

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación de la resistencia de *Bacillus subtilis* a los procesos de liofilización y horneado para establecer su aplicación en la industria de alimentos

Trabajo de graduación presentado por Nicole Zuástegui Garzaro para optar al grado académico de Ingeniero Químico

Guatemala,

2025



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ingeniería



Evaluación de la resistencia de *Bacillus subtilis* a los procesos de liofilización y horneado para establecer su aplicación en la industria de alimentos

Trabajo de graduación presentado por Nicole Zuástegui Garzaro para optar al grado académico de Ingeniero Químico

Guatemala,

2025

**Vo. Bo.**

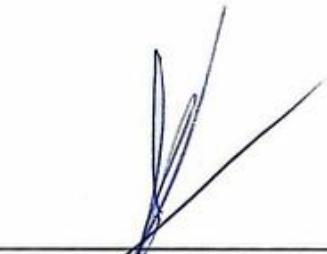
(f) 

**Ing. Luis Ernesto Núñez González**

**Terna examinadora**

(f) 

**Ing. Luis Ernesto Núñez González**

(f) 

**Ing. Gamaliel Giovanni Zambrano Ruano**

(f) 

**Ing. Carmen Alicia Ortiz Pineda**

**Fecha de aprobación: Guatemala, 07 de enero de 2025**

## PREFACIO

El presente trabajo de graduación marca la culminación de un largo y desafiante recorrido académico, uno que no habría sido posible sin el apoyo y la colaboración de muchas personas. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad del Valle de Guatemala, por proporcionarme una formación integral y brindarme las herramientas necesarias para desarrollar este proyecto.

De manera especial, agradezco a mi asesor el Ingeniero Luis Núñez, cuya guía, paciencia y valiosos conocimientos fueron fundamentales para la realización de este trabajo. Sus orientaciones me ayudaron a superar obstáculos y alcanzar los objetivos propuestos.

A mis amigos, gracias por su constante apoyo, palabras de aliento y por ser parte de los momentos compartidos que hicieron esta experiencia única. Su compañía fue invaluable durante este proceso.

Finalmente, pero no menos importante, a mi familia, quien ha sido mi principal pilar de fortaleza. Su amor, comprensión y confianza incondicional me impulsaron a seguir adelante en cada momento. Este logro también es de ustedes.

A todos, gracias por ser parte de este viaje.

# CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES .....	3
III.	JUSTIFICACIÓN.....	6
IV.	OBJETIVOS.....	7
A.	GENERAL .....	7
B.	ESPECÍFICOS .....	7
V.	MARCO TEÓRICO .....	8
VI.	METODOLOGÍA.....	33
VII.	RESULTADOS .....	46
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	52
IX.	CONCLUSIONES.....	58
X.	RECOMENDACIONES .....	59
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	60
XII.	APÉNDICE .....	66
A.	DATOS DE PLACA .....	66
B.	DATOS ORIGINALES .....	73
C.	CÁLCULO DE MUESTRA.....	85
D.	DATOS CALCULADOS .....	93
E.	ANÁLISIS DE ERROR.....	111
F.	PRUEBAS DE LA EXPERIMENTACIÓN .....	113
XIII.	GLOSARIO .....	124

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Cuantificación UFC/mL antes y después del proceso de liofilización de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	46
<b>Cuadro 2.</b> Modelo cinético de la curva de muerte promedio de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) según el triplicado de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L.....	49
<b>Cuadro 3.</b> Modelo cinético de la curva de muerte promedio de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) según el triplicado de las pruebas de horneado de galletas con biomasa .....	51
<b>Cuadro 4.</b> Datos de placa de la campana de extracción de gases.....	66
<b>Cuadro 5.</b> Datos de placa de la balanza analítica.....	66
<b>Cuadro 6.</b> Datos de placa del agitador magnético con calentamiento .....	66
<b>Cuadro 7.</b> Datos de placa del autoclave.....	67
<b>Cuadro 8.</b> Datos de placa de la incubadora .....	67
<b>Cuadro 9.</b> Datos de placa del shaker.....	68
<b>Cuadro 10.</b> Datos de placa del biorreactor .....	68
<b>Cuadro 11.</b> Datos de placa de la centrífuga de 1000 mL .....	69
<b>Cuadro 12.</b> Datos de placa de la centrífuga de 400 mL .....	69
<b>Cuadro 13.</b> Datos de placa del liofilizador.....	69
<b>Cuadro 14.</b> Datos de placa del horno de convección por gravedad.....	70
<b>Cuadro 15.</b> Datos de placa del horno de convección por gravedad.....	71
<b>Cuadro 16.</b> Datos de placa del horno eléctrico .....	71
<b>Cuadro 17.</b> Datos de placa del refrigerador.....	71
<b>Cuadro 18.</b> Datos de placa del vortex.....	71
<b>Cuadro 19.</b> Datos de placa del microscopio .....	72
<b>Cuadro 20.</b> Datos de placa de la cámara de Neubauer.....	72
<b>Cuadro 21.</b> Cuantificación UFC antes y después del proceso de liofilización de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	73
<b>Cuadro 22.</b> Determinación de peso seco del cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	73
<b>Cuadro 23.</b> Primer liofilizado obtenido de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	73
<b>Cuadro 24.</b> Segundo liofilizado obtenido de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	74
<b>Cuadro 25.</b> Biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) obtenida con el crecimiento de 2 L para las pruebas horneadas.....	76

