

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**ESTUDIO DE LA VIDA DE ANAQUEL DE PROBIÓTICOS EN PRESENCIA DE
LA MICROALGA *CHLORELLA* SP. EN FLAN**

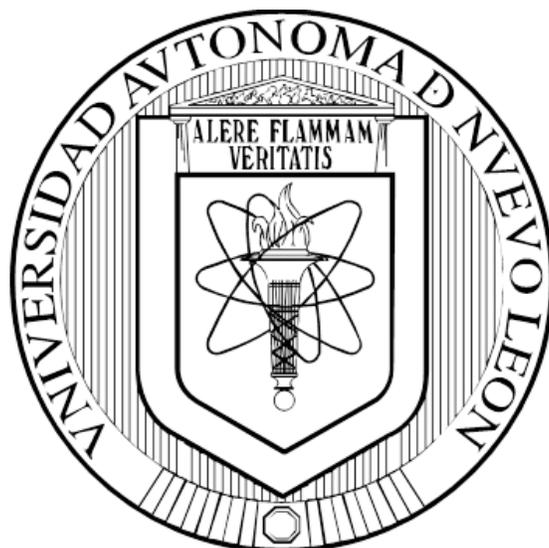
POR

Q.B.C. SERVANDO HORACIO CANTÚ BERNAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

MAYO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**ESTUDIO DE LA VIDA DE ANAQUEL DE PROBIÓTICOS EN PRESENCIA DE
LA MICROALGA *CHLORELLA* SP. EN FLAN**

POR

Q.B.C. SERVANDO HORACIO CANTÚ BERNAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

MAYO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



**ESTUDIO DE LA VIDA DE ANAQUEL DE PROBIÓTICOS EN PRESENCIA DE
LA MICROALGA *CHLORELLA* SP. EN FLAN**

POR

Q.B.C. SERVANDO HORACIO CANTÚ BERNAL

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

MAYO, 2017

LUGAR DE TRABAJO

El desarrollo experimental del presente trabajo se llevó a cabo en las unidades de Formulación de Biológicos e Inmunobiología y Acarreadores de Drogas de la Facultad de Ciencias Biológicas, en el laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas, ambos ubicados en la Ciudad Universitaria de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y en el Laboratorio de Microbiología e Inmunología del Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Sonora Regional Sur, bajo la dirección de la Dra. Patricia Tamez Guerra y de la Dra. Guadalupe González Ochoa.

**ESTUDIO DE LA VIDA DE ANAQUEL DE PROBIÓTICOS EN
PRESENCIA DE LA MICROALGA *CHLORELLA* SP. EN FLAN**

Comité de Tesis

Dra. Patricia Tamez Guerra
Director de Tesis

Dra. Guadalupe González Ochoa
Director externo

Dr. Ricardo A. Gómez Flores
Secretario

Dr. José Alberto Valadéz Lira
Vocal

Dr. Ulrico Javier López Chuken
Vocal

Dra. María Porfiria Barrón González
Vocal

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores la Dra. Patricia Tamez Guerra y Dra. Guadalupe González Ochoa por su apoyo constante, sus enseñanzas, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y proporcionarme un espacio para la realización de este proyecto. También una mención al resto de mi comité por su colaboración y asistencia a los seminarios.

A la Dra. María Porfiria Barrón González por su atención, disponibilidad y valiosos consejos para el desarrollo de este proyecto, así como también agradecer al Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por su atención brindada.

Al M.C Julio César Beltrán Rocha y al Dr. Ulrico Javier López Chuken del el laboratorio de Ciencias de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas por compartir conmigo sus conocimientos y por facilitarme los medios necesarios para la realización de los experimentos con microalgas.

A mis compañeros y al personal del laboratorio de Formulación de Biológicos que fueron un apoyo: Oziel Zúñiga, Alonso Orozco, Raúl Reyna, Dra. Julissa Ek Ramos, Víctor Cruz, Noé Jiménez, Adán Galindo, Teodora Cavazos, Laiju Kuzhuppillymyal, Denisse Aguilar, Ana Barajas, Sergio Torres, Verónica Padilla, Nora Mares, Juan Ballesteros, Enriqueta Monreal, además de mis compañeros del Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Universidad de Sonora Armando Avilés, Ricardo Romero, Maribel Domínguez y Michel Flores.

A mis amigos Guadalupe Quintero, Mariela Garfio, Ana Arriaga, Saraí Gámez, Maritza Flores, Mariana Cuesy y Óscar Pérez, Rossana Gamiño, por todas esas horas y buenos momentos de convivencia.

También un personal agradecimiento al Dr. José Manuel Velarde Cantú por el apoyo brindado en mi estancia en esta Ciudad, gracias.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por la beca otorgada para el desarrollo de mis estudios de Maestría

A mi familia por el apoyo y comprensión a lo largo de esta etapa de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Pág.
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDO.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	ix
NOMENCLATURA	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. HIPÓTESIS.....	4
4. OBJETIVO GENERAL.....	5
4.1 Objetivos específicos.....	5
5. ANTECEDENTES.....	6
5.1 Probióticos.....	6
5.1.1 Criterios para la selección de bacterias probióticas	7
5.1.2 Mecanismo de acción de los probióticos	8
5.1.3 Efectos benéficos de los probióticos a la salud.....	9
5.2 Principales géneros utilizados como probióticos.....	10
5.2.1 Bacterias del ácido láctico.....	10
5.2.2 Características generales del género <i>Lactobacillus</i>	11
5.3 Producción de Microorganismos Probióticos.....	13
5.4 Microalgas	15

5.4.1	Propiedades benéficas de las microalgas	16
5.4.2	<i>Chlorella</i> sp.....	17
5.4.3	Tipo de cultivo de microalgas.....	18
5.5	Efectos de la adición de microalgas en productos probióticos.....	20
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1	Reactivos	22
6.2	Cepas microbianas.....	23
6.3	Caracterización molecular de <i>Chlorella</i> sp.....	23
6.3.1	Purificación del amplicón y secuenciación.....	24
6.4	Mantenimiento de las cepas empleadas en este estudio	24
6.5	Cinética de bacterias probióticas por el método turbidimétrico	25
6.6	Producción de la microalga	26
6.6.1	Evaluación de medios de cultivo para la producción de <i>Chlorella</i> sp.....	26
6.6.2	Producción de <i>Chlorella</i> sp. a nivel de fotobiorreactor	26
6.7	Combinación de probióticos y <i>Chlorella</i> sp.....	27
6.8	Evaluación de la vida de anaquel de los probióticos en flan	28
6.9	Análisis Estadístico.....	29
7.	RESULTADOS.....	30
7.1	Caracterización molecular de <i>Chlorella</i> sp.....	30
7.2	Cinética de crecimiento por el método turbidimétrico	30
7.3	Evaluación de medios de cultivos para la producción de <i>Chlorella sorokiniana</i>	32
7.4	Monitoreo de la producción de <i>Chlorella sorokiniana</i> a nivel de fotobiorreactor.....	33
7.5	Estudio de la viabilidad de probióticos en flan adicionados con <i>Chlorella sorokiniana</i>	34

8. DISCUSIÓN	38
9. CONCLUSIONES	42
10. PERSPECTIVAS	43
11. REFERENCIAS	44
ANEXO I	50
ANEXO 2.....	51
RESUMEN BIOGRÁFICO	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Amplificación del gen 18s rDNA con los <i>primers</i> P2F y P2R en gel de agarosa al 1.5%.	30
Figura 2. Cinética de crecimiento de bacterias probióticas por el método turbidimétrico a 635 nm durante 15 h	31
Figura 3. Cinética de crecimiento de <i>Chlorella sorokiniana</i> en 2 diferentes medios preparados con agua destilada y con agua común.	32
Figura 4. Cinética de crecimiento durante la producción de <i>Chlorella sorokiniana</i> a nivel de fotobiorreactor.....	33
Figura 5. Evolución del cultivo de <i>C. sorokiniana</i> durante el periodo de producción de biomasa en fotobiorreactor.	34
Figura 6. Viabilidad de <i>Lactobacillus plantarum</i> en flan adicionado con diferentes concentraciones de <i>Chlorella sorokiniana</i> durante el almacenado a 4°C.....	35
Figura 7. Viabilidad de <i>Bifidobacterium longum</i> en flan adicionado con diferentes concentraciones de <i>Chlorella sorokiniana</i> durante el almacenado a 4°C.....	36
Figura 8. Viabilidad de probióticos (<i>L. plantarum</i> + <i>B. longum</i>) en flan adicionado con diferentes concentraciones de <i>Chlorella sorokiniana</i> durante el almacenado a 4°C	37

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>Chlorella</i> sp.....	15
Tabla 2. Relación de probióticos en las formulaciones a evaluar en el presente trabajo.	28
Tabla 3. Porcentaje de identidad de secuencias del gen 18s rDNA de 9 especies representativas del género de <i>Chlorella</i>	30
Tabla 4. Publicaciones sobre el efecto de la adición de microalgas en la viabilidad de cultivos probióticos durante su almacenamiento a 4°C.....	41

NOMENCLATURA

° C	Grados Celsius
µm	Micrómetro
µL	Microlitro
18s	Subunidad ribosomal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IgA	Inmunoglobulina A
IL-10	Interleucina 10
lm	Lumens
Log10	Logaritmo base 10
min	Minutos
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
pb	Pares de bases
PBS	Solución buffer fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrogeno
rDNA	Secuencia codificante para ácido ribonucleico ribosomal
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
sp.	Sin especie
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

En los últimos años, estudios han demostrado los beneficios de la ingesta de probióticos a la salud, por ello actualmente existe un interés en desarrollar nuevos alimentos funcionales y de mejor calidad nutricional. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto prebiótico de la microalga *Chlorella sorokiniana* en la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* y *Bifidobacterium longum* en un flan durante su almacenamiento a 4°C. Se evaluaron 9 formulaciones: control, probiótico más *C. sorokiniana* (1×10^6 UFC/g), probiótico más *C. sorokiniana* (1×10^9 UFC/g), solos o en combinación. En cada formulación se determinó mediante recuento en placa (UFC), la viabilidad del probiótico cada 4 días por 30 días. La adición de *C. sorokiniana* a diferentes concentraciones no tuvo efecto significativo ($P > 0.05$) sobre la viabilidad de los probióticos por separado, pero tuvo un efecto altamente significativo ($P < 0.01$) sobre la viabilidad de los probióticos al estar en combinación y a una concentración de *C. sorokiniana* de 1×10^9 UFC/g, manteniendo la viabilidad de los probióticos por arriba de 10^6 UFC/g durante 30 días de almacenamiento a 4°C.

ABSTRACT

In recent years, studies have shown the benefits of probiotic intake to health, therefore there is currently an interest in developing new functional foods and better nutritional quality. The objective of this study was to evaluate the prebiotic effect of the microalga *Chlorella sorokiniana* on the viability of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in a flan, during storage at 4° C. We evaluated 9 formulations: control, probiotic plus *C. sorokiniana* (1x10⁶ CFU/g), probiotic plus *C. sorokiniana* (1x10⁹ CFU/g), alone or in combination. In each formulation, the viability of the probiotic was determined by plaque counting, every 4 days for 30 days. The addition of *C. sorokiniana* at different concentrations did not have a significant effect ($P > 0.05$) on probiotic viability alone, but had a highly significant effect ($P < 0.01$) on probiotic viability in combination and *C. sorokiniana* at 1x10⁹ CFU/g, maintaining the viability of probiotics above 10⁶ CFU/g for 30 days of storage at 4°C.

1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son definidos como microorganismos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped (FAO/WHO, 2006). Estos son cada vez más aceptados como una alternativa profiláctica para los seres humanos y animales, ya sea para el tratamiento de enfermedades relacionadas a patógenos o para ser utilizados en tratamientos preventivos (Lauzon et al. 2014).

Existen reportes en los que se describen los efectos positivos de los probióticos como: balance de la microbiota intestinal, estimula el sistema inmune, produce compuestos antimicrobianos y antivirales, mejora el metabolismo de lactosa, reduce el nivel sérico, mejora la absorción de minerales, prevenir el desarrollo de cáncer. Un punto importante, para que los probióticos puedan presentar estos beneficios a la salud es que deben de estar viables y en un cantidades abundantes por volumen (mililitro) o peso (gramo), siendo el valor recomendado de 1×10^6 UFC al momento de ingerirlas (Beheshtipour et al. 2013).

Las bacterias probióticas más utilizadas en la industria alimenticia pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* debido a que se ha demostrado que son seguros al formar parte de la microbiota intestinal de los seres humanos (Amara y Shibl 2013; Tripathi y Giri 2014).

El desarrollo de alimentos con dosis adecuadas de los probióticos es un reto, debido a diversos factores que afectan la viabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento. Entre los cuales tenemos pH, acidez, presencia de otros microorganismos, el efecto de la temperatura, contenido de oxígeno y por último el tipo de tecnología aplicada para su formulación. En busca de una alternativa para tratar de disminuir el efecto de estos factores y aumentar la viabilidad de los microorganismos probióticos, se ha empezado a adicionar los productos con biomasa de algunas microalgas y así como para mejorar los atributos nutricionales (Beheshtipour et al. 2013).

