

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO PREBIÓTICO DEL EXTRACTO DE
YACÓN (*Smallanthus sonchifolius*) EN LA VIABILIDAD DE *Lactobacillus sp*
BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES HUMANAS SIMULADAS
in vitro”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

TESISTA

Bach. González Rodríguez Natalia Cusi

ASESOR

M. Sc. Ángel Castro Alvarado

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ

2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO PREBIÓTICO DEL EXTRACTO DE
YACÓN (*Smallanthus sonchifolius*) EN LA VIABILIDAD DE *Lactobacillus* sp
BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES HUMANAS SIMULADAS
in vitro”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOTECNOLOGÍA**

AUTORA: Bach. González Rodríguez Natalia Cusi

Revisado y aprobado por el asesor

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'A' followed by a flourish, positioned above a horizontal line.

MSc. Ángel Castro Alvarado

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



“EVALUACIÓN DEL EFECTO PREBIÓTICO DEL EXTRACTO DE YACÓN (*Smallanthus sonchifolius*) EN LA VIABILIDAD DE *Lactobacillus* sp BAJO CONDICIONES GASTROINTESTINALES HUMANAS SIMULADAS *in vitro*”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORA

Bach. González Rodríguez Natalia Cusi

Revisado y aprobado por el jurado evaluador

Dr. Carlos Azañero Díaz
Presidente

José Manuel Villanueva Carlos
BIOLOGO - MICROBIOLOGO

Blgo. Mcblgo. José Villanueva Carlos
Secretario

MSc. Ángel Castro Alvarado
Integrante

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional del Santa, alma máter de mi formación profesional, en especial a la Escuela Académica Profesional de Biotecnología de la Facultad de Ciencias, por haberme forjado profesionalmente, dándome la oportunidad de tener nuevas experiencias y servir a la sociedad y mi país.

A mi asesor MSc. Ángel Castro Alvarado por sus sugerencias para el desarrollo y culminación del presente trabajo de investigación.

A los técnicos de laboratorio de la Escuela Académica Profesional que hicieron parte de este trabajo de investigación con su ayuda y guía en el desarrollo del proceso del mismo.

A mis amigos y compañeros de estudio, que compartieron conocimientos conmigo, así como su amistad y apoyo en los momentos que los necesitaba.

A todas aquellas personas que de alguna forma contribuyeron a mi formación profesional y a la culminación de este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A Dios, nuestro Señor, por su protección y guía durante todo este tiempo, quien me ha guardado con bien desde siempre.

A mis padres por su apoyo durante toda mi formación profesional, su amor incondicional a pesar de las dificultades y sostenerme en las caídas.

A mi familia, que celebran mis logros como suyos, a mis primos que me inspiran a seguir luchando, a mis tíos por estar siempre presentes y en especial a mi Tete por ser el pilar que mantiene unida a la familia

A Jorge, quien siempre fue el mejor. El recuerdo de tu bondad y generosidad vivirán siempre en mí.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTO	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS	4
1.2. HIPÓTESIS	4
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. DESCRIPCIÓN DEL YACÓN (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)	5
2.1.1. Generalidades	5
2.1.2. Composición química de la raíz de yacón	5
2.2. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS	6
2.2.1. Definición	6
2.2.2. Función	7
2.2.3. Propiedades.....	8
2.3. PREBIÓTICOS	9

2.3.1.	Definición	9
2.3.2.	Características.....	9
2.3.3.	Ventajas	10
2.4.	BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL)	10
2.4.1.	Generalidades	10
2.4.2.	Género <i>Lactobacillus</i>	11
2.5.	PROBIÓTICOS	11
2.5.1.	Definición	11
2.5.2.	Características.....	12
2.5.3.	Mecanismo de acción	12
2.6.	PRUEBAS <i>in vitro</i> PARA POTENCIAL PROBIÓTICO	14
2.6.1.	Tolerancia a pH ácido.....	14
2.6.2.	Crecimiento en bilis.....	15
2.6.3.	Actividad antimicrobiana	15
2.6.4.	Susceptibilidad a los antibióticos	15
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1.	DISEÑO EXPERIMENTAL	16
3.2.	POBLACIÓN Y MUESTRA	17
3.3.	IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE YACÓN	17
3.4.	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE YACÓN	17
3.5.	FORMULACIÓN DE MEDIOS DE FERMENTACIÓN	19
3.6.	SIMULACIÓN DE TOLERANCIA A ÁCIDO Y SALES BILIARES	20

3.7.	DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES.....	20
3.8.	CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>Lactobacillus sp</i>	21
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
4.1.	TOLERANCIA A PH ÁCIDO Y RESISTENCIA A SALES BILIARES:.....	22
4.2.	CINÉTICA DE <i>Lactobacillus sp</i> EN MEDIO MRS	25
4.3.	CINÉTICA DE <i>Lactobacillus sp</i> EN MEDIO MRS–EXTRACTO DE YACÓN	28
V.	CONCLUSIONES	33
VI.	RECOMENDACIONES	34
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
VIII.	ANEXOS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fruto de <i>Smallanthus sonchifolius</i> (Yacón).....	5
Figura 2. Estructuras química de cadenas cortas de fructooligosacáridos.	7
Figura 3. <i>Lactobacillus sp</i> con tinción gram visto a 100X	11
Figura 4. Mecanismo de actividad probiótica	12
Figura 5. Modulación de células inmunitarias en el intestino por probióticos.	14
Figura 6. Proceso de la obtención del extracto de yacón (<i>Smallanthus sonchifolius</i>).	19
Figura 7. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato (Glucosa) de <i>Lactobacillus sp</i> en medio MRS	26
Figura 8. Fase exponencial del crecimiento microbiano.....	27
Figura 9. Cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus sp</i> en medio MRS - extracto de yacón	29
Figura 10. Curva de consumo de sustrato FOS (nístosa y 1-kestosa) en la cinética de crecimiento de <i>Lactobacillus sp</i> en medio MRS – extracto de yacón.....	29
Figura 11. Fase exponencial de crecimiento microbiano.....	30
Figura 12. Dibujo de <i>Smallanthussonchifolius</i> (yacón).	43
Figura 13. Cámara de secado con las prensas para conservar la muestra de yacón.....	43
Figura 14. Identificación botánica de la planta de <i>Smallanthus sonchifolius</i> (yacón).....	44
Figura 15. Esquema de preparación del extracto de yacón.....	45
Figura 16. Activación de la cepa de <i>Lactobacillus sp</i> a partir del producto Bacilor	49
Figura 17. Diluciones seriadas para siembra en placa para conteo de colonias	50
Figura 18. Siembra en placa para bacterias ácido lácticas 3M® Petrifilm®	50
Figura 19. Curva de calibración de la glucosa	52

Figura 20. Proceso de para la obtención de la curva patrón	52
Figura 21. Equipo de HPLC.....	53
Figura 22. Curva de calibración de 1 - kestosa	54
Figura 23. Curva de calibración de Nistosa.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización físico químico y funcional de diferentes extractos de yacón.	6
Tabla 2. Diseño experimental de la investigación.	16
Tabla 3. Evaluación de la tolerancia a pH 2.0 y porcentaje de supervivencia.	22
Tabla 4. Análisis de pre y post prueba de resistencia al pH ácido en medio MRS y medio MRS – extracto de yacón	23
Tabla 5. Evaluación de la resistencia a sales biliares y porcentaje de supervivencia.	24
Tabla 6. Análisis de pre y post prueba de tolerancia a sales biliares en medio MRS y medio MRS – extracto de yacón	25
Tabla 7. Datos obtenidos en la cinética de <i>Lactobacillus sp</i> en medio MRS	26
Tabla 8. Datos obtenidos en la cinética de <i>Lactobacillus sp</i> en medio MRS	28
Tabla 9. ANOVA del crecimiento de biomasa de <i>Lactobacillus sp</i> en medio MRS y MRS – extracto de yacón	31
Tabla 10. ANOVA del consumo de sustrato como glucosa y, nistosa y 1- kestosa en los medios MRS y MRS – extracto de yacón respectivamente	32
Tabla 11. Componentes de medio MRS líquido comercial	47
Tabla 12. Componentes de medio líquido MRS – yacón.....	47
Tabla 13. Componentes de medio MRS y MRS – yacón, adaptado para pH ácido	48
Tabla 14. Componentes de Medio MRS y MRS – yacón, adaptado para sales biliares	48
Tabla 15. Concentraciones de muestras para curva patrón	51
Tabla 16. Datos obtenidos para la curva de calibración de 1- kestosa	54
Tabla 17. Datos obtenidos para la curva de calibración de 1- kestosa	55

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE YACÓN (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)... 43	43
ANEXO 2. OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE YACÓN (<i>Smallanthus sonchifolius</i>).... 45	45
ANEXO 3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DEL EXTRACTO DE YACON (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)..... 46	46
ANEXO 4. MEDIOS DE CULTIVO 47	47
ANEXO 5. PREPARACIÓN DEL INÓCULO..... 49	49
ANEXO 6. CONTEO CELULAR USANDO PLACAS PARA BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS 3M [®] Petrifilm [®] 50	50
ANEXO 7. DETERMINACIÓN DE GLUCOSA USANDO KIT DE GLICEMIA ENZIMÁTICA 51	51
ANEXO 8. DETERMINACIÓN DE FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS USANDO UHPLC53	

RESUMEN

Lactobacillus sp tiene un alto potencial probiótico y la adición del extracto de yacón favorece el crecimiento del probiótico, los fructooligosacáridos presentes en el yacón le dan un mejor efecto prebiótico. En ese sentido, el presente trabajo tiene como finalidad evaluar el efecto prebiótico del extracto de yacón (*Smallanthus Sonchifolius*) en la viabilidad de *Lactobacillus sp* bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*. Los datos obtenidos se evaluaron estadísticamente siguiendo la metodología de pre y post prueba. Los porcentajes de viabilidad fueron determinados después de las pruebas *in vitro* de tolerancia a pH 2.0 y sales biliares al 0.3% y la cinética de crecimiento se estableció dentro de las 24 horas a 37°C. La adición del prebiótico en las pruebas *in vitro*, tolerancia a pH 2.0 y sales biliares al 0.3%, muestran una viabilidad de 39.67 y 86.17% respectivamente. En cuanto a la cinética de crecimiento de *Lactobacillus sp*, el medio al que se incluyó el prebiótico tuvo un tiempo de duplicación mayor en comparación al medio que no se le añadió el prebiótico; así mismo la velocidad específica de crecimiento también fue mayor. Por tanto, la adición de extracto de prebiótico en medio MRS favorece la viabilidad, la producción de biomasa y aumenta la velocidad específica de crecimiento y reduce el tiempo de duplicación de *Lactobacillus sp* en comparación con el medio MRS sin adición de prebiótico.

ABSTRACT

Lactobacillus sp has a high probiotic potential and the addition of the yacon extract favors the growth of the probiotic, the fructooligosaccharides present in the yacon give it a better prebiotic effect. In this sense, the present work aims to evaluate the prebiotic effect of the yacon extract (*Smallanthus Sonchifolius*) on the viability of *Lactobacillus* sp under simulated human gastrointestinal conditions in vitro. The data obtained were statistically evaluated following the pre and post test methodology. The percentages of viability were determined after in vitro tolerance tests at pH 2.0 and bile salts at 0.3% and the growth kinetics were established within 24 hours at 37 ° C. The addition of the prebiotic in the in vitro tests, tolerance to pH 2.0 and bile salts at 0.3%, show a viability of 39.67 and 86.17% respectively. Regarding the growth kinetics of *Lactobacillus* sp, the medium to which the prebiotic was included had a longer doubling time compared to the medium that the prebiotic was not added to; likewise, the specific growth speed was also higher. Therefore, the addition of prebiotic extract in MRS medium favors viability, biomass production and increases the specific growth rate and reduces the doubling time of *Lactobacillus* sp compared to MRS medium without the addition of prebiotic.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el interés por el conocimiento de nuestro microbiota intestinal ha aumentado de forma extraordinaria. Sabemos que nuestros microbios intestinales tienen un papel en nuestro metabolismo, nuestra inmunidad e incluso en nuestro comportamiento, tanto en situación de salud como de enfermedad (Ballesteros & González, 2018). Cuando el microbiota intestinal se está desarrollando, la interacción de esta con el huésped resulta en la evolución de un sistema inmune intestinal único y distinto (Alarcón, González, & Erica, 2016). Por otro lado, el mantener cantidades adecuadas de microorganismos beneficiosos en el sistema gastrointestinal se convierte en un reto, por esta razón los probióticos se vienen estudiado en los últimos años (Holguín, et al, 2017).

Para que un microorganismo pueda ser considerado probiótico debe cumplir ciertas características como ser de origen humano, no ser patógeno, ejercer un efecto benéfico en el huésped, sobrevivir y metabolizarse en el intestino humano, tener la capacidad de adherirse al epitelio intestinal (Tonello, 2012); además no ser tóxico, permanecer viable durante almacenamiento, proporcionar propiedades sensoriales a los productos fermentados, y producir sustancias antimicrobianas (Sanders & Klaenhammer, 2001). Los probióticos son definidos como "microorganismos vivos que, cuando se administra en cantidades adecuadas, confieren beneficios en la salud en el huésped" (Comité Conjunto de Expertos FAO/OMS en aditivos, 2000).

Las cepas de probióticos viables son suministradas en el mercado, como alimentos fermentados, liofilizados, suplementos o como preparaciones farmacéuticas (Holzapfel et al, 2001). Entre los probióticos más utilizados en el consumo humano se encuentran las bacterias ácido-lácticas (BAL), que comprenden *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pero también se utilizan otras cepas no patógenas como *Streptococcus*, *Enterococcus*; y levaduras como *Saccharomyces boulardi* (Dunne, et al, 2001).

Lactobacillus sp durante décadas ha sido usado en la conservación de alimentos, en productos lácteos, vegetales fermentados, embutidos e inoculantes de ensilado. Además, son considerados probióticos y productores de nutraceuticos. Sin embargo, en la actualidad debido a la amplia gama de aplicaciones de *Lactobacillus sp* en biotecnología posee su gran potencial comercial, debido a un número de cepas importantes que todavía no son caracterizada (Giraffa, et al, 2010).