<b>Cuadro 26.</b> Biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) obtenida con el crecimiento de 2 L para las pruebas horneadas.....	76
<b>Cuadro 27.</b> Cuantificación en triplicado de la biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) obtenida con el crecimiento de 2 L para las pruebas horneadas.....	77
<b>Cuadro 28.</b> Concentración de la biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) obtenida con el crecimiento de 2 L para las pruebas horneadas .....	77
<b>Cuadro 29.</b> Primera corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	78
<b>Cuadro 30.</b> Segunda corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	79
<b>Cuadro 31.</b> Tercera corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	80
<b>Cuadro 32.</b> Masa de galletas para incorporar <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) .....	81
<b>Cuadro 33.</b> Primera corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	81
<b>Cuadro 34.</b> Segunda corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	82
<b>Cuadro 35.</b> Tercera corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	83
<b>Cuadro 36.</b> Factor de dilución para los cálculos de la determinación de la concentración de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	93
<b>Cuadro 37.</b> Concentración antes y después del proceso de liofilización de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) .....	93
<b>Cuadro 38.</b> Concentración del liofilizado de 10 L de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	94
<b>Cuadro 39.</b> Concentración del medio de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) obtenido con el crecimiento de 2 L para las pruebas horneadas.....	95
<b>Cuadro 40.</b> Concentraciones de la primera corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	95
<b>Cuadro 41.</b> Segunda corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	96
<b>Cuadro 42.</b> Tercera corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	97
<b>Cuadro 43.</b> Promedio del triplicado de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) .....	99

<b>Cuadro 44.</b> Biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) que se incorpora a la masa de galletas para tener 1 x 10 <sup>6</sup> UFC/g.....	100
<b>Cuadro 45.</b> Primera corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	101
<b>Cuadro 46.</b> Segunda corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	102
<b>Cuadro 47.</b> Tercera corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	104
<b>Cuadro 48.</b> Promedio del triplicado de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	105

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Comparación de la cuantificación UFC/mL antes y después del proceso de liofilización de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	47
<b>Figura 2.</b> Curva de muerte promedio de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) según el triplicado de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L.....	48
<b>Figura 3.</b> Curva de muerte promedio de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) según el triplicado de las pruebas de horneado de galletas con biomasa.....	50
<b>Figura 4.</b> Curva de muerte de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) en la primera corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L.....	96
<b>Figura 5.</b> Curva de muerte de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) en la segunda corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L.....	97
<b>Figura 6.</b> Curva de muerte de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) en la tercera corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L.....	98
<b>Figura 7.</b> Curva de muerte promedio de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) según el triplicado de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L.....	100
<b>Figura 8.</b> Curva de muerte de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) en la primera corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa.....	102
<b>Figura 9.</b> Curva de muerte de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) en la segunda corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa.....	103
<b>Figura 10.</b> Curva de muerte de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) en la tercera corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa.....	105
<b>Figura 11.</b> Curva de muerte promedio de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774) según el triplicado de las pruebas de horneado de galletas con biomasa.....	106
<b>Figura 12.</b> Balance de masa del proceso del crecimiento a tercera escala de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	107
<b>Figura 13.</b> Balance de masa del proceso de liofilización de la biomasa recuperada de los 10 L del medio de cultivo con <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	108
<b>Figura 14.</b> Balance de masa del proceso de horneado de las muestras de 2 mL del medio de cultivo de 2 L con <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	109
<b>Figura 15.</b> Balance de masa del proceso de horneado de galletas con biomasa de <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC11774).....	110

