



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**PRODUCTO FORTIFICADO CON PREBIÓTICOS
Y BACTERIAS LÁCTICAS VIVAS
DESHIDRATADAS CON ANTAGONISMO
CONTRA MICROORGANISMOS PATÓGENOS
GASTROINTESTINALES**

JULIO ALBERTO COLORADO CAMPOS

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2022

La presente Tesis, titulada: **“PRODUCTO FORTIFICADO CON PREBIÓTICOS Y BACTERIAS LÁCTICAS VIVAS DESHIDRATADAS CON ANTAGONISMO CONTRA MICROORGANISMOS PATÓGENOS GASTROINTESTINALES”** realizada por el alumno: **Julio Alberto Colorado Campos**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. ADOLFO BUCIO GALINDO

ASESOR:



DR. JESÚS ALBERTO RAMOS JUÁREZ

ASESOR:



DR. PEDRO GARCÍA ALAMILLA

H. Cárdenas, Tabasco, México, diciembre de 2022

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR
Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Julio Alberto Colorado Campos alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Adolfo Bucio Galindo, por lo que otorgó los derechos de autor de mi tesis Producto fortificado con prebióticos y bacterias lácticas vivas deshidratadas con antagonismo contra microorganismos patógenos gastrointestinales y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

H. Cárdenas, Tabasco, diciembre de 2022.



Estudiante
Julio Alberto Colorado Campos



Vo. Bo. de Profesor consejero
Dr. Adolfo Bucio Galindo

PRODUCTO FORTIFICADO CON PREBIÓTICOS Y BACTERIAS LÁCTICAS VIVAS DESHIDRATADAS CON ANTAGONISMO CONTRA MICROORGANISMOS PATÓGENOS GASTROINTESTINALES

Julio Alberto Colorado Campos, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

Muchas bacterias ácido lácticas son utilizados como tratamientos alternativos por sus propiedades antimicrobianas contra patógenos causantes de diarreas. Para tratar las diarreas también se utiliza el plátano verde. Este estudio se realizó para utilizar los dos ingredientes juntos.

El propósito de la investigación fue describir los procedimientos para la obtención de un producto con bacterias lácticas vivas deshidratadas, con efecto antagónico contra *E. coli* y sea compatible con la harina de plátano verde.

Se elaboro yogurt con bacterias lácticas comerciales. Posteriormente se centrifugó a 6,000 rpm/15min/4°C. Con el precipitado, se establecieron 6 tratamientos: 1) Sin aditivo (SN), 2) Glicerol, 3) Carbonato de Calcio, 4) Extracto de Levadura, 5) Glicerol y Carbonato de Calcio, 6) Glicerol, Carbonato de Calcio y Extracto de levadura. Los tratamientos se deshidrataron en desecadores en condiciones de vacío y se usaron como inóculos para elaborar yogurt. Se registró el cambio de pH durante la fermentación y se hizo una modelacion. También se hizo una evaluación del yogurt con Espectroscopia del Infrarrojo por Transformada de Fourier. Se hicieron pruebas de antagonismo de bacterias lácticas contra *E. coli* mediante el agar spot test.

La reducción de pH fue una función sigmoideal de Boltzmann con diferentes velocidades de fermentación de los tratamientos. Los cultivos deshidratados con el Extracto de Levadura y Carbonato de Calcio tienen una mayor actividad de fermentación de la leche ($p \leq 0.05$). Los yogurts manufacturados con cultivos frescos tardan de 4 h en fermentar. Los espectros de infrarrojo mostraron que la calidad de los yogurts con cepas frescas o secas son similares. Las bacterias lácticas fueron antagónicas contra *E. coli*, pero las bacterias del yogurt no crecieron en los medios de cultivo.

Palabras claves: *Lactobacillus*, antagonismo, patógeno, secado

**PRODUCT FORTIFIED WITH PREBIOTICS AND LIVE LACTIC ACID BACTERIA
DEHYDRATED WITH ANTAGONISM AGAINST GASTROINTESTINAL
PATHOGENIC MICROORGANISMS**

Julio Alberto Colorado Campos, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2022

ABSTRACT

Many lactic acid bacteria are used as alternative treatments for their antimicrobial properties against diarrhea-causing pathogens. Green plantains are also used to treat diarrhea. This study was conducted to use the two ingredients together.

The purpose of the research was to describe the procedures for obtaining a product with live dehydrated lactic acid bacteria, with an antagonistic effect against *E. coli* and compatible with green plantain flour.

Yogurt was made with commercial lactic acid bacteria. Subsequently, it was centrifuged at 6,000 rpm/15min/4°C. With the precipitate, 6 treatments were established: 1) Without additive (SN), 2) Glycerol, 3) Calcium Carbonate, 4) Yeast Extract, 5) Glycerol and Calcium Carbonate, 6) Glycerol, Calcium Carbonate and Extract of yeast. The treatments were dehydrated in desiccators under vacuum conditions and used as inocula to make yogurt. The change in pH during fermentation was recorded and a modeling was made. An evaluation of the yogurt was also made with Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Tests for antagonism of lactic acid bacteria against *E. coli* were performed using the agar spot test.

The pH reduction was a Boltzmann sigmoidal function with different fermentation rates of the treatments. Dehydrated cultures with Yeast Extract and Calcium Carbonate have a higher milk fermentation activity ($p \leq 0.05$). Yogurts made with fresh cultures take 4 hours to ferment. Infrared spectra showed that the quality of yogurts with fresh or dry strains are similar. Lactic acid bacteria were antagonistic against *E. coli*, but yogurt bacteria did not grow in the culture media.

Keywords: *Lactobacillus*, antagonism, pathogen, drying

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores de tesis.

Por su tiempo y dedicación en asesorar la tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Por la beca otorgada para la realización y culminación de los trabajos, experimentos, escritos y trámites inherentes a la Maestría en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados (COLPOS) Campus-Tabasco.

Por todo lo aprendido, por todos los apoyos brindados a lo largo de este tiempo.

DEDICATORIA

A mi esposa

Gracias a mi esposa, por brindarme su apoyo incondicional durante todo el desarrollo para obtener este grado académico y la realización de este proyecto.

A mis padres

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de los logros se los debo a ustedes, en los que incluyo este.

Al resto de mi familia

Por estar presentes en la evolución y posterior desarrollo total de mi tesis, les agradezco con creces. Los quiero.

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
III. JUSTIFICACIÓN	3
IV. OBJETIVOS	4
Objetivo general	4
Objetivos específicos.....	4
V. HIPÓTESIS	4
Hipótesis general.....	4
VI. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Diarreas 5	
Medicinas antidiarreicas.....	5
Fármacos	5
Coadyuvantes antidiarreicos en productos naturales	8
VII. Resumen de investigaciones relevantes relacionadas con el problema.....	9
Bacterias ácido lácticas	9
Probióticos.....	9
Efecto de Probióticos en diarreas	10
Plátano verde y diarreas	11
Deshidratación de bacterias lácticas.....	11
Uso de sustratos para deshidratación	12
Antagonismo contra patógenos	13
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	13
Preparación de yogurt.....	13
Tratamientos y diseño experimental	14
Modelación y análisis de resultados.....	15
Huella espectral	16
Estudio de antagonismo	17
Evaluación de actividad inhibitoria de la harina de plátano verde hacia bacterias	17

IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
	Deshidratación de las bacterias ácido lácticas del yogurt a peso constante.	18
	Modelación de la cinética de fermentación para comparar el efecto de los diferentes aditivos en la deshidratación de las bacterias lácticas modelo.	19
	Comparación de las características espectrales del yogurt producido entre el cultivo deshidratado con el no deshidratado mediante el uso de la técnica FTIR.	21
	Actividad inhibitoria de diferentes cepas de bacterias lácticas contra <i>E. coli</i>	22
	Reducción de pH de bacterias en presencia de harina de plátano verde	23
X.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	24
	Conclusiones	24
XI.	BIBLIOGRAFÍA	26

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Representación esquemática de intestino y la acción de medicamentos para reducir la frecuencia de evacuaciones. Modificado de Ang, 1994.	6
Cuadro 2.	Representación esquemática de agua de heces y sustancias o alimentos que absorben agua para mejorar la consistencia de heces. Modificado de Ang, 1994.	7
Cuadro 3.	Medicamentos para reducir la población de agentes infecciosos que ocasionan diarreas.....	8
Cuadro 4.	Prueba de medias de los Parámetros de la función de Boltzman de las cinéticas de reducción de pH	19
Cuadro 5.	Halos de inhibición de las bacterias lácticas contra <i>E. coli</i>	22
Cuadro 6.	Fermentación de leche con harina de plátano con bacterias del yogurt y <i>E. Coli</i>	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama simplificado de flujo del experimento y aditivos usados en el experimento	15
Figura 2.	Función de Boltzman.....	16
Figura 3.	Evaluación de la actividad inhibitoria de las bacteria lacticas	17
Figura 4.	Etapas de remoción de agua del yogurt.....	18
Figura 5.	Curva de reducción de pH del yogurt inoculado con a) yogurt liofilizado y b) con yogurt deshidratado usando como aditivo al extracto de levadura.	20
Figura 6.	Espectros FT-IR de muestras de yogurt fabricado con inóculo de yogurt fresco (A) y deshidratado (B).....	21
Figura 7.	Evaluación de la acción inhibitoria de q6c7 en MRS modificado con varios porcentajes de glucosa hacia <i>Escherichia coli</i> : a) q6c7 al fondo con MRS 0.2% de glucosa y <i>E. coli</i> en superficie; b) q6c7 en MRS 0.2% de glucosa con verde bromocresol y <i>E. coli</i>	23

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los animales son particularmente vulnerables a las infecciones microbianas intestinales en los primeros meses de vida, debido a que sus mecanismos de defensa están poco desarrollados. Al nacer, adquieren mecanismos de defensa transferidos por la madre a través del calostro; y también, por parte de la microbiota benéfica circundante. Pero conforme van creciendo, tienen que generar nuevos mecanismos de defensa, particularmente después del destete, que es cuando los animales dejan de ser amamantados por su madre y se presentan las enfermedades intestinales como las diarreas infecciosas. Varios factores pueden causar alta incidencia de esas enfermedades. Una es la restricción total o parcial para succionar leche de sus madres, restringiendo la adquisición de agentes de inmunidad y de la biota protectora de su mamá (Timmerman *et al.*, 2005). Aunado a lo anterior, están los cambios dietarios de alimentos líquidos a sólidos, y la exposición a patógenos de las heces y del ambiente (Maldonado *et al.*, 2018). Así, la biota protectora como lactobacilos disminuye, y existen daños al epitelio que alteran la función intestinal llevando a diarreas causadas por bacterias como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* tipo C, *Staphylococcus aureus* (Mukhtar *et al.*, 2015), que también prevalecen en varias regiones de México durante el primer mes de vida de terneros (Delgado-González *et al.*, 2016).