El sustrato fundamental de los probióticos, son los prebióticos (De la Cagigas & Blanco, 2002), los cuales estimulan de manera selectiva el crecimiento y la actividad de especies probióticas como *Bifidobacterium sp* y *Lactobacillus sp*, en el intestino, beneficiando así la salud humana (Rastall, 2004).

Los prebióticos usados son los galactooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS) (Vegas, et al, 2013). Los fructanos como la inulina y los FOS, están considerados por la FDA (Food and Drugs Administration) como ingredientes alimentarios GRAS (Generally Recognized As Safe) o “seguros” para el consumo. Se ha evidenciado que el consumo de un 5% de FOS en la dieta diaria, promueve la absorción de calcio, magnesio y fósforo (Fernandez, 2003).

Desde el punto de vista comercial, los fructooligosacáridos (FOS) representan mayor importancia, pues son los componentes alimentarios que ejercer mejor efecto prebiótico, por ser el sustrato más conveniente para el rápido crecimiento de algunas bacterias colónicas. Fueron los primeros oligosacáridos no digeribles en los que se verificaron propiedades funcionales (Santos, 2012). En las últimas décadas se han realizado diferentes investigaciones *in vitro* e *in vivo* en humanos, demostrando que pueden tener un impacto favorable en problemas relacionados con el síndrome metabólico (obesidad, diabetes, cardiovasculares, osteoporosis) y con un gran número de problemas gastrointestinales (García, et al, 2016).

El yacón (*Smallanthus sonchifolius*), es una raíz andina especialmente conocida por su alto contenido de FOS aproximadamente 60 a 70% en base seca; y una baja

proporción de azúcares reductores, por lo que ha sido recomendado como alimento funcional e ingrediente de suplementos dietéticos con potencial prebiótico (Campos, et al, 2012).

La baja viabilidad de probióticos en los diferentes productos comerciales genera la necesidad de realizar mayores investigaciones en esta área, en especial para uso humano. En el Perú la mayoría de las investigaciones sobre probióticos son enfocadas a la alimentación animal, con el fin de que estos mejoren en su alimentación dando mejores productos. Así mismo, el yacón es un tubérculo oriundo del Perú con muy poca presencia en la dieta de los peruanos, sin embargo, esta cuenta con muchos beneficios que lo llevan a ser considerado un alimento funcional.

El uso conjunto de la *Lactobacillus sp* y yacón pueden ser beneficiosos para ayudar a poblar la flora gastrointestinal y mantener un equilibrio saludable entre las diferentes bacterias presentes en el tracto gastrointestinal, lo cual hará que la absorción de nutrientes sea mejor, al igual que la actividad inmunomoduladora que se desarrolla a este nivel y la disminución de problemas gastrointestinales como infecciones, diarreas o estreñimiento.

En base a lo anteriormente expuesto, se formula la pregunta: ¿Tendrá el extracto yacón un efecto prebiótico sobre la viabilidad de *Lactobacillus sp* bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro* en comparación con un medio sin prebiótico?

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Evaluar el efecto prebiótico del extracto de yacón en la viabilidad de *Lactobacillus sp* bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*.

1.1.2. Objetivos específicos

- Evaluar la viabilidad de *Lactobacillus sp* en medios de cultivo de MRS y MRS - extracto de yacón, a través de simulación *in vitro*.
- Comparar la cinética de crecimiento de *Lactobacillus sp* y el consumo de sustrato en medio MRS y MRS – extracto de yacón.
- Probar el consumo de sustrato en medio MRS y MRS – extracto de yacón.
- Determinar y comparar los parámetros de crecimiento (μ , t_d) en ambas cinéticas, MRS y MRS – extracto de yacón

1.2. HIPÓTESIS

El extracto yacón tiene un efecto prebiótico sobre la viabilidad de *Lactobacillus sp* bajo condiciones gastrointestinales humanas simuladas *in vitro*, en comparación con un medio sin prebiótico.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. DESCRIPCIÓN DEL YACÓN (*Smallanthus sonchifolius*)

2.1.1. Generalidades

La planta de yacón es herbácea perenne, mide de 1 a 2.5 m de alto, con un tallo central, a veces ramificado desde la base. Las raíces son irregulares y fusiformes, en colores: rosado, blanco, amarillo, crema, moteado y jaspeado. Sus flores son pequeñas y de color amarillo (Oblitas, 2015)

El yacón es una raíz tuberosa (Figura 1), oriunda de la región andina del Perú, que ha sido considerado como alimento nutraceutico debido a sus componentes, como fibra alimentaria soluble y prebióticos, debido a su baja digestibilidad por las enzimas del tracto gastrointestinal humano, estimulación selectiva de crecimiento y actividad de bacterias intestinales promotoras de la salud, como los *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Santana & Cardoso, 2008).



Figura 1. Fruto de *Smallanthus sonchifolius* (Yacón)

2.1.2. Composición química de la raíz de yacón

Entre el 85 a 90% del peso fresco de las raíces se encuentra en forma de agua. No almacena almidón, sino que acumula sus carbohidratos en forma de fructooligosacáridos (FOS) y azúcares libres (fructosa, glucosa y sacarosa) (Manrique, et al, 2005). Los carbohidratos representan alrededor del 90% del peso seco de las raíces recién cosechadas, de los cuales entre 50 y 70% son FOS. Sin embargo, la composición relativa de los diferentes azúcares varía significativamente debido a diferentes factores como el cultivar, la época de siembra y cosecha (Seminario, et al, 2014) (Ver tabla 1).

Tabla 1. Caracterización físico químico y funcional de diferentes extractos de yacón.

Análisis	Extracto de 20° Brix	Extracto de 28° Brix	Extracto de 36° Brix
Humedad (%)	79.8 ± 0.01	72.6 ± 0.12	62.4 ± 0.31
Cenizas (%)	3.3 ± 0.39	5.4 ± 0.22	7.8 ± 0.41
Azúcares reductores (%)	9.3 ± 0.50	12.3 ± 0.47	17.1 ± 0.70
Fructosa (%)	4.84 ± 0.32	7.04 ± 0.26	9.81 ± 0.18
Glucosa (%)	2.56 ± 0.45	4.45 ± 0.12	5.80 ± 0.07
Sacarosa (%)	2.07 ± 0.10	3.14 ± 0.11	4.26 ± 0.07
Densidad específica	1,078.7 ± 6.8	1,124.4 ± 3.0	1,163.2 ± 0.8
Color (ΔE)	8.4 ± 0.57	8.4 ± 0.17	10.6 ± 0.26
FOS (g/100ml)	10.3 ± 0.10	14.1 ± 1.03	18.9 ± 1.19
Capacidad antioxidante (μmol TE/ml)			
- Método ABTS	1.65 ± 0.11	1.59 ± 0.05	2.42 ± 0.05
- Método ORAC	0.71 ± 0.03	1.0 ± 0.01	1.06 ± 0.04
Contenido de minerales:			
- Potasio (mg/L)	1720.00 ± 0.00	2361.00 ± 0.00	2229.00 ± 0.00
- Calcio (mg/L)	390.00 ± 0.00	458.00 ± 0.00	517.00 ± 0.00
- Fósforo (mg/L)	124.73 ± 0.00	198.41 ± 0.00	195.06 ± 0.00

Fuente: (Mejía, 2015)

2.2. FRUCTOOLIGOSACÁRIDOS

2.2.1. Definición

Los fructooligosacáridos son carbohidratos compuestos principalmente por fructosa y residuos de glucosa escasos, su estructura está formada por uniones repetidas de disacáridos como sacarosa, inulobiosa y levanobiosa (Hernandez & Jiménez, 2010). Los fructanos son fructosilpolímeros que consisten en cadenas lineales de D-fructosa, unidas por un enlace β -(2 \Rightarrow 1) a la fructosa y que regularmente tiene una molécula de D-glucosa terminal unida por un enlace α -(2 \Rightarrow 1) a una fructosa (Chacón, 2006). Las estructuras químicas de algunos FOS de cadena corta con interés se representan en la Figura 2. Los FOS tienen un grado de polimerización aproximada de 3 y 7 unidades, estos son considerados prebióticos, ya que no son digeribles por el tracto digestivo humano (Guevara & Vallejo, 2015).

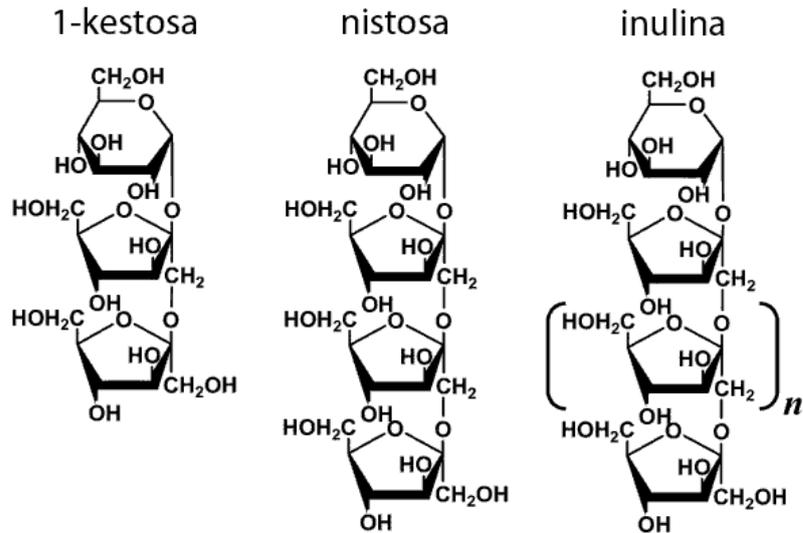


Figura 2. Estructuras químicas de cadenas cortas de fructooligosacáridos.

Fuente: Sabater, et al, 2009.

2.2.2. Función

Debido a la falta de las enzimas que degradan los enlaces glucosídicos β ($2 \Rightarrow 1$), en el tracto gastrointestinal humano, los fructooligosacáridos no pueden ser metabolizados. De esta manera al ser ingeridos se desplazan en casi todo el tracto gastrointestinal hasta alcanzar el colon; donde son fermentados por bacterias probióticas, que provocan efectos benéficos sobre la salud humana (Coussement, 1999).

Al nivel del colon, existen grupos de bacterias dañinas (bacteroides, fusobacterias, clostridios, etc), las mismas que favorecen el crecimiento de hongos, levaduras y otro grupo de bacterias patógenas, causantes de la producción de toxinas y compuestos con potencial cancerígenos. Generalmente estas bacterias son las que dan lugar a cuadros de diarrea y otras enfermedades gastrointestinales (Conway, 2001).

Existe una constante competencia entre los probióticos y las bacterias dañinas por ocupar en mayor número la población de microbiota del colon. El favorecimiento hacia el crecimiento de alguno de los grupos de bacterias será establecido por la ingesta de alimentos en el día a día (Brady, et al, 2000).

La variación entre las bacterias dañinas y los probióticos, en especial las *Bifidobacterium* y los *Lactobacillus*, es la presencia de enzimas degradadoras de los enlaces β (2 \Rightarrow 1) presente en los fructanos. De esta manera los FOS pueden fermentados y la energía producida se usa para la multiplicación y proliferación de probióticos. Cuando se fermentan los FOS se produce ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta (butirato, propionato y acetato), lo que genera un descenso en los niveles de pH del colon generando un ambiente hostil para las bacterias dañinas para el colon. La mejor asimilación del calcio y metabolismo de lípidos, es algo propio de los fructanos asociado a los ácidos grasos de cadena corta (Roberfroid, 2000).

2.2.3. Propiedades

- Salud Gastrointestinal

Los FOS son de gran importancia en la prevención y/o disminución de los riesgos de algunas enfermedades o afecciones tales como: la constipación; inhibición de cuadros diarreicos, ya que los lactobacilos tienen un efecto inhibitorio de sobre las bacterias patógenas gram positivas y negativas (Pazmiño, 2014).

- Cáncer de colon

Según investigaciones por parte de la Asociación Americana de Cáncer, indican que el extracto de yacón tiene un alto contenido de ácido elágico el cual previene principalmente el cáncer de colon. También se destaca la importancia de otros estudios que señalan que el consumo del yacón contribuye a diluir los carcinógenos fecales y promotores tumorales por la presencia de mayor volumen fecal y capacidad para inducir la secreción colónica, de esta forma reduce el contacto con agentes carcinógenos previniendo el cáncer de colon (Rodríguez & Arteaga, 2015).

- Sistema inmunológico

Estimula el sistema inmunológico disminuyendo los niveles de bacterias patógenas en el intestino y aliviando el estreñimiento. Además, aumenta la absorción del calcio, lo que disminuye el riesgo de padecer osteoporosis. Así

mismo disminuye los niveles de triglicéridos y ácidos en el suero sanguíneo (Escobar, 2017)

- Diabetes

El sabor dulce de la raíz de yacón proviene de la oligofruktosa inulina el cual, por medio de la cocción se transforma en fructooligosacarina, que no es metabolizado por el sistema gastrointestinal humano, de esta manera se disminuye la ingesta de azúcares; y por lo tanto, resulta ideal para consumo de los diabéticos (Suquilanda, 2015).

2.3. PREBIÓTICOS

2.3.1. Definición

Los prebióticos son sustancias de la dieta que nutren a un grupo seleccionado de microorganismos que habitan en el intestino y favorecen el crecimiento de bacterias beneficiosas por sobre las nocivas (Saavedra & Zuñiga, 2016). Entre ellos tenemos los fructooligosacáridos (FOS), la inulina y la lactulosa, que se ingieren a través de alimentos naturales o incorporándolos a alimentos como lácteos, bebidas, pastelería o cereales (Pavón & Gillán, 2005). Es responsabilidad del microbiota intestinal, la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y ácido láctico, como consecuencia de la fermentación de carbohidratos no digeribles. Estos productos disminuyen el pH en el colon creando un ambiente donde las bacterias potencialmente patógenas no pueden crecer y desarrollarse (De las Cagigas & Blanco, 2002).

