

**DESARROLLO DE UNA PROPUESTA PARA LA FABRICACIÓN DE BIOMASA  
USADA PARA EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE UN PSICOBÍOTICO**

**NICOLÁS ENRIQUE LESMES MAYORGA**

**INGRID CAROLINA MAYORGA MONROY**

**Proyecto integral de grado para optar al título de:**

**INGENIERO QUÍMICO**

**Orientadora:**

**Astrid Nausa Galeano**

**Magister en ingeniería**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA  
FACULTAD DE INGENIERÍAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA  
BOGOTÁ**

**2022**

## NOTA DE ACEPTACIÓN

---

---

---

---

---

---

---

---

Jurado 1

---

Jurado 2

Bogotá D.C., agosto de 2022

## **DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD**

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

**Dr. MARIO POSADA GARCÍA – PEÑA.**

Consejero Estudiantil

**Dr. LUIS JAIME POSADA GARCIA-PEÑA.**

Vicerrectora Académica y de Investigaciones

**Dra. ALEXANDRA MEJÍA GUZMÁN**

Vicerrector Administrativo y Financiero

**Dr. RICARDO ALFONSO PEÑARANDA CASTRO.**

Secretario General

**Dr. JOSE LUIS MACÍAS RODRÍGUEZ**

Decana de la Facultad de Ingenierías

**NALINY PATRICIA GUERRA PRIETO**

Directora del Programa de Ingeniería Química

**Ing. NUBIA LILIANA BECERRA OSPINA.**

En esta nota se especifica que el trabajo realizado en este documento es la completa autoría de Nicolás Enrique Lesmes Mayorga e Ingrid Carolina Mayorga Monroy, no intervinieron las directivas ni ninguna persona externa de la universidad de América en el desarrollo del trabajo.

## AGRADECIMIENTOS

**A nuestros padres**, que han sido nuestro apoyo durante todo el transcurso de la carrera siendo los mejores guías de vida. Hoy les damos la gracias por estar siempre a nuestro lado en los días y noches más difíciles durante horas de estudio, por estar en este momento tan importante y celebrar esta meta alcanzada en nuestra vida profesional.

**A nuestros docentes**, por transmitirnos cada uno de sus conocimientos y experiencias con los cuales hemos podido crecer como profesionales y como personas, y por su dedicación en su enseñanza.

**A nuestros compañeros**, su compañía ha sido indispensable a lo largo de la carrera tanto como en horarios de clase como fuera de ellos convirtiéndose en amigos para toda la vida y estando agradecidos de tenerlos para celebrar nuestros logros.

**A nuestra directora de tesis**, por brindarnos su ayuda y apoyo durante este proceso y transmitirnos sus consejos y conocimientos en la ejecución de este proyecto de grado,

**A Carolina**, no solo por ser mi compañera de tesis, sino por ser una de las personas más importantes en mi vida, no hay palabras para describir la gratitud y el orgullo que siento de poder lograr este objetivo contigo.

**A Nicolás**, por acompañarme en todo el transcurso de la carrera y ser un apoyo incondicional en mi vida, agradezco infinitamente que hagas parte de lograr esta meta conmigo.

## TABLA DE CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	9
OBJETIVOS	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Psicobióticos	11
1.2. Especies de microorganismos	13
2. SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO	16
2.1. Descripción de microorganismos preseleccionados	16
2.1.1. <i>Bifidobacterium longum</i>	16
2.1.2. <i>Lactobacillus Casei Shirota</i>	17
2.1.3. <i>Lactobacillus gasseri CP2305</i>	18
2.1.4. <i>Bifidobacterium breve</i>	18
2.1.5. <i>Bifidobacterium infantis 35624</i>	19
2.1.6. <i>Lactobacillus Helveticus NS8</i>	19
2.1.7. <i>Lactobacillus Plantarum PS128</i>	21
2.1.8. <i>Lactobacillus Rhamnosus GG</i>	21
2.1.9. <i>Lactobacillus Helveticus R0052</i> y <i>Bifidobacterium longum R0175</i>	22
2.1.10. <i>Lactobacillus Plantarum 90sk</i> y <i>Bifidobacterium adolescentis 150</i>	22
2.1.11. <i>Bifidobacterium longum subsp. Infantis E41</i> y <i>Bifidobacterium breve M2CF22M7</i>	23
2.2. Matriz de selección del microorganismo	24
3. ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	27
3.1. Medio de cultivo	27
3.2. Temperatura y pH	27
4. DISEÑO CONCEPTUAL	31
4.1. Procesamiento	31
4.1.1. Optimización y preparación del medio de cultivo	32
4.1.2. Fermentación	33
4.1.3. Microencapsulación	34
4.1.4. Secado por pulverización o aspersión	34
4.1.5. Liofilización	34
4.2. Control de calidad y condiciones de producto y almacenamiento	35
4.2.1. Control de calidad	35
4.2.2. Condiciones del producto y su almacenamiento	36
4.2.3. Promotores de crecimiento	36
4.2.4. Contenido de oxígeno	36

4.2.5. <i>Contenido de humedad</i>	37
4.2.6. <i>Temperatura de almacenamiento</i>	37
4.2.7. <i>pH y acidez</i>	37
4.2.8. <i>Aspectos de empaque</i>	37
4.3. <b>Alistamiento de materias primas</b>	38
4.3.1. <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>	38
4.1.6 <i>Caldo MRS</i>	38
4.1.7 <i>Agua</i>	38
4.4. <b>Dimensionamiento del proceso</b>	39
4.5. <b>Descripción del proceso</b>	39
4.6. <b>Descripción del producto final</b>	41
5. <b>CONCLUSIONES</b>	42
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	43
<b>ANEXOS</b>	53

## TABLA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Mecanismos de acción de los psicobióticos	13
Figura 2. Número de artículos sobre psicobióticos por país	14
Figura 3. Niveles de serotonina ante la administración de <i>L. Helveticus NS8</i>	20
Figura 4. Tasa de crecimiento en función de la temperatura de crecimiento de <i>Lactobacillus Rhamnosus GG</i>	28
Figura 5. Dependencia de la temperatura de crecimiento con respecto al pH	29
Figura 6. Dinámica de crecimiento de <i>Lactobacillus rhamnosus GG</i> y pH en relación con la temperatura	30
Figura 7. Presentación esquemática de la producción de biomasa	32



## RESUMEN

El objetivo de este documento es el desarrollo de una propuesta de fabricación de biomasa para el proceso de producción de psicobióticos, mediante la selección de la cepa con mayor potencial psicobiótico a través de la investigación de diferentes criterios de cada cepa preseleccionada, con el fin de determinar las condiciones ideales para el crecimiento del microorganismo y con ello proponer un diseño conceptual del proceso de producción.

Primeramente, se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica de aquellos microorganismos estudiados anteriormente en pruebas para su aplicación en el campo de los psicobióticos, identificando a las especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* como las mayormente investigadas para este tipo de estudio. Con ello fueron preseleccionadas un conjunto de cepas de estas especies, para las cuales fueron evaluados la facilidad de obtención, medio de cultivo, pH y temperatura, nivel de desarrollo de la cepa en el campo de estudio y potencial psicobiótico. Con base en los resultados obtenidos en los parámetros estudiados se seleccionó la cepa con mayor puntuación.

Adicionalmente, luego de la selección del microorganismo, se realizó la caracterización de la cepa *Lactobacillus rhamnosus GG*, con el fin de establecer el medio de cultivo adecuado (Caldo MRS), así como los valores de pH y temperatura óptimos reportados en la literatura a partir de tablas y gráficas, con los que se promueva el crecimiento del microorganismo.

Finalmente, se realizó el diseño conceptual del proceso, para lo cual se establecieron las condiciones adecuadas para el alistamiento de la cepa, el medio de cultivo y el agua como materias primas. También se describió y dimensionó el proceso a partir de la capacidad de producción propuesta y el inóculo inicial, además de la formulación del empaque para la comercialización del producto final. Por último, se establecieron las pautas necesarias para el cumplimiento del control de calidad con el objetivo de garantizar un producto adecuado para el uso de las personas que lo requieran.

**PALABRAS CLAVE:** Potencial psicobiótico, *Lactobacillus rhamnosus GG*, caldo MRS, diseño conceptual

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Desarrollar una propuesta para la fabricación de biomasa usada para el proceso de producción de un psicobiótico.

### Objetivos específicos

- Definir el microorganismo con mayor potencial psicobiótico a partir de una preselección de cepas, específicamente de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.
- Determinar las condiciones y factores relevantes que se ven involucrados en el proceso de crecimiento del microorganismo seleccionado con potencial psicobiótico.
- Realizar el diseño conceptual del proceso para la producción de biomasa necesaria para la formulación de un psicobiótico.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Psicobióticos

En los últimos años ha surgido un gran interés en el uso de los probióticos como agentes psicobióticos, debido a que se ha encontrado que estos no solamente tienen actividad beneficiosa para el cuerpo humano en la microbiota intestinal, sino que también generan efectos favorables en el cerebro [1]. Por esta razón se han estudiado los psicobióticos para tratar trastornos como la ansiedad y la depresión.

El término probiótico se utiliza de manera habitual para referirse a especies bacterianas, cepas bacterianas o especies de microorganismos vivos. Los alimentos o suplementos probióticos contienen microorganismos vivos destinados a mantener o mejorar las bacterias “buenas” (microbiota normal) del cuerpo [2].

Los psicobióticos a diferencia de otros tipos de probióticos, se formulan a partir de bacterias que tienen la capacidad de modificar el funcionamiento de la corteza suprarrenal, donde son regulados varios componentes del metabolismo mediante la producción de casi el 95% del cortisol del organismo, hormona que a su vez aumenta el nivel de estrés y ansiedad [2].

El microbioma es el conjunto de microbios (bacterias, arqueas, virus, hongos y protistas) incluyendo sus genes y metabolitos, así como las condiciones ambientales que les rodean. La microbiota es el conjunto de microorganismos que residen en el cuerpo [3].

Hasta hace poco tiempo, al conjunto de microorganismos alojados dentro del intestino se le llamaba flora intestinal, hoy en día se le denomina microbiota, término mucho más correcto que el anterior, ya que no se está hablando acerca de plantas [3].

Se han encontrado distintos mecanismos de acción sobre los cuales las bacterias con potencial psicobiótico proveen beneficios en el sistema nervioso y en el sistema inmune, y además como afectan estos el comportamiento psicológico en el cerebro. Esto ocurre en tres diferentes maneras:

- **Hipotalámico – Pituitaria – Suprarrenal (HPA):** El eje HPA es el principal sistema de respuesta neuroendocrino al estrés físico y fisiológico en el cuerpo humano, esto incluye el hipotálamo, la glándula pituitaria y la corteza suprarrenal [4]. Entre otras funciones no regula únicamente funciones periféricas del cuerpo como el metabolismo y la inmunidad, sino que a su vez existe una fuerte conexión con el cerebro.

Tanto así que bajo estrés crónico se produce una alta cantidad de cortisol, lo cual genera una inhibición en la actividad inmunológica y un aumento en la sensibilidad a posibles amenazas para el cuerpo, llevando a la persona a un estado de ánimo negativo, generando cierto perjuicio en la memoria y fallas en otras funciones cognitivas [4].

La evidencia reciente sugiere que hay una fuerte comunicación bidireccional entre este sistema neuroendocrino y la microbiota intestinal. La colonización de los microbios en el intestino en la vida temprana ha sido identificada para influenciar varios aspectos tanto del cerebro como del comportamiento. Se ha encontrado que el comportamiento del HPA es capaz de afectar la composición de la microbiota intestinal y de incrementar la permeabilidad gastrointestinal. Teniendo esto en cuenta es posible asumir que algunos cambios en la permeabilidad intestinal y el sistema inmune puede jugar un rol importante en el mal funcionamiento neuroendocrino [1].

- Sistema inmune: La disbiosis de la microbiota intestinal esta normalmente conectada con las respuestas anormales del sistema inmune que incluyen la superproducción o la inflamación de citocinas [5]. Los microorganismos en el intestino ayudan a regular las respuestas adaptativas principalmente por la producción de pequeñas moléculas que modulan las interacciones en la microbiota.

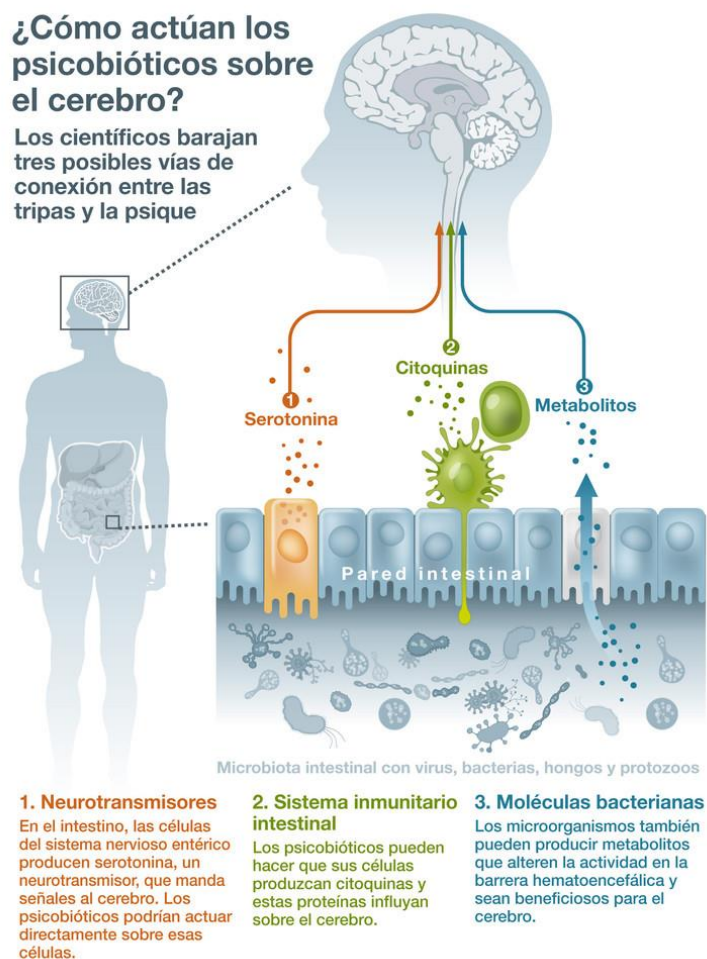
Evidencias recientes sugieren que altos niveles de inflamación incrementan el riesgo de desarrollar desórdenes psicológicos. En efecto, altos niveles inflamatorios de citocinas han sido observados en pacientes con depresión. Adicionalmente, se ha observado una asociación positiva entre la composición de la microbiota y los niveles séricos de algunas citocinas, las cuales se ha encontrado que están positivamente correlacionadas con el comportamiento depresivo [1].