Las microalgas del género *Chlorella* se han sugerido como suplemento nutricional por sus efectos benéficos y por ser una fuente importante de proteínas, ácidos grasos, compuestos antioxidantes y vitaminas debido a su alto contenido de todos estos nutrientes. Así mismo existen varios estudios en los que se ha demostrado que *Chlorella* sp. posee actividad en la supresión de algunos tumores, por lo tanto se considera como una alternativa el ingerirlos en combinación con probióticos (de Morais et al. 2015).

En estudios en leches fermentadas, se ha observado que la adición de biomasa tanto de *Chlorella vulgaris* y *Arthorspira plantesis* tienen un efecto positivo en la viabilidad de la cepa LA-5 de *Lactobacillus acidophilus*, la BB-12 de *Bifidobacterium lactis*, además de una de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y otra de *Streptococcus thermophilus* durante el proceso de fermentación del yogurt; además se ha reportado su sobrevivencia durante el almacenamiento hasta por 28 días (Beheshtipour et al. 2012).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto benéfico de la adición de biomasa de *Chlorella* sp. para incrementar la vida de anaquel de probióticos incorporados a un alimento de refrigeración elaborado a base de lácteos, en este caso en flan.

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe interés en desarrollar alimentos que contengan probióticos (llamados alimentos funcionales) debido a los beneficios científicamente comprobados que aportan a la salud, ayudando a mantener un balance de la microbiota intestinal, estimulando el sistema inmune, ayudando a una mejor absorción de lactosa y minerales, reduciendo los niveles de colesterol sérico, además de poseer propiedades antimicrobianas, antivirales, antitumorales y antimutagénicas.

La tendencia actual de consumir probióticos acompañados de alimentos prebióticos ha resultado en nuevos productos como leche, helados, cereales, varios tipos de queso, bebidas no lácteas fermentadas, etc. Uno de los principales problemas al incorporar probióticos en los alimentos es su estabilidad, ya que existen varios factores que pueden afectar la supervivencia y por ende su efectividad. Entre los principales factores que afectan su viabilidad está la temperatura (desde su producción hasta su consumo), cambios de pH y porcentaje de humedad, disposición de oxígeno durante el almacenamiento, exceso de sales o conservadores, etc.

Para esto, se han evaluado agentes conservadores que permitan mantener la viabilidad de los probióticos, quienes ayuden a proteger de cambios ambientales durante el proceso de envasado, distribución y almacenamiento.

Se ha reportado que la adición de biomasa de microalgas en productos con probióticos, favorece la supervivencia de estos últimos durante el almacenamiento, mejorando su vida de anaquel.

Por ello, en el presente trabajo se evaluó la vida de anaquel de probióticos en flan adicionado con un alga clorofita, y de esta manera establecer si su adición incrementa la viabilidad de probióticos durante el almacenamiento del alimento.

3. HIPÓTESIS

El uso de *Chlorella* sp. incrementa la vida de anaquel de los microorganismos probióticos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* presentes en flan.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la viabilidad de cepas seleccionadas de los probióticos *Bifidobacterium longum* y *Lactobacilos plantarum* en combinación con el alga clorofita *Chlorella* sp., adicionados a flan, durante su almacenamiento.

4.1 Objetivos específicos

- Caracterizar molecularmente el aislamiento seleccionado de la microalga *Chlorella* sp.
- Determinar las condiciones de producción de una cepa seleccionada de *Chlorella* sp. a nivel de fotobioreactor.
- Formular un flan con una concentración inicial de 10^9 UFC/mL de cada cepa probiótica, en combinación con diferentes concentraciones de biomasa de *Chlorella* sp.
- Cuantificar la viabilidad de los probióticos presentes en flan al combinarlos con la microalga después de almacenarla en refrigeración ($4 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 30 días.

5. ANTECEDENTES

5.1 Probióticos

Los probióticos son microorganismos que al ser consumidos en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped (FAO/WHO, 2002). Estos son cada vez más aceptados como una alternativa profiláctica para los seres humanos y animales, ya sea para el tratamiento de enfermedades relacionadas a patógenos o para ser utilizados en tratamientos preventivos (Lauzon et al. 2014).

En 1906, Tissier demostró que las bifidobacterias son la especie que predomina en la microflora de los lactantes amamantados y también comprobó que las bifidobacterias modulaban la microflora intestinal de niños con infecciones intestinales. En 1908, Metchnikoff relacionó los efectos benéficos de los microorganismos probióticos sobre la salud intestinal y longevidad en una población de Bulgaria, donde los pobladores consumían alimentos a base de leche fermentada que contenían especies de *Lactobacillus*. Según él, los procesos de putrefacción en el intestino permitían la formación de toxinas que contribuían a la degeneración del cuerpo y propuso que el consumo de bacterias ácido lácticas en la leche fermentada, podía disminuir los efectos adversos y reducir los procesos dañinos en el organismo (Manzano et al. 2012; Tripathi y Giri 2014)

En 1930, Shirota aisló de heces humanas una cepa de *Lactobacillus casei*, a la que se le asignó la subsp. *shirota*, que era capaz de sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal; él uso esta cepa para desarrollar una bebida con probióticos conocida como “Yakult” (Manzano et al. 2012).

El término "probiótico" fue inicialmente utilizado como un antónimo de la palabra antibiótico, cuya raíz es de origen griego (pro = vida). En 1965, Lilly y Stilwell utilizaron por primera vez el término probiótico para describir aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otro, en contraposición al término antibiótico, y luego de varias redefiniciones, el grupo de trabajo del Programa Conjunto de la Alimentación y la Organización para la Agricultura

y la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS por sus siglas en ingles), definió en el 2001 al término "probiótico" como "microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen una acción fisiológica beneficiosa sobre la salud del hospedero" (FAO/WHO, 2002; Manzano et al. 2012).

5.1.1 Criterios para la selección de bacterias probióticas

Los microorganismos probióticos utilizados en los alimentos deben ser capaces de sobrevivir el paso por el estómago hasta llegar e instalarse en el intestino; es decir, que deben de tener la capacidad de resistir las condiciones de pH bajo debido a los jugos gástricos y la exposición a altas concentraciones de sales biliares; así también, deben colonizar y proliferar en el tracto digestivo. Por otra parte, deben de ser seguros para el huésped (Saad et al. 2013). Por esto, se deben tomar en cuenta algunos criterios desde el punto de bioseguridad, funcional y tecnológico, para poder considerar a una cepa de un microorganismo como probiótica, como por ejemplo:

- La identificación taxonómica y clasificación, ya que esto puede dar indicio de su origen y fisiología de la cepa. Los principales avances en métodos de biología molecular han permitido la secuenciación de rRNA 16S / 23S, por consiguiente la generación de grandes bases de datos de secuencias, que pueden facilitar una clasificación rápida y precisa de una cepa probiótica (Morelli 2007; Vasiljevic y Shah 2008).
- El origen de la cepa debe ser de aislamiento de humanos. Por lo general, las cepas se han aislado a partir de muestras fecales de sujetos humanos sanos, y por lo tanto se han considerado como "parte de la microbiota intestinal humana normal y saludable" (Harzallah y Belhadj 2013). Esto se puede argumentar que al ser aislada de un humano, puede desarrollarse en un ambiente similar de donde fue aislada y carecer efectos adversos como patogenicidad (Saarela et al. 2000).
- La cepa probiótica no debe de poseer factores de virulencia (toxinas, enzimas) y/o patogenicidad, tampoco poseer plásmidos resistentes a antibióticos, por lo

tanto, se debe de evaluar su patogenicidad mediante ensayos *in vitro* o en modelos de experimentación (Lauzon et al. 2014; Luiz et al. 2015).

- Debe de sobrevivir durante su tránsito por tracto digestivo, siendo capaz de tolerar concentraciones bajas del pH gástrico, las altas concentraciones de sales biliares (Luiz et al. 2015).
- Debe de adherirse al epitelio intestinal, ya que es el principal mecanismo al cual se debe su principal beneficio, al competir con patógenos por sitios de las paredes del intestino, reduciendo así el riesgo de una enfermedad causada por estos patógenos (Luiz et al. 2015).

5.1.2 Mecanismo de acción de los probióticos

El mecanismo de acción de los probióticos puede variar de una especie a otra, además no siempre colonizan el tracto intestinal al ser ingeridos, ya que algunos probióticos son transitorios como lo son algunas especies de *Lactobacillus*. A este respecto, mientras que *Bifidobacterium longum* tiene la capacidad de llegar a ser parte de la microbiota del intestino humano después de ser ingerido, *Lactobacillus casei* sólo ejerce sus efectos benéficos al ir transitando por el intestino, pero no posee la capacidad de colonizar las paredes intestinales (Gogineni et al. 2013; Harzallah y Belhadj 2013).

Se ha demostrado que los probióticos poseen propiedades antagonistas contra bacterias patógenas, suprimiendo su crecimiento a través de la producción de antimicrobianos como defensinas, bacteriocinas, peróxido de hidrogeno, óxido nítrico y ácidos grasos de cadena corta que reducen el pH del lumen intestinal (como el ácido láctico y el ácido acético). Además, en algunos casos se ha observado que algunas cepas inducen la producción de mucina, con lo que logran colonizar efectivamente las paredes intestinales (Gogineni et al. 2013).

Por otra parte, algunos probióticos poseen la capacidad de modular la respuesta inmune y tener un efecto antitumoral a través de la inducción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β , o bien por la estimulación de producción de IgA y activación de células T reguladoras. Otra forma descrita es por su interacción con

células epiteliales del huésped, ya que al adherirse los probióticos a estas células se desencadena una serie de señales en cascadas, dando como resultado la activación de algunos mecanismos y de ciertas células asociadas a la respuesta inmune (Corr et al. 2009; Oelschlaeger 2010).

La mayoría de las cepas de lactobacilos y algunas de bifidobacterias han demostrado una gran actividad anti-mutagénica en sistemas *in vitro*, esto se debe a su capacidad para metabolizar e inactivar sustancias mutagénicas. También se ha demostrado que ciertos probióticos pueden metabolizar compuestos aromáticos aminados, lo cual reduce los niveles de componentes carcinogénicos y por ende el posible daño que causarían al DNA (Shah 2007).

5.1.3 Efectos benéficos de los probióticos a la salud

En la actualidad, el uso de probióticos ha ido en incremento debido a la gran variedad de beneficios a la salud que otorga el consumo de estos, debido a las propiedades que poseen.

Dentro de los efectos positivos se han descrito: balance de la microbiota intestinal, estimulación del sistema inmune, actividad antimicrobiana y antiviral, mejoramiento en metabolismo de lactosa, reducción en el nivel sérico, mejora en la absorción de minerales, propiedades antitumorales y antimutagénicas (Beheshtipour et al. 2013). Por otra parte, el desarrollo de terapias basadas en probióticos está adquiriendo importancia debido a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos, donde el uso de probióticos puede ser una alternativa que permita disminuir el uso indiscriminado de antibióticos y evitar el daño en la viabilidad de la microbiota intestinal (Nagpal et al. 2012)

Un punto importante para obtener tales beneficios es que los probióticos deben de estar presentes en el alimento como mínimo en una concentración por mililitro o gramo de entre $10^6 - 10^8$ UFC al momento de ser ingeridos, para que puedan llegar con una cantidad considerable al tracto intestinal (Beheshtipour et al. 2012).

5.2 Principales géneros utilizados como probióticos

Existe una amplia variedad de géneros y especies que son considerados como cepas probióticas; los microorganismos utilizados en la producción de probióticos no se limita sólo al uso de bacterias ácido lácticas (BAL) sino que también se han utilizado levaduras con propiedades probióticas (Amara y Shibl 2013). Entre las especies de *Lactobacillus* reportadas con propiedades probióticas están: *acidophilus*, *brevis*, *casei*, *cellobiosus*, *crispatus*; *delbrueck*, *farciminis*, *fermentum*, *gasseri*, *lactus*, *paracasei*, *plantarum*, *reuteri*, *rhamnosum* y *sporogenes*. De igual forma, dentro de las especies de *Bifidobacterium* están: *adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve*, *infantis*, *lactis*, *longum* y *thermophilum*. Otros géneros descritos como probióticos incluyen algunas especies de *Streptococcus*: *alivarius*, *cremoris*, *diacetylactis*, *intermedius*, *lactis* y *thermophilis*; además de algunas levaduras como *Saccharomyces boulardii* y *S. cerevisiae*. De igual forma se han utilizado algunas especies de los géneros *Enterococcus* y *Lactococcus*, debido a sus efectos benéficos a la salud. De cualquier forma, las más comercializadas por la industria alimenticia son los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, ya que son seguros y muchas de sus especies forman parte de la microbiota intestinal de seres humanos (Amara y Shibl 2013; Tripathi y Giri 2014).

5.2.1 Bacterias del ácido láctico

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representadas por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general, las bacterias ácido lácticas son cocos o bacilos gran positivos, no esporulados, inmóviles, anaerobios, microaerófilos o aerotolerantes, oxidasa y catalasa negativa, carecen de citocromos, no reducen nitrato a nitrito y producen ácido láctico como principal producto de la fermentación de carbohidratos (Harzallah y Belhadj 2013).

Según la fermentación de lactosa las BAL se clasifican en homofermentativas (producen sólo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias) (Parra-Huertas 2010; Lahtinen et al. 2011). Entre géneros más importantes de este grupo de bacterias se encuentran los géneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, además de *Bifidobacterium* (Biavati et al. 2000; Vasiljevic y Sha 2008).

