

## Parámetros cinéticos sigmoidales de probióticos adicionados con diferentes prebióticos

Sigmoidal kinetic parameters of probiotics aggregated with different prebiotics

Cortez-Ramírez Juan Diego<sup>1</sup>, Gallardo-Gasca José Eduardo<sup>2</sup>, González-Ramírez Stephanie<sup>2</sup>, Juárez-Santillán Ana Karen<sup>1</sup>, Luján-Rodríguez Angela Gabriela<sup>3</sup> Canchola-Martínez María Isabel<sup>2</sup>, Servando Rojas-González<sup>1</sup>, Rodríguez-Hernández Gabriela<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Vida. Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

<sup>2</sup>Universidad de Guanajuato. División de Ciencias de la Vida. Departamento de Alimentos. gabriela.rodriguez@correo.mx<sup>2</sup>

<sup>3</sup>Universidad de Guanajuato. Escuela de Nivel Medio Superior Irapuato.

### Resumen

Se realizaron cinéticas de crecimiento bacteriano por 26 horas con dos probióticos (*Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>R</sup> y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>R</sup>), mismos que fueron adicionados con diferentes prebióticos (carboximetilcelulosa e inulina) para evaluar su viabilidad, con el modelo matemático de Baranyi y Roberts (de crecimiento sigmoidal). Se buscó detectar un efecto sinérgico entre ambos, con el objetivo de detectar la mejor combinación de probiótico y prebiótico; no obstante, con los resultados obtenidos no se logró identificar que alguno de los prebióticos estimulara el crecimiento de los probióticos, por otro lado, se observó un mayor crecimiento en todos los tratamientos que tenían a los lactobacilos con respecto a las bifidobacterias.

**Palabras clave:** carboximetilcelulosa, inulina, lactobacilos, bifidobacterias, cinéticas microbianas.

### Introducción

Los probióticos son microorganismos principalmente bacterias cuyas propiedades benéficas fueron descubiertas gracias a Shirota y Metchnikoff; los cuales demostraron que con usos adecuados y en suficientes proporciones, promueven el correcto estado y funcionamiento de organismos más grandes como en el sistema digestivo humano, prolongando la longevidad (Kenifel y Salminen, 2011).

Por otro lado, los prebióticos, como su prefijo lo indica son aquellos que anteceden a los probióticos y se trata del material biodisponible no digerible que es empleado con la finalidad de que se efectúen ciertos procesos fisiológicos en el huésped, el cual contendrá bacterias propias que gracias a estos prebióticos son promovidas selectivamente, contribuyendo a la proliferación y desarrollo de una microbiota más regulada y saludable (Ardusso et al., 2010).

Una cinética es el estudio de las razones o velocidades de cambio de las reacciones químicas bajo ciertas condiciones, y se ejecuta para obtener la velocidad del crecimiento de los probióticos dentro del medio de cultivo y analizar el impacto al adicionar prebióticos; considerando los parámetros cinéticos de crecimiento. Según lo descrito por Zapata et al., (2005), quienes mencionan que son aquellas herramientas que se usan en la ciencia con la finalidad de comprender los procesos que son evaluados y poder hacer un pronóstico de la expresión bacteriana.

En el presente estudio, se realizó una serie de cinéticas bacterianas, destacando el análisis de los siguientes parámetros sigmoideos: rate (velocidad de crecimiento promedio), lag (fase de adaptación) y  $Y_0$  (velocidad inicial en la curva sigmoidea); para ello se empleó el software DMFit creado por József Baranyi y el cual está desarrollado en base a una hoja de Microsoft Excel donde una fase estacionará precede y sucede a la lineal; dando como resultado una gráfica sigmoidea de similitud en forma a una "S" de donde proviene su nombre (Baranyi y Roberts, 1994).

## Metodología

En el presente estudio, se elaboró una cinética de crecimiento microbiano y se determinó el cambio en la densidad óptica por medio de un espectrofotómetro marca Thermo scientific modelo Genesys 10S UV-VIS a 600 nm, monitoreándose por 26 horas (Wilkinson *et al.*, 1993), como se describe a continuación.

