



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CATEDRA DEL COMPONENTE DE
INVESTIGACION
“Dr. JOSE RAFAEL LUNA”**



**CRECIMIENTO DE *Lactobacillus* spp. RELACIONADO CON VARIAS
CONCENTRACIONES DE MELAZA DE CAÑA EN MEDIOS DE CULTIVO**

www.bdigital.ula.ve

Autor(a):

Frank Antonio Castillo Camacho

Yilber Norvey Falcón Santana

Tutor (a):

Prof. Juan Carlos Molina

Mérida, Junio 2019



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CATEDRA DEL COMPONENTE DE
INVESTIGACION
“Dr. JOSE RAFAEL LUNA”**



**CRECIMIENTO DE *Lactobacillus* spp. RELACIONADO CON VARIAS
CONCENTRACIONES DE MELAZA DE CAÑA EN MEDIOS DE CULTIVO**

Trabajo realizado como requisito para optar al título de licenciados en
Bioanálisis

Autor(a):

Frank Antonio Castillo Camacho
Yilber Norvey Falcón Santana

Tutor (a):

Prof. Juan Carlos Molina

Mérida, Junio 2019



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CATEDRA DEL COMPONENTE DE
INVESTIGACION
“Dr. JOSE RAFAEL LUNA”



**CRECIMIENTO DE *Lactobacillus* spp. RELACIONADO CON VARIAS
CONCENTRACIONES DE MELAZA DE CAÑA EN MEDIOS DE CULTIVO**

Trabajo realizado como requisito para optar al título de licenciados en
Bioanálisis

Autores: Frank Antonio Castillo Camacho y Yilber Norvey Falcón Santana

Tutor: Prof. Juan Carlos Molina

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

Los *Lactobacillus* spp., son bacterias ácido lácticas que tienen diversas aplicaciones, siendo una de las principales la fermentación de alimentos. En cuanto a sus requerimientos nutricionales pueden suplirse con el medio M.R.S. (Man Rogosa y Sharpe), pero implica un alto costo al momento de producir la bacteria a nivel industrial, debido a su importancia y utilidad es necesario encontrar un medio óptimo para su desarrollo con un costo menor. **Objetivo:** comparar el crecimiento de *Lactobacillus* spp., en términos de biomasa obtenida, relacionado con varias concentraciones de melaza de caña en medios de cultivo, con el propósito de establecer la concentración idónea para la producción bacteriana. **Metodología:** se utilizó el método gravimétrico SST, para la obtención del peso seco celular. **Resultados:** la concentración de sustrato idónea para el crecimiento de *Lactobacillus* spp., fue al 20 % y 25 % a 30 ± 2 °C y agitación cada 7 horas.

Palabras claves: *Lactobacillus* spp., Melaza de caña, sustrato, Biomasa y peso seco.

DEDICATORIA

A Dios quien es el ser más importante de mi vida y en quien hallo el amor, la esperanza y la fe para vivir cada día.

A mis padres Víctor Castillo y Lourdes Camacho, a ustedes siempre dedicaré lo mejor que pueda dar, sé que mi logro es su logro. Gracias por todo tu apoyo, por el amor que me han brindado sin condiciones. Todo esto se los debo a ustedes. Los amo infinitamente.

A Olinto, quien es como un padre para mi gracias por todo tu apoyo.

A mis hermanos, sobrinos y primos con quienes he crecido y de los cuales he aprendido grandes cosas acerca de la vida.

A mis grandes amigos, Yilber Falcón, Yormán Hernández, Anyi Maldonado y Héctor Andrade a quienes quiero muchísimo, son personas maravillosas.

Al desarrollo de la ciencia y a toda persona que pueda interesarle y ayudarle este trabajo.

Frank Castillo.

DEDICATORIA

A DIOS primeramente, por ser ese guía espiritual que me ha acompañado en todo este trayecto académico, por iluminarme en los momentos que más he necesitado, gracias por todo tu amor y comprensión.

A mi madre ANA LIA SANTANA, por ser mi ejemplo de constancia, trabajo y sacrificio, gracias por todo tu apoyo, por el amor que me has brindado sin condiciones. Todo esto te lo debo a ti y mucho más. TE AMO.

A mi padre SEGUNDO JOSA, por haberme enseñado el valor de las cosas, con trabajo y amor “Todo es posible”. Mi viejo este logro también es tuyo. TE AMO.

A mi hermana DEXIMAR SANTANA, por ser uno de mis motivos de superación, gracias por alegrarme la vida y por enseñarme que “Cuando se quiere, se puede”. TE AMO.

A mi tía GLORIANA SANTANA, por tu comprensión, apoyo, motivación, gracias por ser mi segunda mamá. TE AMO.

A mis primos Yuri, Dani, Maye, Nolanyel por ser mi ejemplo de superación en la vida. Los quiero mucho.

A mis amigos de la vida ERICK DEIVIS y muy especialmente a SIMÓN RANGEL por todo el apoyo brindado, por haber estado conmigo cuando más lo necesite. LOS AMO.

A FRANK CASTILLO, HENEYMAR GONZALEZ, HECTOR LUIS, los amigos que me dio la universidad, personas que admiro y respeto, muchas gracias por todos los momentos vividos.

Yilber Falcón.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todo Poderoso, por acompañarnos y guiarnos en este paso de nuestras vidas, por enseñarnos que a pesar de la oscuridad siempre hay un rayito de luz que nos lleva a seguir adelante.

A nuestros padres, por su compañía en este paso tan importante de nuestras vidas y que sin importar las circunstancias siempre están presentes con su amor y apoyo enseñándonos que la base de todo es el amor y la humildad.

A nuestros hermanos, siempre agradecidos con ustedes por el apoyo y consejos incondicionales que nos brindan a cada segundo de nuestras vidas.

Al profesor JUAN CARLOS MOLINA, por su dedicación y esfuerzo en todo este trabajo.

A la profesora THAYDED VILLASMIL, agradecidos por su tiempo, colaboración sin esperar nada a cambio, por sus conocimientos para la elaboración de esta investigación, que nos han hecho reflexionar sobre el deber ser de las cosas y enamorar aún más de nuestra bella carrera; con su ayuda y apoyo alcanzamos un logro más.

A la Ilustre Universidad de los Andes, por ser la casa de estudios que nos abrió la puerta para la materialización de uno de nuestros sueños más añorados.

A todos ustedes Muchas Gracias.... Dios los Bendiga Siempre.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	IV
DEDICATORIA	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	XI
INDICE DE TABLAS	XII
INDICE DE ESQUEMAS	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación de la Investigación	6
Objetivos de la Investigación	7
<i>Objetivo General</i>	7
<i>Objetivos Específicos</i>	7
Alcance de la investigación	8
Límites de la investigación.....	8
CAPITULO II MARCO TEÓRICO	9
Trabajos Previos.....	9
Antecedentes Históricos	10
Bases Teóricas.....	11

Crecimiento Bacteriano	11
Recuento celular.....	15
Medio de Cultivo	18
Según su estado físico.	19
Según su composición.....	20
Según su utilidad.	20
Bacterias Ácido Lácticas.....	21
<i>Lactobacillus</i> spp.	22
La Melaza de Caña.....	25
Definición de Términos	29
Abreviaturas	30
CAPITULO III MARCO METODOLÓGICO	31
Tipo de investigación:	32
Diseño de investigación:.....	32
Población y muestra:	34
Población:.....	34
Muestra:	34
Técnicas e instrumentos de recolección de datos:	35
Procedimiento de la investigación:	35
Materiales y Métodos.....	37
Materiales e Instrumentos.	37
Equipos.....	37
Actividades realizadas.	38

Formulas utilizadas.....	39
Diseño de análisis:.....	39
CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUCIONES	40
CAPITULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	43
CONCLUSIONES.....	43
RECONMENDACIONES.....	44
Referencias Bibliohemerograficas	45

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Datos de una población que se replica cada 30 min, fuente: (Madigan, et al. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos.10 ed, pág., 142).....	13
Figura 2 Grafica semilogaritmica del crecimiento exponencial: datos representados en escala aritmética (tiempo) y en escala logarítmica (número de células), fuente: (Madigan, et al. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos.10 ed, pág., 142).....	13
Figura 3 Curva de crecimiento, fuente: (Madigan, et al. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos.10 ed, pág., 144).	15
Figura 4 Determinación células viables. (recuento en placa): en cada caso la muestra se diluye normalmente antes de sembrar, fuente: (Madigan, et al. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos.10 ed, pág., 146).....	18
Figura 5 Grafica de relación de la concentración de sustrato y biomasa.	41
Figura 6 Grafica de regresión lineal.	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 composición de la melaza de caña de azúcar.	28
Tabla 2 Biomasa de <i>Lactobacillus</i> spp., obtenida en correspondencia con las concentraciones de sustrato de los medios de cultivo.	40

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 Secuencia experimental para el cultivo de *Lactobacillus* spp. ... 36

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

En microbiología, la palabra crecimiento es igual al incremento en el número de células el cual es un componente esencial de la función microbiana, ya que en la naturaleza cualquier célula tiene un periodo de vida finito y la especie se mantiene como resultado del crecimiento continuo de la población. Por eso a fines de esta investigación se debe tener una comprensión de los aspectos básicos del crecimiento microbiano ya que muchas situaciones prácticas hacen necesario el control de este. El conocimiento de cómo las poblaciones bacterianas se amplifican rápidamente es muy útil para el diseño de métodos y medios de cultivo (Madigan, Martinko y Parker, 2004).

Los *Lactobacillus* spp., son bacterias con la característica común de producir ácido láctico como el principal producto de desecho, además de caracterizarse por sus altos requerimientos nutricionales (Guevara, 2011). Según Hassan y Frank, (2001), requieren aminoácidos específicos, vitamina B y otros factores de crecimiento, por otro lado desde el siglo XX, se demostró a través de diferentes investigaciones que las bacterias ácido lácticas (BAL) inhiben el crecimiento de gérmenes indeseables en el tracto intestinal tanto de seres humanos como en animales. Esta reducción sería consecuencia tanto de la producción de compuestos antibacterianos, como de la acidez intestinal originada o del antagonismo competitivo (Guevara, 2011).

Por su importancia el desarrollo de medios y condiciones de cultivo que permitan obtener altas densidades de microorganismos ($> 10^7$ UFC/g), es de gran interés para los investigadores y emprendedores en este campo.