- Neurohormonas y neurotransmisores: El microbioma puede producir un rango de compuestos neuro-activos. Algunos neuroquímicos han sido aislados de bacterias intestinales como el Ácido Gamma Aminobutírico (GABA), la serotonina, la noradrenalina, dopamina y acetil colina, las cuales afecta directamente la actividad cerebral. Por ello, algunas bacterias dentro del tracto gastrointestinal humano tienen la capacidad de producir y entregar neurotransmisores y neuromoduladores, los cuales pueden ser sugeridos como un novedoso tratamiento para las enfermedades neuropsiquiátricas [1].

GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso. En general, los probióticos pueden modular el equilibrio regional de excitación-inhibición, y estos cambios pueden estar relacionados con reducciones en el comportamiento relacionado con la ansiedad y la depresión y las respuestas sistémicas asociadas [6].

Figura 1.

Mecanismo de acción de los psicobióticos



**Nota.** la ilustración muestra los diferentes mecanismos de acción que tiene los psicobióticos en el cuerpo humano. Tomado de: A. Kato-Kataoka *et al.*, "Fermented milk containing Lactobacillus casei strain Shirota prevents the onset of physical symptoms in medical students under academic examination stress," <http://dx.doi.org/10.3920/BM2015.0100>, vol. 7, no. 2, pp. 153–156, Dec. 2015, doi: 10.3920/BM2015.0100.

## 1.2. Especies de microorganismos

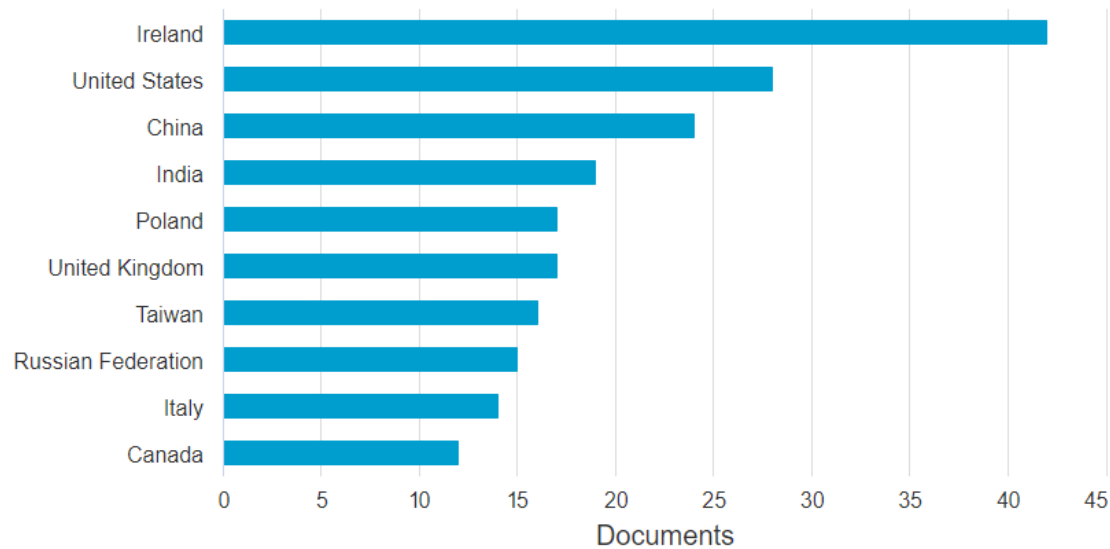
Para la selección del microorganismo se realizó una búsqueda bibliográfica utilizando la ecuación de búsqueda con las palabras clave "Psicobióticos", "Producción de psicobióticos" y "Producción de probióticos".

El criterio de decisión para utilizar o no un artículo, se basó específicamente en que hablara sobre el proceso productivo de la biomasa de un probiótico o psicobiótico o sobre investigación y desarrollo de

los microorganismos con potencial psicobiótico. En la siguiente ilustración se puede observar el nivel de desarrollo que tiene el proceso investigativo de los psicobióticos en cada país

**Figura 2.**

*Número de artículos sobre psicobióticos por país*



**Nota.** la ilustración muestra el número de documentos que existen sobre la investigación de los psicobióticos por cada país. Adaptado de: Scopus, "Documents by country or territory." [Online]. Available: <https://www-scopus-com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=be512b07707edeaad51639bc464af230&origin=resultlist&src=s&s=TITLE-ABS-KEY%28psychobiotics%29&sort=plf-f&sdt=b&sot=b&sl=28&count=252&analyzeResults=Analyze+results&txGid=1ae28a66819c8a99b4472031c1503081>.

**Tabla 1.**

*Cepas bacterianas con potencial psicobiótico y sus hallazgos*

Microorganismo	Hallazgos	Número de artículos
<b><i>Bifidobacterium longum</i> 1714</b>	Reducción de ansiedad, disminución de la hipertermia inducida por el estrés y mejora en el comportamiento antidepresivo.	5
<b><i>Bifidobacterium longum</i> NCC3001</b>	Reducción en los niveles de depresión en la escala de ansiedad y depresión del hospedador y reducción de las respuestas a los estímulos emocionales negativos en múltiples áreas cerebrales	7
<b><i>Lactobacillus casei</i> Shirota</b>	Los aumentos de los niveles de cortisol salival y la tasa de incidencia en síntomas físicos fueron significativamente suprimidos. Se suprimieron	7

	los aumentos de corticosterona en plasma inducidos por el estrés.	
<b><i>Lactobacillus gasseri</i> CP2305</b>	Los comportamientos asociados al estrés mejoraron, así como la calidad del sueño. La administración de parabióticos evitó el aumento de la liberación de cortisol salival y la expresión de micro ARNs que responden al estrés.	12
<b><i>Bifidobacterium breve</i> 1205</b>	Reducción de niveles de ansiedad en diferentes pruebas.	2
<b><i>Bifidobacterium breve</i> CCFM1025</b>	Reducción de los comportamientos de depresión y ansiedad. También se alivió la respuesta hiperactiva HPA y la inflamación.	8
<b><i>Bifidobacterium infantis</i> 35624</b>	Normalización de la respuesta inmunitaria, reversión de los déficits conductuales y la restauración de las concentraciones basales de noradrenalina en el cerebro.	42
<b><i>Lactobacillus helveticus</i> N58</b>	Se produce un efecto ansiolítico asociado a la reducción de niveles de serotonina en el hipocampo.	2
<b><i>Lactobacillus plantarum</i> PS128</b>	Se redujeron los comportamientos de ansiedad y depresión. Aumentaron los niveles de dopamina y serotonina.	23
<b><i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG</b>	Se genera una reducción en síntomas de altos niveles de ansiedad y una mejora cognitiva ante la suplementación de la cepa.	10

**Nota.** la tabla muestra las diferentes cepas estudiadas con potencial psicobiótico y los respectivos resultados. Tomado de: M. Del Toro-Barbosa, A. Hurtado-Romero, L. E. Garcia-Amezquita, and T. García-Cayuela, “Psychobiotics: Mechanisms of action, evaluation methods and effectiveness in applications with food products,” *Nutrients*, vol. 12, no. 12, pp. 1–31, 2020, doi: 10.3390/nu12123896.

## 2. SELECCIÓN DEL MICROORGANISMO

Se van a presentar parámetros importantes como rangos óptimos de pH y temperatura, facilidad de obtención de la cepa, medio de cultivo, nivel de desarrollo y potencial psicobiótico para los microorganismos preseleccionados en la Tabla 1, con el objetivo de profundizar en su conocimiento y dar las bases para seleccionar el microorganismo final.

### 2.1. Descripción de microorganismos preseleccionados

#### 2.1.1. *Bifidobacterium longum*

La temperatura óptima para el crecimiento de *Bifidobacterium longum* está entre 36 y 38 °C, mientras su pH óptimo de crecimiento es de 6,5 a 7,0. No se produce crecimiento por debajo de un pH de 4,5 a 5,0 o por encima de 8,0 a 8,5 [9].

*Bifidobacterium longum* es una de las especies bacterianas nativas de la flora intestinal, conocida como probióticas; es decir bacterias que proporcionan beneficios a la salud del huésped como los fructanos que se encuentran en plantas y son conocidos como prebióticos [10].

Si bien su uso se ha limitado en el campo de suplementos alimenticios por su lento crecimiento, se han estudiado medios con los cuales se pueda incrementar la velocidad de este. Hasta el momento se ha encontrado que la caseína K encontrada en la leche humana y bovina promueve una mayor velocidad de crecimiento haciendo más factible el uso de esta cepa.

*Bifidobacterium longum* 1714 es capaz de modular beneficiosamente el sistema inmunológico. Varios estudios relacionados con los probióticos han demostrado resultados positivos utilizando cepas de bacterias liofilizadas [11]. En estudios preclínicos, se ha identificado la cepa *Bifidobacterium longum* 1714, que mejora selectivamente los comportamientos relacionados con el estrés. Se evidencia que con el consumo de probióticos también existe una mejoría en el rendimiento cognitivo lo cual genera consecuentemente disminución en síntomas de ansiedad [11]. Esto se realizó mediante un estudio a pacientes humanos que recibieron sobres de *Bifidobacterium longum* secado por pulverización, donde cada uno contenía 100-200 mL con una concentración de 1,0E10 UFC/gramo de polvo con maltodextrina. A partir de la dosis suministrada se realizaron estudios mediante muestras de sangre, orina y heces reevaluando los niveles de los síntomas presentados por los pacientes durante varias semanas, disminuyendo en menor medida los síntomas de depresión y ansiedad (de 1 a 2 puntos en la escala del hospital de ansiedad y depresión HAD) y mayor medida los síntomas de estrés [12],

Para la cepa *Bifidobacterium longum* NCC3001 se han hecho estudios en la Universidad de Hamilton en Canadá, donde se evaluaron los niveles de ansiedad y depresión ante la administración de



*Bifidobacterium longum*, a través del control de los patrones de activación cerebral, neurotransmisores y niveles de neurotrofinas. Con ello se pudo determinar que la aplicación de esta cepa, tiene efectos positivos en la disminución del nivel de depresión, pero no tiene efecto significativo en los síntomas de ansiedad [13]. Estos estudios fueron realizados en ratones, a los cuales fue administrado sulfato de sodio dextrano durante 3 ciclos de 7 días, durante el tercer ciclo los ratones recibieron 100 µL de 1E10 UFC de *Bifidobacterium longum* por mL en medio fermentado [14].

### **2.1.2. *Lactobacillus Casei Shirota***

*Lactobacillus casei* es una especie de bacteria anaerobia Gram positiva que se encuentra en el intestino y boca de los humanos. El pH para la producción de biomasa a partir de esta cepa debe ser cercano a 7,0 y el rango de temperatura deberá mantenerse entre 35-37°C [15].

Visualizado como una posible materia prima, el SLC (Suero de Leche de Cabra), subproducto derivado de la elaboración de quesos de cabra, representa una gran oportunidad dado su contenido de nutrimentos: 1000 litros de suero (resultado de la producción de 100 kg de queso) contienen 9 kg de proteína, 50 kg de lactosa y 3 kg de grasa de leche [16].

En la contribución anterior, se propone un proceso simple, escalable y de bajo costo, para el aprovechamiento integral del SLC que conste de las etapas de (a) separación de la grasa por descremado, (b) retención de la mayor parte de la proteína por ultrafiltración (para después liofilizarla) y (c) utilización del permeado de lactosa (con suficiente proteína residual para aún ser un adecuado medio de cultivo) para producir biomasa probiótica de *Lactobacillus casei* [16].

Según estudios de departamentos de patopsicología e investigación y desarrollo de institutos de Japón, se investigó acerca del impacto de esta cepa en condiciones de estrés, resultando una elevación significativa de los niveles de serotonina, disminuyendo síntomas principalmente de estrés [17]. Los estudios fueron realizados en estudiantes, a los cuales se les realizaron muestras de heces y parámetros psicológicos con el fin de determinar el impacto del suministro de la cepa en el cuerpo. El grupo fue dividido en dos, suministrando a un grupo 100mL de leche fermentada con *Lactobacillus casei Shirota* y al otro la misma leche fermentada con placebo durante un periodo de 10 semanas. Se obtuvo que las muestras de los pacientes a los que se les había suministrado la cepa al paso de las 10 semanas, tenían una mayor cantidad de UFC dentro de estas. Pero se reportó que para ambos grupos no variaban los niveles de ansiedad o depresión [18].

### **2.1.3. *Lactobacillus gasseri* CP2305**

*Lactobacillus gasseri* es un microorganismo Gram-positivo intestinal autóctono que constituye la mayor parte de las especies de *Lactobacillus* homofermentativas que ocupan el tracto gastrointestinal humano, con una sobresaliente producción de ácido láctico [19].

