deshidratación dificultando el control de la operación o la realización de otro ciclo de deshidratación. Dadas estas circunstancias se pueden determinar algunos usos finales de las soluciones osmóticas como son ingredientes para la producción de otros productos como jarabe para fruta en conserva, mermeladas, dilución con agua y adición de CO<sub>2</sub>, saborizantes y aromatizantes naturales para pastelería, alimento para animales entre otros (García-Martínez et al., 2002; Osorio et al., 2007; Ramos, Delgado, Bautista, Morales, & Duque, 2005; Rosa & Giroux, 2001).

Aachary y Prapulla (2009) proponen el uso de los jarabes de la DO de sacarosa para la producción de FOS. En este estudio se utilizaron jarabes de la deshidratación osmótica de zanahoria, obteniendo rendimientos entre el 51 y el 58%, lo que muestra esta alternativa como una forma promisorio de agregar valor a este residuo agroindustrial.

## **4.2 FRUCTOOLÓGOSACÁRIDOS (FOS): TENDENCIAS EN INVESTIGACIÓN**

Cada vez es más claro que existe una fuerte relación entre los alimentos que se consumen y la salud, por esta razón existe una demanda creciente de alimentos benéficos para la salud al igual que un aumento en el número de investigaciones en el desarrollo de los mismos. Los alimentos con un efecto benéfico para la salud adicional a su valor nutricional se denominan alimentos funcionales, el mercado de estos a nivel mundial alcanza los 33 billones de dólares anuales (Siró, Kápolna, Kápolna, & Lugasi, 2008). Dentro de los alimentos funcionales se encuentran

sustancias con propiedades prebióticas como los FOS, los que han llamado la atención de consumidores e investigadores.

La investigación acerca de FOS ha abarcado temas desde su producción hasta sus efectos en la salud humana. Una buena parte de la información que se genera alrededor de estos compuestos está consignada en diversas patentes alrededor del mundo. A partir del año 2000 se encuentran 1300 patentes, siendo el tema con mayor número la formulación de productos con FOS y el menor, la obtención de enzimas a partir de microorganismos modificados.

A continuación se presenta un breve resumen de la investigación respecto a los FOS. Primero se presentarán las formas de producción y los rendimientos obtenidos. En segundo lugar los microorganismos con los que se han obtenido, técnicas de análisis, y por último los efectos benéficos para la salud.

#### **4.2.1 Producción de FOS**

Con el fin de entender mejor los mecanismos de reacción en la obtención de FOS y pensando en tener posteriormente jarabes de FOS más fácilmente purificables, algunos estudios se han centrado en la separación y purificación de las enzimas FTasa, su producción se ha reportado a partir de diferentes fuentes como *Bacillus macerans* EG-6, *Acetobacter oxidans* J17-21 y *Aspergillus niger* ATCC 20611, entre otros (Hidaka, Hirayama, & Sumi, 1988; Park, Oh, & Yun, 2001). Se ha encontrado que dependiendo de la fuente a partir de la cual se separan las enzimas, varía el peso molecular, las condiciones óptimas para la actividad enzimática y las condiciones de estabilidad para cada grupo de enzimas, Sangeetha, Ramesh, & Prapulla (2005), presentaron un resumen de los resultados de algunas publicaciones donde se puede observar este comportamiento. En

general el peso molecular de las enzimas varía entre 66 kDa y 168 KDa, las condiciones de pH y temperatura que optimizan la actividad enzimática varían entre 4,5 y 7,0 y 30 a 60 °C respectivamente (Park et al., 2001). Una investigación reciente realizada por Ghazi et al. (2007), reporta la obtención de enzimas con actividad fructosiltransferasa a partir de *Aspergillus aculeatus*. La enzima tiene un peso molecular de 135 KDa, y unas condiciones óptimas de actividad enzimática en cuanto a pH entre 5.0 y 7.0 y de temperatura 60 °C.

Por otro lado, se han investigado diferentes tipos de reactores para la obtención de FOS, en este caso se destacan las investigaciones de Sánchez et al. (2008) en un reactor airlift agitado mecánicamente y la de Sheu, Duan, Cheng, Bi, & Chen, (2002), en un reactor con un sistema biocatalizador complejo equipado con un módulo de microfiltración. Este fue un proceso continuo iniciado por un proceso batch. Los resultados de la primera investigación muestran 70% de producción de FOS a partir de biomasa de *Aspergillus* sp. N74 y de la segunda 80% de producción de FOS a partir del sistema de micelios que utilizó *Aureobasidium pullulans* ATCC 9348 con actividad  $\beta$ -fructofuranosidasa y *Gluconobacter oxydans* ATCC 23771 con actividad glucosa deshidrogenasa.

En la revisión de Sangeetha et al. (2005) se indican estudios de rendimientos de FOS con base en la producción de 1-kestosa a partir de sacarosa de 43%. También se reportan investigaciones con rendimientos entre el 50% y el 60% en reactores por lotes. Algunas técnicas para aumentar este rendimiento se basan en la remoción de la glucosa liberada en la reacción, lo que se ha podido lograr por vía enzimática mediante la adición de enzimas como la glucosa oxidasa y la catalasa, lo que ha permitido llegar a rendimientos del 90% (Sheu, D, Lio, Chen, Lin, & Duan, 2001), y por el uso de biorreactores que incluyen un sistema de membranas que permite eliminar la glucosa y la sacarosa remanente del sistema. Por otro lado, se ha reportado que el uso de  $\beta$ -fructofuranosidasa y glucosa

oxidasa, permite obtener rendimientos del 98% en la producción de FOS (Yun, Lee, & Song, 1994).

#### 4.2.1.1 Tipos de fuentes de enzima fructosiltransferasas (FTasa)

Para la producción de FOS se han utilizado microorganismos que generan enzimas con actividad de transfructosilación, se han reportado tanto bacterias como hongos, sin embargo, la mayoría de microorganismos estudiados son hongos como *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Arthrobacter* y *Fusarium*, algunos de estos hongos se muestran en la Tabla 1 con el rendimiento encontrado con cada uno de ellos.

Tabla 1. Rendimientos reportados para la producción de FOS a partir de sacarosa

Microorganismo	Concentración inicial de sacarosa (g/L)	Rendimiento (%)	Referencia
<i>Aspergillus niger</i> AS 0023	500	54	L'Hocine et al. (2000)
<i>Penicillium citrinum</i>	700	55	Hayashi et al. (2000)
<i>Aspergillus japonicus</i>	400	61	Chien et al. 2001
<i>Aspergillus oryzae</i> CFR 202	600	58	Sangeetha et al. (2002)
<i>Aureobasidium pullulans</i> CFR 77	550	60	Sangeetha et al. (2004)
<i>Bacillus macerans</i> EG-6	500	33	Park et al. (2001)
<i>Zymomonasmobilis</i>	500–600	24–32	Bekeret al. (2002)

Fuente: tomado de Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides Sangeetha et al. (2005)

#### **4.2.1.2 Técnicas de caracterización**

La técnica más utilizada para la caracterización (identificación y cuantificación) de FOS ha sido la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Sin embargo, se encuentran descritas otras técnicas para identificación y cuantificación de FOS como la cromatografía en película delgada, cromatografía de gases acoplada a masas, la resonancia magnética nuclear y métodos de la A.O.A.C (Flamm, Glinsmann, Kritchevsky, Prosky, & Roberfroid, 2001; Sangeetha et al., 2005).

El método de cromatografía líquida se realiza frecuentemente con el detector de índice de refracción, se ha reportado el uso de diferentes tipos de columnas como Aminex, y Shodex, como en el trabajo de Sánchez et al., (2008), y se han utilizado como fases móviles, mezclas de acetonitrilo:agua, agua y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y agua desionizada. Los flujos de la fase móvil varían entre 0,6 y 1,5 mL/min y la temperatura entre 45 °C y 60 °C (Nishizawa, K, Nakajima, & Nabetani, 2000; Park et al., 2001; Sheu, D et al., 2001).

#### **4.2.1.3 Propiedades funcionales de los FOS**

Respecto a los efectos funcionales de los FOS, se han desarrollado varias investigaciones, donde los principales efectos descritos son: prebiótico, fibra dietaria, absorción de minerales, funciones en el sistema de defensa, en el metabolismo de lípidos, anticancerígeno, control de la diabetes. Sangeetha et al. (2005); y Siró et al. (2008) describieron algunos efectos a continuación:

Los prebióticos son ingredientes no digeribles que estimulan selectivamente el crecimiento y/o la actividad de bacterias benéficas en el tracto intestinal. Diferentes pruebas hechas con humanos, han demostrado que la ingesta de FOS

en cantidades de 5g/día promueve el crecimiento de bifidobacterias en el tracto intestinal.

La fibra dietaria es considerada como polisacáridos remanentes de células vegetales, que no son hidrolizables por las enzimas humanas. Se ha demostrado que los FOS son resistentes a las enzimas humanas y son excretados, esto hace que los FOS puedan ser identificados como fibra dietaria.

La fermentación de FOS hace que decrezca el pH en el colon, lo que facilita la absorción de calcio y magnesio por parte del intestino. Se ha encontrado que incrementando a la dieta alimenticia un 5% de FOS y 1% de calcio se previene la pérdida significativa del fémur y de las vértebras lumbares.

La mayoría de estudios que demuestran el efecto prebiótico mediante el estudio del metabolismo de *Bifidobacterias*. Durieux, Fournies, Jacobs, & Simon (2001) investigaron el efecto prebiótico de FOS mediante el estudio del metabolismo de dos tipos de Fructooligosacáridos Chicory sobre *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. angulatum*, obteniendo un alto contenido de biomasa. Rycroft, Jones, Gibson, & Rastall (2001) realizaron una evaluación comparativa de las propiedades de la fermentación de oligosacáridos prebióticos, monitoreando durante 24 horas bacterias intestinales predominantes, dando como resultado aumento en el número de *bifidobacterias* y disminución de clostridos. Perrin, Warchol, Grill, & Schneider, (2001) compararon el comportamiento fisiológico de *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 en cultivo con oligofructosa sintética y semi-sintético, las diferencias fueron determinadas. También observaron que la glucosa fue la preferida como sustrato para el crecimiento y producción de biomasa, mientras la fructosa fue la mejor para la producción de lactato y acetato. Con sacarosa, la producción de biomasa alcanzó el nivel obtenido con glucosa y tanto con FOS y fructosa más metabolitos fueron producidos. Shin, Lee, Pestka, &



Ustunol (2000) estudiaron dos cepas comerciales de *Bifidobacterium* spp cultivados anaeróbicamente y con diferentes concentraciones de FOS. El crecimiento y la actividad de los cultivos en presencia de FOS fueron determinados encontrando que son efectivas en estos medios.

#### **4.3 CRECIMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN MEDIOS CON FOS**

Aunque no hay estudios realizados sobre el crecimiento de BAL en medios como el preparado en el presente trabajo, hay estudios como el de Kaplan & Hutkins (2000) quienes estudiaron 28 cepas de BAL y bifidobacterias por su habilidad de fermentar FOS en agar MRS. Y encontraron que la glucosa y los FOS son buenos sustratos que permiten el crecimiento de las bacterias, además de encontrar que BAL son inmunomoduladoras, aumentan la resistencia a varios problemas de salud y aceleran la recuperación del tracto gastrointestinal. En el estudio de Muñoz, Mosquera, Alméciga-Díaz, Melendez, & Sánchez (2012), se caracterizó el efecto de los FOS en el crecimiento, la producción de ácidos láctico y acético y la actividad antimicrobiana de los extractos crudos obtenidos a partir de cepas de *Lactobacillus* aislados de maíz y melazas, mostrando la viabilidad de aumentar la actividad antimicrobiana de las cepas por la suplementación del medio de crecimiento con FOS.

Existen estudios realizados con diferentes matrices y diferentes microorganismos, los que se resumen en la tabla:

Tabla 2. Revisión bibliográfica de crecimiento de bacterias en medios con frutas y/o FOS y con potencial prebiótico

ITEM	MICROORGANISMOS	MEDIOS DE CULTIVO	ARTÍCULO	Referencia	CONDICIONES
1	<i>Lactobacilli y bifidobacteria</i>	Frutas frescas (manzana verde, kiwi, piña, pera y fresa), el jugo se neutralizó (pH) con NaOH. Se tomaron 180µL del jugo para utilizar	Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria	(Vinderola, Costa, Regenhardt, & Reinheimer, 2002)	Centrifugación a 6000rpm por 30min. Esterilización a 100 °C por 15min y congelados a -80 °C
2	<i>B. lactis</i>	Jugos comerciales. Ajustados a pH 3.5,4.5,5.5 Usando NaOH al 5N	Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices	(Sheehan, Ross, & Fitzgerald, 2007)	Almacenamiento a 4 °C
3	<i>Lactobacillus acidophilus-Lactobacillus fermentum-Lactobacillus plantarum-Lactobacillus reuteri</i>	Jugos comerciales. (piña, manzana, naranja, pera, uva, limón, mango, kiwi, fresa)	Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastrointestinal stresses	(Champagne & Gardner, 2008)	Almacenamiento a 4 °C
4	<i>Lactobacillus plantarum-L. delbrueckii-L.paracasei-L.acidophilus</i>	Jugo de granadilla concentrado 62 °Brix fue diluido a 20 °Brix con agua destilada y luego pasteurizada a 5min a 80 °C	Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria	(Mousavi, Mousavi, Razavi, Emam-Djomeh, & Kiani, 2010)	Almacenamiento a 4 °
5	<i>Lactobacillus acidophilus-Lactobacillus plantarum-Lactobacillus casei-Lactobacillus delbrueckii</i>	Jugo de tomate comercial	Probiotication of Tomato Juice by Lactic Acid Bacteria	(Yoon, Woodams, & Hang, 2004)	Almacenado a 4 °C
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Jugo de zanahoria:manzana (3:1) Inició con contenido de	Correlation of Some Substrate Parameters in Growing <i>Lactobacillus acidophilus</i> on Vegetable	(Nicolescu & Buruleanu, 2010)	—

ITEM	MICROORGANISMOS	MEDIOS DE CULTIVO	ARTÍCULO	Referencia	CONDICIONES
		azúcares reductores de 5,57g glucosa/100mL y en jugo de zanahoria:apio:manzana (6:1:2) el parámetro fue de 3.6g/100mL	and Fruit Cocktail Juices		
7	<i>Bifidobacterias</i>	Jugo de zanahoria puro Tabla 1. Azúcares 4.3 y 4.6% (w/v) además contiene 2% (w/v) de sucrosa, 1% (w/v) de glucosa y 0.8% (w/v) de fructosa.	Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected Bifidobacterium strains	(Kun, Rezessy-Szabó, Nguyen, & Hoschke, 2008)	—
8	<i>Salmonella entérica serotype Typhimurium</i>	Concentración de FOS 0,075%	In vitro anaerobic incubation of Salmonella enterica serotype Typhimurium and laying hen cecal bacteria in poultry feed substrates and a fructooligosaccharide prebiotic	(Donalson et al., 2007)	—
9	<i>Aureobasidium pullulans-Fusarium oxysporum</i>	Concentración de FOS 55% (w/w)	Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation, and application	(Yun, 1996)	—
10	<i>Lactobacillus gasseri-Lactobacillus fermentum</i>	Concentración de FOS Actilight (20g/L-2%)-FOS-AES (60%w/w)	Metabolism of prebiotic products containing b(2-1) fructan mixtures by two Lactobacillus strains	(Bañuelos et al., 2008)	—
11	<i>Bifidobacterias</i>	Concentración de FOS (2% w/w)	Carbohydrate source and Bifidobacteria influence the growth of <i>Clostridium perfringens</i> II' vivo and in vitro	(Kullen, Khil, Busta, Gallaher, & Brady, 1998).	—
12	<i>Bacillus subtilis</i>	Concentración de FOS (0.25-0.50%)	Interaction of dietary Bacillus subtilis and fructooligosaccharide on the	(Zhang et al., 2010)	—

ITEM	MICROORGANISMOS	MEDIOS DE CULTIVO	ARTÍCULO	Referencia	CONDICIONES
			growth performance, non-specific immunity of sea cucumber, <i>postichopus japonicus</i>		
13	<i>Bifidobacterias</i>	Investigaron efecto prebiótico de dos tipos de Chicory FOS (Fibruline Instant-Fibrulose F97)	Metabolism of chicory fructooligosaccharides by bifidobacteria	(Durieux et al., 2001)	Producción de biomasa alta con <i>B. infantis</i> (1.4 y 1.7 g peso seco L-1)
14	<i>Bifidobacterias-Lactobacillus</i>	Comparación de varios tipos de oligosacáridos para los diferentes tipos de bacterias	A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides	(Rycroft et al., 2001)	Los prebióticos aumentan el número de bifidobacterias y disminuye clostridios. Los fructooligosacáridos produce más lactobacilos
15	<i>Bifidobacterium infantis</i>	Comportamiento fisiológico en oligofructosa sintética (0.75% FOS)	Fermentations of fructooligosaccharides and their components by <i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium	(Perrin et al., 2001)	Utilización de hidratos de carbono como glucosa, fructosa, sacarosa y FOS. Glucosa contenida en FOS y la sacarosa podrían mantener el crecimiento y producción de células, mientras la fructosa podría permitir la producción de metabolitos principales

ITEM	MICROORGANISMOS	MEDIOS DE CULTIVO	ARTÍCULO	Referencia	CONDICIONES
16	<i>Bifidobacterias</i>	Fueron cultivadas en 12%(w/w) reconstituido con leche descremada en polvo conteniendo 0-0.5-1-3-5% (w/v) FOS, GOS y inulina	Growth and Viability of Commercial Bifidobacterium spp in Skim Milk Containing Oligosaccharides and Inulin	(Shin et al., 2000)	El crecimiento de las bacterias, el mejoramiento de la actividad y la viabilidad son altas cuando crecen en presencia de FOS seguido en un orden decreciente por GOS y la inulina
17	<i>Acido lácticas y bifidobacterias</i>	Se tomaron de 12 a 16 cepas de <i>Lactobacillus</i> y de 7 a 8 Bifidobacterias para fermentar FOS (FOS 2% en el medio MRS-40 INICIALMENTE%)	Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria	(Kaplan & Hutkins, 2000)	Suplemento con FOS incrementa las LAB, y se consideran inmunomoduladores
18	<i>Bifidobacteria y Lactobacillus</i>	Suplementar la dieta con FOS incrementa la capacidad metabólica y la densidad de las LAB mejorando la defensa del mecanismo, incrementando la resistencia a problemas de salud y disturbios en el tracto gastrointestinal	Prebiotic effects of inulin and oligofructose	(Koida, Tuohy, & Gibson, 2007)	—

De la revisión bibliográfica analizada en la tabla 2 se puede determinar que diferentes autores han trabajado con concentraciones de FOS de 0.25-0.50-0.75-2-55-60%, además de la utilización de jugos comerciales y jugos de frutas de 3.6-5.6 y 20° Brix como medios de cultivo principalmente para bacterias *Bifidobacterias* y ácido lácticas.

## 5. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, la industria de alimentos se ha visto obligada a crear nuevos productos que satisfagan los requerimientos de un consumidor cada vez más exigente y conocedor de las características de algunos componentes de los alimentos que los hacen saludables y previenen daños sobre la salud (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2006). Así como de un consumidor que quiere productos listos o de fácil cocción, que tengan las propiedades organolépticas, funcionales y nutricionales de los productos naturales. Estas nuevas tendencias llevan a los procesadores de alimentos a asumir un ritmo creciente de investigación en el campo del desarrollo de nuevos productos, que otorguen las características deseadas por los consumidores.

La deshidratación osmótica ofrece un soporte tecnológico adecuado para enfrentar las tendencias de consumo que se están estableciendo a nivel mundial, ya que ofrece la posibilidad de obtener productos funcionales, mínimamente procesados y de alta calidad organoléptica. Por lo tanto, los estudios sobre esta operación en alimentos y especialmente en fruta, son un tema de gran importancia para el país, por las posibilidades de ampliación de los mercados en el exterior de este tipo de productos (Ministerio de Industria Comercio y Turismo. & Nacional, 2005).

Una de las limitaciones para la utilización a nivel industrial de la DO de alimentos, en particular de frutas, es la utilización de los jarabes (también llamados soluciones osmóticas), ya que son considerados desechos de la operación, con una alta carga orgánica, lo que causa un alto impacto ambiental y aumenta el costo de los productos obtenidos por esta vía (Rosa & Giroux, 2001).

Las investigaciones realizadas en la caracterización de soluciones osmóticas han mostrado que éstas adquieren sustancias valiosas como sales, vitaminas,

azúcares, compuestos propios del aroma, color y sabor del alimento deshidratado, por lo que se hace atractivo el uso de estas soluciones en la formulación de nuevos productos enriquecidos (Osorio et al., 2007; Peiró et al., 2006). Adicionalmente al utilizarlas en otros procesos, se evitarían los costos relacionados con su disposición final.

Uno de los posibles usos de estos jarabes es en la producción de prebióticos como los FOS; éstos a su vez pueden ser utilizados como medios de cultivo para BAL como estimuladores del crecimiento de las mismas, reduciendo costos, ya que el medio utilizado para producirlas a nivel de laboratorio y a nivel industrial es medio MRS (Ramos Izquierdo, Bucio Galindo, Bautista Muñoz, Aranda Ibáñez, & Izquierdo Reyes, 2009; Serna Cock & Rodríguez de Stouvenel, 2005; Vargas, Gómez, Parra, & Romero, 2004), el cuál por estar enriquecido con compuestos selectivos, lo hace costoso.

Si se quiere reemplazar el medio MRS, el cual contiene fuente de nitrógeno (4g/L), es necesario investigar esta variable en los jarabes con FOS que se utilizarán como medio de cultivo.

La combinación de fructooligosacáridos y bacterias con potencial probiótico, podría ser evaluada a futuro como una matriz para formular alimentos simbióticos.

Adicionalmente, resulta de utilidad realizar el modelamiento matemático de las curvas de crecimiento para establecer parámetros cinéticos de importancia para futuros desarrollos como el diseño de biorreactores y/o determinación de parámetros operativos de la producción de las BAL en este tipo de medios de cultivo.

El propósito de este trabajo fue evaluar el crecimiento de BAL con potencial probiótico en soluciones ricas en fructooligosacáridos obtenidas por vía fermentativa a partir de jarabes provenientes de la deshidratación osmótica de frutas.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 PREPARACIÓN DE JARABES

#### 6.1.1 Deshidratación osmótica

Se utilizó mora de Castilla (*Rubus glaucus*) y tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), que se adquirieron en mercados locales y se mantuvieron a 4 °C hasta su uso. El tomate de árbol se limpió y se cortó en rodajas mientras que la mora de castilla se limpió y se utilizó completa.

La solución osmótica utilizada fue de 60° Brix de concentración inicial preparada con agua destilada y sacarosa comercial. La concentración se revisó por refractometría (Polskie Zalady Optyczne PZO).

Las frutas fueron sumergidas en la solución osmótica en Erlenmeyer de 500 mL y deshidratadas durante 3 h a temperatura controlada de 20 °C en un baño termostático, con una relación de 1:4 fruta-jarabe (100g de fruta) (Muñiz Becerá, García Pereira, Calderín García, & Hernández Gómez, 2011; Pimentel et al., 2010). Los ensayos se realizaron por triplicado. Al finalizar el tiempo, se retiró la fruta de la solución, se secó suavemente con papel secante y se determinaron grados Brix y humedad de la fruta (AOAC 925.10 1990). Al jarabe resultante se le midieron el pH (pH-metro marca Denver) y los grados Brix mediante refractometría. El jarabe se utilizó tres veces, siendo reconcentrado con sacarosa en cada ciclo, utilizando fruta fresca y manteniendo las condiciones de osmodeshidratación previamente descritas.

Mediante las ecuaciones de Berinstain (Azuara, Beristain, & Guti, 1998) se determinó el cálculo de la pérdida de agua (ecuaciones 2, 3, 4) y la ganancia de sólidos (ecuaciones 5, 6, 7).

$$W_i = H_i * m_{if}$$

Ecuación 2. Determinación de contenido inicial de agua

$$W_f = H_f * m_{ff}$$

Ecuación 3. Determinación de contenido final de agua

$$(W_i) - (W_f) = \Delta W$$

Ecuación 4. Determinación de pérdida de agua

$$ST_i = m_{if} * (1 - \%H_i)$$

Ecuación 5. Determinación de sólidos totales iniciales

$$ST_f = m_{ff} * (1 - \%H_f)$$

Ecuación 6. Determinación de sólidos totales finales

$$(ST_f) - (ST_i) = \Delta S$$

Ecuación 7. Determinación de ganancia de sólidos

Donde:

$W_i$ =Agua contenida inicial (g)

$H_i$ =Humedad inicial (%)

$m_{if}$ = masa inicial fruta (g)

$W_f$ = Agua contenida final (g)

$H_f$ = Humedad final (%)

$m_{ff}$ = masa final fruta (g)

$\Delta W$ = Pérdida de agua (g)

$ST_i$ = Sólidos totales iniciales (g)

$ST_f$ = Sólidos totales finales (g)

$\%H_i$ = Porcentaje de humedad inicial

$\%H_f$ = Porcentaje de humedad final

$\Delta S$ = Ganancia de sólidos (g)

Para determinar si habían diferencias entre los ciclos de reuso de los jarabes deshidratados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el software minitab 15 (Minitab®, Minitab Inc.).

Posteriormente se realizó un lote de 2L de jarabes de DO para la producción de los FOS tanto con Mora de castilla (*Rubus glaucus*) como con tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), como se describió anteriormente y con un solo ciclo de deshidratación.

## **6.1.2 Preparación de fructooligosacáridos**

### **6.1.2.1 Preparación e inoculación del microorganismo**

La producción de FOS se realizó siguiendo la metodología descrita por Sánchez et al. (2008). Se utilizó *Aspergillus oryzae* N74 aislado en un estudio previo del bagazo de caña de azúcar. La cepa fue sembrada en agar extracto de malta (MEA) en caja por 7 días a 30 °C hasta la formación de esporas. La suspensión de las esporas fueron preparadas a partir del raspado del cultivo en MEA con solución tensoactiva esterilizada y se diluyó con agua destilada a una concentración aproximada de  $1 \times 10^7$  esporas mL<sup>-1</sup>. Las suspensiones de esporas fueron almacenadas a  $-20 \pm 1$  °C.

La biomasa de *A. oryzae* N74 fue preparada en un Erlenmeyer de 250 mL el cual contenía 100mL de medio de (11% sacarosa, 0.84% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), 0.102% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Merck), 0.088% KCl (Merck), 0.007% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Merck),

0.085%  $\text{NaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck), 2.0% extracto de levadura (Oxoid), 0.136%  $\text{CaCO}_3$  (Merck), ajustado a pH  $5.5 \pm 0.1$  con  $\text{HNO}_3$ ) (Sánchez et al., 2008). El medio de cultivo fue inoculado con 1 mL de suspensión de esporas, e incubado por 48 h a  $30 \pm 1$  °C y 200 rpm (Brandstedt, Lab Line Max<sup>Q</sup>™ 7000). La biomasa del hongo fue recogida luego de filtración utilizando papel de filtro (Whatman No. 2). El resultado de la biomasa fue lavado y filtrado varias veces con buffer de fosfato esterilizado (50 mM, pH 5.5) para remover el medio de cultivo residual y luego este material se secó por 48 h a 105 °C.

#### **6.1.2.2 Producción de FOS**

Los jarabes obtenidos de la DO de frutas, como se describe en el numeral 6.1.1 y con un ciclo de deshidratación fueron utilizados como sustrato para la producción de FOS por vía fermentación.

Se tuvieron en cuenta las condiciones de operación descritas por Sánchez et al. (2008). Se agregó el jarabe y la biomasa correspondiente en un biorreactor de capacidad de 2 L con agitación constante. Las condiciones de operación fueron pH 5.5, la temperatura de 60 °C, el tiempo de reacción de 7 h para el jarabe proveniente de la DO de mora y 6 h para el jarabe proveniente de la DO de tomate de árbol.

#### **6.1.2.3 Determinación del perfil de FOS**

El análisis de carbohidratos durante la producción de FOS se realizó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Se utilizaron como estándares

para HPLC 1-kestosa, nistosa, y 1- $\beta$ -fructofuranosil nistosa adquiridos en Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japón).