Comúnmente, las diarreas son tratadas con antibióticos, pero generalmente son muy costosos, y en ocasiones son usados sin prescripción médica, contribuyendo esta práctica a la resistencia de las bacterias patógenas hacia los antibióticos utilizados (Long *et al.*, 2019).

Existen varias alternativas para prevenir o tratar a las diarreas, entre estas las buenas prácticas de higiene y bienestar animal; además los probióticos, prebióticos, y la herbolaria (Cabrera *et al.*, 2005).

Los probióticos son preparaciones de microorganismos vivos que confieren beneficios al hospedero al balancear la composición de la biota intestinal (FAO/World Health Organization 2002). Los probióticos generalmente son capaces de inhibir a las especies como *S. aureus*, *Enterococcus* spp, *Listeria* y *Salmonella* encontrados en el intestino de los animales (Oliveira y González-Molero, 2016).

Los prebióticos son productos alimenticios que no se digieren ni se absorben en el estómago y el intestino delgado. Sin embargo, pueden ser fermentados por el microbiota intestinal comensal

beneficiosa en el colon, que se fermenta a butirato y ácidos grasos de cadena corta que estimulan la producción de mucus, que fortalece la mucosa intestinal, mejorando la salud del huésped; alguno de ellos son la inulina, fructo-oligosacárido, galacto-oligosacáridos y lactulosa (De Vasconcelos *et al.*, 2016) y también el almidón resistente del plátano verde (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011).

Los probióticos pueden suministrarse deshidratados, pues es más fácil su conservación en refrigeración, por el poco volumen que tienen.

Uno de los inconvenientes de cualquier deshidratación es que inducen estrés osmótico en las bacterias, lo que disminuye considerablemente su viabilidad. Una de las estrategias empleadas para mejorar la viabilidad bacteriana en los métodos de secado, es la adición de agentes protectores (Broeckx *et al.*, 2016), pudiendo así mantenerse durante largo plazo (Prasad *et al.*, 2003). Estos solutos pueden acumularse a altos niveles sin interferir con los procesos celulares. Muchos solutos compatibles han demostrado efectividad estabilizando enzimas, dando protección en condiciones de concentraciones altas de sal, de igual manera resultan favorables contra altas temperaturas, congelación o descongelación y finalmente en los procesos antes mencionados de secado (Poolman y Glaasker 1998).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es necesario generar alternativas naturales para tratar diversos padecimientos de salud animal causadas por bacterias de tipo infeccioso. Comúnmente, las diarreas son tratadas con antibióticos, pero esto tiene varios inconvenientes; entre estas está que su uso frecuente puede causar resistencia de las bacterias patógenas hacia los antibióticos utilizados, lo que puede resultar perjudicial en nuestro entorno (Long *et al.*, 2019). Además, no se pueden usar dentro de los sistemas de producción orgánicos (Smulski *et al.*, 2020).

Las bacterias lácticas y probióticos pueden ser utilizadas para tratar problemas de diarrea infecciosa en ternero y con esto disminuir la incidencia de esta enfermedad (FAO/World Health Organization, 2002). Se deben hacer estudios prospectivos *in vitro* de la actividad antimicrobiana de bacterias probióticas. También debe plantearse la posibilidad de sumar la actividad terapéutica de varios agentes como probióticos y/o prebióticos para mejorar la salud intestinal de los animales. Un método de aplicación de estas preparaciones es la deshidratación, pues permite su conservación

en menos espacio que las preparaciones frescas; pero deben hacerse estudios prospectivos de su efectividad,

III. JUSTIFICACIÓN

Existen varios compuestos naturales que se encuentran en la localidad que tienen propiedades antimicrobianas, por lo que es necesario estudiarlos (Smulski *et. al.*; 2020). Tal es el caso del plátano verde, que tiene una respuesta favorable para el tratamiento de la diarrea en humanos. En muchas comunidades, el plátano verde se usa como tratamiento de diversos trastornos intestinales incluyendo a la diarrea. El fruto es rico en almidones resistentes a la amilasa, existen reportes que indican que es útil en el tratamiento de la diarrea persistente en niños (Rabbani *et al.*, 2001).

En relación con los probióticos, una forma de adicionarlos al alimento de animales es deshidrarlos. Uno de los inconvenientes de cualquier deshidratación es que inducen estrés osmótico en las bacterias, lo que disminuye considerablemente su viabilidad. La viabilidad bacteriana en los métodos de secado se mejora con la adición de agentes protectores (Broeckx *et al.*, 2016), pudiendo así mantenerse durante largo plazo. La acumulación de solutos compatibles como betaína, carnitina, ectoínas, sacarosa y trehalosa brindan protección para el caso del estrés osmótico, haciendo más resistentes a las bacterias en estas condiciones (Prasad *et al.*, 2003). Estos solutos pueden acumularse a altos niveles sin interferir con los procesos celulares. Muchos solutos compatibles han demostrado efectividad estabilizando enzimas, dando protección en condiciones de concentraciones altas de sal, de igual manera resultan favorables contra altas temperaturas, congelación o descongelación y finalmente en los procesos antes mencionados de secado (Poolman y Glaasker, 1998).

Es importante formular un alimento que tenga bacterias vivas deshidratadas, que sean inocuas, que tengan efecto antagonista contra patógenos, que puedan estar junto a alimentos tipo prebióticos como plátano verde.

Con el fin de obtener un producto derivado de la región fortificado con bacterias lácticas, el cual pueda ser utilizado para tratar problemas de diarrea infecciosa en ternero y con esto disminuir la incidencia de esta enfermedad, mismo que ayudará a reducir la mortalidad de estos animales.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

- Describir los procedimientos para la obtención de un ingrediente alimenticio a base de bacterias lácticas vivas deshidratadas, que tengan efecto antagónico contra *E.coli* y que sea compatible con la harina plátano verde (prebiótico antidiarreico).

Objetivos específicos

1. Determinar las condiciones para deshidratar las bacterias ácido lácticas de yogurt como sistema modelo con el uso de aditivos.
2. Hacer un estudio de actividad fermentativa de las cepas deshidratadas con aditivos inoculadas en leche para la elaboración de yogurt.
3. Hacer una modelación de la cinética de fermentación para comparar el efecto de los diferentes aditivos en la deshidratación de las bacterias lácticas modelo.
4. Comparar las características espectrales del yogurt producido entre el cultivo deshidratado con el no deshidratado mediante el uso de la técnica FTIR.
5. Evaluar actividad inhibitoria de diferentes cepas de bacterias lácticas contra *E. coli*.
6. Determinar si existe actividad inhibitoria de la harina de plátano verde contra *E.coli* y bacterias ácido lácticas observando la cinética de fermentación.

V. HIPÓTESIS

Hipótesis general

Es posible desarrollar un producto que contenga bacterias lácticas deshidratadas que preserven su actividad fermentativa para que una vez inoculadas reduzcan el pH de los productos fermentados; además, las bacterias lácticas pueden tener efectos antagónicos contra *E. coli* y pueden ser resistentes a los componentes del plátano verde, que se usan como antidiarreicos.

VI. REVISIÓN DE LITERATURA

Diarreas

La diarrea se caracteriza por un aumento en el contenido de agua de las heces, y una disminución en su consistencia. También aumenta la frecuencia de los movimientos intestinales (peristalsis) y un aumento en el número de evacuaciones. En la diarrea se presenta una mala absorción del agua y hay pérdida de electrolitos (sodio, cloruro, potasio y bicarbonato) en las heces líquidas (Kiers, 2001). La deshidratación ocurre cuando estas pérdidas no se reemplazan adecuadamente y se desarrolla un déficit de agua y de los siguientes electrolitos: sodio, potasio y cloruro corporal. Por lo general, una diarrea desaparece rápidamente sin tratamiento médico.

En algunos casos, la diarrea protege al organismo de la presencia de sustancias o bacterias nocivas presentes en el intestino, acelerando su eliminación. Sin embargo, también puede ser un efecto colateral de algún medicamento; la ansiedad también provoca diarrea. En la ganadería, frecuentemente se debe a la exposición a patógenos, tipo de manejo que se aplica, condiciones ambientales, estado nutricional e inmunológico (Adab *et al.*, 2020). Es una de las enfermedades más graves que padecen los terneros, causa importantes pérdidas económicas debido a la mortalidad, el escaso crecimiento y los costos del tratamiento (Uhde *et al.*, 2008).

Algunas de las recomendaciones preventivas para reducir la incidencia de diarreas son: amamantamiento de neonatos, pues a través de la madre llegan los nutrientes y los agentes inmunológicos que necesita el becerro que son especialmente importantes cuando el becerro está recién nacido. También es importante que haya una buena limpieza de instalaciones donde nace y vive el becerro, con acceso a agua y alimentos de buena calidad.

Medicinas antidiarreicas

Comúnmente, las diarreas son tratadas con medicamentos y sustancias que tienen diferentes mecanismos de acción: narcóticos, agentes formadores de volumen, y antibióticos. Las soluciones de electrolitos se utilizan para restaurar agua y los electrolitos perdidos durante las diarreas (Ang, 1994).

