



**Centro de Investigación en
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**PRODUCCIÓN EN CULTIVO POR LOTE ALIMENTADO
DE *Lactobacillus casei* BL23-bcmo CON POTENCIAL
PROBIÓTICO PARA *Bos primigenius taurus***

Por:

VIRIDIANA NOEMI VEGA BETANCOURT

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

ENERO DEL 2014

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Viridiana Noemi Vega Betancourt, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de maestría en ciencias.

Dra. María Mayra de la Torre Martínez
Directora de tesis

Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Asesora

Dra. Evelia Acedo Félix
Asesora



Dra. María Ofelia Mora Izaguirre
Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto. Por fomentar en la juventud la importancia de la ciencia y tecnología para el desarrollo de México.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría en sus instituciones.

A todo el personal de CIAD, que de manera indirecta ayudaron en mi estancia; Don Héctor, Laura García, Argelia Marín, Verónica Araiza, Héctor Galindo.

Al Dr. Armando Shimada y a la Dra. Ofelia Mora, por permitirme participar en este gran proyecto. Y por el apoyo durante el transcurso de su realización.

Agradezco todo el apoyo y motivación que siempre me brindó el Laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos, de la Coordinación de Ciencias de los Alimentos, CIAD A.C. de C.V.

A la Dra. Mayra de la Torre, por compartir su conocimiento y experiencia para solidar mi formación profesional. Por su cariño y afecto, por su trato, sus sorpresas y su alegría.

A la M. C. Ana Lilia López, por todos los favores, enseñanzas, amistad y confianza dada en el transcurso de esta etapa.

A Rosina Cabrera, Jorge Rocha, por enseñarme a realizar técnicas de laboratorio, por asesorar siempre mis dudas y por su amistad.

A Ernesto, Alfonso, Lupita, por su amistad, cariño, ayuda y paciencia, por hacer de un día de trabajo en el laboratorio un día de sonrisas.

A todo el personal del laboratorio, por su amistad, su paciencia, y por hacer de mi estancia en CIAD, una ráfaga de alegrías y retos cumplidos, por el ambiente de trabajo envidiable y la organización para usar el material y los equipos del laboratorio.

A la Dra. Gabriela Ramos, por su asesoría, motivación y apoyo, por su fuerza y calidez para enseñar. Por su dedicación y amor a la docencia.

A la Dra. Evelia Acedo, por su paciencia, enseñanza y disponibilidad para resolver mis dudas, por su forma de ser.

A la Dra. Anita Valenzuela, por su solidaridad, motivación, por guiarme y por preocuparse por mi situación tanto emocional como profesional.

A la Dra. Eliza Valenzuela, Dra. Verónica Mata, Dra. Luz Vázquez, Dra. Anita Valenzuela, Dra. Claudia Iñiguez, M. en C. Ciria Figueroa, M. en C. Rosalba Pérez, M. en C. Refugio Robles, M. en C. Ana María Domínguez, por su accesibilidad para prestar sus laboratorios, equipos y material.

A mis Docentes, por transmitirme un mundo de información valiosa durante mi estancia en la maestría y por su amistad y comprensión; Dra. Gloria Yepiz, Dra. Mary Islas, Dra. Aida Peña, Dr. Humberto, M. en C. Martín Valenzuela.

A mis amigos, Samantha Loaiza, Hiram Bracamontes, Daniel Miramon, Mireya Hugues, Melvin Tapía, Victor Quintana, Gustavo Velderrain, Edgard Rascón, Elizabeth Reyes, por los años de amistad y cariño, su apoyo y solidaridad, por su fidelidad, muchas gracias.

A mi familia, quienes nunca dejaron de apoyarme, A mi padre Noe Vega y mi madre Yolanda Betancourt, por todo su amor y confianza, por aventarme por el camino del estudio por enseñarme a amar y valorar mis logros profesionales. A mis hermanas Jazmín y Elizabeth por que pese a las peleas y conflictos, la falta de paciencia y tolerancia entre todas siempre nos apoyamos y demostramos nuestro amor.

A mi novio, Darío Pereo, por apoyarme como nadie, por darme coraje de seguir luchando por lo que amo. Por disminuir mí carga transmitiendo su optimismo y alegría. Por su amor incondicional.

DEDICATORIA

*A mis padres, que forman el pilar más fuerte dentro de mi vida,
que con su interminable amor me enseñaron el camino correcto y
a construir una vida llena de felicidad y logros.*

ÍNDICE

RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Producción de Carne de Ganado Bovino en México.....	3
2.2 Degradación Ruminal del β -caroteno.....	4
2.3 Lactobacillus casei como Probiótico.....	6
2.4 Adhesión de Lactobacilos al Tracto Gastrointestinal.....	7
2.5 Modificación Genética de Lactobacillus casei.....	10
2.6 Producción de Biomasa a partir de Lactobacilos.....	10
2.7 Objetivo General.....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 Esquema general de trabajo.....	15
3.2 Cepa.....	16
3.3 Conservación de L. casei BL23-bcmo.....	16
3.4 Preparación de Pre-inóculo e Inóculo.....	17
3.5 Ensayo de Autoagregación.....	17
3.6 Ensayos de Interacción de L. casei BL23 con Mucinas bovinas...	18
3.7 Obtención y Preparación de Mucinas.....	18
3.8 Determinación de la Sensibilidad del Análisis de ELLA.....	20
3.9 Ensayo ELLA para Comparar la Adhesión de L. casei BL23 y L. casei BL23-bcmo a las Mucinas del Rumen e Intestino Bovino....	20
3.1 Evaluación de Glucosa, Glicerol y Xilosa como Fuentes de Carbono para L. casei BL23-bcmo	21
3.11 Fermentación en Cultivo por Lote.....	22
3.12 Fermentación en Cultivo por Lote Alimentado.....	23
3.13 Permanencia del Gen bcmo1 en Lactobacillus casei BL23-bcmo al Final del Cultivo por Lote con Alimentación Intermitente.....	24
3.14 Métodos Analíticos.....	25

3.15	Análisis Estadísticos.....	26
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
4.1	Ensayo de Autoagregación de Lactobacillus casei BL23.....	27
4.2	Determinación de la Sensibilidad del Análisis de ELLA.....	29
4.3	Ensayo ELLA para Comparar la Adhesión de L. casei BL23 y L. casei BL23-bcmo a las Mucinas del Rumen e Intestino Bovino....	30
4.4	Evaluación de Glucosa, Glicerol y Xilosa como Fuentes de Carbono para L. casei BL23-bcmo.....	32
4.5	Fermentación en Cultivo por Lote.....	35
4.6	Fermentación en Cultivo por Lote Alimentado.....	40
4.7	Permanencia del Gen bcmo1 en Lactobacillus casei BL23-bcmo al Final del Cultivo por Lote con Alimentación Intermitente.....	53
V.	CONCLUSIONES.....	55
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Oxidación de β -caroteno por acción de la enzima β -caroteno 15,15'-monooxigenasa1.....	5
Figura 2.	Representación de la adhesión de probióticos al hospedero a diferentes grados de magnitud.....	8
Figura 3.	Esquema general de trabajo.....	15
Figura 4.	Autoagregación de <i>L. casei</i> BL23-bcmo y de <i>L. casei</i> BL23 cepa parental.....	28
Figura 5.	Efecto de la concentración bacteriana y la concentración de mucina sobre la adherencia.....	29
Figura 6.	Adhesión de <i>L. casei</i> BL23-bcmo y de <i>L. casei</i> BL23 cepa parental a mucina porcina gástrica comercial, mucina bovina extraída de intestino y mucina bovina extraída de rumen.....	31
Figura 7.	Crecimiento y producción de lactato de <i>L. casei</i> BL23-bcmo en distintos carbohidratos.....	34
Figura 8.	Cultivo por lote de <i>L. casei</i> BL23-bcmo. Biomasa, Ajuste al modelo logístico, Glucosa, Lactato.....	36
Figura 9.	Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{X/S}$ en cultivo por lote...	38
Figura 10.	Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/S}$ en cultivo por lote...	38
Figura 11.	Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/X}$ en cultivo por lote...	39
Figura 12.	Cultivo por lote alimentado intermitente de <i>L. casei</i> BL23-bcmo, Biomasa, Ajuste al modelo logístico, Glucosa, Lactato.....	41
Figura 13.	Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{X/S}$ en el segmento de lote del cultivo por lote alimentado intermitente.....	43
Figura 14.	Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/S}$ en el segmento de lote del cultivo por lote alimentado intermitente.....	43
Figura 15.	Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/X}$ en el segmento de lote del cultivo por lote alimentado intermitente.....	44
Figura 16.	Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/X}$ en el segmento después de iniciar la alimentación del cultivo por lote alimentado intermitente.....	44

Figura 17. Cultivo por lote alimentado constante de <i>L. casei</i> BL23-bcmo. Biomasa, Ajuste al modelo logístico, Glucosa, Lactato.....	46
Figura 18. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{X/S}$ en el segmento de lote del cultivo por lote alimentado constante.....	48
Figura 19. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/S}$ en el segmento de lote del cultivo por lote alimentado constante.....	48
Figura 20. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/X}$ en el segmento de lote del cultivo por lote alimentado constante.....	49
Figura 21. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/X}$ en el segmento después de iniciar la alimentación del cultivo por lote alimentado constante.....	49
Figura 22. Amplificación por PCR del gen <i>bcmo1</i> en <i>Lactobacillus casei</i> BL23-bcmo al final del cultivo por lote con alimentación intermitente.....	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación de <i>bcmo1</i> ...	25
Cuadro 2.	Parámetros Cinéticos en Cultivo por Lote.....	37
Cuadro 3.	Parámetros Cinéticos en Cultivo por Lote Alimentado Intermitente.....	42
Cuadro 4.	Parámetros Cinéticos en Cultivo por Lote Alimentado Constante.....	47
Cuadro 5.	Concentración de biomasa máxima de distintas cepas de lactobacilos cultivadas en diferentes medios en cultivo por lote o por lote alimentado.....	52

NOMENCLATURA

Símbolo	Definición	Unidades
X	Biomasa	g/L
X_{\max}	Biomasa Máxima	g/L
μ	Velocidad Especifica de Crecimiento	h^{-1}
Pv_x	Productividad Volumétrica de Biomasa	g/L-h
$Y_{X/S}$	Rendimiento Células/Sustrato	$g_{\text{cel}}/g_{\text{glc}}$
$Y_{P/S}$	Rendimiento Producto/Sustrato	$g_{\text{Lct}}/g_{\text{glc}}$
$Y_{P/X}$	Rendimiento Producto/Células	$g_{\text{Lct}}/g_{\text{cel}}$
R^2	Correlación	
Lct	Lactato	
cel	Células	
glc	Glucosa	

RESUMEN

A nivel mundial, México ocupa el séptimo lugar en producción de carne de res (*Bos primigenius taurus*). El 38% de la producción nacional proviene de la zona tropical, donde las reses se alimentan de pastos y forrajes frescos con elevada concentración de β -caroteno. Parte de éste, se convierte en vitamina A y el excedente se deposita en tejido adiposo, produciendo coloración amarilla en la grasa que ocasiona el rechazo del consumidor. Se ha propuesto la expresión de la enzima β -caroteno 15,15'-monooxigenasa (BCMO1) en un probiótico que se adhiera al tracto digestivo animal y que degrade el exceso de β -Caroteno. El objetivo de este trabajo fue comprobar que la cepa *Lactobacillus casei* BL23 transformada con el gen *bcmo 1* mantiene su capacidad de adherencia *in vitro* a las mucinas del rumen y del intestino delgado de la res, y comparar la producción de biomasa de *L. casei* BL23-bcmo en sistemas de cultivo por lote y por lote alimentado. Para determinar posibles cambios en la capacidad de adherencia de la cepa transformada se llevaron a cabo ensayos de interacción proteína-carbohidrato. La afinidad de la adhesión se cuantificó mediante ensayos similares a ELISA, entre proteínas superficiales de la cepa y mucinas obtenidas del rumen e intestino de la res. La afinidad de la adhesión se comparó con la de la bacteria no transformada. Los resultados demostraron que la bacteria no perdió su capacidad de adherencia, siendo esta significativamente mayor ($p < 0.05$) a las mucinas intestinales que a las del rumen. En el cultivo por lote de la cepa transformada utilizando glucosa como sustrato limitante para el crecimiento de la bacteria se implementaron dos estrategias para su alimentación al medio de cultivo: alimentación-intermitente y alimentación-constante. En ambos casos el crecimiento de la bacteria se detuvo por acumulación de lactato, a partir de 23 g/L. El rendimiento de producto en base a células permaneció constante en los sistemas alimentados y en el cultivo por lote, con valor promedio de 2.11 g_{Lct}/g_{cel} . En base al modelo logístico de

crecimiento se encontró que en el cultivo por lote con alimentación-intermitente hay un incremento en la X_{max} de 1.43 veces con respecto al cultivo por lote. Sin embargo, de acuerdo a los datos experimentales es en el cultivo por lote con alimentación-constante en donde se obtiene la mayor X_{max} (11.67 g_{cel}/L), debido a que el modelo no incluye la inhibición del crecimiento por producto. La mayor productividad volumétrica de biomasa se obtuvo en el cultivo por lote con alimentación-intermitente (5.52 g_{cel}/L-h). Se analizaron varios carbohidratos para la producción de biomasa y se encontró que la xilosa o el glicerol no son alternativas para el proceso, porque la bacteria no los utiliza. El cultivo por lote alimentado es una opción apropiada para la producción de biomasa de *L. casei* BL23-bcmo ya que la concentración final de biomasa fue mayor comparada a la del cultivo por lote y la cepa transformada mantiene el gen *bcmo* 1.

Palabras clave: *Lactobacillus casei*, β -caroteno 15,15'-monooxigenasa, cultivo por lote alimentado, biomasa, probióticos, adherencia.

ABSTRACT

Mexico is the seventh place in beef production worldwide (*Bos primigenius taurus*). 38% of beef national production comes from the tropical zone, where cattle feeds from fresh pasture and forage with high amounts of β -carotene. Some of this β -carotene is turned into vitamin A and excess is deposited in adipose tissue, yielding yellowish coloration in fat, which occurs in consumer rejection. In order to avoid this issue, a probiotic that adheres to the animal digestive tract which express enzyme β -carotene 15, 15'-monooxygenase (BCMO1) and degrades β -carotene excess has been proposed. Thus, the aim of this study was to prove that *Lactobacillus casei* BL23 transformed with *bcmo 1* gene maintains its *in vitro* adhesive capacity to rumen and small intestine mucins from beef, and to compare its biomass production in batch and fed-batch cultures. Protein-carbohydrate interaction assays were carried out to determine possible changes in the strain's adherence capability. Adherence affinity was quantified with ELISA-like assays, involving the strain's superficial proteins and beef rumen mucins, and then compared against the untransformed bacteria. Results showed no loss in the strain's adherence capacity, being significantly higher ($p < 0.05$) in intestinal mucins than in rumen mucins. There were implemented two feeding strategies using glucose as limiting growth substrate in the transformed strain's batch culture: intermittent-feeding and constant-feeding. Bacterial growth stopped at 23g/L by lactate accumulation in both procedures. Cell based product performance remained uniform in fed systems as in batch culture, having an average value of $2.11 \text{ g}_{\text{Lct}}/\text{g}_{\text{cel}}$. An increase of 1.43 times X_{max} was found with intermittent-feeding batch culture based on the growth logistic model regarding batch culture. However, constant-feeding batch culture had the highest X_{max} ($11.67 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{L}$) according to experimental data, due to the model not including product growth inhibition. Intermittent-feeding batch culture attained the highest volumetric biomass productivity ($5.52 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{L-h}$). Several

carbohydrates were analyzed for biomass production and it was found that nor xylose nor glycerol are process alternatives because the bacterial strain doesn't use them. *L. casei* BL23-bcmo retained *bcmo* 1 gene in fed-batch culture and final biomass concentration was higher when compared with batch culture, thus, fed-batch culture is a suitable choice for strain production.

Keywords: *Lactobacillus casei*, β -carotene 15,15'-monooxygenase, fed-batch culture, biomass, probiotic, adherence.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, México ocupa el séptimo lugar en producción de carne de res (*Bos primigenius taurus*). El 38% de la producción nacional proviene de la zona tropical del país. En esta región el principal método de alimentación es el pastoreo, que consiste en alimentar al animal con pastos nativos de la región. Las reses pueden durar hasta 3 años en pastoreo, ya que es el tiempo aproximado en que alcanzan el peso ideal de sacrificio (450 kg). Los forrajes verdes tienen un alto contenido de carotenoides, principalmente de luteína y β -caroteno (Cruz Salazar, 2012). Una parte del β -caroteno consumido por la res se convierte en vitamina A; mientras que el excedente circula en sangre y se deposita en el tejido adiposo y en el hígado. En el 85 a 90 % de los casos, el depósito en el tejido adiposo produce la coloración amarilla en la grasa. El amarillamiento excesivo provoca el rechazo de la canal, debido a que los consumidores asumen que la carne proviene de animales viejos, enfermos o que tiene menor valor nutritivo. Lo anterior repercute en pérdidas económicas considerables (Gutierrez *et al.*, 2006).