El equipo de HPLC (LaChrom Elite<sup>®</sup>, Merck) tenía una bomba L-2130 con desgasificador en línea, un detector de índice de refracción L-2490, y un muestreador automático L-2200. La columna CarboSep CHO 411 fue usada para la identificación y cuantificación de carbohidratos. Las condiciones de cromatografía fueron: la temperatura de la columna fue de 85°C, la fase móvil fue agua a una velocidad de 0.4 cm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup>, y detector de índice de refracción a 40°C.

Las muestras para el análisis de los carbohidratos fueron tomadas cada hora durante la fermentación y se mantuvieron en agua hirviendo por 15min para detenerla. La producción final de FOS fue expresada como la concentración de nistosa, kestosa y fructofuranosil nistosa (FFN) (Sánchez et al., 2008).

## **6.2 EVALUACIÓN A MICROESCALA DEL CRECIMIENTO DE *L. plantarum* EN JARABES RICOS EN FOS OBTENIDOS POR VÍA FERMENTATIVA**

### **6.2.1 Preparación del inóculo**

La BAL utilizada en el presente estudio fue *Lactobacillus plantarum*, la cual fue aislada previamente de coliflor (*Brassica oleracea var. Botrytis*) e identificada molecularmente (anexo 1), en estudios previos (Serna, 2012). En el estudio de Serna 2012, esta bacteria fue sometida a pruebas *in vitro* según describe la FAO-OMS (2002) para evaluar el potencial probiótico, y posteriormente fue probada en la elaboración de jugos de fruta, obteniendo buenos resultados debido al alto potencial probiótico encontrado.

La *L. plantarum* estaba en la colección de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de la Sabana en el laboratorio de nuevas tecnologías en un cryovial con nombre VANG LAC1. Se realizó la activación de ésta tomando dos perlas del cryovial (CRYOBANK®) en 10 mL de caldo MRS (Man Rogosa y Sharpe) y se incubó a 37°C durante 24 h. Posteriormente se realizó un subcultivo pasando 100µL del cultivo activo a otro tubo con 10 ml de caldo MRS, que se incubó a 37°C durante 24 h. Se realizaron tres ensayos independientes con tres repeticiones cada uno.

### **6.2.2 Preparación de jarabes como medio de cultivo de bacterias ácido lácticas**

En las tablas 3 y 4 se muestran los jarabes utilizados para la inoculación con *L. plantarum*, los cuales fueron diluídos hasta 20°Brix (Mousavi et al., 2010) con agua destilada estéril, se les ajustó el pH a 5.5 y se filtraron. Los jarabes que fueron enriquecidos con FOS comerciales se agregaron en la misma concentración que la obtenida para los FOS producidos por vía fermentativa. Cada jarabe se inoculó por triplicado para cada uno de los ensayos independientes.

Todos los jarabes tuvieron control negativo y el control positivo fue el crecimiento de la BAL en medio MRS.

Las fuentes de nitrógeno utilizadas fueron:

Extracto de levadura (4g/L) (Fuente de nitrógeno en el agar MRS)

Cloruro de amonio (1g/L) (Vargas, Gómez, Parra, & Romero) y (4g/L) (La misma concentración que la fuente de nitrógeno orgánico o extracto de levadura)

Tabla 3. Jarabes para inoculación a microescala

FRUTA	MEDIOS PARA INOCULAR
Mora	Jarabe sin FOS
	Jarabe con FOS
	Jarabe sin FOS enriquecido con FOS Comercial
Tomate	Jarabe sin FOS
	Jarabe con FOS
	Jarabe sin FOS enriquecido con FOS Comercial

Tabla 4. Jarabes adionados con fuentes de nitrógeno para inoculación a microescala

FRUTA	MEDIOS PARA INOCULAR
Mora	Jarabe sin FOS nitrógeno orgánico 4g/L
	Jarabe sin FOS nitrógeno inorgánico 1g/L
	Jarabe sin FOS nitrógeno inorgánico 4g/L
	Jarabe con FOS nitrógeno orgánico 4g/L
	Jarabe con FOS nitrógeno inorgánico 1g/L
	Jarabe con FOS nitrógeno inorgánico 4g/L
Tomate	Jarabe sin FOS nitrógeno orgánico 4g/L
	Jarabe sin FOS nitrógeno inorgánico 1g/L
	Jarabe sin FOS nitrógeno inorgánico 4g/L
	Jarabe con FOS nitrógeno orgánico 4g/L
	Jarabe con FOS nitrógeno inorgánico 1g/L
	Jarabe con FOS nitrógeno inorgánico 4g/L

### 6.2.3 Siembra a microescala

Para la inoculación de los jarabes se realizaron previamente diluciones seriadas a los subcultivos posteriores a las activaciones de la bacteria con solución salina al 0.85% (Figura 1).

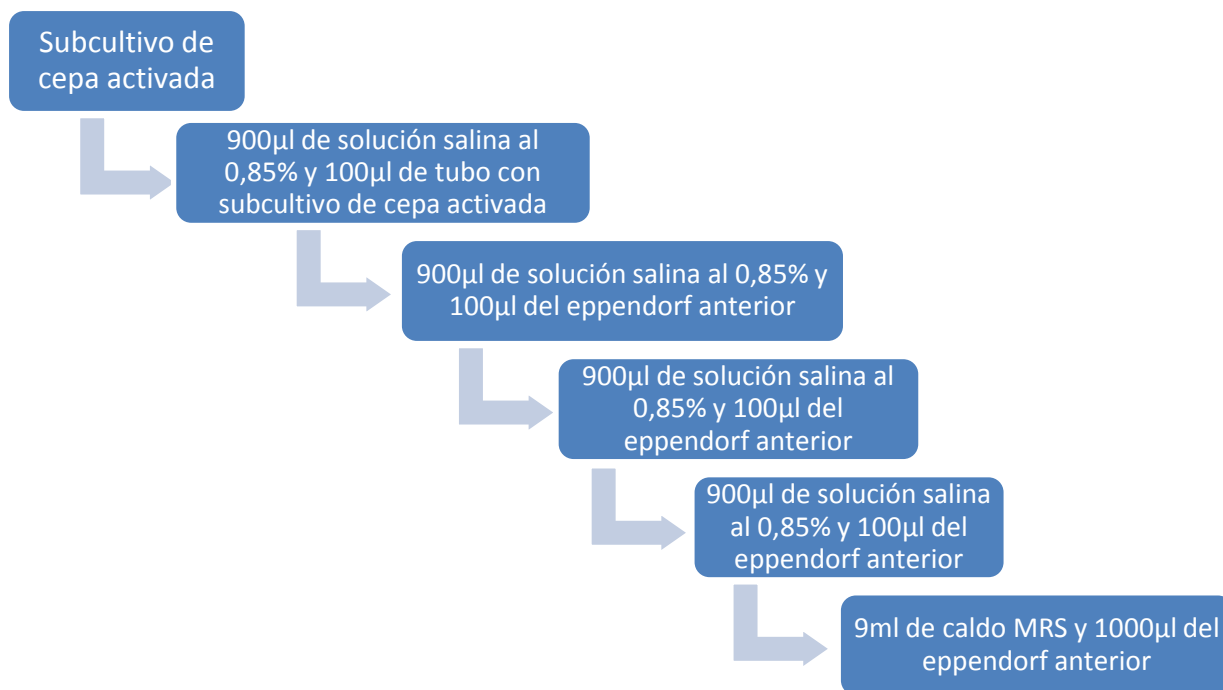


Figura 2. Diluciones seriadas

Con el fin de determinar la curva de crecimiento de *L. plantarum* en los jarabes descritos en las tablas 3 y 4, se tomaron 30µL del tubo final de las diluciones para inocular con 270µL del respectivo jarabe en cada uno de los pozos del Bioscreen C Analyzer (Growth curve USA®), esto para los ensayos independientes y por triplicado. El equipo se programó a 37°C durante 53 horas, realizando lecturas cada 30 min con filtro de amplio espectro 420-580nm.

#### 6.2.4 Correlación de los valores obtenidos de densidad óptica con recuento en placa de *L. plantarum*

Además de observar la viabilidad de los jarabes en el Bioscreen C Analyzer se realizó una correlación entre los valores de densidad óptica y recuento en placa del crecimiento de *L. plantarum*.



Se realizó la activación de la BAL como se describe en el numeral 6.2.1, posteriormente se centrifugó el medio y teniendo en cuenta la metodología que describe Dalgaard & Koutsoumanis (2001) el pellet obtenido fue diluído con solución salina al 0.85% con peptona al 0.1%. Se iniciaron mediciones de absorbancia a 540nm en el espectofotómetro Genesys 10S UV-Vis. Para cada muestra se realizaron recuentos en caja adaptándolas a cuartos e inoculando en cada uno de ellos 20  $\mu$ L de muestra. Las cajas se incubaron por 24 h a 37°C y se realizó el conteo manual de las colonias individuales. A partir de este conteo y sin tener en cuenta los cuartos de caja inferiores a 5 UFC se hallaron los Log(UFC/mL) y se graficaron vs. la densidad óptica.

#### **6.2.5 Efecto de la adición de FOS comerciales**

Para evaluar el efecto de la adición de FOS comerciales en caldo MRS en el crecimiento de *L. plantarum* se realizó la respectiva activación como se describe en el numeral 6.2.1 y se preparó el caldo MRS para ser adicionado con 7 diferentes g/L de FOS comerciales 0.05, 0.2, 3, 8, 20 g/L revisadas en la literatura (Ramírez Higuera, 2009; Yang, Prasad, Xie, Lin, & Jiang, 2011) y en la misma concentración de los FOS obtenidos por vía fermentativa 176.87, 246.75 g/L. Para esta evaluación se utilizó el Bioscreen C analyzer agregando de cada medio 270 $\mu$ L y 30 $\mu$ L de inóculo en cada pozo del microplato.

### **6.3 DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO MEDIANTE LA TÉCNICA DE PESO SECO DE *L. plantarum* EN JARABES CON FOS Y SIN FOS ADICIONADO CON NITRÓGENO ORGÁNICO CON RESPECTO AL TIEMPO**

Las curvas de crecimiento se realizaron en los jarabes sin y con FOS tanto para mora de Castilla como para tomate de árbol y enriquecidos con nitrógeno orgánico o extracto de levadura, con tres ensayos independientes y teniendo diez puntos de muestreo.

El inóculo se preparó como se describe en el numeral 6.2.1.

En tubos falcon se agregaron separadamente 9.9 mL de cada uno de los jarabes a analizar, se inocularon con 0.1 mL de cultivo bacteriano y se incubaron a 37°C. Esto con el fin de iniciar con una población bacteriana aproximadamente de  $1 \times 10^3$  UFC/mL.

En la tabla 5 se describe los puntos de muestreo teniendo en cuenta que la experimentación se realizó por triplicado, éste correspondiente a las tres activaciones independientes de *L. plantarum*.

Tabla 5. Horas de muestreo para curva de crecimiento de *L. plantarum*

HORAS DE MUESTREO	MUESTRA			
	Jarabe Tomate de árbol con FOS y sin FOS y nitrógeno orgánico		Jarabe Mora de Castilla con FOS y sin FOS y nitrógeno orgánico	
	0	Control negativo y recuento en caja	0	Control negativo y recuento en caja
	4		4	
	7	Control negativo	7	Control negativo
	10		10	
	14	Recuento en caja	14	Recuento en caja
	20	Control negativo	20	Control negativo
	24		24	
	33		33	
	39		39	
	44	Control negativo y recuento en caja	44	Control negativo y recuento en caja

En cada hora de muestreo se centrifugaba el jarabe por 15 minutos a 8910g, el sobrenadante se congeló y la biomasa que quedaba en el tubo falcon se secó a 70°C hasta peso constante controlando el peso con una balanza analítica.

### 6.3.1 Recuento en placa para tiempos de control

Se realizaron los recuentos en caja en los puntos de muestreo establecidos. Estos se hicieron en agar MRS mediante el uso de diluciones seriadas en solución salina al 0.85%, adaptado a cajas divididas en cuartos e inoculando en cada uno de ellos

20  $\mu$ L de muestra. Las cajas se incubaron por 24 h a 37°C y se realizó el conteo manual de las colonias individuales, considerando los cuartos de caja con menos de 100 unidades formadoras de colonia se hallaron los Log(UFC/mL) y se graficaron para observar las concentraciones de los jarabes.

### **6.3.2 Determinación de consumo de nitrógeno**

La determinación de consumo de nitrógeno se realizó por el método Kjeldahl (AOAC 955.04 1990), para los sobrenadantes de los puntos de muestreo iniciales y finales para cada ensayo independiente. Para observar este consumo se hallaron las desviaciones estándar y también un análisis de varianza (ANOVA) con el software MINITAB 15 (Minitab®, Minitab Inc.).

### **6.3.3 Determinación del consumo de FOS**

La determinación del perfil de consumo de 1-kestosa, nistosa, fructofuranosil nistosa, sacarosa, fructosa y glucosa se realizó por HPLC para los sobrenadantes de los puntos de muestreo iniciales y finales, de acuerdo con la metodología descrita en el numeral 6.1.2.3.

### **6.3.4 Determinación de las cinéticas de crecimiento microbiano**

Para modelar las curvas de crecimiento, tanto las obtenidas a microescala como las obtenidas con peso seco, se utilizó la aplicación DMFit que se encuentra en <http://www.combase.cc/index.php/en/>, la cual ajusta el modelo de Baranyi & Roberts (1994) a los datos experimentales.

## 7. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 7.1 RESULTADOS DE LA PREPARACIÓN DE JARABES

#### 7.1.1 Deshidratación osmótica

La DO se realizó como se describió en el numeral 6.1.1. Los jarabes obtenidos de la deshidratación osmótica tanto en el primer ciclo de uso, como en los subsiguientes ciclos, tomaron la coloración y aroma de las frutas respectivas, siendo este efecto mayor en el segundo y tercer ciclo de uso. Esto indica, como se refiere en la literatura (García-Martínez et al., 2002; Peiró et al., 2006), que hubo una salida importante de compuestos diferentes al agua durante la deshidratación osmótica, desde la fruta al jarabe. Este comportamiento también es referido por Osorio et al. (2007) para las mismas frutas, sin embargo en este estudio no se realizó reconcentración del jarabe para el reuso.

Los resultados obtenidos para DO con tres ciclos de reuso y con reconcentración de sacarosa, tenían como fin verificar si habían entre ellos diferencias significativas en los parámetros como la pérdida de agua y la ganancia de sólidos. La tabla 6 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 6. Datos de DO obtenidos para mora de Castilla y tomate de árbol

Ciclo OD	Jarabe Mora de Castilla				Jarabe Tomate de Árbol			
	Pérdida de agua (g)	Ganancia de sólidos (g)	pH inicial	pH final	Pérdida de agua (g)	Ganancia de sólidos (g)	pH inicial	pH final
1	24.59±2.92	7.39±3.19	6.41±0.20	3.15±0.05	31.84±5.05	8.98±1.80	6.43±0.12	4.15±0.09
2	20.62±4.01	7.52±3.97	3.34±0.13	3.28±0.12	30.95±0.60	7.95±0.94	4.17±0.15	4.12±0.14
3	21.92±10.62	3.42±2.31	3.20±0.11	3.17±0.11	30.73±2.00	8.77±1.69	4.08±0.08	4.02±0.11

Para ninguna de las dos frutas se encontró que el reuso del jarabe después de reconcentrarlo presentara una diferencia significativa entre los ciclos (ANOVA  $p > 0.05$ ), al igual que para el pH a pesar que muestra una ligera disminución entre ciclos, pero esto se debe a que cada vez se utiliza fruta fresca y sigue el intercambio de sólidos solubles. Este comportamiento indicaría que el restaurar el gradiente de concentración de sólidos solubles mediante la adición de sacarosa, por lo menos hasta un tercer ciclo, hace que no se genere diferencia en la cantidad de agua que pierden, tanto la mora como el tomate, y se tiene el mismo comportamiento para la ganancia de sólidos. Estos resultados no pueden ser comparados con los estudios de reuso publicados ya que en la mayoría de estos estudios no se hace reconcentración del jarabe o se han realizado con otras frutas.

En los resultados previos del proyecto de investigación en el cual se enmarca este trabajo de grado, se encontró adicionalmente que el rendimiento de la producción de FOS no se ve afectado significativamente ( $p > 0.05$ ) por el reuso de los jarabes, es decir, se encuentra el mismo rendimiento en producción de FOS en un jarabe utilizado en el primer ciclo respecto al alcanzado en un jarabe utilizado durante tres ciclos. Con base en este resultado, para continuar con la producción de FOS a partir de los jarabes provenientes de la DO, se decidió realizar un lote de jarabe con un solo ciclo de uso.

### **7.1.2 Producción de fructooligosacáridos (FOS)**

La obtención de FOS a partir de los jarabes de DO se realizó de acuerdo con la metodología descrita en el numeral 6.1.2.

En las figuras 3 y 4 se muestran los perfiles de producción de FOS: GF4 Fructofuranosil nistosa (FFN), GF3 nistosa y GF2 kestosa, al igual que los perfiles de GF sacarosa, G glucosa y F fructosa durante las 7 h de fermentación.

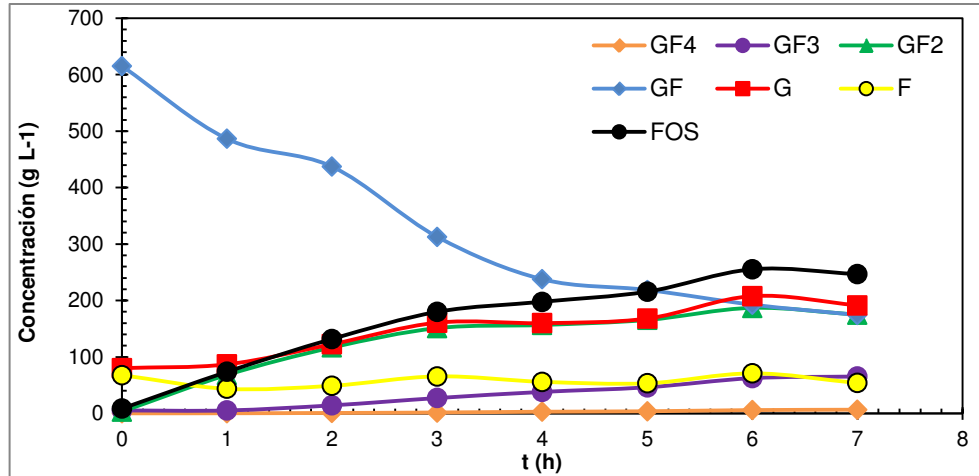


Figura 3. Perfiles de reacción de obtención de FOS en los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla. GF4: FFN, GF3: nistosa, GF2: kestosa, GF: sacarosa, G: glucosa, F: fructosa

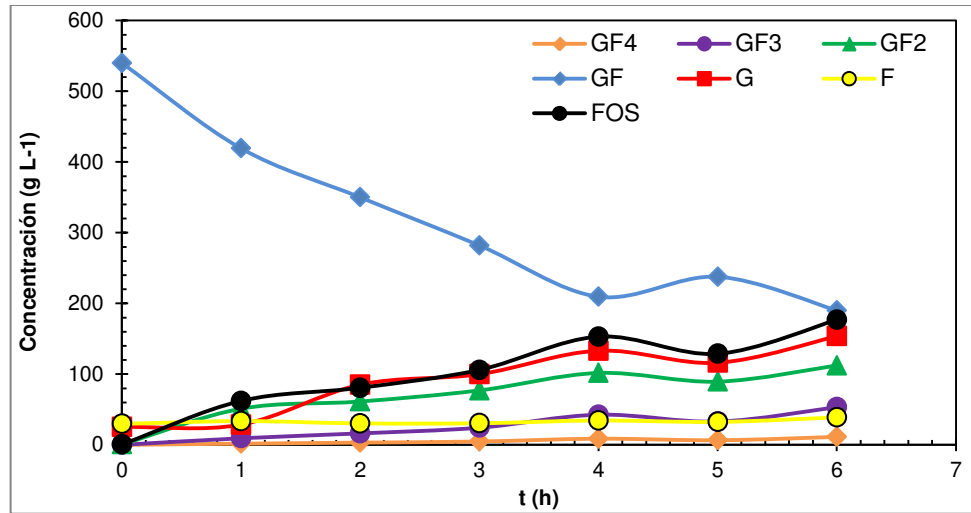


Figura 4. Perfiles de reacción de obtención de FOS en los jarabes provenientes de DO de tomate de árbol. GF4: FFN, GF3: nistosa, GF2: kestosa, GF: sacarosa, G: glucosa, F: fructosa

Puede observarse de las figuras 3 y 4 que la producción de FOS aumenta con el tiempo de la fermentación. Al final de las fermentaciones (7 h para el jarabe de mora y 6 para el jarabe de tomate de árbol), se obtuvo una producción de FOS de 246.75 g/L y 176.87 g/L respectivamente. Estas concentraciones son aproximadamente 28% más bajas respecto a lo reportado por Sánchez et al. (2008), quién produjo FOS en condiciones similares a la del presente estudio con jarabes de sacarosa. Esta disminución puede ser explicada por el menor tiempo de reacción y la menor concentración de sacarosa inicial empleadas.

También se puede observar que las mayores concentraciones para los fructooligosacáridos obtenidos son las correspondientes a kestosa 26% y 20%, seguidos por la nistosa 9.8% y 9.5% y la FFN 0.98% y 2%, tanto para el jarabe de mora como para el de tomate de árbol respectivamente. Estos perfiles son aproximadamente 17% menores a los obtenidos en estudios con jarabes de sacarosa (Sánchez et al., 2008), y pueden ser explicados por los mismos factores mencionados anteriormente.

## **7.2 EVALUACION DEL USO DE JARABES COMO MEDIO DE CULTIVO DE *L. plantarum***

### **7.2.1 Efecto de los FOS sobre el crecimiento de *L. plantarum* a microescala**

Para evaluar el efecto de los FOS obtenidos sobre el crecimiento de *L. plantarum* se hicieron las inoculaciones en los jarabes obtenidos (ver tabla 3) y se utilizó el Bioscreen como se describió en el numeral 6.2.3.

Las figuras 5 y 6 muestran las curvas de crecimiento de *L. plantarum* en los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla y tomate de árbol con FOS



provenientes del proceso fermentativo, sin FOS y adicionados con FOS comerciales, todos con sus respectivos controles negativos y caldo MRS como control positivo. Para ambos jarabes estas curvas tuvieron 53 h de crecimiento presentando tres fases: la fase lag, la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria. La fase lag tiene una duración aproximada de 10 h para todos los jarabes; la fase exponencial oscila entre 10 y 30 h; y la fase estacionaria, la cual es alcanzada en promedio a la hora 33.

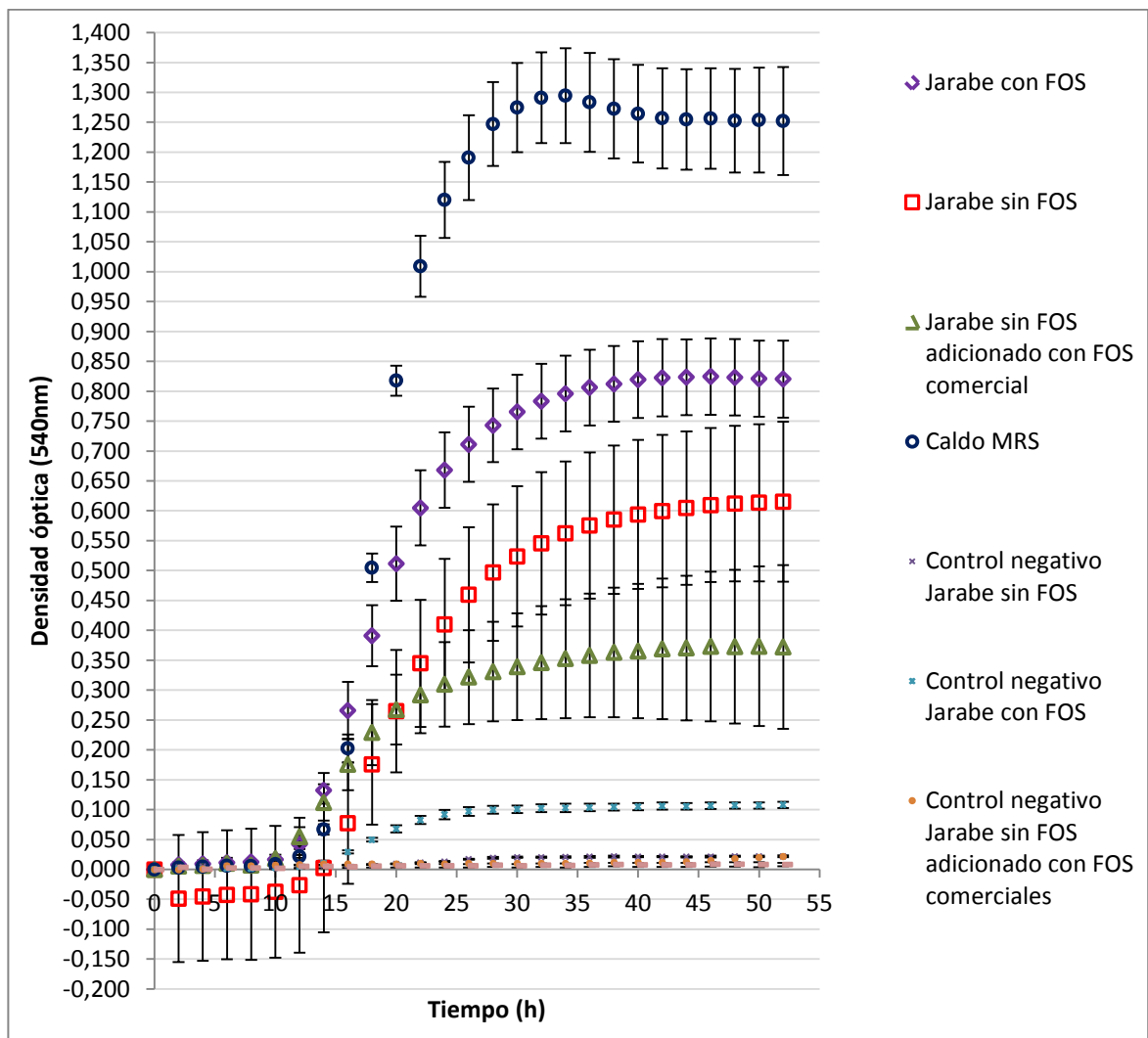


Figura 5. Curvas de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa.

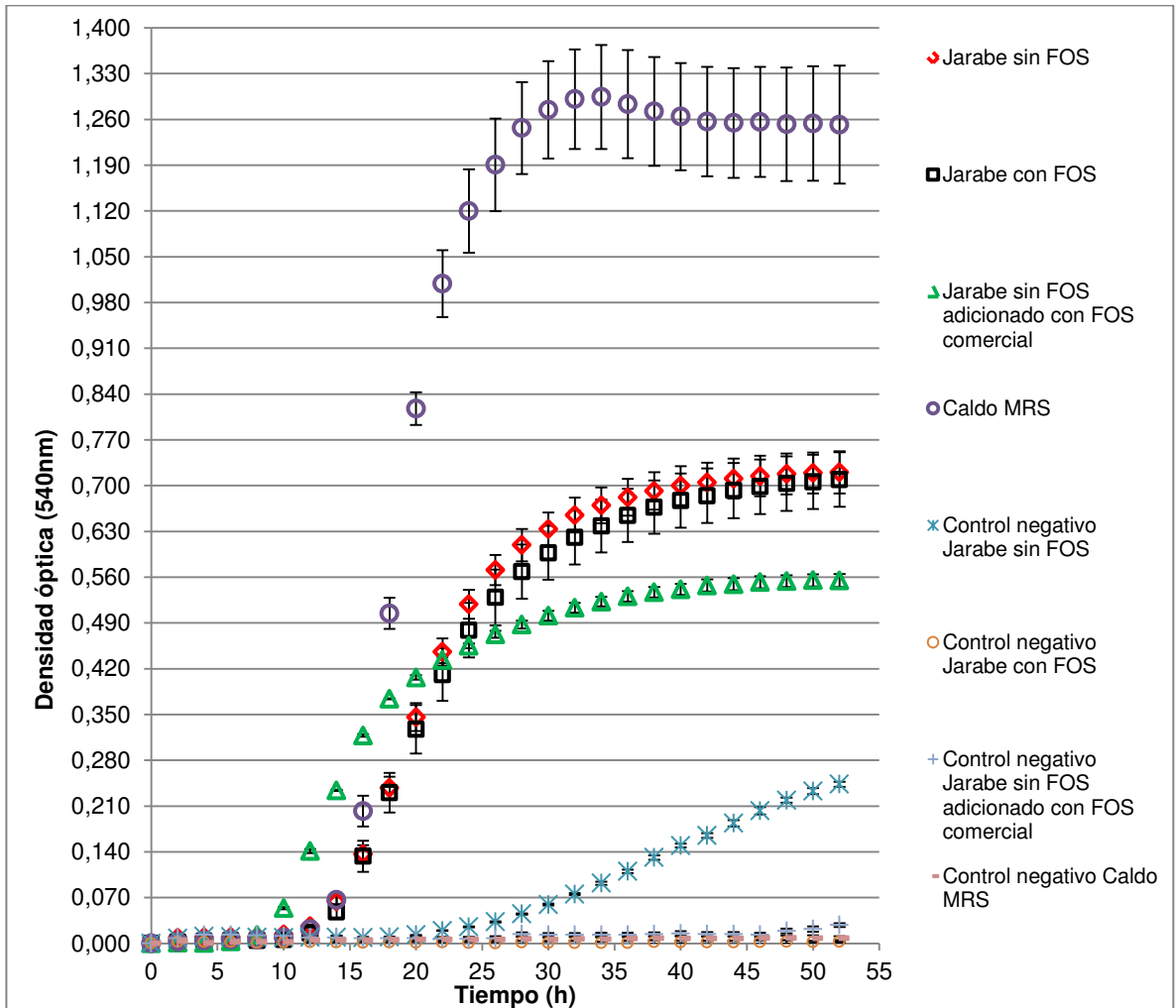


Figura 6. Curvas de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de tomate de árbol sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa.