Fármacos

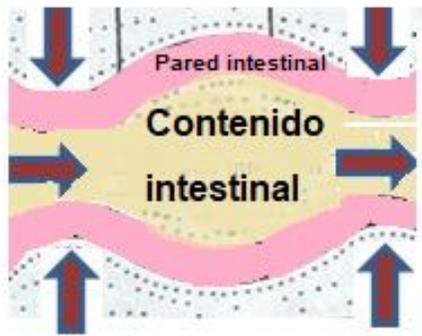
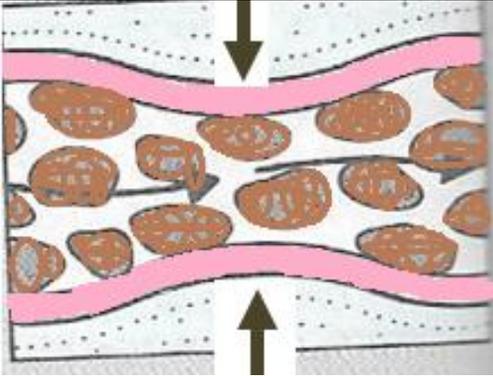
Existen medicamentos que deprimen el sistema nervioso autónomo para que se reduzca la peristalsis, que es la contracción muscular que se dan en el intestino delgado para el paso de los

alimentos digeridos (Ang, 1994). Generalmente estos medicamentos se recetan para aliviar la diarrea cuando se tiene la certeza de que ésta no es infecciosa ni tóxica (Ang, 1994) y por un periodo corto, de máximo 36 h (Cuadro 1).

Otros medicamentos son los agentes formadores de volumen, que consisten en sustancias que absorben agua, p. ej almidón, caopectate, caolín y metilcelulosa (Cuadro 2).

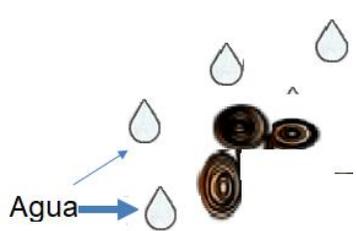
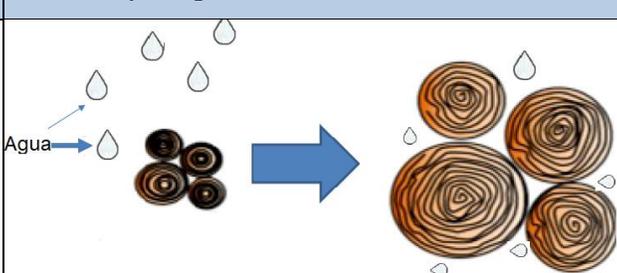
Hay otros medicamentos que sirven para reducir infección, como los antibióticos, que se usan dependiendo del organismo infeccioso y que se usa con prescripción médica (Cuadro 3).

Cuadro 1. Representación esquemática de intestino y la acción de medicamentos para reducir la frecuencia de evacuaciones. Modificado de Ang, 1994.

Medicamento para reducir motilidad intestinal que causa diarrea	
Situación antes del medicamento	Cambios con el medicamento
 <p>Antes del medicamento</p> <p>Ante la necesidad de eliminación del patógeno, el organismo del animal enfermo aumenta la peristalsis (motilidad intestinal) para hacer una contracción rápida, y así rápidamente expulsar al agente nocivo. La diarrea es acuosa y frecuente. La peristalsis es controlada por el sistema nervioso autónomo. Se han desarrollado medicamentos para reducir la intensidad</p>	 <p>Después del medicamento</p> <p>La loperamida y salicilato de bismuto deprimen el sistema nervioso autónomo para disminuir la actividad de propulsión de los músculos que efectúan la peristalsis intestinal. Así, la materia fecal pasa más despacio y esto permite también más tiempo para la absorción de agua. Se reduce la transmisión de señales a las fibras de músculo liso del intestino y de esa manera disminuyen las contracciones de estas. Algunos piensan que esto permite que se absorba más agua y que por lo tanto las heces se hagan</p>

de la señal del sistema nervioso para generar la peristalsis.	menos acuosas. Además, tienen suficiente evidencia de eficacia y seguridad.
---	---

Cuadro 2. Representación esquemática de agua de heces y sustancias o alimentos que absorben agua para mejorar la consistencia de heces. Modificado de Ang, 1994.

Medicamento para reducir agua en las evacuaciones	
Antes del Medicamento	Durante y después del medicamento
 <p>Diarrea acuosa</p> <p>Disminución de la consistencia de las heces y aumento en el número de evacuaciones como consecuencia de una mala absorción del agua y electrolitos, así como los daños en el epitelio intestinal causados por la infección.es y sustancias tóxicas junto con el agua.</p>	 <p>Gránulos de almidón nativo Almidón hidratado</p> <p>Agentes formadores de volumen</p> <p>El medicamento contiene partículas que aumentan de tamaño cuando absorben agua. Esto hace que los movimientos intestinales sean más firmes y que las heces estén menos acuosas. Se piensa que estos agentes pueden absorber sustancias irritantes y sustancias tóxicas junto con el agua.</p>

Cuadro 3. Medicamentos para reducir la población de agentes infecciosos que ocasionan diarreas

Medicamentos para reducir infección	
Antes del Medicamento	Durante y después del medicamento
Las infecciones agudas pueden hacer que la diarrea sea continua y que tenga otros signos clínicos como fiebre alta (39 °C o más) o vomito. Los pacientes deben recibir tratamiento de inmediato para bajar la infección con los antibióticos apropiados.	<u>Antibióticos</u> para casos con deshidratación severa, los antibióticos apropiados pueden acortar la duración de la enfermedad. Los niños con fiebre alta (39 °C o más) deben recibir tratamiento de inmediato para bajar la temperatura. esto se lleva mejor a cabo con el tratamiento de cualquier infección con los antibióticos apropiados.

Coadyuvantes antidiarreicos en productos naturales

Un buen número de estudios clínicos han demostrado la utilidad de varios probióticos en la prevención y tratamiento de infecciones gastrointestinales (Gómez *et al.*, 2011). Las especies más estudiadas en este sentido son: *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. plantarum*. Estas bacterias, productoras de ácido láctico crean un ambiente hostil con la producción de este ácido y su consecuente reducción del pH y la secreción de ciertas bacteriocinas que inhiben el crecimiento de algunas bacterias patógena como son *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella sonnei* (Gómez *et al.*, 2011). Se ha demostrado que el consumo de *L. casei* disminuye la duración de la diarrea y la gastroenteritis por Rotavirus en los niños.

Diversos estudios clínicos han demostrado que algunos prebióticos pueden prevenir diarreas agudas infantiles de origen nosocomial o adquiridas en la comunidad. En un estudio muy amplio realizado con niños de 6 a 12 meses en un área deprimida de Perú, la ingesta de oligo-fructosas redujo la incidencia de episodios de diarrea y el número total de días con diarrea, pero este beneficio sólo fue significativo en niños que no recibían lactancia materna (Guarner, 2011).

VII. RESUMEN DE INVESTIGACIONES RELEVANTES RELACIONADAS CON EL PROBLEMA

Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido-lácticas son microorganismos Gram positivos, no esporulados, catalasas negativas, microaerofílicos y productores de ácido láctico al fermentar glucosa u otros carbohidratos (Mora-Villalobos *et al.*, 2020).

Las bacterias ácido-lácticas son importantes para la salud y nutrición tanto de humanos como en los animales, especialmente en el fortalecimiento de la microbiota, ya que genera un equilibrio en la población de bacterias benéficas presentes (Özogul y Hamed, 2018).

A nivel industrial las bacterias lácticas son muy utilizadas porque pueden servir como cultivos iniciadores, probióticos, así mismo como microorganismos bioprotectores o productores de compuestos antimicrobianos (Vera-Peña *et al.*, 2019). Las bacterias ácido lácticas se utilizan como inóculos para elaborar productos lácteos fermentados, los cuales tienen una gran aceptación para su consumo, debido a su sabor y las propiedades benéficas que puede proporcionar su composición a la salud, dentro de esta clase de productos existen los quesos, jocoque, leche búlgara, yogurt y mantequilla acidificada (Ramírez *et al.*, 2011).

Probióticos

De acuerdo con la FAO/World Health Organization (2002), los probióticos son microorganismos vivos que confieren beneficios al hospedero cuando son consumidos en cantidades adecuadas. Entre los probióticos se encuentran las bacterias ácido-lácticas, dentro de las cuales están *Bifidobacterium* spp, *Lactobacillus* spp, *Enterococcus* spp, *Lactococcus* spp. entre otras; éstas tienen la característica de producir varios compuestos de tipo antimicrobiano, uno de los más potentes son los ácidos como el ácido láctico, otros son el H₂O₂, el diacetilo, acetaldehído, y las bacteriocinas. Estos últimos compuestos tienen la capacidad de inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana, produciéndose poros en la superficie bacteriana. Los probióticos generalmente inhiben géneros como *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Listeria* y *Salmonella* encontrados en el intestino de los animales (Olveira y González-Molero, 2016).

Los prebióticos son productos alimenticios que no se digieren ni se absorben en el estómago y el intestino delgado. Sin embargo, pueden ser fermentados por la microbiota intestinal, promoviendo la respuesta selectiva de la microbiota comensal beneficiosa en el colon, que se fermenta a butirato

y ácidos grasos de cadena corta que estimulan la producción de mucus, que fortalece la mucosa intestinal, mejorando la salud del huésped; alguno de ellos son la inulina, fructo-oligosacárido, galacto-oligosacáridos y lactulosa (De Vasconcelos *et al.*, 2016) y también el almidón resistente del plátano verde (Fuentes-Zaragoza *et al.*, 2011)

Por lo tanto, un simbiótico es la combinación de probióticos y prebióticos; se utilizan para estimular la proliferación de cepas bacterianas nativas específicas presentes en el tracto gastrointestinal. Cabe mencionar que el efecto sobre la salud de los simbióticos probablemente se asocia con la combinación individual de un probiótico y prebiótico debido a un efecto de sinergia (Markowiak y Ślizewska, 2017).

Efecto de Probióticos en diarreas

En Argentina, Maldonado *et al.*, (2018), prepararon leche fermentada con varias especies de bacterias ácidolácticas (*Lactobacillus johnsonii* CRL1693, *L. murinus* CRL1695, *L. mucosae* CRL1696, and *L. salivarius* CRL1702) y se la dieron de comer a los terneros. Después de varios días de consumo, evaluaron la incidencia de diarrea, así como los parámetros nutricionales y microbiológicos. Los terneros que habían consumido la leche fermentada con bacterias lácticas presentaron menor incidencia de diarreas, mayor número de bacterias lácticas fecales, menor mortalidad por diarrea. y mayor ganancia de peso.