El sustrato planteado está compuesto por soluciones de melaza de caña que es un producto final de la fabricación o refinación de la sacarosa, glucosa y fructosa procedente de la caña de azúcar; además contienen sustancias no fermentables y melanoidinas (a base de nitrógeno), derivados a partir de la condensación del azúcar y aminocompuestos que estimulan el crecimiento bacteriano, sirviendo como sustrato en un medio de cultivo (Honig, 1974; Swan y Karalazos, 1990).

Este proyecto ha sido estructurado por capítulos; Capítulo I: planteamiento del problema, justificación y objetivos de la investigación. Capítulo II: marco teórico, dividido en antecedentes de la investigación así como las bases teóricas. Capítulo III; Marco metodológico, subtítulo en, tipo de investigación, diseño de la investigación, población y muestra, instrumento de recolección de datos, procedimientos de la investigación y diseño de análisis. Capítulo IV: resultados y discusiones. Capítulo V: conclusiones y recomendaciones.

El objetivo de esta investigación es comparar el crecimiento de *Lactobacillus* spp., en términos de biomasa obtenida, relacionado con varias concentraciones de melaza de caña en medios de cultivo, con el propósito de establecer la concentración idónea para la producción bacteriana. En el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica I de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, con la colaboración del Laboratorio de Salud Pública del estado Mérida, área de microbiología, desde junio de 2018, hasta junio 2019.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Los *Lactobacillus* spp., son bacterias ácido lácticas que presentan requerimientos nutricionales muy exigentes, ya que no solo requieren carbohidratos como fuentes de carbono y energía, sino también aminoácidos, vitaminas y nucleótidos (Bergey, 1992, citado en Samaniego y Sosa, 2007).

Vargas, Gómez, Parra y Romero, (2004), sostienen que el 65% de los alimentos del mundo contienen probióticos y los *Lactobacillus* son una de las bacterias más empleadas en este mercado, debido a su influencia positiva tanto en la salud humana y animal (Jiménez, 2009).

Distintas investigaciones, han concluido que hay una relación directa entre el funcionamiento del tracto gastrointestinal y el estado de salud de un individuo. Debido a que diferentes especies de bacterias actúan de forma conjunta en el intestino para mantener su funcionamiento normal. Sin embargo, factores como el estrés o un tratamiento con antibióticos pueden alterar el equilibrio bacteriano natural produciendo una disminución del número de organismos beneficiosos (Castro y De Rovetto, 2006; García, López, y Carcassés, 2012).

Por lo cual desde el siglo XX se ha empleado el uso de microorganismos vivos en los alimentos (probióticos), debido a que afectan benéficamente al huésped mejorando su balance intestinal previniendo

enfermedades como la diarrea asociada con el uso de antibióticos (Guevara, 2011; Jiménez, 2009).

En Venezuela las empresas de la industria de alimentos como: Biotécnica Catalina, C.A., Plumrose, Nestle y Alimentos Polar, pertenecientes a la Cámara Venezolana de la Industria de Alimentos (CADIVEA, 2019). Utilizan bacterias ácido lácticas (BAL), para elaborar alimentos de origen lácteo y cárnico, todas ellas exaltando la presencia de *Lactobacillus*, pero la producción de este tipo de productos en el país no se compara con la variedad existente en otros países de América Latina (Martínez, 2009).

Tomando en cuenta estas aseveraciones, nace como una necesidad de la industria alimentaria y sector pecuario en Venezuela, proveer un medio de cultivo apropiado para el desarrollo de dichas bacterias, el cual contenga nutrientes y factores de crecimiento, que provean condiciones bioquímicas y biofísicas, así como la obtención de altas densidades de biomasa bacteriana.

Generalmente estos requerimientos suelen suplirse en un ambiente rico nutricionalmente como la leche, limitando su utilidad a productos lácteos. Estudios anteriores muestran que el caldo o agar M.R.S. (Man, Rogosa y Sharpe). Es un medio de cultivo adecuado para la recuperación de *Lactobacillus* en condiciones de laboratorio. Sin embargo a nivel industrial el medio M.R.S., no resulta rentable (Cabeza, 2006; Ossa, Vanegas y Badillo, 2010).

Siguiendo el mismo orden de ideas, se plantea utilizar un sustrato alternativo al M.R.S., el cual permita el crecimiento de los *Lactobacillus*, que potencie la obtención de biomasa bacteriana, además de su respectivo uso en múltiples áreas tales como la industria de alimentos, adictivos para

alimentos de animales, entre otros; proporcionando una relación de mínimo costo y altos beneficios.

Una alternativa al M.R.S., pero con un costo de producción menor es la melaza de caña, la cual, debido a su composición, favorece el crecimiento de las BAL, Hernández, Chávez, y Rosales, (2008). Es importante destacar que nuestro país tiene un potencial como productor azucarero. De este modo la melaza de caña, un subproducto de la refinación del azúcar, puede transformarse en el sustituto ideal para la producción de *Lactobacillus*, en el país.

Considerando las anteriores formulaciones, y valiéndose de las herramientas del Laboratorio de Tecnología Farmacéutica I de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, con la colaboración del Laboratorio de Salud Pública del estado Mérida, área de microbiología, este trabajo se plantea establecer las diferencias y semejanzas del crecimiento de *Lactobacillus* spp., relacionado con varias concentraciones de melaza de caña en medios de cultivo. Esto con el fin de obtener la concentración idónea para la producción de la bacteria, desde junio de 2018, hasta junio 2019.

Justificación de la Investigación

Los *Lactobacillus* spp., son un género de bacterias del grupo de las denominadas BAL, las cuales son flora habitual del ser humano y varias especies de animales. Debido a su potencial como microorganismo probiótico han sido objeto de estudio de distintas investigaciones que buscan optimizar el uso de esta bacteria en el campo biotecnológico (Cabezas, 2006; Samaniego y Sosa, 2007).

Establecer medios óptimos y rentables, para obtener altas densidades de microorganismos, ha sido la meta de muchas empresas. Pero los métodos de cultivo industrial para *Lactobacillus*., se caracterizan por sufrir de la inhibición del crecimiento celular debido a la producción de ácido láctico además de ser muy costosos (León, *et al*, 2013).

En Venezuela no se cuenta con sistemas apropiados para el desarrollo de métodos y medios de cultivos, en la producción de *Lactobacillus*. Por ende las empresas donde se utilizan como cultivo iniciador importan estos microorganismos. Esto se refleja en el alto costo de los alimentos, medicamentos, suplementos, entre otros productos nacionales que utilizan esta bacteria como materia prima (CAVIDEA, 2019; Martínez, 2009).

El desarrollo de métodos que permitan obtener biomasa bacteriana, es de gran interés, la melaza de caña es un recurso abundante en prácticamente todas las regiones de Venezuela, además distintos estudios han demostrado su potencial para el cultivo de bacterias ácido lácticas, (BAL). Siendo un aporte a la industria biotecnológica nacional. Lo que conlleva indirectamente a beneficiar la economía y calidad de vida del país.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Comparar el crecimiento de *Lactobacillus* spp., en términos de biomasa obtenida, relacionado con varias concentraciones de melaza de caña en medios de cultivo, con el propósito de establecer la concentración idónea para la producción bacteriana. En el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica I de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, con la colaboración del Laboratorio de Salud Pública del estado Mérida, área de microbiología, desde junio de 2018, hasta junio 2019.

Objetivos Específicos

1. Distinguir el crecimiento del *Lactobacillus* spp., con las diferentes concentraciones de melaza de caña en medios de cultivo.
2. Interpretar la biomasa bacteriana obtenida según las concentraciones de melaza de caña al 5, 10, 15, 20, 25 y 30%.
3. Evaluar el crecimiento de *Lactobacillus* spp., en términos de biomasa con las diferentes concentraciones de melaza al 5, 10, 15, 20, 25 y 30%.
4. Cotejar las diferencias y semejanzas del crecimiento bacteriano. en medios de cultivo con concentraciones de melaza al 5, 10, 15, 20, 25 y 30%.

Alcance de la investigación

Esta investigación es de alcance correlacional con la finalidad de obtener la concentración óptima de melaza de caña para el cultivo de *Lactobacillus* spp., estableciendo una relación entre la concentración de sustrato y el crecimiento bacteriano medido en biomasa (g/mL).

Límites de la investigación

Las limitaciones para la realización de esta investigación fueron las siguientes:

- Disponibilidad de recursos financieros para subsidiar el alto costo de los materiales y la escasez de los mismos.
- Dificulta para conseguir una cepa pura de *Lactobacillus* spp.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Para la siguiente investigación se tomaron en cuenta como trabajos previos aquellos que tomaban como núcleo investigativo la melaza de caña para sustrato alternativo en medios de cultivo bacteriano.

En lo que se refiere a Venezuela y el uso de la melaza como sustrato tenemos investigaciones como “Cultivo polialgal (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella* sp, y *Tetraselmis chuii*), en medios nutritivos no Convencionales”, donde uno de los obstáculos en la producción masiva de microalgas es la formulación y selección de un medio de cultivo química y económicamente adecuado. Este trabajo empleo como fuente nutritiva tres medios de cultivo alternativos: gallinaza, melaza y organina, comparando los resultados obtenidos con el medio de control Guillard f/2 (Gómez, Rodríguez y Subero, 2011).

En el año 2012, Cardozo y Moreno realizaron un trabajo en el cual buscaban diseñar y optimizar un medio a base de melaza de caña, suplementado, que favorecieran la producción de biomasa en *Saccharomyces cerevisiae* para el cual se realizo una cinética preliminar en caldo YPG y luego hacer una comparación con los resultados obtenidos en los medios a base de melaza de caña concluyendo que la melaza a una concentración de 20% (p/v) representa una buena fuente nutricional ya que cuenta con la mayoría de los macroelementos esenciales para el desarrollo de este microorganismo.

Un estudio de Pérez y Hernández en el 2015, evaluó las potencialidades del uso de jugo de Aloe vera (sábila) y coproductos azucareros para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* LB/103-1-5. Utilizando como sustratos: jugo de sábila 100 % combinado con glucosa mas melaza, jugo al 75% con melaza y como sustrato estándar M.R.S. (Man Rogosa y Sharpe). Teniendo como resultados que el mejor sustrato a emplear como medio de cultivo alternativo para el crecimiento de *L. plantarum* LB/103-1-5 es el jugo de sábila al 75 % con melaza.

Posteriormente, Aguilar, *et al.*, (2015), realizaron un trabajo de investigación el cual tuvo como objetivo evaluar los residuos provenientes de la industria azucarera y lechera (la melaza de caña y suero lácteo), como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*, teniendo como medio de cultivo control, jugo de uva suplementado.