2.3.2. Características

Para que se considere un ingrediente o alimento como prebiótico debe cumplir algunas características tales como:

- i) No ser hidrolizado o absorbido en el tracto gastrointestinal humano superior (esófago, estómago y duodeno) y a su vez, ser resistente a la acidez gástrica, la hidrólisis por enzimas digestivas y no absorberse en el intestino delgado.
- ii) Ser fermentado de forma selectiva por las bacterias beneficiosas del microbiota intestinal

- iii) Ser capaz de inducir efectos fisiológicamente benéficos para la salud humana (Corzo, et al, 2015).

En general, los prebióticos oligosacáridos, poseen un nivel bajo de dulzor, lo cual es útil para la producción de alimentos cuando se requiere de un agente espesante poco dulce (Morales & Vélez, 2013).

Uno de los requisitos principales de este tipo de alimentos es que los microorganismos probióticos permanezcan viables y activos en el alimento y durante el pasaje gastrointestinal para garantizar así su potencial efecto benéfico en el huésped (Olagnero, et al, 2007).

2.3.3. Ventajas

Algunas de las ventajas, según Saura-Calixto & Goñi, 2004 de los prebióticos son:

- Mejora la absorción de calcio y magnesio, mejorando la salud de dientes y huesos.
- El sistema inmunitario mejora.
- Restringe el crecimiento de las bacterias patógenas y mantiene la integridad intestinal.
- Es de utilidad en las diarreas por infección.
- Disminuye los niveles de colesterol, corrigiendo la dislipemia.

2.4. BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL)

2.4.1. Generalidades

Son altamente usados en procesos fermentativos debido a su capacidad de inhibir el crecimiento de algunos microorganismos contaminantes. Las BAL tienen un gran potencial probiótico, ya que son seguros y benéficos para salud, así como los metabolitos que produce, que son: ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, diacetilo y otros compuestos de peso molecular bajo (Ramirez, 2010).

Las bacterias ácido-lácticas representan un alto potencial biotecnológico, dada su presencia en diversos procesos fermentativos de alimentos destinados al consumo humano y animal. Estos microorganismos favorecen las características

organolépticas a los alimentos. Sumado a su papel en procesos de conservación, una cepa de BAL del género *Lactobacillus* son de beneficio para la salud de humanos y animales (Rondón, et al, 2008).

2.4.2. Género *Lactobacillus*

Dentro de las BAL, las principales bacterias que son usadas como probióticos, en estudios clínicos son las del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, siendo la mayoría de estos perteneciente al primer género (Oliveira & González, 2016).

Los microorganismos pertenecientes al género *Lactobacillus* (Figura 3), por lo general se encuentran en el intestino delgado y la vagina de los seres humanos. Muchas de las bacterias de este género producen metabolitos como: vitamina K, lactasa y antimicrobianos como la acidolina, acidolfina, lactocidina y bacteriocinas, los cuales protegen al hospedero combatiendo y previniendo infecciones (Cabezas, 2009).

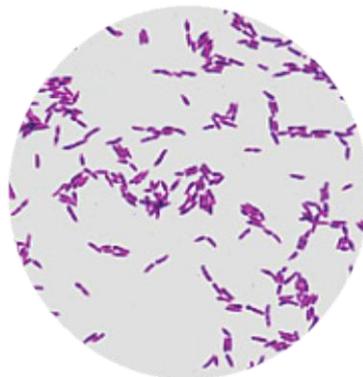


Figura 3. *Lactobacillus sp* con tinción gram visto a 100X

2.5. PROBIÓTICOS

2.5.1. Definición

La OMS refiere a los probióticos como como microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada confieren un efecto beneficioso en la salud del huésped (Oliveira & González, 2007). Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las usadas más frecuentemente como probióticos (Organisation,

2011). Varias especies de *Lactobacillus* forman parte del microbiota intestinal de diferentes animales y humanos, son considerados como GRAS y han sido también utilizando en la fermentación de varios tipos de alimentos (Iñiguez, et al, 2014).

2.5.2. Características

Los microorganismos deben estar vivos y ser administrados en una cantidad adecuada para dar un beneficio sobre la salud del consumidor, deben ser seguros, sin efectos secundarios. Además, deben resistir a las condiciones gástricas y/o biliares, y tener capacidad de adhesión al epitelio intestinal para colonizar el tracto gastrointestinal (Edo Jimeno, 2016).

Algunos de los factores extrínsecos más importantes que afectan la viabilidad y sobrevivencia de las células probióticas son: pH (como parte del proceso de fermentación), oxígeno disuelto, interacciones antagónicas con otras especies, composición del medio de cultivo, concentración final de azúcares (aumenta la presión osmótica), prácticas de inoculación (momento adecuado para el agregado del cultivo probiótico), temperatura y duración de la fermentación, condiciones de almacenamiento del producto (Olagnero, et al, 2007).

2.5.3. Mecanismo de acción

Existen gran variedad de mecanismos de acción (ver Figura 4) que mejoran la resistencia del huésped ante los patógenos, desarrollando diferentes funciones:

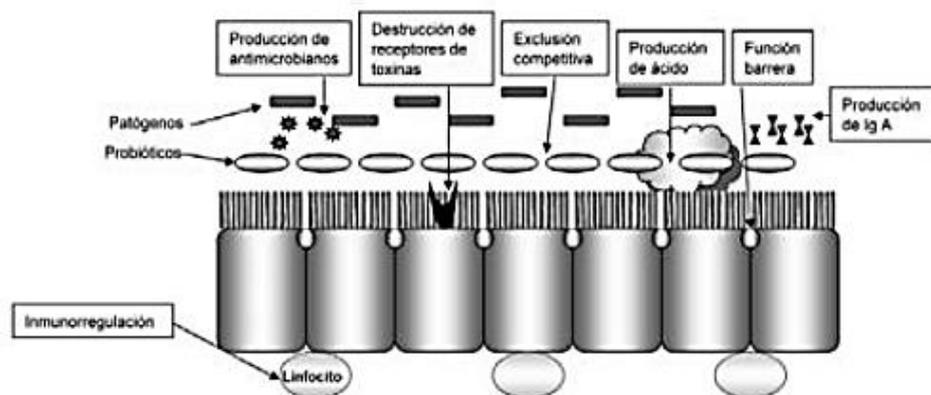


Figura 4. Mecanismo de actividad probiótica

- Efectos bioquímicos: Se desarrollan con la producción de sustancias antimicrobianas que afectan la viabilidad de células patógenas, así como el metabolismo bacteriano, la producción de toxinas, además previenen la descomposición de alimentos mediante:
 - Nivel bajo de pH, que favorece proliferación de organismos beneficiosos (Cueto, Acuña, & Valenzuela, 2010).
 - Metabolitos como: ácido láctico, ácidos grasos de cadena corta, peróxido de hidrógeno y diacetilo (Ramirez, 2010).
 - Bacteriocinas: son péptidos con actividad antimicrobiana que inhibe microorganismos competidores. Hay 4 clases: clase I: lantibióticas, termolábiles, pequeños péptidos (<5 kDa); clase II: pequeñas (13 kDa), hidrofóbicas, termoestables, lineales y sin modificaciones postraduccionales; clase III: no lantibióticas, termolábiles, grandes péptidos (30 kDa), con actividad y estructura compleja; clase IV (complejas): asociadas a lipoproteínas y glicoproteínas (Mondragón, et al, 2013).

- Competición por nutrientes: Este es un factor importante en la composición de la microbiota bacteriana, las bacterias que se alojan en la zona proximal del colon cuentan con un buen suministro de nutrientes proveniente de los residuos del intestino delgado, contrario a las bacterias que se ubican en la porción distal del colon, por tanto la presencia de microorganismos probióticos baja considerablemente (Fook & Gibson, 2002).

- Actividad Inmunomoduladora: Estimula la inmunidad adquirida e innata, con la producción de inmunoglobulina A (IgA), activa mecanismos celulares y humorales; lo cual, activa la actividad fagocitaria aumentando los macrófagos e interferón Gamma (IFN-gamma) y citoquinas proinflamatorias (ver Figura 5) (Rodríguez González, 2009).

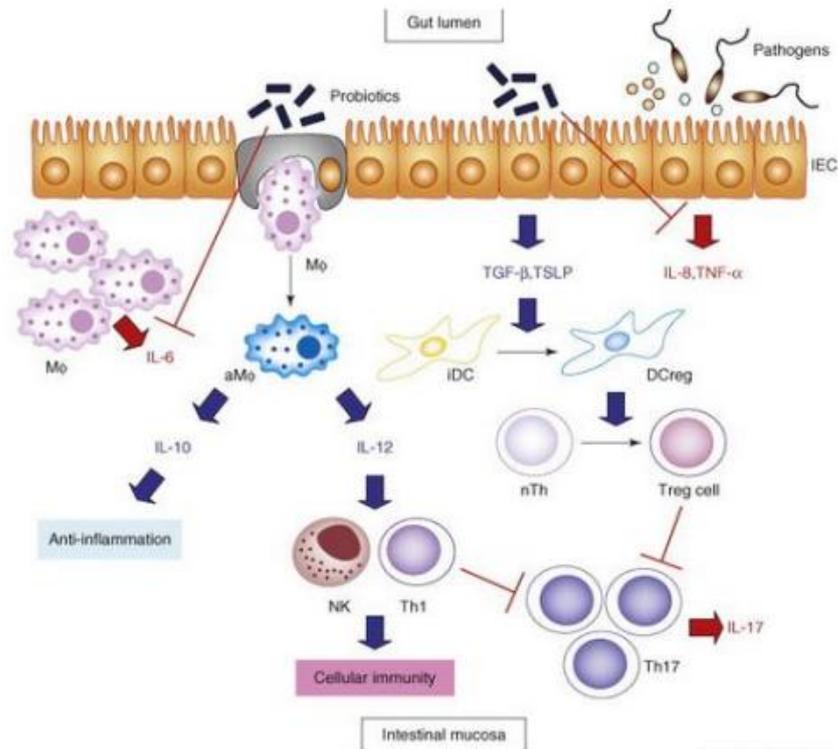


Figura 5. Modulación de células inmunitarias en el intestino por probióticos.

FUENTE: (Shida & Nanno, 2008).

- Adhesión celular: Tienen capacidad de adherencia a enterocitos y colonocitos, afectando la microflora intestinal. Con la adhesión celular los probióticos resisten la peristalsis y evitar ser expulsados. Además, bloquean la invasión y adhesión de enteropatógenos. Una de las cepas con habilidad de adhesión son los *Lactobacillus sp* (Moreno, 2012).

2.6. PRUEBAS *in vitro* PARA POTENCIAL PROBIÓTICO

2.6.1. Tolerancia a pH ácido

Esta es una prueba necesaria para evaluar microorganismos probióticos, ya que la resistencia ante los ácidos varía entre especies. El pH del estómago es de 1.5 y el tiempo promedio de estancia en el estómago es de 90 minutos, al realizar la las pruebas *in vitro* los microorganismos deben resistir al tiempo y pH sin perder viabilidad (Rivas & González, 2006).

2.6.2. Crecimiento en bilis

Los probióticos deben tener la capacidad de resistir los efectos que causan la concentración y duración de la exposición a las sales biliares, mostrando así estabilidad y resistencia a la bilis (Oliveira & González, 2016).

2.6.3. Actividad antimicrobiana

Las BAL producen metabolitos antimicrobianos como las bacteriocinas u otros compuestos sintetizados que inhiben a otras cepas (Moreno, 2012).

2.6.4. Susceptibilidad a los antibióticos

Está relacionado con genes específicos que se hallan en cromosomas, plásmidos o los transposones. Por tanto, no deberían usarse en alimentos microorganismos que tengan genes transmisibles de resistencia a medicamentos. Hasta la fecha no hay una metodología fenotípica normalizada que haya sido reconocida internacionalmente para lactobacilos y bifidobacterias (no patógenas) (FAO, 2001).

Existen otras pruebas como la adhesión celular, actividad inmunomoduladora, capacidad antioxidante y pruebas *in vivo*, entre otras pruebas que no serán consideradas en este estudio; al igual que la actividad antimicrobiana y la susceptibilidad a los antibióticos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para diferenciar el efecto prebiótico del extracto de yacón con respecto a la tolerancia y/o resistencia de *Lactobacillus sp* en las pruebas *in vitro*, se realizarán los siguientes análisis:

Grupos de experimentación

- Primer grupo: MRS-Extracto de yacón
- Segundo grupo (control): medio definido de MRS.

Antes del inicio del tratamiento experimental, a todos los grupos se les aplica una prueba de viabilidad; del mismo modo, se aplica una vez que hayan recibido el tratamiento experimental (ver tabla 2).

Tabla 2. Diseño experimental de la investigación.

Grupos experimentales	Preprueba	Tratamiento experimental	Post prueba
RG ₁	0 ₁	X ₁	0 ₂
RG ₂	0 ₃	X ₂	0 ₄

Fuente: (Propia)

Donde:

- RG₁ y RG₂ representa el grupo de experimentación, MRS y MRS – extracto de yacón, respectivamente.
- X₁ representa el tratamiento experimental, es decir, la tolerancia a pH bajo, mientras que en X₂ representa el tratamiento de tolerancia a sales biliares.
- 0₁ y 0₃ representan las pruebas realizadas antes del inicio del tratamiento experimental, mediante la determinación cuantitativa de la viabilidad de *Lactobacillus sp*.
- 0₂ y 0₄ representan las pruebas realizadas después del tratamiento experimental, mediante la determinación cuantitativa de la viabilidad de *Lactobacillus sp*.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1. Población

Campos de cultivo de yacón (*Smallanthus sonchifolius*).

3.2.2. Muestra

Raíz de yacón (*Smallanthus sonchifolius*).

3.2.3. Unidad de análisis

Extracto de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) procedente del distrito de Usquil, Provincia de Otuzco, departamento de La Libertad.

3.2.4. Material biológico

Raíz de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) procedente del distrito de Usquil, Provincia de Otuzco, departamento de La Libertad. La selección del material se realizó tomando en cuenta daños en la cáscara, daños físicos por transporte, deterioro microbiano, oxidación y/o contaminación en general.

3.3. IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE YACÓN

La identificación botánica de la planta de yacón procedente del distrito de Usquil, Provincia de Otuzco, departamento de La Libertad, se realizó en el Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo (HUT), a través de códigos botánicos y taxonómicos (ver Anexo 1).