Cambiar la dieta del animal, promoviendo un alto consumo en granos, produce una disminución de β -caroteno en la grasa de la canal. Sin embargo, esta opción no es económicamente factible para los productores de carne en la zona tropical de México, porque incrementa sustancialmente los gastos de producción. El uso de lipoxigenasas de pasta de soya, para decolar los carotenoides a nivel ruminal, no ha dado resultado. Una posible alternativa es la

expresión de la enzima β -caroteno 15,15'-monooxigenasa en una bacteria probiótica que se adhiera al rumen e intestino y que degrade el exceso de β -Caroteno (Mora Izaguirre y Shimada Miyasaka, 2001). Para tal propósito, el grupo del Dr. Armando Shimada Miyasaka de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), transformó una cepa de *Lactobacillus casei* BL23 con el gen *bcmo1*, el cual codifica la β -caroteno 15,15'-monooxigenasa. Para que la cepa transformante sea efectiva debe de expresar la enzima y adherirse al rumen. Además, es necesario desarrollar la tecnología para la producción masiva del probiótico, sin que pierda la expresión de la enzima de interés. Por todo lo anterior el objetivo de este trabajo fue establecer la estrategia de alimentación de nutrientes y las condiciones de operación, para la producción de la cepa transformante *Lactobacillus casei* BL23 con capacidad para sintetizar la enzima recombinante BCMO1 en un cultivo por lote alimentado, debido a que este sistema de cultivo tiene mayor productividad que el cultivo por lote.

II. ANTECEDENTES

2.1 Producción de Carne de Ganado Bovino en México

La producción de carne de bovino es una de las actividades fundamentales del sector pecuario nacional. De acuerdo con cifras de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2010) la carne de bovino contribuye con 30.5% del valor de la producción pecuaria. La producción de carne de res se realiza en todas las regiones agropecuarias del país, siendo además, la actividad productiva más difundida en el medio rural. Los sistemas de producción van desde los más altamente tecnificados e integrados hasta los tradicionales (Ruíz *et al.*, 2004).

Existen tres regiones ganaderas: la región norte, árida y semiárida, cuya producción ha estado históricamente integrada a la producción del sur de los Estados Unidos de Norteamérica y las regiones tropical y templada del centro, orientadas fundamentalmente al abasto del mercado interno (SAGARPA, 2010). El 38% de la producción proviene de la zona tropical. En esta región el principal método de alimentación de los animales es el consumo de forrajes por pastoreo. Los forrajes presentan un gran contenido de carotenoides, principalmente de luteína y β -caroteno. Éste último se absorbe en el intestino para convertirse en vitamina A. Sin embargo, parte de los excedentes se depositan en la grasa del animal, dando lugar a coloraciones amarillentas (Cruz Salazar, 2012).

El amarillamiento excesivo de la grasa provoca el rechazo de la canal. Ello se debe a que los consumidores asumen que la carne proviene de animales viejos, enfermos o que tiene menor valor nutritivo (Gutiérrez *et al.*, 2006).

De acuerdo con Mora Izaguirre O. y Shimada Miyasaka (2001), el 5 % (35 000 toneladas), de la carne producida en 2009 presentó grasa amarilla. Considerando el precio de la carne en canal de 2011 (\$33.2/kg) y que únicamente el 10 % de la que presentara grasa amarilla fuera rechazada, las pérdidas ascenderían a aproximadamente 116 millones de pesos. Debido a lo anterior, es importante buscar alternativas para solucionar el problema.

2.2 Degradación Ruminal del β -caroteno

El primer suceso en el proceso del metabolismo de los carotenoides en los rumiantes es la disminución de su concentración por acción de la microbiota ruminal (Mora Izaguirre Ofelia *et al.*, 1999). De acuerdo a Van Soest (1994) el mecanismo para la degradación de carotenos en el rumen es la hidrogenación de las dobles ligaduras por la acción de diferentes bacterias anaerobias. El grado de hidrogenación depende de la posición *trans* o *cis* de las dobles ligaduras, siendo las primeras, más resistentes. Existen muchos tipos de carotenoides; sin embargo, para evitar el amarillamiento de la grasa de los bovinos, interesa sobre todo, degradar a la molécula de β -caroteno, evitando que se absorba como tal. Una opción para lograrlo es el uso de enzimas involucradas en el metabolismo del β -caroteno, siendo la candidata más viable la primera enzima de la vía metabólica: la β -caroteno 15,15'-monooxigenasa.

La β -caroteno 15,15'-monooxigenasa¹ (BCMO1 divide simétricamente al β - caroteno en dos moléculas de retinal (vitamina A) (Figura 1) (Goodman D. S. *et al.*, 1967). La enzima BCMO1 es soluble a pH de 7.8 a 8.2 y en este rango es donde muestra la mejor actividad. La enzima está asociada a un cofactor de

hierro divalente, por ello puede ser inhibida por agentes quelantes de hierro (Fidge *et al.*, 1969; Goodman D. W. S. *et al.*, 1965).

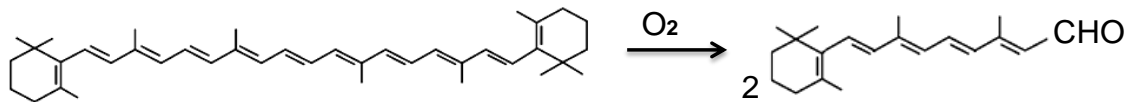


Figura 1. Oxidación de β -caroteno por acción de la enzima β -caroteno 15,15'-monooxigenasa1. Tomado de Cruz Salazar (2012).

La conversión de β -caroteno no se limita exclusivamente a la zona digestiva. También se lleva a cabo en hígado, riñón, pulmón, cerebro, testículos y en el tejido adiposo de los animales (Lietz *et al.*, 2010). Sin embargo, la actividad más alta se observa en la mucosa intestinal y en los enterocitos del yeyuno (Wyss *et al.*, 2001). En el caso de las reses finalizadas en pastoreo, la actividad de la enzima no es suficiente para convertir todo el β -caroteno consumido, en vitamina A.

Para eliminar la pigmentación causada por la acumulación de β -carotenos en las reses finalizadas en pastoreo, se necesita aumentar la concentración de BCMO1 en el organismo animal. Un método factible y novedoso para producir a la enzima de interés es trabajar con un microorganismo modificado con el gen *bcmo1*, preferentemente que actúe a nivel ruminal donde se degradan parte de los carotenoides, o a nivel intestinal, donde estas moléculas se absorben. El microorganismo adecuado debe ser Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS). En este sentido, una bacteria con características probiótica, puede ser el organismo apropiado, ya que además de ser GRAS, presenta una serie de ventajas adicionales, tales como la de resistir pH ácidos, ser capaz de adherirse

a mucinas y células epiteliales y desplazar a microorganismos patógenos (Adam *et al.*, 2012).

2.3 *Lactobacillus casei* como Probiótico

De acuerdo con la “Taxonomic Outline of the Procaryotes” (Euzéby, 1997, 2014) el género *Lactobacillus* pertenece al Phylum *Firmicutes* clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae*. Los lactobacilos son bacterias Gram positivas no esporuladas. Se pueden encontrar como bacilos o cocobacilos; son estrictamente fermentativos, microaerofílicos y quimioorganotróficos (Garrity *et al.*, 2004).

El *Lactobacillus casei* (*L. casei*) se encuentra en la boca y el tracto intestinal de animales sanos (Rodrigues *et al.*, 2006). Esta bacteria se considera como probiótico. Esto significa que cuando se consume viva, en cantidades suficientes puede ejercer un efecto benéfico en la salud de su hospedero (FAO/WHO, 2001). Debido a sus efectos positivos sobre la salud de los humanos, *L. casei* se añade regularmente a productos lácteos y cárnicos fermentados (Panya *et al.*, 2012; Vasile *et al.*, 2011).

El efecto probiótico de *L. casei* en bovinos se ha estudiado relativamente poco, Bautista *et al.* (2008) observaron un efecto protector de *L. casei* contra *Babesia bovis* y *B. Bigemina*, aún sin suministrar la vacuna contra la babesiosis. Posteriormente se observaron mejores resultados cuando se administraron simultáneamente el probiótico y la vacuna. Por otro lado, se ha encontrado que el suministro de *L. casei* a bovinos también reduce la adhesión e internalización a la glándula mamaria de *Staphylococcus aureus*, microorganismo causante de la mastitis (Bouchard *et al.*, 2013).

La cepa BL23 de *L. casei* también es considerado como probiótico. En el año 2010 Maze *et al.*, secuenciaron su genoma, determinando un tamaño de 3,079 196 pares de bases con un contenido G+C de 46.34%. Ellos compararon sus resultados con las secuencias de *L. casei* ATCC 334 y *L. casei* Shirota encontrándolas muy similares, Acedo-Félix y Pérez-Martínez (2003) encontraron evidencias de que ATCC 393 no es la cepa ancestral de *L. casei* BL23 . Las principales diferencias se atribuyeron a inserciones de pro-fagos y a genes que codifican para la utilización de diferentes carbohidratos. Se caracterizó a *L. casei* BL23 como una cepa fácilmente transformable, por ello ha sido un probiótico ampliamente usado de modelo en estudios de fisiología y bioquímica de lactobacilos (Maze *et al.*, 2010; Rochat *et al.*, 2007).

2.4 Adhesión de Lactobacilos al Tracto Gastrointestinal

Los lactobacilos que son utilizados como probióticos resisten el paso en el tracto digestivo y la acidez de las sales biliares del intestino delgado. Dicha resistencia les confiere una mayor probabilidad de adherirse y proliferar en el hospedero, aunque estas características no son permanentes, son requisito para que los probióticos produzcan un efecto benéfico a la salud (Faye *et al.*, 2012; Fuller, 1989).

Uno de los ensayos frecuentes en la búsqueda de probióticos es el de adhesión al tracto gastrointestinal (TGI) debido a que se presume como requisito para que exista interacción con el hospedero para conferir beneficios a su salud (Ouwehand *et al.*, 1999). Un aspecto significativo del TGI es la presencia de una capa de mucus entre el lumen y las células epiteliales. El grosor de esta capa aumenta proporcionalmente al número de microorganismos adheridos, en las diferentes regiones del TGI (Van Tassell y Miller, 2011).

La capa de mucus unida al epitelio del TGI es un gel continuo, que forma una red tridimensional compuesta principalmente por glicoproteínas que actúan como una barrera que protege al hospedero de antígenos dañinos y que promueve la movilidad del TGI (Matsuo *et al.*, 1997). La adhesión a este moco es el primer paso para que un probiótico pueda interactuar con las células de su hospedero para modular respuestas relacionadas con la salud (Matsuo *et al.*, 1997; Ouwehand *et al.*, 2002). Las glicoproteínas que forman al mucus se encuentran densamente glicosiladas (unidas a carbohidratos), lo cual las protege de la degradación por ataque de las proteasas digestivas. Se presume que la unión de los probióticos al mucus puede ser a través de estos oligosacáridos como se esquematiza en la Figura 2 (Van Tassell y Miller, 2011).

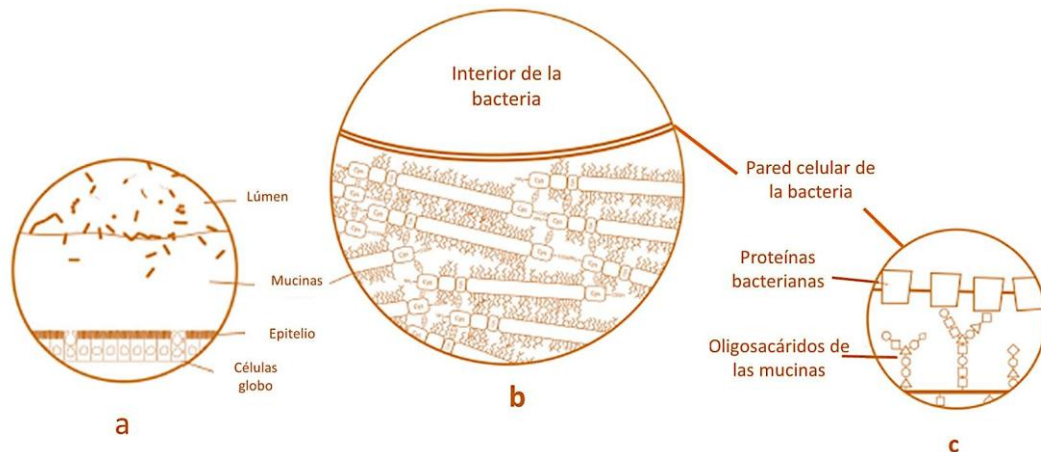


Figura 2. Representación de la adhesión de probióticos al hospedero a diferentes grados de magnitud. (a) La bacteria se une a las mucinas (b) Interface mucina-bacteria (c) Unión proteína carbohidrato. Tomado de Van Tassell y Miller (2011).

La mayoría de los estudios clínicos sobre la persistencia y colonización muestran que los probióticos no pueden colonizar permanentemente al TGI; por lo cual al suspenderse su consumo se pierde el efecto benéfico (Garrido *et al.*, 2005; Tannock *et al.*, 2000). Se sabe muy poco a cerca de por qué los probióticos se unen sólo transitoriamente. La unión inicial se lleva a cabo de manera no-específica a través de interacciones hidrofóbicas, y es por ello que se estudia la capacidad de autoagregación de las bacterias en presencia de compuestos hidrofóbicos, como una manera indirecta de conocer la capacidad de adhesión de una bacteria (Van Tassell y Miller, 2011).

Los probióticos establecen además interacciones específicas para unirse al intestino. Estas se pueden llevar a cabo a través de diferentes proteínas. Existen interacciones proteína-proteína que pueden establecerse entre la bacteria y la célula. En el caso de las interacciones entre la bacteria y las mucinas, la interacción más probable, como se presenta en la Figura 2, es la del tipo proteína-carbohidrato. Se cree que los lactobacilos poseen bacterias superficiales con actividad similar a la de las lectinas, que reconocen específicamente a los carbohidratos de las mucinas (Kwok *et al.*, 2006). Debido a que los carbohidratos que se expresan en las mucinas pueden cambiar dependiendo de la edad del animal y del órgano en que se expresen, la unión de un probiótico puede favorecerse más en algunas regiones del TGI que en otras (Van Tassell y Miller, 2011). La especificidad de esta unión es uno de los factores importantes para explicar por qué existen poblaciones más densas de probióticos en el colon.

2.5 Modificación Genética de *Lactobacillus casei*

L. casei ha sido modificado genéticamente con diferentes propósitos. Por ejemplo, cuando los lactobacilos producen lactato lo hacen en forma de una mezcla racémica de L y D lactato. Este último no es fisiológica ni industrialmente aprovechable, por lo que en *L. casei* BL23 se han suprimido los genes involucrados en la producción de D-lactato con relativo éxito (Rico *et al.*, 2008; Vernile *et al.*, 2008).

Por otro lado, la expresión del gen OmpC de *Salmonella* en plásmidos incorporados a *L. casei* reduce la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) el cual induce la respuesta inflamatoria aguda. Se piensa que este lactobacilo recombinante pueda ser útil para enfermos con procesos inflamatorios severos, como los que se presentan en las crisis de la artritis reumatoide (Kajikawa y Igimi, 2009). Utilizando plásmidos específicos también se ha logrado que *L. casei* BL23 exprese a la proteína β -lactoglobulina para estudios de alergenicidad (Hazebrouck *et al.*, 2007). En el caso de este estudio en particular, el grupo del Dr. Shimada logró la modificación del *L. casei* LB23 con el gen *bcmo1* para la producción de la enzima β -caroteno 15,15'-monooxigenasa, bacteria que será nombrada "*Lactobacillus casei* BL23-bcmo" (*L. casei* BL23-bcmo) a lo largo de este trabajo. En la tesis de Cruz Salazar (2012) se muestran los resultados de la actividad de BCMO1 de dicha cepa.

2.6 Producción de Biomasa a partir de Lactobacilos

Los lactobacilos son bacterias ácido lácticas (BAL) y producen lactato como producto principal final de la fermentación de carbohidratos. Según reporta Heimbach (2012), el lactato se produce a partir de ribosa, adonitol, galactosa,

D-glucosa, D-fructosa, L-sorbosa, manitol, sorbitol, celobiosa, maltosa, lactosa y trehalosa; mientras que a partir de inositol, sacarosa y gluconato la producción es débil, y no se produce a partir de glicerol, eritriol, D o L-arabinosa, D o L, Xilosa, entre otros (Viana Ballester, 2002).