Antecedentes Históricos

Gómez, Nápoles, Núñez y Martínez en el 2008, en su trabajo “Influencia de la Concentración de Melaza y Extracto Acuoso de Soya sobre la Velocidad Específica del Crecimiento de *Bradyrhizobium elkanii* ICA 8001” consideran adecuado el uso de la melaza y los extractos de semillas en la multiplicación celular de los microorganismos, debido a su demostrado papel nutricional por lo que estos sustratos se han convertidos en valiosos componentes para el diseño de medios de cultivo.

En concordancia Flores, Gómez, Gimeno y Shirai para el año 2009, realizan una ponencia en el Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería en México. Sobre el “Diseño de un Medio de Cultivo a partir de Melaza y desechos de Jaiba para la producción de Ácido Láctico y recuperación de Quitina”. El objetivo de este estudio fue determinar las

concentraciones óptimas de desechos de jaiba y melaza para la producción de ácido láctico y extracción de quitina.

Para el año 2010, Ossa y colaboradores, realizaron un estudio intitulado “Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* GROWTH” donde destacan la importancia de las bacterias ácido lácticas como los *Lactobacillus*, colocando de manifiesto la necesidad en el mundo de encontrar métodos óptimos para su crecimiento utilizando sustratos alternativos.

En esta investigación se empleó la melaza de caña para el cultivo de *Lactobacillus plantarum*. Concluyendo que la melaza de caña puede ser usada como sustrato para su desarrollo, (Ossa et al., 2010).

Bases Teóricas

Las bases teóricas de esta investigación se sustentaran desde la postura investigativa de autores, artículos científicos, entre otros, en relación con la utilización de melaza de caña como sustrato para la obtención de *Lactobacillus* spp.

Crecimiento Bacteriano

Entendemos por crecimiento bacteriano a la duplicación o el aumento de la población como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división en un determinado lapso de tiempo, aumentando el número de células bacterianas, o sea que el resultado final de dicho crecimiento es la duplicación celular (Madigan *et al.*, 2004; Tortora, Funke y Case, 2007).

Es importante diferenciar que cuando hay crecimiento sin división celular solo hay aumento del tamaño de la célula, mientras que cuando se

produce el crecimiento acompañada de la división celular estamos hablando de crecimiento poblacional. Esto es importante ya que los microorganismos debido a su pequeño tamaño no se hacen estudios de manera individual sino de sus poblaciones (Tortora, *et al.*, 2007).

En los aspectos a considerar en el crecimiento bacteriano tenemos los siguientes: velocidad de crecimiento, tiempo de generación, crecimiento exponencial lo cual al final nos permite crear una curva del crecimiento bacteriano (Madigan *et al.*, 2004).

Velocidad de crecimiento: es el cambio en el número de células experimentado de manera exponencial por unidad de tiempo, esto se sustenta en el hecho de que cada célula se divide en dos células hijas las cuales harán el mismo proceso de su progenitora generando un modelo exponencial de duplicación bacteriana (Madigan *et al.*, 2004; Willey, Sherwood, Woolverton y Prescott, 2011).

Tiempo de generación: es el tiempo que tarda un cultivo bacteriano en duplicar su población y puede variar desde unos 20 minutos en condiciones óptimas hasta varios meses en condiciones ambientales (Madigan, 2012).

Crecimiento exponencial: es el incremento de la población en la que cada periodo fijo de tiempo se duplica el número de células ver (figura 1). Para obtener información sobre el crecimiento exponencial se utiliza una gráfica semilogarítmica en la que se representa el número de células en una escala logarítmica \log_{10} y el tiempo en una escala aritmética obteniendo una línea recta que indica que las células están creciendo exponencialmente ver (figura 2) (Madigan *et al.*, 2004).

Tiempo (horas)	Número de células	Log del número de células
0	1	0
0,5	2	0,301
1	4	0,602
1,5	8	0,903
2	16	1,204
2,5	32	1,505
3	64	1,806
3,5	128	2,107
4	256	2,408
4,5	512	2,709
5	1024	3,0103
-	-	-
-	-	-
10	1048576	6,021

Figura 1 Datos de una población que se replica cada 30 min, fuente: (Madigan, et al. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos.10 ed, pág., 142).

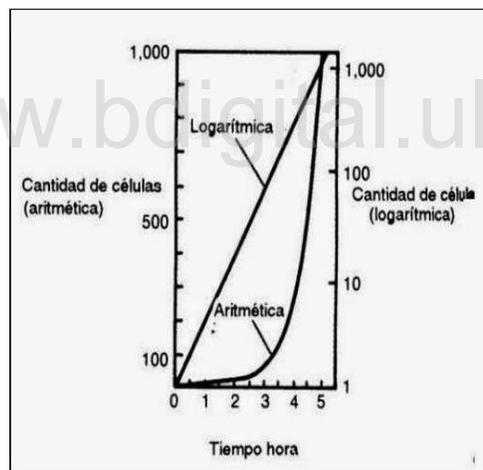


Figura 2 Grafica semilogarítmica del crecimiento exponencial: datos representados en escala aritmética (tiempo) y en escala logarítmica (número de células), fuente: (Madigan, et al. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos.10 ed, pág., 142).

Curva de crecimiento: los datos que se observan en la figura 1 y 2, reflejan solo parte del ciclo de crecimiento de una población microbiana, la curva de crecimiento bacteriano muestra las cuatro fases del ciclo llamadas: (Tortora *et al.*, 2007).

- Fase de latencia.
- Fase exponencial.
- Fase estacionaria.
- Fase de muerte.

Fase de latencia: cuando se inocula una población bacteriana en un medio fresco por lo general el crecimiento no comienza inmediatamente, solo tras un periodo de adaptación que constituye la fase de latencia, la cual puede ser breve o larga dependiendo de la procedencia del cultivo y de las condiciones del medio (Schlegel y Zaborosch, 1997; Tortora *et al.*, 2007).

Fase exponencial: la fase exponencial de crecimiento ya ha sido comentada, es el periodo en el cual el microorganismo cada vez que pasa un tiempo de generación la población se duplica (Schlegel y Zaborosch, 1997; Tortora *et al.*, 2007).

Fase estacionaria: en un sistema de cultivo cerrado como por ejemplo un tubo o una placa agar el crecimiento exponencial no se puede prolongar de modo indefinido, ya sea por el agotamiento de un nutriente esencial del medio, acumulación de productos tóxicos o se alcanza un número de células mayor que el espacio disponible, que hace que cese el crecimiento exponencial (Schlegel y Zaborosch, 1997; Tortora *et al.*, 2007).

Fase de muerte: si la incubación continúa después que la población haya alcanzado al fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero comienza a disminuir el número de células viables, entonces se dice que la población está en fase de muerte (Schlegel y Zaborosch, 1997; Tortora *et al.*, 2007).

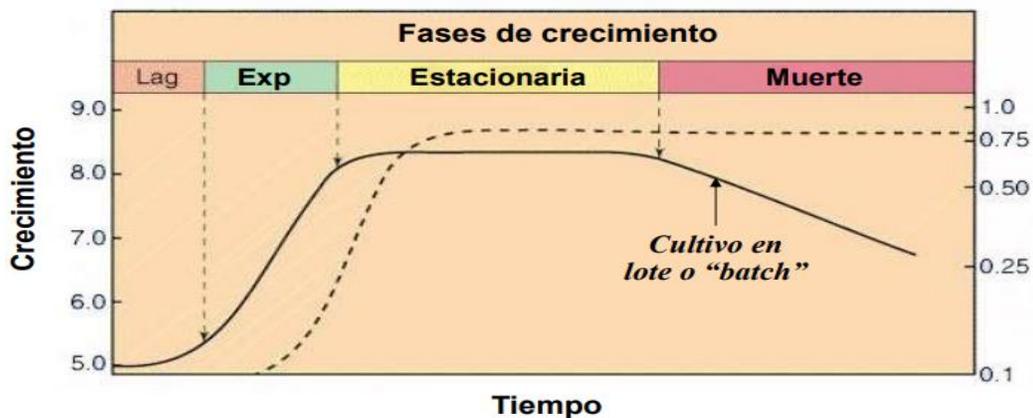


Figura 3 Curva de crecimiento, fuente: (Madigan, et al. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos.10 ed, pág., 144).

Recuento celular

Se realiza estimando los cambios en el número de células, la cantidad de algún producto metabólico o en el peso seco celular. Existen varios métodos para contar el número de células o de determinar la masa celular, en los que están los métodos directos e indirectos (Madigan, 2012).

Métodos directos: son métodos clásicos que se basan en el número de células o en el peso seco celular. Los métodos de numeración celular son métodos de observación, basados en propiedades físicas o en la actividad biológica dentro de estos métodos podemos distinguir los siguientes:

- Métodos gravimétricos (peso seco).
- Método espectrofotométrico.
- Método microscópico mediante epifluorescencia.
- Método microscópico de recuento celular en cámaras.
- Métodos de siembra (Arnáiz, Isac y Lebrato, 2000).

Métodos gravimétricos: se basan en medir la cantidad total de biomasa presente en una muestra en términos de peso seco por unidad de

volumen, ya sea como sólidos en suspensión totales (SST) o sólidos en suspensión volátiles (SSV) (Arnáiz, *et al.*, 2000).

Este método consiste en separar las células bacterianas del líquido bien por centrifugación o por filtración y se expresa en unidades g/mL. La principal desventaja de esta técnica es que su determinación incluye no sólo microorganismos activos sino microorganismos muertos, material inerte, polímeros extracelulares y materia orgánica adsorbida. Además, no puede aplicarse cuando los sustratos a degradar son insolubles. Los métodos gravimétricos son simples, pero consumen bastante tiempo y son poco reproducibles (Arnáiz, *et al.*, 2000).

Sólidos en suspensión totales (SST): se definen como la porción de sólidos suspendidos en una muestra líquida y que se determinan mediante la cantidad de material retenido en un filtro el cual es medido después de que ha sido secado por evaporación a una temperatura específica, es importante tomar en cuenta el tamaño del poro específico del papel filtro utilizado (López, Gandí y García, 2014).

Sólidos en suspensión volátiles (SSV): son los sólidos que se volatilizan e incineran, cuando los sólidos suspendidos totales (SST) son sometidos a una temperatura de 500 a 550 °C, esta pérdida de peso se interpreta en términos de materia orgánica volátil, los sólidos que no se volatilizan se denominan sólidos fijos. Es decir que los SSV, representan la fracción de sólidos suspendidos totales que se volatilizan a dicha temperatura (López, *et al.*, 2014).