De la figura 5 y 6 puede observarse que el crecimiento de *L. plantarum* fue mayor 1.7 veces en caldo MRS respecto al crecimiento en los jarabes estudiados. Esto era de esperarse puesto que es un medio adecuado y con una alta cantidad de nutrientes para propiciar el crecimiento de BAL (De Man et al., 1960). En los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla, se observa que es mayor el crecimiento de la BAL en el medio que contiene FOS obtenidos por vía fermentativa, esto puede indicar que los FOS obtenidos por vía fermentativa, para

este jarabe, tienen un efecto prebiótico para la BAL estudiada, es decir estimulan el crecimiento de la misma. Este comportamiento ha sido reportado para *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei* en caldo MRS enriquecido con FOS comerciales por Muñoz, Mosquera, Alméciga-Díaz, Melendez, & Sánchez (2012).

Por el contrario, en el caso de los jarabes provenientes de la DO de tomate de árbol el crecimiento de *L. plantarum* es muy similar tanto en el que tiene FOS como en el que no tiene, al parecer en este jarabe el efecto de los FOS no es significativo, esto pudo haberse presentado debido a que el rendimiento obtenido al final de la producción de FOS fue 8.75% más bajo que el obtenido en el jarabe de mora. Este punto se analizará con más detalle en las curvas de crecimiento hechas en peso seco, en las que se pudo analizar el perfil final de FOS (Ver numeral 7.3.1.2).

Las curvas de los controles negativos, especialmente los de jarabes de mora con FOS y jarabes de tomate sin FOS presentaron un crecimiento microbiano, sin embargo, de las gráficas se puede ver que es muy bajo. Para verificar el tipo de microorganismos presentes se realizaron siembras en medio PDA y se incubaron a 25°C observando la aparición de colonias crema y redondas en muy baja cantidad (menos de 5 UFC/mL), lo que sugiere la presencia de levaduras en muy baja concentración.

La tabla 7 muestra los resultados de los Log(UFC/mL) máximos para cada jarabe calculadas a partir de la curva de calibración descrita en el anexo 2, y el porcentaje de crecimiento de cada uno de ellos respecto a MRS.

Tabla 7. Log(UFC/mL) correspondientes a la densidad óptica alcanzada a las 53 h y porcentaje de crecimiento respecto a control positivo (MRS) para los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla y tomate de árbol sin y con FOS

Jarabe	Densidad óptica a las 53 horas (Unidades de densidad óptica)	Log(UFC/mL)	Porcentaje de crecimiento respecto a MRS a partir de densidad óptica (%)
Jarabe de Mora sin FOS	0.62±0.13	7.51	49.08
Jarabe de Mora con FOS	0.82±0.06	7.73	65.18
Caldo MRS	1.26±0.09	8.21	-
Jarabe de Tomate sin FOS	0.72±0.03	7.62	57.37
Jarabe de Tomate con FOS	0.71±0.04	7.61	56.57

Se puede observar de la tabla 7 que el mayor recuento obtenido por *L. plantarum* fue en caldo MRS con un valor de 8.21 Log(UFC/mL) correspondiente a la densidad óptica más alta que fue de 1.26 seguido del jarabe de mora con FOS y jarabe de tomate con y sin FOS, comprobando el análisis realizado para las gráficas 5 y 6.

#### 7.2.1.1 Modelado matemático de las curvas de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de la DO con y sin FOS

En varios estudios se ha demostrado que los datos de crecimiento microbiano obtenidos por Bioscreen resultan útiles para modelar las curvas de crecimiento y son fiables para obtener valores como la máxima velocidad específica de crecimiento  $\mu_{max}$  y la fase lag (Begot, Desnier, Daudin, Labadie, & Lebert, 1996;

Dalgaard & Koutsoumanis, 2001). Por esta razón, para comparar entre tratamientos, los datos de las curvas de crecimiento obtenidos del Bioscreen se modelaron con la ecuación de Baranyi & Roberts (1994) utilizando la aplicación DMFit como se describió en el numeral 6.4.1., para determinar los valores de la fase lag,  $\mu_{max}$ , y la cantidad final de microorganismos en unidades de densidad óptica. Los ajustes del modelo de Baranyi & Roberts fueron satisfactorios obteniendo valores de  $R^2$  entre 0.98 y 0.99 tanto para los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla como para los de tomate de árbol. Los resultados para la fase lag, la máxima velocidad específica de crecimiento  $\mu_{max}$ , y punto final de crecimiento se muestran en las figuras 7 a 9 para los jarabes provenientes de DO de mora y en las figuras 10 a 12 para los jarabes provenientes de DO de tomate.

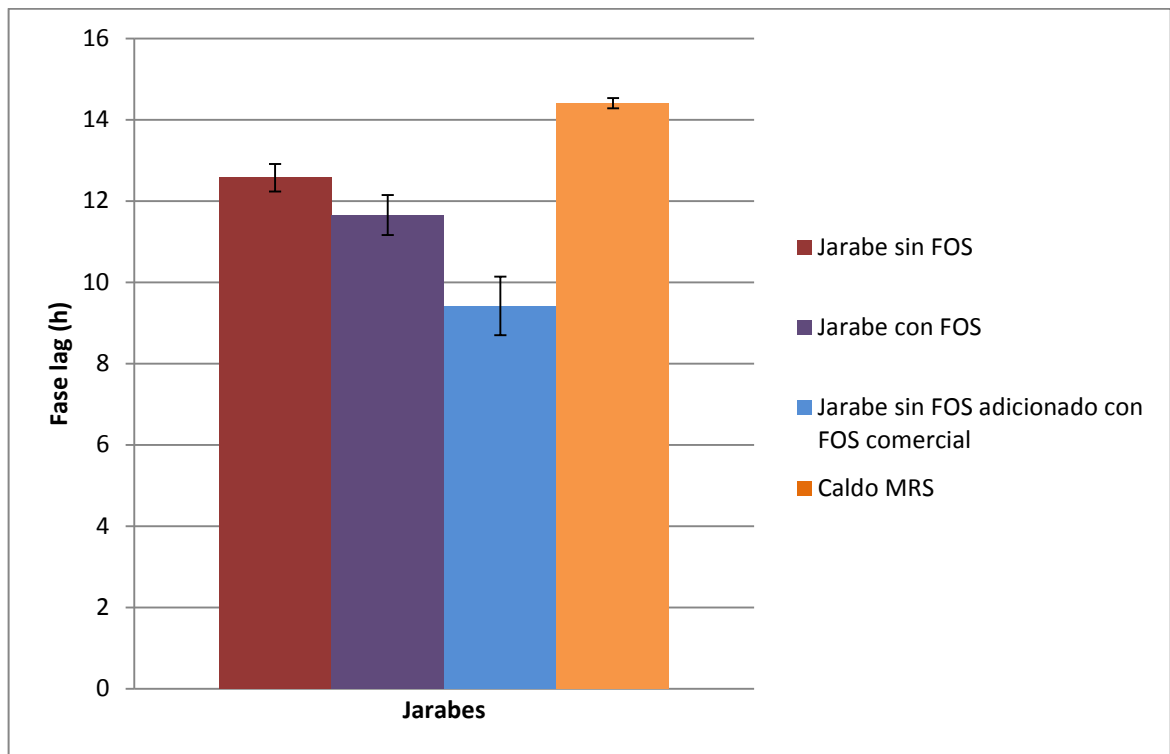


Figura 7. Fase lag de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa.

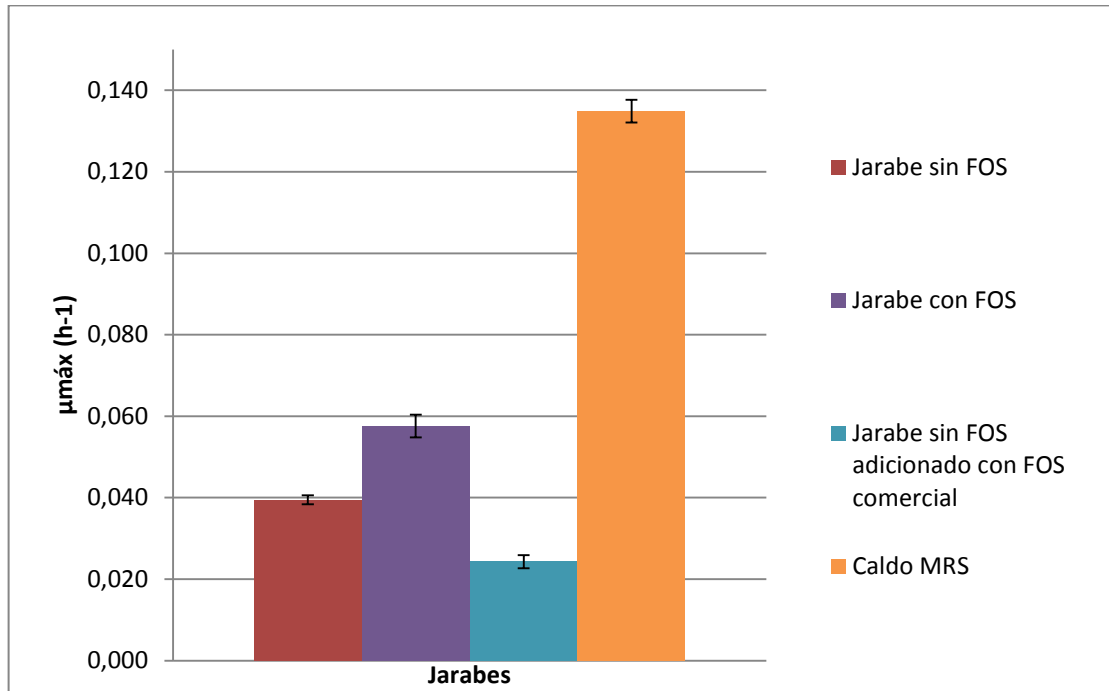


Figura 8. Máxima velocidad específica de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa.

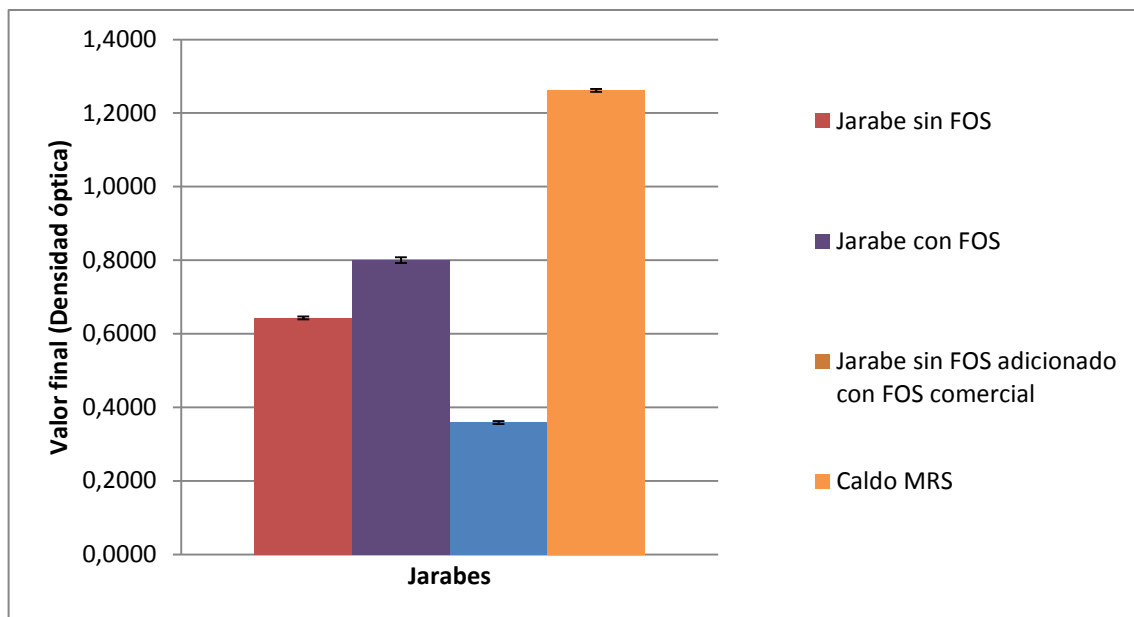


Figura 9. Valor final de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa.

Puede observarse de la figura 7 que la fase lag predicha por el modelo de Baranyi y Roberts (1994), tiene una duración aproximada de 12 h para los jarabes estudiados, y adicionalmente no hay diferencias significativas entre los valores de la fase lag para estos. Por otro lado, debe notarse que la fase lag para el crecimiento en MRS es 1.53 h mayor.

Se puede observar de las figuras 8 y 9 que los mayores valores se tienen para el crecimiento en caldo MRS y como se mencionó anteriormente era de esperarse debido a que es el medio adecuado para el crecimiento de *L. plantarum*, teniendo  $\mu_{max}$  de 0.13 h<sup>-1</sup> y un valor final de 1.26 unidades de densidad óptica. Esta velocidad es baja, ya que en condiciones óptimas de crecimiento *L. plantarum* puede alcanzar valores de 0.5 h<sup>-1</sup> (Agudelo, Ortega, & Hoyos, 2010). Se puede decir de las mismas figuras que el mayor crecimiento de *L. plantarum* se obtuvo en el jarabe con FOS con una  $\mu_{max}$  de 0.06 h<sup>-1</sup> y un valor final de 0.8 unidades de densidad óptica, y que existen diferencias significativas entre  $\mu_{max}$  del jarabe de mora con FOS obtenidos por vía fermentativa y el jarabe de mora proveniente de la deshidratación osmótica, lo que puede indicar que los FOS provenientes de la fermentación del jarabe de mora con *A. oryzae*, estimulan el crecimiento de la BAL en estudio. Sin embargo, debe notarse que la densidad óptica alcanzada final por el jarabe con FOS es 1.6 veces más baja respecto al caldo MRS, lo que sugiere que se puede mejorar el medio de cultivo para tener mayor crecimiento de *L. plantarum*.

En las figuras 10, 11 y 12, se presentan los valores de la fase lag,  $\mu_{max}$  y cantidad final obtenida de microorganismos para los jarabes de tomate de árbol por el mismo modelo utilizado para los jarabes de mora.

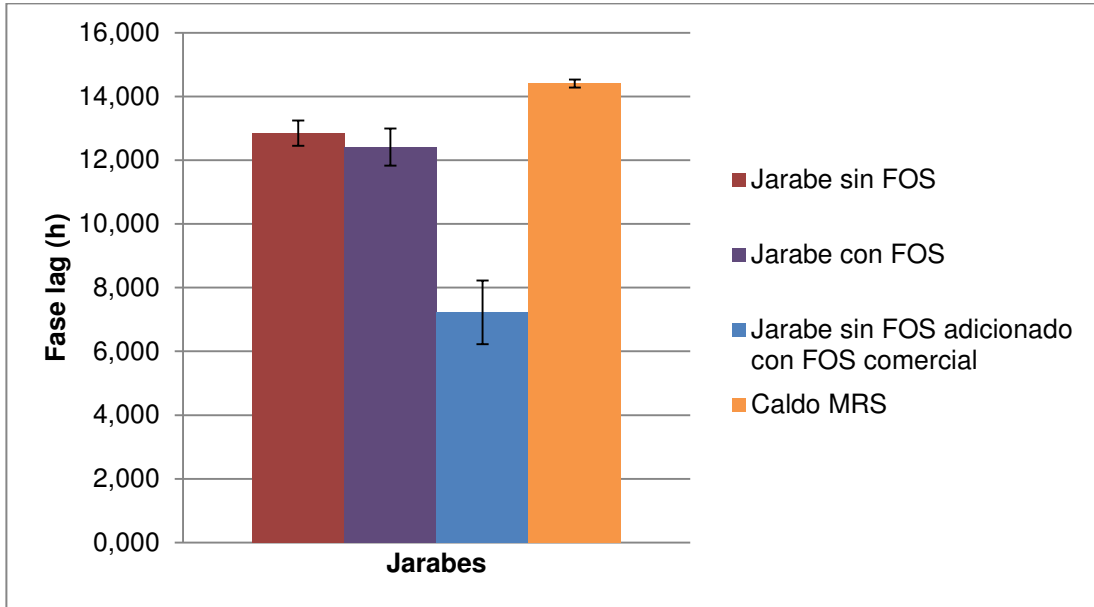


Figura 10. Fase lag de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa.

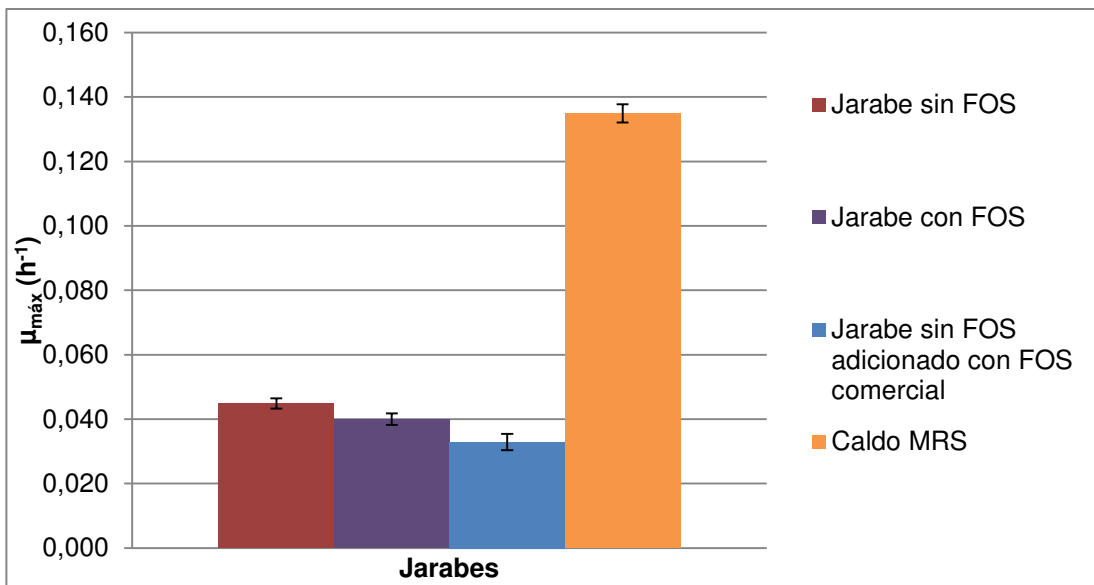


Figura 11. Máxima velocidad específica de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa.



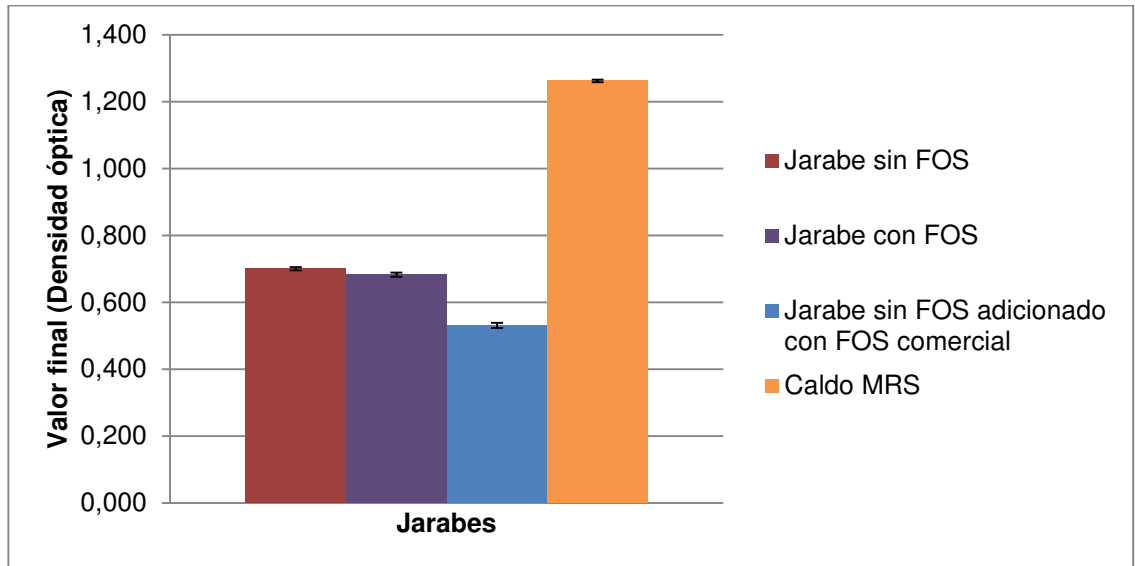


Figura 12. Valor final de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa.

Se puede observar de la figura 11, que los mayores valores, al igual que en los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla se tienen para el crecimiento en caldo MRS. De las gráficas se puede concluir que el mayor crecimiento de la *L. plantarum* se obtuvo en el jarabe sin FOS con  $\mu_{max}$   $0.045 \text{ h}^{-1}$ , y se puede apreciar que aunque la diferencia entre  $\mu_{max}$  y la cantidad final de microorganismos para este caso también es significativa, es pequeña. Esto sugeriría que para el caso de los jarabes de tomate de árbol, la presencia de FOS obtenidos por vía fermentativa no estimuló el crecimiento de *L. plantarum*.

En conclusión, los FOS provenientes de la fermentación con el hongo *A. oryzae* pueden estimular el crecimiento de la BAL en estudio, sin embargo, era de esperarse que los FOS comerciales también lo hicieran, este punto se abordará en el siguiente numeral.

### **7.2.1.2 Efecto de la adición de FOS comerciales sobre el crecimiento de *L. plantarum***

El perfil de los FOS comerciales se obtuvo por HPLC bajo la misma metodología del numeral 6.2.1.3 el cual arrojó concentraciones de 33% kestosa, 50% nistosa, 13% fructofuranosil nistosa (FFN), los cuales son distintos a las concentraciones de los FOS obtenidos por vía fermentativa (26 y 20% de kestosa, 9.8 y 9.5% de nistosa y 0.98 y 2% de FFN respectivamente para jarabe de mora de Castilla y tomate de árbol). Las diferentes concentraciones de FOS utilizadas para enriquecer los medios de crecimiento de diferentes bacterias ácido lácticas en presencia de prebióticos, han sido encontradas como una posible causa de fomento o inhibición del crecimiento de los microorganismos (Muñoz et al., 2012), sin embargo, dado que la adición de FOS comerciales se realizó en la misma concentración que tenía el jarabe con los FOS obtenidos por vía fermentativa no debería ser una causa que explicara la diferencia en el crecimiento de la *L. plantarum* en los dos tipos de jarabe. Teniendo en cuenta lo anterior, se podría sugerir que las diferentes sustancias que contienen los jarabes provenientes de DO ayudan al crecimiento de *L. plantarum* en presencia de FOS obtenidos por vía fermentativa.

Con el fin de verificar si la concentración de los FOS comerciales tienen algún efecto sobre el crecimiento de *L. plantarum* en caldo MRS, se realizaron ensayos como se describió en el numeral 6.2.5. La figura 13 y 14 muestra los resultados de estos ensayos.

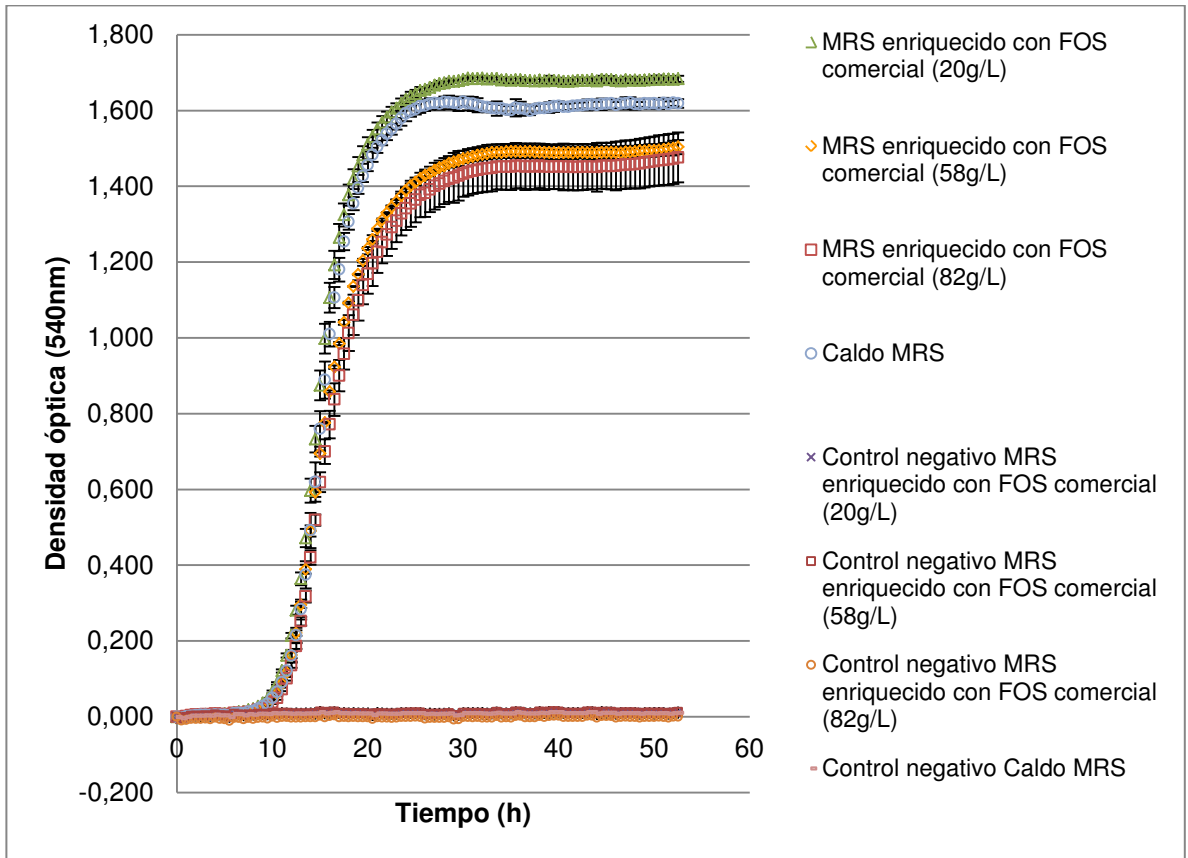


Figura 13. Efecto de la adición de altas concentraciones de FOS comerciales en caldo MRS sobre el crecimiento de *L. plantarum*.