El lactato, producido por las bacterias ácido lácticas actúa como inhibidor de su crecimiento (Waldir *et al.*, 2007). Su velocidad de formación está asociada a la velocidad específica de crecimiento y a la densidad bacteriana, por lo que depende de ambas variables, según se describe en la ecuación de Luedeking y Priet (2000) (Ecuación 1):

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dN}{dt} + \beta N \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde dP/dt es la velocidad de formación del lactato, dN/dt es la velocidad de crecimiento de la bacteria, N es la densidad bacteriana y α y β son constantes.

La velocidad de formación de lactato también depende de la disponibilidad de la fuente de carbono y energía, por lo que esta velocidad así como la velocidad de crecimiento se pueden controlar con base a la velocidad de alimentación de dicha fuente. En el caso de microorganismos recombinantes, en los que el gen introducido se encuentra en un plásmido, la velocidad de replicación de este elemento extracromosomal es diferente a la de replicación del cromosoma bacteriano, por lo que con estos microorganismos es crítico controlar la velocidad de crecimiento a fin de evitar la pérdida del plásmido, además de utilizar una presión selectiva, por ejemplo un antibiótico cuya resistencia esta codificada en el plásmido que contiene el gen de interés.

Para la producción de biomasa los sistemas de cultivo más utilizados a nivel industrial son el cultivo por lote y el cultivo por lote alimentado. En un cultivo por lote todos los nutrientes son alimentados al biorreactor antes de inocular, no se alimentan más sustratos durante el proceso, y una vez que éste ha llegado a su término, se cosecha (Chen *et al.*, 2006; Guillén-Navarro *et al.*, 1998).

Concentraciones altas de la fuente de carbono y energía, pueden tener un efecto deletéreo sobre el microorganismo, inhibiendo el crecimiento e inclusive ocasionando cambios metabólicos (Choojun y Suttisuwan, 2011; Hwang *et al.*, 2011). Por lo que cuando esto ocurre, una alternativa es el cultivo por lote alimentado. Este sistema se inicia como un cultivo por lote y posteriormente se alimentan uno o más sustratos, el perfil de alimentación se establece de acuerdo al avance del proceso y a la demanda de nutrientes (Chen *et al.*, 2006). En base a la velocidad de consumo de la fuente de energía, que generalmente es el sustrato limitante, se elabora un perfil de alimentación (Aguirre-Ezkauriatza *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2011). Para determinar este parámetro se determina el consumo del sustrato limitante durante la fase de crecimiento exponencial en un cultivo por lote o en cultivo por lote alimentado con velocidad constante (Hwang *et al.*, 2011). Con este tipo de sistema, se puede optimizar el rendimiento celular en base al sustrato (Xiang-Yang *et al.*, 2011).

Se han realizados algunos estudios en donde se experimenta con diferentes sistema de cultivo para la producción de biomasa con bacterias lácticas, como en el trabajo de Aguirre-Ezkauriatza *et al.* (2010), en donde utilizaron el cultivo por lote y el cultivo por lote alimentado con alimentación continua. Con este último se tuvo mayor producción de biomasa. Este estudio destaca que las condiciones óptimas para el cultivo de *L. casei* fueron: una temperatura de 37 °C, pH de 5.5 y agitación de 300 rpm. En el estudio de Estela Waldir *et al.* (2007) se cultivó *L. plantarum* en cultivos por lote y por lote alimentado con alimentación continua. Al igual que en el trabajo de Aguirre-Ezkauriatza *et al.*

(2010), en el cultivo por lote se obtuvo la mayor productividad de biomasa a 37 °C, pH de 5.8 y agitación de 500 rpm. En otros experimentos se usaron dos estrategias de alimentación (exponencial y continua) y distintas condiciones de operación. A 37°C, pH de 6.25 y 150 rpm se obtuvo la mejor producción de biomasa utilizando en el sistema de cultivo por lote alimentado exponencialmente.

2.7 Hipótesis

La cepa de *Lactobacillus casei* BL23-bcmo mantendrá la capacidad de autoagregarse y adherirse a mucinas del tracto digestivo bovino, y la productividad volumétrica de biomasa será mayor en cultivo por lote alimentado que en cultivo por lote.

2.8 Objetivo General

Comparar los sistemas de cultivo por lote y por lote alimentado para la producción de biomasa de *L. casei* BL23-bcmo.

2.9 Objetivos Específicos

-Comprobar que la cepa *L. casei* BL23 modificada para expresar la enzima β -caroteno 15,15'-monooxigenasa (BCMO1), mantiene la capacidad de adherencia a mucinas bovinas.

-Evaluar diferentes carbohidratos para la producción de biomasa de *L. casei* BL23-bcmo.

-Determinar los parámetros cinéticos de la cepa *L. casei* BL23-bcmo en cultivo por lote.

-Establecer y evaluar dos estrategias de alimentación en el cultivo por lote alimentado para incrementar la producción de biomasa de la cepa *L. casei* BL23-bcmo con respecto al cultivo por lote.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Esquema general de trabajo

El esquema general de trabajo de muestra en la Figura 3.

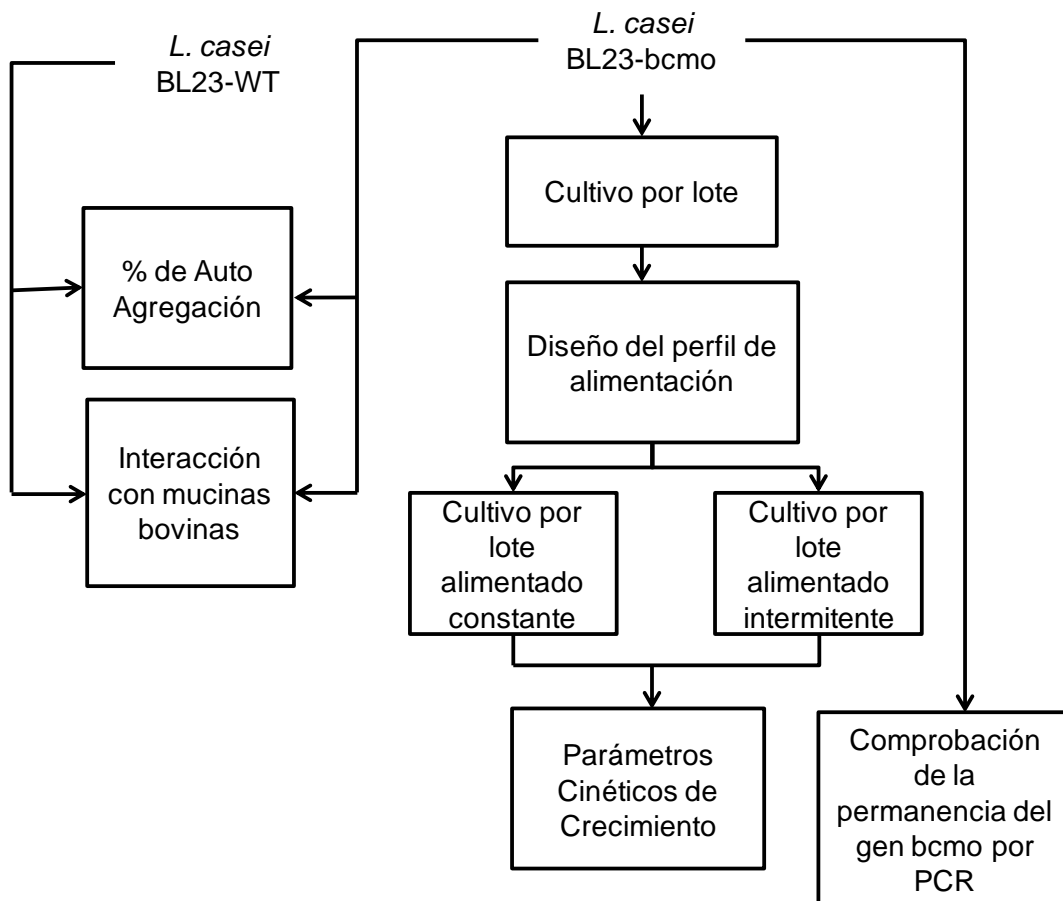


Figura 3. Esquema general de trabajo.

3.2 Cepa

Se utilizó la cepa *L. casei* BL23-bcmo, que tiene el plásmido pNG8048E con los genes *cmr* y *emr* que le confieren resistencia a cloranfenicol y eritromicina, respectivamente; así como el gen *bcmo1* de *Gallus gallus*. La cepa madre *L. casei* BL23 fue donada por el Dr. Vicente Monedero del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos de España a la Dra. Ofelia Mora del Laboratorio de Rumiología y Metabolismo Nutricional (RuMeN) de la Universidad Nacional Autónoma de México, Campus Juriquilla, Querétaro, quien construyó la cepa *L. casei* BL23-bcmo.

3.3 Conservación de *L. casei* BL23-bcmo

La cepa se propagó en el medio de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) (De Man *et al.*, 1960) adicionado con 5 µg/mL de eritromicina y 5 µg/mL cloranfenicol, durante 8 h en matraces agitados a 37°C y 250 rpm en una Agitadora G25 & R25 (New Brunswick, Alemania). Se depositaron alícuotas de 1 mL del cultivo en tubos eppendorf de 1.5 mL con 150 µL de glicerol estéril. Las alícuotas fueron congeladas a -70°C.

3.4 Preparación de Pre-inóculo e Inóculo

El inóculo se preparó en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, conteniendo 20 mL de caldo MRS adicionado de 5 µg/mL de eritromicina y 5 µg/mL cloranfenicol. El matraz se inoculó con 200 µL de *L. casei* BL23-bcmo provenientes de un tubo de conservación, y se incubó toda la noche a 37 °C y 250 rpm en la agitadora G25 & R25 (New Brunswick, Alemania). De este pre-inóculo se utilizó un mililitro con el cual se inoculó un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 100 mL del mismo medio de cultivo, el cual a su vez se incubó toda la noche bajo las mismas condiciones que el pre-inóculo.

3.5 Ensayo de Autoagregación

Se cultivaron *L. casei* BL23-bcmo y *L. casei* BL23 cada uno en 2 mL de caldo MRS adicionado con 5 µg/mL de eritromicina y 5 µg/mL cloranfenicol a 37°C durante 24 h, con 5 repeticiones. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 4500 x g a 4°C, durante 20 min y se lavó dos veces con “Solución Salina Amortiguadora por Fosfato” (PBS). El paquete celular se resuspendió en PBS hasta obtener una D.O. de 0.5 a 600nm. La suspensión celular se centrifugó a 4500 x g a 4°C, durante 20 min. El paquete celular se resuspendió en caldo nuevo MRS estéril. Después se incubó durante 2 h a 37°C, se tomó 1 mL de la parte superior del cultivo y se midió la absorbancia a 600 nm, el resto se homogenizó y se volvió a leer la absorbancia. Se realizaron 5 repeticiones por bacteria y el porcentaje de autoagregación se calculó según describen Del Re *et al.* (2000) (Ecuación 2).

$$Aa = 1 - \frac{DOs}{DOt} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

Aa= Porcentaje de autoagregación (%)

DOs= Densidad óptica del cultivo superior

DOt= Densidad óptica del cultivo total

3.6 Ensayos de Interacción de *L. casei* BL23 con Mucinas bovinas

En esta prueba se determinaron interacciones proteína-carbohidrato mediante un ensayo con lectinas (ELLA) similar a ELISA. Se usó biotina como reportero de las mucinas y el sistema avidina-peroxidasa para revelar la interacción. Primero se estableció la sensibilidad de la prueba y posteriormente se hicieron los ensayos de interacción, comparando las características de adhesión de la bacteria nativa y la transformada. Como control positivo se usaron mucinas gástricas porcinas y como negativo albúmina de suero porcino (PSA).

3.7 Obtención y Preparación de Mucinas

Las mucinas bovinas se obtuvieron del rumen e intestino delgado de dos animales sanos, sacrificados en la planta de sacrificio PEGSON S.A. de C.V. Tipo Inspección Federal (TIF) #118, de Hermosillo Sonora. Se separó el rumen del resto del tracto gastrointestinal al igual que el intestino delgado, se enjuagaron con una solución salina amortiguadora de fosfatos 0.02 M, fría y estéril a pH 7.2, conteniendo 1ml por litro de solución amortiguadora de la mezcla de inhibidores de proteasas, Sigma-ALdrich (Sto. Louis, MO, USA) y 0.02 % de azida de sodio (PBS). Posteriormente se retiró la mucosa raspando

suavemente con un portaobjeto estéril y colocándola en tubos de plástico, con 4 volúmenes de PBS. Los tubos se transportaron en hielo a CIAD en donde se aislaron las mucinas de rumen e intestino individualmente por doble precipitación con etanol a -20°C, de acuerdo con la técnica de Hoskins y Boulding (1981) La suspensión de mucinas en PBS se agitó suavemente por 1 h y se centrifugó a 4°C y 4500 g durante 20 min y se precipitó 2 veces con etanol. El precipitado se disolvió en agua Mili-Q filtrada, se dializó extensivamente. Para las diálisis el primer recambio de agua se hizo con agua corriente, los dos siguientes con agua bidestilada, después con agua HPLC y por ultimo con agua Mili-Q filtrada. Cada mucina se liofilizó en un virtis (Benchtop 6.6, NY, USA) y se almacenó en congelación. Las muestras se mantuvieron perfectamente selladas hasta su análisis.

La biotilación de las mucinas bovinas y porcinas y de la PSA se llevó a cabo según Hofmann *et al.* (1977) con ligeras modificaciones de acuerdo a (Sarabia-Sainz *et al.*, 2009). Por cada miligramo de mucina liofilizada se agregaron 200 µL de PBS a pH 7.2 para hidratarla. Se disolvieron 0.08 mg de biotina en 100 µL de metil sulfóxido contenidos en un frasco ámbar, y se agregó la mucina hidratada. La mezcla se incubó durante 2 h bajo agitación suave, en la oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla mucina-biotina se dializó extensivamente a 4°C para eliminar los restos de biotina que no reaccionaron. La mucina biotilada se congeló a -40 °C durante 24 h, luego se liofilizó y se almacenó a -20 °C hasta su uso (Hofmann *et al.*, 1977; Sarabia-Sainz *et al.*, 2009).

3.8 Determinación de la Sensibilidad del Análisis de ELLA

Para conocer las concentraciones adecuadas de mucina y bacteria a utilizar se llevó a cabo análisis de interacción. Se usaron diferentes concentraciones (0.0025, 0.005, 0.01 y 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de mucinas biotiniladas y de bacteria (2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 y 2×10^8 UFC/mL) en PBS. Las concentraciones de bacteria se ajustaron con el nefelómetro de Mac Farland. Se usaron cajas de ELISA de 96 pozos inmovilizando 100 μL por pozo de la bacteria ajustada. La inmovilización se llevó a cabo con glutaraldehído al 0.01%. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 min con PBS con 0.1% de Tween-20 (TPBS). Se bloquearon las interacciones no específicas con 200 μl de albúmina sérica bovina (BSA) al 1.5 % en PBS por pozo, incubando durante 18 h. Nuevamente se hicieron 3 lavados con TPBS. Después de lavar se añadieron las mucinas biotiniladas y se dejó interaccionar por 2 h a 25 °C. Nuevamente se hicieron 3 lavados con TPBS. Posteriormente se incubó (40 min, 25 °C) con avidina-peroxidasa (1:1000 en PBS), se lavó nuevamente y se reveló la interacción con ortofenilendiamina (OPD), leyendo la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de ELISA 680 micro-plate reader (BioRad, CA, USA). Los análisis se hicieron por duplicado con 24 observaciones por réplica.

3.9 Ensayo ELLA para Comparar la Adhesión de *L. casei* BL23 y *L. casei* BL23-bcmo a las Mucinas del Rumen e Intestino Bovino

Una vez determinadas las concentraciones óptimas de mucina-bacteria para realizar el ensayo ELLA, se procedió a comparar de la interacción de las cepas de *L. casei* BL23 parental y transformada, con las mucinas del rumen e intestino bovino. El ensayo se llevó a cabo como se describe en el apartado anterior, utilizando las concentraciones más adecuadas de mucina (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y de

bacteria (2×10^8 UFC). Como control positivo se utilizó mucina gástrica porcina comercial de Sigma-ALdrich (Sto. Louis, MO, USA) y PSA biotinilada como control negativo. Se leyó absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas ELISA 680 (BioRad, CA, USA). Los análisis se hicieron por duplicado con 24 observaciones por réplica.

3.10 Evaluación de Glucosa, Glicerol y Xilosa como Fuentes de Carbono para *L. casei* BL23-bcmo

Se cultivó *L. casei* BL23-bcmo en un medio con la misma composición del medio MRS pero sustituyendo los 20 g/L de glucosa por 20 g/L de glicerol o xilosa. Se utilizaron matraces nefelométricos de 250 mL con 30 mL de medio y se incubaron a 37°C y 250 rpm de agitación, durante 20 h. La cinética de crecimiento se siguió en un fotocolorímetro Klett Summerson con filtro rojo. Se realizaron tres experimentos independientes para cada fuente de carbono en distintos días, y en cada experimento se incluyó un blanco con el medio MRS sin glucosa.