El crecimiento de *Lactobacillus gasseri* se produce en condiciones de pH entre 3 y 6, mientras que su rango óptimo de temperatura se encuentra entre 38-45°C. Según algunos estudios realizados y publicados por la revista Biosalud de Colombia, para su conservación y crecimiento de la cepa se utiliza caldo MRS como su principal fuente de alimentación [20].

Según un artículo de microbiología aplicada, la cepa *Lactobacillus gasseri* ejerce efectos para aliviar el estrés, sin embargo, en este estudio se encontró que el impacto de la función probiótica es diferente dependiendo el sexo de la persona a la que es sometida el estudio, ya que los resultados favorables haciendo uso de esta cepa se dieron para el género masculino [21]. Las pruebas para *Lactobacillus gasseri* fueron realizadas en humanos, que se dividieron en 2 grupos, en la cual uno tenía la cepa con leche fermentada y al otro grupo se le suministraba placebo donde se substituyó esto por un mayor porcentaje de agua y polvo de leche descremada. Se suministraron dosis de 200mL en las cuales estaban contenidas 1E10 UFC por cada dosis. Como resultado se obtuvo que para el grupo que fue sometido a la cepa de *Lactobacillus gasseri* CP2305 se logró regular los síntomas de estrés en el cuerpo [22].

### **2.1.4. *Bifidobacterium breve***

*Bifidobacterium breve* es una bacteria gram-positiva con un alto efecto probiótico, encontrada dentro del intestino de los humanos. Su temperatura óptima de crecimiento se puede encontrar en rangos entre 36-38°C y un pH óptimo entre 6,5 y 7,0. No ocurre crecimiento de esta cepa por debajo de un pH de 5,0 y por encima de un pH de 8,0 [9].

Se ha evaluado la supervivencia de *Bifidobacterium breve* en medios ricos en cisteína presente en carne cruda y extractos de levadura, donde se ha encontrado que estos promueven el crecimiento de la cepa y la producción de ácido con un estricto control de tiempo y temperatura.

Se han encontrado estudios donde se administró *Bifidobacterium breve* 1205 y en los cuales se mostraron considerables efectos antidepresivos y reguladores de la microbiota mediante la expresión de receptores de glucocorticoides [23]. Estudios demuestran que ante diferentes pruebas *Bifidobacterium breve* 1205 induce una disminución en los niveles de ansiedad, además de buenas respuestas fisiológicas a estrés agudo [24]. Este estudio fue realizado en ratones y la cepa fue donada por Alimentary Health. En el laboratorio esta fue reconstituida hasta una concentración final de 1E9

UFC/mL, suministrado a cada uno de los ratones. Como resultado se obtuvo una reducción en los niveles de estrés, depresión y ansiedad, sin embargo, este tratamiento indujo el bajo peso de los animales [25].

En cuanto a la cepa *Bifidobacterium breve* CCFM1025, se ha encontrado que esta disminuye significativamente los comportamientos de ansiedad y depresión, mediante pruebas de alteraciones neurológicas y niveles de corticosterona y citoquinas, mostrando efectos considerables similares a los de los antidepresivos [47]. Este estudio fue hecho en estudiantes de medicina, donde se dividió el grupo en dos partes, una recibiendo placebo y el otro recibiendo la dosis que contiene la cepa, la cual tiene 1E10 UFC por cada dos dosis. Como resultado se obtuvo una disminución en los niveles de ansiedad en el grupo que recibió la cepa, en comparación con el del placebo [26].

### **2.1.5. *Bifidobacterium infantis* 35624**

*Bifidobacterium infantis* es un microorganismo con morfología característica de bacilos Gram positivos que, dependiendo de las condiciones de pH, pueden ser pleomórficos y largos (pH=7) o bacilos cortos (pH<4). Sin embargo, el pH óptimo de crecimiento y obtención significativa de biomasa se encuentra entre 6,5 y 7, debido a que a un valor de pH por debajo de este rango, *B. Infantis* disminuye significativamente sus células activas en función del tiempo durante la fermentación [27].

Esta bacteria, a diferencia de otras especies de *Bifidobacterium*, no tolera completamente el oxígeno, por esta razón reside en el colon y se encuentra en su gran mayoría, en heces de bebés alimentados con leche materna [28]; conociendo esto, el medio de cultivo utilizado comúnmente es TYP (Tryptona, Peptona de Soya, Glucosa, Extracto de Levadura, Tween 80, L-Cisteína, Fosfato de Potasio, Cloruro de Magnesio, Sulfato de Zinc, Cloruro de Calcio y Tricloruro de Hierro) [29].

Debido a que esta especie es de origen humano, como se mencionó en el párrafo anterior, la temperatura óptima de crecimiento de esta especie se encuentra entre 36 y 38 °C [30].

*B. Infantis* 35624 es una de las cepas más investigadas de esta especie gracias a su actividad probiótica, se ha demostrado que el tratamiento con probióticos da como resultado la normalización de la respuesta inmunitaria, la reversión de los problemas de comportamiento y la reducción de los síntomas depresivos, por lo que podría considerarse un psicobiótico [31].

### **2.1.6. *Lactobacillus Helveticus* NS8**

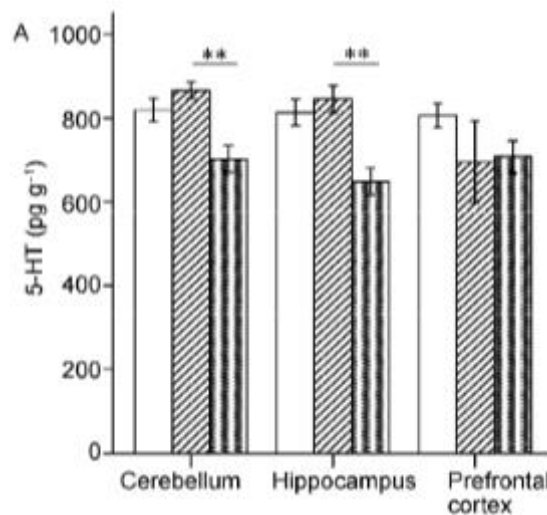
*Lactobacillus Helveticus* es una bacteria láctica homofermentativa, lo que quiere decir que generan como producto principal de la fermentación ácido láctico; por esto, se utiliza principalmente en la fabricación de quesos italianos y en la fermentación de bebidas lácteas [32].

Esta especie corresponde al grupo de bacterias termófilas, por lo que su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 42 y 45°C y el pH óptimo se da entre 5,5 y 5,8 [33]. Por otro lado, el medio de cultivo utilizado es el caldo MRS (DeMan-Rogosa-Sharpe), este es un medio utilizado especialmente para el cultivo y enumeración de *Lactobacillus spp* [34].

Estudios han demostrado que la cepa *Lactobacillus Helveticus NS8* reduce los niveles de Serotonina (5-HT) en el cerebelo y en el hipocampo como se muestra en la Ilustración 3, demostrando mejora en los comportamientos de ansiedad. Esto es importante debido a que una alteración en estos niveles de serotonina pueden contribuir al deterioro cognitivo y al desarrollo del trastorno de ansiedad [35]. El estudio fue realizado en ratas, la cepa fue aislada por el laboratorio que realizó el estudio desde sus productos naturales fermentados diariamente en China. Se utilizó el caldo MRS como medio de cultivo y la cepa fue suspendida en agua fresca estéril con una concentración de 1E9 UFC/mL[36].

**Figura 3.**

Niveles de serotonina ante la administración de *L. Helveticus NS8*



**Nota.** la ilustración muestra el efecto que tiene la administración de *L. Helveticus NS8* en los niveles de serotonina en el cerebelo, el hipocampo y la corteza prefrontal del cerebro. Adaptado de: J. A. Bravo *et al.*, "Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 38, pp. 16050–16055, 2011, doi: 10.1073/pnas.1102999108.

### **2.1.7. *Lactobacillus Plantarum* PS128**

*Lactobacillus Plantarum* es un miembro del grupo de bacterias lácticas heterofermentativas, lo que quiere decir que puede convertir la lactosa en ácido láctico, pero además en otros compuestos como el diacetilo, etanol, entre otros [38]. Se encuentra habitualmente en el tracto gastrointestinal humano y puede encontrarse en procesos fermentativos de lácteos, carnes y vegetales [39].

Debido a que *L. Plantarum* se clasifica como bacteria mesófila, su temperatura de crecimiento óptima se encuentra entre 30 – 35°C y el pH óptimo se establece entre 6 y 7; por otro lado, el medio de cultivo utilizado es el caldo MRS [40].

Estudios demostraron que *Lactobacillus Plantarum* PS128 normaliza los comportamientos similares a la depresión y reduce los comportamientos similares a la ansiedad, y además, es el primer psicobiótico en aumentar la actividad locomotora y modular los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico [41]. El estudio fue realizado en ratas, la cepa fue inoculada en caldo MRS como medio de cultivo y fue resuspendido en MRS más 12.5% de glicerol hasta una concentración final de 5E9 UFC/mL[42].

### **2.1.8. *Lactobacillus Rhamnosus* GG**

*Lactobacillus Rhamnosus* es una bacteria Gram-positiva, no formadora de esporas, y anaerobia facultativa. Pertenece a los organismos mesófilos (5 – 45°C) y dependiendo de la cepa, sus cultivos pueden crecer a temperaturas inferiores a 15°C o superiores a 40°C. Sin embargo, el rango de temperatura óptima se encuentra entre 30 y 45°C. Por otro lado, el pH óptimo se encuentra entre 4,5 y 6,4 [43].

Esta especie es de tipo heterofermentativa, lo que quiere decir que no solo puede producir ácido láctico, sino también ácido acético, ácido fórmico y etanol. Se encuentra naturalmente en el cuerpo humano, principalmente en los intestinos y gracias a esto se ha utilizado como probiótico para prevenir el crecimiento de bacterias dañinas en el estómago y en los intestinos [38]. Por otra parte, como es común en las bacterias del género *Lactobacillus*, el medio de cultivo es el caldo MRS [43].

Estudios demuestran que el suministro de *Lactobacillus Rhamnosus* GG genera una reducción en los altos niveles de ansiedad que pueda presentar el organismo [37]. *Lactobacillus rhamnosus* GG ha sido asociado con la reducción de ansiedad, así como con un mayor rendimiento cognitivo en las personas ante la suplementación de este probiótico [44].

### **2.1.9. *Lactobacillus Helveticus R0052* y *Bifidobacterium longum R0175***

Se han presentado estudios que demuestran que el cocultivo entre *Lactobacillus Helveticus R0052* y *Bifidobacterium longum R0175* tiene un efecto beneficioso como tratamiento para la depresión.

Un estudio demostró la primera evidencia de que esta combinación da un resultado positivo en la depresión posterior a un infarto de miocardio, este efecto beneficioso se debe a las alteraciones que inducen estos probióticos en la microbiota intestinal, lo que a su vez se relaciona con el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal y demuestra la actividad psicobiótica gracias a la conexión intestino-cerebro [45].

Adicionalmente, otro estudio demostró que el pretratamiento con estas especies bacterianas pueden desempeñar un papel beneficioso en algunas condiciones neurodegenerativas mediante la regulación de la expresión génica cerebral y las vías neuronales correspondientes [46].

Según estudios realizados en institutos de gastroenterología la formulación psicobiótica del co-cultivo de *Lactobacillus helveticus R0052* y *Bifidobacterium longum R0175* muestra actividad ansiolítica, además de tener efectos beneficiosos en la actividad cerebral ante condiciones de estrés crónico [47]. Además de ello se ha informado acerca de efectos positivos de este co-cultivo en niveles de depresión, ira y ansiedad, así como la disminución del nivel de la hormona del cortisol, la cual es la precursora principal del estrés [48]. El estudio fue realizado en ratones macho, la cepa fue suministrada por Lallemand Heath Solutions Inc ubicada en el país de Francia y como medio de cultivo fue utilizado el caldo MRS. La solución administrada a los sujetos de estudio se preparó en 0,9% de NaCl y en una concentración de 1E9 UFC/día [49].

### **2.1.10. *Lactobacillus Plantarum 90sk* y *Bifidobacterium adolescentis 150***

Las composiciones probióticas multicepas pueden afectar al microorganismo de muchas maneras, lo que no ocurre si se utilizan sus componentes por separado, como es el caso de este cocultivo que es un sistema biológico con muchas propiedades probióticas.

Un estudio demostró que *Lactobacillus Plantarum 90sk* y *Bifidobacterium adolescentis 150* presentaron una importante actividad antagonista con respecto a la depresión y la ansiedad, por otra parte, también mostraron propiedades antioxidantes, la cual es una característica importante en los psicobióticos [50]. El estudio fue realizado en ratones, el co-cultivo fue proporcionado por la colección del laboratorio de genética de microorganismos de la Academia Rusa de Ciencias. Como medio de cultivo se utilizó el agar MRS y para obtener un medio sólido se utilizó agar clostridial reforzado. Por 14 días fue administrado 0,5 mL de este co-cultivo, en la cual cada dosis contenía 1E8 UFC de *Lactobacillus Plantarum 90sk* y 1E7 UFC de *Bifidobacterium adolescentis 150* [51].

### 2.1.11. *Bifidobacterium longum subsp. Infantis E41* y *Bifidobacterium breve M2CF22M7*

A partir de la revista de bioquímica nutricional se ha estudiado la administración del co-cultivo de *Bifidobacterium longum subsp. Infantis E41* y *Bifidobacterium breve M2CF22M7*, con la cual se han obtenido resultados favorables en los niveles de concentración del factor neurotrófico, reduciendo significativamente los niveles de depresión, lo cual indica que la nutrición del organismo con este conjunto de cepas puede llegarse a convertir en una alternativa emergente para el tratamiento de los trastornos relacionados con el estado de ánimo [52]. El estudio fue realizado en ratones macho, la cepa fue suministrada por la Colección de cultivos de microorganismos alimentarios en la Universidad de Jiangnan. La cepa fue cultivada en caldo MRS con 0,05% (p/p) de L-cisteína [53].