Mukodiningsih *et al.*, (2017) utilizó repollo fermentado para el crecimiento de bacterias lácticas. Al añadir hasta un 6% de fermentado de repollo en alimento iniciador de terneros se produjo una mayor cantidad de bacterias de ácido láctico. Siendo una alternativa contra la diarrea de los terneros.

En otro estudio, Bartkiene *et al.*, (2016) utilizó el jugo de tubérculo de papa como sustrato para el desarrollo de *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici*. Al utilizar este sustrato enriquecido con estas bacterias, los autores encontraron que inhiben eficazmente el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Corynebacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus cereus*. Y con ello determinaron que el jugo de papa puede usarse como alternativa para cultivar este tipo de bacterias ácido lácticas. Realizaron el secado del producto obtenido mediante técnicas de liofilización y secado por aspersion. Posterior a la liofilización a -48°C y secado por aspersion a $+150^{\circ}\text{C}$ las concentraciones celulares viables en el polvo de jugo de papa fermentado fueron 9.18 ± 0.09 log UFC/g y 9.04 ± 0.07 log UFC/g, respectivamente, que son buenos valores de sobrevivencia.

Plátano verde y diarreas

En muchas comunidades de Asia, el plátano verde inmaduro se usa como tratamiento de diversos trastornos intestinales incluyendo a la diarrea. El fruto es rico en almidones resistentes a la amilasa, existen reportes que indican que es útil en el tratamiento de la diarrea persistente en niños hospitalizados (Rabbani *et al.*, 2001). El uso del plátano verde como antidiarreico fue probado en América por Álvarez-Acosta *et al.* (2009), quienes realizaron un experimento con 80 de niños de 1 a 28 meses de edad con diarrea. Estos fueron alimentados con dos tipos de dieta, una a base de yogurt y la otra parte era alimentada con plátano verde. En las heces de estos niños se aislaron una serie de bacterias en las que las más frecuentes fueron *Aeromonas hydrophilia* y *Shigella flexneri*. Entre sus resultados se puede destacar que el grupo experimental alimentado con una dieta de plátano verde tuvo una respuesta mejor en disminución de la producción y la consistencia de las heces, peso de las heces, y lo más importante la duración de la diarrea (18 horas más corta) que el grupo alimentado con la dieta a base de yogur. Por ello Kosek *et al.* (2010), recomienda que en las áreas donde existe producción plátano verde, debe ser incluida como un elemento básico en el tratamiento y el período de rehabilitación temprana de shigelosis o disentería. Hasta donde sabemos no se ha utilizado el plátano verde deshidratado para estudios de tratamiento de diarreas.

Deshidratación de bacterias lácticas

Anteriormente los cultivos bacterianos para la elaboración del yogurt eran empleadas como inóculos congelados, pero traía consigo limitantes importantes relacionadas a su conservación, almacenamiento y transporte, limitantes que se han corregido por la implementación de cultivos deshidratados (Tamime y Robinson 2007). Con el secado, al remover el agua se genera un ambiente estresante para las bacterias, y esto puede hacer que pierdan parcial o totalmente su capacidad fermentativa y su viabilidad. El secado de bacterias es un proceso costoso que debe conservar la estabilidad y viabilidad de microorganismos para asegurar su función probiótica, pero deben buscarse costos más bajos a una escala mayor, para que puedan ser sostenibles (Huang *et al.*, 2017).

Uno de los inconvenientes de cualquier deshidratación es que induce estrés osmótico en las bacterias, lo que disminuye considerablemente su viabilidad. Una de las estrategias empleadas para mejorar la viabilidad bacteriana en los métodos de secado, es la adición de agentes protectores (Broeckx *et al.*, 2016), pudiendo así mantenerse durante largo tiempo. La acumulación de solutos

compatibles como betaína, carnitina, ectoínas, sacarosa y trehalosa brindan protección para el caso del estrés osmótico, haciendo más resistentes a las bacterias en estas condiciones (Prasad *et al.*, 2003). Estos solutos pueden acumularse a altos niveles sin interferir con los procesos celulares. Muchos solutos compatibles han demostrado efectividad estabilizando enzimas, dando protección en condiciones de concentraciones altas de sal, de igual manera resultan favorables contra altas temperaturas, congelación o descongelación y finalmente en los procesos antes mencionados de secado (Poolman y Glaasker, 1998).

Existe una variedad de métodos para realizar el secado de bacterias en donde podemos encontrar a los siguientes: liofilización, pulverización, lecho fluidizado y vacío. El liofilizado es un método de alta relevancia el cual puede proporcionar estabilidad a productos que son sensibles a temperaturas altas, como es el caso de las bacterias ácido lácticas. En este proceso se requiere de congelar la solución acuosa que contiene bacterias, posteriormente el primer secado que se realiza consiste en sublimar el hielo y, por último, un segundo secado, el cual ayudará a eliminar el agua no congelada (Fonseca *et al.*, 2015). Este método tiene como uno de los principales estreses la congelación de las bacterias; el hielo al tener menor densidad que el agua se expande en el citoplasma, ocasionando daños en las membranas celulares afectando su fluidez y poniendo en riesgo la función de los organelos celulares (Papadimitriou *et al.*, 2016). La técnica de lecho fluidizado es también utilizada cuando se requiere deshidratar microorganismos con un acarreador de características sólidas que es expuesto a un flujo de aire en un producto húmedo de características sólidas, creando un ambiente fluidizado (Laconelli *et al.*, 2015).

Uso de sustratos para deshidratación

El uso de sustratos para la deshidratación de bacterias lácticas ha sido evaluado por varios autores. Guergoletto *et al.* (2010), demostraron que el uso de salvado de avena y la harina de plátano verde son sustratos que brindan condiciones favorables para la adhesión de *L. casei*. La viabilidad fue alta, en un secado al vacío de 45 ° C. El uso de sacarosa y trehalosa incrementó la posibilidad de supervivencia de los probióticos durante el secado, lo cual se mantuvo durante 28 días de almacenamiento. Siendo el salvado de avena quien proporcionó mejores resultados para la deshidratación de *L. casei*.

Por otro lado, Bucio *et al.*, (2005) realizaron investigaciones en bases a estudiar la viabilidad de *Lactobacillus plantarum 44^a* después del secado, su almacenamiento, así como en la exposición a

los fluidos del tracto gastrointestinal mediante un modelo *in vitro*. El sustrato utilizado que tenía 6% de humedad fue rociado con una suspensión de aproximadamente 2×10^8 UFC de *L. plantarum* 44a en 10, 15, 20, 25 y 30% v/w del sustrato, para posteriormente secarlo hasta llegar a un contenido de humedad de 6% con el apoyo de un horno convectivo a una temperatura de 25°C.°. Obteniendo resultados de supervivencia de 14%, 36%, 51%, 78% y 105% respectivamente en relación con el porcentaje v/w original del sustrato. Con ello concluyeron que *L. plantarum* 44a puede tener una alta viabilidad después de ser secado y almacenado en el alimento preparado a partir de harina de pescado, soya y otros granos, incluso mostró ser resistente a los fluidos gástricos e intestinales.

Antagonismo contra patógenos

En la ganadería la diarrea es una disfunción del intestino que puede deberse a la presencia de patógenos, tipo de manejo que se aplica en la ganadería, condiciones ambientales, estado nutricional e inmunológico (Adab, *et. al*; 2020). Se caracteriza por la disminución de la consistencia de las heces y un aumento en el número de evacuaciones, es consecuencia de una mala absorción del agua y electrolitos por daños en el epitelio intestinal causados por la infección. Es una de las enfermedades más graves que padecen los terneros, causa importantes pérdidas económicas debido a la mortalidad, el escaso crecimiento y los costos del tratamiento (Uhde *et al.*, 2008). En cuanto a las diarreas infecciosas existe una variedad de agentes patógenos responsables, tales como *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* tipo C, *Staphylococcus aureus* (Mukhtar *et al.*, 2015).

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de yogurt

El yogurt se formuló con leche de vaca pasteurizada de la marca Lala® (grasa, 3.3%; proteína, 3.1%; lactosa 4.80%) inoculada con un cultivo liofilizado (0.1g bacterias⁻¹ litro leche) de la marca YF-L705 Yo-Flex® CHR HANSEN e incubado a una temperatura de 44 a 45 °C en un termobañero FELISA FE-377 por un tiempo de 4 a 5 h. Finalmente se almacenó en refrigeración para su conservación antes de utilizarlo.

El yogurt se centrifugó a 6000 rpm a 4 °C durante 15 minutos, posteriormente se colectó el sedimento láctico, el cual contenía las bacterias lácticas que fueron utilizadas para los experimentos de este estudio; el sobrenadante fue eliminado.

Tratamientos y diseño experimental

En un diseño completamente al azar, se distribuyeron seis tratamientos (aditivos) con tres repeticiones. Los tratamientos (T) fueron: T1: sin aditivo, T2: Glicerol, T3: Carbonato de calcio, T4: Extracto de Levadura, T5: Glicerol y Carbonato de Calcio, T6: Glicerol, Carbonato de Calcio y Extracto de Levadura.

La unidad experimental consistió en charolas de aluminio de 5 cm de diámetro. A cada charola se le agregó 2 g del precipitado del yogurt y 0.2 ml del aditivo según tratamiento (Figura 1). Los tratamientos se secaron durante 5 días en un desecador bajo condiciones de vacío (Nalgene NALGE07022). Se midió la pérdida de peso de la muestra en el desecador en el día 0, 1, 2, 3, 4 y 5.

Se realizaron pruebas de la actividad fermentativa de los tratamientos estudiados a las 72 h de secado, ya que después de ese tiempo, no se encontró cambios en el peso de las muestras. El producto deshidratado (0.5 g) se utilizó para inocular 50 ml leche entera (composición descrita anteriormente) y se midió el pH a las 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 h con un potenciómetro (HANNA HI-2211, Estados Unidos de América). En las pruebas de fermentación, se usaron inóculos de yogurt fresco (Tratamiento 7) y un cultivo liofilizado (tratamiento 8) como grupos control. Al tratamiento 7, se le inoculó 2 g de yogurt natural elaborado con el cultivo liofilizado (sin centrifugar y sin deshidratar). Al tratamiento 8 se le inoculó 0.005g de un cultivo liofilizado.