Método espectrofotométrico: se fundamenta en la existencia de una relación directa entre el número total de microorganismos presentes en una muestra y su valor de turbidez. La determinación de la turbidez en la

suspensión celular se realiza mediante espectrofotometría y el resultado se expresa en unidades de absorbancia (Arnaiz, *et al.*, 2000).

Métodos microscópicos mediante epifluorescencia: es considerado uno de los mejores métodos para la estimación de la biomasa. La epifluorescencia es debida a un agente fluorocromo unido a algún anticuerpo o puede ser causa de una autofluorescencia natural debida a la existencia de algún componente celular autofluorescente (Arnáiz, *et al.*, 2000).

Métodos microscópicos de recuento celular en cámaras: en estos métodos el número de células de una población se puede determinar de dos formas en muestras secas sobre porta objetos o en muestras líquidas. Con muestras líquidas se emplea cámaras de recuento especiales como la cámara de Neubauer, Thoma, Bürker-Türk, Fuchs-Rosenthal, Malassez, Petroff Hauser, entre otros, que en esencia son porta escavados modificados, sobre cuya superficie de vidrio está marcada una rejilla o pequeños cuadrados de área conocida lo que permite conocer el número de células por el volumen que determina cada área (n° cel/mL) (Arnáiz, *et al.*, 2000; Collins, Lyne, Grange y Falkinham, 2004).

Métodos de siembra: se fundamenta en la capacidad de dichas células para desarrollar una colonia visible en un medio de cultivo el método usual para realizar una determinación de células viables se basa en contar el número de células que es capaz de formar colonias. Hay dos maneras de realizar el recuento de células viables: el método de extensión en placa y el método de vertido en placa (figura 4) (Willey *et al.*, 2011).

- **Método de extensión en placa:** un volumen de cultivo diluido, que no suele ser superior a 0,1 mL, se extiende sobre la superficie de una placa de petri con medio sólido utilizando un

asa estéril de extensión. La placa se incuba hasta que aparecen las colonias y se cuenta su número (Willey *et al.*, 2011).

- **Método del vertido en placa:** se pipetea un volumen conocido de la muestra, normalmente 0,1- 1,0 mL de cultivo en una placa de petri estéril sobre la que se añade el medio con agar fundido (Willey *et al.*, 2011).

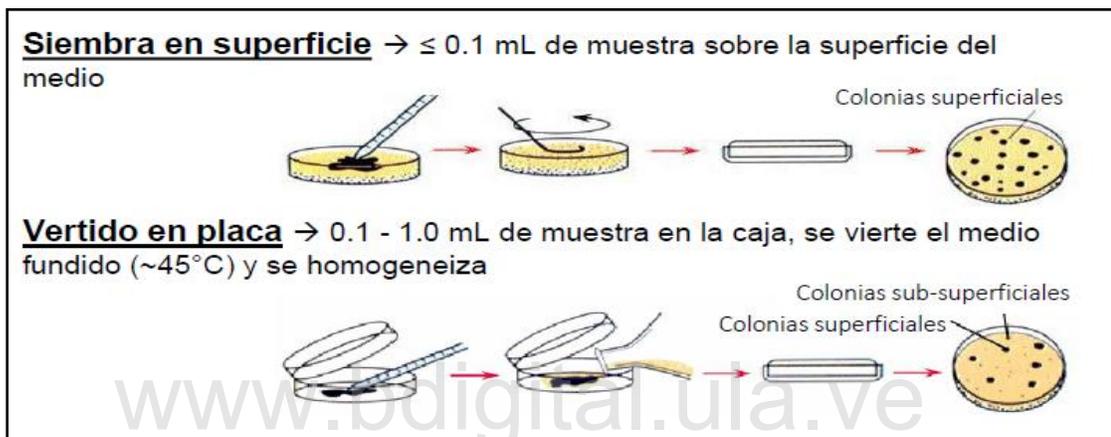


Figura 4 Determinación células viables. (recuento en placa): en cada caso la muestra se diluye normalmente antes de sembrar, fuente: (Madigan, et al. (2004). Brock. Biología de los Microorganismos.10 ed, pág., 146).

Métodos indirectos: actualmente hay un gran interés en métodos alternativos de determinación de biomasa. Estos métodos son indirectos y estiman algún componente celular o alguna actividad metabólica específica, además no requieren el examen visual de los organismos ni su incubación (Arnáiz, *et al.*, 2000).

Medio de Cultivo

Es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes, que proveen condiciones bioquímicas (oxígeno, carbono,

nitrógeno, azufre, entre otros) y biofísicas (temperatura, pH, presión osmótica) apropiadas para el aislamiento, desarrollo y mantenimiento de los microorganismos, son altamente utilizados para diagnóstico microbiológico, así como en el desarrollo de biomasa microbiana (García, *et al.*, 2006).

Clasificación: los medios de cultivos se pueden clasificar según su:

- **Estado físico:** medios líquidos o caldos, sólidos y semisólidos.
- **Composición:** medios sintéticos o definidos y medios complejos.
- **Utilidad:** medios de transporte, selectivos, diferenciales, selectivos-diferenciales, enriquecidos, de enriquecimiento y de conservación (García, *et al.*, 2006).

Según su estado físico.

Medios líquidos o caldos: se presentan en estado líquido denominándose por ello caldos. Con adición de algún tampón, capaz de mantener el pH adecuado (Piccoli, Bojanihc, López y Sosa, 2010).

Medios sólidos: es un agar o gelatina esterilizados que se vierten en una placa de Petri o en tubos. Las exigencias nutritivas y las condiciones físico-químicas son similares a las de los medios líquidos (Piccoli, *et al.*, 2010).

Medios semisólidos: se preparan a partir de medios líquidos, agregando un agente solidificante en una proporción menor que lo medios sólidos usualmente al 0.4% (Piccoli, *et al.*, 2010).

Según su composición.

Medios sintéticos: son aquellos en el que se conocen todos los componentes químicos del medio, y la proporción exacta de cada uno (Piccoli, *et al.*, 2010).

Medios complejos: contienen ingredientes cuya composición no está determinada, además no se conoce la proporción de cada uno de sus componentes (Piccoli, *et al.*, 2010).

Según su utilidad.

Medios de transporte: son medios con bajo aporte nutricional para impedir el sobrecrecimiento ya que se usa para transportar aquellas muestras que no van a ser procesadas de inmediato o que deban ser trasladadas de un laboratorio a otro (Piccoli, *et al.*, 2010).

Medios selectivos: son medios que se les agrega uno o más agentes inhibidores para que favorezcan el crecimiento de un microorganismo en particular mientras que inhibe crecimiento de otros (Piccoli, *et al.*, 2010).

Medios diferenciales: son medios que nos permiten diferenciar microorganismos a través de la utilización del sustrato añadido, el cual se evidencia con un viraje de color del indicador utilizado (generalmente de pH). Dependiendo si se acidifica o alcaliniza el medio (Piccoli, *et al.*, 2010).

Medios selectivo-diferenciales: son todos aquellos medios a los que se le añade un indicador y un agente selectivo que nos permite diferenciar la presencia de un microorganismo con otro. Por esta razón es uno de los medios más utilizados debido a su doble propiedad, de permitir el

crecimiento de solo ciertos microorganismos y diferenciarlos unos de otros a través de sus propiedades metabólicas (García, *et al.*, 2006).

Medios enriquecidos: son medios en los que además de las sustancias nutritivas normales, incorporan una serie de factores indispensables para el crecimiento de microorganismos exigentes (Piccoli, *et al.*, 2010).

Medios de enriquecimiento: se basan en la libre competencia por los sustratos. Son medios que favorecen o permiten la multiplicación de unas bacterias, inhibiendo parcialmente la de otras (Piccoli, *et al.*, 2010).

Medios de conservación: se utilizan para conservar todas aquellas cepas de microorganismos, que sean de interés e importancia en el laboratorio por largos periodos de tiempo así como la preservación de cepas utilizadas como colección (García, *et al.*, 2006).

Bacterias Ácido Lácticas

Son un grupo de bacterias con la característica común de producir ácido láctico como principal producto del metabolismo celular; se encuentran en la leche que es un medio típico y satisfactorio para su crecimiento sin embargo otros medios también son excelentes para su proliferación. Representados por microorganismos de varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común, tienen forma de cocos o bacilos Gram positivo, no esporuladas, no móviles, anaeróbicas, microaerofilicas o aerotolerantes, oxidasa, catalasa y bencidina negativos, carecen de citocromos y no reducen el nitrato a nitrito (Guevara, 2011; Ramírez *et al.*, 2011).

Su importancia radica en el beneficio que proporcionan estas bacterias cuando son utilizadas como probióticos, ya que producen sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, adhiriéndose a las paredes del tejido gastrointestinal de ahí que ejercen un efecto directo en la salud del tracto digestivo lo cual trae muchos beneficios en la salud humana y animal es por ello que los probióticos se adicionan a productos alimenticios dotándoles de un valor agregado (Jiménez, 2009).

Lactobacillus spp.

Son el género más representativo de las bacterias ácido lácticas, pertenecen al grupo de las Gram positivas, morfológicamente se caracterizan por ser bacilos largos y extendidos aunque esto no descarta que puedan observarse bacilos cortos o coryneformes (Kandler y Weiss, citados en Bergey's, 1992). Además son anaerobias-aerotolerantes, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros no requieren oxígeno (O₂), aunque algunas especies pueden crecer en presencia de CO₂, transforman la lactosa y algunos monosacáridos en ácido láctico convirtiéndolos en, organismos probióticos de interés particular por su larga historia de uso (Vásquez, Suarez y Zapata, 2009).

Los *Lactobacillus* fueron entre los primeros organismos usados por el hombre para la producción de alimento y su preservación, al inhibir la invasión por otros microorganismos que causan la descomposición de la comida (Ramírez *et al.*, 2011; Vásquez *et al.*, 2009).

Entre las principales especies de *Lactobacillus* más usados tenemos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii sub sp.*, *Bulgaricus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus*

plantarum, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus* (Jiménez, 2009; Martínez, 2009).

Nutrición y condiciones de crecimiento: los *Lactobacillus* presentan particularidades para cada especie respecto a los requerimientos nutricionales debido a que no sólo necesitan carbohidratos como fuentes de carbono y energía, sino también: aminoácidos, vitaminas y nucleótidos, generalmente estos requerimientos variados suelen suplirse cuando el medio de cultivo contiene carbohidratos fermentables, peptona, extracto de carne y extracto de levadura, aunque una suplementación con jugo de tomate, manganeso, acetato y esteres del ácido oleico, especialmente Tween 80, resulta estimuladora y hasta esencial para muchas especies (Ramírez *et al.*, 2011).