## LISTA DE ECUACIONES

<b>Ecuación 1.</b> Velocidad de reacción en base a la masa de un fluido .....	15
<b>Ecuación 2.</b> Velocidad de reacción en base a la masa de un sólido .....	15
<b>Ecuación 3.</b> Velocidad de reacción es base a la superficie de interfase de un sistema de dos fluidos o un sistema gas-sólido.....	15
<b>Ecuación 4.</b> Velocidad de reacción en base al volumen de un sólido .....	16
<b>Ecuación 5.</b> Velocidad de reacción en base al volumen del reactor.....	16
<b>Ecuación 6.</b> Velocidad de reacción del reactivo A en una reacción de una sola fase.....	16
<b>Ecuación 7.</b> Relación entre las velocidades de reacción de todos los compuestos.....	16
<b>Ecuación 8.</b> Velocidad de reacción tomando en cuenta la influencia de la temperatura .....	17
<b>Ecuación 9.</b> Velocidad de desaparición del reactivo A.....	18
<b>Ecuación 10.</b> Velocidad de reacción en la que intervienen distintas sustancias.....	18
<b>Ecuación 11.</b> Velocidad de reacción método diferencial .....	19
<b>Ecuación 12.</b> Logaritmo de la velocidad de reacción método diferencial.....	19
<b>Ecuación 13.</b> Concentración células/mL en cámara Petroff-Hauser.....	21
<b>Ecuación 14.</b> Concentración células/mL en cámara Neubauer .....	22
<b>Ecuación 15.</b> Concentración UFC/mL en recuento de viable sen placa.....	23
<b>Ecuación 16.</b> Factor de dilución.....	85
<b>Ecuación 17.</b> Cambio de concentración .....	86
<b>Ecuación 18.</b> Porcentaje de reducción de viabilidad.....	86
<b>Ecuación 19.</b> Concentración en UFC/g.....	87
<b>Ecuación 20.</b> Cantidad de liofilizado obtenido .....	87
<b>Ecuación 21.</b> Cantidad de liofilizado por galleta.....	88
<b>Ecuación 22.</b> Cantidad de liofilizado por receta de galletas .....	88
<b>Ecuación 23.</b> Volumen del medio de cultivo.....	89
<b>Ecuación 24.</b> Concentración total en el medio de cultivo .....	90
<b>Ecuación 25.</b> Cantidad de biomasa por galleta .....	90
<b>Ecuación 26.</b> Cantidad de biomasa por receta de galletas .....	90
<b>Ecuación 27.</b> Derivada de la velocidad de la reacción elemental.....	91
<b>Ecuación 28.</b> Integral de la velocidad de reacción .....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

1. ATCC: American Type Culture Collection, es un grupo de material biológico de referencia, certificado.
2. SLPM: litros por minuto estándar.
3. UFC/g: unidades formadoras de colonia por gramo.
4. UFC/mL: unidades formadoras de colonia por mililitro.
5. UFC: unidades formadoras de colonia.