1. Se prepararon los tubos de ensaye con caldo de crecimiento lactosado (MCD LAB) y fueron esterilizados.
2. Una vez enfriado el caldo, se realizaron nueve tratamientos por triplicado cada uno de ellos, de los cuales: T1- lactobacilo (probiótico L), T2- bifidobacteria (probiótico B), T3- lactobacilo + carboximetilcelulosa (probiótico L + prebiótico C), T4- bifidobacteria + carboximetilcelulosa (probiótico B + prebiótico C), T5- caldo solo (control negativo de crecimiento), T6- lactobacilo + inulina (probiótico L + prebiótico I), T7- bifidobacteria + inulina (probiótico B + prebiótico I), T8- carboximetilcelulosa (prebiótico C), T9- inulina (prebiótico I). De los cuales, los tratamientos correspondientes, fueron inoculados al 0.01% con los probióticos: *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>R</sup> (CHR HANSEN) y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>R</sup> (CHR HANSEN); así como los tratamientos con los prebióticos se adicionaron al 0.5%, de los cuales carboximetilcelulosa (ILM) e inulina (ENATURE).
3. Se etiquetaron los tubos e incubaron a 37°C por 26 horas, monitoreando la densidad óptica cada hora durante las primeras cinco horas y las últimas cinco horas.
4. Se analizaron graficaron y los resultados. Los datos se ajustaron con el software DMFit<sup>R</sup> versión 2.0 que se basa en la ecuación de Baranyi y Roberts, (1994). Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SAS (2006), donde se llevó a cabo un análisis de varianza con el PROC GLM y para la comparación de medias entre tratamientos, se utilizó la prueba de TUKEY. Analizando las variables de respuesta los parámetros sigmoideos: rate (velocidad promedio), lag (periodo de adaptación),  $y_0$  (velocidad inicial).

## Resultados y discusión

Los resultados de las cinéticas se muestran en la Tabla 1, donde se aprecia que no se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos en rate (velocidad promedio), ya que para este parámetro se toman en cuenta todos los datos de la cinética para cada tratamiento, es por ello que puede ser tan general que no se observan las diferencias.

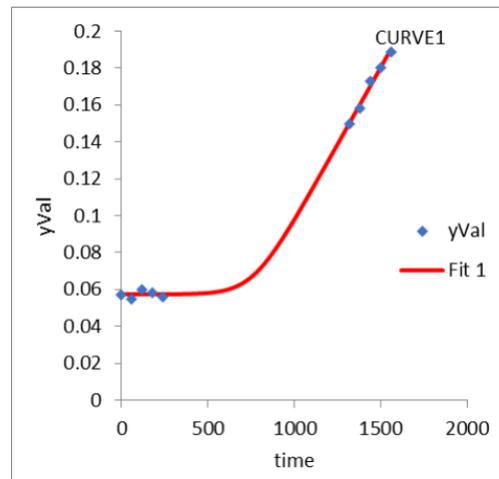
Por otra parte, para la fase lag (periodo de adaptación), si se detectaron diferencias en el T5 (control) y en el T4 (Figura 1), mismas que no son muy destacables. Sin embargo, el parámetro más importante de las cinéticas fue  $y_0$  (velocidad inicial en la curva sigmoidea), ya que, es donde se aprecian las diferencias reales entre tratamientos, de las cuales se puede destacar que todos los tratamientos que contenían los lactobacilos (T1, T3 y T6) observaron mayor crecimiento que los que tenían las bifidobacterias (T2, T4 y T7), sin observarse efecto sinérgico por la adición de ninguno de los dos prebióticos (carboximetilcelulosa o inulina). Dichos resultados coinciden con lo reportado por Gueimonde *et al.*, (2004), ya que en este estudio los autores monitorearon las concentraciones de varias especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en productos comerciales fermentados y también detectaron cuentas más altas de concentración en los productos con los lactobacilos con respecto a los que tenían bifidobacterias.

Cabe destacarse que se obtuvieron  $R^2$  muy altas, lo cual indica que los datos se ajustaron muy bien al modelo descrito por Baranyi y Roberts, (1994) de las cuales la mayoría (T1, T2, T3, T4, T6, T8 y T9) presentaron valores mayores a 0.91, siendo solamente el T7 de 0.75 y el T5 o control de 0.4 (este último solo era el caldo, por ello no presentó los parámetros característicos del crecimiento sigmoideo).

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos sigmoidales de las cinéticas con los probióticos *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>R</sup> y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>R</sup> y los prebióticos inulina y carboximetilcelulosa, durante 26 horas de monitoreo.