3.11 Fermentación en Cultivo por Lote

La fermentación en lote se llevó a cabo en un biorreactor con volumen nominal de 3 L (Applikon Biotechnology). El biorreactor se esterilizó con 1,250 mL de medio MRS, a 121°C durante, 15 psi, durante 15 min. El reactor se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron eritromicina y cloranfenicol esterilizados por filtración para tener una concentración final en el reactor de 5 µg/mL de cada uno. Las condiciones de operación fueron: pH controlado a 5.6 ± 0.2 (NaOH 4M), temperatura 37°C, agitación 300 rpm y 0.05 vvm de aireación (condiciones estándar de PyT). Se utilizó un inóculo correspondiente al 6% del volumen de operación total en cada fermentación, el inóculo se creció en medio MRS adicionado con 5 µg/mL de eritromicina y 5 µg/mL cloranfenicol durante toda la noche para alcanzar una concentración celular superior a 2×10^8 UFC, se centrifugó a 4500 g a 4°C durante 20 min para eliminar el medio fermentado y se resuspendió en medio nuevo estéril. Se realizaron dos fermentaciones independientes. Todos los datos de las cinéticas de crecimiento se ajustaron al modelo logístico de tres variables, como se describe en la Ecuación 3, para determinar las velocidades específicas de crecimiento y la concentración máxima de biomasa, mediante el programa estadístico NCSS 2007. Mientras que los rendimientos de glucosa, lactato y células, se calcularon utilizando todos los datos experimentales y una regresión lineal.

$$X = \frac{X_{max}}{1 + X_{\frac{max}{X_0}} e^{-\mu m t}} \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde: X= Biomasa (g/L)

μ = Velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

t= Tiempo (h)

X_{max} = Concentración máxima de biomasa (g/L)

Se calculó la productividad volumétrica de biomasa mediante la Ecuación 4, calculándose el valor teórico con base a la X_{\max} predicha por el modelo logístico y a partir de la X_{\max} experimental promedio de cada sistema de cultivo.

$$P_{V_x} = \mu^* X_{\max} \quad (\text{Ec. 4})$$

3.12 Fermentación en Cultivo por Lote Alimentado

Se implementaron dos diferentes estrategias de alimentación: alimentación-intermitente y alimentación-constante, bajo las mismas condiciones de pH, temperatura, agitación y aireación que el cultivo por lote. La alimentación se inició en la fase exponencial de crecimiento, cuando la concentración de glucosa en el biorreactor era de aproximadamente de 8 g/L y la de células de 4 g/L. Se realizaron dos fermentaciones en distintos días para cada tipo de alimentación.

En el cultivo por lote alimentado con alimentación-intermitente la concentración de glucosa se mantuvo entre 8-15 g/L, adicionando pulsos de una solución acuosa estéril de glucosa [400 g/L]. Se determinó la concentración de glucosa antes y después de cada alimentación. Para el cultivo por lote alimentado con alimentación constante, se añadió la solución acuosa de glucosa a una velocidad de $4 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ mediante una bomba peristáltica (Cole Parmer, modelo 7518). De igual forma que para el cultivo por lote todos los datos de las cinéticas de crecimiento se ajustaron al modelo logístico de 3 variables, como se describe en la Ecuación 3. Para determinar las velocidades específicas de crecimiento y la concentración máxima de biomasa, mediante el programa estadístico NCSS 2007. En todos los casos los cambios de volumen en el reactor fueron menores al 10% por lo que el volumen se consideró constante.

3.13 Permanencia del Gen *bcmo1* en *Lactobacillus casei* BL23-*bcmo* al Final del Cultivo por Lote con Alimentación Intermitente

Para comprobar la permanencia del gen de *bcmo1* en la cepa transformante, se tomó 1 mL del cultivo por lote alimentado con alimentación intermitente a la hora 12. La alícuota se conservó a -20 °C hasta su uso. Se reactivó la cepa conservada, en caldo MRS como se describe anteriormente en la reactivación de la cepa. Se aisló una colonia en medio sólido de MRS, mediante la técnica de siembra por estría cruzada, de donde se tomó una sola colonia para el ensayo de PCR. Como control negativo se utilizó una colonia aislada de la cepa parental. Se realizó el PCR de colonia como lo describe Rojo *et al.* (2007) con modificaciones en las condiciones: La desnaturalización se realizó a 95° C durante 3 min, la alineación de los cebadores a 55 °C por 30 seg, la extensión de las cadenas a 72 °C por 5 min, durante 34 ciclos. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores (Cuadro 1) en la reacción de PCR, para amplificar un fragmento de *bcmo1*, fueron diseñados en el laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos de CIAD A.C. y sintetizados por Integrated DNA Technologies, Inc (IDT). La secuencia nucleotídica de cada cebador se muestra en la Cuadro 1. Dichos oligonucleótidos amplifican un fragmento de 276 pb del gen *bcmo1*. Los productos de PCR se visualizaron mediante el empleo de geles de agarosa al 1%. La electroforesis se hizo en una cámara de electroforesis horizontal "Wide Mini-Sub Cell GT Cell" con una fuente de poder "Power Supply" de (BIO-RAD, EUA) a de 90 v durante 45 min. Se cargaron en el gel 7 µL del producto de PCR con 2 µL de amortiguador de carga SYBER SAFE (*Invitrogen*, CA, USA), como marcador de peso molecular se emplearon 2 µL de 1kb plus DNA Ladder (*Invitrogen* Carlsbad, CA) en el pozo inicial del gel de agarosa. Los resultados se capturaron en un fotodocumentador (Gel doc® XR+BIO-RAD, EUA) mediante un transluminador de luz ultravioleta (UV). Las imágenes se analizaron utilizando el programa Image Lab software (BIO-RAD, EUA).

Cuadro 1. Secuencia de oligonucleótidos para la amplificación de *bcmo 1*.

Nombre	Cebador	Secuencia 5'- 3'
BCMO- F1	Oligonucleótido Iniciador	ACATCCGAGGTGTGAACTGG
BCMO-R1	Oligonucleótido Terminador	AGGTTGGGATGGAGGTAAGC

3.14 Métodos Analíticos

La glucosa y el lactato se cuantificaron en el analizador bioquímico YSI Modelo 2700 (Yellow Springs Instruments, Ohio USA). El equipo utiliza un electrodo con una membrana en la que se encuentra inmovilizada la enzima glucosa oxidasa para el análisis de glucosa y la lactato oxidasa para el análisis de lactato. Para cada cinética se realizaron muestreos con intervalos de tiempo de 1 a 2 horas, la muestra se centrifugó a 4500 x g a 4°C por 20 min y se analizó el sobrenadante.

La biomasa se estimó a partir de la D.O. a 600nm. Los valores de absorbancia fueron correlacionados con los del peso seco de la misma fermentación como lo describe Aguirre-Ezkauriatza *et al.* (2010). El peso seco se determinó filtrando las muestras a través de membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm, previamente taradas y secadas al vacío a 60°C a peso constante.

3.15 Análisis Estadísticos

El diseño estadístico fue un diseño completamente al azar. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). Para evaluar diferencias entre medias se usó la prueba de comparación múltiple de Tuckey-Kramer a un nivel de probabilidad del 95%, usando el software estadístico NCSS 2007.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensayo de Autoagregación de *Lactobacillus casei* BL23

La autoagregación es una habilidad que permite que las cepas probióticas lleguen a cumplir funciones benéficas en el TGI y se ha encontrado una relación entre la capacidad de autoagregación y capacidad de adhesión en algunas especies de bifidobacterias y lactobacilos (Del Re *et al.*, 2000; Iñiguez-Palomares *et al.*, 2007). *L. casei* BL23-bcmo tuvo 30% de autoagregación comparado con 27% de la cepa parental, los resultados del análisis de varianza no mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el porcentaje de autoagregación de cada cepa como se muestra en la Figura 4. Los resultados obtenidos con *L. casei* BL23 y *L. casei* BL23-bcmo mostraron un porcentaje de autoagregación similar al de otras cepas del mismo género (Tuo *et al.*, 2013).

Tanto la cepa parental como la transformada corresponden a un fenotipo de autoagregación moderadamente alto (Del Re *et al.*, 2000). Iñiguez-Palomares *et al.* (2007), evaluaron la capacidad de autoagregación de 20 cepas de lactobacilos, aquellas que mostraron el mayor porcentaje de autoagregación se hallaron en un rango del 30 a 40%, que se considera como un nivel elevado de autoagregación. También encontraron correlación entre cepas con alto porcentaje de autoagregación y la capacidad de adherencia a células epiteliales. En otro estudio Tuo *et al.* (2013) trabajaron con 22 cepas de lactobacilos, de las cuales 5 pertenecían a *L. casei*, y encontraron que los

lactobacilos tuvieron porcentajes de autoagregación entre 24 y 41%, y al igual que Del Re *et al.* (2000) encontraron una correlación entre la capacidad de autoagregación de 15 diferentes cepas de *L. casei plantarum* y la capacidad de adherencia. Sin embargo, no encontraron dicha correlación en las cepas de *L. casei*. Lo que sugiere que no todas las cepas con alta capacidad de autoagregación mantienen una alta capacidad de adherencia, por todo lo anterior, se procedió a realizar los ensayos de adherencia con mucinas extraídas de rumen e intestino bovino.

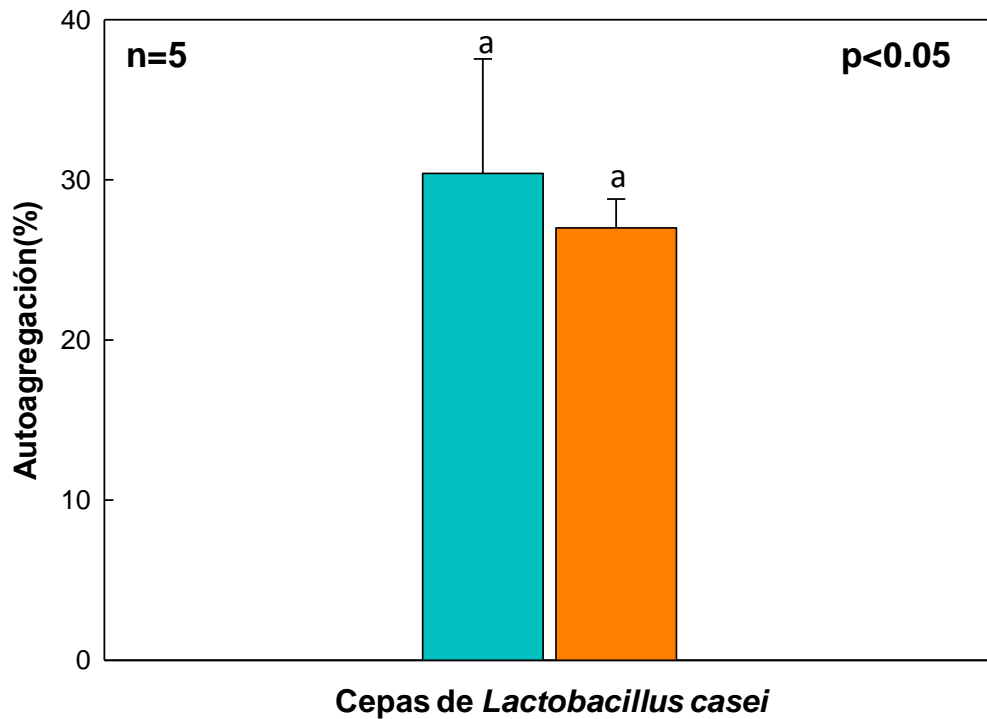


Figura 4. Autoagregación de ■ *L. casei* BL23-bcmo y de ■ *L. casei* BL23 cepa parental. Literales diferentes significan diferencias significativas $p<0.05$.

4.2 Determinación de la Sensibilidad del Análisis de ELLA

Los resultados para determinar la sensibilidad del ensayo de adhesión se muestran en la figura 5. Se probaron diferentes concentraciones de mucina y de bacteria a fin de encontrar la relación más adecuada. Se observó mayor interacción al usar 20 $\mu\text{g/mL}$ de mucina bovina a una concentración celular aproximada de 2×10^8 UFC de *L. casei* BL23 /mL .Estos parámetros fueron usados posteriormente, para las subsecuentes análisis.

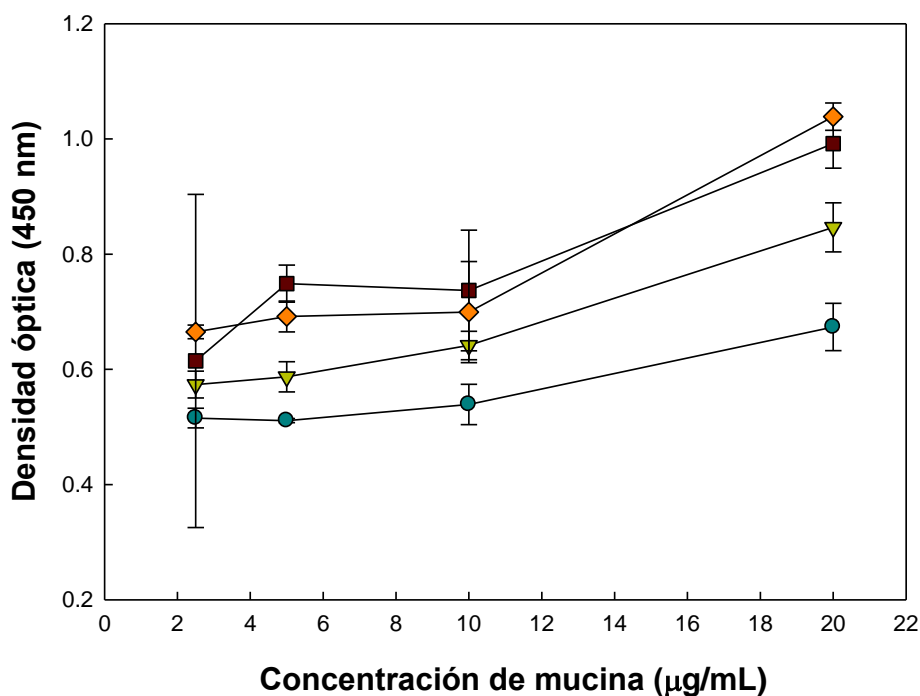


Figura 5. Efecto de la concentración bacteriana y la concentración de mucina sobre la adherencia (●) 2×10^5 UFC, (▼) 2×10^6 UFC, (■) 2×10^7 UFC y (◆) 2×10^8 UFC.

4.3 Ensayo ELLA para Comparar la Adhesión de *L. casei* BL23 y *L. casei* BL23-bcmo a las Mucinas del Rumen e Intestino Bovino

En el estudio de bacterias probióticas, la adhesión al TGI ha sido un criterio útil para la selección de cepas. En los últimos años se han investigado los lactobacilos probióticos con el fin de identificar adhesinas superficiales (Sánchez *et al.*, 2008; Velez *et al.*, 2007). En base a análisis exoproteómicos se ha comprobado que cepas de *L. casei* presentan en su superficie una variedad de proteínas, algunas de ellas están involucradas en la interacción con la mucosa hospedera y se comportan como factores de adhesión capaces de interactuar con la capa de mucosa o de activar vías definidas en el hospedero (Beck *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2009).

A la fecha no se habían reportado datos sobre la capacidad de adherencia del *L. casei* sobre mucinas del tracto gastrointestinal bovino. En este estudio se demuestra que *L. casei* BL23, tanto la cepa parental como la transformada con el gen *bcmo1* son capaces de adherirse a glicoproteínas bovinas tanto del rumen como del intestino delgado (Figura 6). Cabe destacar que se encontró una mayor adherencia entre las cepas de *L. casei* y las mucinas del intestino bovino en contraste con las mucinas de rumen. Ésto se puede deberse a que el intestino es el sitio más importante para la actividad inmune probiótica, inclusive se sabe que en humanos el intestino puede alcanzar una 50% de colonización de lactobacilos sobre la microbiota natural del mismo (Kleerebezem y Vaughan, 2009). En el estómago hay menor concentración microbiana y la colonización de bacterias es un poco más difícil debido a los drásticos cambios de pH y a las sales biliares, entre otros (Bik *et al.*, 2006).

Respecto a la interacción con mucinas porcinas, hubo una ligera diferencia entre la adhesión a mucinas de rumen bovino y a mucinas gástricas porcinas, siendo menor la adherencia a las mucinas del rumen, para ambas cepas.