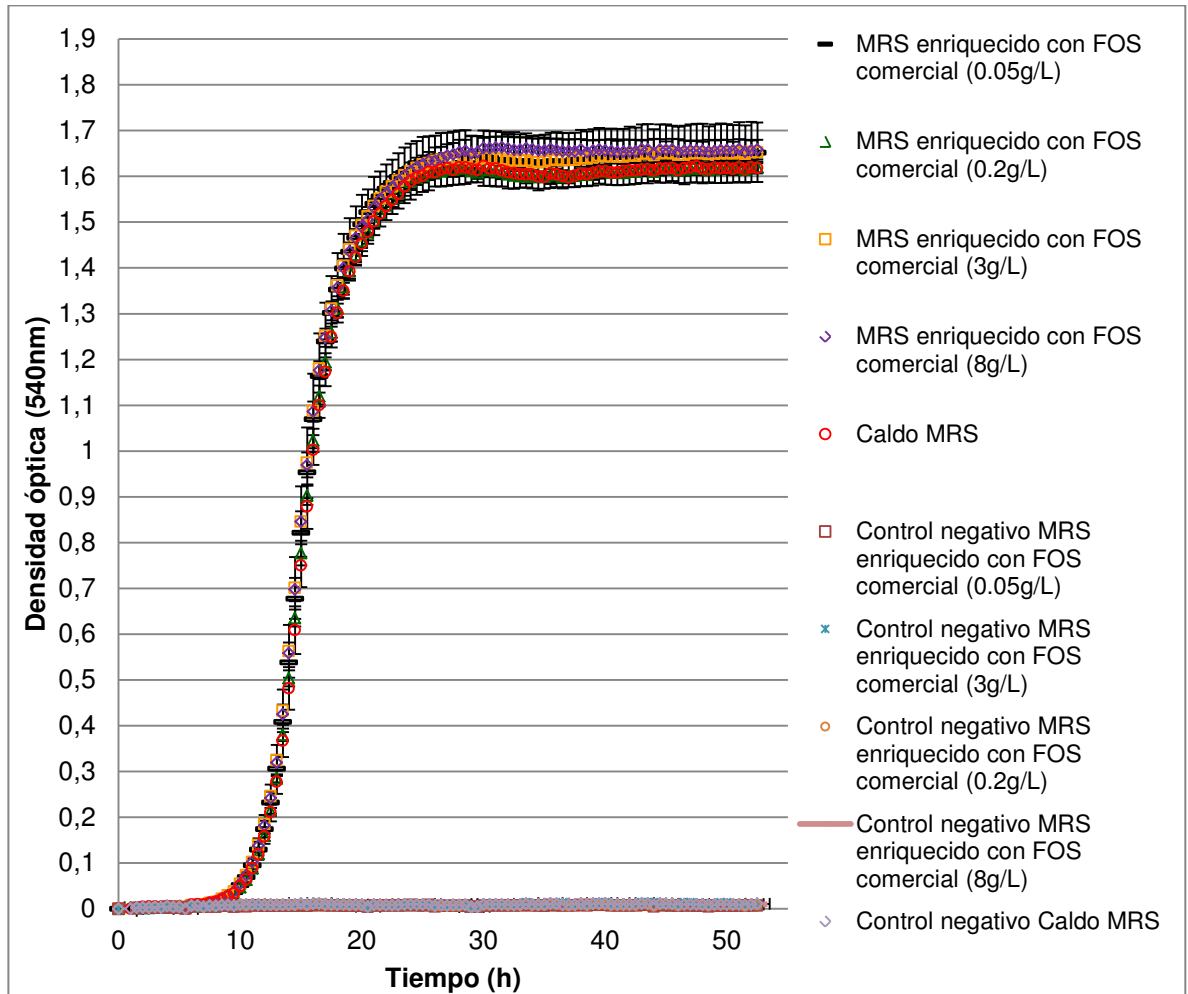


Figura 14. Efecto de la adición de bajas concentraciones de FOS comerciales en caldo MRS sobre el crecimiento de *L. plantarum*

En la tabla 8 se resumen los datos obtenidos en las figuras 13 y 14.

Tabla 8. Densidades ópticas obtenidas en el crecimiento de *L. plantarum* en caldo MRS enriquecido con diferentes concentraciones de FOS comerciales adicionadas a caldo MRS.

<b>Concentraciones de FOS comerciales adicionadas a caldo MRS (g/L)</b>	<b>Densidad óptica final</b>
MRS sin FOS comercial	1.61±0.11
0.05	1.65±0.01
0.2	1.62±0.01
3	1.65±0.07
8	1.66±0.02
20	1.68±0.01
58	1.5±0.02
82	1.48±0.07

De la figura 13 y 14 puede verse que la concentración de FOS comerciales tiene efecto sobre el crecimiento de *L. plantarum*, observándose que a altas concentraciones se inhibe el crecimiento. Sin embargo, para concentraciones en el intervalo entre 0.2 g/L y 20 g/L a medida que aumenta la concentración de FOS aumenta el crecimiento de *L. plantarum*. Un comportamiento similar fue el reportado por Muñoz et al. (2012). De estos resultados podría determinarse que menores concentraciones iniciales del jarabe pueden mejorar el crecimiento de *L. plantarum* en los jarabes con FOS.

## **7.2.2 Efecto del nitrógeno**

### **7.2.2.1 Nitrógeno orgánico**

Para evaluar el efecto de la adición de nitrógeno orgánico, se utilizó extracto de levadura, como se describió en el numeral 6.2.2 (ver tabla 4). Posteriormente se realizó el mismo procedimiento utilizado para determinar el efecto de los FOS (numeral 7.2.1), mediante inoculaciones con *L. plantarum* en los jarabes y posterior experimentación en Bioscreen (numeral 6.2.3).

Las figuras 15 y 16 muestran las curvas de crecimiento de *L. plantarum* en los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla y tomate de árbol con y sin FOS obtenidos por vía fermentativa, adicionados con nitrógeno orgánico, y el control positivo generado en caldo MRS. Estas curvas, al igual que las curvas de los jarabes sin adición de nitrógeno, tuvieron 53 h de crecimiento y presentan las tres fases características; primero la fase lag que aproximadamente para todos los jarabes es de 10 h, al igual que sucedía en los jarabes sin adición de nitrógeno. Posteriormente se observa la fase exponencial que oscila entre 10 y 25 h y finalmente la fase estacionaria, la cual es alcanzada en promedio a la hora 28.

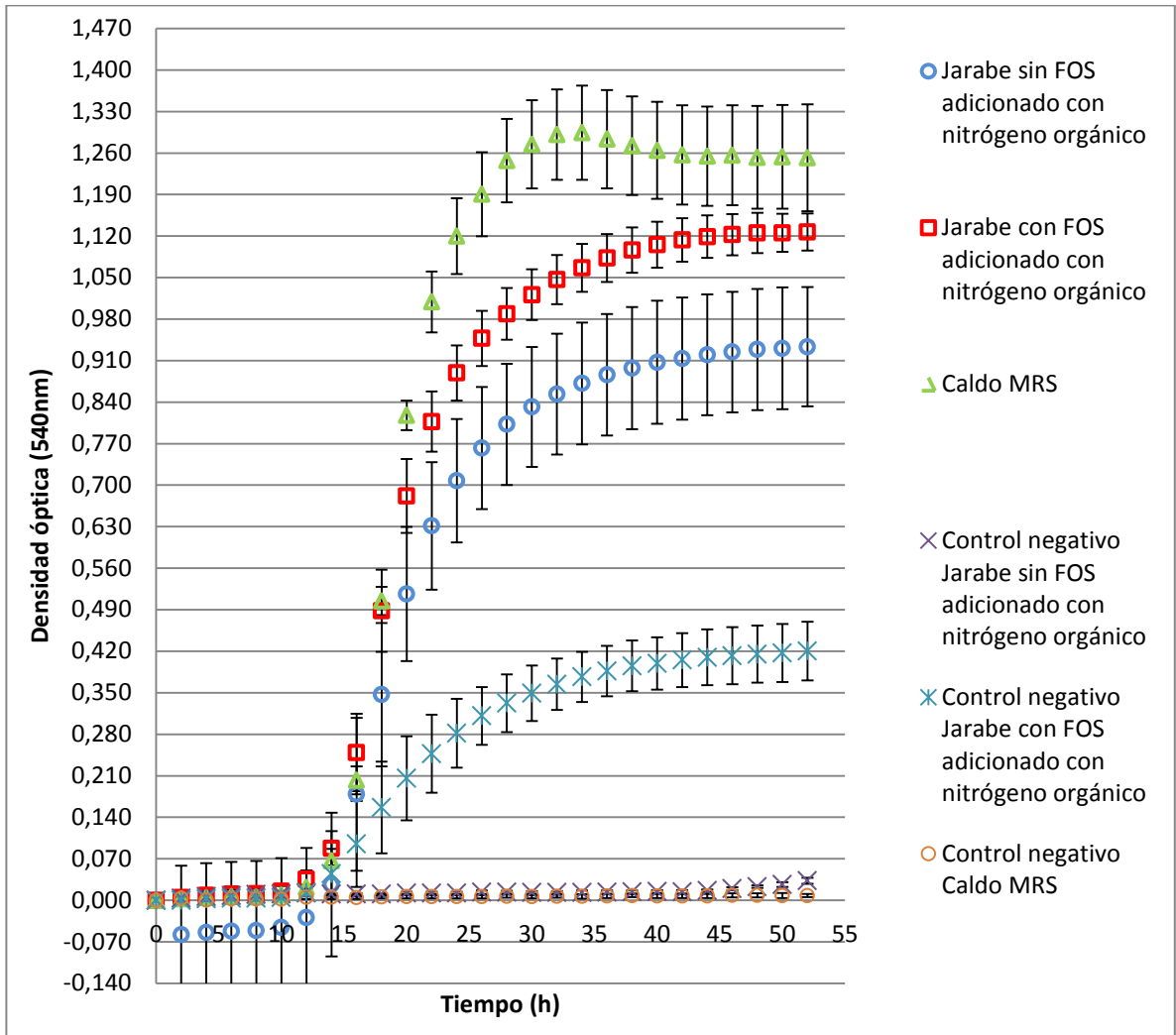


Figura 15. Curvas de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico

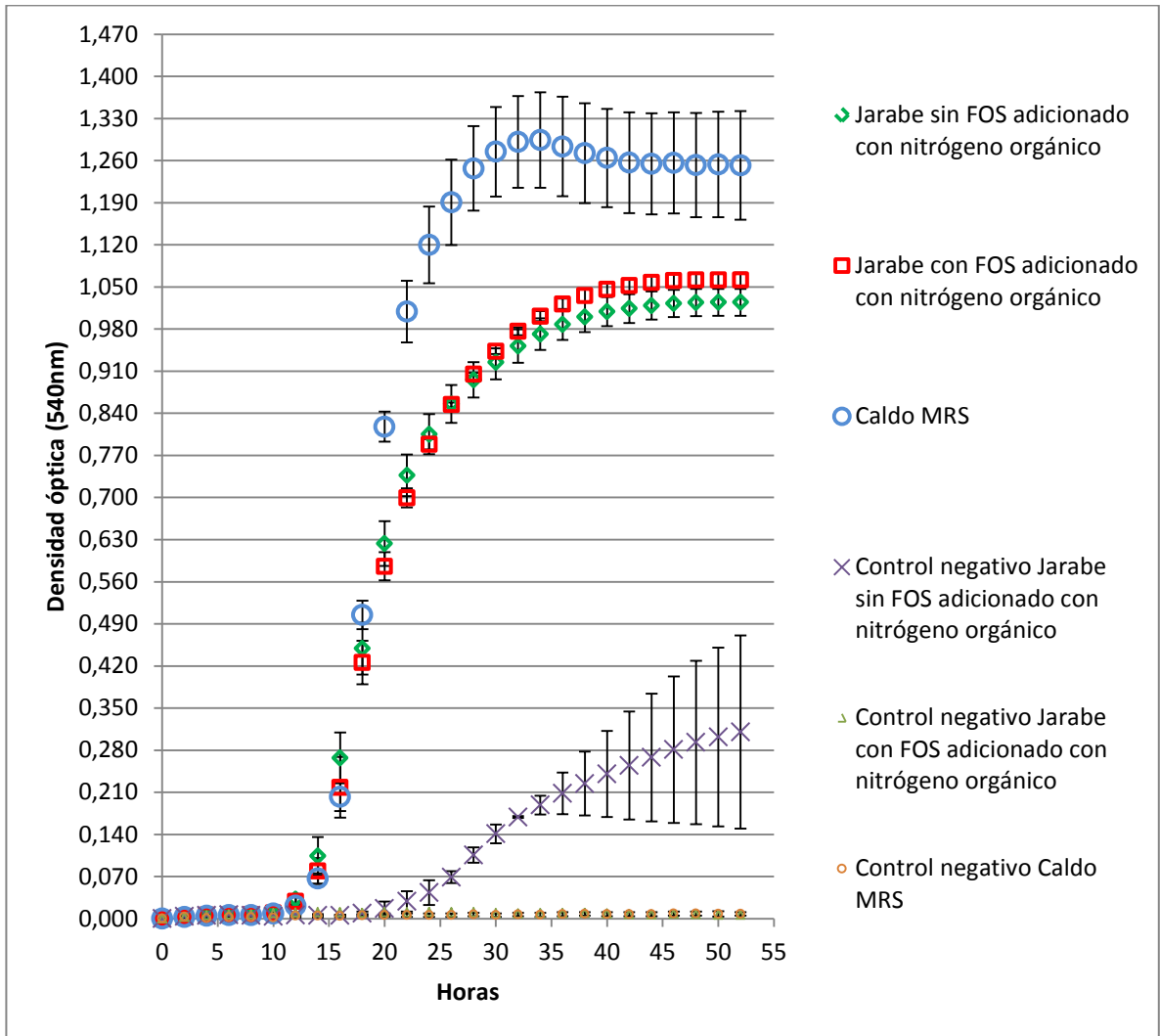


Figura 16. Curvas de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico.

De las figuras 15 y 16, se puede observar que el crecimiento en caldo MRS sigue siendo mayor respecto a todos los jarabes en 1.1 veces, sin embargo se nota un crecimiento mayor respecto a los jarabes que no tenían adición de nitrógeno orgánico (Ver figuras 5 y 6). En los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla se observa que es mayor el crecimiento de *L. plantarum* en el jarabe que tiene FOS adicionado con nitrógeno orgánico con densidad óptica final de 1.1,



respecto al jarabe sin FOS y con adición de nitrógeno orgánico con densidad óptica final de 0.9. Por el contrario en los jarabes provenientes de DO de tomate de árbol el crecimiento no presenta diferencias apreciables entre los jarabes con y sin FOS con adición de nitrógeno orgánico con densidad óptica final de 1.06 y 1.02 respectivamente.

Con el fin de verificar las unidades de densidad óptica alcanzadas con respecto a los Log(UFC/mL), la tabla 9 muestra los resultados para cada uno de los jarabes (ver anexo 2) y el porcentaje de crecimiento de cada uno de ellos con respecto al MRS.

Tabla 9. Log(UFC/mL) correspondientes a la densidad óptica alcanzada a las 53 horas y porcentaje de crecimiento respecto a control positivo (MRS) para los jarabes provenientes de OD de mora de Castilla y tomate de árbol adicionados con nitrógeno orgánico.

<b>Jarabe</b>	<b>Densidad óptica a las 53 horas (Unidades de densidad óptica)</b>	<b>Log(UFC/ml)</b>	<b>Porcentaje de crecimiento respecto a MRS (%) a partir de densidad óptica</b>
Jarabe de Mora sin FOS adicionado con nitrógeno orgánico	0.94±0.10	7.86	74.50
Jarabe de Mora con FOS adicionado con nitrógeno orgánico	1.13±0.031	8.07	89.80
Caldo MRS	1.26±0.09	8.21	-
Jarabe de Tomate sin FOS adicionado con nitrógeno orgánico	1.03±0.02	7.96	81.67
Jarabe de Tomate con FOS adicionado con nitrógeno orgánico	1.06±0.01	8.00	84.62

De la tabla 9 se puede observar que el mayor valor fue 8.21 Log(UFC/mL) obtenido para caldo MRS, seguido del jarabe de mora con FOS adicionado con nitrógeno orgánico con valor de 8.07 Log(UFC/mL) y 8 para jarabe de tomate con FOS adicionado con nitrógeno orgánico, comprobando así el análisis realizado en las gráficas 15 y 16.

#### **7.2.2.2 Modelado matemático de las curvas de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de la DO con y sin FOS adicionados con nitrógeno orgánico**

Al igual que en el numeral 7.2.1., para comparar entre tratamientos se realizó un ajuste del modelo de Baranyi & Roberts, (1994) a los datos experimentales, utilizando la aplicación DMFit como se describió en el numeral 6.4.1. Los ajustes fueron satisfactorios obteniendo valores de  $R^2$  entre 0.98 y 0.99 tanto para los jarabes provenientes de mora de Castilla como para los de tomate de árbol. Los resultados para la fase lag, velocidad específica y punto final de crecimiento se muestran en las figuras 17, 18 y 19 para los jarabes provenientes de DO de mora.

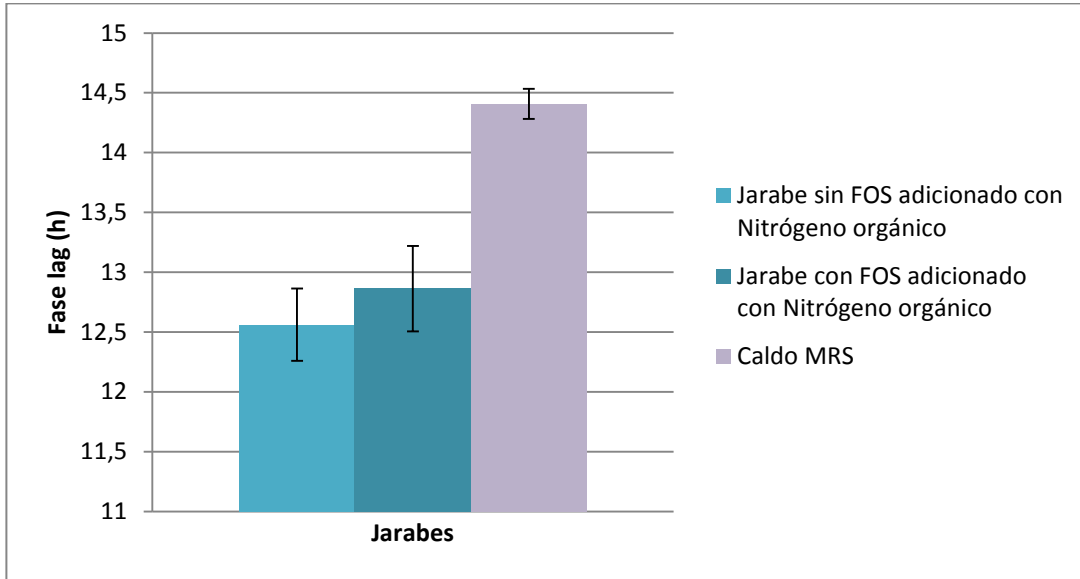


Figura 17. Fase lag de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla adicionados con nitrógeno orgánico.

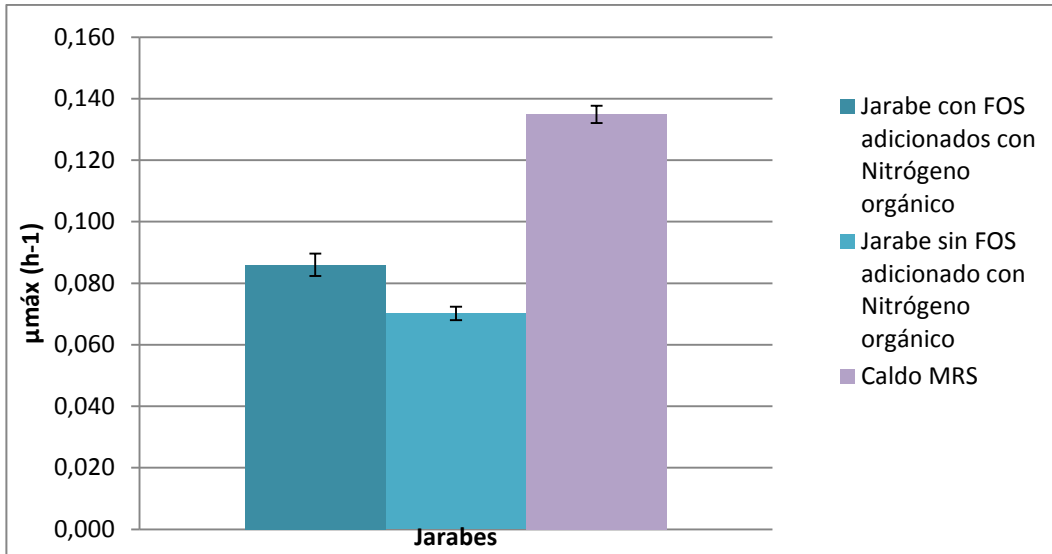


Figura 18. Máxima velocidad específica de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla adicionados con nitrógeno orgánico.

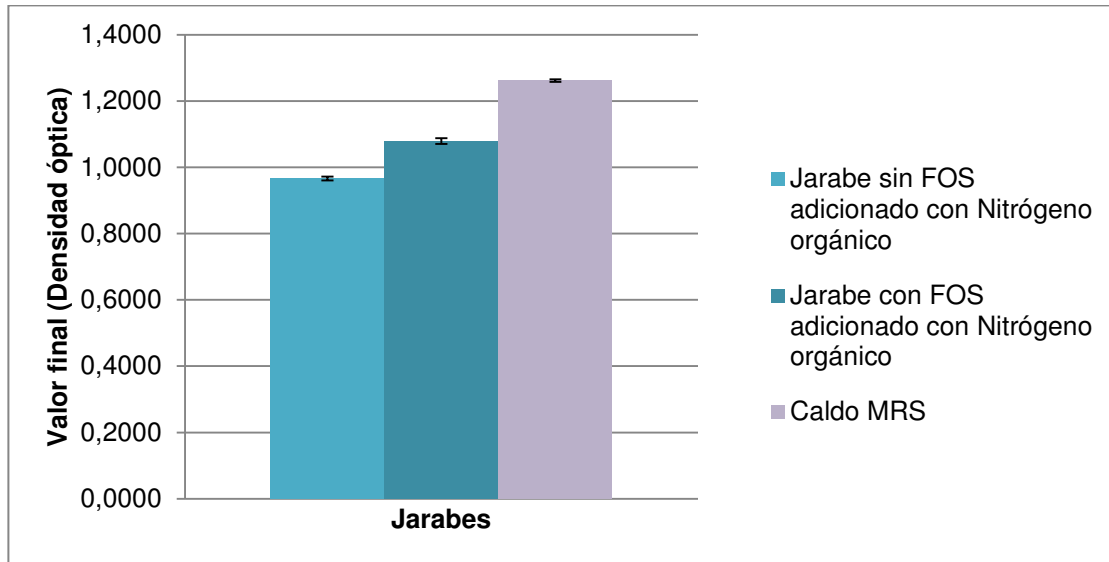


Figura 19. Valor final de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla adicionados con nitrógeno orgánico.

De la figura 17 puede observarse que la fase lag no tiene diferencias significativas entre los jarabes con y sin FOS obtenidos por vía fermentativa adicionados con nitrógeno orgánico, sin embargo puede notarse que es más baja que la fase lag en caldo MRS.

De las figuras 18 y 19, se observa que los mayores valores de máxima velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y densidad óptica final se obtienen en caldo MRS,  $0.13 \text{ h}^{-1}$  y 1.26 unidades de densidad óptica respectivamente. Se puede decir de las figuras, que el mayor crecimiento de *L. plantarum*, después del caldo MRS, se obtuvo en el jarabe con FOS, obtenidos por vía fermentativa, adicionado con nitrógeno orgánico con una  $\mu_{max}$   $0.09 \text{ h}^{-1}$  y un valor final de 1.08 unidades de densidad óptica, lo que es significativamente mayor en  $\mu_{max}$  de 1.5 veces, con respecto a los ensayos en los que no se adicionó nitrógeno orgánico. Puede concluirse entonces que, para el caso de los jarabes de mora, la adición de fuente de nitrógeno orgánico tiene un impacto positivo en el crecimiento de la BAL. Sin

embargo, debe resaltarse que aún el crecimiento respecto al caldo MRS sigue quedando 1.2 veces por debajo.

En las figuras 20, 21 y 22 se presentan los resultados de duración de la fase lag, velocidad específica y densidad óptica final para los jarabes de tomate de árbol.

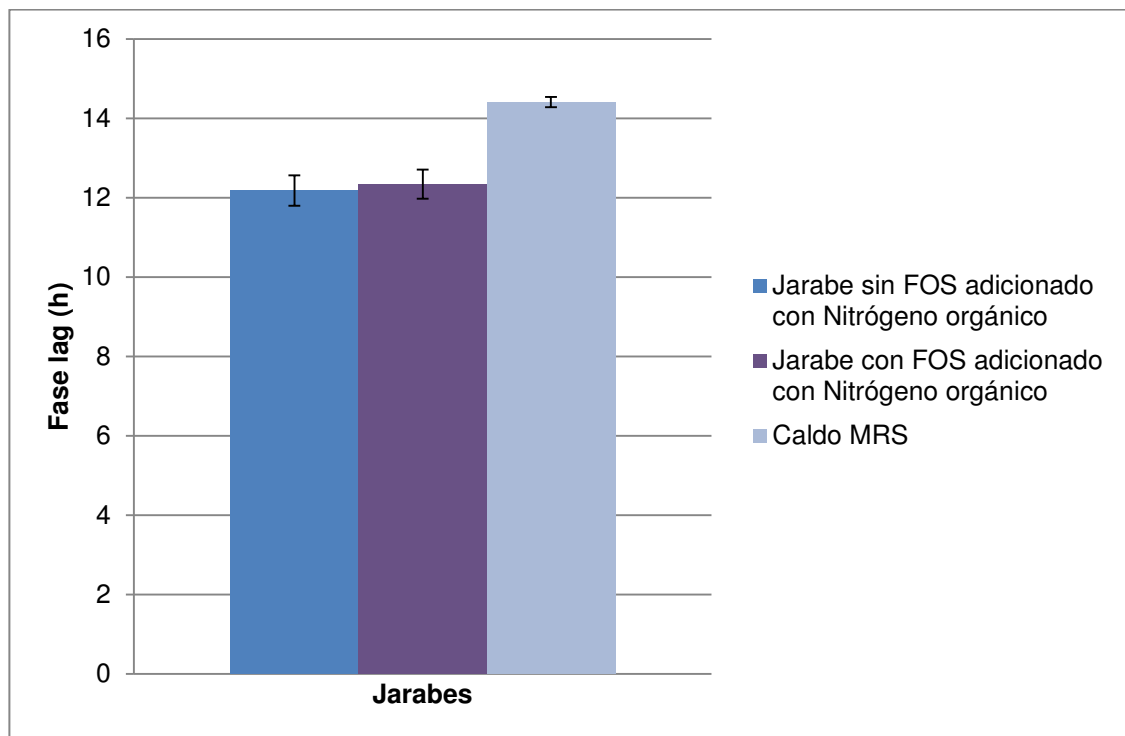


Figura 20. Fase lag de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de OD de tomate de árbol adicionados con nitrógeno orgánico.

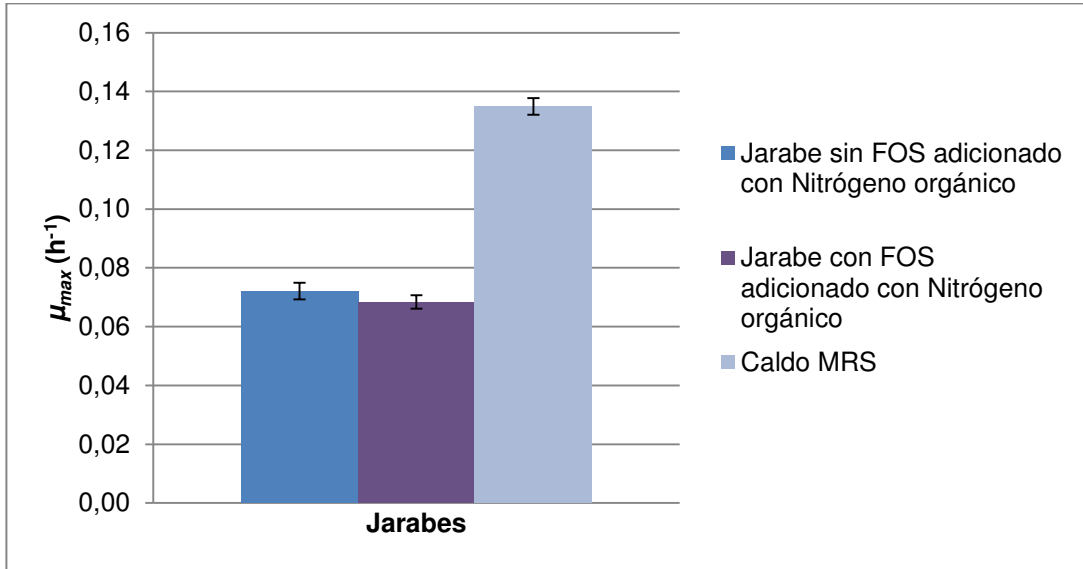


Figura 21. Máxima velocidad específica de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol adicionados con nitrógeno orgánico.