## RESUMEN

En el presente trabajo de graduación se analizó la viabilidad de desarrollar una galleta como alimento funcional incorporando *Bacillus subtilis* (ATCC11774) como probiótico. Se evaluó la posibilidad de liofilizar el microorganismo cultivado, comparando las concentraciones antes y después del proceso, lo que permitió determinar el rendimiento de la población viable luego de reconstituir el producto liofilizado. Además, se evaluó la resistencia del medio de cultivo de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) a un proceso de horneado, para analizar la viabilidad de su uso en procedimiento con altas temperaturas y la dependencia del rendimiento bacteriano con el tiempo horneado. Asimismo, se comprobó la resistencia de la biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) aplicada a una galleta durante un proceso de horneado. Para la cuantificación de la población promedio de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), se utilizó la técnica de unidades formadoras de colonia, en agar nutritivo sólido. La concentración inicial tras el crecimiento de la cepa fue de  $5.084 \times 10^8 \pm 2.396 \times 10^7$  UFC/mL, disminuyendo a  $5.669 \times 10^7 \pm 8.118 \times 10^6$  UFC/mL, luego del proceso de liofilización. lo que refleja una pérdida de viabilidad del  $88.884 \pm 1.096$  %. En las pruebas de horneado del medio de cultivo de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), se determinó un promedio de los resultados que se muestran en una curva de muerte donde se presenta un modelo exponencial que se ajusta a los resultados con un  $R^2 = 0.9858$ . A los 15 minutos de horneado, tiempo reportado como aceptable para la producción de galletas de mantequilla, la concentración fue de  $2.667 \times 10^5$  UFC/mL con desviación de  $1.528 \times 10^4$  UFC/mL, partiendo de una concentración inicial de  $8.567 \times 10^5 \pm 2.082 \times 10^4$  UFC/mL, se tuvo una reducción en su viabilidad de  $68.872 \pm 18.740$  %. En las pruebas de horneado de las galletas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), se mostró también una curva de muerte promedio, donde se presentó un modelo exponencial que se ajusta a los resultados con un  $R^2 = 0.9354$ , un comportamiento que evidencia menor exactitud en la predicción del modelo que el que se tiene para medio líquido, al ser afectado por la matriz alimentaria. La concentración obtenida en el minuto 15 de horneo de  $6.933 \times 10^5$  UFC/mL con desviación de  $1.528 \times 10^4$  UFC/mL. Al iniciar con una concentración de  $1.747 \times 10^6 \pm 1.021 \times 10^5$  UFC/mL, el porcentaje de reducción de su viabilidad de  $60.305 \pm 6.483$  %. Si bien la concentración final de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) no alcanzó el mínimo requerido de  $10^6$  UFC/g para considerarse un alimento probiótico, una fracción significativa de la población sobrevivió al proceso térmico. Esto sugiere que, aunque la galleta no pueda ser etiquetada como un probiótico, aún puede ser considerada un alimento funcional con potencial beneficio para salud, contribuyendo al consumo de bacterias viables que podrían favorecer la microbiota intestinal.

## ABSTRACT

In the following study, the feasibility of developing a cookie as a functional food by incorporating *Bacillus subtilis* (ATCC11774) as a probiotic was analyzed. The possibility of freeze-drying the cultures microorganism was evaluated by comparing concentrations before and after the process, which allowed determining the yield of the viable population after reconstituting the lyophilized product. Additionally, the resistance of the *Bacillus subtilis* (ATCC11774) culture medium to a baking process was tested to determine the viability of its use in processes involving high temperatures and the dependence of bacterial yield on baking time. Furthermore, the resistance of *Bacillus subtilis* (ATCC11774) biomass applied to a cookie during a baking process was also examined. The Colony Forming Unit (CFU) technique on solid nutrient agar was used to quantify the average population of *Bacillus subtilis* (ATCC11774). The initial concentration after the growth of the strain was  $5.084 \times 10^8 \pm 2.396 \times 10^7$  CFU/mL, decreasing to  $5.669 \times 10^7 \pm 8.118 \times 10^6$  CFU/mL after the freeze-drying process, reflecting a viability loss of  $88.884 \pm 1.096$  %. In the baking tests of the *Bacillus subtilis* (ATCC11774) culture medium, an average of the results was determined, showing a death curve that follows an exponential model that fits the results with an  $R^2 = 0.9858$ . After 15 minutes of baking, the time reported as acceptable for producing butter cookies, the concentration was  $2.667 \times 10^5$  CFU/mL with a deviation of  $1.528 \times 10^4$  CFU/mL, starting from an initial concentration of  $8.567 \times 10^5 \pm 2.082 \times 10^4$  CFU/mL, resulting in a viability reduction of  $68.872 \pm 18.740$  %. In the baking tests of cookies with *Bacillus subtilis* (ATCC11774) biomass, an average death curve was also observed, showing an exponential model fitting the results with an  $R^2 = 0.9354$ . This behavior indicates lower model prediction accuracy than in the liquid medium, as it is affected by the food matrix. The concentration obtained after 15 minutes of baking was  $6.933 \times 10^5$  CFU/mL with a deviation of  $1.528 \times 10^4$  CFU/mL. Starting from a concentration of  $1.747 \times 10^6 \pm 1.021 \times 10^5$  CFU/mL, the viability reduction percentage was  $60.305 \pm 6.483$  %. Although the final concentration of *Bacillus subtilis* (ATCC11774) does not reach the required minimum of  $10^6$  CFU/g to be considered a probiotic food, a significant fraction of the population survives the thermal process. This suggests that, although the cookie cannot be labeled as a probiotic, it can still be considered a functional food with potential health benefits, contributing to the consumption of viable bacteria that could favor the intestinal microbiota.