El aumento en los niveles del FNDC y de la hidroxitriptamina están asociados a la reducción de la corticosterona sérica que consecuentemente disminuye los síntomas de depresión en el organismo, siendo esta suplementación probiótica eficaz contra depresión y estrés [54].

**Tabla 2.**

*Características de los artículos consultados para cada microorganismo*

<b>Cepa</b>	<b>Lugar de extracción</b>	<b>Volumen de dosis</b>	<b>Medio de cultivo</b>
<i>Bifidobacterium longum</i> 1714	Hamilton Health Sciences	100 – 200 mL	Maltodextrina
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC3001	ICN Biomedicals Inc.	100 µL	Sulfato de sodio dextrano
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Laboratorio de Investigación de Colección de Cultivos del Instituto Central de Yakult	100 mL	Leche fermentada
<i>Lactobacillus gasseri</i> CP2305	-	200 mL	Leche fermentada
<i>Bifidobacterium breve</i> 1205	Alimentary Health	20 mg/kg	Solución salina con fosfato estéril
<i>Bifidobacterium breve</i> CCFM1025	-	-	Dextrina
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	-	-	-

<i>Lactobacillus helveticus</i> N58	Laboratorio de Grassland	20 µL	Caldo MRS y agua fresca estéril
<i>Lactobacillus plantarum</i> PS128	-	-	MRS más 12.5% de glicerol
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	University of Turku	-	Caldo MRS
<i>Lactobacillus Helveticus</i> R0052 y <i>Bifidobacterium longum</i> R0175	Lallemand Heath Solutions Inc.	-	Caldo MRS con NaCl al 0,9%
<i>Lactobacillus Plantarum</i> 90sk y <i>Bifidobacterium adolescentis</i> 150	Laboratorio de genética de microorganismos de la Academia Rusa de Ciencias	0,5mL	Agar MRS y agar clostridial reforzado
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>Infantis</i> E41 y <i>Bifidobacterium breve</i> M2CF22M7	Colección de cultivos de microorganismos alimentarios en la Universidad de Jiangnan	0,5mL	Caldo MRS con 0,05% (p/p) de L-cisteína

*Nota.* Datos tomados de las referencias de la Tabla 1

## 2.2. Matriz de selección del microorganismo

Se realiza la matriz de selección del microorganismo mediante la evaluación de criterios como la facilidad de obtención de la cepa, nivel de desarrollo de la investigación, el medio de cultivo, pH y temperatura de crecimiento óptimos y potencial psicobiótico. Esta matriz de decisión sigue la metodología optimista, ya que los resultados que reflejen un resultado más alto será el más favorable para su aplicación en el diseño para el cual se puede obtener un valor ponderado mínimo de 0 y un valor ponderado máximo de 15 [55].

Se maneja una escala de 1 a 3 para cada criterio, de la siguiente manera:

- Facilidad de obtención
  - 1: No se encuentra información acerca de la comercialización de la cepa.
  - 2: Se encuentra el microorganismo en un banco de cepas.
  - 3: Se tiene disponibilidad de la cepa en la Universidad de América.



- Nivel de desarrollo tecnológico
  - 1: La cepa analizada se encuentra en una etapa muy temprana de desarrollo.
  - 2: La cepa analizada ha sido probada en animales o humanos.
  - 3: La cepa analizada ha demostrado resultados exitosos en las pruebas en animales o humanos y se han realizado diversos estudios en diferentes países.
- Medio de cultivo
  - 1: El medio de cultivo es muy específico, difícil de obtener y costoso.
  - 2: El medio de cultivo es asequible, pero con costo elevado.
  - 3: El medio de cultivo es asequible y tiene un costo moderado.
- pH y temperatura
  - 1: Las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa se encuentran en un rango muy limitado de pH y temperatura, y además presenta un rango de pH neutro o básico, lo que implica un mayor control de esta variable.
  - 2: Las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa se encuentran en un rango muy limitado de pH y temperatura o presenta un rango de pH neutro o básico, lo que implica un mayor control de esta variable.
  - 3: Las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa se encuentran en un rango amplio de pH y temperatura, y además presenta un rango de pH ácido, lo que facilita el control de esta variable.
- Potencial psicobiótico
  - 1: La cepa muestra resultados limitados y poco contundentes.
  - 2: La cepa muestra resultados positivos para la ansiedad o la depresión,
  - 3: La cepa muestra resultados positivos y contundentes para la ansiedad y la depresión.

Con ello se pondera la puntuación para cada cepa y se selecciona aquella que sea la más factible en cuanto a los criterios evaluados, es decir, la que obtenga el resultado más alto.

**Tabla 3.**

*Matriz de selección del microorganismo*

<b>Cepa/Criterio</b>	<b>Facilidad de obtención</b>	<b>Nivel de desarrollo</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>pH y temperatura</b>	<b>Potencial psicobiótico</b>	<b>Total</b>
<i>Bifidobacterium longum</i> 1714	1	3	3	1	2	10
<i>Bifidobacterium longum</i> NCC3001	1	3	3	1	1	9
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	1	3	3	1	1	9

<i>Lactobacillus gasseri</i> CP2305	1	1	2	3	1	8
<i>Bifidobacterium breve</i> 1205	1	1	3	1	3	9
<i>Bifidobacterium breve</i> CCFM1025	1	1	3	1	2	8
<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	1	2	3	1	3	10
<i>Lactobacillus helveticus</i> N58	1	2	2	2	2	9
<i>Lactobacillus plantarum</i> PS128	2	2	2	2	3	11
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	2	3	2	3	2	12
<i>Lactobacillus Helveticus</i> R0052 y <i>Bifidobacterium longum</i> R0175	1	1	2	1	3	8
<i>Lactobacillus Plantarum</i> 90sk y <i>Bifidobacterium adolescentis</i> 150	1	1	2	2	3	9
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>Infantis</i> E41 y <i>Bifidobacterium breve</i> M2CF22M7	1	1	3	1	2	8

*Nota.* Puntajes ponderados según la descripción de cada criterio

A partir de los resultados obtenidos en la matriz de selección del microorganismo, se seleccionó la cepa *Lactobacillus rhamnosus* GG, debido a que obtuvo la mayor puntuación (12), lo que quiere decir que en todos los criterios evaluados presenta mayores ventajas con respecto a las demás cepas analizadas y este resultado es bastante cercano al máximo posible (15). Si bien *Lactobacillus plantarum* PS128 obtuvo un valor de 11, es decir, cercano a la puntuación del microorganismo seleccionado, *Lactobacillus Rhamnosus* GG se destacó en más parámetros como lo fueron el nivel de desarrollo y el rango óptimo de pH y temperatura. El nivel de desarrollo de *Lactobacillus plantarum* PS128 es más bajo, debido a la cantidad de estudios realizados; *Lactobacillus Rhamnosus* GG tiene más artículos donde es mencionada la cepa y se hacen análisis de esta a mayor profundidad [56], [43], [44], [57], [37].

### 3. ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus rhamnosus GG*

#### 3.1. Medio de cultivo

Si bien existen variedad de medios de cultivos que se comercializan para *Lactobacillus rhamnosus GG*, es necesario identificar, a través de la información publicada en los diferentes artículos, aquel medio en el que las sustancias dentro de su composición promueven el crecimiento del microorganismo en mayor medida. Además, también es importante poseer toda la información acerca de la preparación, así como de sus condiciones de almacenamiento y control de calidad teniendo claros los parámetros de temperatura y pH que la cepa escogida requiere.

Luego de una exhaustiva revisión bibliográfica en artículos que relacionan *Lactobacillus rhamnosus GG* con pruebas para psicobióticos, se encontró el caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) como el medio de cultivo mayormente utilizado.

La composición del caldo MRS se describe en la siguiente tabla:

Tabla 4.

Composición del caldo MRS

Fórmula en g/L			
Peptona bacteriológica	10	Dextrosa	20
Fosfato dipotásico	2	Sulfato magnésico	0,2
Sulfato de manganeso	0,05	Extracto de carne	8
Acetato de sodio	5	Tween 80	1
Extracto de levadura	4	Citrato amónico	2

**Nota.** la tabla muestra la composición detallada del medio de cultivo que será utilizado (Caldo MRS). Adaptado de: Britania, "Caldo, MRS," *J. Appl. Bacteriol*, vol. 23, no. 37, pp. 2–3, 2014, [Online]. Available: [http://www.britanialab.com/productos/413\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/413_hoja_tecnica_es.pdf).

Para su preparación se suspenden 52,25 gramos del medio en un litro de agua destilada. Se mezcla y se disuelve por calentamiento agitando con frecuencia. Se hierve durante un minuto hasta disolver por completo. Finalmente se dispensa en los recipientes adecuados y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 12 minutos [43].

Su rango temperatura de almacenamiento debe encontrarse entre 2°C y 8°C. El cultivo se inocula en una concentración de aproximadamente 10<sup>3</sup> CFU [43].

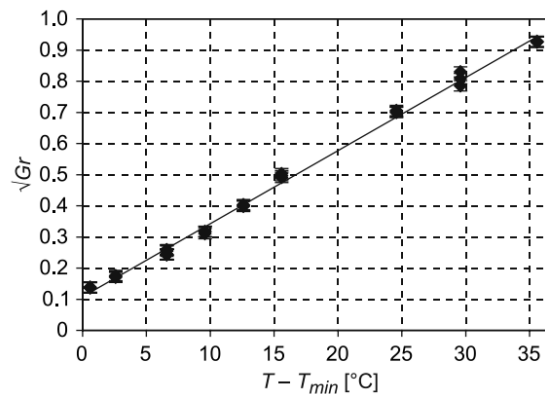
#### 3.2. Temperatura y pH

*Lactobacillus rhamnosus GG* pertenece a los organismos mesófilos (5 – 45°C), su cultivo puede crecer a temperaturas inferiores a 15°C o superiores a 40°C. Sin embargo, el rango de temperatura óptima se encuentra entre 30 y 45°C [43].

Según estudios publicados por la revista de investigación de comida y nutrición de Bratislava, Eslovaquia, se realizaron análisis del crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus GG* en temperaturas entre 6°C y 41°C, como se puede observar en la ilustración 4.

**Figura 4.**

*Tasa de crecimiento en función de la temperatura de crecimiento de Lactobacillus Rhamnosus GG*



**Nota.** la ilustración muestra una gráfica que representa la tasa de crecimiento de *L. Rhamnosus GG* con respecto a la temperatura. Adaptado de: Ľ. Valik and D. M. A. Lipatkova, "Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus GG*," *J. food Nutr. Res.*, vol. 47, no. 2, pp. 60–67, 2008.

Se plantea el método de "raíz cuadrada" propuesto por Ratkowsky, para modelar la tasa de crecimiento de la cepa con el objetivo de cubrir el rango de temperatura hasta el rango óptimo de crecimiento mediante la siguiente ecuación.

$$\sqrt{Gr} = b(T - T_{min}) \quad (1)$$

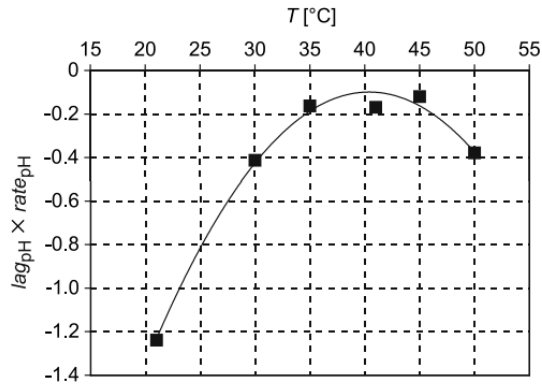
Donde  $T_{min}$  es la mínima temperatura teórica de crecimiento del microorganismo,  $Gr$  es la tasa de crecimiento del microorganismo a temperatura subóptima y  $b$  es el coeficiente de regresión lineal. El valor de  $T$  es propuesto por el investigador dependiente de la temperatura o temperaturas a las que se desea estudiar el comportamiento de la cepa [58].

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio, que se muestran en la ilustración 4, se puede establecer que la temperatura a la que se da una mayor tasa de crecimiento es a 40,5°C, teniendo en cuenta que para el estudio realizado la temperatura mínima fue de 6°C ( $T - T_{min} = 35^{\circ}C$ ). Esto fue verificado teniendo en cuenta también la dependencia de la temperatura con respecto al pH, con la siguiente ecuación [43].

$$\text{lag}_{pH} * \text{rate}_{pH} = -0,003T^2 + 0,243T - 5,0091 \quad (2)$$

**Figura 5.**

*Dependencia de la temperatura de crecimiento con respecto al pH*



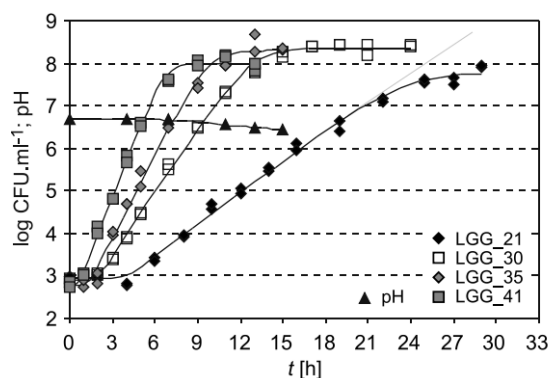
**Nota.** la ilustración muestra una gráfica que representa la dependencia de que tiene la temperatura con respecto a la variación del pH en el análisis del crecimiento de *L. Rhamnosus GG*. Adaptado de: Ľ. Valik and D. M. A. Lipatkova, "Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus GG*," *J. food Nutr. Res.*, vol. 47, no. 2, pp. 60–67, 2008.