Proceso de fermentación y secado

Aditivos usados en el experimento



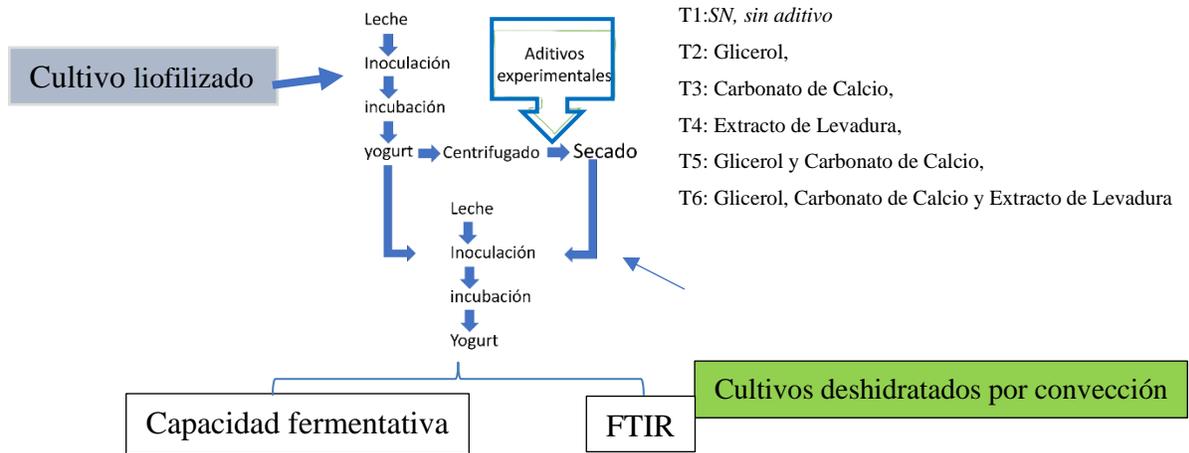


Figura 1. Diagrama simplificado de flujo del experimento y aditivos usados en el experimento

Modelación y análisis de resultados

Los valores de pH registrados a diferentes tiempos se graficaron para modelar y monitorear la fermentación en leche usando la ecuación de Boltzman con el software Microcal Origin ver 6 (Navrátil *et al.*, 2004). La ecuación de Boltzman fue ajustada de la siguiente forma:

$$pH = \frac{pH_{inicial} - pH_{final}}{1 + e^{(x-x_0)/d_x}} + pH_{final}$$

Los valores de las constantes ($pH_{inicial}$, pH_{final} , x_0 , d_x) se estimaron mediante el ajuste de curvas no lineales del software Microcal Origin 6.0 (Northampton, MA, USA). En la función sigmoideal de Boltzmann, el pH cambia en el tiempo t . Los parámetros $pH_{inicial}$ y pH_{final} corresponden a las posiciones de dos asíntotas de la curva $Y(t)$ (superior e inferior), x_0 es la mitad del tiempo que transcurre entre el $pH_{inicial}$ y el pH_{final} (Figura 2). De ahí se infiere que $2x_0$ es el tiempo en la que el yogurt alcanza el pH de finalización.

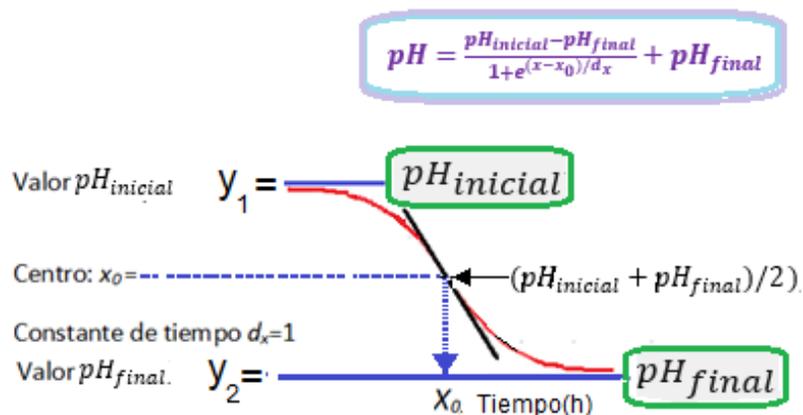


Figura 2. Función de Boltzman, modificado de Microcal origin ver 6.

Figura 2. Función de Boltzman

Huella espectral

Huella espectral FTIR

En las instalaciones de la División Académica de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, se realizó de acuerdo con los procedimientos de Subramanian y Rodríguez-Saona, (2009). Se colocó 1 ml de yogurt en vial, se centrifugó a 14,000 rpm durante 3 minutos, y se desechó el precipitado. Se tomó 0.5 ml de sobrenadante y se colocó en un nuevo vial y se le adicionó 0.5 ml de agua destilada más 0.5 ml de cloroformo para separar la grasa compleja en la muestra. Posteriormente, se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente y se desechó la parte más viscosa que contenía el cloroformo con grasas disueltas. Finalmente, se colectaron 200 μ l del sobrenadante, se agregó 200 μ l de etanol absoluto de la última mezcla para precipitar proteínas complejas del sobrenadante; se tomó 100 μ l y se colocó en un nuevo vial para congelarlo hasta su lectura en un espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) (Perkin Elmer, Frontier, EUA). Para los análisis, se empleó una reflexión total atenuada (ATR) de diamante controlado con software para Windows© en el intervalo de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 1 cm^{-1} y 32 scan. Con los espectros obtenidos se realizó un pretratamiento de corrección de línea base y de suavización con el software Spectrum del espectrofotómetro FT IR Perkin-Elmer (Perkin-Elmer). Los datos de los espectros fueron exportados en formato ASCII y se analizaron utilizando MagicPlot.

Estudio de antagonismo

En la figura 3 se describe la prueba de la mancha en agar empleada para las pruebas de antagonismo. Las bacterias ácido-lácticas fueron las de la colección del laboratorio Taller de alimentos: se sembraron previamente antes que la de los patógenos en MRS modificado (0 y 0.2% glucosa) en microplacas. Las placas tenían verde de bromocresol como indicador de la fermentación. Se vertió 10 μ L de BAL en el centro de la placa de agar MRS y se incubaron por la noche a una temperatura de 30 °C. Una vez desarrollada la mancha en la placa, se añadió agar blando constituido por caldo de triptona de soya que contenía 1% de un cultivo de la bacteria patógena, cultivada por la noche en medio TSB. El registro de la inhibición se determinó mediante la ausencia de crecimiento de los patógenos alrededor de las manchas. Las pruebas se realizaron por triplicado (Bucio *et al.*, 2004). Las cepas de bacterias lácticas más inhibitorias fueron utilizadas para estudios posteriores.

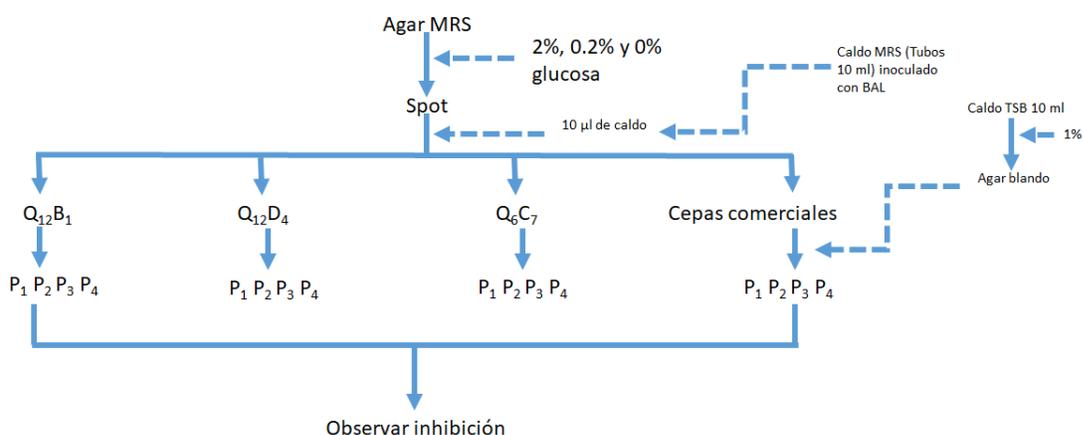


Figura 3. Evaluación de la actividad inhibitoria de las bacterias lácticas

Evaluación de actividad inhibitoria de la harina de plátano verde hacia bacterias

A 100 ml de leche entera marca Lala se le añadió diferentes cantidades de harina de plátano 0, 0.1, 1 y 10 g^{-1} litro. Se inoculó con 0.01 g de cultivo liofilizado de yogurt y se incubó a 45°C. A las 4 horas se midió el pH en yogurt. Una actividad inhibitoria seria considerada positiva si el pH fuera significativamente diferente al tratamiento sin harina de plátano.

Para evaluar la actividad inhibitoria de la harina de plátano verde se agregó 0, 0.1, 1 y 10 g^{-1} litro en caldo triptona de soya inoculado con 1% de un cultivo de *E. coli*. A las 24 h se midió el pH.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El yogurt se produjo con las típicas cinéticas de fermentación con una duración de 4 o 5 h incubando a 45 °C (Soukoulis *et al.*, 2007). Con el centrifugado del yogurt, y la remoción de la parte acuosa, el precipitado quedo con aproximadamente el 25% del peso original del yogurt. El secado del precipitado en las charolas tuvo una duración de tres días, después del tercer día, las muestras ya no perdieron peso (Figura 4).

Deshidratación de las bacterias ácido lácticas del yogurt a peso constante.