5.2.2 Características generales del género *Lactobacillus*.

Los lactobacilos son bacilos Gram positivos que forman parte de la flora normal del tubo digestivo en humanos, así como también es parte de la flora intestinal de muchas otras especies animales. En cuanto a su morfología, los lactobacilos son alargados en forma de cocobacilos, la mayoría de las especies son inmóviles, son anaerobios o micro-aerofílicos, catalasa y oxidasa negativos, no forman esporas, generalmente se caracterizan por un bajo contenido en G+C (50% aproximadamente del DNA), posee un metabolismo fermentativo produciendo ácido láctico como resultado de la fermentación de carbohidratos pero algunas especies pueden producir otros compuestos ácido acéticos y otras sustancias. La temperatura de crecimiento oscila entre 2° a 53°C y son capaces de desarrollarse en un rango de pH entre 3 y 8, siendo su temperatura óptima de entre 30° a 40°C y un pH óptimo 5.5 a 6.2 (Hammes y Vogel 1995; Koneman y Allen 2008; Salvetti et al. 2012). En la actualidad, el género *Lactobacillus* abarca alrededor de 145 especies pertenecientes al filo *Firmicutes* (Turroni et al. 2014).

Algunas cepas del género *Lactobacillus* se han empleado en la producción de yogurt, queso y vino, entre otros productos fermentados. En estos casos, los azúcares se metabolizan en ácido láctico creando un ambiente no favorable para microorganismo patógenos, donde algunas cepas son efectivas para prevenir patógenos causantes de diarreas posterior a la administración de antibióticos y permiten la preservación de los alimentos. La gran mayoría de las especies que se han seleccionado como probióticos poseen muchas propiedades esenciales como tolerar sales biliares y jugos gástricos,

adherirse al epitelio intestinal, inhibir especies patógenas por medio de la producción de compuestos antimicrobianos y ayudar a disminuir el colesterol (Fijan 2014).

5.2.2.1 *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum es un bacilo Gram positivo, heterofermentativo y anaeróbico, productor de ácido láctico; esta especie tiene una gran variedad de hábitats incluyendo el tracto gastrointestinal (donde se aísla de la saliva). Es reconocido como una cepa segura en base al gran historial en el consumo de *Lactobacillus* en humanos. Además de ser seguro, *L. plantarum* es muy fácil de cultivar y por lo tanto es de gran interés en la industria alimenticia, además de su capacidad para sobrevivir a través del tránsito gástrico y colonizar el tracto intestinal de seres humanos y otros mamíferos (Liu et al. 2015; Zago et al. 2011).

Lactobacillus plantarum posee la capacidad de utilizar diferentes azúcares como sustratos para su metabolismo, captar péptidos e hidrolizarlos en aminoácidos y poseer un gran número de proteínas ancladas a la superficie, sugiriendo que tiene potencial para adherirse en muchas superficies del intestino a diferentes niveles. El gran número de genes que posee le permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales; por ejemplo, algunas especies presentan una gran tolerancia al ácido clorhídrico (pH 2.0) (de Vries et al. 2006).

Varias propiedades benéficas que se han asociado al consumo de *L. plantarum* incluyen la reducción de la incidencia de diarrea y estreñimiento, capacidad antagonista contra enteropatógenos en células de carcinoma de colon (Caco-2) y la capacidad de mejorar la respuesta inmune, entre otros (Liu et al. 2015).

5.2.2.2 Características generales del género *Bifidobacterium*

Las bifidobacterias se caracterizan por ser Gram positivas, no esporuladas, inmóviles y catalasa-negativas. Son pleomórficas, incluyendo las formas de bacilos cortos, bacilos curvados o bacilos bifurcados con forma de Y, anaerobios, con

temperatura óptima de entre 37 y 41°C en las especies que colonizan al humano; sin embargo, no crecen por debajo de 20°C ni por arriba de 46 °C. Su pH óptimo se encuentra entre 6 y 7, pero no crecen por debajo de 4.5-5.0 ni por encima de 8-8.5 (Biavati et al. 2000; Vasiljevic y Shah 2008).

Los representantes de este género, naturalmente colonizan el tracto gastrointestinal de humanos y son importantes para el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis de la microbiota intestinal; esto se atribuye a su capacidad de producir bacteriocinas, que son agentes bacteriostáticos de amplio espectro. Su presencia en el intestino se ha asociado con algunos efectos benéficos como prevención de diarreas, tolerancia a lactosa y estimulación del sistema inmune (Biavati et al. 2000).

Diferentes especies se han usado ampliamente como probióticos debido a su gran capacidad de resistir sales biliares, lo cual es muy importante para poder establecerse en el tracto intestinal y ejercer sus propiedades benéficas a la salud. Algunas subespecies que se han indicado dentro de las más importantes incluyen a: *B. animalis* subsp. *animalis*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *B. bifidum*, *B. breve* y *B. longum*. Además, el uso de bifidobacterias en conjunto con otros probióticos ha demostrado evitar el estreñimiento, la diarrea del viajero, la diarrea asociada a antibióticos y la alergia a ciertos alimentos, entre otras afecciones en el tracto gastrointestinal (Fijan 2014).

5.3 Producción de Microorganismos Probióticos

Una vez que una determinada cepa o conjunto de cepas es seleccionada por sus características probióticas, el paso siguiente consiste en el cultivo. Dentro de las formas en que el cultivo puede llevarse a cabo están el modo discontinuo (batch), el modo continuo y el semicontinuo. El uso de uno u otro estará determinado principalmente por las características del microorganismo y también por lo que se desea obtener, si se desea fomentar la producción de biomasa o bien la producción de un metabolito.

El cultivo discontinuo, es el proceso más utilizado por la industria en la producción de probióticos. Sin embargo, la utilización de cultivos continuos y sistemas

de cultivos inmovilizados están siendo estudiados en la producción de probióticos (Foerst & Santivarangkna 2015).

En el cultivo *batch*, los microorganismos se inoculan en un reactor (fermentador) el cual contiene el medio de cultivo seleccionado; técnicamente, el proceso es operado hasta llegar a una densidad máxima celular, por lo general es cuando los nutrientes en el medio se han agotado (Foerst & Santivarangkna 2015).

Otra forma de producción de probióticos es mediante el cultivo continuo, en este caso, existe un volumen constante de medio al que continuamente se le añade medio fresco y también se le es retirado el medio usado. Por lo tanto el medio se renueva y su composición no cambia a lo largo del tiempo, lo que permite mantener el crecimiento de la población de forma indefinida, una vez alcanza el estado de equilibrio dentro del biorreactor. La principal ventaja del cultivo continuo es que se remueven algunos productos de fermentación (Doleyres y Lacroix 2005).

En la actualidad, se ha propuesto la utilización de cultivos inmovilizados ya que ofrecen una mayor ventaja en cuanto a producción de biomasa y metabolitos comparado con sistemas de cultivos en lo que las células no se inmovilizan con agentes encapsulantes (Lacroix y Yildirim 2007).

El sistema cultivo de células inmovilizadas consiste en retener al microorganismo en una sección del biorreactor para lograr altas concentraciones de células. Para esto se utilizan diferentes métodos de inmovilización de bacterias probióticas como la microencapsulación y el sistema de retención en membrana (Doleyres y Lacroix 2005).

En el biorreactor con sistema de retención de membrana, las células son retenidas por una membrana de ultrafiltración o microfiltración, mientras que las moléculas pequeñas se difunden a través de los poros de la membrana de acuerdo a su tamaño debido al flujo continuo de medio fresco entrante. Como resultado, las células se concentran en la membrana y los metabolitos se eliminan en el permeado (Lacroix y Yildirim 2007).

5.4 Microalgas

Las microalgas son microorganismos unicelulares fotosintéticos que crecen en agua dulce o salada y poseen una morfología variada con un diámetro de 3-10 μm , pueden ser unicelulares o multicelulares, soportan condiciones ambientales muy extremas como temperatura, presión osmótica, salinidad y radiación UV (Christaki et al. 2013). Existen microalgas procariotas (por ejemplo las cianobacterias) y eucariotas (como las clorofitas) (Tabla 1) y se encuentran distribuidas en todos los ecosistemas del planeta, no sólo en ecosistemas acuáticos, lo que representa una gran variedad de especies que viven en una amplia gama de condiciones ambientales (Zehr et al. 2008).

Se estima que existen alrededor de 50,000 especies, pero sólo unas 30,000 especies se han podido estudiar (Mata et al. 2010; de Morais et al. 2015). Estos microorganismos al ser fotosintéticos, realizan una función clave en el ecosistema, ya que aproximadamente el 40% de la fotosíntesis global es gracias a las microalgas.

Tabla 1.
Taxonomía de *Chlorella sp.*

Reino:	<i>Protista (Primoplantae)</i>
División:	<i>Chlorophyta</i>
Clase:	<i>Trebouxiophyceae</i>
Orden:	<i>Chlorellales</i>
Familia:	<i>Chlorellaceae</i>
Género:	<i>Chlorella</i>

Las cianobacterias carecen de organelos como plastos, mitocondrias, núcleo, aparato Golgi y flagelos, y presentan más similitud con las bacterias que con las algas. Sin embargo, las algas eucariotas si poseen muchos de estos organelos característicos de los eucariotas que les permiten sobrevivir y reproducirse. Las algas eucariotas se clasifican principalmente en base a su pigmentación, ciclo de vida y su estructura celular. Entre las clases más importantes se encuentran: algas verdes (clorofitas), algas rojas (rodofitas) y diatomeas (bacilariofitas), las cuales pueden ser autótrofas (usan compuestos inorgánicos como el CO₂ como fuente de carbono, sales y luz como fuente de energía para su crecimiento), mientras algunas otras pueden ser heterótrofas (usan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía), por lo que requieren de compuestos orgánicos para su desarrollo. Para las algas autótrofas, la fotosíntesis es vital para su sobrevivencia, mediante la cual convierten la radiación solar y el CO₂ absorbido por los cloroplastos, en ATP y O₂ para ser utilizado como energía celular (Brennan y Owende 2010). Algunas de ellas se han comercializado como suplemento alimenticio como lo son *Spirulina* y *Chlorella*, por la gran cantidad de propiedades benéficas que confieren después de ingerirlas gracias a los compuestos que producen, por lo que las agencias gubernamentales internacionales *Food and Drug Administration* (FDA) y *Generally Recognized as Safe* (GRAS) aprobaron su empleo para consumo humano (de Morais et al. 2015).

5.4.1 Propiedades benéficas de las microalgas

Las microalgas son una importante fuente de compuestos bioactivos y sustancias naturales. Muchos metabolitos aislados de estos microorganismos han demostrado tener actividad biológica y beneficios potenciales a la salud. Estos metabolitos se pueden obtener de la producción de biomasa de microalgas como lo son proteínas, polisacáridos, lípidos, vitaminas, enzimas, esteroides, todos estos con un gran potencial de utilidad en el área farmacéutica, así como en la nutricional (de Morais et al. 2015).

Actividad antioxidante: las microalgas se pueden considerar como una fuente importante de compuestos antioxidantes que podrían ser adecuados para la protección en

contra de especies reactivas de oxígeno formadas ya sea por el metabolismo propio y/o incluso por factores externos como la radiación UV, el estrés, etc. Debido a que las microalgas poseen sustancias antioxidantes de diferente composición como son la vitamina E (α -tocoferol) y los carotenoides los cuales son solubles en solventes no polares, mientras que también podemos encontrar polifenoles, ficobiliproteínas y vitamina C como compuestos solubles en soluciones acuosas (Shalaby 2011).

Actividad antiviral: Los polisacáridos sulfatados de las microalgas marinas poseen la capacidad de interferir en la absorción y penetración del virus en la célula, aparentemente esto es debido a la interacción de estos compuestos con la envoltura del virus y/o con la superficie celular por lo tanto limita los sitios de adsorción del virus en la célula (Amaro et al. 2011). Estudios recientes, han demostrado que los polisacáridos sulfatados de algunas microalgas tienen la capacidad de interferir e inhibir con la síntesis viral de proteínas, además de estos también se ha reportado evidencia *in vitro* que dichos polisacáridos sulfatados inhiben selectivamente a la transcriptasa inversa en estudios, una enzima esencial para el ciclo de replicación del virus de inmunodeficiencia humana (Shalaby 2011). Así mismo, se ha reportado que las microalgas poseen efectos antibacterial y antifúngico (Amaro et al. 2011).

Actividad antitumoral: varios estudios han demostrado que los polisacáridos sulfatados de las microalgas presentan actividad anti-proliferativa en líneas celulares *in vitro*, así como actividad inhibidora del crecimiento tumoral en ratones. También se ha propuesto que estos compuestos inhiben la proliferación de células tumorales y la adhesión de células tumorales a varios sustratos, pero los mecanismos de acción no han sido completamente entendidos (Wijesekara et al. 2011).

5.4.2 *Chlorella* sp.

Chlorella es un género de algas verdes eucariotas, unicelulares que pertenecen a la división *Chlorophyta*. Es de forma esférica, miden aproximadamente 2 a 10 micras de diámetro y no poseen flagelos. *Chlorella* contiene α -clorofila y β -clorofila en sus

cloroplastos. Para su metabolismo sólo requiere dióxido de carbono, agua, luz solar y una pequeña cantidad de minerales (Beheshtipour et al. 2013; de Morais et al. 2015).