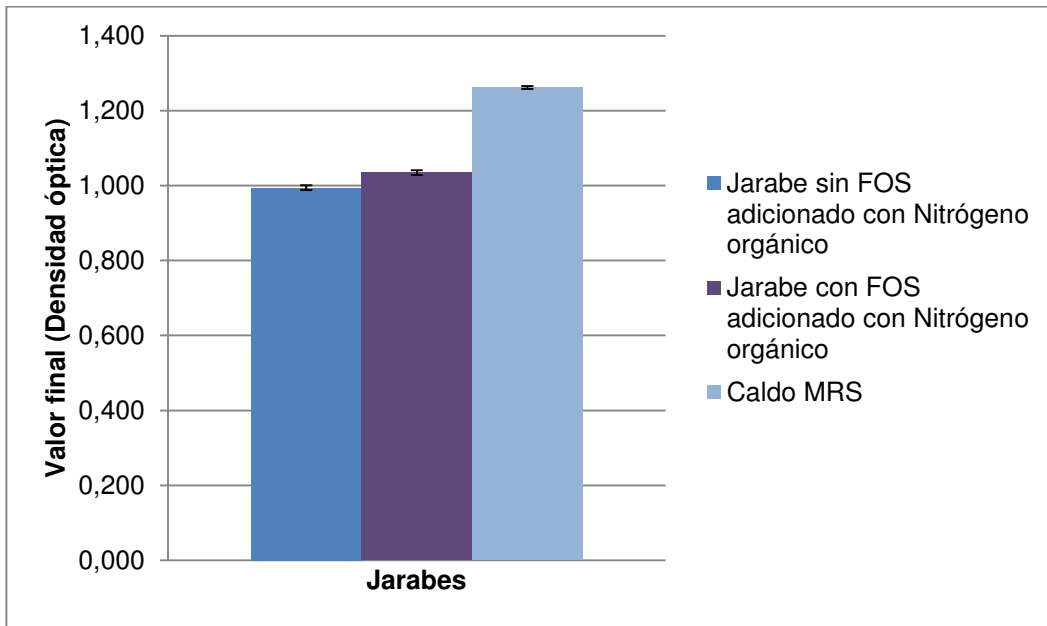


Figura 22. Valor final de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol adicionados con nitrógeno orgánico.

De la figura 20, puede observarse, que al igual que sucedió con los jarabes de mora de Castilla, la fase lag tiene una duración promedio de 12 h, no habiendo diferencias significativas entre jarabes de tomate de árbol, y teniendo una mayor duración en el caldo MRS.

De las figuras 21 y 22 se observa que los mayores valores de velocidad específica de crecimiento y valor final de densidad óptica, al igual que en los jarabes de mora de Castilla, se tienen para el crecimiento en caldo MRS, con  $\mu_{max}$  de  $0.13 \text{ h}^{-1}$  y 1.26 de valor final.

De la figura 21 puede verse que no hay diferencia significativa entre la máxima velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de los dos jarabes estudiados; adicionalmente puede notarse que el valor de  $\mu_{max}$  respecto a los jarabes que no fueron adicionados con nitrógeno orgánico (ver numeral 7.2.1.1) es 1.6 veces mayor.

En lo relacionado con el valor de la densidad óptica final, puede verse de la figura 22, que existen diferencias entre los jarabes sin FOS y los jarabes con FOS adicionados con nitrógeno orgánico, presentando mayor crecimiento de la *L. plantarum* en el jarabe con FOS (1.15 veces con respecto a los que no tienen FOS). Este comportamiento es diferente al presentado por los jarabes de tomate sin adición de nitrógeno orgánico, donde el crecimiento de *L. plantarum* era igual en los jarabes con y sin FOS, lo que indica que la presencia de nitrógeno es importante en la potencialización del crecimiento de *L. plantarum* en presencia de FOS.

En conclusión, la adición de nitrógeno orgánico mejora de manera importante el crecimiento de *L. plantarum* tanto en los jarabes de mora de Castilla como de

tomate de árbol, tanto en el caso de los jarabes que no tienen FOS obtenidos por vía fermentativa, como en el caso de aquellos que si los tienen. (1.5 veces respecto a los jarabes sin adición de nitrógeno orgánico) esto era de esperarse, debido a que es una fuente esencial en el desarrollo de los microorganismos (Salmien, Wright, & Ouwehand, 2004).

### **7.2.2.3 Nitrógeno inorgánico**

Para evaluar el efecto de la adición de nitrógeno de una fuente inorgánica, se utilizó cloruro de amonio, como se describió en el numeral 6.2.2, posteriormente se realizó el mismo procedimiento que para los jarabes adicionados con nitrógeno orgánico (numeral 7.2.2.1).

Las figuras 23 y 24 muestran las curvas de crecimiento de *L. plantarum* en los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla y tomate de árbol con y sin FOS adicionados con nitrógeno inorgánico. Al igual que los anteriores jarabes estas curvas tuvieron 53 h de crecimiento presentando las tres fases: la fase lag que tiene una duración aproximadamente de 10 h, la fase exponencial que oscila entre 10 y 25 h y la fase estacionaria, la cual es alcanzada en promedio a la hora 28.



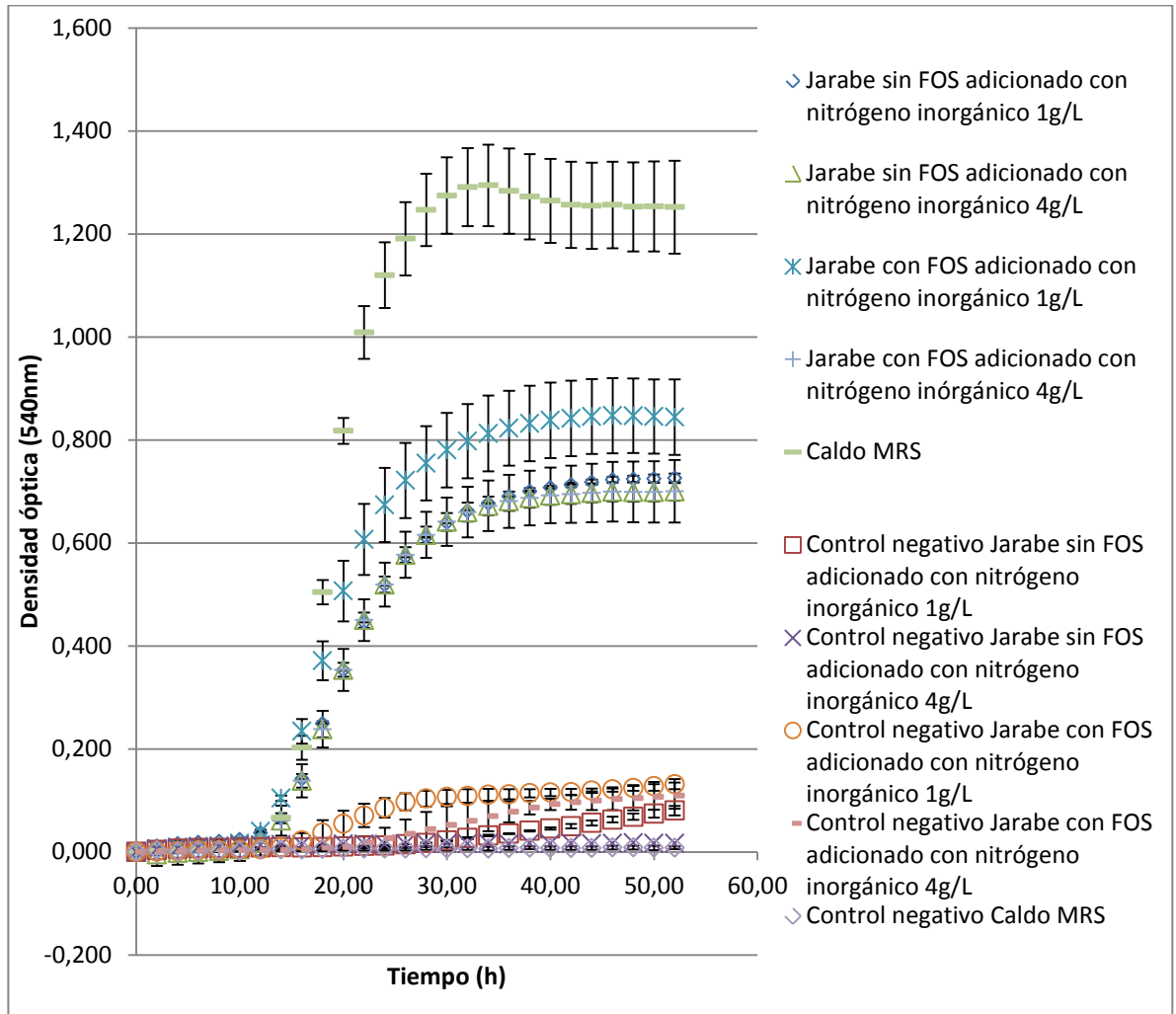


Figura 23. Curvas de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno inorgánico.

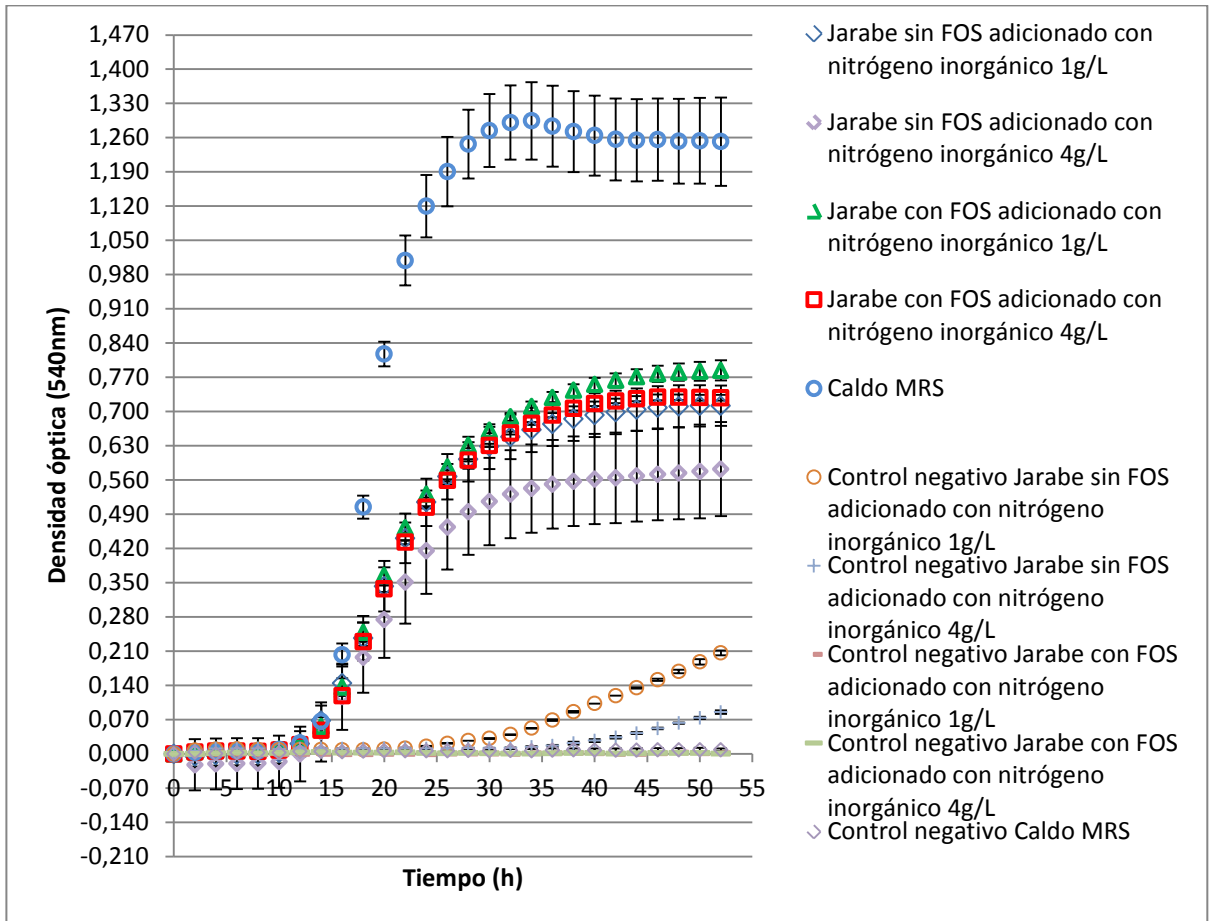


Figura 24. Curvas de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS adicionados con nitrógeno inorgánico.

De las figuras 23 y 24, se puede observar que el crecimiento de *L. plantarum* en caldo MRS sigue siendo mayor respecto a los jarabes estudiados. Al igual que se obtuvo con la adición de nitrógeno orgánico, hay un incremento en el crecimiento de *L. plantarum* (1.02 veces respecto a los jarabes con FOS obtenidos por vía fermentativa sin adición de nitrógeno. Ver figuras 5 y 6) Adicionalmente, se evidencia para el caso de los jarabes de tomate de árbol con FOS, un aumento del crecimiento de la BAL con la adición de nitrógeno inorgánico respecto a los jarabes que no tienen FOS, lo que confirmaría que el nitrógeno puede tener un

efecto, en el caso de este jarabe, en el consumo de FOS por parte de *L. plantarum*. Se observa también que tanto para el caso de los jarabes de mora de Castilla, como los jarabes de tomate de árbol, hubo un aumento en el crecimiento de *L. plantarum* con una disminución de la concentración de la fuente de nitrógeno inorgánico siendo este efecto más notorio en los jarabes sin FOS.

Con el fin de verificar las unidades de densidad óptica alcanzadas con respecto a los Log(UFC/mL), la tabla 10 muestra los resultados para cada uno de los jarabes (ver anexo 2) y el porcentaje de crecimiento de cada uno de ellos con respecto al MRS.

Tabla 10. Log(UFC/mL) correspondientes a la densidad óptica alcanzada a las 53 h y porcentaje de crecimiento respecto a control positivo (MRS) para los jarabes provenientes de OD de mora de Castilla y tomate de árbol adicionados con nitrógeno inorgánico.

Jarabe	Concentración nitrógeno inorgánico (g/L)	Densidad óptica a las 53 horas (Unidades de densidad óptica)	Log(UFC/mL)	Porcentaje de crecimiento respecto a MRS (%) a partir de densidad óptica
Mora de Castilla sin FOS	1	0.73±0.04	7.63	57.93
	4	0.70±0.06	7.60	55.86
Mora de Castilla con FOS	1	0.84±0.07	7.76	67.25
	4	0.75±0.02	7.65	59.44
Tomate de árbol sin FOS	1	0.71±0.04	7.61	56.73
	4	0.59±0.10	7.47	46.85
Tomate de árbol con FOS	1	0.79±0.02	7.69	62.55
	4	0.73±0.01	7.63	58.09
Caldo MRS		1.26±0.09	8.21	-

De la tabla 10 se puede observar que el mayor valor sigue siendo 8.21 Log(UFC/mL) obtenido para caldo MRS, seguido del jarabe de mora con FOS adicionado con nitrógeno inorgánico 1g/L con valor de 7.76 Log(UFC/mL) y 7.69 Log(UFC/mL) para jarabe de tomate con FOS adicionado con nitrógeno inorgánico 1g/L, notando que los Log(UFC/mL) no cambian entre las dos concentraciones, como se observó en las figuras 23 y 24.

Por otro lado, comparando los resultados de crecimiento de *L. plantarum* respecto a la adición de nitrógeno orgánico e inorgánico, se puede observar que la adición de nitrógeno orgánico favoreció en mayor grado el crecimiento de *L. plantarum*, obteniendo valores de densidad óptica entre 0.9 y 1.1 y porcentajes de crecimiento entre 74 y 89% con respecto al caldo MRS, a diferencia de la adición de nitrógeno inorgánico tanto para 1g/L como para 4g/L, en cual se obtuvieron valores de densidad óptica entre 0.59 y 0.75 y porcentajes de crecimiento entre 46 y 67% con respecto al caldo MRS (ver tablas 9 y 10). Por lo tanto se puede decir que la bacteria ácido láctica en estudio presenta un mejor crecimiento con la adición de nitrógeno orgánico en el medio de cultivo; esto se puede ver en algunos estudios realizados para la producción de ácido láctico en donde han utilizado como medios de cultivo residuos de cosechas, almidón, jugo de caña de azúcar, entre otros, donde se muestra que han sido enriquecidos con extracto de levadura, obteniendo muy buenos resultados a nivel de crecimiento de las BAL (Altaf, Naveena, & Reddy, 2007; Nancib et al., 2001; Serna & Rodríguez, 2007).

#### 7.2.2.4 Modelado matemático de las curvas de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de la DO con y sin FOS adicionados con nitrógeno inorgánico

Para comparar entre tratamientos se realizó un ajuste con la aplicación DMFit como se describió en el numeral 6.4.1. Los ajustes del modelo de Baranyi & Roberts, 1994 fueron satisfactorios obteniendo valores de  $R^2$  entre 0.98 y 0.99 tanto para los jarabes provenientes de mora de castilla como para los de tomate de árbol. Los resultados para la fase lag, velocidad específica y punto final de crecimiento se muestran en las figuras 25, 26 y 27 para los jarabes provenientes de DO de mora y las figuras 28, 29 y 30 para los jarabes provenientes de DO de tomate.

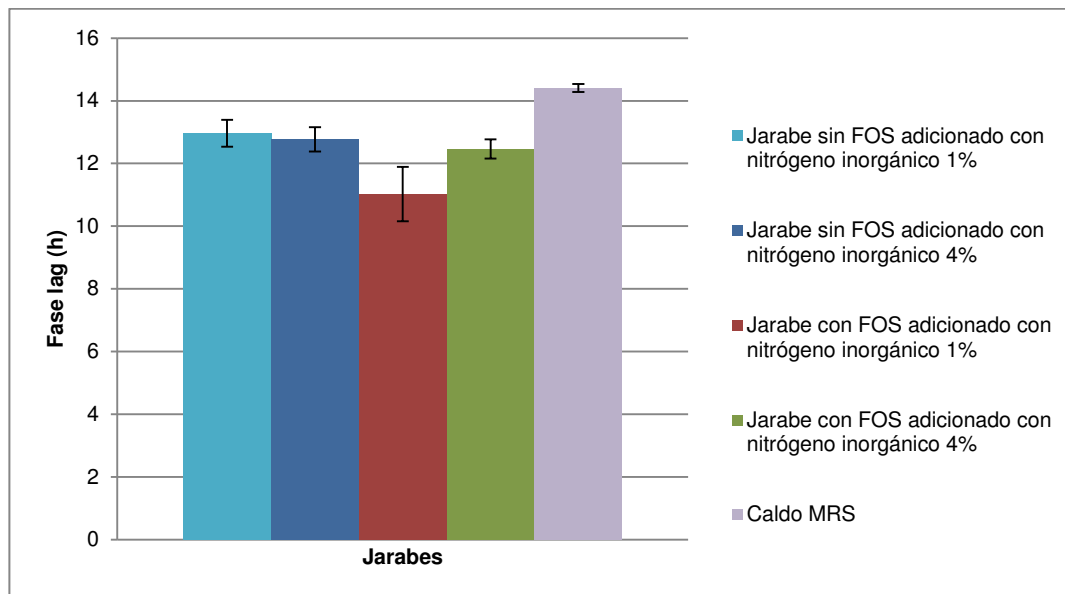


Figura 25. Fase lag de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla adicionados con nitrógeno inorgánico.

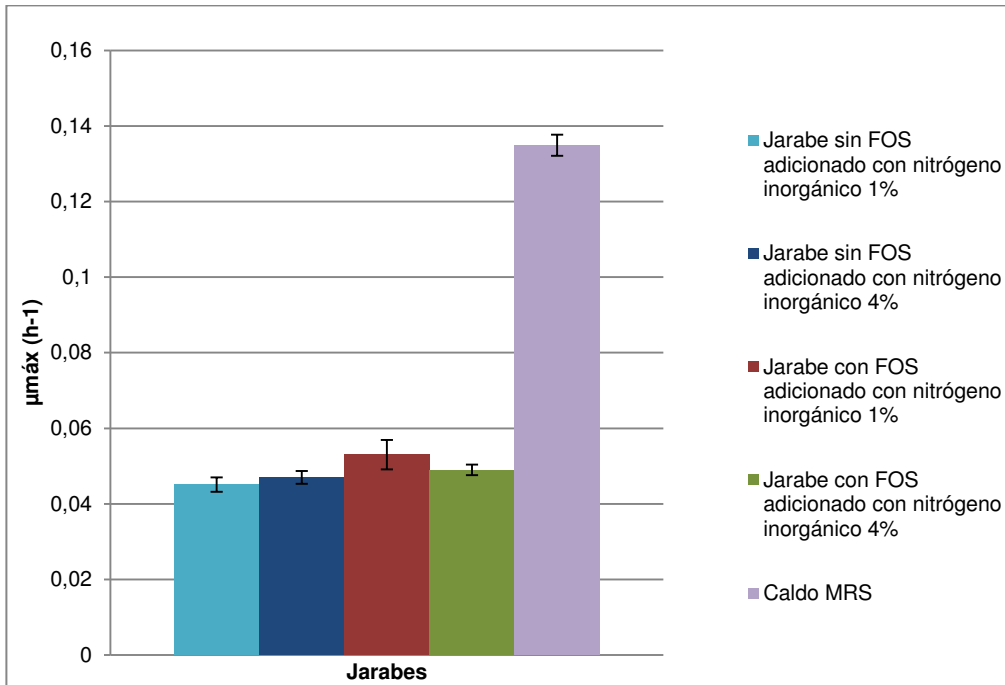


Figura 26. Máxima velocidad específica de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol adicionados con nitrógeno inorgánico.

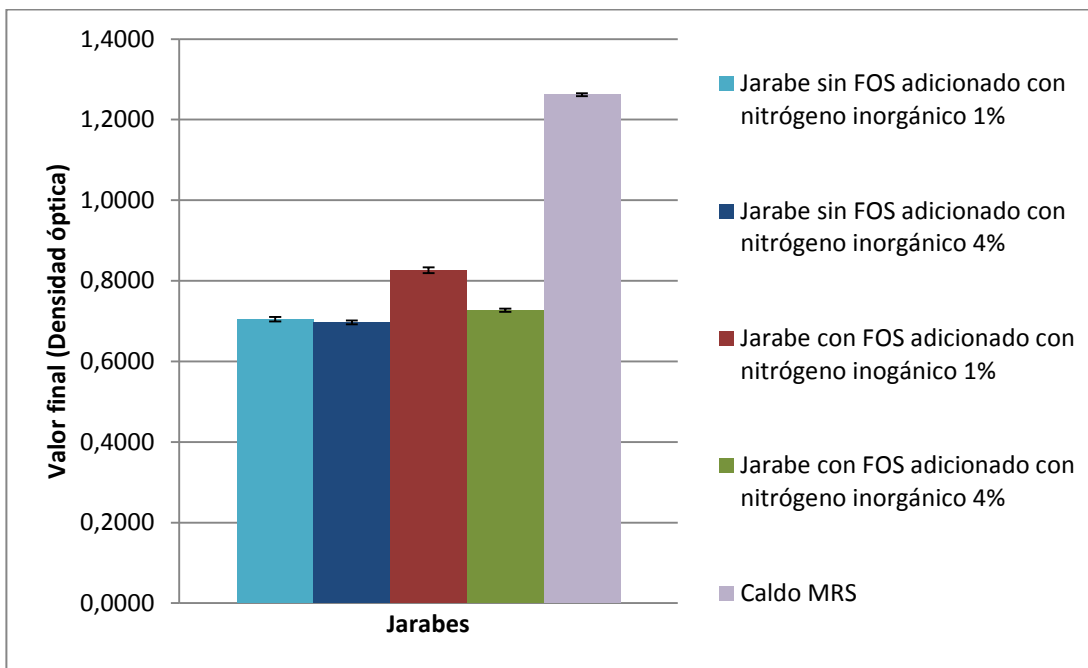


Figura 27. Valor final de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de OD de mora de Castilla adicionados con nitrógeno inorgánico.

De la figura 25 se puede observar que la fase lag tiene una duración promedio 12.6 h, excepto la fase lag del jarabe adicionado con nitrógeno inorgánico 1% que presentó 11 h, la mayor duración se sigue teniendo en caldo MRS.

De la figura 26 y 27, se puede observar que los mayores valores se tienen para el crecimiento en caldo MRS, teniendo una velocidad específica de crecimiento de  $0.13 \text{ h}^{-1}$  y un valor final de 1.26 unidades de densidad óptica. La  $\mu_{max}$  no presentó diferencias significativas entre los jarabes adicionados con fuente de nitrógeno inorgánico, teniendo un valor aproximado de  $0.04 \text{ h}^{-1}$  para los jarabes sin FOS y  $0.05 \text{ h}^{-1}$  para los jarabes con FOS, sin embargo en la figura de valor final se obtuvo que el más alto fue en el jarabe con FOS adicionado con nitrógeno inorgánico al 4% con 0.73 unidades de densidad óptica. Aunque la diferencia no es significativa, esto pudo deberse a una falta de alimento en el jarabe con nitrógeno inorgánico al 1%. Dados estos valores se obtiene que están por debajo del crecimiento en medio MRS 2.5 veces.

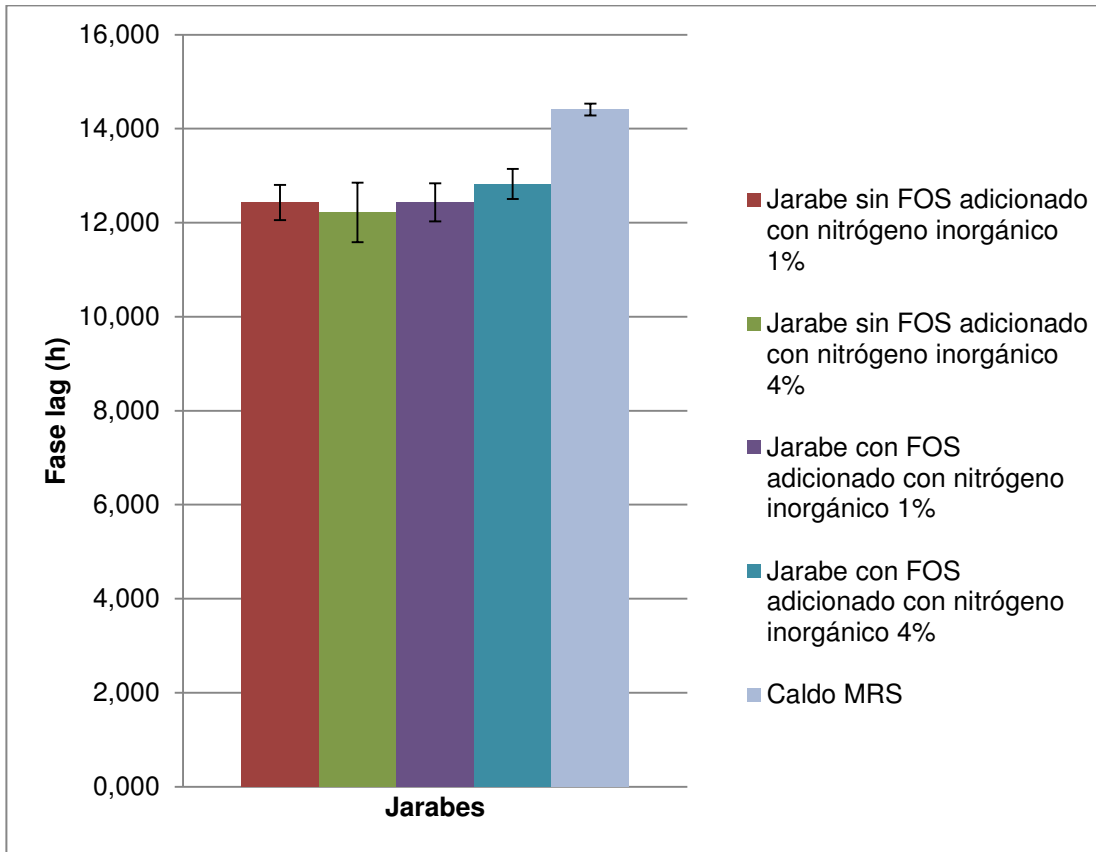


Figura 28. Fase lag de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol a adicionados con nitrógeno inorgánico.