Con la ecuación 2 a diferentes temperaturas, se estudia el crecimiento de la cepa en rangos cercanos a la posible temperatura óptima, notando en la siguiente gráfica un pico máximo de la curva hacia los 40°C. También se puede visualizar que, a temperaturas mayores a 40,5°C, la curva muestra un decrecimiento, lo cual también confirma la temperatura óptima de crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus GG*.

Por otro lado, el pH óptimo para el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus GG* se encuentra en un rango entre 4,5 y 6,4.

**Figura 6.**

*Dinámica de crecimiento de Lactobacillus rhamnosus GG y pH en relación con la temperatura*



**Nota.** la ilustración muestra una gráfica que representa la dinámica de crecimiento de *L. Rhamnosus GG* con respecto al pH y la temperatura. Adaptado de: L. Valik and D. M. A. Lipatkova, "Characterization of the growth of *Lactobacillus rhamnosus GG*," *J. food Nutr. Res.*, vol. 47, no. 2, pp. 60–67, 2008.

### **Las diferentes series corresponden a distintas temperaturas de crecimiento**

De acuerdo a la ilustración 6, se tuvo en cuenta en primer lugar la curva que representa la temperatura óptima de crecimiento (41°C), ya que a esta temperatura se alcanza la mayor velocidad de crecimiento. Luego de esto, se observó que el valor del pH disminuye progresivamente hasta un valor de 6,4 a la hora 15, sin embargo, como muestra la ilustración 6, la variación del pH es mínima y se mantiene prácticamente constante.

## 4. DISEÑO CONCEPTUAL

### 4.1. Procesamiento

El proceso de producción de un psicobiótico es igual al de un probiótico, debido a que el objetivo para ambos casos es obtener una cepa óptima y funcional para cada requerimiento.

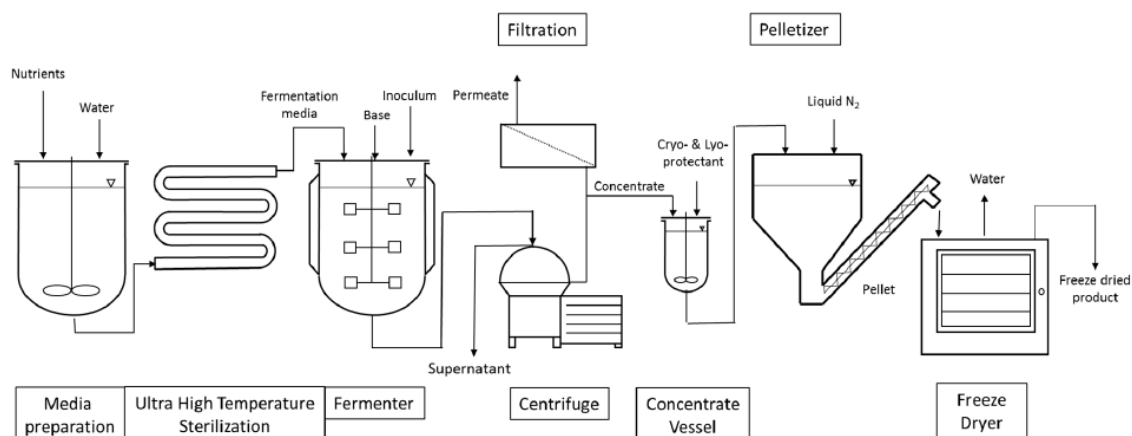
Como se puede observar en la tabla 1, las especies más comunes en cuanto al potencial psicobiótico pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los microorganismos de estos géneros pueden tener requisitos de crecimiento y propiedades de estabilidad muy diferentes. Como la viabilidad es clave, en cantidades suficientes y hasta el final de la vida útil, los psicobióticos deben producirse de forma que sean robustos y estables. También es necesario incluirlos en productos de consumo que permitan su supervivencia, en cantidades suficientes, hasta el final de su vida útil [59].

Algunas tecnologías de fermentación, entre las que se encuentran la fermentación por lotes, la fermentación continua, los biorreactores de membrana y la tecnología de células inmovilizadas, se consideran adecuadas para la proliferación de bacterias probióticas. Están diseñadas para producir un mayor rendimiento y productividad celular y para disminuir la capacidad de procesamiento posterior necesaria para cosechar la biomasa [60].

Varias características influyen en la viabilidad de los microorganismos probióticos en los productos alimentarios durante los periodos de producción y de almacenamiento, como el pH, la acidez, el oxígeno disuelto, el potencial redox, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las bacteriocinas, los ácidos grasos de cadena corta, los agentes aromatizantes, los microbios competitivos, los materiales y las condiciones de envasado, la tasa y concentración de inoculación, condiciones de fermentación, microencapsulación, contenido de sólidos no grasos de la leche, suplementación de la leche con nutrientes, temperatura y tiempo de incubación, temperatura de almacenamiento, carbonatación, adición de sal, azúcar y edulcorantes, velocidad de enfriamiento del producto y la escala de producción [60].

El diagrama de proceso de producción más común para la producción de microorganismos probióticos se puede observar en la ilustración 2.

**Figura 7.**  
Presentación esquemática de la producción de biomasa



**Nota.** la ilustración muestra el diagrama de proceso para la obtención de la biomasa de un probiótico. Adaptado de: K. Fenster, B. Freeburg, C. Hollard, C. Wong, R. R. Laursen, and A. C. Ouwehand, "The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach," *Microorg.* 2019, Vol. 7, Page 83, vol. 7, no. 3, p. 83, Mar. 2019, doi: 10.3390/MICROORGANISMS7030083.

El proceso de producción se divide en las etapas que se describen a continuación.

#### 4.1.1 Optimización y preparación del medio de cultivo

Las semillas congeladas se preparan cuidadosamente para que consista en una sola cepa pura y se verifica que esté libre de contaminantes para el test de control de calidad (QC), se utiliza en un número limitado de fermentaciones secuenciales de semillas para lograr el volumen de inóculo deseado y, finalmente, se transfiere al recipiente de fermentación principal para su crecimiento. Como alternativa, el material congelado de inoculación directa en cuba (DVI) consiste en una mayor cantidad de células concentradas que puede utilizarse para inocular directamente el recipiente de fermentación principal [59].

El medio tratado térmicamente que se utiliza en el escalado de semillas y la fermentación principal es una mezcla de agua, fuentes de nitrógeno, carbohidratos, sales y micronutrientes necesarios para el crecimiento [59].

La leche y el suero de leche bovina son considerados como fuentes de nutrientes para el crecimiento de bacterias del género *Lactobacillus*, ya que contienen fuente de nitrógeno en forma orgánica, complejos vitamínicos como el complejo B, pH adecuado, y una forma coloidal que hace disponible todo tipo de nutrientes [8].



El caldo MRS (DE MAN, ROGOSA y SHARPE) es el medio más utilizado para el cultivo de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* [62]. Se produjeron mayores recuentos celulares de cepas de bifidobacterias en leche desnatada ultrafiltrada con diversas concentraciones de proteínas o la inclusión de leche con sustratos nitrogenados, como las fracciones de suero y caseína de la leche humana o de vaca comparada con el crecimiento en leche desnatada solamente [63].

#### 4.1.2 Fermentación

En esta etapa se pueden tomar diferentes caminos ya que existen varios tipos de fermentación que pueden ser utilizados para la producción de un psicobiótico, entre ellos están:

- **Biorreactor de Membrana:** algunos investigadores han informado sobre la producción de células probióticas en biorreactores de membrana. Han apoyado los altos rendimientos celulares y la productividad volumétrica. Se han reportado niveles de biomasa siete veces mayores de *Bifidobacterium longum* en un biorreactor de membrana que la obtenida en fermentadores discontinuos de células libres [64]. Asimismo, estudios informan que hay un alto rendimiento celular y una productividad volumétrica 15 veces mayor en comparación con los cultivos discontinuos de células libres de *Bifidobacterium bifidum* [65].
- **Tecnología de células inmovilizadas en cultivos continuos:** este tipo de tecnología tiene el potencial de mejorar el papel de las células probióticas. Por lo tanto, la fisiología y la funcionalidad de los probióticos ingeridos pueden mejorarse con la aplicación de estas tecnologías. Esto ayuda a ampliar la gama de probióticos disponibles en el mercado [66]. En los cultivos continuos, las células bacterianas crecen en un fermentador con un suplemento continuo de medio fresco y la eliminación del caldo fermentado a una tasa de dilución determinada. El metabolismo, la tasa de crecimiento y la expresión genética de las bacterias de los cultivos continuos pueden controlarse en condiciones constantes durante largos períodos de tiempo [67].
- **Fermentación continua:** las células producidas con cultivos continuos de CI (Células Inmovilizadas) están en fase exponencial o fase estacionaria temprana, y muestran una alta viabilidad y actividad metabólica en comparación con las células muertas de hambre producidas con cultivos convencionales por lotes [60]. La tecnología de células inmovilizadas combinada con el cultivo continuo a largo plazo puede ser un proceso de un solo paso y de células con mayor tolerancia a las tensiones ambientales, sin necesidad de tratamientos de pre acondicionamiento que a veces se hace para mejorar la supervivencia de los probióticos durante su producción y uso en alimentos funcionales, pero que acaban reduciendo la actividad y el rendimiento de las células [68].

### **4.1.3 Microencapsulación**

La microencapsulación es una tecnología para envasar sólidos, líquidos o materiales gaseosos en pequeñas cápsulas selladas que pueden liberar su contenido a un ritmo controlado en condiciones específicas [69]. La microencapsulación de probióticos en perlas de hidrocoloide se ha comprobado que mejora su viabilidad y actividad en los productos alimenticios, ya que las células quedan atrapadas en una matriz de perlas, separándolas así de las duras condiciones ambientales y protegiéndolas contra los bacteriófagos [70].

### **4.1.4 Secado por pulverización o aspersión**

Las células bacterianas requieren una actividad del agua ( $a_w$ ) de aproximadamente 0,98 en la matriz resultante para su crecimiento y supervivencia. Por lo tanto, la eliminación física del agua para convertir las células bacterianas en una forma seca es un proceso arriesgado. Es necesario mantener una  $a_w$  alta para la actividad metabólica o una  $a_w$  baja para preservar las bacterias en estado vivo, para que puedan sobrevivir en estado latente en los polvos [71].

El secado por aspersión es una herramienta bien organizada en las industrias alimentarias para la producción de leche en polvo y café instantáneo. Aunque hay varias condiciones de proceso restrictivas para los microorganismos (la entrada alcanza  $\geq 180$  °C), la rapidez del secado, combinada con la capacidad de secar grandes cantidades de cultivos bacterianos ha llamado la atención de la investigación y la industria [72].

### **4.1.5 Liofilización**

La liofilización es un método comúnmente utilizado, que proporciona una mayor supervivencia en comparación con el secado por pulverización. En general, la liofilización se consigue mediante tres pasos importantes: congelación, secado primario y secundario.

Para aumentar la tasa de supervivencia de los cultivos bacterianos, se suelen congelar a  $-196$  °C en nitrógeno líquido. Tras la congelación, las muestras congeladas se subliman con hielo en condiciones de alto vacío para completar la congelación primaria.

En este paso, la alta temperatura bajo presión provoca la transición de fase de sólido a gas. Después de la etapa de secado primario se elimina casi el 95% del contenido de agua de la muestra. Sin embargo, el secado secundario también es importante para eliminar las moléculas de agua ligada al hidrógeno para lograr un contenido final de agua inferior al 4%, lo que de agua final por debajo del 4%, mejorando así las tasas de supervivencia y la eficacia del almacenamiento a largo plazo y evitando el deterioro [73].

## 4.2. Control de calidad y condiciones de producto y almacenamiento

### 4.2.1. Control de calidad

La fabricación de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con un alto rendimiento constante depende en gran medida del control efectuado durante todo el proceso. Es necesario tener en cuenta la diversidad de respuestas que puedan tener las cepas al proceso, con el fin de mantener el control y evitar la alteración negativa del rendimiento [74].

Una vez establecido el proceso para cada cepa establecida, es importante ejecutar este proceso de la misma manera cada vez, lo cual genera una menor desviación en la fabricación y una mayor facilidad en el control [61].

El control del proceso de fabricación se realiza en varios niveles, entre los que se incluyen los siguientes:

- Los proveedores de materias primas son auditados y las materias primas son evaluadas a cierto nivel para garantizar la alta calidad.
- El establecimiento de rangos significativos y alcanzables para los parámetros del proceso y la verificación de la capacidad del proceso para estar constantemente dentro de esos rangos.
- Automatización del proceso en la medida de lo posible, para reducir la incoherencia asociada a los errores humanos y los aspectos del proceso de fabricación controlados manualmente.
- Evaluación de las muestras durante el proceso y del producto final para garantizar que el producto sea de alto rendimiento y esté libre de contaminantes.

Todos los aspectos del proceso deben ser supervisados y controlados adecuadamente para garantizar un rendimiento de la cepa elevado y constante. No se puede subestimar la importancia de controlar el proceso para la fabricación constante de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* de alto rendimiento, especialmente los requisitos nutricionales específicos de la cepa y la sensibilidad del proceso [61].

Cuando se fabrican productos probióticos, es imprescindible contar con normas y procesos de alta calidad. Esto garantiza que el producto se fabrique de acuerdo con las normas más estrictas para obtener un producto que no sólo cumpla las especificaciones de la etiqueta, sino que también sea eficaz y seguro de usar. Además, el producto debe ser analizado por un laboratorio independiente y plenamente acreditado que tenga la experiencia necesaria para analizar las cepas probióticas. La garantía de calidad debe ocupar un lugar destacado en la lista de obligaciones para cada empresa y la trazabilidad completa debe ser una prioridad [75].

Como cada vez más probióticos están siendo consumidos por la población en general, que incluye a personas vulnerables sujetos como mujeres embarazadas, bebés, personas con reacciones alérgicas y

personas con sistemas inmunitarios comprometidos, los estándares y normatividad para mantener el control de calidad industrial y las pruebas han avanzado.