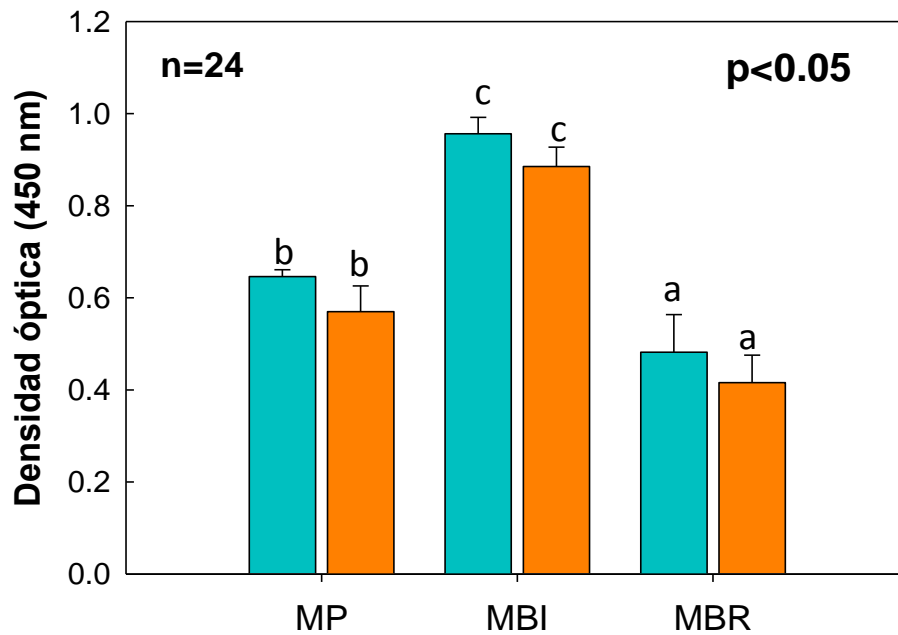


Figura 6. Adhesión de ■ *L. casei* BL23-bcmo y de ■ *L. casei* BL23 cepa parental a mucina porcina gástrica comercial (MP), a mucina bovina extraída de intestino (MBI) y a mucina bovina extraída de rumen (MBR). La adhesión esta expresada con la media \pm desviación estándar. Literales diferentes significan diferencias significativas $p < 0.05$.

Cuando una bacteria es manipulada mediante técnicas de ingeniería genética, existe la probabilidad de que esta pierda la capacidad de sobre expresar una diversidad de genes, lo cual puede llegar a afectar la conformación, electronegatividad o expresión de las proteínas de superficie, lo que puede afectar a la capacidad de adherencia de la cepa transformada (Muñoz-Provencio *et al.*, 2009; Muñoz-Provencio *et al.*, 2010). Por ello fue necesario comprobar que las células transformadas de *L. casei* BL23-bcmo no hubiesen perdido la capacidad de adherencia. No se encontraron diferencias significativas entre la adherencia a las mucinas de las cepa *L. casei* BL23-bcmo y su cepa parental (Fig. 6), por lo que se puede deducir que la transformación de la bacteria con el gen *bcmo1* no afectó su capacidad de adherencia de la cepa de *Lactobacillus*. Se presume que la transformante es apta para ser utilizada como probiótico, ya que mantiene la capacidad tanto de autoagregación como la de adherencia.

4.4 Evaluación de Glucosa, Glicerol y Xilosa como Fuentes de Carbono para *L. casei* BL23-bcmo

En la Figura 7(A) se muestra el crecimiento promedio de *L. casei* BL23-bcmo en glucosa, glicerol y xilosa. El mayor crecimiento celular y la mayor producción de lactato se obtuvieron con glucosa, para las demás fuentes de carbono el crecimiento obtenido fue similar al del control, el cual solo contenía los aminoácidos como fuente de carbono. Estos resultados sugieren que el microorganismo no utilizó la xilosa, ni el glicerol y creció a expensas de los aminoácidos presentes en el medio de cultivo.

Los resultados obtenidos indican que la mejor opción como fuente de carbono y energía, para la producción de biomasa de la cepa de interés fue la glucosa. Se sabe que estas bacterias pueden usar una gran variedad de fuentes de carbono

para su crecimiento, que normalmente son metabolizadas vía glucólisis hasta ácido pirúvico, el cual es posteriormente reducido a lactato. Sin embargo, han desarrollado un sistema que asegura el uso preferencial de carbohidratos rápidamente metabolizables. Sin embargo, *L. casei* BL23 no fermentó la xilosa ni el glicerol en ausencia de glucosa, según Viana Ballester (2002) *L. casei* no fermenta arabinosa, melobiosa, rafinosa, ramnosa ni xilosa. Sin embargo *L. casei* BL23 a diferencia de otras cepas no fue capaz de metabolizar el glicerol. Algunas bacterias gram positivas como *Bacillus subtilis* sintetizan todas las enzimas para metabolizar xilosa, pero no pueden transportarla (Hernández Bustos, 2003), pero no se encontró información sobre *L. casei* al respecto.

En la Figura 7(B) se muestra la concentración de lactato al final de la cinética de cada uno de los tratamientos, la concentración fue mínima en el caso de los carbohidratos que no fueron metabolizados y elevada para la glucosa. Estos resultados concuerdan con los de Aguirre-Ezkauriatza *et al.*, (2009), quienes encontraron que el microorganismo utiliza la glucosa tanto para el crecimiento como para la producción de lactato.

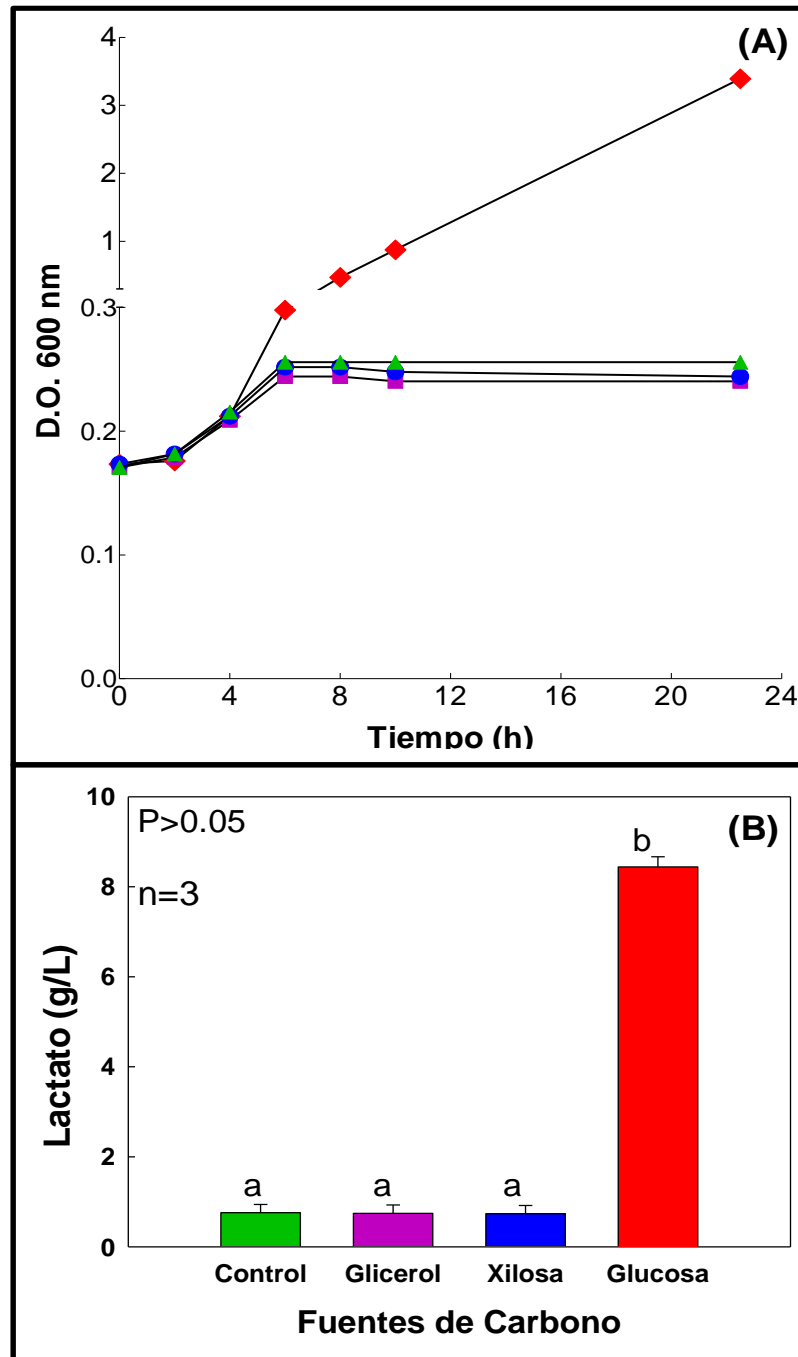


Figura 7. Crecimiento y producción de lactato de *L. casei* BL23-bcmo en distintos carbohidratos. (A) Cinética de crecimiento de *L. casei* BL23-bcmo en glucosa ♦, glicerol ■, xilosa ●, control sin fuente de carbono ▲. (B) Concentración de lactato al final de la fermentación.

4.5 Fermentación en Cultivo por Lote

La cinética de fermentación en cultivo por lote de *L. casei* BL23-bcmo se muestra en la Figura 8(A). Los datos experimentales de biomasa se ajustaron al modelo logístico con una R^2 de 0.98. La concentración máxima de biomasa según el ajuste al modelo logístico fue de 10.83 g/L, con una $\mu = 0.32 \text{ h}^{-1}$. En la Fig. 9 se muestra la regresión lineal para calcular el rendimiento de biomasa en base a glucosa ($Y_{X/S}$) fue de $0.39 \text{ g}_{\text{cel}}/\text{g}_{\text{glc}}$, con una $R^2=0.94$. El valor teórico de $Y_{X/S}$ es 0.5 para un microorganismo creciendo en condiciones aerobias sobre glucosa. El rendimiento de lactato en base a glucosa ($Y_{P/S}$) fue de $0.93 \text{ g}_{\text{Lac}}/\text{g}_{\text{glc}}$, con $R^2=0.99$ (Fig. 10). Estos resultados indican que la bacteria está utilizando también los aminoácidos presentes en el medio para crecer (Cuadro 2). Sin embargo, tanto el crecimiento como la producción de lactato cesaron cuándo la glucosa se agotó como se observa en la Figura 8(B). Por lo tanto el sustrato limitante fue la glucosa.

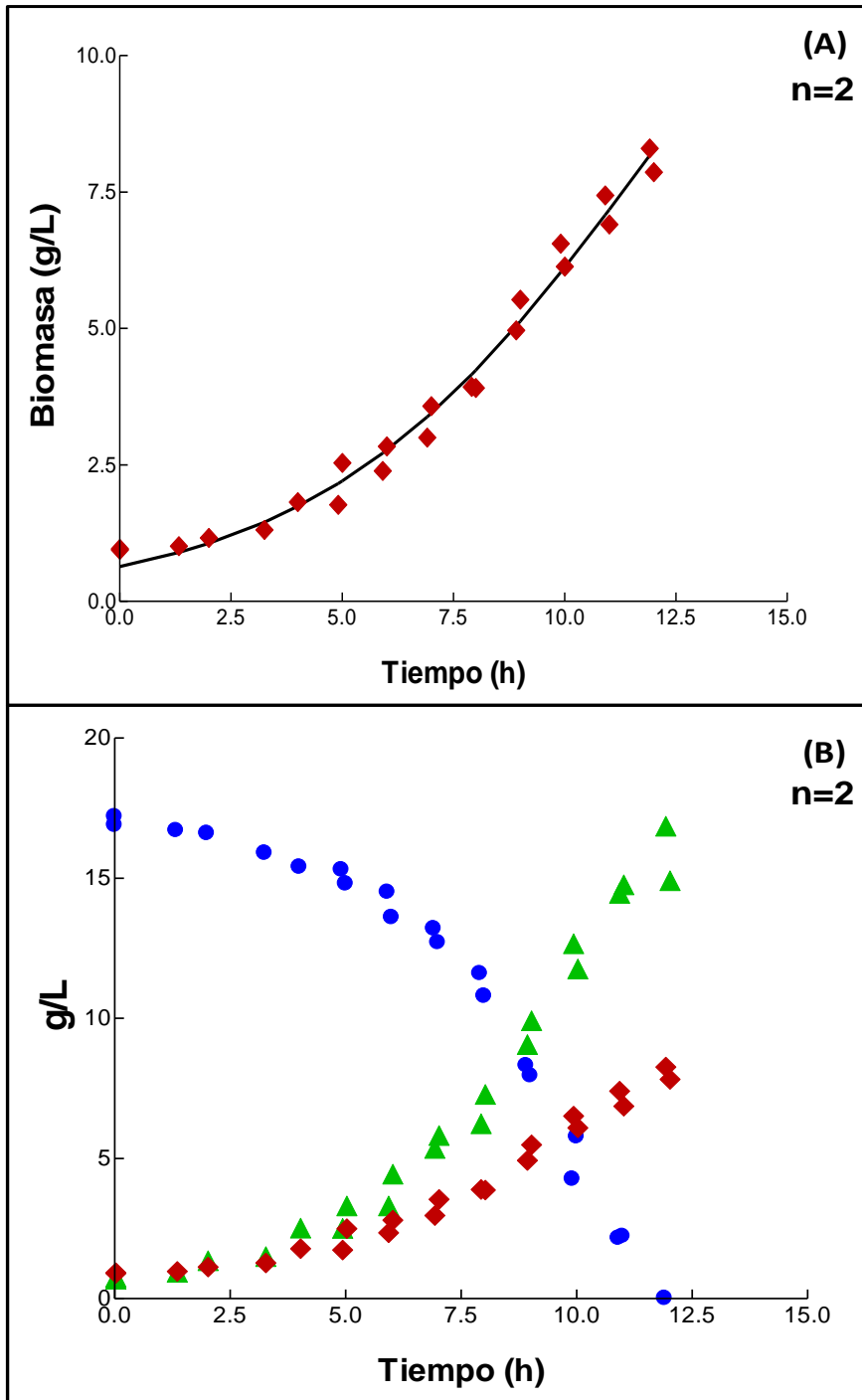


Figura 8. Cultivo por lote de *L. casei* BL23-bcmo (A) \blacklozenge Biomasa, — Ajuste al modelo logístico. (B) \blacklozenge Biomasa, \bullet Glucosa, \blacktriangle Lactato.

Cuadro 2. Parámetros Cinéticos en Cultivo por Lote.

Parámetro	Ajuste Logístico	R ²	Ajuste Lineal	R ²
X _{max} (g/L)	10.83	0.98		
μ (h ⁻¹)	0.32	0.98		
Y _{x/s} (g _{cel} /g _{glc})			0.39	0.94
Y _{P/S} (g _{Lct} /g _{glc})			0.93	0.99
Y _{P/X} (g _{Lct} /g _{cel})			2.15	0.99
^a Pv _{xt} (g _{cel} /L-h)	3.46			
^b Pv _x (g _{cel} /L-h)	2.58			

a: Calculada en base a la X_{max} predicha por el modelo logístico

b: Calculada en base a la X_{max} experimental

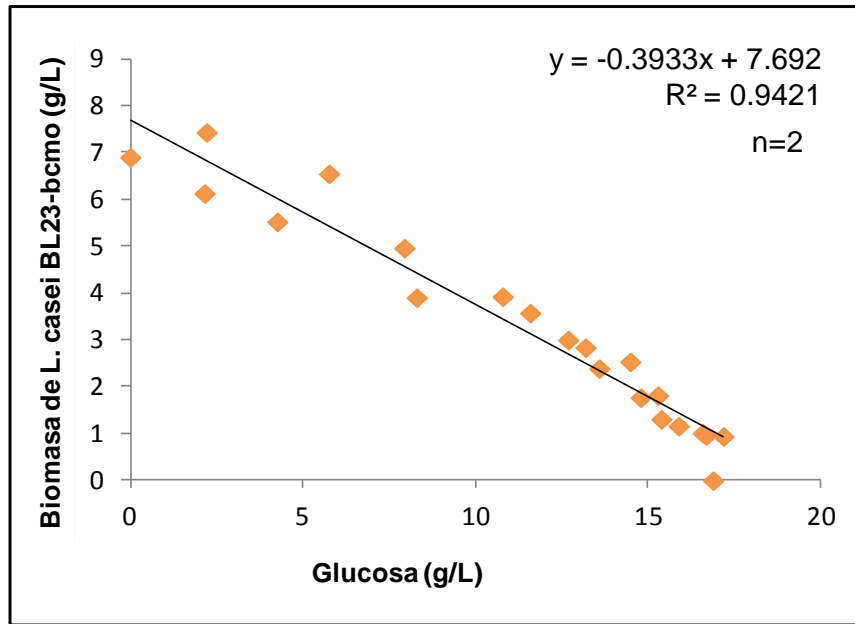


Figura 9. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{X/S}$ en cultivo por lote.