Este género de microalgas son ricas en clorofila, proteínas, polisacáridos, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales, alrededor del 53% de su peso es proteína, el 23% son carbohidratos, un 9% de su peso son lípidos mientras que un 5% son minerales. Estos resultados pueden variados dependiendo de las condiciones de cultivo. La producción de biomasa de *Chlorella* es rica en vitamina B₁₂ (vital para la formación y regeneración de células sanguíneas) (de Morais et al. 2015).

En este género se han identificado compuestos antioxidantes tales como luteína, α y β carotenos, α -tocoferol y ácido ascórbico, que pueden ayudar a reducir la incidencia de cáncer. Uno de los más importantes compuestos bioactivos es el β -1,3 glucano, un inmuno-estimulador que tiene varios efectos benéficos como la reducción de colesterol en sangre, disminución de radicales libres, y se ha reportado que posee actividad antitumoral (Beheshtipour et al. 2013).

Estudios previos realizados en el laboratorio donde se propone realizar el presente proyecto, donde se evaluaron diferentes microalgas nativas del estado de Nuevo León para medir su actividad citotóxica contra un tipo de linfoma, revelaron con las cepas de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. eran las que presentaban mayor actividad y por ende mayor potencial para emplearse como un suplemento en la prevención y/o reducción de la formación de tumores por ese tipo de cáncer (Reyna-Martínez et al. 2014).

5.4.3 Tipo de cultivo de microalgas

El cultivo de microalgas puede ser en sistemas abiertos o sistemas cerrados llamados fotorreactores. Los sistemas abiertos son lagos, laguna y/o estanques artificiales, son baratos de construir, tienen gran capacidad de producción debido a las extensas áreas que poseen, pero la mayor ventaja de estos sistemas abiertos es su sencillez, lo que resulta en bajos costos de producción y de operación. Por otra parte, estos los sistemas abiertos son muy susceptibles a contaminación por otros

microorganismos como algas y algunas especies de bacterias. En estos sistemas es difícil el control de la temperatura. Sin embargo, las principales limitaciones en sistemas abiertos es la intensidad desigual de la luz, la difusión de CO₂ a la atmosfera, y la exigencia de grandes extensiones de tierra (Singh y Sharma 2012).

Por otra parte se encuentran los sistemas de cultivo cerrados, mejor conocidos como fotorreactores. En estos fotorreactores no existe algún intercambio de gases o contaminantes con el medio ambiente y regularmente poseen una fuente de iluminación. Los fotorreactores son más costosos que los sistemas abiertos, pero tienen muchas ventajas sobre los sistemas abiertos (Singh y Sharma 2012).

Algunas de las ventajas de los fotorreactores es que al ser un sistema cerrado al ambiente, estos reducen el riesgo de contaminación del cultivo, además las condiciones como temperatura, intensidad de la luz, concentración de CO₂ entre otras, son controladas a diferencia de los sistemas abiertos (Singh y Sharma 2012).

Además, los cultivos de microalgas se pueden clasificar dependiendo si el microorganismo es fotótrofo, heterótrofo, mixótrofo o fotoheterótrofo (Chen et al. 2011).

- Los cultivos fotótrofos son aquellos en donde las microalgas utilizan la luz solar como fuente de energía y una fuente inorgánica de carbón (CO₂).
- Los cultivos heterótrofos son aquellos en donde la microalga utiliza compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono (glucosa, acetato, glicerol, fructosa, lactosa entre otros). Mediante la utilización de este tipo de cultivo se ha logrado una alta producción de biomasa.
- El cultivo mixótrofo es cuando la microalga puede obtener energía tanto del proceso de fotosíntesis como mediante la utilización de compuestos orgánicos e inorgánicos, lo que le permite a este tipo de microalgas desarrollarse bajo condiciones de fotótrofos o heterótrofos.
- Los cultivos fotoheterótrofos es cuando la microalga requiere luz como fuente de energía y además compuestos orgánicos como fuente de carbón, la diferencia

entre mixótrofo y fotoheterótrofos es que estos últimos requiere de luz y compuestos orgánicos al mismo tiempo.

5.5 Efectos de la adición de microalgas en productos probióticos.

En la actualidad, las bacterias probióticas sólo se han podido incorporar a una limitada cantidad de productos alimenticios, principalmente en productos lácteos como el yogurt, queso, helados y postres lácteos, así como en productos no lácteos como jugos de frutas, leche de soya, avenas y cereales (Ranadheera et al. 2010). Sin embargo, la incorporación de probióticos a estos productos no resulta sencilla debido a las condiciones que necesitan estas bacterias para mantenerse viables pero inactivas, donde influyen factores físico-químicos como el pH, actividad del agua, potencial redox, salinidad, anaerobiosis, etc., para mantener una óptima supervivencia. De igual forma, se deben considerar los factores que pueden afectan su supervivencia tanto en la producción, envasado y/o procesamiento, como durante el almacenado, por lo que se debe considerar la temperatura, el porcentaje de humedad, el pH, y estrés mecánico, entre otros (Tripathi y Giri 2014).

Se ha propuesto que la adición de biomasa de microalgas en los productos fermentados tiene un efecto positivo, al mejorar la viabilidad de probióticos y los atributos nutricionales de los mismos. Por esto, se ha recomendado el uso de microalgas como *Spirulina* y *Chlorella* ya que son seguras para su consumo y contienen una gran cantidad de compuestos antioxidantes, aminoácidos, proteínas, minerales, ácidos grasos polinsaturados y vitaminas, incluyendo las vitamina A, B, E y K (Beheshtipour et al. 2013). Además, la adición de biomasa de microalgas estimula el crecimiento e incrementa la viabilidad y la producción de ácido de bacterias probióticas. A este respecto, las sustancias responsables de conferir dichas propiedades se han identificado como adenina, hipoxantina y aminoácidos libres (Beheshtipour et al. 2013; Hernández-Pérez y Labbé 2014).

En un estudio realizado por Beheshtipour et al. (2012) donde evaluaron la adición de *Chlorella* y *Spirulina* (cada una por separado) en productos fermentados,

observaron que se incrementó la viabilidad de *L. acidophilus* y *B. lactis* durante el proceso de fermentación, mientras que durante el almacenamiento se mantuvo una viabilidad de arriba de 10^7 UFC/ml por 21 días. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en otro estudio donde se utilizaba la biomasa seca de *Spirulina* y *Chlorella* para estimular el crecimiento y la producción de ácido láctico en *L. plantarum* y *Enterococcus faecium*, utilizando diferentes medios de cultivo (Gyenis et al. 2005).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

Peptona de caseína (DIFCO, Reactivos y Equipo S.A. DE C.V., Monterrey, N.L.)

Extracto de levadura (DIFCO)

Cloruro de Sodio (Sigma-Aldrich Química de México, S.A., Toluca de Lerdo)

L-Cisteína (JALMEK Científica, Monterrey, N.L.)

Ácido Ascórbico (SIGMA)

Fosfato de potasio dibásico (SPECTRUM, Industrias Bioelec, S.A. de C.V., Monterrey, N.L.)

Fosfato de potasio monobásico (SPECTRUM)

Citrato férrico de amonio (SIGMA)

Glucosa (CTR Scientific, Monterrey, NL)

Hidróxido de Sodio (CTR Scientific)

6.2 Cepas microbianas

Las cepas de bacterias probióticas fueron facilitadas por el laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

- *Lactobacillus plantarum*
- *Bifidobacterium longum*

La cepa de microalga es un aislamiento de *Chlorella* sp., que se aisló del Rio San Juan Cadereyta del estado de Nuevo León, y se tiene en nuestra unidad de investigación (UFB-LIV-DEMI).

6.3 Caracterización molecular de *Chlorella* sp.

Debido a que algunas microalgas presentan una pared celular muy resistente, el cultivo de *Chlorella* sp. (40 mg de biomasa resuspendido en 1 ml de PBS) fue sometido a congelación con nitrógeno y mediante un homogenizador (Polytron PT 10-35 GT, CTR) a 8000 rpm por 1 min se lisaron las células.

Después del proceso de lisado celular, se extrajo el ADN genómico utilizando el kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, Inc. Invitrogen, S.A., Monterrey, N.L.), a partir de esto se realizó la amplificación del gen 18s utilizando los primer P2F (5´-GGC TCA TTA AAT CAG TTA TAG-3´) y P2R (5´-CCT TGT TAC GA(C/T) TTC TCC TTC-3´) propuestos por Lee y Hur (2012), los cuales amplifican para un fragmento de aproximadamente 1700 pb. bajo las condiciones de un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 30-35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento a 50-55°C por 30 seg y un proceso de extensión a 72°C por 105 seg, seguido de una extensión final a 72°C por 7 min. El producto de PCR se confirmó en un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5% a 100 volts por 35 min.

6.3.1 Purificación del amplicón y secuenciación

Una vez confirmado el producto de PCR en el gel de agarosa al 1.5%, se procedió a purificar la banda de aproximadamente 1700 pares de bases, para ello se empleó el kit Wizard SV Gel and PCR *clean-up system* (Promega, Invitrogen) y posteriormente se envió a la Unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación.

La edición y el análisis del porcentaje de similitud de la secuencia de *Chlorella* sp. se llevó a cabo en el programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* v. 7.1.9 por medio de una matriz de identidad de secuencias al comparar con secuencias ya reportadas en GenBank.

6.4 Mantenimiento de las cepas empleadas en este estudio

Para el mantenimiento de las *Chlorella* sp., ésta se mantuvo en la solución Lc a 4 °C y se realizaron pases cada 30 días, para su conservación. Para la reactivación de la microalga se tomó un inóculo del 10% y se transfirió a un matraz de 125 mL con un volumen de 50 mL de Solución Lc, el cultivo se mantuvo en fotoperiodo de 18:6 h luz/oscuridad por aproximadamente 10 días con agitación constante a 120 rpm en un agitador orbital (Orbit 1900, Labnet, CTR)

Mientras que las cepas de probióticos se reactivaron en dos ocasiones para asegurar la actividad de las mismas. A partir de un cultivo que se mantuvo en refrigeración a 4°C en agar semisólido MPT, cada cepa se activó tomando 500 µL del cultivo y se resuspendió en 5 mL de caldo MPT, después se incubó por 18 h a 37°C. Esta operación se realizó dos veces, pero esta vez utilizando un inóculo al 1%. Posteriormente, se transfirieron 50 µL del cultivo a tubos de borosilicato de 13x100 mm con 5 mL de caldo MPT y se guardaron a 4°C por un periodo máximo de tres meses.

6.5 Cinética de bacterias probióticas por el método turbidimétrico

Para la producción de probióticos se utilizó la metodología descrita por Mendoza-Flores (2014) con algunas modificaciones para cumplir con los objetivos del presente proyecto.

La cinética de crecimiento se realizó por el método turbidimétrico. Para ello se inocularon 50 µL del cultivo nuevo en caldo MPT (de 24 h) de cada cepa probiótica en un tubo de 3x100 mm con 5 mL del mismo medio, en una serie de tres repeticiones. Posteriormente, se incubaron a 37°C y a partir de cada hora se tomó las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 635-nm (Spectronic Genesis, CTR) hasta que se observó que el cultivo entro en fase estacionaria. Los resultados de las absorbancias se registraron y se representaron mediante una gráfica.

6.5 Producción de bacterias probióticas

Una vez identificada la fase exponencial se produjo biomasa de las cepas probióticas, considerando la metodología de la cinética y un tiempo 18 h de producción continua, se tomó una alícuota de 1 mL de muestra para el recuento inicial de UFC/mL, el cual fue resuspendido en 9 ml de solución salina al 0.85%, se realizaron diluciones seriadas de 10^1 - 10^{12} y a partir de cada una de las diluciones de un rango de 10^9 - 10^{14} se tomó 1 ml de muestra y se transfirió a una caja Petri (esto por triplicado), enseguida se agregó aproximadamente 15 mL de agar MTP (a una temperatura de entre 35-45°C) e inmediatamente se realizaron 8 movimientos en forma de 8 para obtener un óptimo homogenizado de la muestra, una vez solidificado el agar las cajas Petri se dejaron incubar a 37°C por 24 h. Al finalizar el período de incubación se procedió a contar las colonias en las cajas Petri que presentaron una cuenta de entre 25-250 colonias. Una vez obtenido los resultados se procedió a ajustar a un inoculo de 1×10^9 UFC/mL y posteriormente ser utilizados en los bioformulados.

6.6 Producción de Microalga

6.6.1 Evaluación de medios de cultivo para la producción de *Chlorella* sp.

Se realizó la evaluación de dos medios de cultivos utilizados para microalgas, el primero de ellos fue el medio de cultivo Basal Bold (BBM, Anexo 1) empleado en el cultivo de microalgas de agua dulce y el segundo fue la solución Lc (Anexo 2) previamente reportada por Lopez-Chuken et al. (2010), esto con el fin de determinar la mejor producción de biomasa.