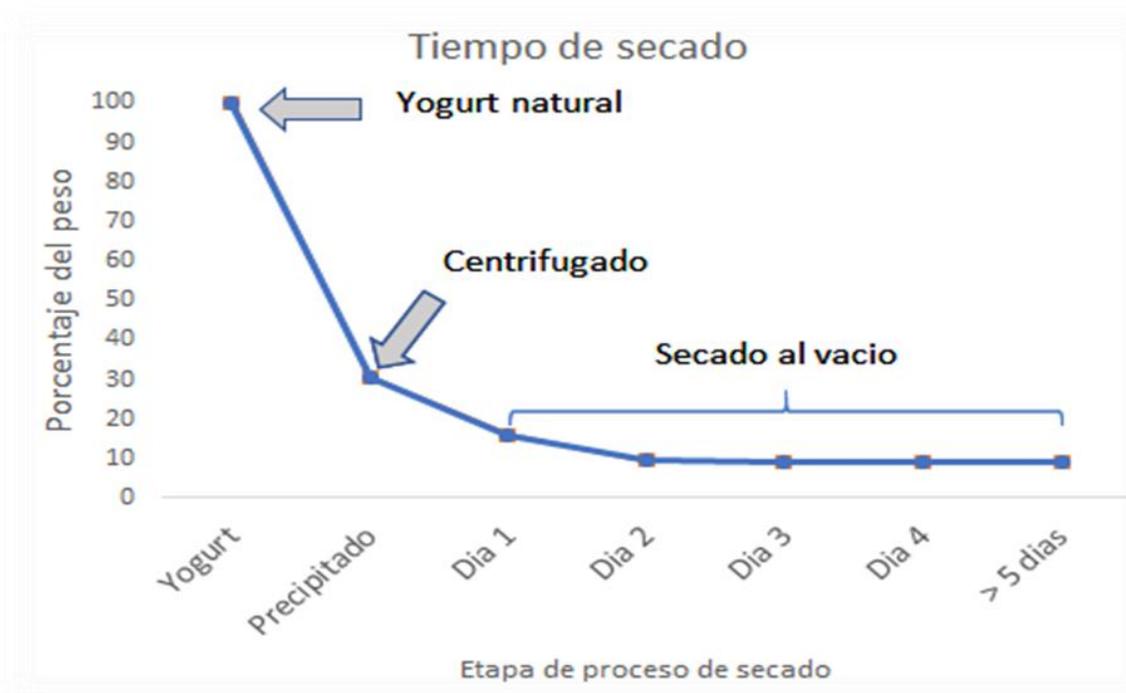


Figura 4. Etapas de remoción de agua del yogurt.

La leche con los inóculos de yogurt deshidratado redujó el pH en las 3 fases del proceso de fermentación: 1) fase de latencia, lag o de inicio de disminución del pH), 2) fase logarítmica (disminución rápida del pH) y 3) disminución final de pH hasta valores estables. A modo de ejemplo se presentan dos cinéticas de fermentación en la Figura 5

El tiempo de finalización de la fermentación difirió significativamente entre inóculos liofilizados y deshidratados. Esos datos se modelaron de un modo predictivo con la función de Boltzman

(Figura 4). Los coeficientes de determinación alcanzados son altos (0.98 y 0.99 para el yogurt liofilizado y deshidratado, respectivamente), lo cual indica un buen ajuste de los datos al modelo de Boltzman. Este modelo ya se ha utilizado anteriormente para evaluar la cinética de desaparición de lactosa en la fermentación de Kombucha (Kanurić *et al.*, 2018), pero no se había utilizado para describir el descenso de pH. Los yogurts manufacturados con cultivos frescos fermentan más rápido (4 h) en relación a los deshidratados, que tardan más de 10 h (Figura 4).

Modelación de la cinética de fermentación para comparar el efecto de los diferentes aditivos en la deshidratación de las bacterias lácticas modelo.

En el Cuadro 4, se presentan muestra los parámetros de la función de Boltzman obtenidos de la interpolación de las cinéticas de reducción de pH de leche inoculadas con las muestras de sedimentos deshidratados y yogurt fresco. Los X_0 , de las leches inoculadas con yogurt fresco y liofilizado indican que el pH se redujo significativamente más rápidamente que en los demás tratamientos; en velocidad más rápida, le siguieron las muestras de tratamiento 3 y 4, que contienen Carbonato de Calcio y Extracto de Levadura respectivamente. X_0 es la coordenada t del punto en el que la pendiente tiene el valor más alto, y es el tiempo medio de fermentación.

Cuadro 4. Prueba de medias de los Parámetros de la función de Boltzman de las cinéticas de reducción de pH

Tratamientos	pH _{Inicial}	pH final	X_0	d_x
1) SN, sin aditivo	6.6 ^a	3.9 ^a	6.3cd	1.9b
2) Glicerol,	6.7 ^a	3.9ab	6.8d	2.1b
3) Carbonato de calcio,	6.8 ^a	4.0bc	5.9c	2.3b
4) Extracto de levadura,	6.9 ^a	3.9ab	5.8c	2.2b
5) Glicerol y carbonato de calcio,	6.8 ^a	4.0c	6.2cd	2.1b
6) Glicerol, Carbonato de calcio y extracto de levadura	6.7 ^a	4.0c	6.8d	2.0b
7) yogurt natural	8.1b	4.0bc	1.3 ^a	1.8b
8) yogurt liofilizado	7.0a	4.4d	2.6b	0.8 ^a

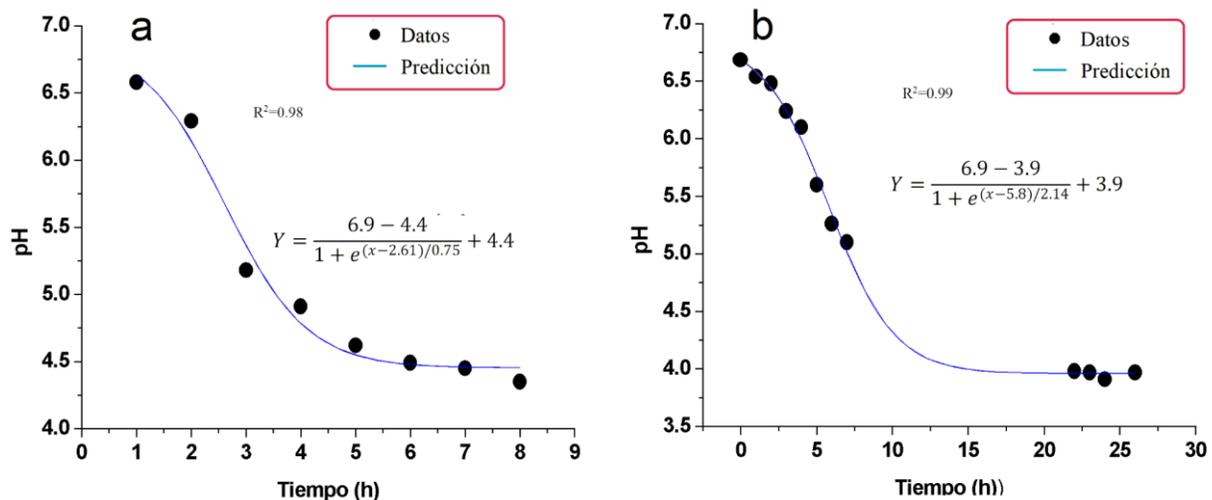


Figura 5. Curva de reducción de pH del yogurt inoculado con a) yogurt liofilizado y b) con yogurt deshidratado usando como aditivo al extracto de levadura.

El $pH_{inicial}$ del yogurt natural en el modelo Boltzmann fue significativamente mayor a los otros tratamientos. Es de suponerse que ese valor se debió a la interpolación de los parámetros de la ecuación de Boltzmann en los que se incluye una pendiente con gran velocidad de reducción de pH de este tratamiento; y que quizás a diferencia de los otros tratamientos no tiene alcalinizantes, que puede afectar los límites inferior y superior de la cinética. En caso de pH_{final} , los valores más altos fueron para el tratamiento inoculado con yogurt liofilizado; probablemente debido a algún efecto de la naturaleza del inóculo que no acidifica a pH menos de 4. Los cultivos deshidratados que contienen el Extracto de levadura y Carbonato de Calcio se asocian con una más rápida actividad de fermentación de la leche ($p \leq 0.05$).

Comparación de las características espectrales del yogurt producido entre el cultivo deshidratado con el no deshidratado mediante el uso de la técnica FTIR.

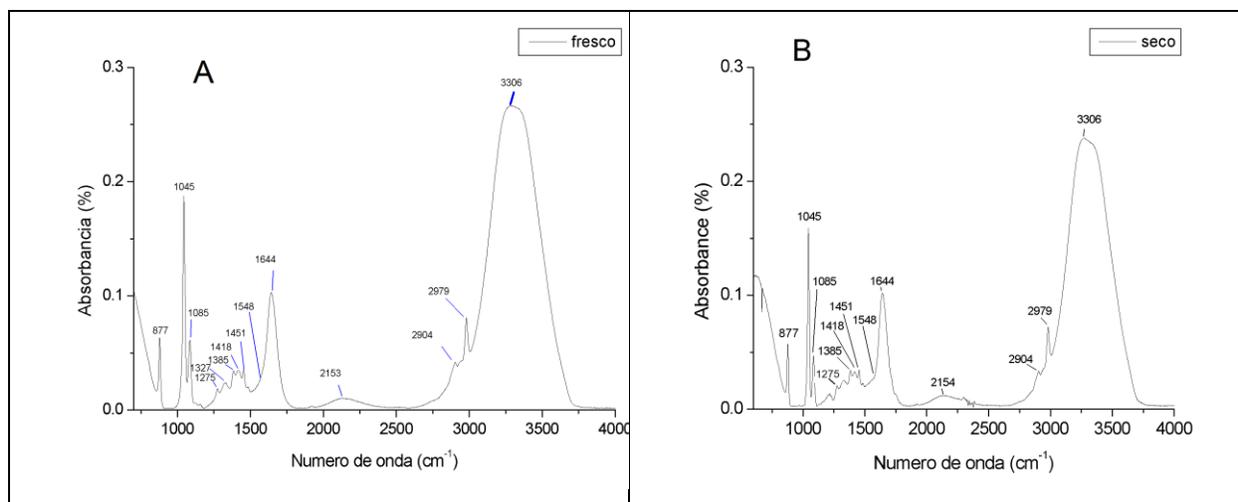


Figura 6 Espectros FT-IR de muestras de yogurt fabricado con inóculo de yogurt fresco (A) y deshidratado (B)