Tratamiento	Rate	Lag	Yo	R <sup>2</sup>
1	0.0026 ± 0.0025 <sup>a</sup>	1291.6312 ± 185.1370 <sup>a</sup>	0.1016 ± 0.0194 <sup>a</sup>	0.9132 ± 0.0322 <sup>a</sup>
2	0.0029 ± 0.0018 <sup>a</sup>	1433.0381 ± 126.6175 <sup>a</sup>	0.0547 ± 0.0043 <sup>b</sup>	0.9180 ± 0.0482 <sup>a</sup>
3	0.0010 ± 0.0012 <sup>a</sup>	1332.5673 ± 232.711 <sup>a</sup>	0.1070 ± 0.0155 <sup>a</sup>	0.9217 ± 0.0692 <sup>a</sup>
4	0.0001 ± 0.000 <sup>a</sup>	763.5607 ± 0.0000 <sup>b</sup>	0.0492 ± 0.0091 <sup>b</sup>	0.9708 ± 0.0339 <sup>a</sup>
5	0.0000 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.0000 ± 0.0000 <sup>a</sup>	0.0045 ± 0.000 <sup>c</sup>	0.4111 ± 0.0000 <sup>c</sup>
6	0.0004 ± 0.0002 <sup>a</sup>	1168.9408 ± 163.2684 <sup>a</sup>	0.1034 ± 0.0060 <sup>a</sup>	0.9551 ± 0.0251 <sup>a</sup>
7	0.0027 ± 0.0001 <sup>a</sup>	1307.3874 ± 2.4397 <sup>a</sup>	0.0459 ± 0.0071 <sup>b</sup>	0.7576 ± 0.0543 <sup>b</sup>
8	0.0008 ± 0.0010 <sup>a</sup>	1156.9281 ± 185.7449 <sup>a</sup>	0.0141 ± 0.0049 <sup>c</sup>	0.9486 ± 0.0228 <sup>a</sup>
9	0.0006 ± 0.0004 <sup>a</sup>	1184.9414 ± 19.1611 <sup>a</sup>	0.0006 ± 0.0109 <sup>c</sup>	0.9254 ± 0.0245 <sup>a</sup>

Tratamientos: T1- lactobacilo (probiótico L), T2- bifidobacteria (probiótico B), T3- lactobacilo + carboximetilcelulosa (probiótico L + prebiótico C), T4- bifidobacteria + carboximetilcelulosa (probiótico B + prebiótico C), T5- caldo solo (control negativo de crecimiento), T6- lactobacilo + inulina (probiótico L + prebiótico I), T7- bifidobacteria + inulina (probiótico B + prebiótico I), T8- carboximetilcelulosa (prebiótico C), T9- inulina (prebiótico I). Parámetros sigmoideos: rate (velocidad de crecimiento promedio), lag (fase de adaptación), Yo (velocidad inicial en la curva sigmoidea). <sup>a, b, c</sup> Literales diferentes en una misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (P≤0.05).



**Figura 1.** Curva de crecimiento característica generada por el software Dmfit<sup>R</sup> (versión 2.0), donde se monitoreó el tratamiento 4, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>R</sup> (CHR HANSEN) adicionado con carboximetilcelulosa durante 26 horas (1560 minutos). Donde: yVal, son las observaciones registradas (dadas por densidad óptica a 600 nm) y Fit 1, la línea de tendencia que se describe.

## Conclusiones

De los resultados obtenidos de las cinéticas se puede resaltar que todos los tratamientos que contenían *Lactobacillus acidophilus* LA-5<sup>R</sup>, presentaron mayor crecimiento que los que tenía *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12<sup>R</sup>, es decir los lactobacillus potenciaron más su crecimiento que las bifidobacterias. No obstante, no se presentó efecto sinérgico por la adición de ninguno de los dos aditivos, carboximetilcelulosa o inulina, es decir no se potenció el crecimiento de los probióticos con ninguno de los prebióticos.

## Bibliografía

- Arduoso L., De Gennaro M., Eiguchi K., Rubeglio E., de Paula J.A., Perdigón G. (2010). Taller de Expertos en Probióticos: Revisión de la evidencia y aplicaciones clínicas. Asociación Argentina de Alergia e Inmunología Clínica (AAAeIC). 41(2). Argentina pp. 45-53
- Baranyi J., Roberts T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology. 23: 277-294.
- Gueimonde M., Delgado S., Mayo B., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Reyes-Gavilán C.G. (2004). Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. Food Research International. 37(9): 839-850
- Kenifel W. & Salminen S. (2011). Probiotics and health Claims. Black Well Publishing Ltd. First Edition. pp. 19.
- SAS, Statistical Analysis System. (2006). Version 9.1.3 for Windows. SAS Institute Inc., Cary, N.C.
- Wilkinson M., Guinee T., O'Callaghan D., Fox P. (1993). Autolysis and proteolysis in different strains of starter bacteria during Cheddar cheese ripening. Journal of Dairy Research. 61: 249-262.
- Zapata M. J. E., Hoyos R. M., Quinchía B. L. A. (2005). Parámetros cinéticos de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de un campo magnético variable de baja intensidad y alta frecuencia. Revista de la Facultad de Química. 12(1). Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. pp. 39-44.