Factores de crecimiento: son compuestos orgánicos que, como los micronutrientes, se necesitan en muy pequeñas cantidades. Entre estos factores se pueden encontrar las vitaminas, aminoácidos, purinas y pirimidinas, en algunos casos es necesario suministrarlos a los medios de cultivo (Tortora *et al.*, 2007).

También existen otros factores que influyen en el crecimiento bacteriano tales como:

- **pH:** los *Lactobacillus* son bacterias ácido tolerantes pudiendo crecer bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4 - 4,5 y con uno óptimo de desarrollo entre 5,5 y 6,2. Su crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores desde 4 hasta 3,6 y disminuye notablemente en medios neutros o ligeramente alcalinos (Bergey`s, 1992).

- **Temperatura:** la mayor parte de los *Lactobacillus*. son mesófilos esto quiere decir que pueden crecer en una temperatura de 30 – 40 °C, con un límite superior de 40 °C., algunos pueden crecer por debajo de 15° C y hay cepas que crecen a temperaturas cercanas al punto de congelación (por ejemplo, los que habitan en carnes y pescados congelados). También encontramos los llamados *Lactobacillus* “termófilos” que pueden tener un límite superior de temperatura de 55 °C (Bergey`s, 1992).
- **Oxígeno:** la mayoría de las cepas de *Lactobacillus*. son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofilicas o anaeróbicas y se conoce que un incremento de la concentración de CO₂ (de aproximadamente 5% o hasta el 10%) puede estimular el crecimiento, sobre todo en el caso del crecimiento superficial sobre medios sólidos (Bergey`s, 1992).

Metabolismo: los *Lactobacillus* van de la vida anaerobia a la aerobia. Estos microorganismos carecen de sistemas de citocromos para ejecutar la fosforilación oxidativa y no poseen enzimas superóxido dismutasas ni catalasas. Los miembros de este género transforman los carbohidratos que producen azúcares simples y los alcoholes polihidroxicos en ácido láctico por homofermentación, otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico se dan por heterofermentación (Kandler, 1983).

Medios de cultivos para *Lactobacillus* spp.: como ya se había mencionado los requerimientos nutricionales son característicos de cada especie, pero en general para los *Lactobacillus* es deseable que el nitrógeno sea orgánico en forma de aminoácidos o péptidos dentro de los cuales el

ácido glutámico, isoleucina y valina son considerados factores de crecimiento y deben estar presentes en el medio de cultivo. Los medios más usados para el desarrollo de *Lactobacillus* a nivel industrial son medios lácteos pero en el laboratorio se usa el M.R.S. (Man, Rogosa y Sharpe) (León, *et al.*, 2013).

Medio de cultivo M.R.S: el agar M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de *Lactobacillus* y otras bacterias ácido lácticas. Este medio está compuesto por proteasa, peptona, extracto de carne, extracto de levadura y glucosa que constituyen la fuente nutritiva ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales también contiene el monoleato de sorbitán, sales de sodio, magnesio y manganeso que proveen cofactores para el crecimiento bacteriano. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas (León, *et al.*, 2013).

Sin embargo, para la producción de los *Lactobacillus* en el medio M.R.S. no resulta rentable, por lo que surge la necesidad de buscar otras fuentes económicas de materia prima para su producción y desarrollo de biomasa.

La Melaza de Caña

Según el Instituto colombiano de normas técnicas la melaza suele ser definida como, los residuos de la cristalización final del azúcar de la cual no se puede obtener más azúcar por métodos físicos (ICONTEC, 1994). Por su parte Honig, (1974), la define como un líquido denso, viscoso de color oscuro que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles en álcali que normalmente están presentes en el jugo de caña localizado.

Clasificación: la asociación Americana de Control Oficial de Alimentos (AAFCO), recomienda diferentes clasificaciones para las melazas, según su contenido de azúcar total y humedad entre las cuales se tiene: (Castro, 1993, citado en Fajardo y Sarmiento 2007).

- **Melaza superior blackstrap:** melaza de caña que contiene 23,4% de agua o menos y 53,5% o más de azúcares totales.
- **Melaza blackstrap:** melaza compuesta por 23,5% a 26,4% de agua y 48,5% a 53,5% de azúcares totales (Castro, 1993, citado en Fajardo y Sarmiento 2007).

Otra clasificación de la melaza se da por el porcentaje de materia sólida en peso (grado Brix):

- **Melaza blackstrap:** cuyo grado Brix, diluido con igual peso de agua es de 42,5 grados Brix.
- **Melaza de caña alimenticia:** es la melaza Blackstrap diluida con agua hasta una concentración no menor a 37,9 grado Brix.
- **Melaza high test o jarabe invertido:** producto obtenido por la concentración de jugo clarificación hasta un grado Brix de 85 % e invertido con ácido (Castro, 1993, citado en Fajardo y Sarmiento 2007).

Composición: la composición de la melaza es muy heterogénea y depende de la variedad de caña de azúcar, suelo, clima, periodo de cultivo, eficiencia de la operación de la fábrica, sistema de ebullición del azúcar, tipo y capacidad de los evaporadores, entre otros. Por otro lado la melaza de caña se caracteriza por tener grado Brix o sólidos disueltos de 68-75% y un pH, de 5,0- 6,1 (Castro, 1993).

Entre los sólidos disueltos en la melaza tenemos.

Azúcares: los principales azúcares en la melaza son la sacarosa (60% - 63% en peso), glucosa o dextrosa (6% - 9% en peso), y la fructosa o levulosa (5% - 10% en peso); estas dos últimas pertenecen a los azúcares reductores (Castro, 1993).

No azúcares: los no azúcares están compuestos por 33% de sustancias inorgánicas (Fe^{+3} , K^+ , Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , As^{+3} , Cd^{+2} , Hg^+ , Pb^+ , y Cl^- , NO_3^- , SO_2^-), el 42% corresponde a sustancias nitrogenadas (aminoácidos, péptidos, colorantes) y el 25% a sustancias orgánicas libres de nitrógeno (ácidos carboxílicos, alcoholes, fenoles, ésteres, vitaminas, gomas y dextranos) (Castro, 1993).

Cenizas: en general la composición de las cenizas de las melazas, es cualitativamente similar a la del jugo, del cual se obtiene éstas: potasio 40%, calcio 10 a 20%, magnesio, sodio, aluminio, sílice, cloruros, fosfatos y los óxidos de hierro completan el resto de contenido de cenizas (Castro, 1993).

Compuestos nitrogenados: están constituidos principalmente por aminoácidos mono y dibásicos, amidas ácidas, betaínas y pequeñas cantidades de peptonas y nitratos (Castro, 1993).

Ácidos: ácido aconítico, ácido málico, cítrico y fórmico la mayoría de estos ácidos, son metabolizados por los microorganismos como fuentes de carbono y no inhiben el crecimiento bacteriano (Castro, 1993).

Vitaminas: la niacina, ácido pantoténico y riboflavina, están presentes siendo importantes para el crecimiento microbiano, pueden estar presentes

en cantidades significativas y otras vitaminas lo están en cantidades muy pequeñas (Castro, 1993).

Fenoles y compuestos volátiles: los cuales en concentraciones mayores a 0,5 g/L no permiten el crecimiento bacteriano, los fenoles proviene de la parte fibrosa de la caña y se derivan de los ácidos hidroxicinámico y para-hidroxibenzoico (Castro, 1993).

Tabla 1 composición de la melaza de caña de azúcar.

COMPONENTES	CONSTITUYENTES	CONTENIDO (P/P)
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60-63 %
	Azúcares reductores	3-5%
	Sustancias disueltas (diferentes azúcares)	4-8%
	Agua	16%
	Grasas	0,40%
	Cenizas	9%
Contenido de minerales	Calcio	0,74 %
	Magnesio	0,35%
	Fosforo	0,08%
	Potasio	3,67%
Contenido de aminoácidos	Glicina	0,10%
	Leucina	0.01%
	Lisina	0.01%
	Treonina	0,06 %
	Valina	0,02%
Contenido de vitaminas	Ácido Pantoténico	42,90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Riboflavina	4,40 ppm
	Tiamina	0,88 ppm

Fuente: Tellez, (2004) citado en Fajardo y Sarmiento 2007

Microorganismos en la melaza: mediante ensayos adecuados con soluciones diluidas de melazas, se ha demostrado que éstas, a pesar de su bajo contenido de fósforo, constituyen un buen medio nutritivo para muchos microorganismos, tales como levaduras, hongos y bacterias (Ariza y González, 1997, citado en Fajardo y Sarmiento, 2007).

Definición de Términos

Grado Brix: los grados Brix son una unidad de cantidad y sirven para determinar el cociente total de materia seca disuelta en un líquido (Castro, 1993).

Biomasa: cantidad total de materia viva presente en una comunidad o ecosistema (Tortora *et al.*, 2007).

Sustrato: es la base, materia o sustancia que sirve de sostén a un organismo, ya sea vegetal, animal o protistas, en el cual transcurre su vida; el sustrato satisface determinadas necesidades básicas de los organismos como la fijación, la nutrición, la protección, la reserva de agua, entre otros (Tortora *et al.*, 2007).

Probiótico: son organismos y sustancias los cuales se suministran como suplemento en los alimentos para que ayuden al hospedero a mejorar su salud siendo los principales microorganismos utilizados como probióticos; *Lactobacillus* spp., y *Bifidobacterium* sp. Nativas del tracto gastrointestinal (Fuller, 1989; Parker, 1974).

Cepa: en microbiología, población de células de una sola especie descendientes de una única célula, usualmente propagada clonalmente (Madigan, 2012).

Abreviaturas

- **M.R.S.:** Man Rogosa y Sharpe.
- **CADIVEA:** Cámara Venezolana de la Industria de Alimentos.
- **SST:** sólidos suspensión totales.
- **SSV:** sólidos en suspensión volátiles.
- **BAL:** bacteria ácido láctica.
- **AAFCO:** la Asociación Americana de Control Oficial de Alimentos.
- **ICONTEC:** Instituto Colombiano de Normas Técnicas.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Según Hurtado, (2007), se entiende por metodología al estudio de los modos o maneras de llevar a cabo algo, en el campo de la investigación, la metodología es el área del conocimiento que estudia los métodos generales de las disciplinas científicas.