El cumplimiento de la orientación reglamentaria y las normas aplicables han mejorado el control y el resultado de los procesos de producción y control de calidad, aumentando la capacidad de las instalaciones de producción para producir y control de calidad para la fabricación de un producto final más consistente. Además, al implementar y practicar dichas pautas, las áreas continuas para el desarrollo y/o las correcciones se pueden adoptar más fácilmente.

Además, al adoptar buenas prácticas de manufactura (BPM), el laboratorio de control de calidad minimiza la contaminación mediante la comprensión de los pasos utilizados en la producción para hacer el producto final, la composición del producto final y la manipulación del producto final. Esto incluye personal higiene, el equipo de protección individual (EPI) adecuado, establecimiento de protocolos de tránsito peatonal, flujo a través del laboratorio, y procedimientos y registros de saneamiento.

#### ***4.2.2. Condiciones del producto y su almacenamiento***

La composición de los alimentos, los tipos de material de envasado y entorno de almacenamiento tienen una influencia significativa en la supervivencia de los probióticos [76].

#### ***4.2.3. Promotores de crecimiento***

Diferentes promotores del crecimiento, como la glucosa, las vitaminas, los minerales, la caseína, los hidrolizados de proteína de suero, el extracto de levadura y los antioxidantes, se enriquecen en los productos lácteos para aumentar la tasa de crecimiento de las especies probióticas (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) [77]. Estos suplementos tienen efectos positivos significativos en la supervivencia de los microorganismos probióticos durante el almacenamiento. Los estudios también han demostrado que la presencia de disacáridos puede estabilizar la membrana celular durante el almacenamiento [78]. Por ejemplo, el sorbitol evita el daño de la membrana al interactuar con ella, y estabiliza la funcionalidad y la estructura de las proteínas, se encontró al sorbitol como el mayor protector para *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus* durante el almacenamiento [79].

#### ***4.2.4. Contenido de oxígeno***

El contenido de oxígeno es uno de los factores más importantes que afectan a la viabilidad de los probióticos, especialmente durante el periodo de almacenamiento [80]. El oxígeno molecular es perjudicial para la supervivencia y el crecimiento de los probióticos, ya que la mayoría de las especies

son estrictamente anaerobias. El nivel de oxígeno dentro del envase durante el almacenamiento de los productos probióticos debe ser lo más bajo posible para evitar la toxicidad y la muerte del microorganismo y la consiguiente pérdida de funcionalidad del producto [81].

#### **4.2.5. Contenido de humedad**

El contenido de humedad de los productos probióticos es otro factor que influye en la estabilidad de la vida útil de las bacterias vivas [82]. El almacenamiento en presencia de oxígeno y humedad será perjudicial para la supervivencia de las bacterias. El contenido óptimo de humedad óptimo para el almacenamiento de *Lactobacillus salivarius* oscila entre el 2,8% y el 5,6% [83].

#### **4.2.6. Temperatura de almacenamiento**

La viabilidad de las bacterias probióticas durante el almacenamiento está inversamente relacionada con la temperatura de almacenamiento. Los alimentos probióticos deben almacenarse preferentemente a una temperatura de 4-5 °C. La mayor viabilidad de *Lactobacillus acidophilus* en yogur se observó hasta 20 días cuando se almacenó a 2 °C, mientras que para *Bifidobacterium lactis*, la temperatura óptima de almacenamiento fue de 8 °C [84].

#### **4.2.7. pH y acidez**

La supervivencia de los probióticos durante el almacenamiento se ve considerablemente afectada por el pH y la acidez. El rango óptimo de pH para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* está en el rango de 5,5 - 6,0 y 6,0 - 7,0, respectivamente. Los lactobacilos son capaces de crecer y sobrevivir en productos fermentados con valores de pH entre 3,7 y 4,3 [85]. Las especies de bifidobacterias son menos tolerantes al ácido, y un nivel de pH inferior a 4,6 es perjudicial para su supervivencia [86].

#### **4.2.8. Aspectos de empaque**

Diferentes aspectos del envasado, como el tipo y el grosor de los materiales de envasado, la permeabilidad a los gases (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y vapor de agua) y permeabilidad a la luz a través del material pueden influir en la supervivencia de los probióticos [77].

Las mejores condiciones para crear un entorno anaeróbico favorable (menos de 1 ppm de oxígeno) para el crecimiento de cultivos probióticos viables se obtuvieron cuando se envasó en un recipiente hecho de un material de barrera al oxígeno integrado con un agente capturador de oxígeno [87]

### **4.3. Alistamiento de materias primas**

#### **4.3.1. *Lactobacillus rhamnosus GG***

Para la elección del proveedor de la cepa de *Lactobacillus rhamnosus GG* se realizó una búsqueda en la cual se encontró que la ATCC (American Type Culture Collection) es una organización estadounidense encargada de recolectar, almacenar y distribuir microorganismos a nivel mundial, por lo cual se selecciona está directamente como proveedor ya que, al realizar la búsqueda a nivel nacional, no se encontró la disponibilidad de esta cepa.

#### **4.1.6 *Caldo MRS***

El caldo MRS es un medio mejorado para *Lactobacillus*, favorece un buen crecimiento y es particularmente útil para una serie de cepas exigentes que crecen mal en otros medios generales.

Contiene digestión enzimática de tejido animal, extracto de carne de res y extracto de levadura, que son las fuentes de carbono, nitrógeno y vitaminas que se utilizan para satisfacer los requisitos generales de crecimiento en el medio de caldo MRS. La dextrosa es el carbohidrato fermentable incorporado al medio. El acetato de sodio en caldo es un agente inhibidor. El acetato de sodio y el citrato de amonio actúan como fuente de energía y como agentes selectivos para prevenir el crecimiento excesivo de organismos contaminantes. El fosfato de potasio es el agente taponador. El sulfato de magnesio y el sulfato de manganeso proporcionan cationes que se utilizan en el metabolismo. El polisorbato 80 es un tensioactivo que facilita la absorción de nutrientes por los *Lactobacillus* [88].

Los respectivos pesos de cada uno de los componentes que conforman el caldo MRS en g/L están consignados en la *Tabla 3*.

Este es posible obtenerlo mediante proveedores nacionales como el grupo didacta de ciencia y tecnología o proveedores internacionales como Merck que cuentan con la disponibilidad para la necesidad de un proceso industrial.

#### **4.1.7 *Agua***

El agua es un componente importante en la preparación y utilización de medios de cultivo microbiológicos, por lo que esta debe estar libre de impurezas que podrían tener un impacto en el crecimiento de bacterias o causar diversas anomalías en el medio, como un pH incorrecto, color incorrecto o precipitación. Por esta razón, la calidad del agua recomendada está descrita en la norma

ISO 11133: 2014 (“Microbiología de alimentos, alimentación animal y agua – Preparación, producción, almacenamiento y pruebas de rendimiento de medio de cultivo”)[89] y describe los siguientes criterios:

- Estar purificada, libre de trazas de cloro, amoníaco o iones metálicos, que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos
- La conductividad del agua debe ser  $<25 \mu\text{S}/\text{cm}$ , preferiblemente por debajo de  $5 \mu\text{S}/\text{cm}$
- Se recomienda que el agua se use recién purificada o se almacene en un recipiente libre de sustancias inhibidoras
- La contaminación microbiana del agua debe ser  $<10^3 \text{ufc} / \text{mL}$

#### 4.4. Dimensionamiento del proceso

Para el proceso de producción del microorganismo psicobiótico *Lactobacillus Rhamnosus GG* se estableció un reactor con capacidad de  $1\text{m}^3$ , esto debido a que después de realizar una amplia revisión bibliográfica acerca de la producción anual del mercado probiótico/psicobiótico a nivel nacional, no se encontró una cifra concreta de esta variable, por lo que se procedió a optar por un reactor con el volumen más grande disponible de manera comercial.

A pesar de que el volumen del reactor es de  $1\text{m}^3$ , este se va a operar con un máximo de 700L como volumen efectivo, debido a que existen cabezas de aire y un reactor no se opera a su máxima capacidad por temas de control y seguridad. Adicionalmente, los días laborales durante el año serán 300, los días restantes del año corresponden a días festivos, domingos y días destinados al mantenimiento.

Con lo anterior y teniendo en cuenta que *L. Rhamnosus GG* tiene un tiempo de fermentación de 12h, como se puede observar en la ilustración 6, se programa que se produzca un lote de 700L por día, lo cual correspondería a 210000 L/año.

Ahora bien, es importante tener en cuenta que la productividad del microorganismo es de  $10 \times 10^{10}$  UFC/L y para que se produzca esta cantidad debe haber un inóculo inicial de  $6,17 \times 10^5$  UFC/L, por lo tanto, la cantidad de biomasa que se produciría por lote sería de  $7 \times 10^{13}$  UFC.

#### 4.5. Descripción del proceso

Inicialmente, se realiza la dilución del medio de cultivo (caldo MRS) con agua, siguiendo las instrucciones del proveedor (55g de caldo por cada litro de agua) en el mezclador M-101, posteriormente, esta mezcla pasa a un esterilizador (H-101) que funciona a una temperatura de  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos y que tiene como objetivo la esterilización del medio de cultivo, esto para asegurar su completa inocuidad. Una vez completada la esterilización, se procede a repartir el medio de cultivo

en el respectivo tren de inóculo por medio de tres divisores (D-101, D-102 y D-103). El proceso de esterilización se realiza antes de la entrada a cada fermentador en los equipos H-102, H-103 y H-104,

El tren de inóculo se construye a partir del dimensionamiento del proceso. Como se estableció un volumen de 1000L en el reactor principal, se dividió este valor en 10 para colocar un reactor previo de 10L, se realizó este proceso hasta llegar a un reactor de 100ml (R-101), el cual corresponde a un volumen óptimo para el inicio del proceso, en el R-101 ingresa directamente la biomasa seca de *L. Rhamnosus GG*.

Es necesario tener en cuenta el inóculo inicial para cada uno de los biorreactores, ya que cuentan con diferente capacidad. A partir del inóculo inicial para 1L que es de  $6,17 \times 10^5$  UFC, es calculado el necesario para las demás capacidades, siendo de  $4,32 \times 10^5$  UFC para el de 700mL,  $4,32 \times 10^6$  UFC para el de 7L,  $4,32 \times 10^7$  UFC para el de 70L y  $4,32 \times 10^8$  UFC para el de 700L.

Una vez terminada la fermentación en el R-104, la corriente se dirige hacia una centrífuga (S-101) para separar los metabolitos de la biomasa, los metabolitos formados salen por la parte de abajo hacia un tanque (T-101) y la biomasa concentrada se dirige posteriormente hacia un secador por aspersion (S-102). En dicho secador, ingresa por arriba aire caliente y sale por abajo la biomasa seca que es dirigida al tanque T-102; por la otra corriente sale aire húmedo, este aire ingresa a un ciclón (S-103) para retirar la humedad y las trazas de biomasa que hayan quedado, del S-103 por arriba sale el escape de aire y por abajo la biomasa seca que se haya recuperado que se dirige al tanque T-102.

Cabe aclarar que, para el proceso de separación y secado, las técnicas más utilizadas son la liofilización y el secado por aspersion. Para este diseño se eligió la técnica de secado por aspersion debido a que es uno de los procesos más prometedores para la producción de probióticos secos debido a su alta tasa de funcionamiento, bajo costo de operación y mantenimiento, además del alto de supervivencia de los microorganismos [90].

Es importante tener en cuenta las condiciones en las que debe realizarse el proceso de secado para no afectar la viabilidad del microorganismo, la temperatura de entrada a la cámara de secado debe estar entre 80 y 180°C, mientras que la temperatura de salida debe encontrarse entre 40 y 100°C. El aumento de la temperatura a la salida disminuye la viabilidad celular, dado que esta temperatura se encuentra por encima de la temperatura que los microorganismos pueden soportar [91].

Por último, la producción de biomasa debe realizarse en un proceso estéril y completamente hermético para evitar la contaminación cruzada con microorganismos silvestres. Por lo tanto, todas las líneas de aire y de gases inertes necesarias para el proceso de fermentación y secado deben ser filtradas a través de filtros HEPA.

Adicionalmente se debe contar con líneas de servicio de vapor vivo que permitan esterilizar las tuberías y los equipos previo al paso de las corrientes de proceso y también se debe contar con una limpieza



CIP, con el fin de garantizar la remoción de los residuos entre lotes y evitar la contaminación entre los mismos. Dichos equipos de filtrado no se muestran en el diagrama PFD, sin embargo, deben tenerse en cuenta para el diseño del proceso.

El diagrama de flujo de proceso (PFD) puede observarse en el anexo A.

#### **4.6. Descripción del producto final**

La formulación del producto terminado incluye las características de empaque necesario para la comercialización del mismo. Ya que los productos terminados de este tipo son en polvo fino de 10-100  $\mu\text{m}$ , es necesario hacer la revisión correspondiente del tipo empacado para estos, ya que deben cumplir con inocuidad, sostenibilidad y evitar contaminación con el medio ambiente.

Para el empaque de este tipo de productos es necesario utilizar materiales que conserven y protejan el producto contenido. El sachet y el doy pack son los tipos de empaque más utilizados, debido a su versatilidad y precio, además de ser ideal para productos comercializados en bajas cantidades [92], lo cual para la aplicación en productos probióticos es un factor positivo ya que se empacan en cantidades alrededor de 20 g de producto terminado. Además de ello, estos son herméticos, de modo que no da paso a flujos de aire o líquidos exteriores que perjudiquen las características del producto.