Para la determinación de un medio óptimo para el desarrollo de *Chlorella* sp. se tomó un inóculo del 10% de un cultivo axénico de *Chlorella* sp. y se inoculó en un matraz Erlenmeyer de 125 ml con medio de cultivo reportado por López-Chuken et al. (2010), con un volumen final de 50 mL, el cual se incubó a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) con ciclos de luz/oscuridad de 18:6 h utilizando 2 lámparas fluorescentes (OSRAM) de 23 Watts (aproximadamente 1449 lúmenes) por aproximadamente 7 días, cada 24 h se tomó una alícuota de 1 mL en un tubo Eppendorf, en un segundo tubo Eppendorf se realizó una dilución 1:10, tomando 100 μL de muestra en 900 μL de solución salina al 0.85%, se agito con vortex por 10 seg, posteriormente tomando 10 μL de muestra del mismo tubo Eppendorf se llenó la cámara de Neubauer (Hausser Scientific, Horsham, Pensilvania, EUA) y se realizó el recuento celular, y una vez que el cultivo alcanzó el final de su fase estacionaria se detuvo el ensayo.

6.6.2 Producción de *Chlorella* sp. a nivel de fotobiorreactor

A partir del cultivo utilizado en la evaluación de un medio óptimo, se transfirió el volumen necesario para obtener una concentración final de 1×10^6 UFC/mL en un matraz de 1000 mL con un volumen final de 500 mL de solución Lc, este se incubó por 8 días, con agitación constante a 120 rpm y un fotoperiodo de 18:6 h (luz/oscuridad) a temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), esto con el fin de obtener mayor cantidad para el inóculo utilizado en el fotobiorreactor. La producción a nivel de fotobiorreactor se

realizó ajustando un inoculo a 1×10^6 UFC/mL en un volumen final de 10 L, las condiciones de operación fueron: temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1$, agitación a 120 rpm/min, fotoperiodo de 18:6 h utilizando 3 lámparas fluorescentes de 1449 lúmenes cada una, aireación contante de 2.5 L/min. Para monitorear la densidad celular y determinar la fase estacionaria del cultivo se llevó a cabo un recuento celular tomando una muestra de 10 mL cada 24 h a la cual se realizaban diluciones de 10^1 - 10^3 y posteriormente utilizando una cámara de Neubauer para contar tales colonias, tomándose un nivel de precisión de acuerdo a la fórmula $X \pm 0.10$, lo cual nos da un margen de error del 10%, siendo permisible para estos fines.

Una vez que el cultivo alcanzó su fase estacionaria se detuvo la producción, se procedió a la cosecha de *Chlorella* sp. Para esto, el cultivo fue sometido a un proceso de refrigeración a 4°C por 3 días, transcurridos estos días y manteniendo el cultivo siempre a temperatura fría se le agregó NaOH al 1 N y se homogenizó hasta que se observaron cúmulos celulares y que estos cúmulos se precipitaban; después se decantó cuidadosamente el sobrenadante para obtener el pellet, que se recolectó en tubos Corning de 50 mL. Por último, se realizaron dos lavados a los sedimentos celulares respondiéndolos en solución salina al 0.85% y se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min.

Además se determinó el rendimiento de la producción de biomasa, para esto se centrifugaron 10 L de cultivo de *Chlorella* sp. a 8000 rpm/15 min (Beckman, J2-21, Beckman Coulter de México, S.A. de C.V., Ciudad de México) y posteriormente los pellets fueron liofilizados y pesados.

6.7 Combinación de probióticos y *Chlorella* sp.

A partir de los concentrados celulares obtenidos de la producción de biomasa de los probióticos y de microalga, se prepararon formulados como se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.
Relación de probióticos en las formulaciones a evaluar en el presente trabajo

Formulados	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1x10⁹	<i>Bifidobacterium longum</i> 1x10⁹	<i>Chlorella</i> sp. 1x10⁶	<i>Chlorella</i> sp. 1x10⁹
F1	+	-	-	-
F2	+	-	+	-
F3	+	-	-	+
F4	-	+	-	-
F5	-	+	+	-
F6	-	+	-	+
F7	+	+	-	-
F8	+	+	+	-
F9	+	+	-	+

6.8 Evaluación de la vida de anaquel de los probióticos en flan

Se realizó un análisis microbiológico por recuento en placa en las diferentes formulaciones de flan al momento de elaborarlas (día 0), posteriormente se siguió realizando los conteos en placa en periodos de 3, 7, 21, y 30 días.

Para esto, se tomaron 1 g de cada una de las formulaciones de flan y se les adicionó 9 mL de solución salina al 0.85% en un tubo de 18x100 mm. Se homogenizó por vortex a alta velocidad, una vez homogenizada, se tomó 1 mL que se transfirió a un tubo de 18x100 mm con 9 mL de solución salina al 0.85%. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10¹-10⁻¹⁰ de la suspensión anterior, respetando un volumen final de 9 mL. De cada dilución en el rango de 10⁶- 10¹⁰ se tomó 1 mL y se inoculó en cajas Petri con agar MTP, esto se realizó por triplicado y se incubó a 37°C por 24 h, pasado el tiempo de incubación, se determinó las unidades formadoras de colonias donde se escogieron las cajas que muestras entre 25 y 250 colonias en base a la NOM-092-SSA1-1994, los resultados se reportarán como UFC/g en flan. Una vez obtenido los resultados, los datos se analizaron utilizando un análisis de normalidad y estadístico de

ANOVA (SPSS, 2013) o Kruskal Wallis (Quinn & Keough, 2002) (dependiendo de si cumplían con normalidad o no los datos) y posteriormente se le realizó una comparación múltiple de medias de Duncan con el software SPSS v.22 (2013).

6.9 Análisis Estadístico

Los resultados de recuentos celulares se transformaron a unidades Log_{10} y se expresaron como medias \pm desviación estándar de tres ensayos independientes. Para los ensayos de evaluación de medios de cultivos para *Chlorella* sp. se aplicó un análisis no paramétrico (Kruskal Wallis) con el fin de observar diferencias significativas en el crecimiento del alga en los diferentes medios. Para el estudio de la vida de anaquel de probióticos se realizó un análisis de normalidad de datos por Kolmogorov-Smirnov, en los datos que presentaron una distribución normal se aplicó un análisis de ANOVA simple, mientras que los datos que no presentaron una distribución normal se les aplicó un análisis no paramétrico Kruskal Wallis, todo esto con el fin de determinar si existía un efecto significativo de la adición de *Chlorella* sp. en la viabilidad de los probióticos y posteriormente se realizó una prueba de comparaciones de medias de Dunnet. Todos estos análisis se realizaron en el software SPSS v.22 (2013)

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización molecular de *Chlorella* sp.

Mediante la amplificación del gen 18s rDNA se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1700 pb, el cual al ser analizado se demostró que posee una homología con un 99.7- 100% de identidad con *Chlorella sorokiniana*, comparado con 9 especies de esta misma especie obtenidas del Genbank.

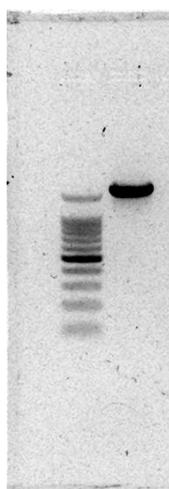


Figura 1. Amplificación del gen 18s rDNA con los *primers* P2F y P2R en gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 3.
Porcentaje de identidad de secuencias del gen 18s rDNA de 9 especies representativas del género de *Chlorella*.

No.	Especies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	<i>Chlorella UFB-LMI</i>	-	100	100	100	100	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8
2	<i>KR092112.1 Chlorella sorokiniana</i>	100	-	100	100	100	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8
3	<i>KF444207.1 Chlorella sorokiniana</i>	100	100	-	100	100	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8
4	<i>LK021940.1 Chlorella sorokiniana</i>	100	100	100	-	100	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8
5	<i>EU402596.1 Chlorella sorokiniana</i>	100	100	100	100	-	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8
6	<i>FM205834.1 Chlorella sorokiniana</i>	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	-	100	99.8	99.8	99.8
7	<i>AB080307.1 Chlorella sorokiniana</i>	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	100	-	99.8	99.8	99.8
8	<i>KY471550.1 Chlorella sorokiniana</i>	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8	-	99.8	99.7
9	<i>JX910111.1 Chlorella sorokiniana</i>	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8	99.8	-	99.7
10	<i>X74001.1 Chlorella sorokiniana</i>	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.7	99.7	-

7.2 Cinética de crecimiento por el método turbidimétrico

La cinética de crecimiento por el método turbidimétrico (Figura 2) realizada a cada probiótico demostró que tanto *L. plantarum* como *B. longum* poseen un crecimiento muy similar donde se observa una fase de latencia de tres horas para ambos, mientras que la fase exponencial de los probióticos se presentó desde la tercera hora hasta aproximadamente las 12 h, y a partir de ahí se observa una lenta proliferación, indicando el comienzo de la fase estacionaria.

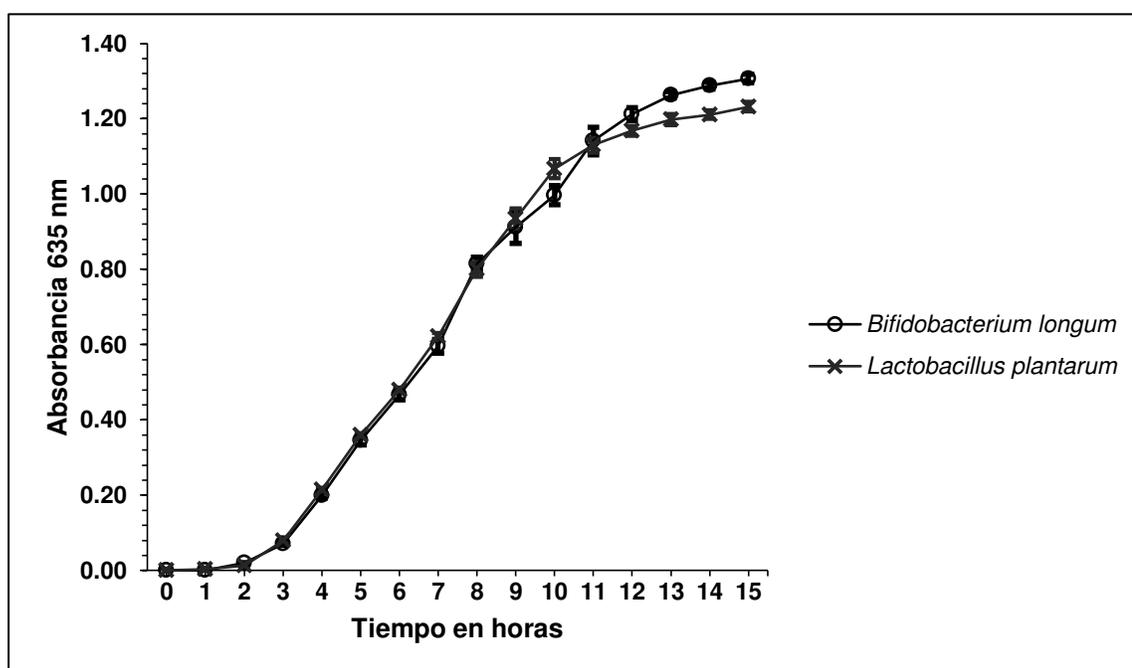


Figura 3. Cinética de crecimiento de bacterias probióticas por el método turbidimétrico a 635 nm durante 15 h.

7.3 Evaluación de medios de cultivos para la producción de *C. sorokiniana*.

En los resultados obtenidos en la evaluación de dos diferentes medios de cultivo para un crecimiento óptimo de *C. sorokiniana*, se observó que en ninguno de los dos medios evaluados se presentó una fase de latencia, mientras que en la fase exponencial se observa que el cultivo con medio BBM+H₂O_L presentó una fase exponencial más temprana en comparación con los demás cultivos (0 – 2 días), mientras que los cultivos en medios BBM+H₂O_D, Lc+H₂O_D y Lc+H₂O_L presentaron una fase exponencial muy similar (0 – 3 días). En general, no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los dos medios evaluados (Figura 3). Como se observa en la cinética de crecimiento de *C. sorokiniana* en ambos medios de cultivo, el desarrollo fue muy similar, por lo tanto se optó por utilizar la Solución Lc para el escalamiento a nivel de fotobiorreactor.

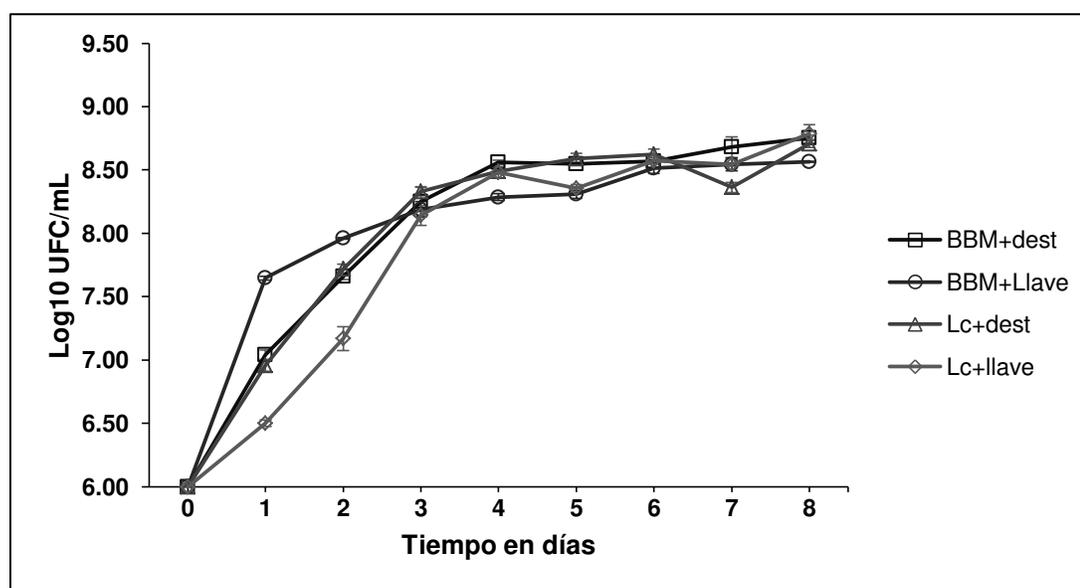


Figura 4. Cinética de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* en 2 diferentes medios preparados con agua destilada y con agua común.