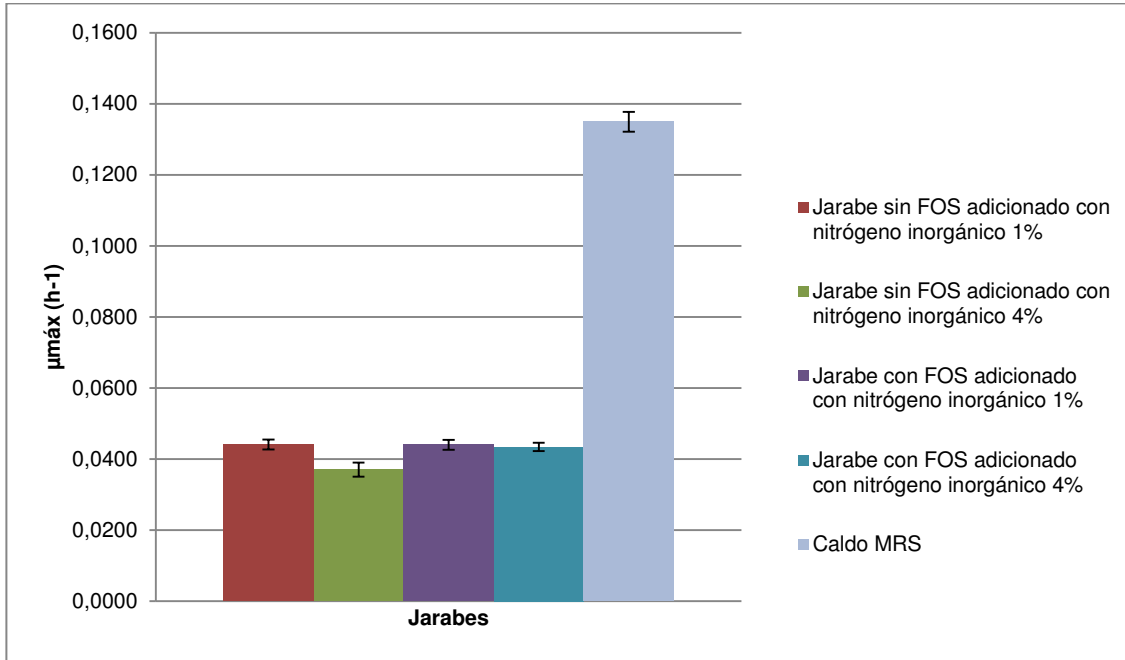


Figura 29. Máxima velocidad específica de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol adicionados con nitrógeno inorgánico.

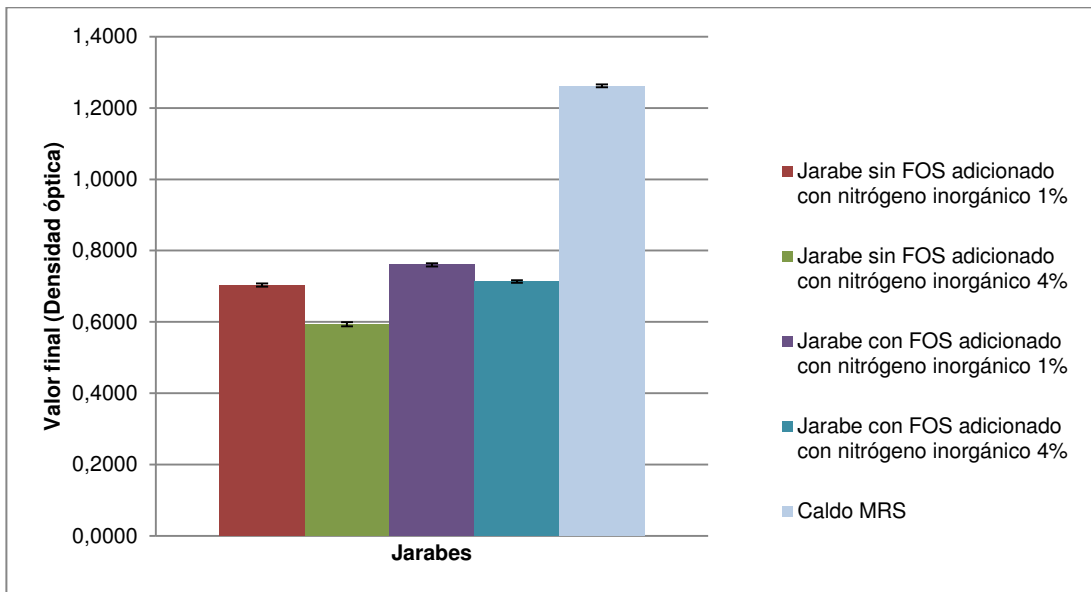


Figura 30. Valor final de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol adicionados con nitrógeno inorgánico.

De la figura 28 se puede observar que la fase lag no tiene diferencias significativas entre los jarabes presentando una duración promedio 12.4 h, la mayor duración se sigue teniendo en caldo MRS.

De la figura 29, se puede observar que al igual que en los jarabes de mora, la adición de nitrógeno inorgánico en diferente concentración no genera cambios significativos en  $\mu_{max}$ . Estos valores son similares a la máxima velocidad específica de los jarabes que no tenían adición de nitrógeno inorgánico, lo que indica que este compuesto no tiene un efecto apreciable en el crecimiento de *L. plantarum*.

Como conclusión de esta fase del estudio se obtuvo que la adición de nitrógeno inorgánico (Cloruro de amonio), no aumenta el crecimiento de *L. plantarum* en la misma magnitud que lo hace la adición de nitrógeno orgánico en las mismas concentraciones. También pudo verse que la máxima velocidad específica de crecimiento no se ve afectada significativamente con el aumento de las concentraciones estudiadas, pero se ve un descenso en la cantidad de población final lograda, encontrando un efecto inverso con la concentración, es decir, a mayores concentraciones se disminuye la población final.

Dado que los mejores resultados a microescala se obtuvieron con los jarabes con adición de nitrógeno orgánico (extracto de levadura), se decidió realizar experimentación a mayor tamaño para la determinación de curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de castilla y tomate de árbol sin y con FOS y adicionados con nitrógeno orgánico a nivel de obtención de biomasa.

### **7.3 ENSAYOS PARA DETERMINACIÓN DE CURVA DE CRECIMIENTO POR PESO SECO DE *L. plantarum* EN JARABES CON FOS Y SIN FOS ADICIONADO CON NITRÓGENO ORGÁNICO**

Para determinar la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla y tomate de árbol sin y con FOS adicionado con nitrógeno orgánico se hizo la experimentación como se describe en el numeral 6.3

Las figuras 31 y 32 muestran los resultados obtenidos para los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla y tomate de árbol sin FOS y con FOS obtenidos por vía fermentativa adicionados con nitrógeno orgánico (extracto de levadura) y las curvas se muestran respecto al control positivo, caldo MRS. De las figuras se observa la fase lag que tiene una duración aproximadamente de 12 h, la fase exponencial que oscila entre 12 y 24 h. Estos valores se aproximan a los obtenidos para las mismas condiciones en los ensayos hechos a nivel micro. Se pueden apreciar cantidades de biomasa alcanzadas para el caldo MRS alrededor de 5.2 g/L; para los jarabes de mora de castilla se alcanzaron valores de 3.1 y 3.7 g/L para los jarabes sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa, respectivamente. Para el caso de los jarabes de tomate de árbol se tienen valores de 2.7 y 2.8 g/L para los jarabes sin y con FOS obtenidos por vía fermentativa, respectivamente.

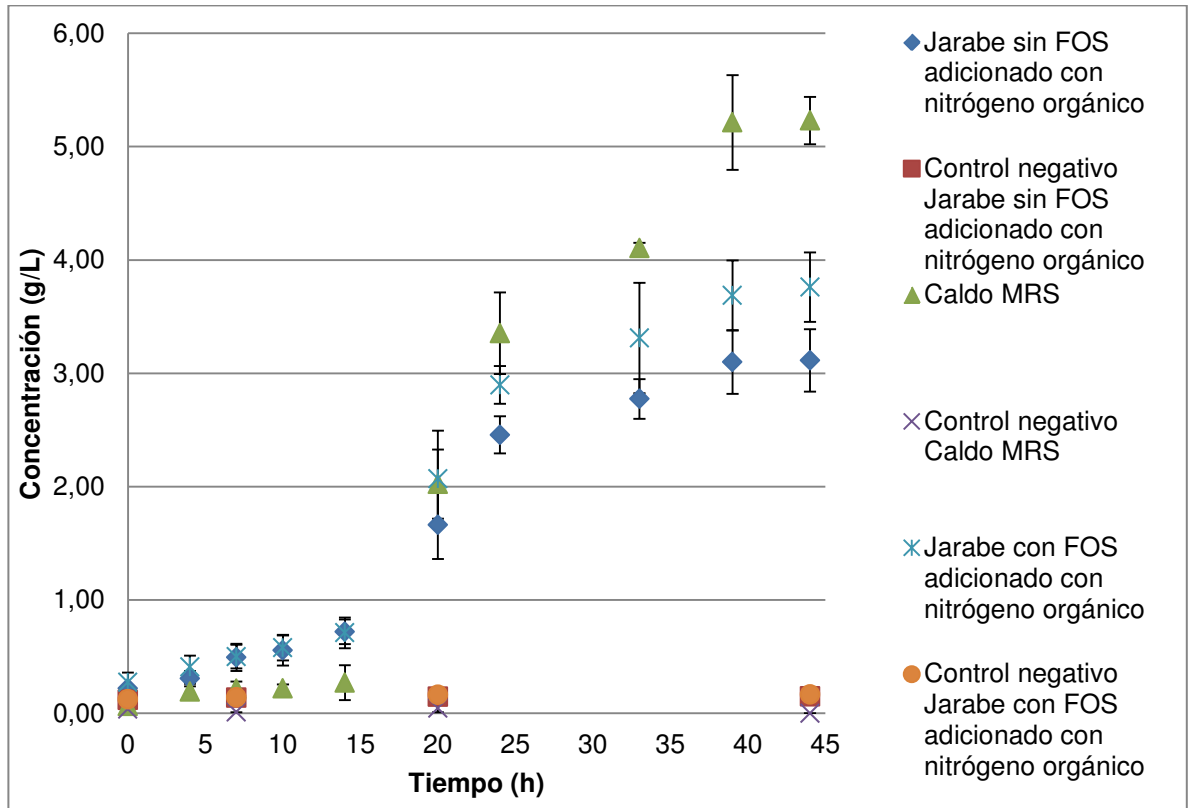


Figura 31. Curva de crecimiento de BAL *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de Mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco.

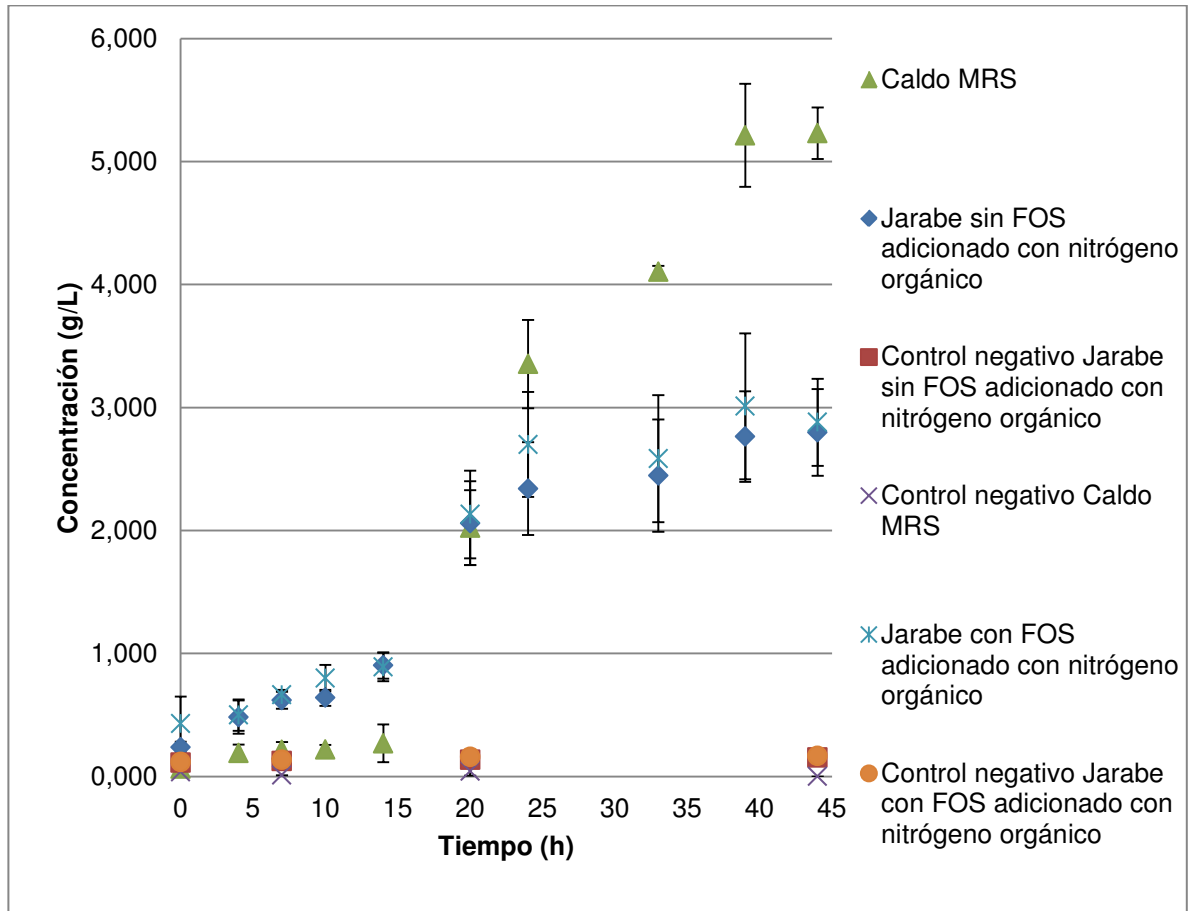


Figura 32. Curva de crecimiento de BAL *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS adicionado con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco.

De las figuras 31 y 32 se puede observar, al igual que los ensayos en bioscreen, la mayor obtención de biomasa (g/L) de *L. plantarum* fue en caldo MRS. Se observa, que para los jarabes de mora de Castilla el mayor crecimiento sigue siendo en jarabes con FOS obtenidos por vía fermentativa. En el caso de los jarabes de tomate de árbol no se observan diferencias significativas entre el crecimiento de *L. plantarum* en los jarabes con FOS y sin FOS, al igual que lo evidenciado en los ensayos a nivel micro, quedando así, 1.6 y 1.8 veces respectivamente para los

jarabes de mora y tomate de árbol, por debajo del crecimiento en caldo MRS. Lo que indica como se mencionó en los ensayos en bioscreen que los FOS y la adición de nitrógeno sí estimulan el crecimiento de *L. plantarum*.

Las gráficas 33 y 34 muestran las UFC/ml, correspondientes para las curvas de crecimiento de *L. plantarum* por biomasa en los jarabes de mora y tomate respectivamente, calculadas a partir de la curva de calibración descrita en el anexo 3.

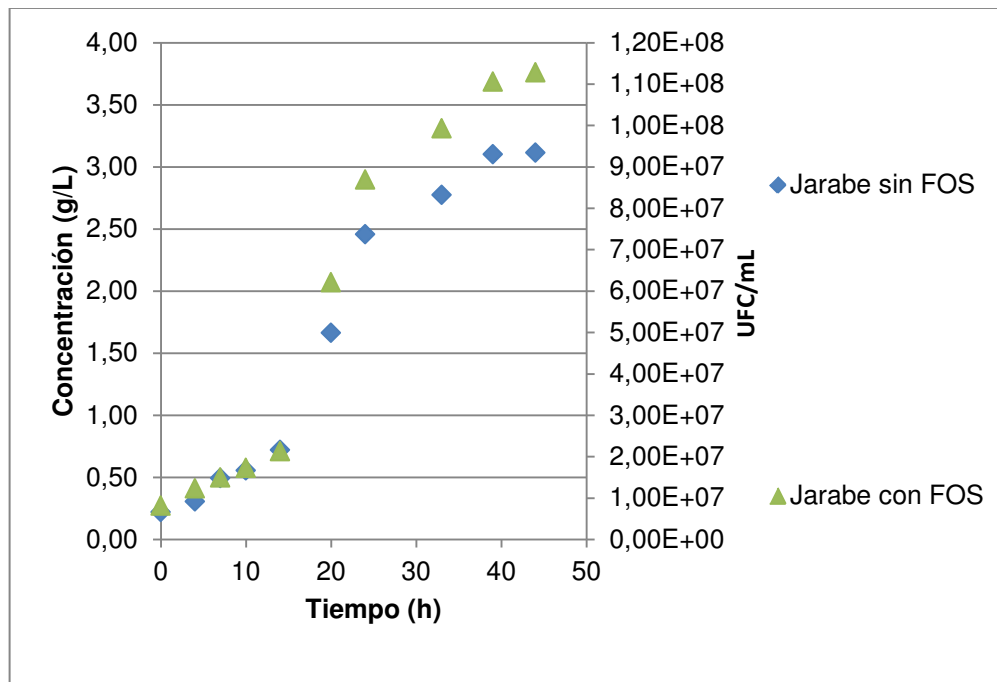


Figura 33. UFC/mL de *L. plantarum* correspondientes a la biomasa obtenida en los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico a nivel de peso seco.

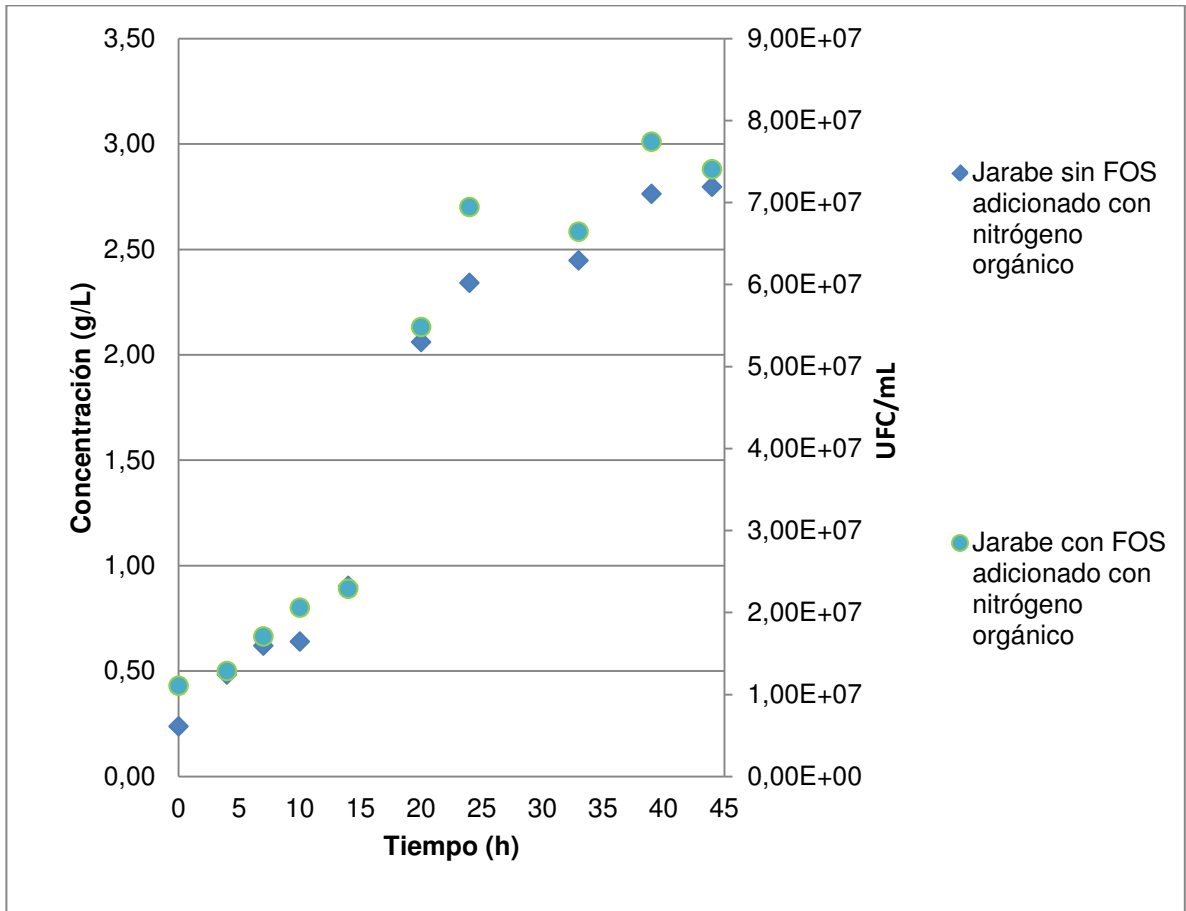


Figura 34. UFC/mL de *L. plantarum* correspondientes a la biomasa obtenida en los jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico a nivel de peso seco.

De la figura 33 y 34 se puede observar que los UFC/mL más altos se encuentran en los jarabes de mora con FOS adicionados con nitrógeno orgánico, mostrando que el crecimiento de *L. plantarum* sigue siendo mejor en este jarabe.

### 7.3.1 Modelado matemático de las curvas de crecimiento por peso seco de *L. plantarum* en jarabes provenientes de la DO con FOS y sin FOS adicionados con nitrógeno orgánico

Para comparar entre tratamientos se realizó un ajuste con la aplicación DMFit como se describió en el numeral 6.4.1. Se obtuvieron ajustes del modelo de Baranyi & Roberts, (1994) satisfactorios obteniendo  $R^2$  de 0.98, 0.97 y 0.97, para jarabes de mora de Castilla, tomate de árbol y caldo MRS, respectivamente. La fase lag, velocidad específica y punto final de crecimiento se muestra en las figuras 35, 36 y 37 para los jarabes provenientes de DO de mora sin FOS y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico, y las figuras 38, 39 y 40 para los jarabes de tomate de árbol.

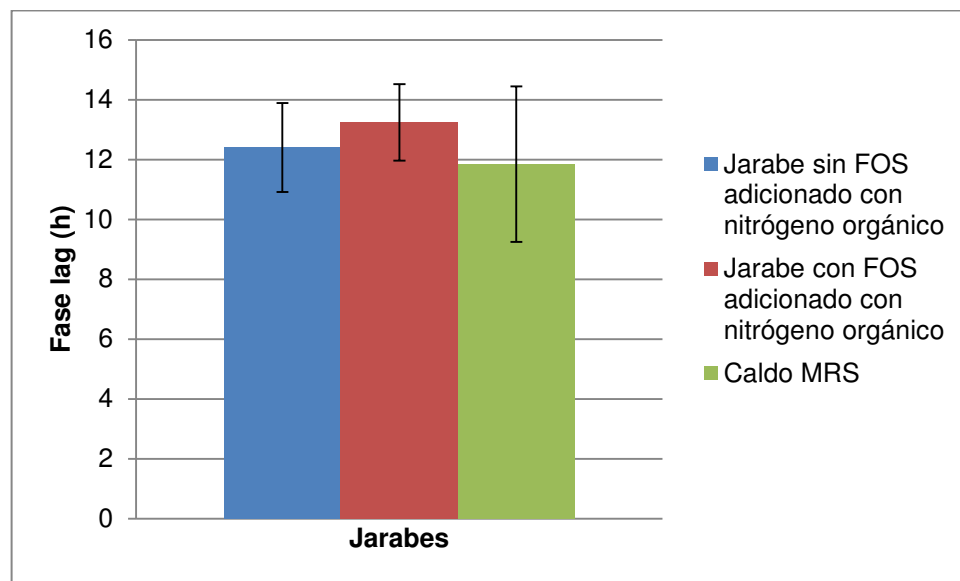


Figura 35. Fase lag de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco.



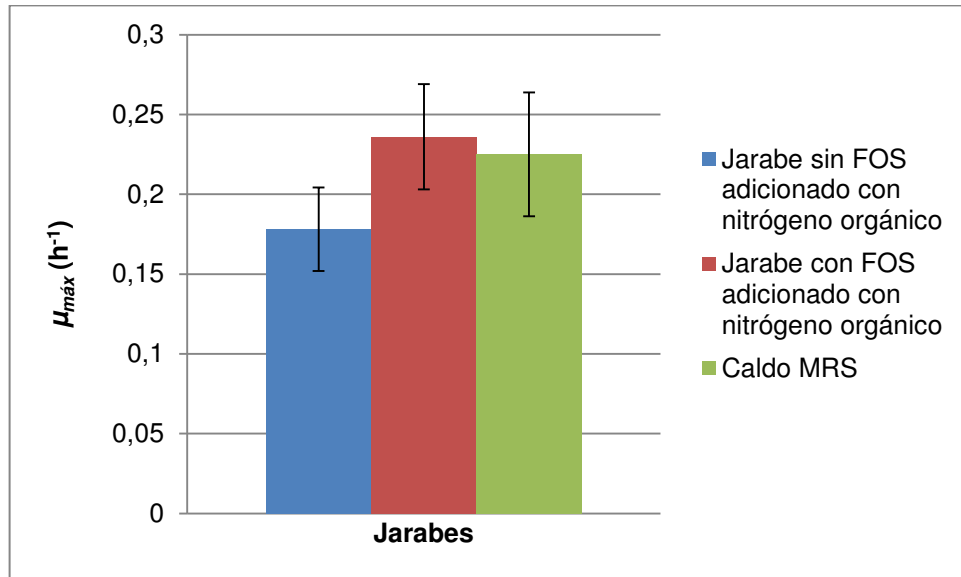


Figura 36. Máxima velocidad específica de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco.

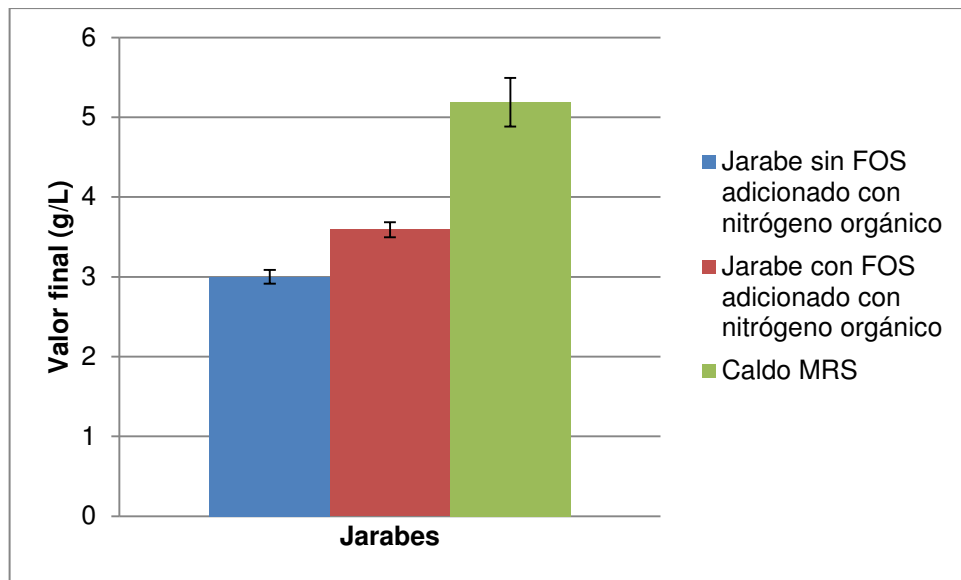


Figura 37. Valor final de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco.

La figura 35 muestra que no hay diferencias significativas en la duración de la fase lag para los tres medios estudiados.

De la figura 36, se observa que no hay diferencias significativas entre los valores de la máxima velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) de los jarabes estudiados y el caldo MRS, y se obtienen valores de  $0.23 \text{ h}^{-1}$  y  $0.22 \text{ h}^{-1}$ , para el jarabe con FOS obtenidos por vía fermentativa y MRS respectivamente .

Por otro lado, en la figura 37 se evidencia que la concentración final de *L. plantarum* si presenta diferencias significativas entre los jarabes con FOS y los jarabes sin FOS, de igual forma estos dos jarabes presentan diferencias significativas con el caldo MRS. Para el caso de la concentración final de *L. plantarum* predicha por el modelo de Baranyi y Roberts (1994) en el jarabe con FOS fue  $3.59 \text{ g/L}$ , mientras en el jarabe sin FOS la concentración final de *L. plantarum* fue  $3.00 \text{ g/L}$ . Por lo que puede concluirse que, para el caso de los jarabes de mora, la presencia de FOS obtenidos por vía fermentativa y la adición de fuente de nitrógeno orgánico tienen un impacto positivo en el crecimiento de *L. plantarum*, lo que reafirma el resultado obtenido en el trabajo a microescala.