# I. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que, al ser consumidos en cantidades adecuadas, brindan beneficios para la salud del huésped, especialmente en el aparato digestivo. Principalmente, se incluyen especies como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque también se utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunos tipos de *E. coli* y *Bacillus*, que ayudan a equilibrar el microbiota intestinal, mejorar la digestión y proteger contra otros microorganismos dañinos (WGO, 2011). Los probióticos pueden ser incorporados en la fórmula de distintos productos, como alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos. Al agregarse a una matriz alimenticia, estos productos pertenecen a la categoría de alimentos funcionales, los cuales no solo aportan valor nutritivo, sino que también mejoran la salud y reducen el riesgo de enfermedades. Estos alimentos pueden ser naturales o modificados, con componentes añadidos, incrementados o eliminados para potenciar sus efectos. Los alimentos funcionales de estado natural son aquellos que aportan vitaminas, minerales, fibra, antioxidantes, ácidos grasos esenciales, entre otros. Y están los alimentos probióticos y prebióticos, como en el caso de los lácteos (Sanitas, s. f.).

Se menciona la importancia de que las cepas de microorganismos probióticos deben estar vivas en el alimento durante todo el período de conservación, por lo mismo también pueden estar en forma liofilizada para mantenerse mejor (Codex Alimentarius, 2018). La liofilización es un proceso de secado que utiliza congelación y sublimación bajo condiciones de vacío, permitiendo la eliminación del agua sin alterar la composición del producto a tratar. Es ideal para alimentos y materiales biológicos, como bacterias y células, ya que mantiene sus enlaces moleculares intactos, por lo que se conserva su sabor, textura y nutrientes. Es un proceso muy utilizado para la conservación de materia prima a largo plazo. Por lo mismo es un método bastante útil para añadir los probióticos a los alimentos, pues permite deshidratar las bacterias sin dañar su viabilidad, asegurando que permanezcan activos al ser rehidratados en el producto (Barnalab, 2018).

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva que forma esporas, lo que le permite tolerar condiciones ambientales extremas como altas temperaturas, baja acidez y elevada compresión. Esta capacidad lo hace ideal como probiótico en alimentos que pasan por procesos térmicos, como horneado (Villanueva, 2015). Al llegar al intestino, las esporas germinan y actúan beneficiosamente en el microbiota, favoreciendo la inmunidad y reduciendo microorganismos dañinos como *E. coli* y *Salmonella*. Además, los *Bacillus subtilis* han demostrado gran potencial para mejorar la salud inmunológica y retrasar el envejecimiento celular, según estudios recientes (Ospat, 2022). Asimismo, en la Universidad de Veterinaria, Animales y Pesquerías de Karnataka, se evaluó la variante de la cepa *Bacillus subtilis* (ATCC 11774) por su potencial probiótico

y su actividad antagonista contra patógenos bacterianos de peces y humanos. Al final del estudio, esta especie reveló una actividad antimicrobiana y antibiótica significativa contra patógenos, lo que refuerza su potencial como alternativa a los antibióticos en la acuicultura y la industria alimentaria.

De acuerdo con algunos autores de la Universidad Nacional de Colombia, los alimentos pueden considerarse probióticos si contienen concentraciones entre  $10^6$  y  $10^{11}$  UFC/mL, durante el tiempo de vida útil de los microorganismos (MARIN et al., 2009). Para comprobar la efectividad de los alimentos probióticos, es esencial cuantificar la viabilidad de las células bacterianas. Se puede utilizar el recuento de viables en placa, que es un método indirecto para cuantificar únicamente las células vivas. Este procedimiento implica sembrar diluciones de la muestra, de la suspensión bacteriana, en placas petri con medio de cultivo sólido. Las células viables forman colonias visibles tras la incubación y el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) se calcula en función del número de colonias, el factor de dilución y el volumen sembrado. Por otro lado, el recuento en cámara de Neubauer es un método directo que permite contar el número total de células presentes en una muestra. En este método se cuenta el número de células en una sección de la cámara y se calcula la concentración celular multiplicando por un factor de dilución. Ambos métodos son clave para evaluar la viabilidad celular en los alimentos probióticos y garantizar su eficacia (Hernández, 2022).