7.4 Monitoreo de la producción de *C. sorokiniana* a nivel de fotobiorreactor

Una vez determinado el medio de cultivo para el escalamiento de la producción a nivel de fotobiorreactor se llevó la producción a un volumen de 10 L donde *C. sorokiniana* mostró un buen desarrollo. El cultivo a nivel de fotobiorreactor tuvo una duración de 12 días, al igual que en el ensayo a escala de matraz aquí tampoco se presentó una fase de adaptación, mientras que se observó una fase exponencial de aproximadamente 5 días hasta el inicio de la fase estacionaria como se observa en la Figura 4.

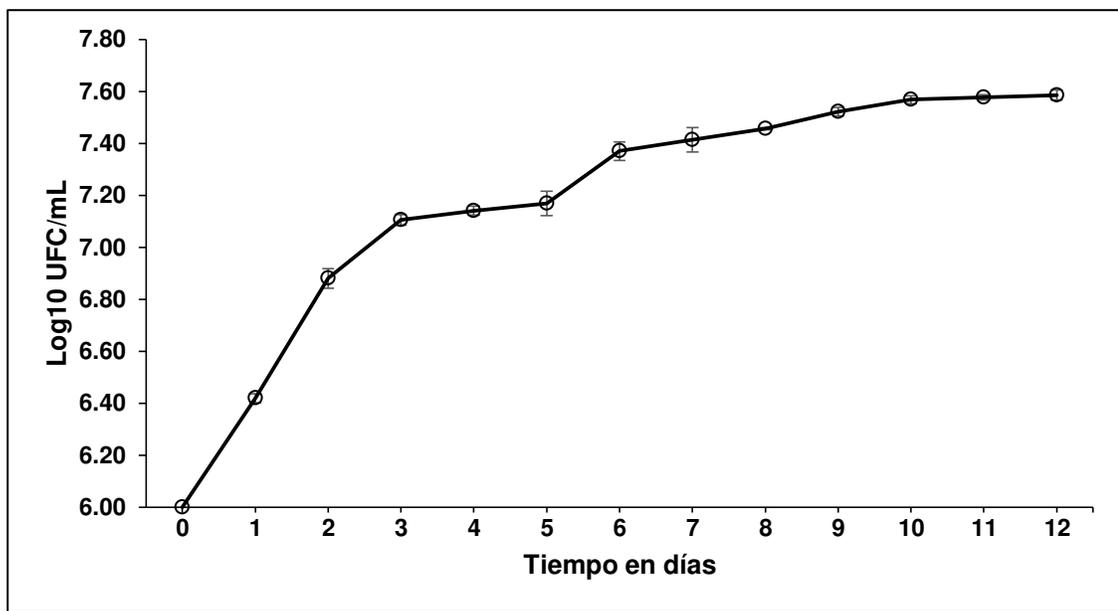


Figura 5. Cinética de crecimiento durante la producción de *Chlorella sorokiniana* a nivel de fotobiorreactor

Además del recuento de UFC/mL también se realizaron exámenes microscópicos y macroscópicos donde se observó un cultivo monoalgal y sin presencia de bacterias, células de aproximadamente 4-6 μ de diámetro, ovaladas con pigmentación verde e inmóviles y se observó conglomerados celulares, todo esto característico del género *Chlorella* (Figura 5). Al término de la producción de microalgas se obtuvo un rendimiento de 130 mg/L en peso seco de biomasa.

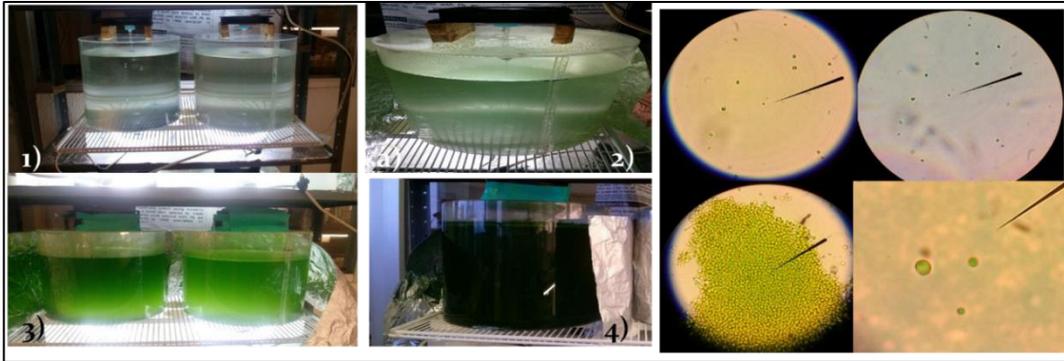


Figura 6. Evolución del cultivo de *C. sorokiniana* durante el periodo de producción de biomasa en fotobiorreactor. (1) Inicio de la producción. (2) 7 días de producción, (3) 12 días de producción, (4) día de cosecha de biomasa. A la derecha se muestran las características macroscópicas y microscópicas del cultivo monoalgal durante la producción.

7.5 Estudio de la viabilidad de probióticos en flan adicionados con *C. sorokiniana*

Las evaluaciones de la vida de anaquel de probióticos en combinación con *C. sorokiniana* se realizaron en cada probiótico por separado y también una combinación de ellos. Los resultados demuestran que *L. plantarum* sobrevive en un flan (sin adición de *C. sorokiniana*) a concentraciones por arriba de 1×10^6 UFC/g por al menos 10 días en almacenamiento a 4°C , no así para *B. longum*, quien a los 7 días ya se encontraba a concentraciones por debajo de lo recomendado para la ingesta diaria de probióticos. La combinación de *L. plantarum* y *B. longum* también se comportó similar a la viabilidad de *B. longum*, mientras que *L. plantarum* presentó una mejor viabilidad a los 10 días de almacenamiento.

En la Figura 6 se puede observar que *L. plantarum* permaneció dentro de las cantidades recomendadas por la OMS para la ingesta (1×10^6 UFC/g) con una concentración de 2.5×10^6 UFC/g al día 10 en un flan sin la adición de *C. sorokiniana*, mientras que en el flan adicionado con una concentración de *C. sorokiniana* de 1×10^9 UFC/g se prolongó la viabilidad del probiótico hasta el día 14 con una concentración de 2.5×10^6 UFC/g. Por otra parte, el flan adicionado con *C. sorokiniana* a 1×10^9 UFC/g, mantuvo la viabilidad de *L. plantarum* hasta por 18 días, requerida para un producto comercial a base de probióticos, alcanzando una concentración de 1.3×10^6 UFC/g. No se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos evaluados.

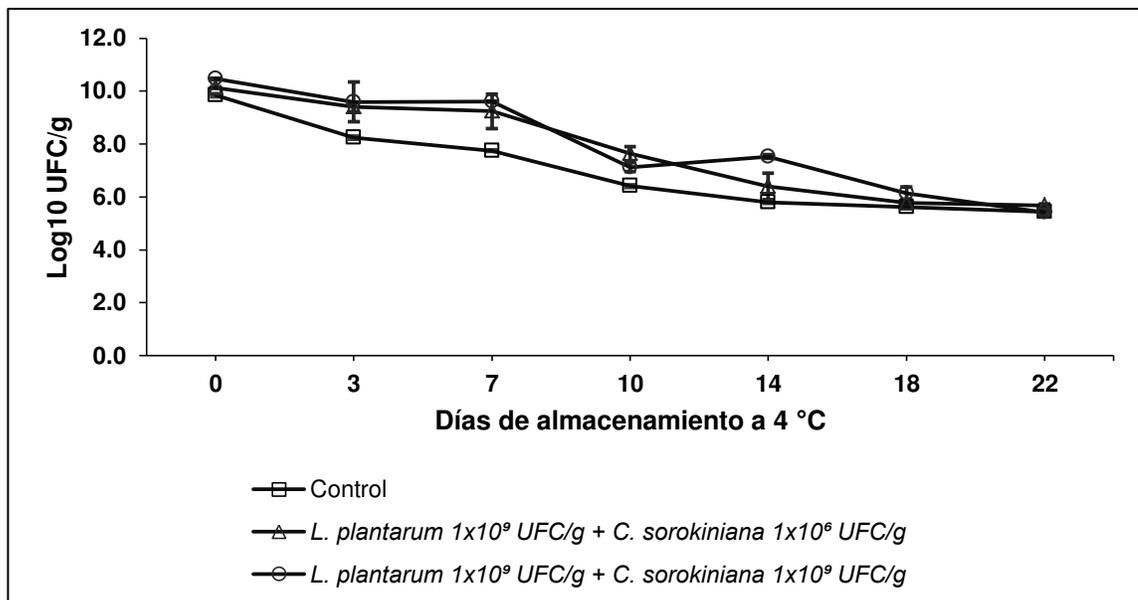


Figura 7. Viabilidad de *Lactobacillus plantarum* en flan adicionado con diferentes concentraciones de *Chlorella sorokiniana* durante el almacenamiento a 4°C.

En el caso de *B. longum*, este presentó una baja viabilidad durante el almacenamiento a 4°C, como se observa en la Figura 7. *B. longum* logró mantenerse por 3 días por arriba de la concentración mínima requerida al momento de la ingesta. El enriquecimiento del flan con una concentración de 1×10^6 UFC/g de *C. sorokiniana* favoreció que *B. longum* se mantuviera hasta por 7 días más por arriba de 10^6 UFC/g, mientras que al aumentar la concentración de *C. sorokiniana* a 1×10^9 UFC/g aquí se observó que no tuvo un efecto sobre *B. longum*, ya que la viabilidad se mantuvo por 3

días, similar a lo observado en el control. Al realizar el análisis no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tratamientos.

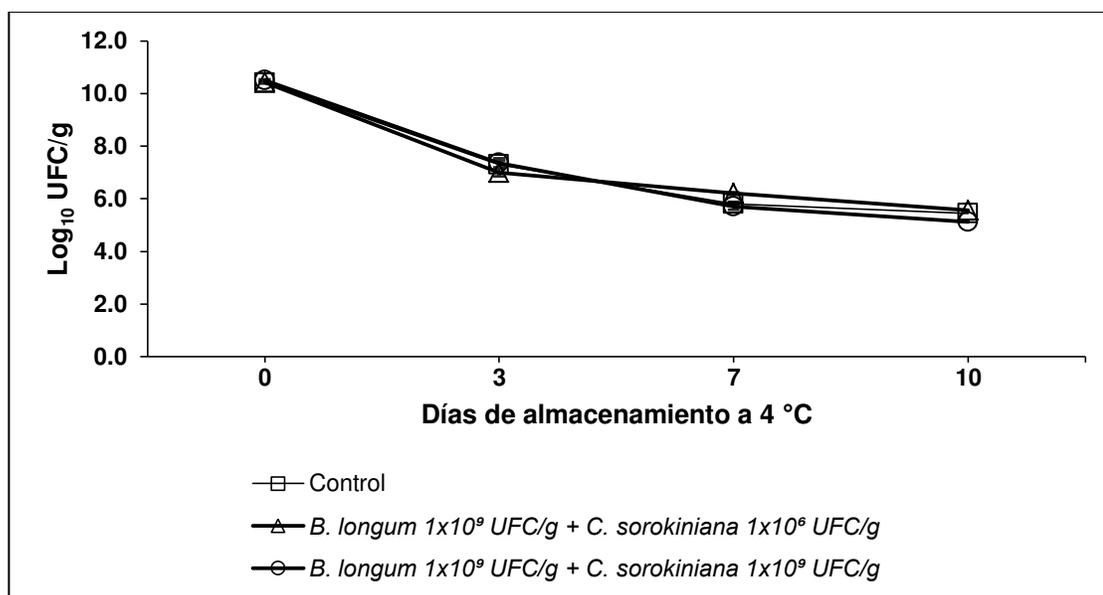


Figura 8. Viabilidad de *Bifidobacterium longum* en flan adicionado con diferentes concentraciones de *Chlorella sorokiniana* durante el almacenamiento a 4°C

Por último se evaluó el desarrollo de *L. plantarum* y *B. longum* combinadas y el posible efecto de *C. sorokiniana* sobre esta combinación. En la Figura 8 se puede observar que el control disminuye rápidamente su viabilidad desde la primera toma de muestra hasta el día 3 de muestreo, donde presentó una concentración de 1×10^7 UFC/g, por otra parte, la combinación de probióticos con una concentración de *C. sorokiniana* de 1×10^6 UFC/g, presenta una viabilidad al día 3 de 1.23×10^6 UFC/g, en ambos tratamientos después del día 3 ya no poseen los niveles de probióticos recomendados para la ingesta. A diferencia de estos, la combinación de probióticos con *C. sorokiniana* a una concentración de 1×10^9 UFC/g ha mostrado mantener la viabilidad de los probióticos hasta 26 días a una concentración de 1.2×10^{10} UFC/g, y por 34 días en 2.63×10^8 UFC/g mostrando así un efecto altamente significativo ($p < 0.01$) en la viabilidad de la combinación de *L. plantarum* y *B. longum*.