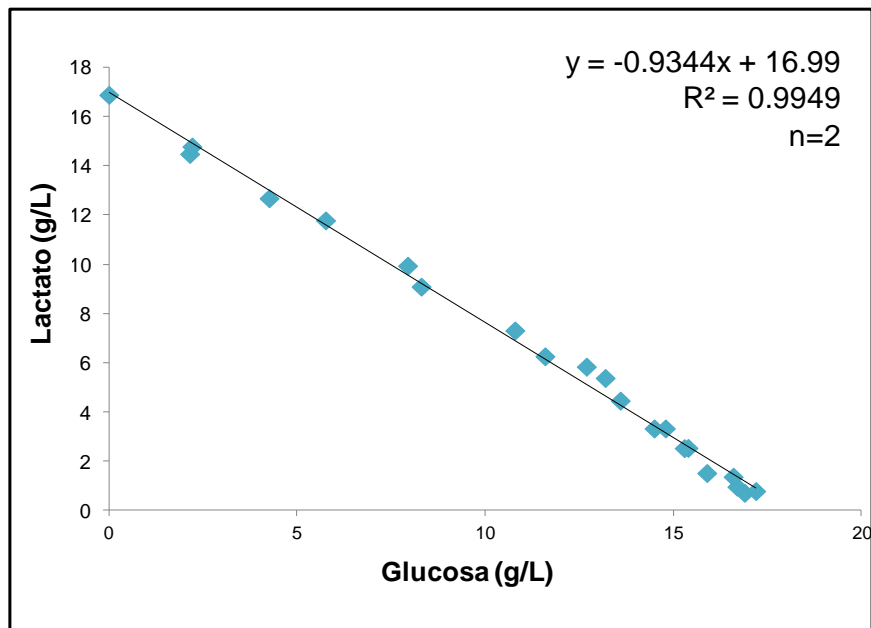


Figura 10. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/S}$ en cultivo por lote.

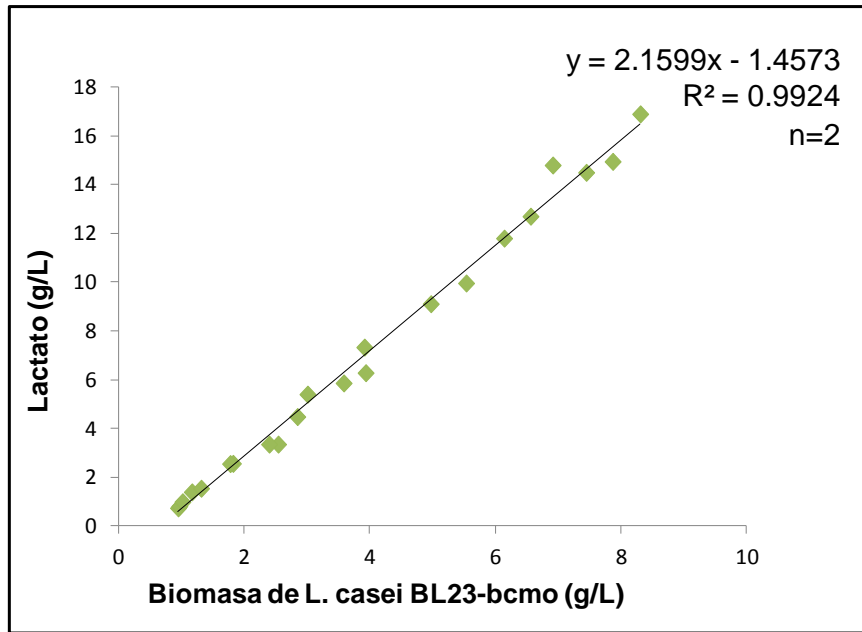


Figura 11. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/X}$ en cultivo por lote.

4.6 Fermentación en Cultivo por Lote Alimentado

En Figura 12(A) se presenta la cinética de las fases por lote y por lote alimentado para el cultivo por lote con alimentación intermitente, los parámetros cinéticos correspondientes a la fase de cultivo por lote y por lote alimentado se muestran en la Cuadro 3 y las regresiones respectivas en las Fig. 13, 14, 15 y 16. La concentración máxima de biomasa predicha por el modelo logístico durante la alimentación fue 1.43 veces mayor a la de la etapa por lote, mientras que μ y $Y_{P/X}$ se incrementaron 1.53 y 1.26 veces, respectivamente.

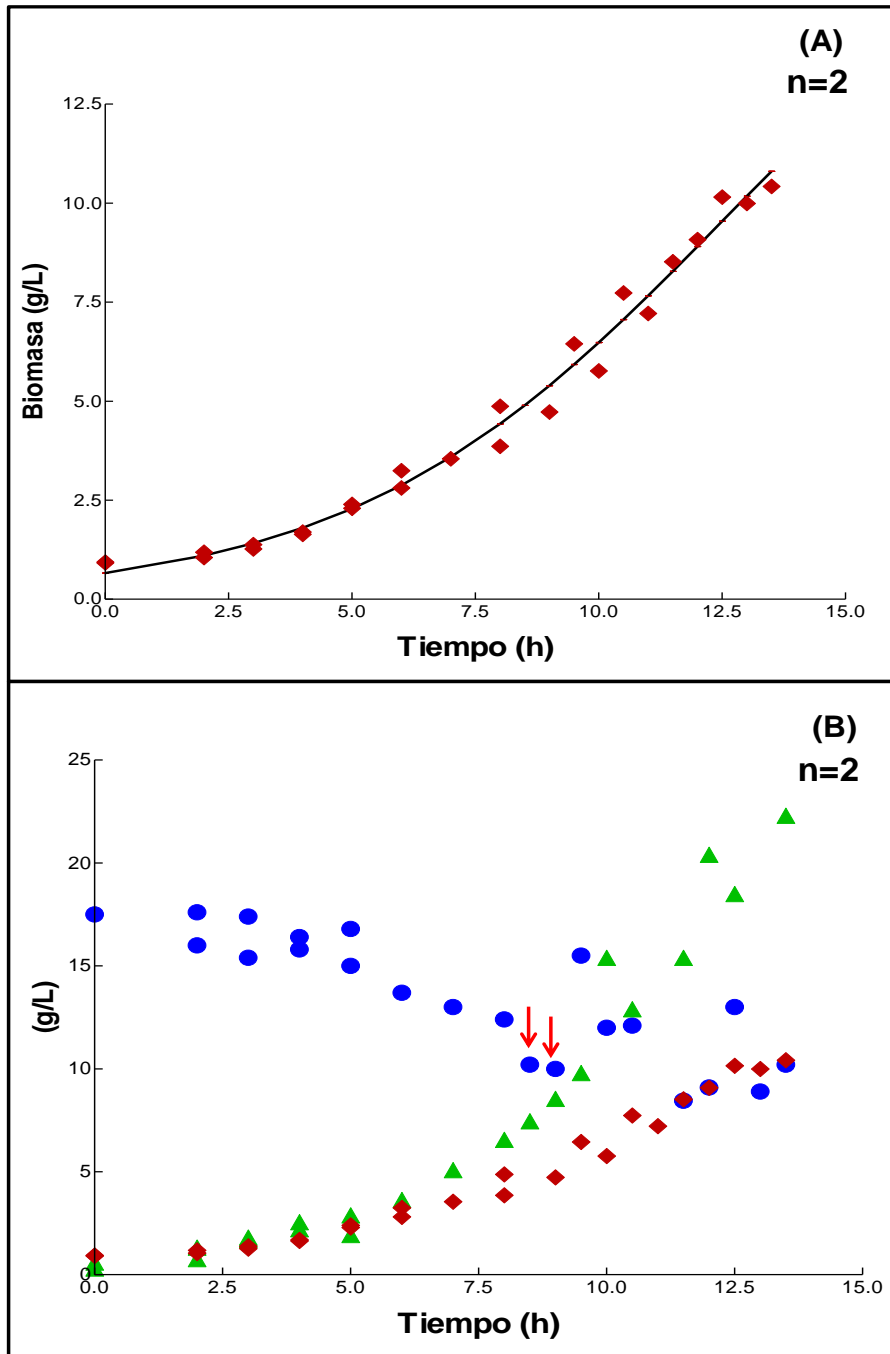


Figura 12. Cultivo por lote alimentado intermitente de *L. casei* BL23-bcmo (A) \blacklozenge Biomasa, — Ajuste al modelo logístico. (B) \blacklozenge Biomasa, \bullet Glucosa, \blacktriangle Lactato. \blacktriangledown Indica el inicio de la alimentación.

Cuadro 3. Parámetros Cinéticos en Cultivo por Lote Alimentado Intermitente.

Sección de la fermentación	Parámetro	Ajuste Logístico	R ²	Ajuste Lineal	R ²
Lote	X _{max} (g/L)	9	0.96		
	μ (h ⁻¹)	0.28	0.96		
	Y _{X/S} (g _{cel} /g _{glc})			0.514	0.78
	Y _{P/S} (g _{Lct} /g _{glc})			0.928	0.91
	Y _{P/X} (g _{Lct} /g _{cel})			1.65	0.88
Lote alimentado	X _{max} (g/L)	12.83	0.95		
	μ (h ⁻¹)	0.43	0.95		
	Y _{X/S} (g _{cel} /g _{glc})			ND	
	Y _{P/S} (g _{Lct} /g _{glc})			ND	
	Y _{P/X} (g _{Lct} /g _{cel})			2.08	0.81
	^a P _{V_{xt}} (g _{cel} /L·h)	5.52			
	^b P _{V_x} (g _{cel} /L·h)	4.38			

a: Calculada en base a la X_{max} predicha por el modelo logístico

b: Calculada en base a la X_{max} experimental

ND: No determinado

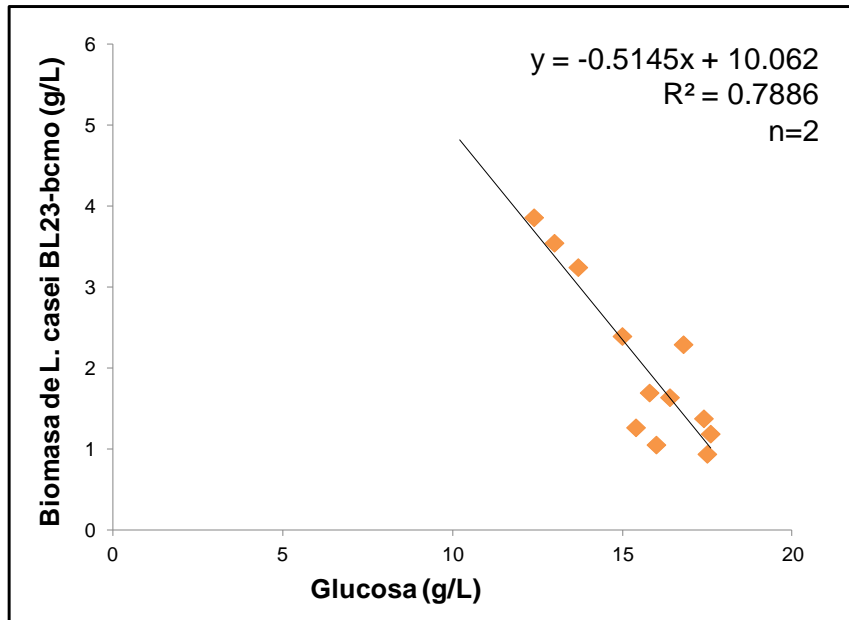


Figura 13. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{X/S}$ en el segmento de lote del cultivo por lote alimentado intermitente.

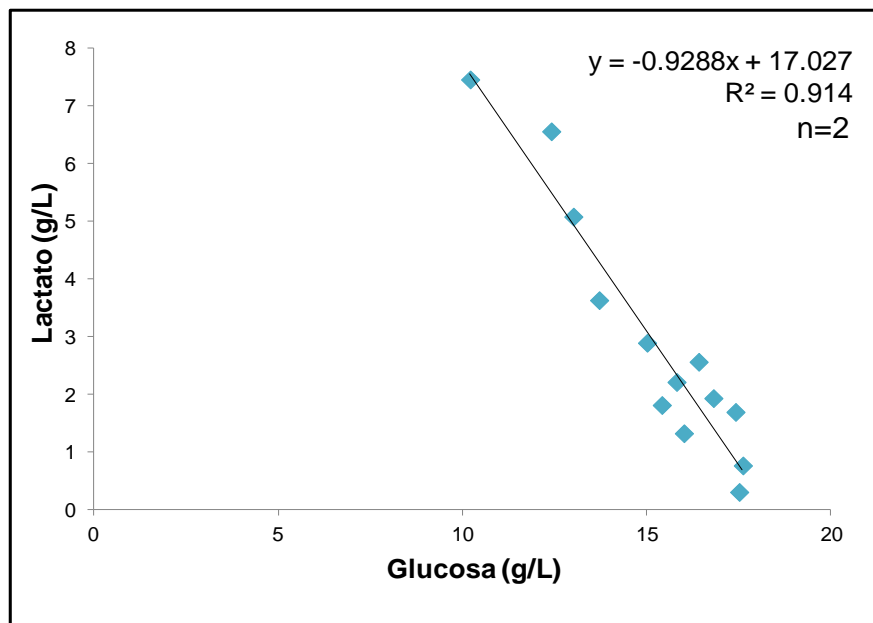


Figura 14. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/S}$ en el segmento de lote del cultivo por lote alimentado intermitente.

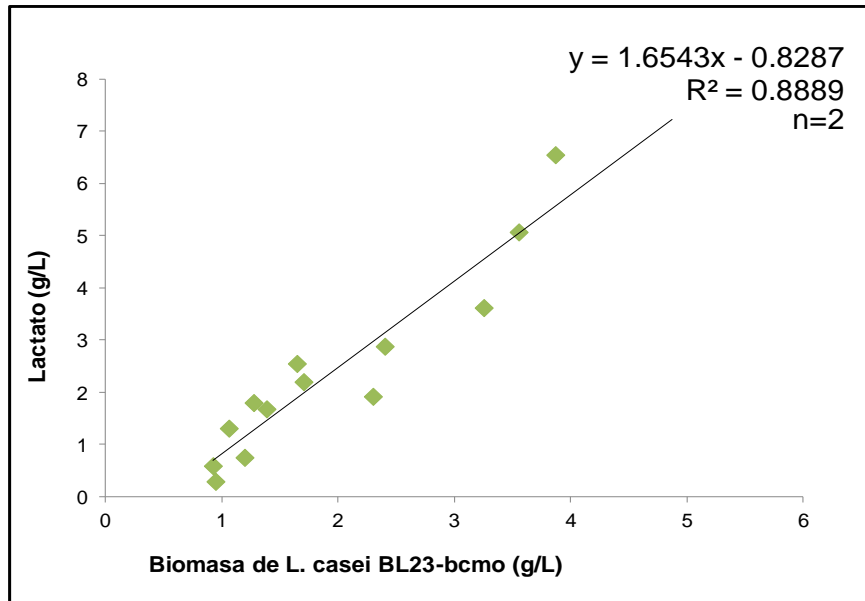


Figura 15. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/X}$ en el segmento de lote del cultivo por lote alimentado intermitente.

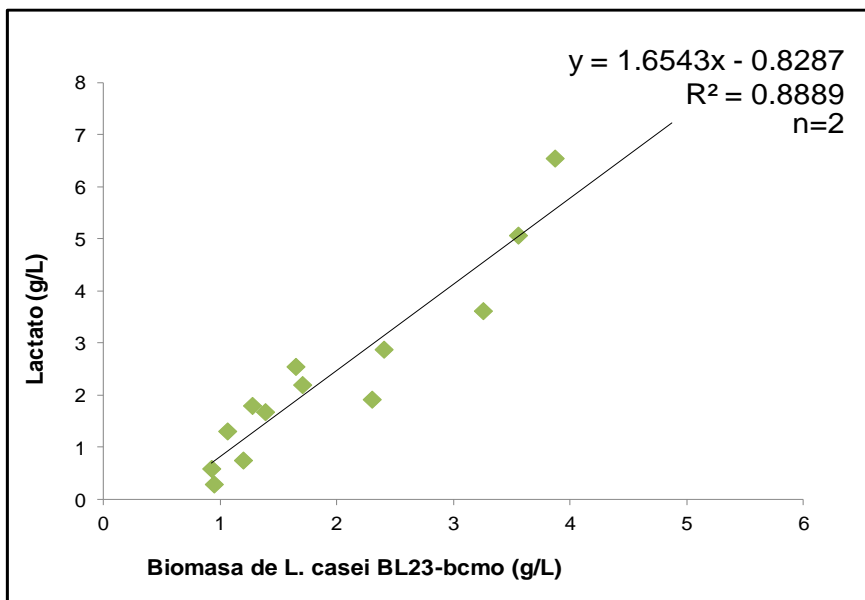


Figura 16. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/X}$ en el segmento después de iniciar la alimentación del cultivo por lote alimentado intermitente.

De la misma forma en la Figura 17(A) presenta la cinética de las fases por lote y por lote con alimentación-constante. Los parámetros cinéticos correspondientes a las fases de cultivo por lote y lote alimentado se muestran en la Cuadro 4 y las regresiones respectivas en las Fig. 18, 19, 20 y 21. La concentración máxima de biomasa predicha por el modelo logístico para el cultivo por lote y por lote alimentado son muy similares, mientras que μ y $Y_{P/X}$ se incrementaron 1.5 veces, respectivamente.