Los datos espectrales de FTIR de las muestras de extracto de yogur elaborado con inóculos de yogurt fresco y de una de las muestras de yogurt deshidratado (tratamiento 4) se muestran en la Figura 6. Los espectros de la muestra de yogurt manufacturado con inóculos deshidratados tiene en sus picos y anchos de bandas características similares a los de yogurts con cultivos frescos. En ambos tratamientos se identificaron varios picos de absorción de la radiación electromagnética del infrarrojo característicos en productos lácteos fermentados (Rodríguez-Saona *et al.*, (2006 y 2017). La lactosa se distingue por presentar dos picos a 1046 y 1086 cm^{-1} (Rodríguez-Saona *et al.*, 2017). La amida I tiene un pico de absorción espectral a 1640 cm^{-1} que corresponde a la unión de grupos carboxilo y amino de los aminoácidos, derivados de la caseína, que al igual que muchas otras proteínas, tiene picos espectrales alrededor 1650, 1550 y 1250 cm^{-1} debido a amida I, amida II y III (Hewavitharana y van Brakel, 1997; Papadopoulou *et al.*, 2021; Derrick *et al.*, 2000). Derrick *et al.* (2000), observaron que los picos de mayor absorción de infrarrojo de muestras de caseínas son de estiramiento de grupos N-H a 3300, con estiramiento de grupos C-H a 3100-2800 C-H, estiramiento de grupos C=O a 1660-1600, flexión de grupos C-N-H a 1565-1500, flexión de grupos C-H a 1480-1300. Esos picos son comunes en muestras extraídas de los quesos (Subramanian y Rodríguez-Saona, 2009) y en los yogurts de este estudio.

En mezclas de α -caseína y β -lactoglobulina, se ha reportado picos de absorción del infrarrojo a 1650 cm^{-1} (Susi, 1972) que corresponden a uniones de grupos SH, de las proteínas del suero y caseínas, que resultan del tratamiento térmico de la leche para yogurt. Otros autores indican que a esa misma longitud de onda también se detecta agua y ácidos carboxílicos de los ácidos orgánicos (Fagan, 2014).

En muestras de exopolisacáridos producidos por *Streptococcus thermophilus*, utilizando espectroscopia FTIR, han detectado una banda ancha en alrededor de 3287 cm^{-1} atribuidos a la vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo de los carbohidratos y a 2925 cm^{-1} , debido a un estiramiento de la banda de C-H. La banda de 1638 cm^{-1} está asociada con la vibración de tracción de C=O y corresponde a la absorción característica de los polisacáridos. Todos los espectros muestran bandas típicas de polisacáridos cerca de 10267 cm^{-1} dentro de la región de la huella digital ($1200\text{--}950\text{ cm}^{-1}$) (Karadeniz *et al.*, 2021).

Actividad inhibitoria de diferentes cepas de bacterias lácticas contra *E. coli*

En el cuadro 5 y figura 7 se presentan los resultados de antibiosis contra *Escherichia coli* de 3 bacterias lácticas aisladas de queso y el aislado de las cepas de yogurt, que no crecieron en el substrato MRS y, por lo tanto, no se pudo hacer la prueba de inhibición. Las tres bacterias tuvieron algún grado de inhibición contra *E. coli*. La ausencia de cambio de color en el medio de inhibición (figura 7b) muestra que la sustancia inhibitoria producida por las bacterias lácticas no fue el ácido láctico; que es usualmente el principal agente antimicrobiano en sustratos ricos en azúcar, que se indica por el cambio de color del verde de bromocresol que a pH ácido es verde (figura 7d) y a pH neutro es azul (figura 7e), lo cual hace interesante a la bacteria lácticas del estudio, ya que permite inhibir a los patógenos a bajo y alto contenido de dextrosa (Bucio *et al.*, 2004)

Cuadro 5 Halos de inhibición de las bacterias lácticas contra E. coli

Cepas	Diámetro spot	Diámetro halo
q6c7	4.5±0.5	1.6±0.9
q12b1	5.7±0.9	2.2±0.5
q12d4	5.8±1.3	2.1±0.5
yogurt	-	-

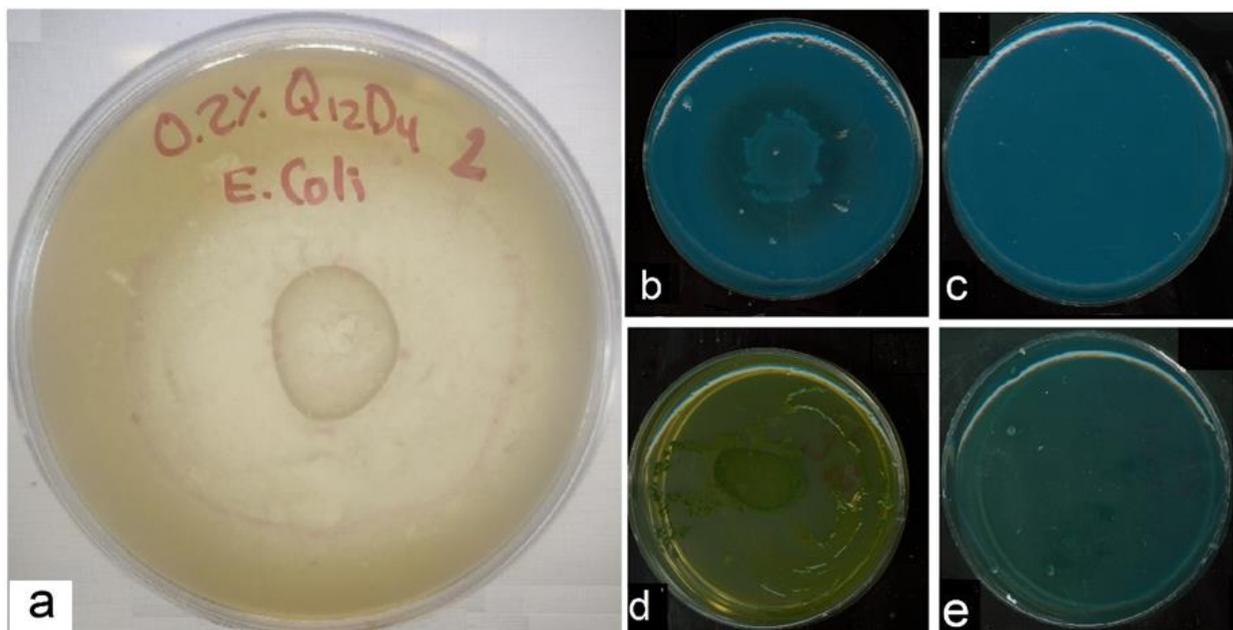


Figura 7. Evaluación de la acción inhibitoria de $Q_{12}D_4$ hacia *Escherichia coli* en MRS modificado con varios porcentajes de glucosa:

- a) MRS 0.2% de glucosa y $Q_{12}D_4+E.coli$
- b) MRS 0.2% de glucosa y verde de bromocresol y $Q_{12}D_4+E.coli$
- c) MRS 0.2% de glucosa y verde de bromocresol (sin inocular)
- d) MRS 2.0% de glucosa y verde de bromocresol y $Q_{12}D_4+E.coli$
- e) MRS 2.0% de glucosa y verde de bromocresol (sin inocular)

Reducción de pH de bacterias en presencia de harina de plátano verde

No se observaron diferencias significativas en los valores de reducción de pH en tratamientos de leche adicionados con diferentes cantidades de harina de plátano verde seco inoculados con bacterias del yogurt. Se infiere que no existe una actividad inhibitoria del plátano verde hacia estas bacterias.

En el caso de caldo triptona de soya inoculado con *E. coli* con diferentes cantidades de plátano verde tampoco se observaron cambios de pH, por lo que es de suponerse que no hay una actividad inhibitoria del plátano verde hacia *E. coli*.

Cuadro 6. Fermentación de leche con harina de plátano con bacterias del yogurt y *E. coli*

	Inoculada con bacterias del yogurt	Inoculada con <i>E. coli</i>
Harina de plátano (%) en leche (p/v)	pH	pH
0	4.44	4.97
0.1	4.29	4.94
1	4.27	5.0
10	4.37	5.0

X. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Este estudio muestra un método alternativo para deshidratar bacterias lácticas en el laboratorio con equipo relativamente fácil de acceso para cualquier laboratorio. Los inóculos deshidratados con los aditivos se pueden utilizar para hacer yogurt con calidad similares a cuando se utiliza inóculo con cultivo fresco, con la desventaja que el tiempo de fermentación es mayor.

Existen bacterias lácticas que tienen actividad inhibitoria contra *Escherichia coli* a bajas y altas concentraciones de glucosa. La actividad inhibitoria a bajas concentraciones de glucosa no se debe a los ácidos.

La harina de plátano verde no inhibe a las bacterias que producen yogurt ni a *E. coli*.

Recomendaciones

Propuesta de preparación del alimento fortificado

Es posible preparar un alimento antidiarreico con varios ingredientes: harina de plátano verde y bacterias inhibidoras de *E. coli*. La funcionalidad del plátano verde deshidratado es absorber el exceso de agua de la diarrea, suministrar electrolitos y además funcionar como prebiótico.

La funcionalidad de las bacterias ácido-lácticas es generar antagonismo contra *E. coli* a bajas y altas concentraciones de glucosa, y coadyuvar con el plátano verde en la terapia para contrarrestar diarreas o incluso para prevenir las diarreas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Adab, M., Mahjoubi, E., Yazdi, M. H., & Collier, R. J. (2020). Effect of supplemental dietary Zinc and its time of inclusion on pre-weaning phase of Holstein heifer calves: Growth performance and health status. *Livestock Science*, 231, 103891.

Álvarez-Acosta, T., León, C., Acosta-González, S., Parra-Soto, H., Cluet-Rodríguez, I., Rossell, M. R., & Colina-Chourio, J. A. (2009). Beneficial role of green plantain [musa paradisiaca] in the management of persistent diarrhea: A prospective randomized trial. *Journal of the American College of Nutrition*, 28(2), 169–176.