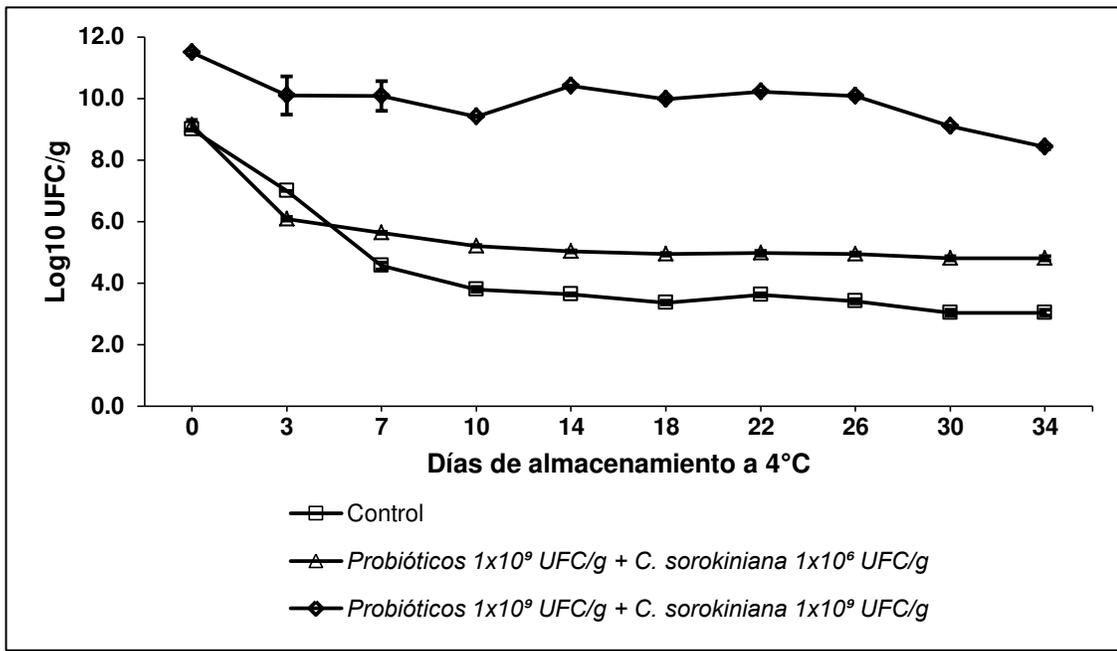


Figura 9. Viabilidad de probióticos (*L. plantarum* + *B. longum*) en flan adicionado con diferentes concentraciones de *Chlorella sorokiniana* durante el almacenado a 4°C

8. DISCUSIÓN

El género *Chlorella* es cosmopolita lo cual le permite adaptarse a diferentes condiciones ambientales y nutricionales, puede ser encontrado en estanques, lagos y suelo. *C. sorokiniana* es una de las microalgas con mayor potencial biotecnológico empleada en la producción de biodisel, fármacos y en la obtención de suplementos nutricionales en la industria alimenticia (Ortíz-Moreno et al. 2010). El aislamiento del alga en la zona de Cadereyta, Nuevo León, México es *Chlorella sorokiniana* con una similitud del 99.7.100% comparada con otras especies de *Chlorella*. En cuanto a su morfología microscópica se observaron células verdes, redondas, con núcleo, no flageladas y con un diámetro aproximado de 5 μ . Similar a lo reportado por Wan et al. (2012) donde evaluó y caracterizó un aislamiento de *C. sorokiniana*.

Los probióticos, prebióticos y simbióticos son componentes funcionales que posee ciertos beneficios a la salud humana y animal, debido a estos efectos positivos, actualmente existe un interés en la industria alimentaria en desarrollar nuevos alimentos funcionales y de mejor calidad nutricional, para ello los fabricantes de alimentos tendrán que ser capaces de comercializar productos que mantengan los probióticos viables (1×10^6 UFC/g) hasta el momento de consumirlos, por esta razón se están estudiando nuevas alternativas que ayuden a promover la viabilidad de estas bacterias en diferentes matrices alimentaria durante el procesamiento y el almacenamiento del producto (Wildman 2016). Entre estas alternativas se encuentran microencapsulación, adición de prebióticos como inulina, lactulosa, fructo-oligosacáridos, y la adición de biomasa de microalgas del género *Spirulina* o *Chlorella*.

En los tratamientos con *L. plantarum* (Figura 6) se observó que hubo una diferencia de 4 días en la disminución de la viabilidad entre el control y los tratamientos, lo cual nos indica que las concentraciones utilizadas de *C. sorokiniana* posiblemente si ejercían un efecto positivo sobre la viabilidad de *L. plantarum* pero no eran las concentraciones necesarias para lograr un efecto estadísticamente comprobable. Mientras que Gyenis et al. (2005) en su estudio utilizaron 3g/L de *C. vulgaris* y a esa

cantidad si observaron una diferencia significativa ($P < 0.05$) al adicionar la biomasa de esta alga en el desarrollo de *L. plantarum* e incubarlo en leche por 22 h.

Además se observó que *B. longum* (Figura 7) mostraba una mayor disminución en la viabilidad del control como en los tratamientos después de 7 días de almacenamiento a 4°C, esto pudo deberse a la exposición con los ácidos producto del metabolismo propio de la bacteria lo cual causó una acumulación intracelular de protones provocando daños en la membrana celular. Además de esto, la sensibilidad al oxígeno de las bifidobacterias pudo ser otro factor, debido a que carecen de mecanismos celulares eficaces en la eliminación de oxígeno y por lo tanto, los reactivos de oxígeno pueden acumularse en la célula y causar un daño oxidativo; de hecho, esto se considera un problema importante en matrices alimentarias altamente aireadas (Buriti et al. 2015).

El flan comercial adicionado con *C. sorokiniana* puede ser una matriz alimentaria para los probióticos al compararlo con productos como yogurt y quesos, demostrando que al utilizar dos cepas probióticas combinadas estas sobrevivieron por más de 34 días (2.6×10^8 UFC/g) con concentraciones por arriba de 10^6 UFC/g. Este efecto puede ser atribuido a que *C. sorokiniana* provee gran cantidad de compuestos (aminoácidos, oligosacáridos, vitaminas) que estimulan el desarrollo de *L. plantarum* y *B. longum* (Beheshtipour et al. 2013).

Estos resultados son similares con lo reportado por Beheshtipour et al. (2012), donde evaluaron la viabilidad de *L. acidophilus* LA-5, *B. lactis* BB-12, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*. en un yogurt adicionado con diferentes concentraciones de biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Arthrospira platensis* (0.25%, 0.50% y 1% p/v) y almacenado a 5° C por 28 días. El autor demostró que la adición de 0.5% de *Chlorella vulgaris* al yogurt fue suficiente para mantener la viabilidad de *L. acidophilus* y *B. lactis* por arriba de 10^7 UFC/mL durante 28 días.

Por otra parte, Guldás e Irkin (2010) evaluaron la viabilidad de *L. acidophilus*, *S. thermophilus* y *S. bulgaricus* en yogurt adicionado con 1% de *Spirulina* (cianobacteria), observando un efecto positivo de la adición de biomasa de *Spirulina* (P

< 0.05) en la viabilidad de las bacterias ácido lácticas por arriba de 10^6 UFC/mL durante los 30 días.

Mazinani et al. (2016) lograron obtener mejores resultados en la viabilidad de *L. acidophilus*, utilizando una combinación de 1% menta *Longifolia l.* + 0.8% *S. platensis*, al adicionarlo en un queso, donde *L. acidophilus* permaneció a concentraciones de 10^7 UFC/g durante 45 días en almacenamiento a 4°C, observándose diferencias significativas ($p < 0.05$) en la viabilidad del probiótico entre las muestras de queso con y sin *S. platensis*.

Una diferencia importante a considerar entre los trabajos anteriores y el presente estudio, fue la cantidad de microalga utilizada. Por ejemplo, Guldás e Irkin (2010), Beheshtipour et al. (2012) y Mazinani et al. (2016) utilizaron biomasa seca en relación peso-volumen, por lo cual el efecto pudiese ser relativo debido que el concentrado en polvo pudiera tener mayor o menor densidad celular (dependiendo del porcentaje de humedad del polvo) que el utilizado en el presente estudio, donde se demuestra que con una densidad celular de 1×10^9 UFC/g de *C. sorokiniana* ya existe un efecto sobre la viabilidad de los probióticos (Tabla 4). Por lo tanto se sugiere investigar este efecto de microalgas en concentraciones dadas en unidades formadoras de colonias.

Correa et al. (2008) evaluaron la viabilidad de *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium lactis*, sólo y en co-cultivo en flan de coco almacenado a 5°C por 28 días, donde observaron que *L. paracasei* y *B. lactis* permanecieron por arriba de 10^7 UFC/g durante el periodo de almacenamiento tanto sólo como en combinación. A diferencia de los estudios anteriores, en este no se utilizó biomasa de alguna microalga, pero los autores sugieren que el flan de coco sería una buena de matriz alimentaria para bacterias ácido lácticas.

Tabla 4.

Publicaciones sobre el efecto de la adición de microalgas en la viabilidad de cultivos probióticos durante su almacenamiento a 4°C.

Cultivos Probióticos	Microalga	Días de almacenamiento 4±1°C	Log UFC inicial	Log UFC final	Matriz	Referencia
<i>L. plantarum</i> , <i>B. longum</i>	<i>Chlorella sorokiniana</i> 1x10 ⁹ UFC/g	30 días	11.50	10.07	Flan	Presente estudio
<i>L. acidophilus</i> LA-5, <i>B. lactis</i> BB-12, <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> .	<i>Chlorella vulgaris</i> 1% p/v	28 días	8.15	7.3	Yogurt	Beheshtipour et al. 2012
<i>L. acidophilus</i> LA-5, <i>B. lactis</i> BB-12, <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> .	<i>Arthrospira platensis</i> 0.5% p/v	28 días	8.16	7.49	Yogurt	Beheshtipour et al. 2012
<i>L. acidophilus</i>	0.5% menta Longifolia l. + 0.8% <i>S. platensis</i> 1% menta	45 días	8.8	7.67	Queso	Mazinani et al. 2016
<i>L. acidophilus</i>	Longifolia l. + 0.8% <i>S. platensis</i>	45 días	8.9	7.67	Queso	Mazinani et al. 2016
<i>S. bulgaricus</i>	<i>S. platensis</i> 1%	30 días	7	6	Yogurt	Guldas y Irkin, 2010
<i>S. thermophilus</i>	<i>S. platensis</i> 1%	30 días	7.5	7.5	Yogurt	Guldas y Irkin, 2010
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. platensis</i> 1%	30 días	8.4	7.3	Yogurt	Guldas y Irkin, 2010
<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12	<i>S. platensis</i> 1%	15 días	8.5	7.4	Yogurt	Mocanu et al. 2013
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	<i>S. platensis</i> 1%	15 días	8.4	7.3	Yogurt	Mocanu et al. 2013

9. CONCLUSIONES

La especie del género *Chlorella* sp. evaluada en el presente trabajo se identificó como *C. sorokiniana*, en base a la caracterización molecular por medio del gen 18s.

No hubo diferencias significativas en la producción de biomasa de *C. sorokiniana* en condiciones autótrofas, al utilizar los medios BBM+H₂O₂D, Lc+H₂O₂D y Lc+H₂O₂L. El cultivo de *C. sorokiniana* a nivel de fotobiorreactor alcanzó su fase estacionaria a los 12 días en solución Lc+H₂O₂D, con un rendimiento de 130 mg/L.

En flan, *Chlorella sorokiniana* a una concentración de 1×10^9 UFC/g promueven significativamente ($P < 0.01$) la viabilidad *L. plantarum* y *B. longum* (más de 30 días en almacenamiento a 4°C) al estar los tres microorganismos en combinación.

Chlorella sorokiniana podría ser utilizada como un prebiótico debido a su efecto sobre la viabilidad de probióticos y sus propiedades nutracéuticas en alimentos funcionales destinados para el consumo humano.

10. PERSPECTIVAS

Evaluar el desarrollo de *C. sorokiniana* en cultivos mixótrofos para una mejor producción de biomasa.

Determinar la composición bioquímica de *C. sorokiniana* mediante análisis bromatológicos.

Evaluar el efecto de concentraciones mayores a 1×10^9 UFC/g de *C. sorokiniana* sobre *L. plantarum*.

Estudiar el efecto de *C. sorokiniana* sobre diferentes cepas probióticas a las evaluadas en el presente estudio.