Las figuras 38, 39 y 40 muestran los resultados obtenidos para los jarabes de tomate de árbol.

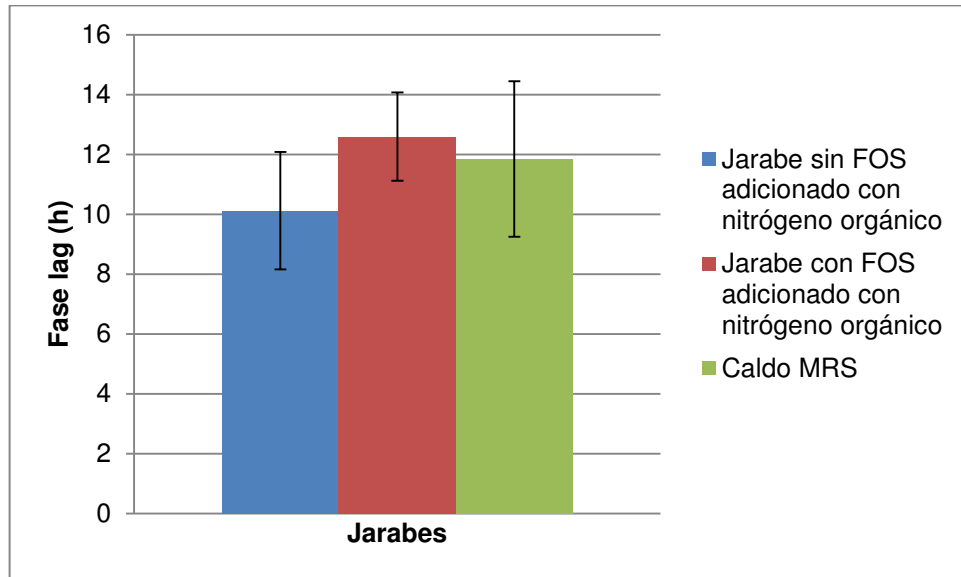


Figura 38. Fase lag de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco.

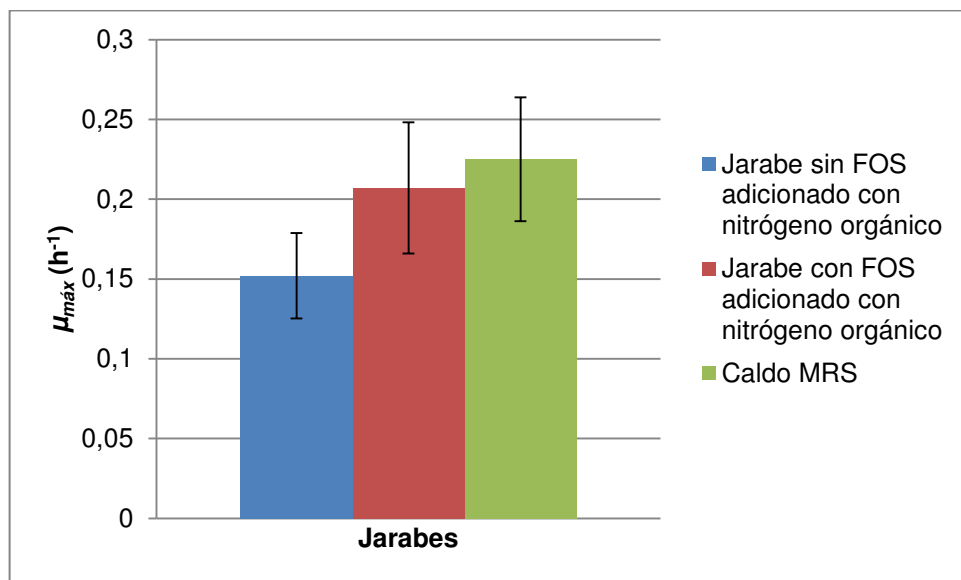


Figura 39. Máxima velocidad específica de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco

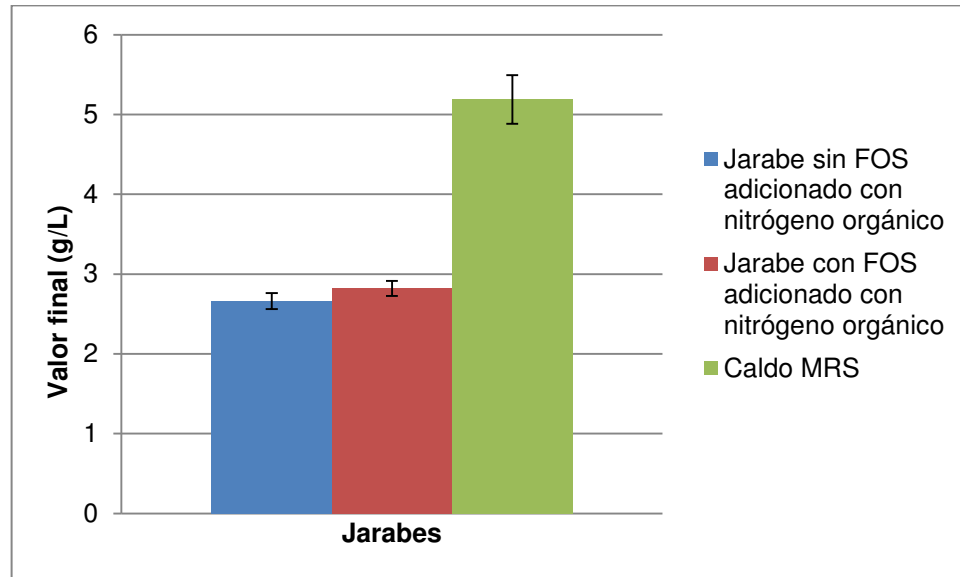


Figura 40. Valor final de la curva de crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico con respecto al caldo MRS, según peso seco.

Se puede observar en la figura 38 que el valor de la fase lag es mayor en los jarabes con FOS que sin FOS. Este comportamiento también se observó en los jarabes de mora de Castilla.

De la figura 39 y 40, se observa que los mayores valores de velocidad específica y densidad óptica se obtienen en caldo MRS, con valores de  $0.22 \text{ h}^{-1}$  y  $5.18 \text{ g/L}$  respectivamente. La máxima velocidad específica en los jarabes con FOS es muy similar que la obtenida para el caldo MRS, sin embargo en el punto final se obtiene un valor de  $2.82 \text{ g/L}$ , 1.8 veces por debajo del crecimiento de *L. plantarum* en caldo MRS.

Este comportamiento es muy similar al obtenido en microescala, confirmando que los jarabes con FOS obtenidos con el hongo *Aspergillus oryzae* y adicionados con

nitrógeno orgánico sí favorecen el crecimiento, pero deben mejorarse para lograr uno similar al obtenido en caldo MRS.

### **7.3.2 Resultados de consumo de nitrógeno**

Se determinó el consumo de nitrógeno como se describió en el numeral 6.3.2. Para ninguno de los jarabes se presentaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el inicio y el final del crecimiento de la *L. plantarum*, lo que indicaría que las cantidades de nitrógeno utilizadas fueron adecuadas, ya que no se presentó agotamiento de ellas.

En las figuras 41 y 42 se presentan los resultados para los jarabes provenientes de DO de mora de Castilla y tomate de árbol respectivamente. En las figuras se observa que se presenta una disminución en la concentración de nitrógeno entre la hora 0 y la hora 44, como era de esperarse, pero también se evidencia que la diferencia no es significativa, mostrando que no se agota el reactivo durante el crecimiento de la BAL. Debe destacarse que en el caso de los controles negativos la cantidad de nitrógeno permanece igual al inicio y al final, lo que sugiere que no había presencia importante de otros microorganismos en los jarabes.

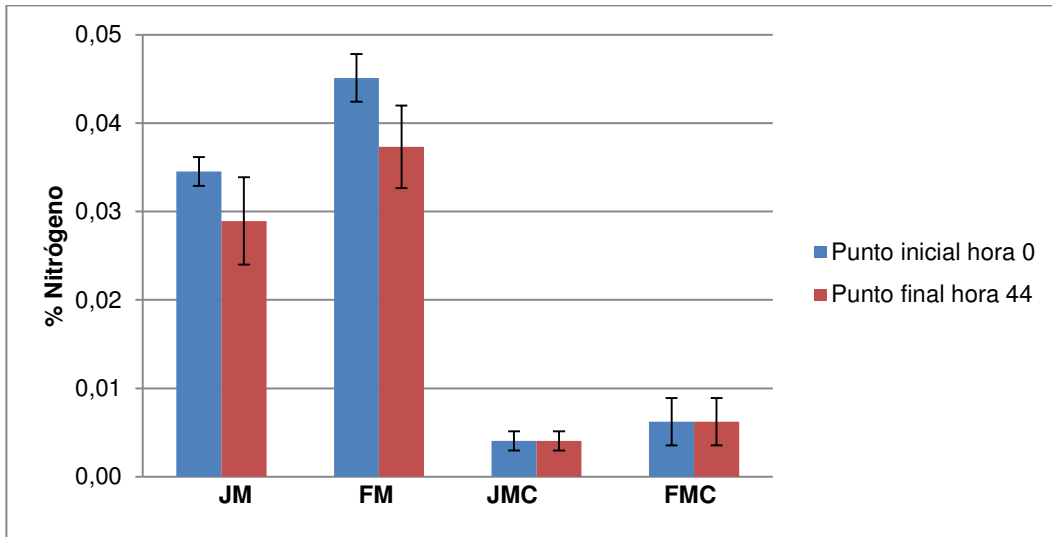


Figura 41. Consumo de nitrógeno punto inicial y final del crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla a nivel de peso seco. JM: Jarabe sin FOS; FM: Jarabes con FOS; JMC: Control negativo jarabe sin FOS; FMC: Control negativo jarabe con FOS.

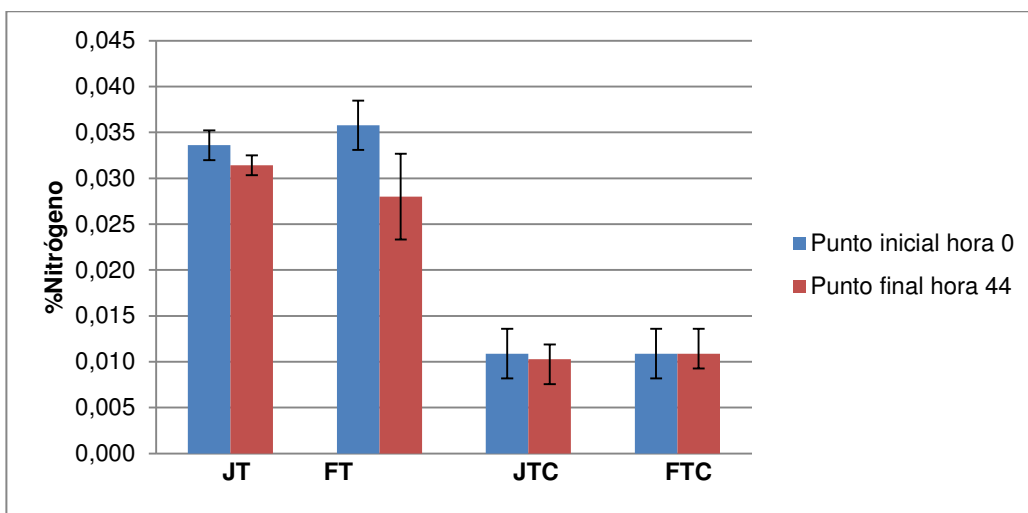


Figura 42. Consumo de nitrógeno punto inicial y final del crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol a nivel de peso seco. JT: Jarabe sin FOS; FT: Jarabe con FOS; JTC: Control negativo jarabe sin FOS; FTC: Control negativo jarabe con FOS.

Debe resaltarse de las figuras anteriores que para los jarabes, tanto de mora de Castilla, como de tomate de árbol, la disminución en la cantidad de nitrógeno es más elevada en los jarabes que tienen FOS obtenidos por vía fermentativa, respecto a los jarabes que no los contienen, siendo este efecto mayor para el caso de los jarabes de mora de Castilla, lo que coincide con lo observado en los ensayos a nivel micro, lo que lleva a concluir que la adición de nitrógeno orgánico tiene un efecto “sinérgico” para ayudar al crecimiento de la *L. plantarum* en presencia de FOS obtenidos por vía fermentativa.

### 7.3.3 Resultados de consumo de FOS

Para determinar el consumo de FOS se realizó HPLC como se describió en el numeral 6.3.3, obteniéndose los resultados para el punto inicial (hora 0) y punto final (hora 44) de la fermentación, mostrados en las figuras 43, 44 y 45 y 46 para jarabes de mora y tomate de árbol respectivamente.

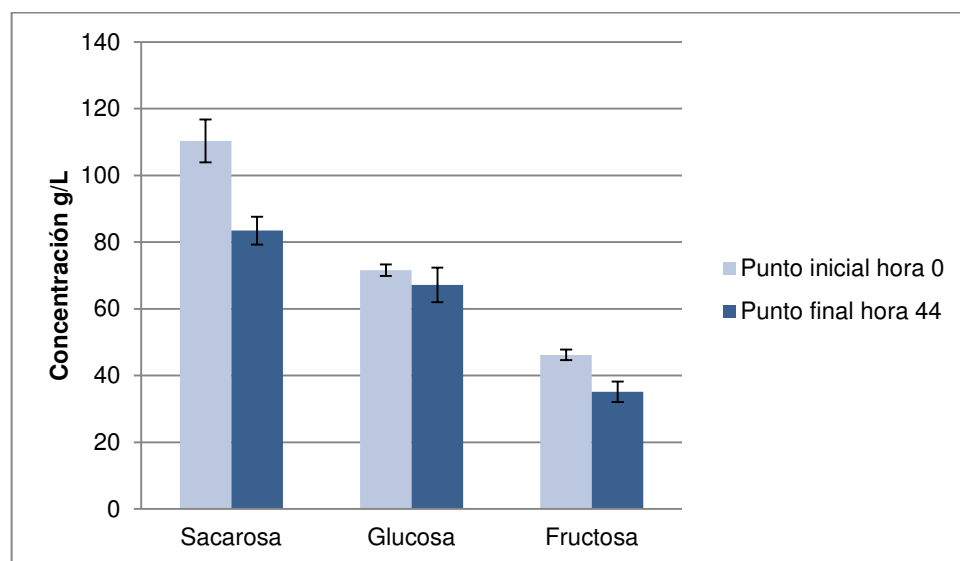


Figura 43. Concentración inicial y final de sacarosa, glucosa y fructosa para jarabes provenientes de DO de mora de Castilla, durante el crecimiento de *L. plantarum*

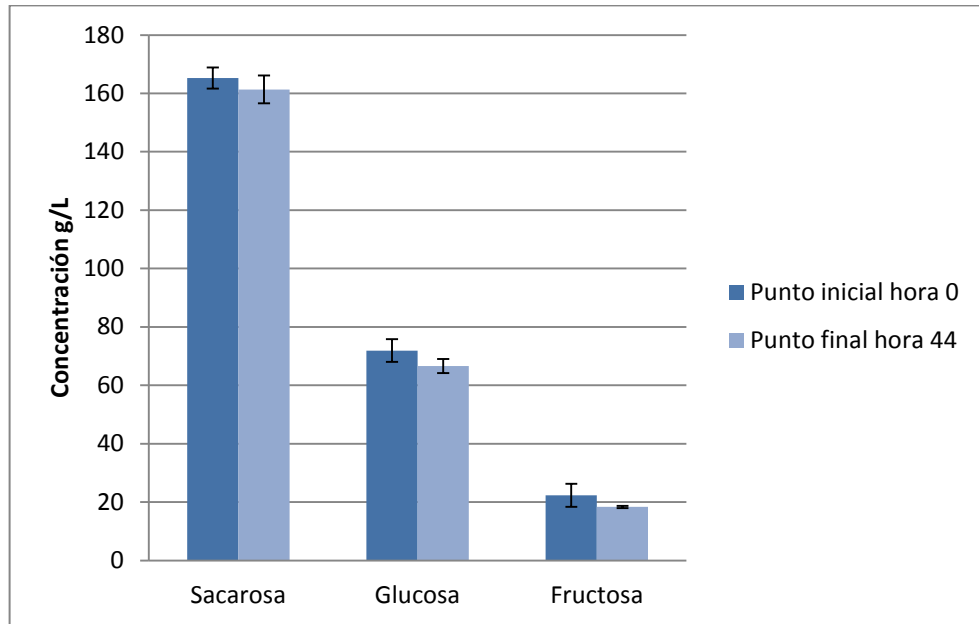


Figura 44. Concentración inicial y final de sacarosa, glucosa y fructosa para jarabes provenientes de DO de tomate de árbol durante el crecimiento de *L. Plantarum*

De la figura 43, puede observarse que hubo un consumo de los tres carbohidratos caracterizados, como era de esperarse, sin embargo, solamente la sacarosa y la fructosa presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el inicio y el final del crecimiento de *L. plantarum*. En el caso de la disminución de sacarosa, puede deberse a una hidrólisis enzimática por el metabolismo de *L. plantarum*, produciendo glucosa y fructosa; por otro lado como se indica en la literatura (Saulnier, Molenaar, De Vos, Gibson, & Kolida, 2007), para bacterias *L. plantarum* es más conveniente el consumo de fructosa que el de la glucosa para realizar la glicólisis, lo que podría explicar mayor concentración de glucosa en los jarabes de estudio.

En el caso de los jarabes provenientes de la DO de tomate de árbol aunque se ve una disminución en los tres azúcares, no hay diferencia significativa en la



concentración de los mismos entre los puntos iniciales y finales ( $p < 0.05$ ), este resultado estaría acorde con el menor crecimiento de *L. plantarum* obtenido en este jarabe respecto al crecimiento obtenido en los jarabes provenientes de la DO de mora de Castilla.

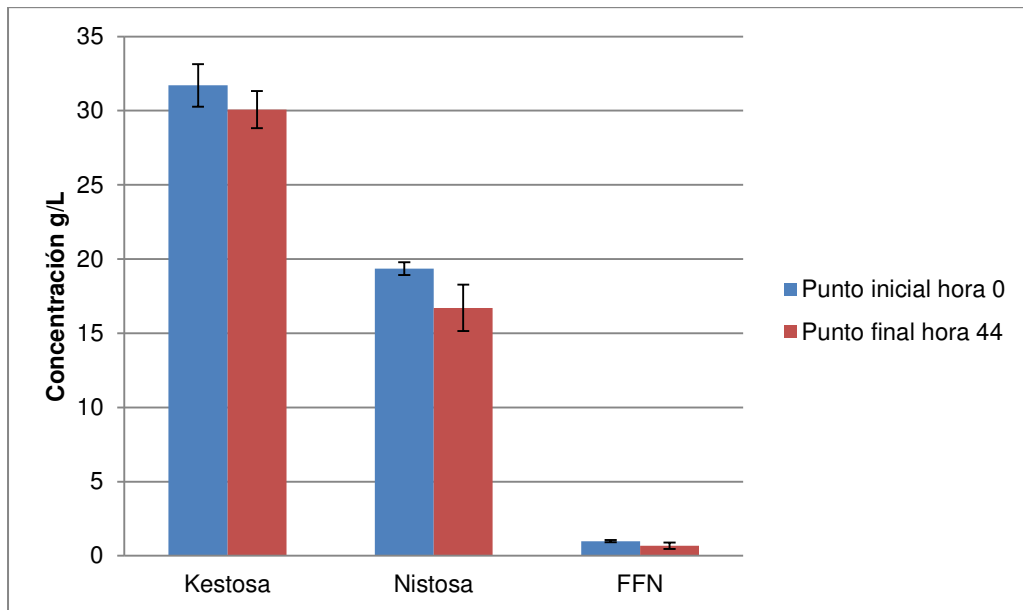


Figura 45. Concentración inicial y final de kestosa, nistosa y FFN en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla.

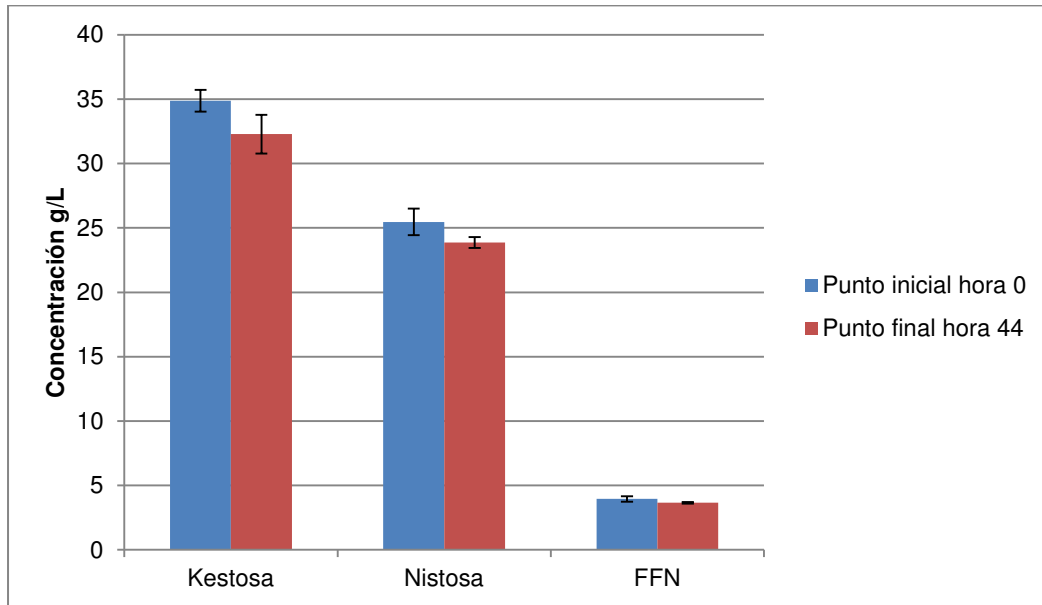


Figura 46. Concentración inicial y final de kestosa, nistosa, FFN, sacarosa, glucosa y fructosa en jarabes provenientes de DO de tomate de árbol.

De las figuras 45 y 46 se puede observar que para los jarabes de mora de Castilla, la nistosa presentó diferencias significativas entre el inicio y el final del crecimiento de *L. plantarum* ( $p < 0.05$ ), lo que hace pensar que es la ingesta de éste el que genera el efecto de mayor crecimiento que presenta *L. plantarum*.

Por otro lado, en el caso de los jarabes de tomate de árbol con FOS obtenidos por vía fermentativa, no se observan cambios significativos en las concentraciones. Si esta combinación de *L. plantarum* y azúcares con efecto prebiótico fuera a ser utilizada como base para alimentos simbióticos, podría decirse que es efectiva para los dos jarabes, pero principalmente para los jarabes de mora de Castilla, ya que se alcanzan crecimientos importantes de la bacteria sin cambiar de manera importante el perfil de prebióticos que contiene el jarabe. También se debe tener en cuenta que para este caso el uso de los FOS obtenidos por vía fermentativa son los que estimulan el crecimiento de la *L. plantarum* con respecto al uso de los

FOS comerciales que no mostraron buenos resultados, pero esto, como se mencionó anteriormente se afecta con la concentración.

## 7.4 RESUMEN DEL MODELADO MATEMÁTICO

Para determinar los parámetros de crecimiento, fase lag, velocidad máxima específica de crecimiento y valor final, los datos se ajustaron en la aplicación DMFit, que utiliza el modelo de Baranyi & Roberts, 1994 (ecuación 8).

$$y(t) = y_0 + \mu_{m\acute{a}x}t + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \ln(e^{-v^*t} + e^{-h_0} - e^{-v^*t-h_0}) - \frac{1}{m} \ln\left(1 + \frac{e^{mt\mu_{m\acute{a}x} + \frac{1}{\mu_{m\acute{a}x}} \ln(e^{-v^*t} + e^{-h_0} - e^{-v^*t-h_0})} - 1}{e^{m(y_{m\acute{a}x} - y_0)}}\right)$$

Ecuación 8. Modelo de Baranyi & Roberts (1994).

Donde  $y(t)$  es la concentración celular o el diámetro de las colonias,  $y_0$  es la concentración o diámetro inicial,  $\mu_{m\acute{a}x}$  velocidad específica de crecimiento  $h^{-1}$ ,  $m$  es un parámetro de curvatura para caracterizar la transición de la fase exponencial,  $v$  es un parámetro de curvatura para caracterizar la transición de la fase exponencial y  $h_0$  es un parámetro adimensional que cuantifica el estado fisiológico inicial de las células. De donde el tiempo de latencia  $h$  es calculado como  $h_0/\mu_{m\acute{a}x}$ .

El ajuste del modelo a los datos, se realizó tanto para los jarabes evaluados a microescala como para los que se realizaron en tubos falcon a nivel de peso seco y se obtuvieron buenos ajustes con  $R^2$  entre 0.97 y 0.99.

Tabla 11. Parámetros cinéticos obtenidos para el crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de DO de mora de Castilla y tomate de árbol a nivel microescala.

JARABE DE MORA				JARABE DE TOMATE		
	Fase lag (h)	$\mu_{m\acute{a}x}(h^{-1})$	Valor final	Fase lag (h)	$\mu_{m\acute{a}x}(h^{-1})$	Valor final
<b>MRS</b>	14.41±0.13	0.13±0.00	1.27±0.00	14.41±0.13	0.13±0.00	1.27±0.00
<b>sin FOS</b>	12.57±0.34	0.04±0.00	0.64±0.00	12.84±0.40	0.04±0.00	0.70±0.00
<b>con FOS</b>	11.65±0.49	0.06±0.00	0.80±0.00	12.41±0.59	0.04±0.00	0.68±0.00
<b>sin FOS adicionado con nitrógeno orgánico</b>	12.56±0.30	0.07±0.00	0.97±0.00	12.17±0.38	0.07±0.00	0.99±0.01
<b>con FOS adicionado con nitrógeno orgánico</b>	12.86±0.36	0.09±0.00	1.08±0.01	12.34±0.37	0.07±0.00	1.03±0.01
<b>sin FOS adicionado con nitrógeno inorgánico 1g/L</b>	12.96±0.42	0.04±0.00	0.70±0.00	12.43±0.37	0.04±0.00	0.70±0.00
<b>con FOS adicionado con nitrógeno inorgánico 1g/L</b>	11.02±0.87	0.05±0.00	0.83±0.01	12.43±0.40	0.04±0.00	0.76±0.00
<b>sin FOS adicionado con nitrógeno inorgánico 4g/L</b>	12.76±0.39	0.05±0.00	0.70±0.00	12.22±0.63	0.04±0.00	0.59±0.00
<b>con FOS adicionado con nitrógeno inorgánico 4g/L</b>	12.46±0.31	0.05±0.00	0.73±0.00	12.83±0.32	0.04±0.00	0.71±0.00

De la tabla 11 se puede observar que la fase lag es muy similar para todos los jarabes y las mayores  $\mu_{m\acute{a}x}$  se obtuvieron en jarabes con FOS adicionados con nitrógeno orgánico al igual que valores finales de densidad óptica. Sin embargo los valores más altos se obtuvieron en caldo MRS.

Así mismo se obtuvieron los parámetros para el crecimiento de *L. plantarum* en los jarabes provenientes de DO de mora y tomate sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico a nivel de biomasa.

Tabla 12. Parámetros cinéticos obtenidos para el crecimiento de *L. plantarum* en jarabes provenientes de OD de mora de Castilla y tomate de árbol a nivel biomasa.

	JARABE DE MORA			JARABE DE TOMATE		
	Fase lag (h)	$\mu_{m\acute{a}x}(h^{-1})$	Valor final	Fase lag (h)	$\mu_{m\acute{a}x}(h^{-1})$	Valor final
<b>MRS</b>	11.85±2.60	0.22±0.04	5.19±0.30	11.85±2.60	0.22±0.04	5.19±0.30
<b>sin FOS adicionado con nitrógeno orgánico</b>	12.40±1.49	0.18±0.03	2.99±0.09	10.11±2.60	0.15±0.03	2.66±0.10
<b>con FOS adicionado con nitrógeno orgánico</b>	13.24±1.28	0.24±0.03	3.59±0.09	12.60±1.48	0.21±0.04	2.82±0.09

De la tabla 12 se puede observar que la fase lag varía entre un jarabe y otro, notándose que para jarabes con FOS adicionados con nitrógeno orgánico se presentó el mayor tiempo de adaptación, al igual que los valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  y valor final después de los valores para caldo MRS. El comportamiento fue similar con respecto a los ensayos realizados a microescala.