3.4. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE YACÓN

3.4.1. Preparación de extracto de yacón

Se obtuvo el extracto de las raíces de yacón mediante el procedimiento (ver Figura 6 y Anexo 2) utilizado para la obtención del extracto (Castillo, 2011).

- Lavado y desinfección:

Las raíces primero se limpiaron en seco con ayuda de un cepillo, luego se lavó con abundante agua. Posteriormente, las raíces se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio 200 ppm de cloro residual por 5 minutos, para disminuir la carga microbiana. Se eliminaron, además los restos de hipoclorito.

- Pelado y troceado:

Se realizó manualmente con un cuchillo de acero inoxidable y se cortó las raíces a la mitad para facilitar la obtención del extracto. Para el control de pardeamiento se añadirá ácido cítrico al 1%.

- Obtención del Extracto:

Los trozos de yacón se pasaron por un extractor y se recepcionó en un frasco de vidrio con ácido cítrico al 0.4%.

- Concentración:

Se realizó en un rotavapor a una temperatura de 80°C, 100 rpm y una presión de 48 kPa, hasta alcanzar la concentración de 50° Brix, evaluados con ayuda de un refractómetro.

- Esterilización:

Se realizará en autoclave a 115°C de temperatura, durante 15 minutos.

- Almacenamiento:

El extracto se envasó en tubos de ensayo y se almacenó en refrigeración.

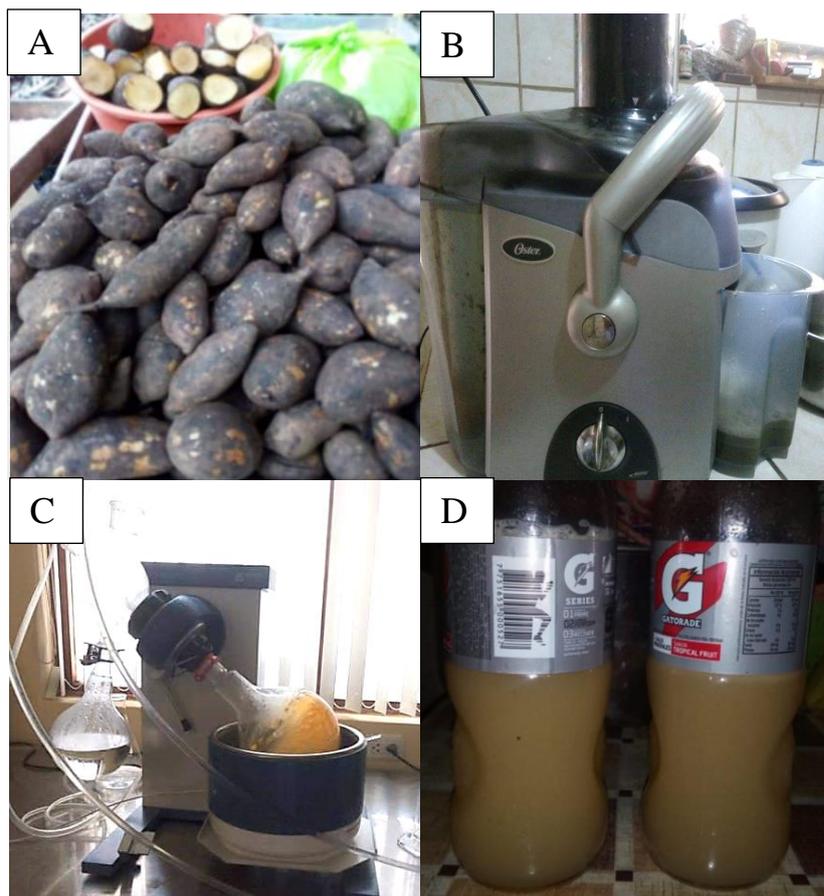


Figura 6. Proceso de la obtención del extracto de yacón (*Smallanthus sonchifolius*).

(A) Recepción y selección de la materia prima. (B) Obtención del extracto de yacón usando una extractora. (C) Concentración del extracto de yacón usando rotavapor. (D) Extracto de yacón concentrado a 50° Brix

3.4.2. Caracterización del extracto de yacón

Se preparó una muestra de 500 mL de extracto de yacón, la cual se analizó en el Laboratorio de Apoyo y Servicio a la Comunidad e Investigación (LASACI) de la Universidad Nacional de Trujillo (ver Anexo 3).

3.5. FORMULACIÓN DE MEDIOS DE FERMENTACIÓN

3.5.1. Medio MRS

Para la preparación del medio de cultivo líquido MRS comercial, se adicionó 11.03 g de medio y se aforó a 200 mL de agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos a 1 atm de presión.

3.5.2. Formulación de medio MRS – extracto de yacón

La adaptación de este medio se hizo cambiando la fuente de carbono del medio MRS líquido, en el cual se reemplazó la glucosa con el extracto de yacón concentrado a 50°Brix (ver Anexo 4). Se esterilizó la preparación en autoclave a 115°C por 15 minutos a 1 atm de presión.

3.6. SIMULACIÓN DE TOLERANCIA A ÁCIDO Y SALES BILIARES

Para la tolerancia de ácido se realizó en tubos con 5 mL de caldo MRS ajustado a pH 2.0 (ver Anexo 4, Tabla 9) con adición de ácido clorhídrico 6M, se sembró 10% del inóculo (ver Anexo 5) de *Lactobacillus sp.*, se incubó por 2 h a 37°C y se realizó un recuento de placas inicial y final del cultivo usando placas para recuento de Bacterias Ácido Lácticas 3M® Petrifilm® (ver Anexo 6).

La tolerancia a sales biliares se realizó en tubos con 5 mL enriqueciendo el caldo MRS con 0.3% de sales biliares (Sigma B8756) (ver Anexo 4, Tabla 10) e incubando 10% (ver Anexo 5) de *Lactobacillus sp.*, incubó por 2 h a 37°C y se realizó un recuento de placas inicial y final del cultivo usando placas para recuento de Bacterias Ácido Lácticas 3M® Petrifilm® (ver Anexo 6) (Noriega et al, 2004).

El proceso se realizó tanto con medio MRS comercial como con medio MRS – extracto de yacón (ver Anexo 4) y por triplicado.

3.7. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CÉLULAS VIABLES

El conteo de células viables se realizó con placas para recuento de Bacterias Ácido Lácticas 3M® Petrifilm® (ver Anexo 6). Fueron incubados a 37°C por 24h determinando el número de unidades formadoras de colonias. El porcentaje de supervivencia fue calculado de acuerdo con la siguiente ecuación:

Porcentaje de supervivencia

$$(\%) = \frac{\log UFC N_1}{\log UFC N_0} \times 100$$

Donde N_1 representa el total de células viables después de los tratamientos y N_0 representa el número inicial de células inoculadas (Bao, et al, 2010).

3.8. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *Lactobacillus sp*

La cinética de crecimiento se realizó en un Erlenmeyer con 200mL del medio MRS comercial y el inóculo ajustado (180 mL del medio y 20 mL del inóculo), con agitación constante en incubadora shaker a 100 rpm a 37°C de donde se tomó muestras a las 0, 3, 6, 9, 12, 24 horas de incubación, para medir el consumo de sustrato (glucosa), mediante el kit de glicemia enzimática (ver Anexo 7) y el crecimiento de biomasa, por lo que se extrajo 2 mL de muestra para hacer diluciones y se sembró en placas para recuento de Bacterias Ácido Lácticas 3M[®] Petrifilm[®] (ver Anexo 6), estos fueron incubados a 37°C por 24 horas, se determinó el crecimiento log UFC/mL.

De igual manera se realizó la cinética de crecimiento con el medio MRS – extracto de yacón y se obtuvo el crecimiento de biomasa mediante placas para recuento de Bacterias Ácido Lácticas 3M[®] Petrifilm[®] (ver Anexo 6) y determinación de consumo de sustrato (FOS) por UHPLC, usando los standards de 1-kestosa y nistosa (Sigma Aldrich) (ver Anexo 8).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. TOLERANCIA A PH ÁCIDO Y RESISTENCIA A SALES BILIARES:

La tolerancia a pH ácido es un criterio obligatorio en para la evaluación de la capacidad de tolerancia de prebióticos que vayan a ser usados en producir alimentos fermentados como los lácteos, la venta libre de suspensiones de probióticos y otros, de igual manera lo es la resistencia a las sales biliares (Paitán, et al, 2019).

Tabla 3. Evaluación de la tolerancia a pH 2.0 y porcentaje de supervivencia.

	T ₀ (UFC/mL)	T ₁ (UFC/mL)	Viabilidad (%)
Sin prebiótico	4050	12	29.66
Con prebiótico	3010	24	39.67

Los valores obtenidos a partir del estudio (ver Tabla 3) muestran un porcentaje de supervivencia de 29.66% para la tolerancia al pH 2.0 en las bacterias que fueron expuestas sin prebiótico, en cuanto a las bacterias que fueron sometidas a la misma prueba con adición de prebiótico dieron un porcentaje de supervivencia de 39.67%. Mientras que Cueto & Aragón (2012), registra un porcentaje de supervivencia en el medio ajustado a pH 2.0 fue de 54%. Los resultados dados por Vasquez y otros (2007), para la evaluación a tolerancia a pH bajo con valores de 3.09 y 1.91, donde se vio un descenso del concentración celular de 18 y 90% respectivamente, después de 30 minutos de exposición.

Un dato importante es que la evaluación *in vitro* de tolerancia a pH bajo de bacterias ácido-lácticas puede no dar un buen desempeño en su comportamiento *in vivo*, debido a que la correlación de ambos es deficiente (Cruz et al, 2009). Paitán y otros (2019) consideran como positivo a la tolerancia a pH bajo a aquellas cepas que dieron un valor igual o superior al 30% de supervivencia. Por tanto, vemos que hay una tolerancia positiva al pH bajo en las bacterias que fueron sometidas a la prueba con la adición del prebiótico.

Tabla 4. Análisis de pre y post prueba de resistencia al pH ácido en medio MRS y medio MRS – extracto de yacón

	Pre-prueba	Post-prueba
Media	3530	18
Varianza	540800	72
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	-1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	6.677	
P(T<=t) una cola	0.047	
Valor crítico de t (una cola)	6.314	
P (T<=t) dos colas	0.094	
Valor crítico de t (dos colas)	12.706	

El nivel de significancia es de $0.094 > 0.05$, por tanto, la adición de extracto de yacón al medio MRS no genera una diferencia promedio significativa sobre la viabilidad de *Lactobacillus sp* en la prueba de resistencia al pH ácido.

Otro criterio importante es la resistencia a sales biliares, ya que este es un factor limitante de crecimiento en el intestino delgado donde hay un tránsito rápido (Guerrero Medina, 2012). Las sales biliares disuelven la membrana lipídica generando lisis y muerte celular (Succi, et al, 2005). El mecanismo molecular que da la capacidad a las bacterias probióticas de resistir a las sales biliares y mantener la viabilidad a través del tracto gastrointestinal es gracias a la hidrolasa de sales biliares (BSH) que se encuentran en las bacterias del género *Lactobacillus* (Bernal, 2017).

Tabla 5. Evaluación de la resistencia a sales biliares y porcentaje de supervivencia.

	T ₀ (UFC/ml)	T ₁ (UFC/ml)	Viabilidad (%)
Sin prebiótico	53	26	79.05
Con prebiótico	150	75	86.17

Posterior a la realización de la prueba (ver Tabla 4) se muestra que las bacterias sin probiótico tuvieron una viabilidad en promedio de 79.05%, a comparación de las bacterias que fueron sometidas a la misma prueba con adición de prebiótico dieron un porcentaje de supervivencia de 86.17%. Según los resultados dados por (Aragón, 2012) se obtuvo un porcentaje 73.6% de supervivencia en medio enriquecido con 0.3% de sales biliares durante un periodo de dos horas. Mientras que el estudio realizado por Bolado, Acedo, & Pérez (2009) muestra un 48.4% de supervivencia después de la exposición a sales biliares y un porcentaje de supervivencia de 41.2% exposición a sales biliares, después que se les expuso a condiciones de pH bajo. En otro estudio realizado por Vasquez y otros (2007) se usó oxgall como fuente de sales biliares, el reactivo fue adicionado en medio MRS en dos concentraciones distintas, 0.5% y 0.9%, los cuales presentan una disminución del crecimiento de 47% y 50% respectivamente; en comparación al control y tuvieron una exposición durante 48 horas.

La concentración de sales biliares varía de persona a persona, y de manera general, los ensayos *in vitro* no son lo suficientemente exactos en la composición de las sales biliares de los humanos (Zuñiga, 2017).

Es necesario que, *Lactobacillus sp* tenga un sistema de protección que ayude a contrarrestar las condiciones hostiles del estómago (pH bajo) y la bilis en el intestino delgado. Las microcápsulas secas dan una capa adicional con el fin de proteger el núcleo de la bacteria, ayudando a liberar el núcleo bacteriano en el sitio adecuado del tracto gastrointestinal (Montes, 2013). Por ello, que a *Lactobacillus sp* se le adiciona un prebiótico, que es el extracto de yacón, lo cual da una mayor resistencia en comparación a aquellos *Lactobacillus* que fueron sometidos a las mismas pruebas (ver Tabla 3).

Tabla 6. Análisis de pre y post prueba de tolerancia a sales biliares en medio MRS y medio MRS – extracto de yacón

	Pre-prueba	Post-prueba
Media	101.5	50.5
Varianza	4704.5	1200.5
Observaciones	2	2
Coeficiente de correlación de Pearson	1	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	1	
Estadístico t	2.125	
P(T<=t) una cola	0.140	
Valor crítico de t (una cola)	6.314	
P (T<=t) dos colas	0.280	
Valor crítico de t (dos colas)	12.706	

El nivel de significancia es de $0.280 > 0.05$, por tanto, la adición de extracto de yacón al medio MRS no genera una diferencia promedio significativa sobre el crecimiento de *Lactobacillus sp* en la prueba de tolerancia a sales biliares.