11. REFERENCIAS

- Amara A y Shibl A. 2013. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal* 23: 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.07.001>
- Amaro H, Guedes A, y Malcata F. 2011. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. En: *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances*. Ed. A. Méndez-Vilas pp: 1272–1280. <http://www.formatex.info/microbiology3/book/1272-1284.pdf> Accesado el 14-Mayo-2017.
- Beheshtipour H, Mortazavian AM, Haratian P, y Darani KK. 2012. Effects of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis* addition on viability of probiotic bacteria in yogurt and its biochemical properties. *European Food Research and Technology* 235: 719–728. doi:10.1007/s00217-012-1798-4
- Beheshtipour H, Mortazavian AM, Mohammadi R, Sohrabvandi S, y Khosravi-Darani K. 2013. Supplementation of *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* algae into probiotic fermented milks. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12: 144–154. Doi: 10.1111/1541-4337.12004
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, y Bottazzi V. 2000. Bifidobacteria: history , ecology , physiology and applications. *Annals of Microbiology* 131: 117–131. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.583.7996&rep=rep1&type=pdf> Accesado el 14-Mayo-2017.
- Brennan L, y Owende P. 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>
- Buriti FCA, Bedani R, y Saad SMI. 2015. Probiotic and Prebiotic Dairy Desserts. En: *Probiotics in food, Part II: Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics*. Chapter 23, Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802189-7.00023-X>, Accesado el 14-Mayo-2017.
- Chen CY, Yeh KL, Aisyah R, Lee DJ, y Chang JS. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology* 102: 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
- Christaki E, Bonos E, Giannenas I, y Florou-Paneria P. 2013. Functional properties of carotenoids originating from algae. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93: 5–11. Doi: 10.1002/jsfa.5902

- Corr SC, Hill C, y Gahan CGM. 2009. Chapter 1. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Advances in Food and Nutrition Research* 56: 1-15. [https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(08\)00601-3](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(08)00601-3)
- Corrêa SBM, Castro IA, y Saad SMI. 2008. Probiotic potential and sensory properties of coconut flan supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *International Journal of Food Science and Technology* 43:1560–1568. Doi: 10.1111/j.1365-2621.2007.01585.x
- Doleyres Y y Lacroix C. 2005. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. *International Dairy Journal* 15:973–988. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.11.014>
- Food, Organization A, Organization WH. 2006. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO.
- Fijan S. 2014. Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11:4745–4767. Doi:[10.3390/ijerph110504745](https://doi.org/10.3390/ijerph110504745)
- Gogineni VK, Morrow LE, y Malesker MA. 2013. Probiotics: mechanisms of action and clinical applications immune modulation. *Journal of Probiotic and Health* 1:1–11. <http://tarjomefa.com/wp-content/uploads/2016/08/4865-English.pdf> Accesado el 14-Mayo-2017.
- Guldas M, Irkin R. 2010. Influence of *Spirulina platensis* powder on the microflora of yoghurt and acidophilus milk. *Mljekarstvo*, 60: 237.
- Gyenis B, Szigeti J, Molnár N, y Varga L. 2005. Use of dried microalgal biomasses to stimulate acid production and growth of *Lactobacillus platarum* and *Enterococcus faecium* in milk. *Acta Agraria Kaposváriensis* 9: 53–59. <http://publicatio.nyme.hu/1078/1/1176561.pdf> Accesado el 14-Mayo-2017.
- Hammes W, y Vogel R. 1995. The genus *Lactobacillus*. En: *The genera of lactic acid bacteria*. Series 2:19–54. Ed. BJB Woods et al. Chapman & Hall© Springer. Doi: [10.1007/978-1-4615-5817-0_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_3)
- Harzallah D, y Belhadj H. 2013. Lactic acid bacteria as probiotics: characteristics , selection criteria and role in immunomodulation of human gi mucosal barrier. En: *Characteristics, Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Mucosal Barrier* 197–216. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/50732>
- Hernández-Pérez A, y Labbé JI. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49: 157–173. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718->

19572014000200001

- Koneman EW, y Allen S. 2008. Koneman. Diagnostico Microbiologico: Texto y Atlas En Color. Editorial Médica Panamericana, S.A. México. ISBN: 978-950-06-0895-4
- Lacroix C, y Yildirim S. 2007. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology* 18: 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.02.002>
- Lahtinen S, Seppo S, y Von Wright A. 2011. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Fourth Edition. CRC press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida. EUA. e-book ISBN: 978-1-4398-3678-1
- Lauzon HL, Dimitroglou A, Daniel L, Ringø E, y Davies SJ. 2014. Probiotics and Prebiotics: Concepts, Definitions and History. En: *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*, First Edition. Ed. D. Merrifield y E. Ringø. John Wiley & Sons, Ltd. Doi: 10.1002/9781118897263.ch7
- Lee HJ, Hur SB. 2009. Genetic relationships among multiple strains of the genus *Tetraselmis* based on partial 18S rDNA sequences. *Algae* 24: 205-212. Doi: 10.4490/ALGAE.2009.24.4.205
- Liu W-H, Yang C-H, Lin C-T, Li S-W, Cheng W-S, Jiang Y-P, Wu C-C, Chang C-H, y Tsai Y-C. 2015. Genome architecture of *Lactobacillus plantarum* PS128, a probiotic strain with potential immunomodulatory activity. *Gut Pathogens* 7:22. Doi: 10.1186/s13099-015-0068-y
- Lopez-Chuken U y Young S. 2010. The use of chloro-complexation to enhance cadmium uptake by *Zea mays* and *Brassica juncea*: testing a “free ion activity model” and implications for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* 12:7. <http://dx.doi.org/10.1080/15226510903353161>
- Luiz W, Almeida G De, Ferrari S, Souza JV De, Barbosa AL, Matiuzzi M, Menezes DR, y Dias FS. 2015. Principal criteria for selection of lactic acid bacteria for potential use as probiotics in foods. 9:671–686. Doi: 10.5897/AJMR2014.7226
- Manzano AC, Estupiñán GD, y Poveda EE. 2012. Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia. *Revista Chilena de Nutrición* 39: 98–110. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000100010>
- Mata TM, Martins AA, y Caetano NS. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Mazinani S, Fadaei V, Khosravi-Darani K. 2016. Impact of *Spirulina platensis* on

- physicochemical properties and viability of *Lactobacillus acidophilus* of probiotic UF feta cheese. *Journal of Food Processing and Preservation* 40: 1318-1324. Doi: 10.1111/jfpp.12717
- Mendoza-Flores P. 2014. Actividad biológica de factores extracelulares de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum* sobre la línea celular HT-29 de cáncer de colon humano. Tesis de maestría., Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. <http://eprints.uanl.mx/11755/1/1080215602.pdf> Accesado el 17 de Mayo-2017.
- Mocanu GD, Botez E, Nistor OV, Andronoiu DG, Vlăsceanu G. 2013. Influence of *Spirulina platensis* biomass over some starter culture of lactic bacteria. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 19: 474-479.
- de Moraes MG, Vaz BDS, de Moraes EG, y Costa JAV. 2015. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. *BioMed Research International* 15 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/835761>
- Morelli L. 2007. *In vitro* assessment of probiotic bacteria: from survival to functionality. *International Dairy Journal* 17: 1278–1283. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.015>
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html> Accesado el 17-Mayo-2017.:
- Nagpal R, Kumar A, Kumar M, Behare P V, Jain S, y Yadav H. 2012. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. *FEMS Microbiology Letters* 334: 1–15 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02593.x>
- Oelschlaeger TA. 2010. Mechanisms of probiotic actions - A review. *International Journal of Medical Microbiology* 300: 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.005>
- Ortíz-Moreno ML, Cortés- Castillo CE, Sánchez-Villarraga J, Padilla J, y Otero-Paternina AM. 2010. Evaluating microalgae *Chlorella sorokiniana* growth in different culture mediums in autotrophic and mixotrophic conditions. *Orinoquia* 16: 11–20. <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v16n1/v16n1a02.pdf> Accesado el 14-Mayo-2017.
- Parra-Huertas RA. 2010. Bacterias Ácido Lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad de ciencias agropecuarias* 8: 93–105. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v8n1/v8n1a12.pdf> Accesado el 14-Mayo-2017.

- Quinn GP, y Keough MJ. 2002. Multidimensional scaling and cluster analysis, in *Experimental design and data analysis for biologists*, ed. by Quinn GP, and Keough MJ, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 473–493
- Ranadheera RDCS, Baines SK, y Adams MC. 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International* 43:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.009>
- Reyna-Martínez R, Caballero-Hernández DE, Lopez U, Gomez-Flores R, Tamez-Guerra P. 2014. *Chlorella* sp. And *Scenedesmus* sp. Microalgae cytotoxic activity against L5178Y-R murine lymphoma cells. Biotechnology SUMMIT 2014. 8-11 Oct. Huatulco, Oax. Pp 249-255. http://www.bio.edu.mx/bio_summit_2014.html. Accesado el 14-Mayo-2017.
- Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM, y Bressollier P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology* 50:1–16. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014>
- Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, y Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84:197–215. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8)
- Salvetti E, Torriani S, y Felis GE. 2012. The genus *Lactobacillus*: a taxonomic update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 4:217–226. Doi: 10.1007/s12602-012-9117-8
- Foerst P, y Santivarangkna CFP. 2015. *Advances in Probiotic Technology*. CRC press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida. EUA. e-book ISBN: 978-1-4987-3458-5. <http://www.crcnetbase.com/doi/pdf/10.1201/b18807-1> Accesado el 14-Mayo-2017.
- Shah NP. 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* 17: 1262–1277. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.01.014>
- Shalaby E. 2011. Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signaling & Behavior* 6: 1338–1350. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.6.9.16779>
- Singh RN, y Sharma S. 2012. Development of suitable photobioreactor for algae production - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16:2347–2353. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>
- SPSS 22 for Windows. 2013. *Statistical Package for the Social Sciences*. IBM-SPSS Inc.
- Tripathi MK, y Giri SK. 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during

- processing and storage. *Journal of Functional Foods* 9: 225–241. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>
- Turróni F, Ventura M, Buttó LF, Duranti S, O’Toole PW, Motherway MOC, y Van Sinderen D. 2014. Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: A *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71: 183–203. DOI: 10.1007/s00018-013-1318-0
- Vasiljevic T y Shah NP. 2008. Probiotics-from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* 18: 714–728. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.004>
- de Vries MC, Vaughan EE, Kleerebezem M, y de Vos WM. 2006. *Lactobacillus plantarum*-survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal* 16: 1018–1028. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.003>
- Wan MX, Wang RM, Xia JL, Rosenberg JN, Nie ZY, Kobayashi N, Oyler GA, y Betenbaugh MJ. 2012. Physiological evaluation of a new *Chlorella sorokiniana* isolate for its biomass production and lipid accumulation in photoautotrophic and heterotrophic cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 109: 1958–1964. Doi: 10.1002/bit.24477
- Wijesekara I, Pangestuti R, y Kim SK. 2011. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers* 84:14–21. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.062>
- Wildman R. 2016. Handbook of nutraceuticals and functional foods. CRC press. Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida. EUA. ISBN: 0-84936409-4.
- Zago M, Fornasari ME, Carminati D, Burns P, Suárez V, Vinderola G, Reinheimer J, y Giraffa G. 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology* 28:1033–1040. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.009>
- Zehr J, Bench S, Carter B, y Hewson I. 2008. Globally distributed uncultivated oceanic N₂-fixing cyanobacteria lack oxygenic photosystem II. *Science*. 322: 1110-1112 Doi: 10.1126/science.1165340

ANEXO I

Composición química Medio Basal Bold		
Compuesto	g/L dH₂O	mL L⁻¹
NaNO ₃	25.00	10
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.5	10
MgSO ₄ .7 H ₂ O	7.50	10
K ₂ HPO ₄	7.50	10
KH ₂ PO ₄	17.50	10
NaCl	2.50	10
Solución alcalina		
Na ₂ .EDTA	50	1
KOH	31	
Solución acidificada		
FeSO ₄ .7 H ₂ O	4.98	1
H ₂ SO ₄	1 ml	
Solución de Boro		
H ₃ BO ₃	11.42	1
Solución de metales traza		
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	8.82	1
MnCl ₂ .4 H ₂ O	1.44	
MoO ₃	0.71	
CuSO ₄ .5 H ₂ O	1.57	
Co(NO ₃) ₂ .6 H ₂ O	0.49	

Fuente: Banco español de algas (<http://marinebiotechnology.org/es/>)

ANEXO 2

Composición química Solución Lc (Lopez-Chuken et al. 2010)		
Stock A		
Compuesto	g/L dH₂O	mL L⁻¹
KNO ₃	101.11	5
KH ₂ PO ₄	27.22	
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	98.6	
Stock B		
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	295.18	5
Stock C		
H ₃ BO ₃	2.86	1
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.08	
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.019	
Stock D		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1.388	5
Na ₂ EDTA	1.833	

RESUMEN BIOGRÁFICO

Servando Horacio Cantú Bernal

Candidato para el grado de:

Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología

Tesis:

**ESTUDIO DE LA VIDA DE ANAQUEL DE PROBIÓTICOS EN PRESENCIA
DE LA MICROALGA *CHLORELLA SP.* EN FLAN**

Campo de estudio: Microbiología

Biografía:

Datos personales: Nacido en Ciudad Obregón, Sonora, el 11 de noviembre de 1988, hijo de Yanet Bernal Rojo y Hervey Cantú Beltrán.

Educación: Egresado de la Universidad de Sonora, grado obtenido: Licenciado Químico Biólogo Clínico 2013.