## 5. CONCLUSIONES

Se seleccionó la cepa de *Lactobacillus rhamnosus GG* como el microorganismo con mayor potencial psicobiótico, mediante la evaluación de criterios (Facilidad de obtención, nivel de desarrollo tecnológico, medio de cultivo, pH y temperatura, potencial psicobiótico), en la cual esta cepa presentó los mejores puntajes en estos parámetros en comparación con las demás cepas de microorganismos preseleccionadas.

Se encontró evidencia de la temperatura óptima de crecimiento (40,5°C) para *Lactobacillus rhamnosus GG*, en ensayos realizados desde 21°C a 41°C, notando además que la mayor producción de biomasa se alcanza a las 12h de cultivo.

Fue establecido el caldo MRS como el medio de cultivo más adecuado para el crecimiento de *Lactobacillus rhamnosus GG*, donde cada uno de los componentes del medio de cultivo cumple una función específica para el crecimiento de la cepa, tales como, el suministro y absorción de nutrientes, fuentes de energía y selectividad.

Se determinaron las condiciones para el alistamiento de cada una de las materias primas estableciendo a ATCC como proveedor de la cepa *Lactobacillus rhamnosus GG* y Grupo Didacta como proveedor del caldo MRS, además de describir los criterios de purificación de agua con fines microbiológicos.

Se realizó el diseño conceptual siguiendo la descripción del proceso para lograr hacer el dimensionamiento, estableciendo una capacidad de  $7 \times 10^{13}$  UFC por cada lote.

Se realizó el diagrama PFD del proceso con el cual se pueden identificar las etapas del proceso a escala industrial y las operaciones que se realizan para la fabricación de biomasa de *Lactobacillus rhamnosus GG*.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] M. Del Toro-Barbosa, A. Hurtado-Romero, L. E. Garcia-Amezquita, and T. García-Cayuela, "Psychobiotics: Mechanisms of action, evaluation methods and effectiveness in applications with food products," *Nutrients*, vol. 12, no. 12, pp. 1–31, 2020, doi: 10.3390/nu12123896.
- [2] Mi empresa es saludable, "Probióticos y psicobióticos, un 'segundo cerebro' en perfecto estado," 2021. <https://miempresaessaludable.com/probioticos-psicobioticos/#:~:text=A diferencia de otros probióticos,nivel de estrés y ansiedad.>
- [3] E. M. Montes, "Microbioma, Microbiota y Cáncer," 2018. <https://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/2512-microbioma-microbiota-y-cancer.>
- [4] "Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis | Simply Psychology." <https://www.simplypsychology.org/hypothalamic-pituitary-adrenal-axis.html> (accessed Jun. 07, 2022).
- [5] M. Sochocka, K. Donskow-Łysoniewska, B. S. Diniz, D. Kurpas, E. Brzozowska, and J. Leszek, "The Gut Microbiome Alterations and Inflammation-Driven Pathogenesis of Alzheimer's Disease—a Critical Review," *Mol. Neurobiol.*, vol. 56, no. 3, pp. 1841–1851, Mar. 2019, doi: 10.1007/S12035-018-1188-4/FIGURES/2.
- [6] A. Sarkar, S. M. Lehto, S. Harty, T. G. Dinan, J. F. Cryan, and P. W. J. Burnet, "Psychobiotics and the Manipulation of Bacteria–Gut–Brain Signals," *Trends Neurosci.*, vol. 39, no. 11, p. 763, Nov. 2016, doi: 10.1016/J.TINS.2016.09.002.
- [7] L. Chaparro, "Llegan los psicobióticos," *La ciencia es noticia*, Mar. 2017, <https://www.agenciasinc.es/Reportajes/Llegan-los-psicobioticos> (accessed Jun. 13, 2022).
- [8] Scopus, "Documents by country or territory." [Online]. Available: <https://www-scopus-com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=be512b07707edeaad51639bc464af230&origin=resultslist&src=s&s=TITLE-ABS-KEY%28psychobiotics%29&sort=plf-f&sdt=b&sot=b&sl=28&count=252&analyzeResults=Analyze+results&txGid=1ae28a66819c8a99b4472031c1503081>.
- [9] T. Magrone and E. Jirillo, "Prebiotics and Probiotics in Aging Population: Effects on the Immune-Gut Microbiota Axis," *Mol. Basis Nutr. Aging A Vol. Mol. Nutr. Ser.*, pp. 693–705, Apr. 2016, doi: 10.1016/B978-0-12-801816-3.00049-2.

- [10] “Análisis proteómico de *Bifidobacterium longum* en presencia de fructanos de Agave tequilana como fuente de carbono.” <https://repositorio.ipicyt.edu.mx/handle/11627/198> (accessed Apr. 21, 2022).
- [11] M. I. Pinto-Sanchez *et al.*, “Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome,” *Gastroenterology*, vol. 153, no. 2, pp. 448-459.e8, Aug. 2017, doi: 10.1053/J.GASTRO.2017.05.003.
- [12] M. I. Pinto-Sanchez *et al.*, “Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome,” *Gastroenterology*, vol. 153, no. 2, pp. 448-459.e8, Aug. 2017, doi: 10.1053/J.GASTRO.2017.05.003.
- [13] P. Bercik *et al.*, “The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut–brain communication,” *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 23, no. 12, pp. 1132–1139, Dec. 2011, doi: 10.1111/J.1365-2982.2011.01796.X.
- [14] P. Bercik *et al.*, “The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut–brain communication,” *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 23, no. 12, pp. 1132–1139, Dec. 2011, doi: 10.1111/J.1365-2982.2011.01796.X.
- [15] S. Oh, S. Rheem, J. Sim, S. Kim, and Y. Baek, “Optimizing conditions for the growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 61, no. 11, p. 3809, 1995, doi: 10.1128/AEM.61.11.3809-3814.1995.
- [16] “Producción de proteína y biomasa probiótica de *Lactobacillus casei* liofilizadas a partir de suero de leche de cabra.” [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=s1665-27382009000100007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=s1665-27382009000100007&script=sci_arttext) (accessed Apr. 21, 2022).
- [17] A. Kato-Kataoka *et al.*, “Fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents the onset of physical symptoms in medical students under academic examination stress,” <http://dx.doi.org/10.3920/BM2015.0100>, vol. 7, no. 2, pp. 153–156, Dec. 2015, doi: 10.3920/BM2015.0100.
- [18] A. Kato-Kataoka *et al.*, “Fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota prevents the onset of physical symptoms in medical students under academic examination stress,” <http://dx.doi.org/10.3920/BM2015.0100>, vol. 7, no. 2, pp. 153–156, Dec. 2015, doi: 10.3920/BM2015.0100.

- 10.3920/BM2015.0100.
- [19] “Lactobacillus gasseri: ¿Cuál es el mejor probiótico del 2022? - FITFORBEACH.” <https://www.fitforbeach.mx/lactobacillus-gasseri/> (accessed Apr. 21, 2022).
- [20] H. Jurado-Gómez and C. Fajardo-Argoti, “DETERMINACIÓN DEL EFECTO PROBIÓTICO IN VITRO DE Lactobacillus gasseri SOBRE UNA CEPA DE Staphylococcus epidermidis,” *Biosalud*, vol. 16, no. 2, pp. 53–69, 2017, doi: 10.17151/BIOSA.2017.16.2.6.
- [21] K. Nishida, D. Sawada, T. Kawai, Y. Kuwano, S. Fujiwara, and K. Rokutan, “Para-psycho-biotic Lactobacillus gasseri CP2305 ameliorates stress-related symptoms and sleep quality,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 123, no. 6, pp. 1561–1570, Dec. 2017, doi: 10.1111/JAM.13594.
- [22] K. Nishida, D. Sawada, T. Kawai, Y. Kuwano, S. Fujiwara, and K. Rokutan, “Para-psycho-biotic Lactobacillus gasseri CP2305 ameliorates stress-related symptoms and sleep quality,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 123, no. 6, pp. 1561–1570, Dec. 2017, doi: 10.1111/JAM.13594.
- [23] K. Nishida, D. Sawada, Y. Kuwano, H. Tanaka, and K. Rokutan, “Health Benefits of Lactobacillus gasseri CP2305 Tablets in Young Adults Exposed to Chronic Stress: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study,” *Nutr. 2019, Vol. 11, Page 1859*, vol. 11, no. 8, p. 1859, Aug. 2019, doi: 10.3390/NU11081859.
- [24] H. M. Savignac, B. Kiely, T. G. Dinan, and J. F. Cryan, “Bifidobacteria exert strain-specific effects on stress-related behavior and physiology in BALB/c mice,” *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 26, no. 11, pp. 1615–1627, Nov. 2014, doi: 10.1111/NMO.12427.
- [25] H. M. Savignac, B. Kiely, T. G. Dinan, and J. F. Cryan, “Bifidobacteria exert strain-specific effects on stress-related behavior and physiology in BALB/c mice,” *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 26, no. 11, pp. 1615–1627, Nov. 2014, doi: 10.1111/NMO.12427.
- [26] K. Nishida, D. Sawada, Y. Kuwano, H. Tanaka, and K. Rokutan, “Health Benefits of Lactobacillus gasseri CP2305 Tablets in Young Adults Exposed to Chronic Stress: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study,” *Nutr. 2019, Vol. 11, Page 1859*, vol. 11, no. 8, p. 1859, Aug. 2019, doi: 10.3390/NU11081859.
- [27] L. Mayorga-Reyes, P. Bustamante-Camilo, A. Gutiérrez-Nava, E. Barranco-Florido, and Y. A. Azaola-Espinosa, “CRECIMIENTO, SOBREVIVENCIA Y ADAPTACIÓN DE Bifidobacterium infantis A CONDICIONES ÁCIDAS GROWTH, SURVIVAL AND ADAPTATION OF Bifidobacterium infantis TO ACIDIC CONDITIONS,” *Rev. Mex. Ing. Química*, vol. 8, no. 3, pp. 259–264, 2009.
- [28] “Bifidobacterium infantis | Database.”

- <https://www.optibacprobiotics.com/professionals/probiotics-database/bifidobacterium/bifidobacterium-infantis> (accessed Apr. 17, 2022).
- [29] I. Medina, "Aislamiento, identificación y caracterización de bifidobacterias presentes en heces de lactantes.," p. 87, 2002.
- [30] N. P. Shah, "BACTERIA, BENEFICIAL | Bifidobacterium spp.: Morphology and Physiology," *Encycl. Dairy Sci. Second Ed.*, pp. 381–387, Jan. 2011, doi: 10.1016/B978-0-12-374407-4.00043-1.
- [31] "Bifidobacterium infantis 35624 | Database." <https://www.optibacprobiotics.com/professionals/probiotics-database/bifidobacterium/bifidobacterium-infantis/bifidobacterium-infantis-35624> (accessed Apr. 17, 2022).
- [32] M. W. Griffiths and A. M. Tellez, "Lactobacillus helveticus: The proteolytic system," *Front. Microbiol.*, vol. 4, no. MAR, pp. 1–9, 2013, doi: 10.3389/fmicb.2013.00030.
- [33] L. Slattery, J. O'Callaghan, G. F. Fitzgerald, T. Beresford, and R. P. Ross, "Invited review: Lactobacillus helveticus-A thermophilic dairy starter related to gut bacteria," *J. Dairy Sci.*, vol. 93, no. 10, pp. 4435–4454, Oct. 2010, doi: 10.3168/JDS.2010-3327.
- [34] Britania, "Caldo, MRS," *J. Appl. Bacteriol*, vol. 23, no. 37, pp. 2–3, 2014, [Online]. Available: [http://www.britanialab.com/productos/413\\_hoja\\_tecnica\\_es.pdf](http://www.britanialab.com/productos/413_hoja_tecnica_es.pdf).
- [35] J. Luo, T. Wang, S. Liang, X. Hu, W. Li, and F. Jin, "Ingestion of Lactobacillus strain reduces anxiety and improves cognitive function in the hyperammonemia rat," *Sci. China Life Sci.*, vol. 57, no. 3, pp. 327–335, 2014, doi: 10.1007/s11427-014-4615-4.
- [36] J. Luo, T. Wang, S. Liang, X. Hu, W. Li, and F. Jin, "Ingestion of Lactobacillus strain reduces anxiety and improves cognitive function in the hyperammonemia rat," *Sci. China. Life Sci.*, vol. 57, no. 3, pp. 327–335, 2014, doi: 10.1007/S11427-014-4615-4.
- [37] J. A. Bravo *et al.*, "Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 38, pp. 16050–16055, 2011, doi: 10.1073/pnas.1102999108.
- [38] T. Agurto Saenz and J. Carlos Ramos Gorbeña, "Bacterias Acido lácticas: Biopreservante de los alimentos," *Biotiempo*, vol. 8, pp. 54–64, 2008.
- [39] Z. Matejčková, D. Liptáková, S. Spodniaková, and Ľ. Valík, "Characterization of the growth of