Ang, G. 1994. Libro de los medicamentos: nombres, usos y efectos. Reader's Digest Association, Reader's Digest México. Editor Reader's Digest México, 1994. ISBN 9682801990, 9789682801990. 519 páginas

Bartkiene, E., Krungleviciute, V., Antanaitis, R., & Kantautaite, J. (2016). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria multiplied in an alternative substrate and their influence on physiological parameters of new-born calves. *Veterinárni medicína*, 61(12), 653-662.

Broeckx, G., Vandenheuvel, D., Claes, I. J. J., Lebeer, S., & Kiekens, F. (2016). Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1–2), 303–318.

Bucio, A., Hartemink, R., Schrama, J. W., & Rombouts, F. M. (2004). Screening of lactobacilli from fish intestines to select a probiotic for warm freshwater fish. *Bioscience and microflora*, 23(1), 21-30.

Bucio, A., Hartemink, R., Schrama, J. W., Verreth, J., and Rombouts, F. M. (2005). Survival of *Lactobacillus plantarum* 44a after spraying and drying in feed and during exposure to gastrointestinal tract fluids in vitro. *Journal of General and Applied Microbiology*, 51(4), 221–227.

Cabrera Cao, Y., Fadragas Fernández, A., y Guerrero Guerrero, L. G. (2005). Antibióticos naturales: Mito o realidad. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 21(3-4).

De Vasconcelos Generoso, S., Lages, P. C., & Correia, M. I. T. D. (2016). Fiber, prebiotics, and diarrhea: What, why, when and how. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 19(5), 388–393.

Delgado-González Ramón Alfredo, González-Álvarez Vicente Homero, Rodríguez-Martínez Rafael, V.-D. F. G. (2016). Prevalencia de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en becerras Holstein con diarrea en la Comarca Lagunera, México (Prevalence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in Diarrheic H. AGROFAZ, 16(1), 57–64.

Derrick, M. R., Stulik, D., & Landry, J. M. (2000). Infrared spectroscopy in conservation science. Getty Publications.
https://www.getty.edu/conservation/publications_resources/pdf_publications/infrared_spectroscopy.html

Fagan, C. C. (2014). Infrared spectroscopy. En O'Donnell, C. P., Fagan, C., y Cullen, P. J. (Eds.). (2014). *Process Analytical Technology for the Food Industry*. Springer. Pp. 73-101.

FAO/WHO (2002). *Guidelines for evaluation of probiotics in food* London, Ontario, Canada

Fonseca, F., Cenard, S., & Passot, S. (2015). Freeze-drying of lactic acid bacteria. In *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (pp. 477-488). Springer, New York, NY.

Fuentes-Zaragoza, E., Sánchez-Zapata, E., Sendra, E., Sayas, E., Navarro, C., Fernández-López, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2011). Resistant starch as prebiotic: A review. *Starch-Stärke*, 63(7), 406-415. <https://doi.org/10.1002/star.201000099>

Gómez, S., Nova, E., y Marcos, A. 2011. Probioticos. En Barberá Mateos, J.M y Marcos, A. (editores). Alimentos funcionales: aproximación a una nueva alimentación. Instituto de Nutrición y Trastornos Alimentarios (INUTCAM). Dirección general de salud pública y alimentación. <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM009703.pdf>

Guarner, F. 2011. Alimentos prebióticos. En Barberá Mateos, J.M y Marcos, A. (editores). Alimentos funcionales: aproximación a una nueva alimentación. Instituto de Nutrición y Trastornos Alimentarios (INUTCAM). Dirección General de Salud Pública y Alimentación. <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM009703.pdf>

Guergoletto, K. B., Magnani, M., Martin, J. S., Andrade, C. G. T. de J., & Garcia, S. (2010). Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(2), 415–421.

Hewavitharana, A. K., & van Brakel, B. (1997). Fourier transform infrared spectrometric method for the rapid determination of casein in raw milk. *Analyst*, 122(7), 701-704. DOI:[10.1039/A700953D](https://doi.org/10.1039/A700953D)

Huang, S., Vignolles, M., Chen, X. D., Loir, Y. Le, Jan, G., Schuck, P., & Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science y Technology*, 63, 1–17.

Kanurić, K. G., Milanović, S. D., Ikonić, B. B., Lončar, E. S., Iličić, M. D., Vukić, V. R., & Vukić, D. V. (2018). Kinetics of lactose fermentation in milk with kombucha starter. *journal of food and drug analysis*, 26(4), 1229-1234.

Karadeniz, D. G., Kaskatepe, B., Kiymaci, M. E., Tok, K. C., Gumustas, M., & Karaaslan, C. (2021). Microbial exopolysaccharide production of *Streptococcus thermophilus* and its antiquorum sensing activity. *Archives of Microbiology*, 203(6), 3331-3339.

Kosek, M., Yori, P. P., & Olortegui, M. P. (2010). Shigellosis update: Advancing antibiotic resistance, investment empowered vaccine development, and green bananas. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 23(5), 475–480.

Laconelli, C., Lemetais, G., Kechaou, N., Chain, F., Bermúdez-Humarán, L. G., Langella, P., & Beney, L. (2015). Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *Journal of Biotechnology*, 214, 17-26.

Long, S., Liu, L., Liu, S., Mahfuz, S., & Piao, X. (2019). Effects of forsythia suspense extract as an antibiotics substitute on growth performance, nutrient digestibility, serum antioxidant capacity, fecal *Escherichia coli* concentration and intestinal morphology of weaned piglets. *Animals*, 9(10).

Maldonado, N. C., Chiaraviglio, J., Bru, E., De Chazal, L., Santos, V., & Nader-Macías, M. E. F. (2018). Effect of milk fermented with lactic acid bacteria on diarrheal incidence, growth performance and microbiological and blood profiles of newborn dairy calves. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(4), 668–676.

Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9).

Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., ... & López-Gómez, J. P. (2020). Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. *Fermentation*, 6(1), 23.

Mukodiningsih, S., Achmadi, J., Wahyono, F., Utama, C. S., Putri, O. N., Solikhah, S. S., & Ohh, S. J. (2017). Handling and using waste cabbage as feed additive on pellet of calf starter and it's effect to microbiology quality. *Advanced Science Letters*, 23(3), 2589–2590.

Muktar, Y., Mamo, G., Tesfaye, B., & Belina, D. (2015). A review on major bacterial causes of calf diarrhea and its diagnostic method. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* 7(5), 173–185.

Navrátil, M., Cimander, C., & Mandenius, C. F. (2004). On-line multisensor monitoring of yogurt and filmjök fermentation on production scale. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 415-420.

Olveira, G., & González-Molero, I. (2016). An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinología y Nutrición* (English Edition), 63(9), 482-494. <https://doi.org/10.1016/j.endoen.2016.10.011>

Özogul, F., & Hamed, I. (2018). The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58(10), 1660-1670.

Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., De Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., & Turróni, F. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 80(3), 837-890

Papadopoulou, O. S., Argyri, A. A., Kounani, V., Tassou, C. C., & Chorianopoulos, N. (2021). Use of Fourier transform infrared spectroscopy for monitoring the shelf life and safety of yogurts supplemented with a *Lactobacillus plantarum* strain with probiotic potential. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1625.

Poolman, B., & Glaasker, E. (1998). Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Molecular microbiology*, 29(2), 397-407.

Prasad, J., McJarrow, P., & Gopal, P. (2003). Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(2), 917-925.

Rabbani, G. H., Teka, T., Zaman, B., Majid, N., Khatun, M., & Fuchs, G. J. (2001). Clinical studies in persistent diarrhea: Dietary management with green banana or pectin in Bangladeshi children. *Gastroenterology*, 121(3), 554–560.

Ramírez, J. C., Rosas Ulloa, P., Velázquez González, M. Y., Ulloa, J. A., & Arce Romero, F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista fuente- 2*, 7 CONACYT. Microsoft Word - Artículo 1 BAL corregido versión final JCRR y col. (uan.mx)

Rodríguez-Saona, L. E., Koca, N., Harper, W. J., & Alvarez, V. B. (2006). Rapid determination of Swiss cheese composition by Fourier transform infrared/ attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 89, 1407e1412.

Rodríguez-Saona, L. E., & Allendorf, M. E. (2011). Use of FTIR for rapid authentication and detection of adulteration of food. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2, 467–483. doi: 10.1146/annurev-food-022510-133750.

Rodríguez-Saona, L., Ayvaz, H., & Wehling, R. L. (2017). Infrared and Raman spectroscopy. In S. Nielsen (Ed.), *Food Analysis. Food science text series* (pp. 107-127). Springer.

Smulski, S., Turlewicz-Podbielska, H., Wylandowska, A., & Włodarek, J. (2020). Non-antibiotic possibilities in prevention and treatment of calf diarrhoea. *Journal of Veterinary Research* 64(1), 119-126.

Soukoulis, C., Panagiotidis, P., Koureli, R., & Tzia, C. (2007). Industrial yogurt manufacture: monitoring of fermentation process and improvement of final product quality. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2641-2654.

Subramanian, A. & Rodríguez-Saona, L. E. 2009. Methods for Monitoring Composition and Flavor Quality of Cheese Using a Rapid Spectroscopic Method. U.S. Patent Application No 12/481,278, 10 Dic. 2009.

Susi, H. (1972). [22] Infrared spectroscopy Conformation. In C. H. W. Hirs, Serge N. Timasheff. *Methods in enzymology* (Vol. 26, pp. 455-472). Academic Press. Enzyme Structure, Part C Volume 26.

Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (2007). *Tamime and Robinson's yogurt: science and Technology*. Elsevier.

Timmerman, H. M., Mulder, L., Everts, H., Van Espen, D. C., Van Der Wal, E., Klaassen, G., y Beynen, A. C. (2005). Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *Journal of Dairy Science*, 88(6), 2154-2165.

Uhde, F. L., Kaufmann, T., Sager, H., Albini, S., Zanoni, R., Schelling, E., & Meylan, M. (2008). Papers y Articles Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in in Switzerland. *Veterinary Record*, 163, 362–366.

Vera Peña, M. Y., Cortés Rodríguez, M., & Valencia García, F. E. (2019). Spray Drying of Lactic Acid Bacteria. *Ingeniería y Ciencia*, 15(29), 179-213.