4.2. CINÉTICA DE *Lactobacillus sp* EN MEDIO MRS

En esta cinética se evaluó el crecimiento de la biomasa y el consumo de glucosa en el tiempo de fermentación (24 horas), se observó turbidez en el medio y el característico olor a ácido láctico, lo cual evidenciaba el aumento de biomasa. La mayor cantidad de biomasa se alcanza a las 24 horas con 180 UFC/mL (ver Tabla 5 y Figura 7) y el mayor consumo de sustrato registrado fue de 16.91g/L de glucosa (Ver Tabla 5 y Figura 7).

Tabla 7. Datos obtenidos en la cinética de *Lactobacillus sp* en medio MRS

Tiempo	Horas	Biomasa (UFC/mL)	Ln (UFC/mL)	Glucosa (g/L)
T0	0	85	4.44	102.37
T1	3	96	4.56	102.11
T2	6	100	4.61	82.79
T3	9	120	4.79	78.04
T4	12	143	4.96	18.10
T5	24	180	5.19	16.91

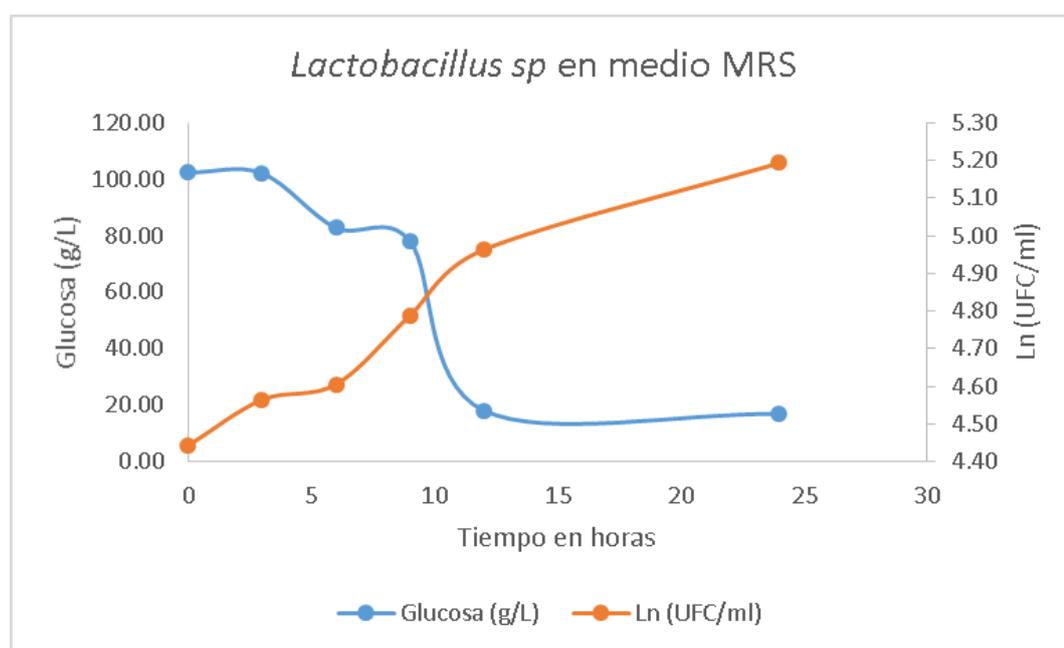


Figura 7. Cinética de crecimiento y consumo de sustrato (Glucosa) de *Lactobacillus sp* en medio MRS

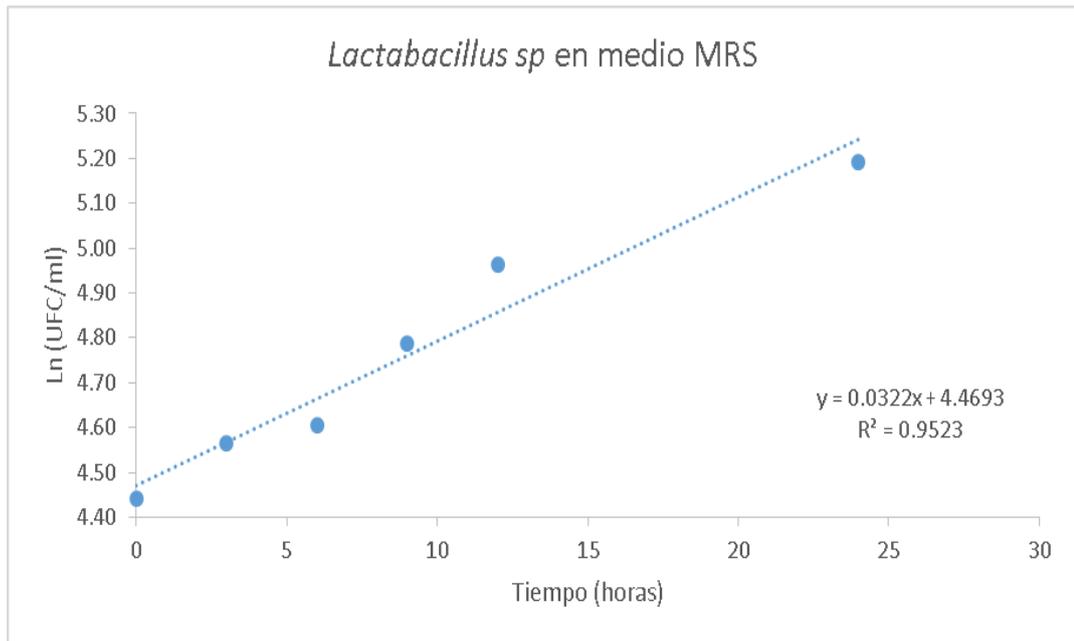


Figura 8. Fase exponencial del crecimiento de *Lactobacillus sp* en medio MRS

Usando los datos obtenidos en la ecuación de la recta (ver Figura 8), se obtiene la velocidad específica de crecimiento celular (μ) y el tiempo de duplicación celular (t_d), que corresponde a 0.0322 h^{-1} y 21.53 horas respectivamente.

Jurado & Jarrín (2015), en su cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* realizado en medio MRS, evidencia el fin de la fase exponencial a las 14 h 24 min con una biomasa de $1,3 \times 10^{13}$ UFC/mL; con respecto al consumo de azúcar en el mismo periodo hubo un valor de 2.70 mg/L. En lo que refiere a la velocidad específica de crecimiento fue de 14.48 h^{-1} y un coeficiente de determinación R^2 de 0.772.

Jurado & Martínez, (2015) obtiene los siguientes datos en la cinética de crecimiento *Lactobacillus lactis* en el medio MRS, el final de la fase exponencial fue a las 14 h 24 min, la velocidad específica de crecimiento fue de 0.657 h^{-1} y un coeficiente de determinación R^2 de 0.86. La biomasa tuvo un crecimiento máximo en la fase exponencial con un valor de 77×10^{10} UFC /mL y azúcar 2.33 mg/mL.

Jurado, Ramírez, & Aguirre, (2013) realizaron un estudio donde evaluaron dos cepas de *Lactobacillus plantarum* (H1 y H2) en dos medios (MRS y M4), donde los resultados para viabilidad en M4 fueron para H1 y H2 con valores de 3×10^{12} y 6×10^{11} UFC/mL a las 12 horas y el consumo de azúcar para H1 y H2 fueron de 8.90 g/L y 17.66 g/L. La mejor velocidad específica de crecimiento se vió en medio MRS con H1 que tuvo un valor de 0.9803 h^{-1} , sin embargo el mejor tiempo de duplicación se observó con H2 en medio M4 con un valor de 64.44 min.

4.3. CINÉTICA DE *Lactobacillus sp* EN MEDIO MRS–EXTRACTO DE YACÓN

En esta cinética, al igual que la anterior, se evaluó tanto el crecimiento de la biomasa, como el consumo de FOS (nistosa y 1-kestosa) en un tiempo de fermentación (24 horas); durante esta evaluación se observó la turbidez en el medio y el característico olor a ácido láctico, lo cual evidenciaba el aumento de biomasa. La mayor cantidad de biomasa se alcanza a las 24 horas con 2780 UFC/mL (ver tabla 6 y figura 9) y las menores cantidades de sustrato registrados fueron de 98742 mg/L y 102055 mg/L para nistosa y 1-kestosa correspondientemente (ver tabla 6 y figura 10).

Tabla 8. Datos obtenidos en la cinética de *Lactobacillus sp* en medio MRS

Tiempo	Horas	Biomasa (UFC/mL)	Ln (UFC/mL)	Nistosa (mg/mL)	Kestosa (mg/mL)
T1	0	208	5.34	98771	102079
T2	3	363	5.90	98785	102065
T3	6	523	6.26	98756	102092
T4	9	717	6.57	98742	102090
T5	12	1477	7.30	98748	102074
T6	24	2780	7.93	98742	102055

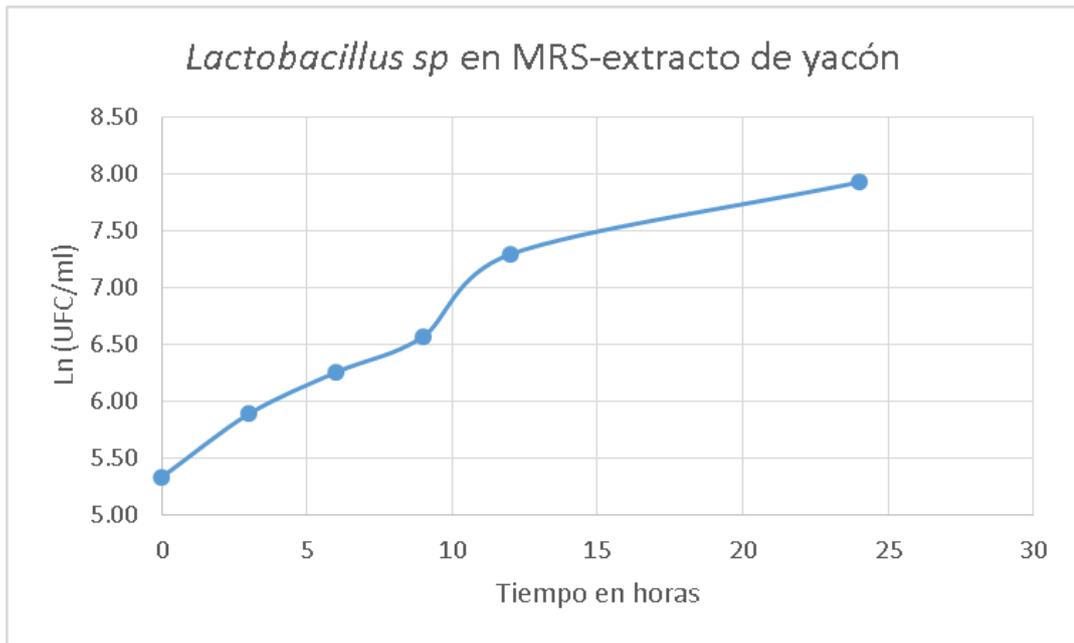


Figura 9. Cinética de crecimiento de *Lactobacillus sp* en medio MRS - extracto de yacón

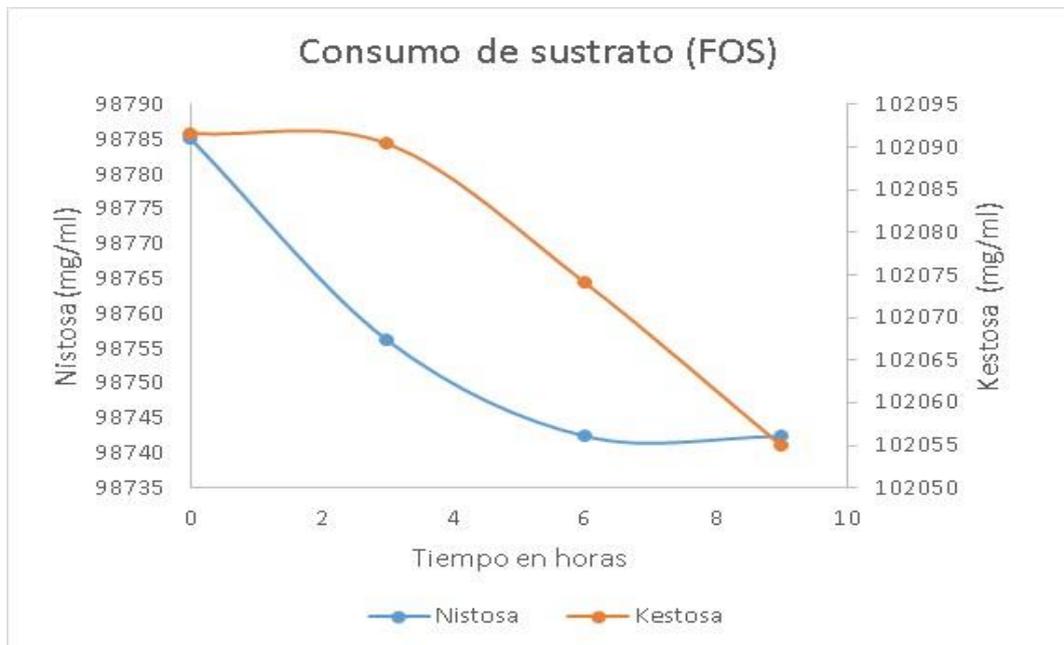


Figura 10. Curva de consumo de sustrato FOS (nistosa y 1-kestosa) en la cinética de crecimiento de *Lactobacillus sp* en medio MRS – extracto de yacón

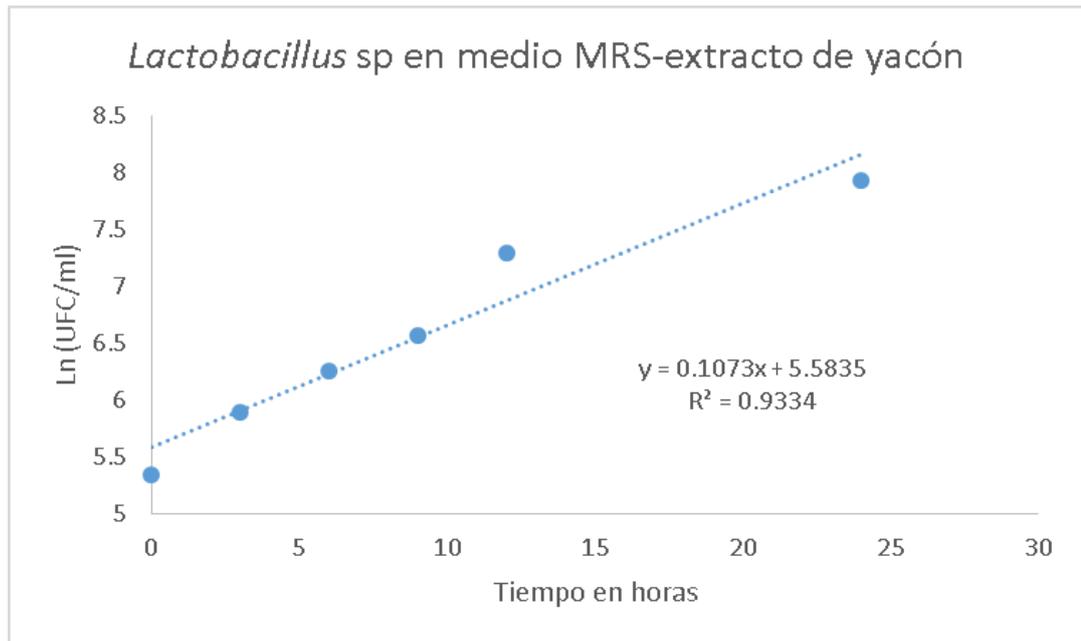


Figura 11. Fase exponencial del crecimiento de *Lactobacillus* sp en medio MRS – extracto de yacón.