- Lactobacillus plantarum in milk in dependence on temperature ,” *Acta Chim. Slovaca*, vol. 9, no. 2, pp. 104–108, 2016, doi: 10.1515/acs-2016-0018.
- [40] D. C. Aryani, H. M. W. den Besten, and M. H. Zwietering, “Quantifying variability in growth and thermal inactivation kinetics of lactobacillus plantarum,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 82, no. 16, pp. 4896–4908, 2016, doi: 10.1128/AEM.00277-16.
- [41] Y. W. Liu *et al.*, “Psychotropic effects of Lactobacillus plantarum PS128 in early life-stressed and naïve adult mice,” *Brain Res.*, vol. 1631, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1016/j.brainres.2015.11.018.
- [42] Y. W. Liu *et al.*, “Psychotropic effects of Lactobacillus plantarum PS128 in early life-stressed and naïve adult mice,” *Brain Res.*, vol. 1631, pp. 1–12, Jan. 2016, doi: 10.1016/J.BRAINRES.2015.11.018.
- [43] Ľ. Valík and D. M. A. Lipatkova, “Characterization of the growth of Lactobacillus rhamnosus GG,” *J. food Nutr. Res.*, vol. 47, no. 2, pp. 60–67, 2008.
- [44] V. Sanborn, M. A. Azcarate-Peril, J. Updegraff, L. Manderino, and J. Gunstad, “Randomized Clinical Trial Examining the Impact of Lactobacillus rhamnosus GG Probiotic Supplementation on Cognitive Functioning in Middle-aged and Older Adults,” *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, vol. 16, p. 2765, 2020, doi: 10.2147/NDT.S270035.
- [45] J. Arseneault-Bréard *et al.*, “Combination of Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175 reduces post-myocardial infarction depression symptoms and restores intestinal permeability in a rat model,” *Br. J. Nutr.*, vol. 107, no. 12, pp. 1793–1799, 2012, doi: 10.1017/S0007114511005137.
- [46] G. Mohammadi *et al.*, “Probiotic mixture of Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium longum R0175 attenuates hippocampal apoptosis induced by lipopolysaccharide in rats,” *Int. Microbiol.*, vol. 22, no. 3, pp. 317–323, 2019, doi: 10.1007/s10123-018-00051-3.
- [47] A. Ait-Belgnaoui *et al.*, “Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice,” *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 26, no. 4, pp. 510–520, Apr. 2014, doi: 10.1111/NMO.12295.
- [48] S. Misra and D. Mohanty, “Psychobiotics: A new approach for treating mental illness?,” <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1399860>, vol. 59, no. 8, pp. 1230–1236, Apr. 2017, doi: 10.1080/10408398.2017.1399860.
- [49] A. Ait-Belgnaoui *et al.*, “Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice,” *Neurogastroenterol. Motil.*, vol. 26, no. 4, pp. 510–520,

- 2014, doi: 10.1111/NMO.12295.
- [50] R. A. Yunes *et al.*, “A Multi-strain Potential Probiotic Formulation of GABA-Producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with Antidepressant Effects,” *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol. 12, no. 3, pp. 973–979, 2020, doi: 10.1007/s12602-019-09601-1.
- [51] R. A. Yunes *et al.*, “A Multi-strain Potential Probiotic Formulation of GABA-Producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with Antidepressant Effects,” *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol. 12, no. 3, pp. 973–979, Sep. 2020, doi: 10.1007/S12602-019-09601-1.
- [52] P. Tian, G. Wang, J. Zhao, H. Zhang, and W. Chen, “*Bifidobacterium* with the role of 5-hydroxytryptophan synthesis regulation alleviates the symptom of depression and related microbiota dysbiosis,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 66, pp. 43–51, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.JNUTBIO.2019.01.007.
- [53] P. Tian, G. Wang, J. Zhao, H. Zhang, and W. Chen, “*Bifidobacterium* with the role of 5-hydroxytryptophan synthesis regulation alleviates the symptom of depression and related microbiota dysbiosis,” *J. Nutr. Biochem.*, vol. 66, pp. 43–51, Apr. 2019, doi: 10.1016/J.JNUTBIO.2019.01.007.
- [54] P. Trzeciak and M. Herbet, “Role of the Intestinal Microbiome, Intestinal Barrier and Psychobiotics in Depression,” *Nutr. 2021, Vol. 13, Page 927*, vol. 13, no. 3, p. 927, Mar. 2021, doi: 10.3390/NU13030927.
- [55] O. li and F. Alfaro-, “Matriz de Decisiones ¿Qué es?,” [Online]. Available: [http://fcaenlinea1.unam.mx/anexos/1624/1624\\_u9\\_Matriz\\_de\\_decisiones.pdf](http://fcaenlinea1.unam.mx/anexos/1624/1624_u9_Matriz_de_decisiones.pdf).
- [56] “*Lactobacillus rhamnosus* GG Información Española De la Droga.” [https://www.drugs.com/mtm\\_esp/lactobacillus-rhamnosus-gg.html](https://www.drugs.com/mtm_esp/lactobacillus-rhamnosus-gg.html) (accessed Apr. 17, 2022).
- [57] S. Sharafi and L. Nateghi, “Optimization of gamma-aminobutyric acid production by probiotic bacteria through response surface methodology,” *Iran. J. Microbiol.*, vol. 12, no. 6, pp. 584–591, 2020, doi: 10.18502/ijm.v12i6.5033.
- [58] D. A. Ratkowsky, R. K. Lowry, T. A. McMeekin, A. N. Stokes, and R. E. Chandler, “Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range.,” *J. Bacteriol.*, vol. 154, no. 3, p. 1222, 1983, doi: 10.1128/JB.154.3.1222-1226.1983.
- [59] K. Fenster, B. Freeburg, C. Hollard, C. Wong, R. R. Laursen, and A. C. Ouwehand, “The



- production and delivery of probiotics: A review of a practical approach," *Microorganisms*, vol. 7, no. 3, pp. 1–17, 2019, doi: 10.3390/microorganisms7030083.
- [60] M. Anandharaj, R. P. Rani, and M. R. Swain, *Production of High-Quality Probiotics by Fermentation*, no. November. 2017.
- [61] K. Fenster, B. Freeburg, C. Hollard, C. Wong, R. R. Laursen, and A. C. Ouwehand, "The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach," *Microorg.* 2019, Vol. 7, Page 83, vol. 7, no. 3, p. 83, Mar. 2019, doi: 10.3390/MICROORGANISMS7030083.
- [62] "de man, rogosa and sharpe (MRS) agar," *Prog. Ind. Microbiol.*, vol. 37, no. C, pp. 511–513, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0079-6352(03)80066-8.
- [63] C. G. Vinderola, P. Mocchiutti, and J. A. Reinheimer, "Interactions Among Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria Used for Fermented Dairy Products," *J. Dairy Sci.*, vol. 85, no. 4, pp. 721–729, Apr. 2002, doi: 10.3168/JDS.S0022-0302(02)74129-5.
- [64] K. Taniguchi, T. Urasawa, Y. Morita, H. B. Greenberg, and S. Urasawa, "Direct serotyping of human rotavirus in stools by an enzyme-linked immunosorbent assay using serotype 1-, 2-, 3-, and 4-specific monoclonal antibodies to VP7," *J. Infect. Dis.*, vol. 155, no. 6, pp. 1159–1166, 1987, doi: 10.1093/INFDIS/155.6.1159.
- [65] "Production of concentrated bifidobacterium bifidum." <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301753080> (accessed Mar. 21, 2022).
- [66] C. Lacroix and S. Yildirim, "Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 18, no. 2, pp. 176–183, 2007, doi: 10.1016/j.copbio.2007.02.002.
- [67] T. B. Kim, S. H. Song, S. C. Kang, and D. K. Oh, "Quantitative comparison of lactose and glucose utilization in *Bifidobacterium longum* cultures," *Biotechnol. Prog.*, vol. 19, no. 2, pp. 672–675, Mar. 2003, doi: 10.1021/BP0257426.
- [68] C. Desmond, G. F. Fitzgerald, C. Stanton, and R. P. Ross, "Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 10, pp. 5929–5936, 2004, doi: 10.1128/AEM.70.10.5929-5936.2004.
- [69] F. Shahidi and X. Q. Han, "Encapsulation of food ingredients," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 33, no. 6, pp. 501–547, Jan. 1993, doi: 10.1080/10408399309527645.

- [70] W. Krasaekoopt, B. Bhandari, and H. Deeth, "Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt," *Int. Dairy J.*, vol. 13, no. 1, pp. 3–13, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0958-6946(02)00155-3.
- [71] E. Paul, J. Fages, P. Blanc, G. Goma, and A. Pareilleux, "Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 40, no. 1, pp. 34–39, Oct. 1993, doi: 10.1007/BF00170425.
- [72] X. C. Meng, C. Stanton, G. F. Fitzgerald, C. Daly, and R. P. Ross, "Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures," *Food Chem.*, vol. 106, no. 4 SPEC. ISS., pp. 1406–1416, Feb. 2008, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2007.04.076.
- [73] C. Santivarangkna, U. Kulozik, and P. Foerst, "Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures," *Biotechnol. Prog.*, vol. 23, no. 2, pp. 302–315, Mar. 2007, doi: 10.1021/BP060268F.
- [74] R. Barrangou *et al.*, "Comparison of the complete genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and BI-04," *J. Bacteriol.*, vol. 191, no. 13, pp. 4144–4151, 2009, doi: 10.1128/JB.00155-09.
- [75] M. Georgieva, L. Andonova, L. Peikova, and A. Zlatkov, "Probiotics - Health benefits, classification, quality assurance and quality control - Review," *Pharmacia*, vol. 61, no. 4, pp. 22–31, 2014.
- [76] T. Mattila-Sandholm, P. Myllärinen, R. Crittenden, G. Mogensen, R. Fondén, and M. Saarela, "Technological challenges for future probiotic foods," *Int. Dairy J.*, vol. 12, no. 2–3, pp. 173–182, Jan. 2002, doi: 10.1016/S0958-6946(01)00099-1.
- [77] "Korbekandi: Technology and stability of probiotic... - Google Académico." [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Technology and stability of probiotic in fermented milks&author=H. Korbekandi&publication\\_year=2011&pages=131-169](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Technology+and+stability+of+probiotic+in+fermented+milks&author=H.+Korbekandi&publication_year=2011&pages=131-169) (accessed Mar. 21, 2022).
- [78] R. Mohammadi, A. M. Mortazavian, R. Khosrokhavar, and A. G. Da Cruz, "Probiotic ice cream: viability of probiotic bacteria and sensory properties," *Ann. Microbiol. 2011 613*, vol. 61, no. 3, pp. 411–424, Jan. 2011, doi: 10.1007/S13213-010-0188-Z.
- [79] B. Yoo and C. M. Lee, "Thermoprotective effect of sorbitol on proteins during dehydration," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 41, no. 2, pp. 190–192, 2002, doi: 10.1021/JF00026A008.
- [80] "Handbook of Probiotics and Prebiotics - Yuan Kun Lee, Seppo Salminen - Google Libros."

[https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=ohZtUQZ4uHwC&oi=fnd&pg=PR5&ots=alVAb4hmN-&sig=t\\_RIGZ9wynhO\\_la2BfmK4Qrgy9s&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=ohZtUQZ4uHwC&oi=fnd&pg=PR5&ots=alVAb4hmN-&sig=t_RIGZ9wynhO_la2BfmK4Qrgy9s&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)  
(accessed Mar. 21, 2022).

- [81] M. K. Tripathi and S. K. Giri, "Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage," *J. Funct. Foods*, vol. 9, no. 1, pp. 225–241, 2014, doi: 10.1016/J.JFF.2014.04.030.
- [82] K. Önnéby, L. Pizzul, J. Bjerketorp, D. Mahlin, S. Håkansson, and P. Wessman, "Effects of di- and polysaccharide formulations and storage conditions on survival of freeze-dried *Sphingobium* sp.," *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2013 298, vol. 29, no. 8, pp. 1399–1408, Mar. 2013, doi: 10.1007/S11274-013-1303-7.
- [83] G. Zayed and Y. H. Roos, "Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage," *Process Biochem.*, vol. 39, no. 9, pp. 1081–1086, May 2004, doi: 10.1016/S0032-9592(03)00222-X.
- [84] A. M. Mortazavian, M. R. Ehsani, S. M. Mousavi, K. Rezaei, S. Sohrabvandi, and J. A. Reinheimer, "Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic micro-organisms in yogurt," *Int. J. Dairy Technol.*, vol. 60, no. 2, pp. 123–127, May 2007, doi: 10.1111/J.1471-0307.2007.00306.X.
- [85] T. D. Boylston, C. G. Vinderola, H. B. Ghoddusi, and J. A. Reinheimer, "Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards," *Int. Dairy J.*, vol. 14, no. 5, pp. 375–387, May 2004, doi: 10.1016/J.IDAIRYJ.2003.08.008.
- [86] C. Dunne *et al.*, "In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 73, no. 2, pp. 386s-392s, Feb. 2001, doi: 10.1093/AJCN/73.2.386S.
- [87] H. C. Hsiao, W. C. Lian, and C. C. Chou, "Effect of packaging conditions and temperature on viability of microencapsulated bifidobacteria during storage," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 84, no. 2, pp. 134–139, Jan. 2004, doi: 10.1002/JSFA.1616.
- [88] "Prueba de caldo MRS: principio, procedimiento y resultados -." <https://microbiio.info/prueba-de-caldo-mrs/> (accessed Jun. 07, 2022).
- [89] "¿Conoce la calidad de agua necesaria para sus análisis microbiológicos? - IAlimentos." <https://www.revistaialimentos.com/blog/merck/conoce-la-calidad-de-agua-necesaria-para-sus-analisis-microbiologicos/> (accessed Jun. 04, 2022).
- [90] A. M. CHAUX, L. M. JIMENEZ, K. MOTATO, and G. HERNANDEZ, "Secado Por Aspersión Y Su

Efecto Sobre La Viabilidad De Los Microorganismos Presentes En Suero Fermentado Con Gránulos De Kefir.,” pp. 3621–3627, 2015, doi: 10.5151/chemeng-cobeq2014-0503-25202-150191.

- [91] M. Y. Vera Peña, M. Cortés Rodríguez, and F. E. Valencia-García, “Secado por atomización de bacterias ácido lácticas: una revisión,” *Ing. y Cienc.*, vol. 15, no. 29, pp. 179–213, 2019, doi: 10.17230/ingciencia.15.29.7.
- [92] “⇒ El sachet y sus características | Envasados a Terceros.” <https://www.envasados.es/el-sachet-y-sus-caracteristicas/> (accessed Jun. 07, 2022).

## **ANEXOS**

## ANEXO 1.

### DIAGRAMA DE FLUJO DE PROCESO (PFD) DE LA PRODUCCIÓN DE LA BIOMASA DE *Lactobacillus Rhamnosus GG*.