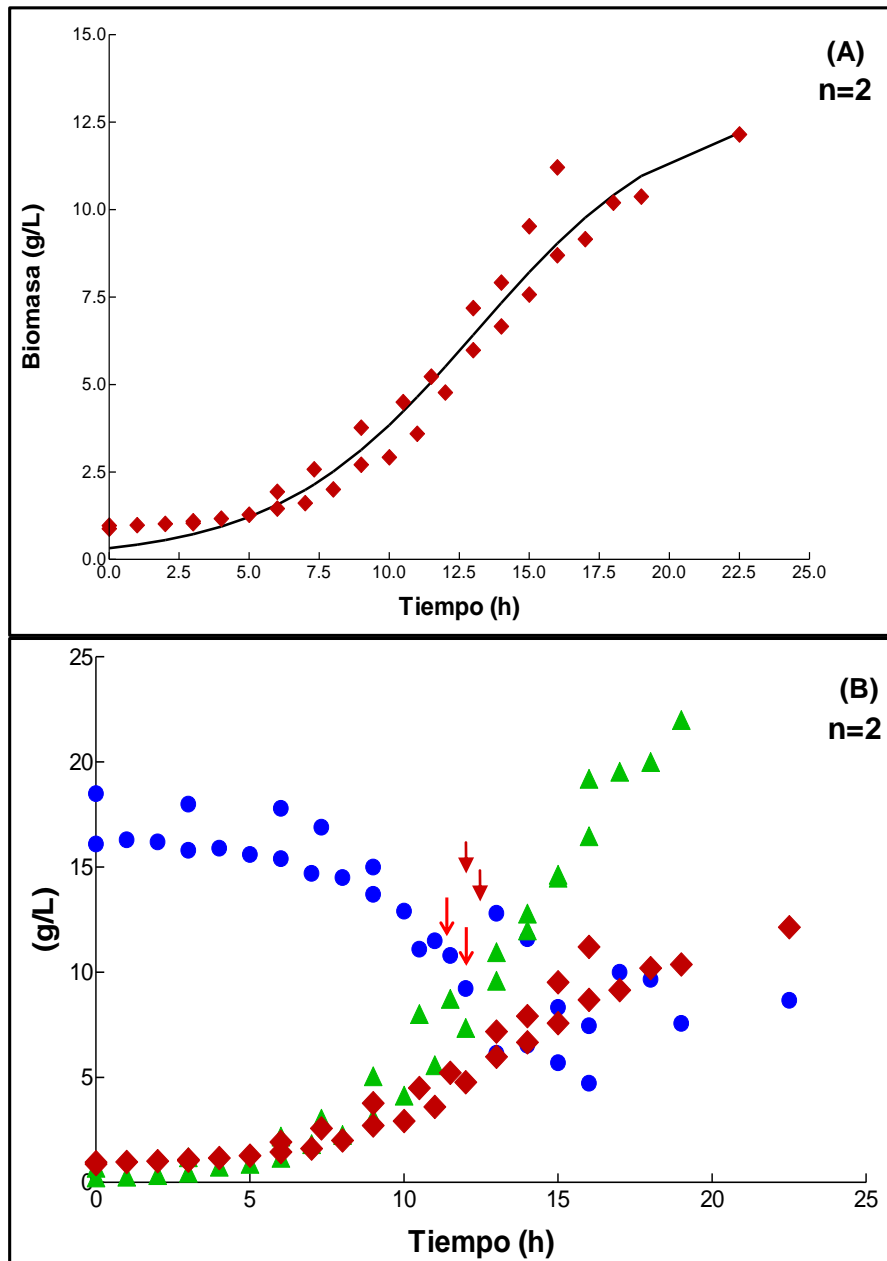


Figura 17. Cultivo por lote alimentado constante de *L. casei* BL23-bcmo (A) \blacklozenge Biomasa, — Ajuste al modelo logístico. (B) \blacklozenge Biomasa, \bullet Glucosa, \blacktriangle Lactato. \blacktriangledown Indica el inicio de la alimentación.

Cuadro 4. Parámetros Cinéticos en Cultivo por Lote Alimentado Constante.

Sección de la fermentación	Parámetro	Ajuste Logístico	R ²	Ajuste Lineal	R ²
Lote	X _{max} (g/L)	11.7	0.84		
	μ (h ⁻¹)	0.22	0.84		
	Y _{X/S} (g _{cel} /g _{glc})			0.48	0.66
	Y _{P/S} (g _{Lct} /g _{glc})			0.94	0.67
	Y _{P/X} (g _{Lct} /g _{cel})			1.93	0.97
Lote alimentado	X _{max} (g/L)	12.04	0.89		
	μ (h ⁻¹)	0.33	0.89		
	Y _{X/S} (g _{cel} /g _{glc})			ND	
	Y _{P/S} (g _{Lct} /g _{glc})			ND	
	Y _{P/X} (g _{Lct} /g _{cel})			2.11	0.91
	^a Pv _{xt} (g _{cel} /L-h)	3.97			
	^b Pv _x (g _{cel} /L-h)	3.85			

a: Calculada en base a la X_{max} predicha por el modelo logístico

b: Calculada en base a la X_{max} experimental

ND: No determinado

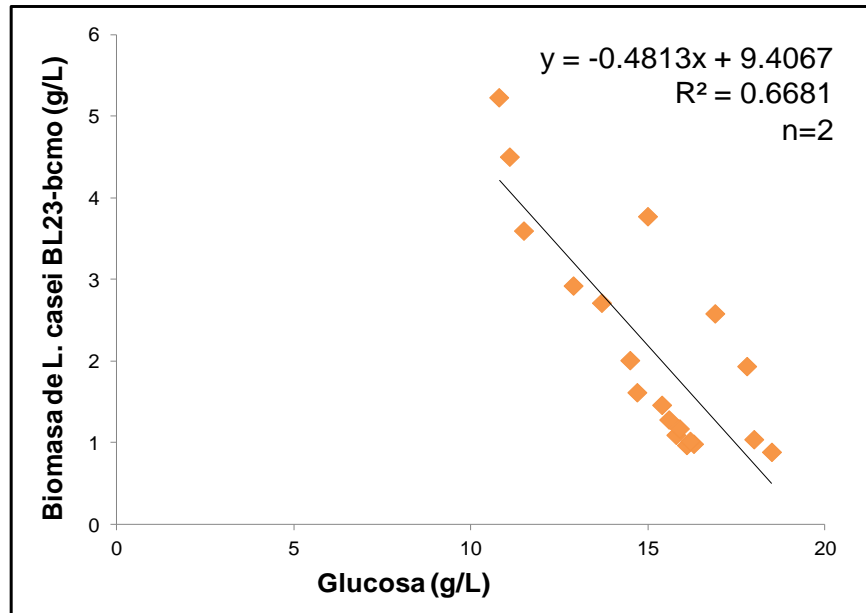


Figura 18. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{X/S}$ en el segmento de lote del cultivo por lote alimentado constante.

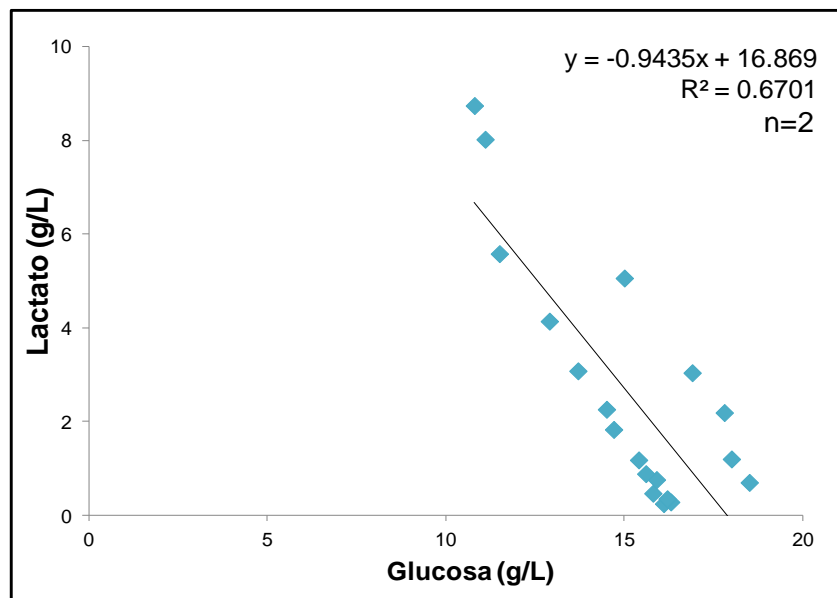


Figura 19. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/S}$ en el segmento de lote del cultivo por lote alimentado constante.

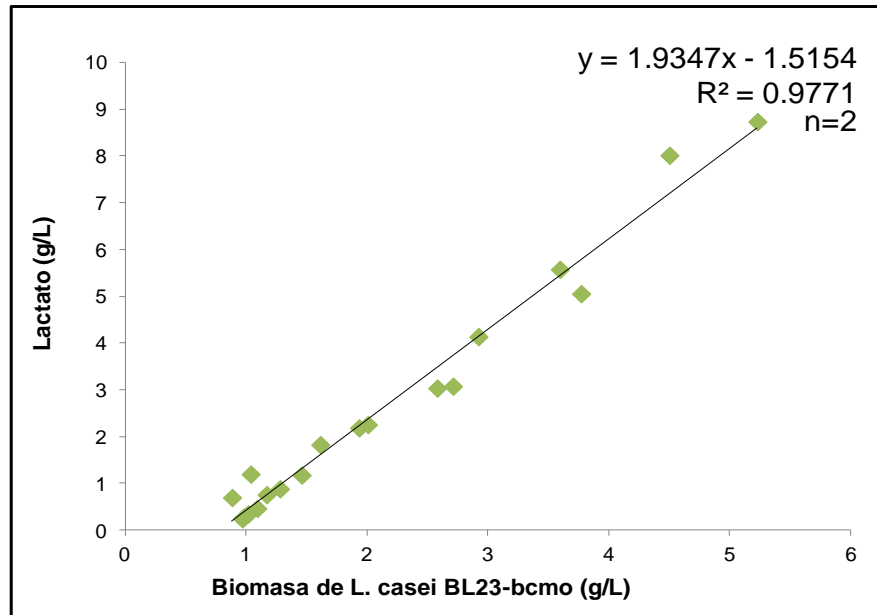


Figura 20. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/X}$ en el segmento de lote del cultivo por lote alimentado constante.

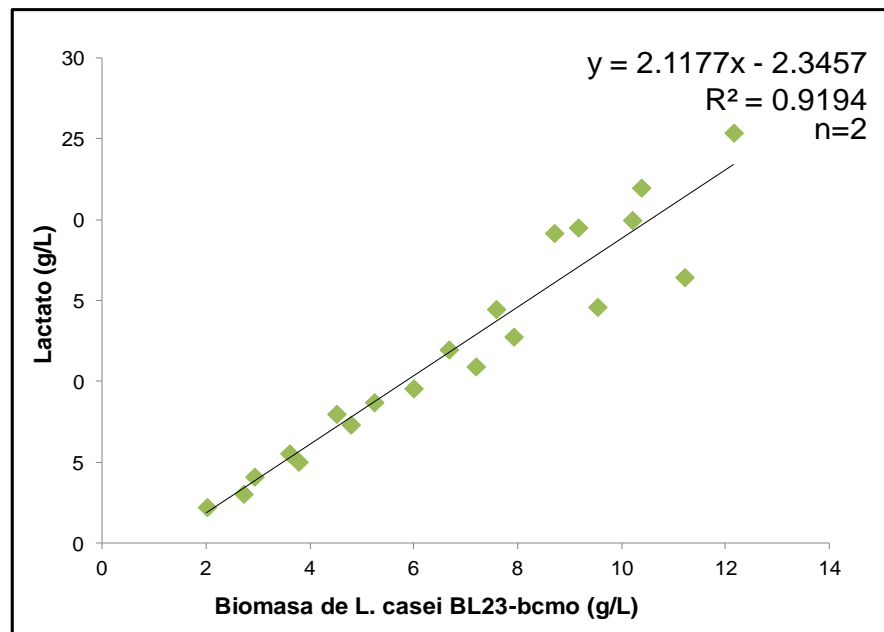


Figura 21. Ajuste a la línea recta para el cálculo de $Y_{P/X}$ en el segmento después de iniciar la alimentación del cultivo por lote alimentado constante.

En cuanto a los rendimientos se refiere, no fue posible calcular $Y_{X/S}$ y $Y_{P/S}$ para la fase con alimentación de sustrato en los dos sistemas de cultivo por lote alimentado, porque no se determinó siempre la concentración de glucosa antes y después de la alimentación para poder calcular los consumos durante la cinética (Cuadro 4).

Es importante resaltar que el microorganismo dejó de crecer cuando la concentración de lactato en el medio de fermentación fue mayor de 23 g_{Lct}/L en el reactor, aun cuando había nutrientes y el pH se mantuvo en 5.6 ± 0.2 . Lo que indica que la limitante para el proceso es la acumulación de lactato. Estos resultados concuerdan con los de Hwang (2011), quien reporta también la inhibición del crecimiento de *L. plantarum* por la producción de ácido láctico. La conversión de pirúvico en otros metabolitos es regulada por los intermediarios y por las enzimas de la glucólisis. Así, cuando las concentraciones de azúcares son elevadas y el flujo glucolítico es alto, la elevada relación NADH/NAD⁺ favorece la activación de la lactato deshidrogenasa y provoca una inhibición de la enzima gliceraldehído-3P deshidrogenasa. La inhibición de esta enzima hace que se acumulen triosas 5 fosfato que tienen un efecto alostérico negativo sobre el enzima piruvato formato liasa, lo que ocasiona que casi todo el producto final de la metabolización de azúcares sea lactato (Rico *et al.*, 2008; Viana Ballester, 2002). El lactato, producido por las bacterias ácido lácticas actúa como inhibidor de su crecimiento (Waldir *et al.*, 2007) y su velocidad de formación está asociada a la velocidad específica de crecimiento y a la densidad bacteriana, por lo que depende de ambas variables, según se describe en la ecuación de Luedeking y Prier (2000). Por lo que la inhibición por lactato no permitió incrementar más la concentración de la biomasa en el cultivo por lote alimentados. Sin embargo, es importante recalcar que el $Y_{P/X}$ promedio de los cultivos por lote y de las fases por lote de los cultivos que posteriormente fueron alimentados, fue 2.11 g_{Lct}/g_{glc}, es decir la producción de lactato por biomasa se mantuvo constante a pesar que las μ fueron diferentes (Cuadro 2, 3 y 4) por lo que el control de μ basado en la alimentación del sustrato limitante

no permitió modificar este parámetro, no obstante puesto que la μ en el cultivo por lote con alimentación intermitente fue mayor que en los otros, la productividad volumétrica de biomasa teórica de acuerdo a la X_{max} predicha con el modelo logístico, así como la calculada de acuerdo a la X_{max} alcanzada experimentalmente también fueron mayores (Cuadro 2, 3 y 4).

Otra alternativa para disminuir la formación de lactato es el uso de glicerol, que se metaboliza más lentamente y se utiliza en cultivos por lote alimentado para disminuir la producción de acetato en *Escherichia coli* (Sambrook J *et al.*, 1989). Existen reportes sobre cepas de lactobacilos que metabolizan este sustrato, pero la cepa de *L. case* BL23-bcno no fue capaz de utilizarlo (Fig. 7). Así que habría que investigar otras alternativas, el suero de leche parece tampoco ser una opción ya que la cepa creció muy poco en medio MRS adicionado con suero de leche (Datos no mostrados).

En este trabajo la X_{max} experimental obtenida en cultivo por lote fue mayor a la obtenida en otras investigaciones realizadas con diferentes lactobacilos como se muestra en la Cuadro 5. Los resultados obtenidos en el cultivo por lote con alimentación intermitente se asemejan a los de Hwang (2011), quien logra obtener 10.12 g_{cel}/L de *L. plantarum* en un cultivo por lote con alimentación intermitente de glucosa. Mientras que la X_{max} experimental obtenida en el sistema por lote con alimentación constante es mayor a la reportada por otros autores.

Es importante recalcar que el $Y_{P/X}$ promedio del cultivo por lote y las fases por lote de los cultivos que posteriormente fueron alimentados fue 2.11 g_{Lct}/g_{cel}, es decir la producción de lactato por gramo de biomasa se mantuvo constante, a pesar de que las μ fueron diferentes (Cuadro 2, 3 y 4) por lo que no se permitió el control de μ con base a la alimentación.

Cuadro 5. Concentración de biomasa máxima de distintas cepas de lactobacilos cultivadas en diferentes medios en cultivo por lote o por lote alimentado.