Usando los datos obtenidos en la ecuación de la recta (ver Figura 11) se obtiene la velocidad específica de crecimiento celular (μ) y el tiempo de duplicación celular (t_d) que corresponde a 0.1073 h^{-1} y 6.46 horas respectivamente.

La cantidad de biomasa que se produce en la prueba de adición de extracto de yacón se debe a lo mencionado por Apolinario, et al (2014), quien demostraron que la presencia de FOS reduce de manera considerable el tiempo de fermentación (incubación), lo que lleva al aumento de biomasa, así como aumento en los niveles de ácido láctico. Debido a que la inulina y los FOS son sustrato que son asimilados con mayor facilidad por las BAL.

En un estudio realizado por Parra (2014), muestra que hay una mayor concentración de BAL en el yogur con extracto de yacón con un valor de 3.92×10^5 en comparación con un yogurt control que tiene un valor de 2.21×10^5 , así mismo hay una mayor proliferación de BAL (4.88×10^5) en un periodo de 30 días en comparación con el yogurt control (2.28×10^5). Se estima que la presencia de inulina y FOS estimularon el

metabolismo de las BAL y contribuyen a la supervivencia de bacterias ácido-lácticas durante su almacenamiento.

Se sabe que uno de los beneficios de los prebiótico es restricción del crecimiento de bacterias patógenas y conserva la integridad intestinal, ello se respalda por el estudio que realizaron Vegas, et al (2013), quienes al evaluar el efecto simbiótico del extracto de yacón y *Lactobacillus plantarum* frente a *E. coli*, evidenciando el estimo de crecimiento de *L. plantarum* usando el extracto de yacón como fuente prebiótica, en cuanto a *E. coli* enteropatógena mantuvo niveles poblacionales bajos. La simbiosis entre el extracto de yacón y *L. plantarum* inhibieron el crecimiento de *E. coli* enteropatógena.

El análisis de varianza para comparar la cinética de *Lactobacillus sp* en medio MRS y MRS- extracto de yacón, con respecto a la respuesta de la producción a la biomasa y el consumo de sustrato (glucosa, nistosa y 1- kestosa; estos últimos considerados como FOS) se describe en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. ANOVA del crecimiento de biomasa de *Lactobacillus sp* en medio MRS y MRS – extracto de yacón

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	9.6155	1	9.6155	19.884	0.0012
Dentro de los grupos	4.8358	10	0.4836		
Total	14.4513	11			

La significancia es de $0.0012 > 0.05$, en consecuencia, el medio MRS - extracto de yacón genera una diferencia promedio significativa sobre el crecimiento de *Lactobacillus sp* en la cinética de crecimiento a comparación del medio MRS.

Tabla 10. ANOVA del consumo de sustrato como glucosa y, nistosa y 1- kestosa en los medios MRS y MRS – extracto de yacón respectivamente

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	4574.590	2	2287.295	4.425	0.031
Dentro de los grupos	7754.291	15	516.953		
Total	12328.881	17			

La significancia tiene un nivel de $0.031 > 0.05$, entonces el consumo de sustrato en el medio MRS - extracto de yacón genera una diferencia promedio significativa sobre el crecimiento de *Lactobacillus sp* en la cinética de crecimiento a comparación del medio MRS.

V. CONCLUSIONES

- La evaluación de la viabilidad de *Lactobacillus sp* en condiciones de simulación *in vitro* en medio MRS – extracto de yacón mostró una mayor viabilidad con respecto a medio MRS, sin embargo, no mostraron una variación significativa.
- Se comparó la cinética de crecimiento en medio MRS y MRS – extracto de yacón, en los cuales se mostró un mayor crecimiento de biomasa de *Lactobacillus sp* en el medio con prebiótico; así mismo se evidencia un tiempo de latencia más corto durante la cinética con medio MRS – extracto de yacón.
- Se determinó el consumo de sustrato, nistosa tuvo 98.74 g/L y 1-kestosa tuvo 102.06 g/L (medio MRS – extracto de yacón), en comparación con el consumo de carbono en glucosa con 16.91 g/L (medio MRS), lo cual comprueba el consumo de sustrato.
- Los parámetros de crecimiento, velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación (μ , t_d), se determinaron en ambas cinéticas; en medio MRS se evidenció valores inferiores en comparación con los valores de MRS - extracto de yacón, lo cual hace referencia a que prebiótico sirve como impulsor del crecimiento de biomasa reduciendo tiempos y optimizando la producción de esta.

VI. RECOMENDACIONES

- Purificar la extracción de FOS a partir del extracto de yacón.
- Usar otras especies de *Lactobacillus sp* y comparar la resistencia entre cepas comerciales y cepas aisladas *in situ*.
- Realizar un encapsulamiento de *Lactobacillus sp* junto con el extracto de yacón para aumentar su viabilidad en condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro*.
- Usar diferentes concentraciones de sales biliares y niveles de pH, así mismo variar el tiempo de exposición a las pruebas *in vitro*.
- Realizar el análisis de FOS en la brevedad de lo posible para reducir el margen de error en el proceso de análisis.
- Evaluar el consumo de insulina y como este interviene en el crecimiento microbiano, además de cómo afecta a los parámetros cinéticos.
- Escalar el proceso de fermentación con MRS – extracto de yacón y determinar parámetros óptimos de crecimiento de *Lactobacillus sp* para extraer biomasa y posibles subproductos.
- Evaluar inhibición por sustrato en MRS – extracto de yacón.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón, P., González, M., & Erica, C. (2016). Rol de la microbiota gastrointestinal en la regulación de la respuesta inmune. *Rev. Med. Chile*, 910-916.
- Apolinario, A., Lima, B., Macedo, N., Pessoa, A., Converti, A., & Silva, J. (2014). Review Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 368 -378.
- Aragón, S. (2012). Evaluación bioquímica y molecular de la capacidad hipocolesterolemica de bacterias ácido lácticas con potencia probiótico. Universidad de La Sabana. Bogota: Maestría en diseño y gestión de procesos.
- Ballesteros, M., & González, E. (2018). Papel de los prebióticos en la funcionalidad de la microbiota del paciente con nutrición enteral. *Nutrición hospitalaria*, 35(2), 18-26.
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, Y., Dong, X., & Wang, Y. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control*, 21(5), 695-712.
- Bernal, C. (2017). Evaluación del comportamiento de cultivos probióticos y prebióticos en bebidas de frutos rojos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá: Posgrado en ciencia y tecnología de alimentos.
- Bolado, E., Acedo, E., & Pérez, R. (2009). An alternative method for evaluation of resistance to low pH and bile salts in probiotic characterization of *lactobacillus reuteri* strains. A technical note. *Revista científica de veterinaria*, 19(1), 93-96.
- Brady, L., Gallaher, D., & Busta, F. (2000). The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *Journal of Nutrition*, 130(1), 410-414.
- Cabezas Alarcón, M. A. (2009). Evaluación de la capacidad de colonización intestinal de un *Lactobacillus sp* proveniente de un fermento comercial. Universidad San Francisco de Quito, Quito: Tesis de grado para la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología.
- Campos, D., Betalleluz - Pallardel, I., Chirinos, R., Aguilar - Galvez, A., Noratto, G., & Pedreschi, R. (2012). Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*

- Poepp. & Endl*), asource of fructooligosacárides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 135(3), 1592 - 1599.
- Chacón, A. (2006). Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofruktosacáridos (FOS). *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 265-286.
- Comité Conjunto de Expertos FAO/OMS en aditivos alimentarios. (2000). *Safety aspects of genetically modified foods of plant origin*. Obtenido de Geneva: World Health Organization: p.http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/topics/ec_june2000_en.pdf.
- Conway, P. L. (2001). Prebiotics and human health: The state of the art and future perspectives. *Scandinavian Journal of Nutrition*, 45(3), 13-21.
- Corzo, N., Alonso, J., Azpiroz, F., Calvo, M., Cirici, M., Leis, R., Clemente, A. (2015). Prebióticos; conceptos, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición hospitalaria*, 31(1), 99-118.
- Coussement, P. (1999). Inulin and oligofruktose: Safe intakes and legal status. *Journal of Nutrition*, 129(1), 1412-1417.
- Cruz, A., Antues, A., Sousa, A., Faria, J., & Saad, S. (2009). Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food research internacional*, 42(9), 1233-1239.
- Cueto, C., & Aragón, S. (2012). Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas para reducir el colesterol *in vitro*. *Scientia Agropecuaria*, 1, 45-50.
- Cueto, M., Acuña, Y., & Valenzuela, J. (2010). Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actual Biol*, 32(93), 129-138.
- De la Cagigas, A., & Blanco, A. (2002). Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Alimentación y Nutrición*, 16(1), 63 - 68.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Collins, J. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 386 - 392.

- Edo Jimeno, M. (2016). Microbiota, probióticos, prebióticos y simbióticos en pediatría. *Boletín de la Sociedad de Pediatría de Aragón, La Rioja y Soria*, 46(1), 77-83.
- Escobar, F. (2017). Obtención de cristales de inulina a partir de cuatro variedades de plantas de cultivos no tradicional del Ecuador. Quito: Escuela Politécnica Nacional.
- FAO. (2001). Evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas del ácido láctico. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, Córdoba.
- Fernandez, A. (2003). Yacón; importancia prebiótica y tecnológica. *Agroenfoque*, 1(139), 46 - 47.
- Fook, L., & Gibson, G. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88(1), 539-549.
- García, Y., Ayala, L., López, M., & Cabrera, E. (2016). Los fructooligosacáridos en la nutrición y salud animal y humana. *V Congreso Internacional de Producción Animal Tropical*. La Habana.
- Giraffa, G., Chanishvili, N., & Widyastuti, Y. (2010). Importance of *Lactobacillus* in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161(6), 480 - 487.
- Guerrero Medina, P. (2012). Evaluación de la calidad microbiológica, fisiológica y los microorganismos probióticos en productos lácteos fermentados comerciales en la ciudad de Ocotlán, Jalisco. Universidad de Oviedo. Oviedo: Programa de doctorado.
- Guevara, C., & Vallejo, E. (2015). Identificación de fructooligosacáridos e insulinas en residuos de hojas de fique - *Furcraea macrophylla* Baker. *Acta agronómica*, 64(4), 297-301.
- Hernandez, P., & Jiménez, M. (2010). Propiedades funcionales y aplicaciones industriales de los fructooligosacáridos. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(1), 1-8.

- Holguín, D., García, M., Lemus, K., Ramos, A., Sierra, J., & Gómez, M. (2017). Microbiota intestinal y sus generalidades en el organismo del ser humano. *Biociencias*, 1(2), 23-31.
- Holzappel, W., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., & Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(3), 365-373.
- Iñiguez, C., Bolado, E., & Acedo, E. (2014). Probióticos: Principios y aplicaciones prácticas. En A. González, B. González, E. Vallejo, & H. Alvarez, *Los alimentos funcionales - Un reto para la industria de alimentos* (págs. 251-292). Mexico: AGT.
- Jurado, H., & Jarrín, V. (2015). Cinética de crecimiento de *Lactobacillus lactis* y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. *Revista Biosalud*, 14(2), 49 - 62.
- Jurado, H., & Martínez, J. (2015). Caracterización del proceso de fermentación y del efecto de inhibición de *Lactobacillus lactis* en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. *Revista de medicina veterinaria*, 1(30), 15 - 29.
- Jurado, H., Ramírez, C., & Aguirre, D. (2013). Cinética de fermentación de *Lactobacillus plantarum* en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. *Veterinaria y zootecnia*, 7(2), 37 - 53.
- Manrique, I., Párraga, A., & Hermann, M. (2005). Jarabe de yacón: Principios y procesamiento. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa.
- Mejía, R. (2015). Impregnación al vacío de fructooligosacáridos de yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poepp & Endl.) en manzana. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima: Tesis de pregrado .
- Mondragón, G., Escalante, P., Osuna, J., Ibarra, V., Morlett, J., Aguilar, C., & Rodríguez, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y ciencia*, 1(59), 64-70.
- Montes, L. (2013). Efecto de la microencapsulación con agentes prebióticos sobre la viabilidad de microorganismos probióticos (*Lactobacillus casei* ATCC 393 y

- Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9469). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá: Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos.
- Morales-Koelliker, D., & Vélez-Ruiz, J. (2013). Prebióticos: su importancia en la salud humana y propiedades funcionales en tecnología de alimentos. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos*, 7(1), 12-24.
- Moreno, L. (2012). Aislamiento y selección de *Lactobacillus sp* con potencial probiótico a partir de pan de abeja. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá: Tesis de maestría.
- Noriega, L., Gueimonde, M., Sánchez, B., Margolles, A., & De los Reyes-Gavilán, C. (2004). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glucosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 94(1), 79-86.
- Oblitas, I. (2015). Estimación del área foliar en ocho morfotipos de yacón, *Smallanthus sanchifollus* (Popp. & Endl) H. Rob. mediante ecuaciones alométricas. Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca.
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati, M. (2007). Functional food: fiber, prebiotics, probiotics and simbiotics. *DIATEA*, 25(121), 20-33.
- Olveira, G., & González, I. (2007). Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *nutrición hospitalaria*, 22(2), 26-34.
- Olveira, G., & González, I. (2016). Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinología y nutrición*, 63(9), 482 - 494.
- Organisation, W. G. (2011). Probióticos y prebióticos. Wisconcil: Global guidelines and cascades.
- Paitán, E., Santos, R., Sotelo, A., Zúñiga, D., & Vilchez, C. (2019). Caracterización molecular de bacterias con potencial probiótico aisladas de heces de neonatos humanos. *Revista peruana de biología*, 26(1), 119-130.
- Parra, R. (2014). Efecto de la adición de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) en las características fisicoquímicas, microbiológicas, proximales y sensoriales de

- yogur durante el almacenamiento bajo refrigeración. *Alimentech. Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 12(1), 5 - 14.
- Pavón, P., & Gillán, B. (2005). Alimentos funcionales. Papel de los prebióticos en nutrición pediátrica. *An Pediatric*, 3(1), 1-63.
- Pazmiño Zambrano, M. (2014). Aprovechamiento de los principios activos de Yacón (*Smallanthus sonchifolius*), para la elaboración de yogurt rico en FOS (Fructooligosacáridos). Guayaquil: Universidad de Guayaquil.
- Ramirez Muñoz, F. (2010). Aislamiento de bacterias *Lactobacillus sp* y levaduras a partir de productos lácteos artesanales y evaluación de la capacidad antagonica in vitro. Trabajo de grado Microbiología industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Rastall, R. (2004). Bacterias in the gut: Friends and Foes and How to after the balance. *Journal of nutrition*, 134(8), 2022 - 2026.
- Rivas, F., & González, B. (2006). Calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolémicos. *Revista Salud pública y nutrición*, 7(1).
- Roberfroid, M. B. (2000). Chicory fructooligosaccharides and the gastrointestinal. *Nutrition*, 16(7), 677-679.
- Rodríguez Barahona, K., & Arteaga Reina, I. (2015). Bondades Medicinales de la jícma (*Smallanthus Sanchifolius*) - Revisión Bibliográfica, 2014 - 2015. Ibarra: Universidad Técnica del Norte.
- Rodríguez González, M. (2009). Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis Doctoral. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona.
- Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M. J., Pérez, M. (2008). Aislamiento, identificación y caracterización parcial de las propiedades probióticas de cepas de *Lactobacillus sp.* procedentes del tracto gastrointestinal de pollos de ceba. *Ciencia y tecnología alimentaria*, 6(1), 56 - 63.

- Saavedra, J., & Zuñiga, L. (2016). Los probióticos: microorganismos vivos que previenen enfermedades en adultos niños. *Medicina*, 38(3), 247-263.
- Sabater, M., Larque, E., Torrella, F., & Zamora, S. (2009). Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 65(3), 315-328.
- Sanders, M., & Klaenhammer, T. (2001). Invited Review. The Scientific Basic of *Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a Probiotic. *Journal of Dairy Science*, 84(2), 319-331.
- Santana, I., & Cardoso, M. (2008). Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sanchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. *Ciência Rural*, 38(3), 898 - 905.
- Santos, B. (2012). Fructooligosacáridos y probióticos en leches fermentadas, una alternativa nutricional y saludable. *ReserchGate*, 22(3), 53-59.
- Saura-Calixto, F. D., & Goñi, I. (2004). The intake of dietary indigestible fraction in the Spanish diet shows the limitations of dietary fibre data for nutritional studies. *Eur J Clin Nutr*, 58, 1078-1082.
- Seminario, J., Valderrama, M., & Manrique, I. (2014). *El yacón: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio*. Lima: Centro Internacional de la Papa.
- Shida, K., & Nanno, M. (2008). Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff. *Trends Immunol*, 29(11), 565-573.
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacífico, S., & Coppola, R. (2005). Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS Microbiol Lett*, 244(1), 129-137.
- Suquilanda Valdivieso, M. (2015). *Producción orgánica de cultivos andinos*. Cotopaxi: Unión de organizaciones campesinas del norte de Cotopaxi.
- Tonello, A. (2012). *Consumo de alimentos prebióticos y probióticos y resultados intrínsecos de consumo en mujeres de 30 a 40 años que asisten a un gimnasio*

de la ciudad de Rosario. Universidad Abierta Interamericana. Rosario:
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud.

Vasquez, S., Lopretti, M., Rey, E., & Zunino, P. (2007). Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Lactobacillus spp.* para su uso como probióticos en la industria láctea. *INNOTEC*, 1(2), 12-14.

Vega, C., Pichihua, B., Peña, C., & Zavaleta, A. (2013). Efecto simbiótico del extracto de *Smallanthus sonchifolius* (Yacón) y *Lactobacillus plantarum* frente a *Escherichia coli*. *Ciencia e investigación*, 16(2), 77 - 82.

Zuñiga, G. (2017). *Desarrollo de un helado funcional con adición de prebióticos y bacterias probióticas*. Universidad de Azuay, Maestría en gestión de calidad y seguridad alimentaria, Cuenca.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Identificación botánica de yacón (*Smallanthus sonchifolius*)

1. Recolección del material botánico

Se viajó a la ciudad de Usquil, Provincia de Otuzco, departamento de La Libertad; de los campos de cultivo de yacón y con los pobladores de la zona se hizo la recolección del material botánico, el cual debe incluir parte del tallo, hojas y flor (ver Figura 12).



Figura 12. Dibujo de *Smallanthus sonchifolius* (yacón).
Fuente: <https://babilonica.wordpress.com>

2. Prensado y secado del material botánico

El material botánico se colocó en una bandeja cubierta de papel grueso, se ubica de forma extendida de forma que se pueda mostrar las partes de la planta (tallo, hoja, flor). Se ejerce presión en la prensa se coloca peso y se deja aproximadamente 4 semanas en un área ventilada y cálida, para que ayude al proceso de secado (ver Figura 13).



Figura 13. Cámara de secado con las prensas para conservar la muestra de yacón.

3. Ingreso en el herbario

Para el ingreso del material botánico al Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo (HUT), el material botánico se montó en un cartón blanco de 320 gr., con las dimensiones de 43 x 28 cm. Para fijar el material botánico se usó cola sintética y se asegura con cinta engomada de papel. Posteriormente, se colocó la etiqueta con los datos correspondientes en la parte inferior derecha (ver Figura 14.B). El material montado y etiquetado se colocó dentro de una cubierta de papel de papel bond doblado de 80 gr., con la siguiente medida 45 x 30; además se adicionó cuatro esferas de naftalina para conservar el material botánico y evitar daño de insectos.

Al momento de presentar el material de acuerdo a los pasos indicados anteriormente, se sella y se asigna un número, el cual se conoce como código, y se ubica en la parte superior derecha (ver Figura 14.A). El número de ingreso de este material botánico fue el 58445.

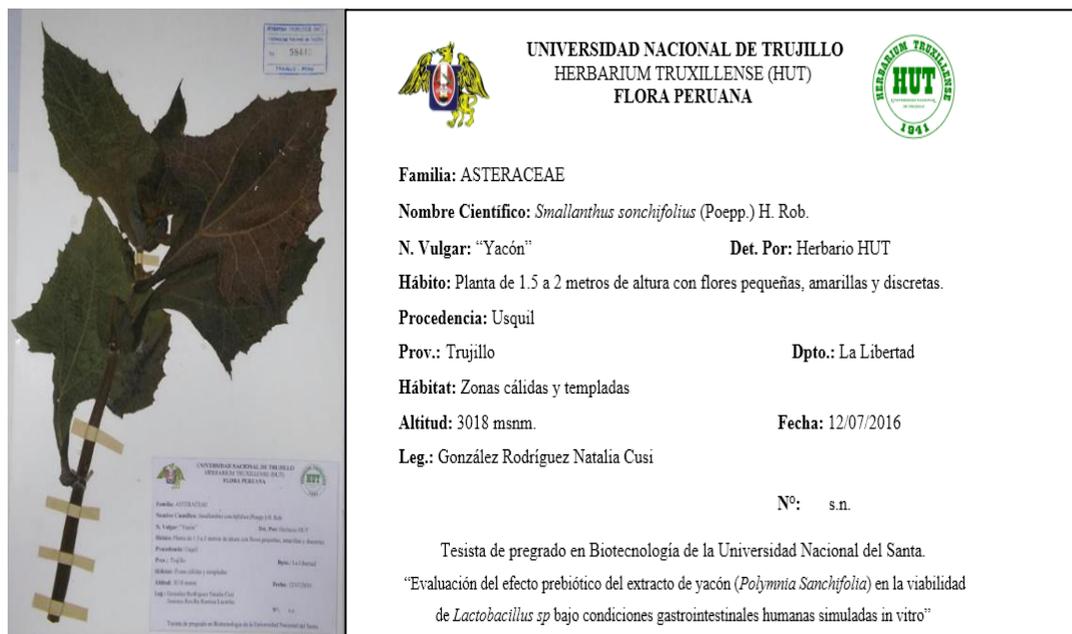


Figura 14. Identificación botánica de la planta de *Smilax sonchifolia* (yacón). (A) Material montado, etiquetado y codificado por el HUT. (B) Etiqueta con los datos del material botánico.

ANEXO 2. Obtención de extracto de yacón (*Smallanthus sonchifolius*)

Descripción del método:

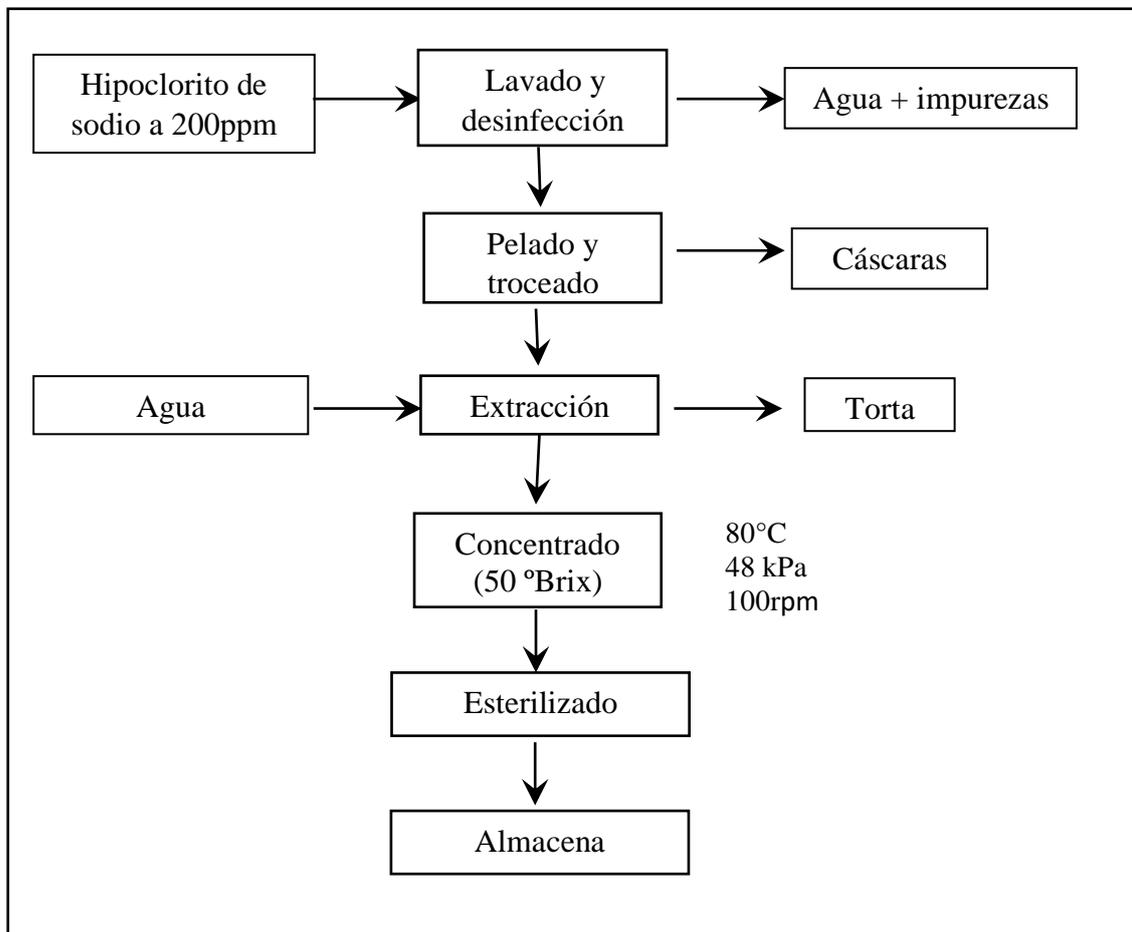


Figura 15. Esquema de preparación del extracto de yacón

ANEXO 3. Caracterización físicoquímica del extracto de yacón (*Smallanthus sonchifolius*)

Para la caracterización físicoquímica se preparó un poco de extracto de yacón concentrado a 50° Brix, siguiendo el proceso descrito en la figura 15. Los valores obtenidos están en base a 100 gr de extracto de yacón.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
LABORATORIO DE SERVICIOS A LA COMUNIDAD E INVESTIGACION



LASACI

INFORME DE ANÁLISIS

SOLICITANTE	: NATALIA GONZALEZ RODRIGUEZ
MUESTRA	: EXTRACTO DE YACON
FECHA DE INGRESO	: 07 DE DICIEMBRE DEL 2016
MUESTRA RECIBIDA EN LABORATORIO	

Físico Química	
Determinación	Resultados
Proteínas	3.7
Sacarosa	14
Carbohidratos	106
Fibra	3.6
Frútanos	62
Glucosa	3.4
Lípidos (mg)	244
Calcio (mg)	87
Fosforo (mg)	240
Potasio (mg)	2284

TRUJILLO 12 DE DICIEMBRE DEL 2016



Cardinal **Antonio Menocza**
R. Q. QUIMICO
R. CIP. 122583

AGUAS - SUELOS - ALIMENTOS - MINERALES - ACEITE - CARBON - CAL

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA

☎ 949959632 / 949119298

ANEXO 4. Medios de cultivo

Tabla 11. Componentes de medio MRS líquido comercial

Reactivos	Cantidad (g/L)
Glucosa	20 g
Peptona de caseína	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	10 g
Acetato de sodio	5 g
Citrato de amonio	2 g
Fosfato acido de potasio	2 g
Tween 80	1 mL
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	200 mg
Sulfato de manganeso	50 mg

Fuente: De Man, Rogosa y Sharpe (1960)

Tabla 12. Componentes de medio líquido MRS – yacón

Reactivos	Cantidad (g/L)
Extracto de yacón	20 g
Peptona de caseína	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	10 g
Acetato de sodio	5 g
Citrato de amonio	2 g
Fosfato acido de potasio	2 g
Tween 80	1 mL
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	200 mg
Sulfato de manganeso	50 mg

Fuente: De Man, Rogosa y Sharpe (1960)

Tabla 13. Componentes de medio MRS y MRS – yacón, adaptado para pH ácido

Reactivos	Cantidad (g/L)
Fuente de carbono	20 g
Peptona de caseína	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	10 g
Acetato de sodio	5 g
Citrato de amonio	2 g
Fosfato acido de potasio	2 g
Tween 80	1 mL
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	200 mg
Sulfato de manganeso	50 mg

Nota: La fuente de carbono varía de acuerdo al tipo de medio (MRS/glucosa y MRS – yacón/extracto de yacón). El pH se ajusta con HCl 6M.