En el estudio de Vargas et al. (2004), utilizaron como medio de cultivo para *Lactobacillus*, melaza de caña adicionado con sales y extracto de levadura y

obtuvieron como valores máximos 5.5 g/L para el crecimiento celular y  $0.1 \text{ h}^{-1}$  de  $\mu_{\text{máx}}$ , y como valores mínimos 3.5 g/L y  $\mu_{\text{máx}} 0.06 \text{ h}^{-1}$ , datos similares a los obtenidos en este trabajo. En el estudio de Agudelo et al. (2010) utilizaron un medio líquido para su posible aplicación en la fermentación de residuos pesqueros y obtuvieron resultados de 7.22 g/L y  $\mu_{\text{máx}} 0.58 \text{ h}^{-1}$  para BAL de yogurt. En cuanto a estudios de fuentes de carbono Díaz Vela, Mayorga Reyes, Totosa S, & Pérez Chabela (2012) evaluaron albedo de naranja, inulina de agave e inulina de achicoria para determinar parámetros cinéticos y el perfil de ácidos grasos de cadena corta de dos bacterias ácido lácticas: *P. pentosaceus* y *A. viridans*, mostrando que el mejor medio de crecimiento de las mismas fue en albedo de naranja con  $1.46 \text{ h}^{-1}$  y  $1.44 \text{ h}^{-1}$  respectivamente. Bustamante C. et al. (2006) determinaron el crecimiento y la tasa específica de crecimiento para varias cepas de bifidobacterias y de bacterias ácido lácticas cultivadas en glucosa, rafinosa e inulina, determinando que para BAL el crecimiento fue similar en inulina y rafinosa pero menor en glucosa y para las bifidobacterias fue mejor en rafinosa, con aproximadamente 3g/L para ambas especies, por lo que concluyeron que este prebiótico es mejor que la inulina para las distintas especies de bifidobacterias consideradas probióticas. Para evaluar el consumo de FOS de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* Kaplan & Hutkins (2000) las evaluaron en medio MRS adicionado con FOS y concluyeron que 12 de las 16 cepas que utilizaron los FOS como fuente de carbono al igual que 8 de las 7 cepas que utilizaron de *Bifidobacterium*, pero ninguna cepa consumió GF4 (FFN). Se puede observar que los parámetros cinéticos varían dependiendo la BAL, las condiciones de inoculación y el medio que se utilice.

## 8. CONCLUSIONES

De los jarabes estudiados como medio de crecimiento para *L. plantarum*, la presencia de FOS obtenidos por vía fermentativa estimula el crecimiento de la bacteria solamente en los jarabes provenientes de la DO de mora de Castilla. En el caso de los jarabes provenientes de DO de tomate de árbol y con FOS obtenidos por vía fermentativa no se estimula el crecimiento de *L. plantarum*.

La fuente de nitrógeno orgánico estudiada resulta ser de importancia para aumentar el crecimiento de *L. plantarum* en los jarabes estudiados, ya que su presencia eleva 1.5 veces el crecimiento de la bacteria.

Se pudo observar que la adición de nitrógeno orgánico (extracto de levadura) estimuló el crecimiento en *L. plantarum* mostrando mejores resultados con respecto a la adición de nitrógeno inorgánico (Cloruro de amonio).

*L. plantarum* mostró un leve crecimiento en presencia de fuente de nitrógeno inorgánico, sin embargo no fue significativo entre las concentraciones utilizadas.

La presencia de fuente de nitrógeno y de FOS obtenidos por vía fermentativa estimula de manera positiva el crecimiento de *L. plantarum*, este efecto “sinérgico” es en especial notorio en los jarabes de mora de Castilla.

El tipo de fruta que se osmodeshidrata en el jarabe tiene influencia en el crecimiento posterior de *L. plantarum*.

Las curvas de crecimiento de *L. plantarum* fueron modeladas adecuadamente con el modelo de Baranyi y Roberts, obteniendo para todos los casos valores de  $R^2$  de 0.97 y 0.98.

Los ensayos a nivel micro y los realizados para la determinación de la curva de crecimiento en peso de biomasa g/L, arrojaron resultados similares en lo relacionado con duración de la fase lag que fue aproximadamente 12 h , duración de la fase exponencial que osciló entre 12 y 24 h, y en general para comparar entre los diferentes jarabes evaluados.

Es posible la utilización de los jarabes estudiados para la producción de *L. plantarum*, sin embargo es necesario enriquecer más el medio para lograr el crecimiento que se obtiene en el medio MRS.

La mezcla obtenida de *L. plantarum* y jarabe con fructooligosacáridos podría ser utilizada como base para formulación de alimentos simbióticos, ya que propicia el crecimiento de la bacteria a niveles elevados de biomasa, sin alterar de manera apreciable el perfil de FOS estudiados.



## 9. RECOMENDACIONES

Evaluar el crecimiento de *L. plantarum* variando grados Brix y concentración de FOS, ya que los resultados sugieren que el crecimiento se afecta con estas concentraciones.

El estudio de la concentración de nitrógeno inorgánico no obtuvo buenos resultados, sin embargo se podría evaluar en más detalle para desarrollar base de alimento para animales, con el fin de buscar muchas más aplicaciones para los probióticos.

Ya que la adición de nitrógeno orgánico favorece el crecimiento de *L. plantarum*, se podrían evaluar otras fuentes, como el extracto de carne y la peptona, para observar si se afecta el crecimiento con este cambio.

Dadas las diferencias de crecimiento de *L. plantarum* presentadas en los jarabes, se recomienda hacer pruebas para las frutas tales como contenido de nitrógeno, cantidad de minerales, vitaminas y carbohidratos y así determinar si las características de cada una de ellas afecta este crecimiento.

Realizar otros estudios, como la determinación y cuantificación de ácido láctico ya que éstos influyen en el crecimiento de la BAL.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Aachary, A. A., & Prapulla, S. G. (2009). Value addition to spent osmotic sugar solution (SOS) by enzymatic conversion to fructooligosaccharides (FOS), a low calorie prebiotic. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *10*(2), 284–288.
- AGUDELO, C., ORTEGA, R., & HOYOS, J. L. (2010). Determinación de parámetros cinéticos de dos inóculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y Bacterias ácido lácticas de yougurt. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *8*, 8–16.
- Altaf, M., Naveena, B. J., & Reddy, G. (2007). Use of inexpensive nitrogen sources and starch for l(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. *Bioresource Technology*, *98*(3), 498–503. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2006.02.013>
- Azuara, E., Beristain, C. I., & Guti, G. F. (1998). A Method for Continuous Kinetic Evaluation of Osmotic Dehydration. *LWT - Food Science and Technology*, *31*, 317–321.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). Review Paper A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, *23*, 277–294.
- Bañuelos, O., Fernández, L., Corral, J. M., Valdivieso-Ugarte, M., Adrio, J. L., & Velasco, J. (2008). Metabolism of prebiotic products containing beta(2-1) fructan mixtures by two *Lactobacillus* strains. *Anaerobe*, *14*(3), 184–9.
- Begot, C., Desnier, I., Daudin, J. D., Labadie, J. C., & Lebert, A. (1996). Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. *Journal of microbiological methods*, *25*, 225–232.
- Bornet, F. R. J., Brouns, F., Tashiro, Y., & Duvallier, V. (2002). Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: natural occurrence, chemistry, physiology and health implications. *Digestive and Liver Disease*, *34*, Supple, S111 – S120.
- Bustamante C., P., Mayorga R., L., Ramírez S., H., Martínez C., P., Barranco F., E., & Azaola E., A. (2006). Evaluación microbiológica de compuestos con actividad prebiótica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, *37*, 5–10.

- Champagne, C. P., & Gardner, N. J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 41(5), 539–543.
- Chiralt, A., & Talens, P. (2005). Physical and chemical changes induced by osmotic dehydration in plant tissues. *Journal of Food Engineering*, 67(1–2), 167–177.
- Dalgaard, P., & Koutsoumanis, K. (2001). Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of microbiological methods*, 43(3), 183–96.
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. *Journal of Applied Microbiology*, 23(1), 130–135.
- Djelveh, G., Gros, J.-B., & Emam-Djomeh, Z. (2001). Osmotic Dehydration of Foods in a Multicomponent Solution Part II. Water Loss and Solute Uptake in Agar Gels and Meat. *LWT - Food Science and Technology*, 34(5), 319–323.
- Donalson, L. M., Kim, W.-K., Chalova, V. I., Herrera, P., Woodward, C. L., McReynolds, J. L., Kubena, L. F., et al. (2007). In vitro anaerobic incubation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and laying hen cecal bacteria in poultry feed substrates and a fructooligosaccharide prebiotic. *Anaerobe*, 13(5–6), 208–14.
- Durieux, A., Fougnyes, C., Jacobs, H., & Simon, J.-P. (2001). Metabolism of chicory fructooligosaccharides by bifidobacteria. *Biotechnology Letters*, 23(18), 1523–1527.
- Díaz Vela, J., Mayorga Reyes, L., Totosaús S, A., & Pérez Chabela, M. de L. (2012). Parámetros cinéticos y perfil de ácidos grasos de cadena corta de bacterias ácido lácticas termotolerantes con diferentes fuentes de carbono. *Vitae*, 19, 253–260.
- Emam-Djomeh, Z., Djelveh, G., & Gros, J.-B. (2001). Osmotic Dehydration of Foods in a Multicomponent Solution Part I. Lowering of Solute Uptake in Agar Gels: Diffusion Considerations. *LWT - Food Science and Technology*, 34(5), 312–318. doi:10.1006/fstl.2001.0776

- FAO-OMS. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/OMS. *Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food* (pp. 1–52).
- Ferrando, M., & Spiess, W. E. L. (2001). Cellular response of plant tissue during the osmotic treatment with sucrose, maltose, and trehalose solutions. *Journal of Food Engineering*, *49*(2–3), 115–127.
- Flamm, G., Glinsmann, W., Kritchevsky, D., Prosky, L., & Roberfroid, M. (2001). Inulin and Oligofructose as Dietary Fiber: A Review of the Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *41*(5), 353–362.
- García-Martínez, E., Martínez-Monzó, J., Camacho, M. M., & Martínez-Navarrete, N. (2002). Characterisation of reused osmotic solution as ingredient in new product formulation. *Food Research International*, *35*(2–3), 307–313.
- Georgieva, R., Koleva, P., Nikolova, D., Yankov, D., & Danova, S. (2009). Growth parameters of probiotic strain *Lactobacillus plantarum*, isolated from traditional white cheese. *Biotechnol. & Biotechnol.*, *23 Special*, 861–865.
- Ghazi, I., Fernandez-Arrojo, L., Garcia-Arellano, H., Ferrer, M., Ballesteros, A., & Plou, F. J. (2007). Purification and kinetic characterization of a fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus*. *Journal of Biotechnology*, *128*(1), 204–211.
- Hidaka, H., Hirayama, M., & Sumi, N. (1988). A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agricultural and Biological Chemistry*, *52*, 1181–1187.
- Kaplan, H., & Hutkins, R. W. (2000). Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied and environmental microbiology*, *66*(6), 2682–4.
- Kolida, S., Tuohy, K., & Gibson, G. R. (2007). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, *87*(S2), S193. doi:10.1079/BJN/2002537
- Kullen, M. J., Khil, J., Busta, F. F., Gallaher, D. D., & Brady, L. J. (1998). Carbohydrate source and bifidobacteria influence the growth of *Clostridium perfringens* in vivo and in vitro. *Nutrition Research*, *18*(11).

- Kun, S., Rezessy-Szabó, J. M., Nguyen, Q. D., & Hoschke, Á. (2008). Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected Bifidobacterium strains. *Process Biochemistry*, 43(8), 816–821.
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2006). Apuesta Exportadora Agropecuaria Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural 2006-2020. *Fecha de consulta: septiembre 17 de 2006*. Retrieved from [www.miniagricultura.gov.co](http://www.miniagricultura.gov.co)
- Ministerio de Industria Comercio y Turismo., & Nacional, U. (2005). Estudio de prospectiva tecnológica sobre requerimientos de diseño de bienes y capital para el sector agroindustrial dentro del cual se desarrollan las Mipymes y planteamiento de una estrategia de apoyo a este sector en diseño desde la Universidad. *Capítulo 1 (CD-ROM)*.
- Moreira, R., Chenlo, F., & Pereira, G. (2003). Viscosities of ternary aqueous solutions with glucose and sodium chloride employed in osmotic dehydration operation. *Journal of Food Engineering*, 57(2), 173–177. doi:10.1016/S0260-8774(02)00295-9
- Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z., & Kiani, H. (2010). Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 123–128.
- Muñiz Becerá, S., García Pereira, A., Calderín García, A., & Hernández Gómez, A. (2011). Evaluación de la calidad de la fruta bomba ( Carica papaya L .) variedad Maradol roja deshidratada utilizando el método de deshidratación osmótica (DO). *Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 20(1), 52–56.
- Muñoz, M., Mosquera, A., Alméciga-Díaz, C. J., Melendez, a P., & Sánchez, O. F. (2012). Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in Lactobacillus strains isolated from ensiled corn and molasses. *Anaerobe*, 18(3), 321–30.
- Nancib, N., Nancib, A., Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F., & Boudrant, J. (2001). The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by Lactobacillus casei subsp. rhamnosus. *Bioresource Technology*, 78(2), 149–153. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00009-8

- Nicolescu, C. L., & Buruleanu, L. C. (2010). Correlation of Some Substrate Parameters in Growing *Lactobacillus acidophilus* on Vegetable and Fruit Cocktail Juices. *Bulletin UASVM Agriculture*, 67(2), 352–359.
- Nishizawa, K., Nakajima, M., & Nabetani, H. (2000). A forced-flow membrane reactor for transfructosylation using ceramic membrane. *Biotechnol Bioeng.*, 68, 92–97.
- Nishizawa, Koji, Nakajima, M., & Nabetani, H. (2001). Kinetic Study on Transfructosylation by .BETA.-Fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611 and Availability of a Membrane Reactor for Fructooligosaccharide Production. *Food Science and Technology Research*, 7(1), 39–44.
- Osorio, C., Franco, M. S., Castaño, M. P., González-Miret, M. L., Heredia, F. J., & Morales, A. L. (2007). Colour and flavour changes during osmotic dehydration of fruits. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(3), 353–359.
- Park, J., Oh, T., & Yun, J. W. (2001). Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from *Bacillus macerans* EG-6. *Process Biochemistry*, 37, 471–476.
- Parra Huertas, R. A. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8, 93–105.
- Peiró, R., Dias, V. M. C., Camacho, M. M., & Martínez-Navarrete, N. (2006). Micronutrient flow to the osmotic solution during grapefruit osmotic dehydration. *Journal of Food Engineering*, 74(3), 299–307.
- Perrin, S., Warchol, M., Grill, J. P., & Schneider, F. (2001). Fermentations of fructooligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. *Journal of applied microbiology*, 90(6), 859–65.
- Pimentel, S., Germer, M., Queiroz, M. R., Aguirre, J. M., Aparecida, S., Berbari, G., & Anjos, V. D. (2010). Process variables in the osmotic dehydration of sliced peaches. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(4), 940–948.
- Ramos, F. A., Delgado, J. L., Bautista, E., Morales, A. L., & Duque, C. (2005). Changes in volatiles with the application of progressive freeze-concentration to

- Andes berry (*Rubus glaucus* Benth). *Journal of Food Engineering*, 69(3), 291–297.
- Ramos Izquierdo, B., Bucio Galindo, A., Bautista Muñoz, C., Aranda Ibáñez, E., & Izquierdo Reyes, F. (2009). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Universidad y Ciencia*, 25(2), 159–171.
- Ramírez Higuera, I. . A. (2009). *Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de Maguey (Agave salmiana) en Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Instituto Politécnico Nacional de México D.F.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. ., Niranjan, K., & Knorr, D. (2002). Recent developments in osmotic dehydration: methods to enhance mass transfer. *Trends in Food Science & Technology*, 13(2), 48–59.
- Rosa, M. D., & Giroux, F. (2001). Osmotic treatments (OT) and problems related to the solution management. *Journal of Food Engineering*, 49(2–3), 223–236.
- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., & Rastall, R. a. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of applied microbiology*, 91(5), 878–87.
- Sacchetti, G., Gianotti, A., & Rosa, M. D. (2001). Sucrose–salt combined effects on mass transfer kinetics and product acceptability. Study on apple osmotic treatments. *Journal of Food Engineering*, 49(2–3), 163–173.
- Salmien, S., Wright, A. von, & Ouwehand, A. (2004). Nitrogen Metabolism: The proteolytic System. *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects* (pp. 36–37).
- Sangeetha, P T, Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2005). Recent trends in the microbial production, analysis and application of Fructooligosaccharides. *Trends in Food Science & Technology*, 16(10), 442–457.
- Sangeetha, P.T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2005). Maximization of fructooligosaccharide production by two stage continuous process and its scale up. *Journal of Food Engineering*, 68(1), 57–64. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.05.022
- Saulnier, D. M. a, Molenaar, D., De Vos, W. M., Gibson, G. R., & Kolida, S. (2007). Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus*

- plantarum WCFS1 through microarrays. *Applied and environmental microbiology*, 73(6), 1753–65.
- Serna Cock, L., & Rodríguez de Stouvenel, A. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5, 54–65.
- Serna, J. (2012). *Elaboración de jugos de fruta con adición de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico*. Universidad de La Sabana.
- Serna, L., & Rodríguez, A. (2007). Producción económica de ácido láctico utilizando residuos de cosecha y jugos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). *Agricultura técnica*, 67(1), 29–38.
- Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 279–284.
- Sheu, D., Lio, P., Chen, S., Lin, C., & Duan, K. (2001). Production of fructooligosaccharides in high yield using a mixed enzyme system of  $\beta$ -fructofuranosidase and glucose oxidase. *Biotechnology Letters*, 23(18), 1499–1503.
- Sheu, D.-C., Duan, K.-J., Cheng, C.-Y., Bi, J.-L., & Chen, J.-Y. (2002). Continuous Production of High-Content Fructooligosaccharides by a Complex Cell System. *Biotechnology Progress*, 18(6), 1282–1286.
- Shin, H.-S., Lee, J.-H., Pestka, J. J., & Ustunol, Z. (2000). Growth and Viability of Commercial Bifidobacterium spp in Skim Milk Containing Oligosaccharides and Inulin. *Journal of Food Science*, 65(5), 884–887.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, 51(3), 456–467.
- Sánchez, O., Guio, F., Garcia, D., Silva, E., & Caicedo, L. (2008). Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. *Food and Bioproducts Processing*, 86(2), 109–115.
- Torreggiani, D., & Bertolo, G. (2001). Osmotic pre-treatments in fruit processing: chemical, physical and structural effects. *Journal of Food Engineering*, 49(2–3), 247–253.



- Valdez-Frugoso, A., Welti-Chancs, J., & Giroux, F. (1998). Properties of a sucrose solution reused in osmotic dehydration of apples. *Drying Technology*, *16*(7), 1429–1445.
- Vargas, E. M., Gómez, C. J., Parra, M. E., & Romero, M. A. (2004). Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno (Primera parte). *Revista de Ingeniería Universidad de Los Andes*, *19*, 166–176.
- Vinderola, C. G., Costa, G. A., Regenhardt, S., & Reinheimer, J. A. (2002). Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, *12*, 579–589.
- Yang, B., Prasad, K. N., Xie, H., Lin, S., & Jiang, Y. (2011). Structural characteristics of oligosaccharides from soy sauce lees and their potential prebiotic effect on lactic acid bacteria. *Food Chemistry*, *126*(2), 590–594.
- Yoon, K. Y., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2004). Probiotication of Tomato Juice by Lactic Acid Bacteria. *The journal of Microbiology*, *42*(4), 315–318.
- Yun, J. W. (1996). Fructooligosaccharides—Occurrence, preparation, and application. *Enzyme and Microbial Technology*, *19*(2), 107–117.
- Yun, J. W., Lee, M. G., & Song, S. K. (1994). Batch production of high-content fructo-oligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of  $\beta$ -fructofuranosidase and glucose oxidase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *77*(2), 159–163.
- Zhang, Q., Ma, H., Mai, K., Zhang, W., Liufu, Z., & Xu, W. (2010). Interaction of dietary *Bacillus subtilis* and fructooligosaccharide on the growth performance, non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Fish & shellfish immunology*, *29*(2), 204–11.
- Zwietering, M. H., & Den Besten, H. M. W. (2010). Modelling: one word for many activities and uses. *Food microbiology*, *28*(4), 818–22.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1. Identificación molecular de *L. plantarum*

TGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGA  
AAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGAT  
GGTGAGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTA  
ATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG  
TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA  
GAGTAACTGTTGAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC  
GTGCCAGA

### CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```
vanlact      -----GCACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCT  52
genoma      GGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCT  60
plantarum   -----TGG-----AACAGATGCT  13
              ***                               *****

vanlact      AATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCAC 112
genoma      AATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCAC 120
plantarum   AATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCAC  73
              *****

vanlact      TTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATG  172
genoma      TTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATG  180
plantarum   TTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGAGTAACGGCTCACCATGGCAATG  133
              *****

vanlact      ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTC  232
genoma      ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTC  240
plantarum   ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTC  193
              *****

vanlact      CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCC  292
genoma      CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCC  300
plantarum   CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCC  253
              *****

vanlact      GCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA  352
genoma      GCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA  360
plantarum   GCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGA  313
              *****

vanlact      GAGTAACTGTTGAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGC-----  398
genoma      GAGTAACTGTTGAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG  420
plantarum   GAGTAACTGTTGAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG  373
              *****
```

vanglact -  
genoma -  
plantarum A 374

Sequence type explicitly set to Protein

Sequence format is Pearson

Sequence 1: vanglact 398 aa

Sequence 2: plantarum 374 aa

Sequence 3: genoma 420 aa

Start of Pairwise alignments

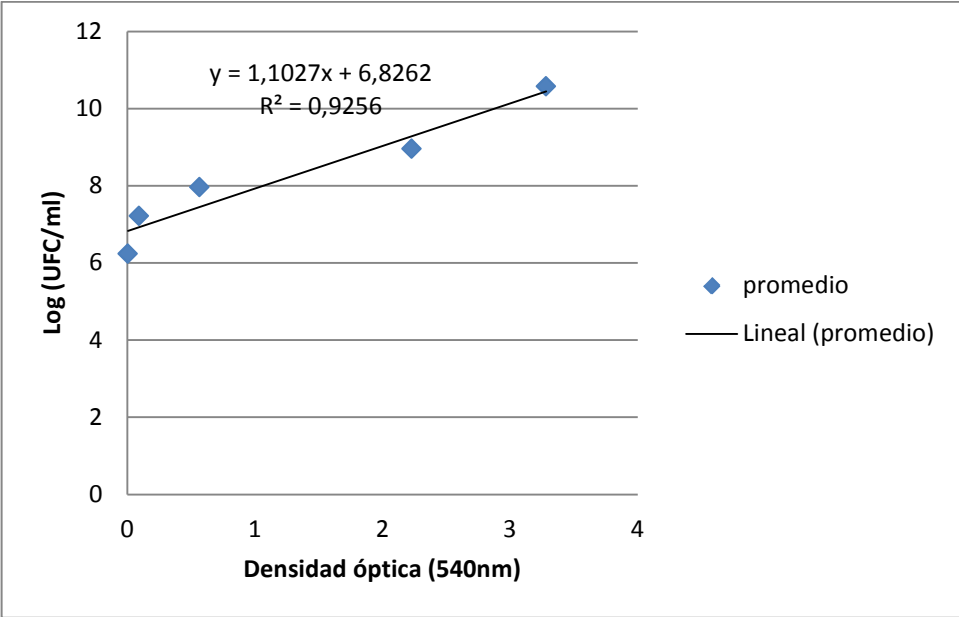
Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 95

Sequences (1:3) Aligned. Score: 99

Sequences (2:3) Aligned. Score: 98

**Anexo 2. Curva de calibración para determinación de Log(UFC/ml) en los jarabes provenientes de DO**



### Anexo 3. Recuento en placa para tiempos de control

Se realizaron conteos en caja para los tiempos de control establecidos a la hora 0, 14 y 44 tanto para jarabes provenientes de OD de mora de castilla y tomate de árbol sin y con FOS adicionados con nitrógeno orgánico, los cuales se graficaron vs. la biomasa g/L, para la determinación de UFC/mL para cada punto de la curva de crecimiento de *L. plantarum*.

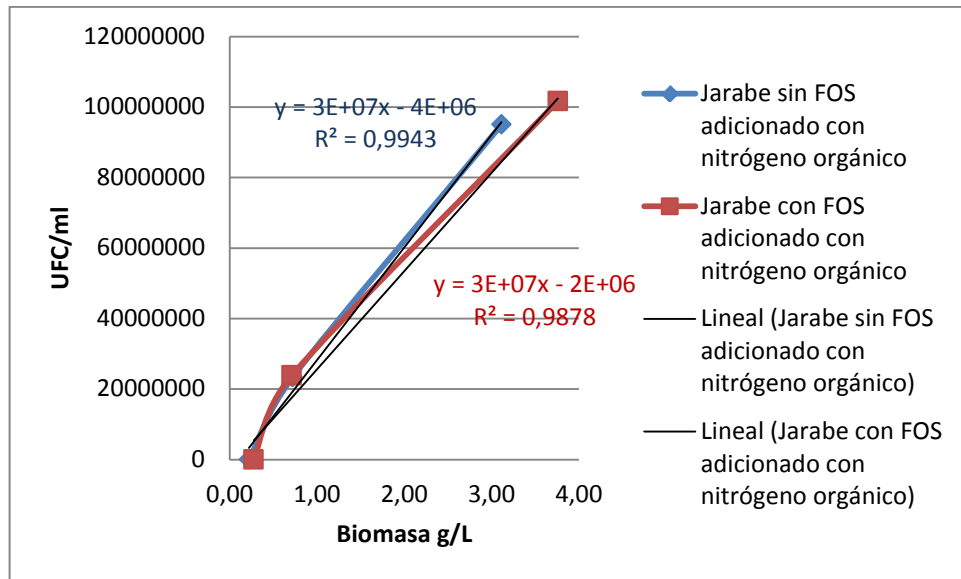


Figura 47. UFC/mL vs biomasa g/L obtenidos para el crecimiento de *L. plantarum* en los puntos de control de jarabes provenientes de OD de mora de Castilla sin y con FOS adicionado con nitrógeno orgánico.

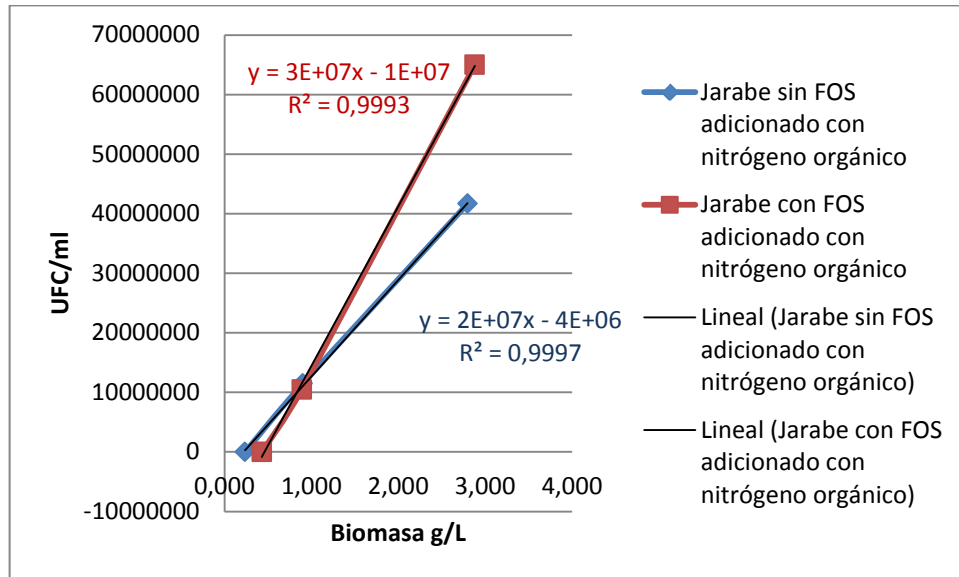


Figura 48. UFC/ml vs biomasa g/L obtenidos para el crecimiento de *L. plantarum* en los puntos de control de jarabes provenientes de OD de tomate de árbol sin y con FOS adicionado con nitrógeno orgánico.