Autor	Microorganismo	Tipo de cultivo	Medio de fermentación	X_{\max} experimental (g _{cel} /L)
Bernárdez <i>et al.</i> , 2008	<i>L. casei</i>	Lote Alimentado	Suero de Leche	1.7
Xian <i>et al.</i> , 2010	<i>L. casei</i>	Lote	Glucosa	3.05
Aguirre <i>et al.</i> , 2010	<i>L. casei</i>	Lote Alimentado	Suero de Leche de Cabra	3.25
Hwang <i>et al.</i> , 2011	<i>L. plantarum</i>	Lote Alimentado Intermitente	Glucosa	10.12
Este trabajo	<i>L. casei</i> BL23-bcmo	Lote	MRS	8.08
Este trabajo	<i>L. casei</i> BL23-bcmo	Lote Alimentado Intermitente	MRS + glucosa	10.19
Este trabajo	<i>L. casei</i> BL23-bcmo	Lote Alimentado Constante	MRS + glucosa	11.67

4.7 Permanencia del Gen *bcmo1* en *Lactobacillus casei* BL23-*bcmo* al Final del Cultivo por Lote con Alimentación Intermitente

Puesto que *L. casei* BL23-*bcmo* presentó la μ más alta en el cultivo por lote con alimentación intermitente, fue en la biomasa obtenida en este sistema en donde se investigó si la cepa conservaba el gen *bcmo1* y se encontró que lo conservó (Figura 22). En la cepa parental *L. casei* BL23 no se observó la banda correspondiente al peso molecular del gen *bcmo 1*, lo que demuestra que no hay una amplificación inespecífica con los oligonucleótidos BCMO-F y BCMO-R. En el trabajo de Cruz Salazar (2012) se demuestra que la cepa es capaz de mantener el plásmido transgénico por 100 generaciones sin la presencia de los antibióticos (120 h). Sus resultados señalan una elevada estabilidad del plásmido en la cepa y nuestros resultados indican que las condiciones de cultivo utilizadas en el cultivo por lote con alimentación intermitente son adecuadas para la producción de biomasa que conserve el plásmido. Puesto que la μ en cultivo por lote con alimentación constante es menor, se infiere que la biomasa producida también conservará el gen.

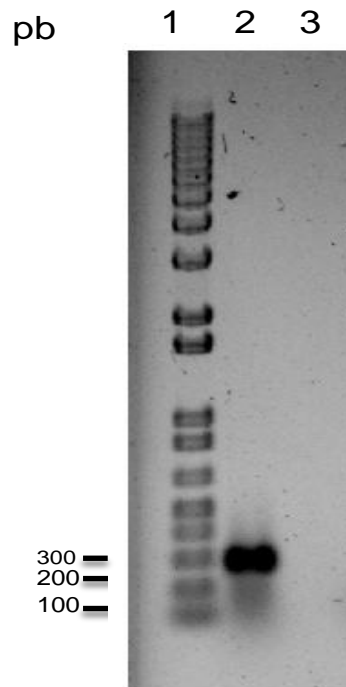


Figura 22. Amplificación por PCR del gen *bcmo1* en *L. casei* BL23-bcmo al final del cultivo por lote con alimentación intermitente. (1) Marcador molecular (2) *L. casei* BL23- bcmo carril (3) *L. casei* BL23.

V. CONCLUSIONES

Lactobacillus casei BL23-bcmo es capaz de adherirse a mucinas bovinas del rumen e intestino delgado y mantiene su capacidad de autoagregación. El empleo del cultivo por lote alimentado incrementa la concentración de biomasa y la bacteria conserva el gen que codifica para la proteína β -caroteno 15,15'-monooxigenasa al final de la fermentación, por lo que se sugiere que el sistema de cultivo por lote alimentado es una alternativa para la producción de biomasa de *L. casei* BL23-bcmo.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Acedo-Félix, E., & Pérez-Martínez, G. (2003). Significant differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393T and a commonly used plasmid-cured derivative revealed by a polyphasic study. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(1), 67-75. doi: 10.1099/ijs.0.02325-0.
- Adam, J. K., Odhav, B., & Naidu, K. (2012). Probiotics: recent understandings and biomedical applications. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 6(1), 1-14.
- Aguirre-Ezkauriatza, E., Aguilar-Yáñez, J., Ramírez-Medrano, A., & Alvarez, M. (2010). Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. *Bioresource Technology*, 101(8), 2837-2844.
- Aguirre-Ezkauriatza, E., Ramirez-Medrano, A., Aguilar-Yáñez, J., & Alvarez, M. (2009). Producción de proteína y biomasa probiótica de *Lactobacillus casei* liofilizadas a partir de suero de leche de cabra. *Revista mexicana de ingeniería química*, 8(1), 67-76.
- Bautista, C. R., Alvarez, J. A., Mosqueda, J. J., Falcon, A., Ramos, J. A., Rojas, C., *et al.* (2008). Enhancement of the mexican bovine babesiosis vaccine efficacy by using *Lactobacillus casei*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149(1), 126-130.

- Beck, H. C., Madsen, S. M., Glenting, J., Petersen, J., Israelsen, H., Norrelykke, M. R., *et al.* (2009). Proteomic analysis of cell surface-associated proteins from probiotic *Lactobacillus plantarum*. *FEMS microbiology letters*, 297(1), 61-66. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01662.x.
- Bernárdez, P. F., Amado, I. R., Castro, L. P., & Guerra, N. P. (2008). Production of a potentially probiotic culture of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CECT 4043 in whey. *International Dairy Journal*, 18(10), 1057-1065. doi: 10.1016/j.idairyj.2008.05.004.
- Bik, E. M., Eckburg, P. B., Gill, S. R., Nelson, K. E., Purdom, E. A., Francois, F., *et al.* (2006). Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 732-737. doi: 10.1073/pnas.0506655103.
- Bouchard, D. S., Rault, L., Berkova, N., Le Loir, Y., & Even, S. (2013). Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(3), 877-885. doi: 10.1128/AEM.03323-12.
- Cruz Salazar, N. (2012). *Lactobacillus casei* BL23 recombinante con el gen *b-caroteno 15-15'* monooxigenasa de *Gallus gallus*. (Tesis de Maestría), Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro, Querétaro.
- Chen, L. Z., Nguang, S. K., & Chen, X. D. (2006). *Modelling and optimization of biotechnological processes* Retrieved from http://books.google.com.mx/books?id=TjxP_8pp-mMC&pg=PA1&dq=biotechnological+process%7D&hl=es&sa=X&ei=lpaMT7WEHsmQ2QXbm52_CQ&ved=0CD8Q6AEwAw#v=onepage&q=biotechnological%20process%7D&f=true.

- Choojun, S., & Suttisuwan, R. (2011). Continuous Lactic Acid Production from Longan Juice by *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* TISTR 108. *Journal of Agricultural Science & Technology B*, 6(1b), 556-565.
- De Man, J., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*, 23(1), 130-135. doi: 10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., & Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31(6), 438-442. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x.
- Euzeby, J. P. (1997). List of bacterial names with standing in nomenclature: A folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 590-592. doi: 10.1099/00207713-47-2-590.
- Euzeby, J. P. (2014). list of prokaryotic names with standing in nomenclature. Retrieved from
- FAO/WHO. (2001). Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods derived from Biotechnology. *Rome*, 22-25.
- Faye, T., Tamburello, A., Vegarud, G., & Skeie, S. (2012). Survival of lactic acid bacteria from fermented milks in an in vitro digestion model exploiting sequential incubation in human gastric and duodenum juice. *Journal of Dairy Science*, 95(2), 558-566. doi: 10.3168/jds.2011-4705.
- Fidge, N. H., Smith, F. R., & Goodman, D. W. S. (1969). Vitamin A and carotenoids. The enzymic conversion of β -carotene into retinal in hog intestinal mucosa. *Biochemical Journal*, 114(4), 689.

- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology*, 66, 365-378.
- Garrido, D., Suau, A., Pochart, P., Cruchet, S., & Gotteland, M. (2005). Modulation of the fecal microbiota by the intake of a *Lactobacillus johnsonii* La1-containing product in human volunteers. *FEMS microbiology letters*, 248(2), 249-256.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Springer, New York, Berlin, Heidelberg. doi: 10.1007/bergeysoutline200405.
- Goodman, D. S., Huang, H. S., Kanai, M., & Shiratori, T. (1967). The enzymatic conversion of all-trans β -carotene into retinal. *Journal of Biological Chemistry*, 242(15), 3543-3554.
- Goodman, D. W. S., Huang, H. S., & Shiratori, T. (1965). Tissue distribution and metabolism of newly absorbed vitamin A in the rat. *Journal of lipid research*, 6(3), 390-396.
- Guillén-Navarro, G., Márquez-Rocha, F., & Sanchez-Vázquez, J. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología*, 15, 302-306.
- Gutiérrez, S. B., Izaguirre, O. M., Meneses, V. C., & Miyasaka, A. S. (2006). La pigmentación amarilla del tejido adiposo de bovinos finalizados en pastoreo y su relación con su concentración de carotenoides y el perfil de ácidos grasos. *Técnica Pecuaria en México*, 44(002).
- Hazebrouck, S., Pothelune, L., Azevedo, V., Corthier, G., Wal, J.-M., & Langella, P. (2007). Efficient production and secretion of bovine β -lactoglobulin by

Lactobacillus casei. *Microbial Cell Factories*, 6(1), 12. doi: 10.1186/1475-2859-6-12.

Hernández Bustos, C. I. (2003). *Crecimiento y formación de productos en cultivos aeróbicos y anaeróbicos de Bacillus subtilis con glucosa, xilosa y celobiosa*. (Tesis de Licenciatura), Instituto Tecnológico de Zacatepec, Zacatepec Mor.

Hofmann, K., Finn, F. M., Friesen, H.-J., Diaconescu, C., & Zahn, H. (1977). Biotinylinsulins as potential tools for receptor studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(7), 2697-2700.

Hoskins, L. C., & Boulding, E. T. (1981). Mucin degradation in human colon ecosystems: evidence for the existence and role of bacterial subpopulations producing glycosidases as extracellular enzymes. *Journal of Clinical Investigation*, 67(1), 163–172. doi: 10.1172/JCI110009.

Hwang, C. F., Chen, J. N., Huang, Y. T., & Mao, Z. Y. (2011). Biomass production of *Lactobacillus plantarum* LP02 isolated from infant feces with potential cholesterol-lowering ability. *African Journal of Biotechnology*, 10(36), 7010-7020.

Iñiguez-Palomares, C., Pérez-Morales, R., & Acedo-Félix, E. (2007). Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 49(3-4), 46-54.

Kajikawa, A., & Igimi, S. (2009). Reduction of tumor necrosis factor alpha-inducing capacity of recombinant *Lactobacillus casei* via expression of *Salmonella* OmpC. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), 2727-2734. doi: 10.1128/AEM.01916-08.

- Kleerebezem, M., & Vaughan, E. E. (2009). Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. *Annual Review of Microbiology*, 63, 269-290. doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073341.
- Kwok, L., Stapleton, A. E., Stamm, W. E., Hillier, S. L., Wobbe, C. L., & Gupta, K. (2006). Adherence of *Lactobacillus crispatus* to vaginal epithelial cells from women with or without a history of recurrent urinary tract infection. *The Journal of Urology*, 176(5), 2050-2054.
- Lietz, G., Lange, J., & Rimbach, G. (2010). Molecular and dietary regulation of β , β -carotene 15, 15'-monooxygenase 1 (BCMO1). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 502(1), 8-16. doi: 10.1016/j.abb.2010.06.032.
- Matsuo, K., Ota, H., Akamatsu, T., Sugiyama, A., & Katsuyama, T. (1997). Histochemistry of the surface mucous gel layer of the human colon. *Gut*, 40(6), 782-789. doi: 10.1136/gut.40.6.782.
- Maze, A., Boel, G., Zuñiga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra, M. J., et al. (2010). Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *Journal of Bacteriology*, 192(10), 2647-2648. doi: 10.1128/JB.00076-10.
- Mora Izaguirre, O., Romano, J. L., González, E., Ruiz, F. J., & Shimada, A. (1999). *In vitro* and *in situ* disappearance of β -carotene and lutein from lucerne (*Medicago sativa*) hay in bovine and caprine ruminal fluids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(2), 273-276. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(199902)79:2<273::AID-JSFA191>3.0.CO;2-V.

- Mora Izaguirre, O., & Shimada Miyasaka, A. (2001). Causas del color amarillo de la grasa de canales de bovinos finalizados en pastoreo. *Veterinaria México*, 32(001).
- Muñoz-Provencio, D., Llopis, M., Antolín, M., De Torres, I., Guarner, F., Pérez-Martínez, G., et al. (2009). Adhesion properties of *Lactobacillus casei* strains to resected intestinal fragments and components of the extracellular matrix. *Archives of microbiology*, 191(2), 153-161. doi: 10.1007/s00203-008-0436-9.
- Muñoz-Provencio, D., Pérez-Martínez, G., & Monedero, V. (2010). Characterization of a fibronectin-binding protein from *Lactobacillus casei* BL23. *Journal of Applied Microbiology*, 108(3), 1050-1059. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04508.x.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P. V., Shortt, C., & Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*, 9(1), 43-52.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 279-289.
- Panya, M., Lulitanond, V., Tangphatsornruang, S., Namwat, W., Wannasutta, R., Suebwongsa, N., et al. (2012). Sequencing and analysis of three plasmids from *Lactobacillus casei* TISTR1341 and development of plasmid-derived *Escherichia coli*-*L. casei* shuttle vectors. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 93(1), 261-272. doi: 10.1007/s00253-011-3503-0.
- Rico, J., Yebra, M. J., Pérez-Martínez, G., Deutscher, J., & Monedero, V. (2008). Analysis of *ldh* genes in *Lactobacillus casei* BL23: role on lactic

acid production. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(6), 579-586. doi: 10.1007/s10295-008-0319-8.

Rochat, T., Bermúdez-Humarán, L., Gratadoux, J.-J., Fourage, C., Hoebler, C., Corthier, G., *et al.* (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microbial Cell Factories*, 6, 1-10. doi: 10.1186/1475-2859-6-22.

Rodrigues, L., Moldes, A., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal*, 28(2), 109-116.

Rojo, R. G., Chavolla, E. T., Flores-Tena, F. J., Guerrero-Barrera, A. L., Avelar-González, F. J., Ramírez-López, E. M., *et al.* (2007). Confirmation of presumptive *Salmonella* colonies contaminated with *Proteus* swarming using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 49(1-2), 19-24.

SAGARPA. (2010). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera SAGARPA: Base de datos pecuario 2000-2009 en línea. Consultado: Septiembre-Noviembre.

Sambrook J, Fritsch EF, & T, M. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez, B., Bressollier, P., & Urdaci, M. C. (2008). Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 54(1), 1-17. doi: 10.1111/j.1574-695X.2008.00454.x.

- Sánchez, B., Schmitter, J.-M., & Urdaci, M. C. (2009). Identification of novel proteins secreted by *Lactobacillus plantarum* that bind to mucin and fibronectin. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 17(3), 158-162. doi: 10.1159/000233579.
- Sarabia-Sainz, A.-i., Ramos-Clamont, G., Candia-Plata, M. M. d. C., & Vázquez-Moreno, L. (2009). Biorecognition of Escherichia coli K88 adhesin for glycosylated porcine albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 44(2), 175-181. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2008.11.009.
- Tannock, G., Munro, K., Harmsen, H., Welling, G., Smart, J., & Gopal, P. (2000). Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2578-2588. doi: 10.1128/AEM.66.6.2578-2588.2000.
- Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., & Chen, W. (2013). Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*. doi: 10.3168/jds.2013-6547.
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press.
- Van Tassel, M. L., & Miller, M. J. (2011). *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, 3(5), 613-636. doi: 10.3390/nu3050613.
- Vasile, A., Paraschiv, D., Dima, S., & Bahrim, G. (2011). Growth and cell viability improve of the probiotic strain *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei* in the presence of oat bran and buckwheat flour. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 9, 52-59.

- Velez, M. P., De Keersmaecker, S. C., & Vanderleyden, J. (2007). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*, 276(2), 140-148. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00908.x.
- Vernile, A., Giammanco, G., Spano, G., Beresford, T. P., Fox, P. F., & Massa, S. (2008). Genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from traditional pecorino siciliano cheese. *Dairy Science & Technology (EDP Sciences)*, 88(6), 619-629. doi: 10.1051/dst:2008009.
- Viana Ballester, R. (2002). *Caracterización de elementos clave en la regulación del catabolismo de azúcares en Lactobacillus casei*. (Tesis de Doctorado), Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos Valencia, España.
- Waldir, E., Rychtera, M., & Melzoch, K. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista Peruana de Biología*, 14(2), 271-276.
- Wyss, A., Wirtz, G. M., Woggon, W. D., Brugger, R., Wyss, M., Friedlein, A., et al. (2001). Expression pattern and localization of β , β -carotene 15, 15'-dioxygenase in different tissues. *Biochemical Journal*, 354(Pt 3), 521.
- Xiang-Yang, G., Jian, Y., Hao, Q., & Wei-Guo, Z. (2011). Improvement of l-lactic acid production by osmotic-tolerant mutant of *Lactobacillus casei* at high temperature. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 89(1), 73-78. doi: 10.1007/s00253-010-2868-9.