Tabla 14. Componentes de Medio MRS y MRS – yacón, adaptado para sales biliares

Reactivos	Cantidad (g/L)
Fuente de Carbono	20 g
Peptona de caseína	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	10 g
Acetato de sodio	5 g
Citrato de amonio	2 g
Fosfato acido de potasio	2 g
Tween 80	1 mL
Sulfato de magnesio 7H ₂ O	200 mg
Sulfato de manganeso	50 mg
Sales biliares (Sigma B8756)	3 g

Nota: La fuente de carbono varía de acuerdo al tipo de medio (MRS/glucosa y MRS – yacón/extracto de yacón).

ANEXO 5. Preparación del inóculo

Para la activación de la cepa, se vertió el contenido del sobre de Bacilor en un vaso de precipitación de 50 mL con agua estéril, de donde se tomó una azada y se sembró en medio MRS líquido y sólido comercial estéril (ver Figura 16). Se incubó durante 24 h a 37°C.

Para la preparación del inóculo se partió del cultivo axénico de *Lactobacillus sp*, generado a partir de la activación antes mencionada, se prepararon 20 mL de medio MRS líquido comercial y se sembró. Durante 24 h a 37°C se mantuvo incubando el medio. Pasadas las 24 horas, se toma una muestra para ver la concentración y se ajusta el inóculo a 10^8 adicionando medio MRS líquido comercial.



Figura 16. Activación de la cepa de *Lactobacillus sp* a partir del producto Bacilor

ANEXO 6. Recuento de colonias usando Placas Para Bacterias Ácido Lácticas 3M® Petrifilm®

Se tomó muestra a las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas, y se le realizó diluciones seriadas (ver Figura 17) las cuales iban aumentando conforme pasaban las horas debido a que la biomasa va aumentando.

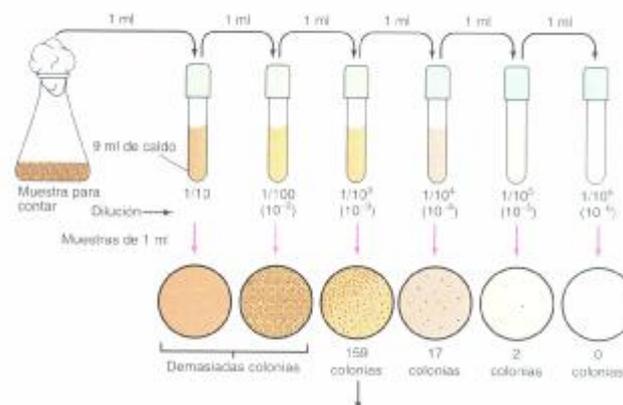


Figura 17. Diluciones seriadas para siembra en placa para conteo de colonias

Posteriormente se pasó a sembrar en placas Petrifilm® (ver Figura 18) y el conteo de células viables se realizó siguiendo la guía de interpretación de 3M, la cual se puede hallar en el siguiente link: <https://multimedia.3m.com/mws/media/14096720/guia-interpretacin-petrifilm-acido-lactica.pdf>



Figura 18. Siembra en placa para bacterias ácido lácticas 3M® Petrifilm®

ANEXO 7. Determinación de glucosa usando kit de glicemia enzimática

1. Curva de calibración para la determinación de concentración de glucosa (g/L)

Para determinar la concentración de glucosa de las muestras se usó el kit Glicemia enzimática AA (Weimar lab). Se preparó 50 mL de un patrón de glucosa 5 g/L. Para poder generar la curva de calibrado se realizaron diferentes concentraciones (ver Tabla 11). Se tomaron muestras de 2mL en microtubos, luego se centrifugaron a 15 000 rpm por 5 minutos. Posteriormente se tomó 5 µl de cada muestra centrifugada y se le adicionó 0.5 mL de solución enzimática en un microtubo. Las muestras se llevaron durante 5 minutos a baño maría a 37°C, transcurrido el tiempo se procedió a leer en espectrofotómetro a 505 nm como longitud de onda y se calculó la concentración de glucosa presente en los tubos (ver Figura 20).

Tabla 15. Concentraciones de muestras para curva patrón

Dilución	Blanco	1	2	3
Volumen de solución (mL)	0	0.3	0.7	1
Volumen de agua (mL)	1	0.7	0.3	0
Solución enzimática)	0.5	0.5	0.5	0.5

2. Determinación de la concentración de glucosa (g/L)

Se calculó la concentración de las muestras preparadas anteriormente y con esos datos se graficó la curva de calibración (ver Figura 19), de la cual se obtuvo la ecuación de la recta que se usó para determinar la concentración de glucosa en las muestras, así:

$$Y = ax$$

Dónde:

Y = Absorbancia obtenida.

A = Pendiente de la recta.

X = Concentración de glucosa (g/L).

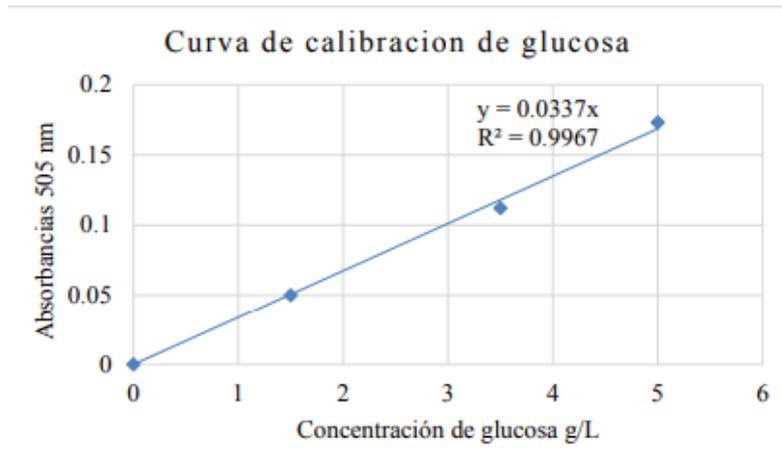


Figura 19. Curva de calibración de la glucosa



Figura 20. Proceso de para la obtención de la curva patrón

ANEXO 8. Determinación de fructooligosacáridos usando HPLC

1. Reparación del estándar de nistosa y 1-kestosa

Se preparó una solución estándar de 5000 ppm (5 g/mL) de Nistosa y 1-Kestosa por separado usando como solvente etanol al 60 %, luego se pasó las soluciones por un filtro de jeringa a un vial para su posterior lectura. Se diluyeron las soluciones estándar en viales usando las siguientes concentraciones: 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm y 50 ppm.

La configuración HPLC (ver Figura 21) a seguir, fue la siguiente:

- Columna: Water XBridge Amide column (4.6 x 250 mm id, 3.5 μ m)
- Temperatura de columna: 30 °C
- Fase móvil: gradiente 0 - 30 min de 75% - 45% Acetonitrilo; 30 - 32 min de 45% - 75% Acetonitrilo y 10 min de 75% Acetonitrilo.
- Flujo: 1 mL/min
- Volumen de inyección: 5 μ L



Figura 21. Equipo de HPLC

2. Determinación de 1-kestosa

Para los estándares se calculó la cantidad de componente de cada azúcar mediante la siguiente ecuación.

$$\%R_{\text{azúcar}} = \frac{\text{concentración detectada por HPLC, mg/ml}}{\text{concentración conocida de azúcar, mg/ml}} \times 100$$

Tabla 16. Datos obtenidos para la curva de calibración de 1-kestosa

Concentración conocida (ppm)	Concentración detectada (ppm)	%R (Estándar)
50	49.8613	99.7226
100	103.3546	103.3546
250	268.0028	107.2011
500	490.3415	98.0683
Promedio		102.0867

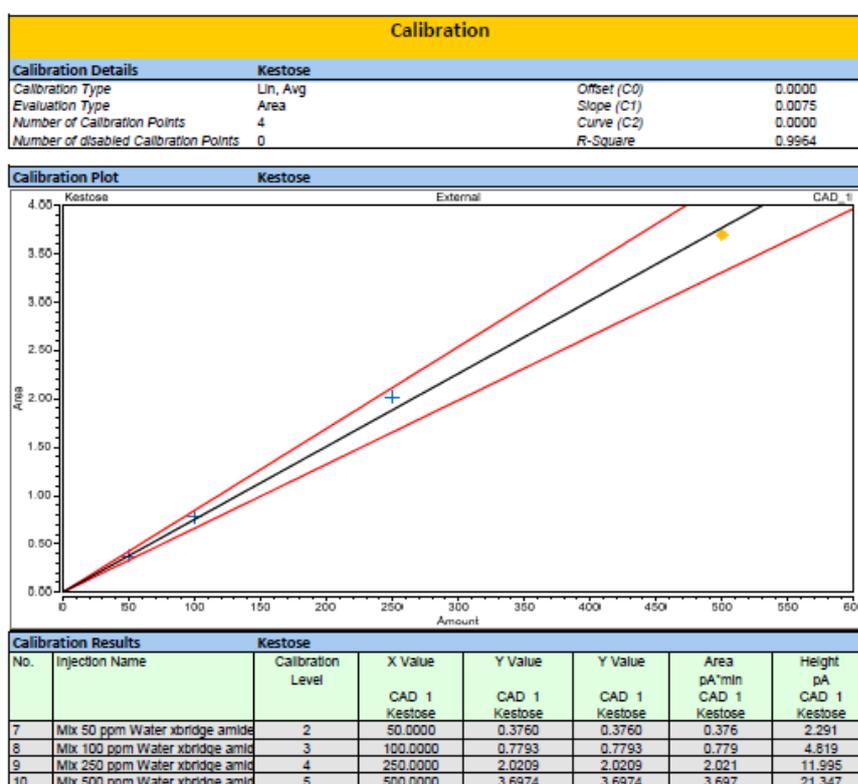


Figura 22. Curva de calibración de 1 - kestosa

3. Determinación de nistosa

Para los estándares se calculará la cantidad de componente de cada azúcar mediante la siguiente ecuación.

$$\%R_{\text{azúcar}} = \frac{\text{concentración detectada por HPLC, mg/ml}}{\text{concentración conocida de azúcar, mg/ml}} \times 100$$

Tabla 17. Datos obtenidos para la curva de calibración de nistosa

Concentración conocida (ppm)	Concentración detectada (ppm)	%R (Estándar)
50	45.8352	91.6704
100	101.8489	101.8489
250	254.7908	101.9163
500	497.6513	99.5303
Promedio		98.7415

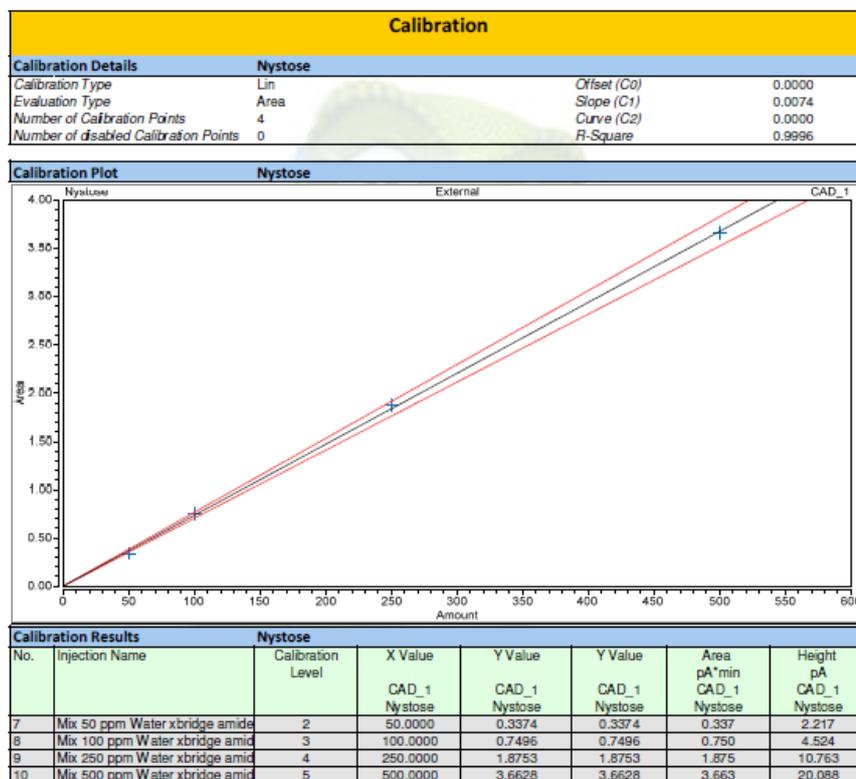


Figura 23. Curva de calibración de Nistosa