En el mismo orden de ideas la autora expresa: la metodología de la investigación está basada principalmente en las estrategias y procedimientos que utilizará el investigador para lograr los objetivos de su investigación, lo cual comprende:

1. Determinación del tipo de investigación.
2. Selección del diseño de investigación.
3. Definición de los eventos o fenómenos estudiados, así como de los indicios de medición.
4. Delimitación, elección y descripción de las unidades de estudio (población y muestra).
5. Selección de las técnicas y búsqueda o elaboración de los instrumentos de recolección de datos.
6. Descripción del procedimiento.
7. Selección de las técnicas de análisis de resultados, (diseño de análisis).

Cabe destacar que los procedimientos mencionados anteriormente, aplicarán o no, dependiendo del tema en estudio.

Tipo de investigación:

De acuerdo con Hurtado, (2007), los tipos de investigación se definen en base al objetivo general, clasificándolos en: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. Haciendo un paréntesis definimos una de ellas ya que será de interés para nuestra investigación.

La investigación comparativa tiene como objetivo identificar diferencias y semejanzas entre dos o más grupos o unidades de estudio. Su objetivo es comparar el comportamiento de uno o más eventos en los grupos observados. Requiere como logro anterior la descripción del fenómeno y la clasificación de los resultados (Hurtado, 2007).

Tomando en cuenta estas bases conceptuales podemos decir que nuestra investigación será de tipo comparativa ya que el objetivo general de esta investigación es comparar el crecimiento de *Lactobacillus* spp., en términos de biomasa obtenida, relacionado con varias concentraciones de melaza de caña en medios de cultivo, con el propósito de establecer la concentración idónea para la producción bacteriana.

Diseño de investigación:

El diseño de investigación se define en base a los procedimientos de la investigación. Por lo tanto el diseño se refiere a dónde y cuándo se recopila la información, así como la amplitud de la información a recopilar, de modo que se pueda dar respuesta a la pregunta de investigación de la forma más idónea posible (Hurtado, 2007).

El dónde se refiere a las fuentes; si son vivas, y la información se recoge en su ambiente natural, el diseño se denomina de campo, pero si la

información se recoge en un ambiente artificial o creado, se habla de diseño de laboratorio. Por el contrario, si las fuentes no son vivas, sino documentos o restos, el diseño es documental (Hurtado, 2007).

El cuándo del diseño, alude a la perspectiva temporal. Un diseño puede estar dirigido a reconstruir hechos pasados, entonces se denomina histórico o retrospectivo; si el propósito es obtener información de un evento actual, el diseño es contemporáneo. También es posible diferenciar entre diseño evolutivo o transeccional: en el diseño evolutivo el investigador estudia el evento en su proceso de cambio a lo largo del tiempo, por ello requiere hacer mediciones repetidas; pero en el diseño transeccional el investigador estudia el evento en un único momento del tiempo (Hurtado, 2007).

Otra definición que nos ofrece hurtado, es sobre el diseño experimental en el cual el investigador interviene sobre las variables independientes o sobre los procesos causales y los modifica de manera intencional y planificada para ver los efectos, pero además hace un control estricto de variables extrañas para descartar que los cambios no hayan sido originados por otros factores distintos a las variables independientes (Hurtado, 2007).

En base a estos conocimientos se puede decir que la investigación tendrá un diseño experimental de laboratorio transeccional, ya que trabajaremos en un ambiente artificial (En el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica I de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, con la colaboración del Laboratorio de Salud Pública del estado Mérida, área de microbiología), donde se podrá controlar las variables a intervenir (concentración de sustrato y obtención de biomasa), además el evento de estudio será observable en único momento de tiempo.

Población y muestra:

Se entiende por población el “conjunto finito o infinito de elementos con características comunes, para los cuales será extensivas las conclusiones de la investigación. Esta queda limitada por el problema y por los objetivos de estudios” (Arias, 2006).

Con respecto a la muestra Arias, (2006), establece que “es un subconjunto representativo y finito que se extrae de la población”. Es decir, representa una parte de la población objeto de estudio. De allí es importante asegurarse que los elementos de la muestra sean lo suficientemente representativos de la población para que permita hacer generalizaciones.

Para Castro, (2003), la muestra se clasifica como probabilística y no probabilística. La probabilística, son aquellas donde todos los miembros de la población tienen la misma opción de conformarla. La no probabilística, la elección de los miembros para el estudio dependerá de un criterio específico del investigador, lo que significa que no todos los miembros de la población tienen igualdad de oportunidad de conformarla.

En tal sentido, la muestra de esta investigación será de tipo probabilística, ya que todas las células bacterianas tienen las mismas posibilidades de formar parte del inóculo al momento de realizar la siembra en los medios de cultivos.

Población:

Lactobacillus spp.

Muestra:

Inóculo bacteriano de 10 mL.

Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

Las técnicas de recolección de datos, son definidas como la expresión operativa del diseño de investigación y que especifica concretamente como se hizo la investigación. (Tamayo, 1999).

Hurtado, (2007), explica que las técnicas se refieren al cómo recoger la información, mientras que los instrumentos constituyen las herramientas con las que se recolecta dicha información. Las técnicas de recolección de información se seleccionan con base en el tipo de indicio a través del cual se manifiesta el evento de estudio. Algunos indicios se pueden observar, otros hay que preguntarlos, y otros más están registrados en documentos. Cada técnica tiene sus propios instrumentos.

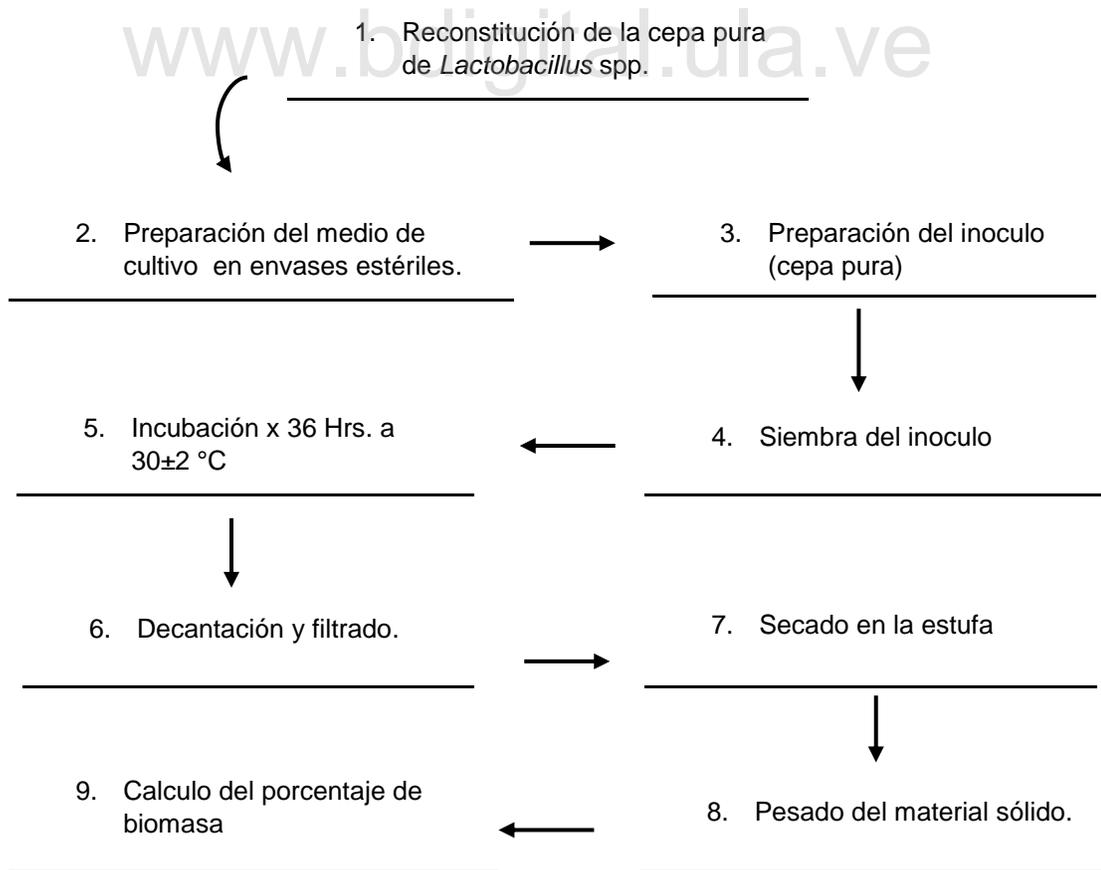
Siguiendo el mismo orden de ideas esta investigación utilizara técnicas de observación e instrumentos que le permitan recolectar información del fenómeno estudiado. Donde la observación: consiste en captar directamente lo que está ocurriendo con el evento. El investigador debe ser testigo de la ocurrencia del evento y percibirlo a través de los sentidos. No sirve cuando se trata de eventos que ya ocurrieron Hurtado, (2007). Algunos instrumentos de observación para esta investigación son: la guía de observación, la lista de cotejo y la balanza electrónica para la obtención del peso seco de biomasa.

Procedimiento de la investigación:

Un procedimiento consiste en seguir ciertos pasos predefinidos para desarrollar una labor de manera eficaz. Su objetivo debería ser único y de fácil identificación (Hernández, Fernández y Baptista, 2003).

Para esta investigación se llevara a cabo el siguiente procedimiento: primero se realizara la reconstitución de la cepa pura, luego la preparación de los medios de cultivo los cuales se harán en un matraz Erlenmeyer, estériles, transparente de 500 mL, de vidrio tipo 1 o vidrio boro silicato de alta resistencia hidrolítica, seguidamente se preparará el inculo de los *Lactobacillus* spp., seguido por la siembra del mismo en los medios de cultivo para su posterior incubación por 36 horas a una temperatura de 30 ± 2 °C, después del periodo de incubación se procederá a la decantación y filtrado del cultivo cosechado, se seca por evaporación y finalmente el sedimento obtenido es pesado para luego realizar el cálculo del porcentaje de biomasa obtenida en unidades g/mL.

Esquema 1 Secuencia experimental para el cultivo de *Lactobacillus* spp.



Materiales y Métodos

Materiales e Instrumentos.

- *Lactobacillus* spp.
- Melaza de caña.
- Agar M.R.S.
- Agua destilada.
- Matraz Erlenmeyer.
- Tubos de ensayo de 16*100 mm.
- Asa en aro.
- Asa en punta.
- Patrón de Mcfarland al 0,5 %.
- Papel filtro, (microporo 2-4 μ).
- Mechero.
- Gradilla.
- Placa de petri.
- Solución de cristal violeta.
- Lugol Mordiente.
- Alcohol acetona.
- Colorante de safranina.
- Lamina porta objetos
- Aceite de inmersión.

Equipos.

- Centrifuga.
- Estufa a 37°C.
- Balanza electrónica.
- Incubadora.
- Auto clave.
- Microscopio.

Actividades realizadas.

Reconstitución de la de cepa: se hizo en base agar M.R.S., luego se constato su crecimiento y se repicó nuevamente en agar M.R.S., incubándose por 24 horas a 37 °C, se observó el crecimiento y morfología. La pureza de la cepa se verificó con tinción de Gram.

Preparación del medio de cultivo melaza de caña: se prepararon 6 medios de cultivo en matraz Erlenmeyer de 500 mL, en los cuales se les agrego la cantidad de sustrato (melaza de caña) y diluyente (agua destilada) respetando las proporciones para obtener las concentraciones deseadas las cuales fueron del 5, 10, 15, 20, 25 y 30 % p/v. para posteriormente esterilizar en el auto clave a 120 °C durante 15 min.

Preparación del inóculo: posterior a este procedimiento, se tomaron colonias aisladas de *Lactobacillus* del agar base M.R.S., y se prepararon 6 inóculos de 10 mL en tubos de ensayo con tapa de rosca ajustando el valor de turbidez al patrón 0,5 de Mcfarland.

Siembra de los medios melaza de caña:, en un matraz erlenmeyer con capacidad de 500 mL se trasvaso 490 mL del caldo de melaza estéril y 10 mL del inóculo de la cepa probiotica este procedimiento se hizo con cada uno de los medios preparados a distintas concentraciones, luego se incubó por 36 horas a 30 ± 2 °C, con agitación cada 7 horas.

Filtrado y secado de biomasa obtenida: después del periodo de incubación se procede a filtrar la biomasa obtenida en los medios haciendo pasar el líquido por un papel filtro con microporos de 2-4 μ de diámetro a otro

recipiente, luego del proceso de filtrado se toma ese material y se coloca a secar en la estufa a 37°C por 12 horas.

Pesaje: se pesa la masa del papel filtro solamente, para tener un blanco y luego pesamos nuevamente la masa del papel filtro con el contenido del proceso de filtración después del secado en la estufa.

Determinación de biomasa: para esto se utilizo el método gravimétrico SST, en el cual se decanta el material que contenían los matraces erlenmeyer a través de un papel filtro y luego se procede secar para su posterior pesaje y determinación de biomasa en términos de peso seco (g/mL).

Formulas utilizadas.

Fórmula para el cálculo de biomasa seca bacteriana:

$$g \frac{ms}{mL} = \frac{(masa \ de \ papel \ filtro + muestra \ seca) - (masa \ de \ papel \ filtro)}{volumen \ de \ la \ muestra}$$

Fórmula para el cálculo del porcentaje de biomasa en gramos obtenidos por cada 100 mililitros de la solución:

$$\% \frac{p}{v} = \frac{g \ sto}{mL \ sol} * 100$$

Diseño de análisis:

Se hará un análisis correlacional del crecimiento bacteriano en relación con la concentración de melaza de caña, medido en peso seco de biomasa obtenida, para cada muestra.

CAPITULO IV

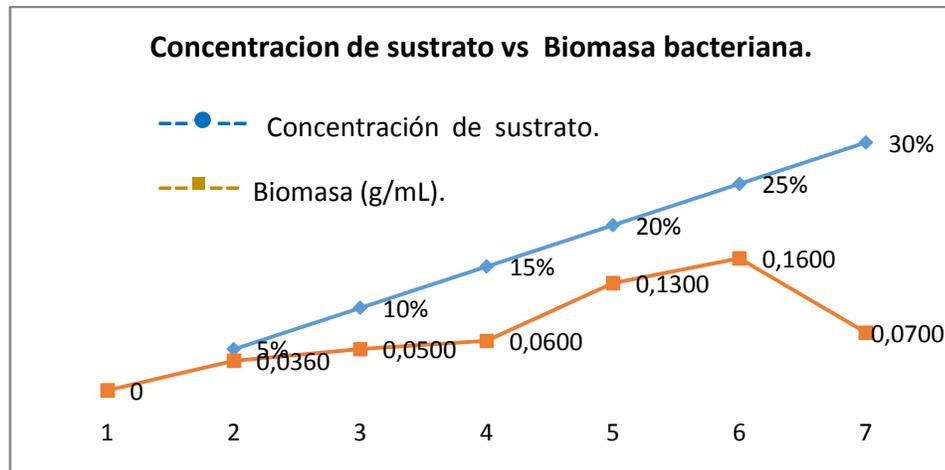
RESULTADOS Y DISCUSIONES

Tabla 2 Biomasa de *Lactobacillus* spp., obtenida en correspondencia con las concentraciones de sustrato de los medios de cultivo.

	Medio de cultivo	Concentración del sustrato	Masa de papel filtro (g).	Masa de papel + biomasa (g).	Biomasa total obtenida (g).	Biomasa bacteriana (g/mL).	% de biomasa obtenida
<i>Lactobacillus</i> spp.	1	5%	5	23	23	0,0360	4%
	2	10%	5	30	25	0,0500	5%
	3	15%	5	35	30	0,0600	6%
	4	20%	5	70	65	0,1300	13%
	5	25%	5	85	80	0,1600	16%
	6	30%	5	40	35	0,0700	7%
Volumen de muestra (mL)			500 mL.				

Respecto a la correspondencia de la biomasa bacteriana y la concentración de sustrato, se obtuvo que la biomasa producida de *Lactobacillus* fue mayor en los medios a 20% y 25% de concentración de sustrato, obteniendo una biomasa celular evaluada en términos de peso seco y porcentaje (p/v) de la cual se tiene 0,13 y 0,16 g/mL que corresponde a 13% y 16% p/v con respecto al volumen del medio inoculado. Por otra parte, se obtuvo porcentajes de biomasa más bajos, con las demás concentraciones (5%, 10%, 15 % y 30%). Es necesario tomar en cuenta que los 6 medios de cultivos fueron incubados bajo las mismas condiciones de temperatura, agitación y tiempo de incubación.

Figura 5 Grafica de relación de la concentración de sustrato y biomasa.



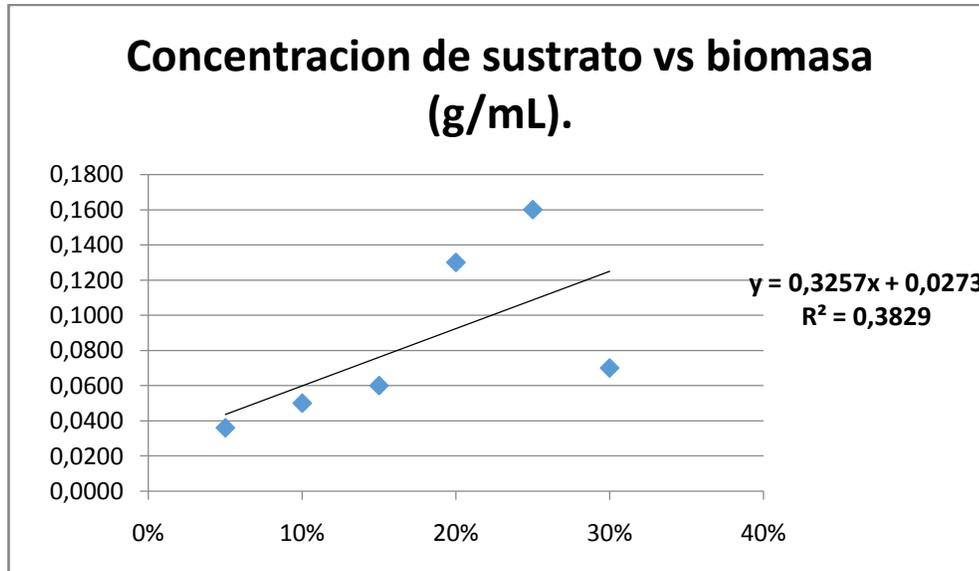
Esta investigación permitió establecer una relación entre la concentración del sustrato y el peso seco de masa celular obtenida por mL de cultivo.

Lo anterior puede ser atribuido a la transformación de la sacarosa a monómeros de azúcar (glucosa y fructosa) por la enzima invertasa, que puede disminuir su actividad a concentraciones altas de sustrato, a determinadas temperaturas y pH, permitiendo el aumento de la velocidad de crecimiento (Kazuhiko y Kozo, 1995).

En contraste, se obtuvo que a bajas concentraciones de melaza (5%, 10% y 15%) exista una deficiencia de carbono, que se refleja en la pobre producción de biomasa bacteriana (Ortiz *et al.* 2008).

Sin embargo concentraciones de melaza más elevadas (30%), las bacterias alcanzan la fase estacionaria más rápido, antes de consumir todo el sustrato, lo que hace que el microorganismo no produzca más biomasa, por el estado de saturación del sustrato, respecto a la concentración microbiana (Ortiz *et al.* 2008).

Figura 6 Grafica de regresión lineal.



En cuanto al diseño de análisis se utilizó una regresión lineal, en la cual se puede inferir que existe una relación entre la concentración del sustrato y la cantidad de biomasa producida por un microorganismo; pero también nos muestra que esta relación no es lineal ya que existe una dispersión de los datos con respecto a la recta, esta dispersión se debe a que como se puede observar en la gráfica en los primeros tres medios de cultivo (5, 10, y 15 %) la relación es lineal pero luego se ven dos picos de crecimiento en los medios al 20 y 25 % para luego obtener una caída de este crecimiento en el medio de concentración al 30 %. El $R^2 = 0,382$ nos indica que el porcentaje de variación para predecir futuros resultados a través de la ecuación de la recta es muy bajo y por ende la concentración de sustrato idónea para un microorganismo solo se puede determinar de manera experimental ya que cada uno posee propiedades metabólicas y requerimientos nutricionales propios de la bacteria a estudiar (Ramírez *et al.*, 2011).

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

Con el presente trabajo se concluyo el desarrollo óptimo para obtención de biomasa de *Lactobacillus* spp., depende de una concentración idónea del sustrato empleado en el medio de cultivo. Aun cuando las demás condiciones de crecimientos (pH, temperatura y agitación) sean las adecuadas.

Se concluye que la concentración de melaza de caña como medio cultivo idónea para el crecimiento y desarrollo de biomasa de *Lactobacillus* spp., es del 20 y 25% p/v. a una temperatura de 30 ± 2 y agitación cada 7 horas ya que estos tratamientos fue el que permitió obtener mayor contenido de biomasa celular por mililitro de cultivo.

RECOMENDACIONES

Se recomienda mantener cepas puras de *Lactobacillus* spp., en la facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes ya que estos son microorganismos de gran interés Biotecnológico para futuras investigaciones.

Se recomienda la melaza de caña, como sustrato, para realizar más investigaciones a nivel de laboratorio y, posteriormente, poseer herramientas de acercamiento a la planta piloto, para lograr proponer este sustrato, como un medio de trabajo pertinente, que optimice la propagación de las bacterias ácido lácticas a nivel industrial.

www.bdigital.ula.ve

Referencias Bibliohemerograficas

- Aguilar, J., Espinoza, M., Cabanillas, J., Ávila, I., García, A., Julca, J., Tacanga, D., Zuta, I., y Linares, G., (2015). Evaluación de la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando un medio de cultivo a base de melaza de caña y suero lácteo. **Agroind Sci 5**, (1), 37-47.
- Ariza, B. y González, L., (1997). *Producción de Proteína Unicelular a partir de levaduras y melaza de caña de azúcar como sustrato*. (Tesis de pregrado Bacteriología). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Bacteriología. Bogotá. Colombia. 22-27.
- Arnáiz, C., Isac, L. y Lebrato, J., (2000). *Determinación de la biomasa en procesos biológicos*. Artículo técnico: tecnología del agua. 45-52.
- Arias, Fidias., (2006). ***El proyecto de investigación: introducción a la metodología científica***. (5ª ed). Caracas-Venezuela: Episteme.
- Bergey`s., (1992). ***Manual of Deternative Bacteriology***. (10ª ed).. The Williams y Wilkins. Baltimore, USA.
- Cabeza, E., (2006). *Bacterias ácido-lácticas (BAL): Aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica*. Trabajo presentado en el Simposio Regional de Microbiología “*Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo*”, Universidad Libre, del 15 al 16 de septiembre de 2006. Barranquilla, Colombia.
- Cardozo, M., C., y Moreno, J., H., (2012). *Diseño y optimización de un medio de cultivo a base de melaza de caña para la producción de biomasa a partir de Saccharomyces cerevisiae*. (Tesis de pregrado Microbiología

Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.

Castro, M., (2003). ***El proyecto de investigación y su esquema de elaboración.*** (2º. Ed.). Caracas: Uyapal.

Castro L., y de Rovetto C., (2006), Probióticos: utilidad clínica. ***Colomb Med,*** **37**, (4), 308-314.

Castro, M., (1993). *Estudio de la melaza de caña como sustrato de la fermentación acetobutilica.* (Tesis pregrado Ingeniería Química). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniera. Bogotá, Colombia. 3-53.

CAVIDEA, (2019). Cámara Venezolana de la Industria de Alimentos. Recuperado de: <http://cavidea.org/category/bienestar-cavidea/>

Collins, C. H., Lyne, J. M., y Falkinham, J. O., (2004). ***Collins y Line's Microbiological Methods.*** (8ª ed). Euston Road. London: Editorial ARNOLD.

Fajardo, E., y Sarmiento, S. (2007). *Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae* (tesis de doctorado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C.

Flores, B., Gómez, J., Gimeno, M., y Shirai, k. (2009). *Diseño de un medio de cultivo a partir de la melaza y desechos de jaiba para la producción de ácido láctico y recuperación de quitina.* Trabajo presentado en el XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 22 al 26 de Julio del 2009. Acapulco, México.

- Fuller, R., (1989). Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.** **66**:365-378.
- García, E., (2006). Medios de cultivo. Clasificación y aplicación. En: Araque, M., Longa, A., Mosqueda, N., Nieves, M., Ramírez, A., Sánchez, K. y Velasco, J. (Comp.). **Manual práctico de bacteriología general**. Mérida, Venezuela. CODEPRE., 53-63.
- García, M., López, y., Carcassés, A., (2012). Empleo de los Probióticos en animales. Obtenido el 26/07/2015. Disponible en: <http://www.engornix.com/MA-ganaderia-carne/sanidad/articulo/empleo-probioticos-animalest4125/165/PO.Htm>.
- Gómez, G., Nápoles, M., C., Núñez, C., R., y Martínez J. (2008). Influencia de la concentración de melaza y extracto acuoso de soya sobre la velocidad específica de crecimiento de *bradyrhizobium elkanii* ICA 8001. **Cultrop**, **29**, (4), 21-26.
- Gómez, O., Rodríguez, R., y Subero, S. (2011). Cultivo polialgal (*chaetoceros gracilis*, *chlorellas*, *tetraselmis chuii*) en medios nutritivos no convencionales. **Saber**, **23**, (1), 83-85.
- Guevara, J. (2011). **Probióticos en nutrición animal**. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos (sirivs). 3-4.
- Hassan, A., y Frank, J., (2001), Starter cultures and their use', in Marth E. H., and Steele J. L., (ed.), **Applied Dairy Microbiology**. (2ª ed). Revised and expanded. (Ed.), Marcel Dekker, INC, New York, EEUU. 151–206.

- Hernández, A., Chávez, B., y Rosales, M., (2008). *Utilización de un Subproducto Industrial de la Caña de Azúcar para la Producción de un Cultivo con Potencial Probiótico*. Trabajo presentado en el V congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, Mar del Norte No. 5, Col. San Álvaro Azcapotzalco C. P. 02090, 01-31- 2008 México, D. F.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P., (2003). ***Metodología de la Investigación***. (3ª ed), México: McGrawi-Hill. Interamericana.
- Hoing, P., (1974). ***Principios de tecnología azucarera***. (2ª ed). México. Continental. 23-54.
- Hurtado, J., (2007). ***El Proyecto de Investigación. Metodología de la Investigación Holística***. (5ª ed), Sypal- Quirón ediciones. Caracas, Venezuela. 183.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas (ICONTEC), (1994). *Industrias alimentarias e industriales de bebidas. Melaza de caña NTC.587*.
- Jiménez, A., (2009). *Efecto de Diferentes Fármacos sobre el Crecimiento de Lactobacillus casei Shirota*. (Tesis Doctoral en Ciencias de los Alimentos). Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México. D.F. Recuperado de <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/7935>.
- Kandler, O. y Weiss, N., (1992). Regular non sporing Gram-positive rods. En: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe M. E., Holt, J. G., (Ed.), ***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology***. (10ª ed), vol. 2. The Williams and Wilkins Co; Baltimore, USA. 1208-1260.

- Kandler, O., (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.** **49.** 209-224.
- Kazuhiko, T., y Kozo, T., (1995). Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. **J. Ferment. Bioeng.** **79** (5):449-452.
- León, D., Calderón, B., Martínez, A., Sánchez, E., Zulatto, A., Camacho, I., Arredondo, A. y Salgado, R., (2013). Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque. **Investigación Universitaria Multidisciplinaria** **12.** (12). 153- 154.
- López, E., Gandí, J. y García J., (2014). *Determinación de sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos volátiles (SSV).* Reporte de Practica N° 1. pp.2.
- Madigan, M. T., (2012). **Brock biology of microorganisms.** San Francisco: Benjamín Cummings.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J., (2004). **Brock Biología de los Microorganismos.** Caracas: Pearson Educacion.102-161.
- Martínez V. R., (2009). Bacterias Probióticos en alimentos y su importancia para la salud. **Tribuna del investigador.** **10,** (1-2) 3-6. Obtenido el28/06/2015. Disponible en: <http://www.tribunadelinvestigador.com/ediciones/2009/1-2/?i=art6>.
- Ortiz, A., Reuto, J., Fajardo, E., Sarmiento, S., Aguirre, A., Arbeláez, G., Gómez, D., y Quevedo, B., (2008). Evaluación de la capacidad probiótica “in vitro” de una cepa nativa de *Saccharomyces cerevisiae*. **Universitas Scientiarum.** **13** (2), 138-148.

- Ossa, J., Vanegas, M., y Badillo, A. (2010). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. **GROWTH. U.D.C.A act & Div. Client**, **13**, (1), 97-104.
- Parker, R. B., (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health*. **29**. 4-8.
- Pérez, H., y Hernández, A., (2015). Evaluación de sustratos con jugo de aloe vera para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. **Tecnología química**. **35**, (2), 156-166.
- Piccoli, L., Bojanich, M., López, M. y Sosa, M., (2010). **Guía de trabajos prácticos microbiología general**. FACENA-UNNE. 9-12.
- Ramírez, J. C., Ulloa, P. R., Velásquez, M. Y., Ulloa, J. A., y Romero F.A., (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. **Fuente**, **2** (7), 1-16.
- Samaniego, L., y Sosa, M., (2007), *Lactobacillus spp.: Importantes promotores de la actividad probiótica, antimicrobiana y bioconservadora*. Matanzas, Cuba. 4-5. Obtenido el 04/08/2015. Disponible en: <http://monografias.umcc.cu/monos/2001/mono11.pdf>.
- Schlegel H. G., y Zaborosch, C., (1997). **Microbiología General**. (Nueva edición). Barcelona: Editorial Omega.
- Swan, H., y Karalazos, A., (1990). La melaza y sus derivados. **Rev. Tecm. Geplacea**. **19**, 78-82.
- Tamayo, M., (1999). **El proceso de la investigación científica**. México: editorial Limusa.

- Téllez, D., (2004). *Caracterización de las melazas empleadas en el proceso fermentativo de la destilería San Martín- Industria de Licores del Valle*. (Tesis pregrado Bacteriología).Universidad del Valle. Facultad de salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio clínico. Santiago de Cali. Cali, Colombia. pp.79.
- Tortora G. J., Funke, B. R., y C. L., Case (2007). ***Introducción a la Microbiología***. (9° ed). Editorial Médica Panamericana.
- Vargas., E., Gómez., C., Parra, M., y Romero., M., (2004). Producción de microorganismos probióticos como aditivo para alimentos concentrados para ganado vacuno. ***Revista De Ingeniería***, 0 (20), 21-31. doi:10.16924/riua.v0i20.417
- Vázquez, S. M., Suárez, M.H., y Zapata, B.S., (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producida por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. ***Rev. Chil. Nutr.*** 36, (1), 64-71.
- Willey, J. M., Sherwood, L., Woolverton, C. J., y Prescott, L. M., (2011). ***Prescott's microbiology***. New York: McGraw-Hill.