## II. ANTECEDENTES

En la Universidad Federal de Río Grande del Sur, de Brasil, se investigaron las propiedades probióticas in vitro de varias cepas de *Bacillus subtilis* disponibles en formulaciones probióticas, con el objetivo de evaluar su potencial para promover el equilibrio del microbiota intestinal y generar beneficios para la salud del huésped. Se examinaron diversas características, incluyendo el espectro antimicrobiano, donde las cepas CHR01 y FTC01 mostraron eficacia contra las bacterias grampositivas y especies de *Aspergillus*, aunque solo *Aeromonas hydrophila* fue inhibida entre las Gramnegativas. Además, se midió la actividad antioxidante, siendo más alta en las cepas KM01 y FTC01. Se observó una variabilidad significativa en la adhesión a hidrocarburos y en las propiedades de autoagregación entre las cepas probadas, con rangos de 2.2 a 56.4 % y de 4.4 y 52.9 %, respectivamente. La mayoría de las cepas demostraron tolerancia a las sales biliares y al pH ácido, aunque las cepas FPR02 y CHR01 fueron sensibles a la bilis de buey. Las cepas FTC01 y CP01 mostraron una supervivencia superior al 90 % a pH 2. Ninguna de las cepas mostró una reacción hemolítica positiva. Finalmente, se evaluó la producción de surfactina, con la cepa FPR01 destacándose por su alta producción independientemente del sustrato utilizado. Estos resultados subrayan la importancia de una selección cuidadosa de cepas de *Bacillus subtilis* para aplicaciones específicas en formulaciones probióticas (Ritter et. al, 2018).

En la Universidad ORT Uruguay se investigó la liofilización como método para la preservación a largo plazo de microorganismos, aspecto esencial en muchas industrias, destacando la pureza, identidad y estabilidad del material biológico almacenado. Este proyecto surgió de la necesidad de la empresa Laboratorios Microsules de conservar su cepario bacteriano mediante liofilización. Se formuló y liofilizó tres cepas bacterianas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Bacillus anthracis*, utilizando un liofilizador a nivel de laboratorio. Se probaron diversos lioprotectores: leche descremada, sacarosa, una combinación de leche descremada con glicerol y una combinación de leche descremada con sacarosa. Los parámetros evaluados incluyeron la estructura física del producto final, el efecto del paso de congelado en la liofilización, la viabilidad celular después del proceso de liofilización y la viabilidad luego de una prueba de estabilidad acelerada, durante 5 días a 37 °C. Se observó que el uso de mezclas de lioprotectores permitía alcanzar mayores porcentajes de recuperación celular en las cepas estudiadas. Finalmente, se proporcionó a la empresa interesada un protocolo de liofilización para la conservación de microorganismos a largo plazo (Grauer et, al. 2015).

En la Universidad de Veterinaria, Animales y Pesquerías de Karnataka, de Mangalore, India, se evaluó el potencial probiótico de *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103), *Bacillus subtilis* (ATCC 11774) y *Saccharomyces cerevisiae* (PS 42571-1) con actividad antagonista contra patógenos bacterianos de peces y humanos. Las bacterias seleccionadas se caracterizaron in vitro, utilizando caldo DeMan Rogosa y Sharpe (MRS) como medio para el cultivo de los lactobacillus a 37 °C durante 48 horas, caldo Luria Bertani (LB) para el cultivo de *Bacillus* a 37 °C durante 12 horas y para la levadura, agar dextrosa sabouraud (SDA) a 28 °C durante 12 horas, utilizando una incubadora con agitador a 100 rpm. Los resultados indicaron que los probióticos seleccionados mostraron una tolerancia positiva a pH alterado, NaCl y sales biliares, además de revelar actividades antimicrobianas y antibióticas notables contra patógenos humanos y de peces. Asimismo, se demostró que las cepas no son patógenas para el huésped *Pangasianodon hypophthalmus*, lo que justifica un estudio adicional para aplicarlos como aditivos alimentarios. Se destaca entonces su potencial como probióticos que pueden ser aplicados como una alternativa a los antibióticos en la acuicultura y otras industrias alimentarias (Srinivasa et. al., 2023).

En la Universidad de Cartagena, para optar al título de Químico Farmacéutico, Meza realizó su trabajo de grado acerca del diseño y formulación de productos probióticos. Analizó el concepto de “probiótico” y destacó las especies de bacterias *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como otras especies de hongos de la familia *Saccharomyces*, que son las más utilizadas como probióticos. Históricamente, estos microorganismos se han administrado a través de alimentos lácteos fermentados, como yogur, queso y bebidas de suero. Sin embargo, en la actualidad también se encuentran en diversos alimentos como zumos de frutas, cereales y productos a base de vegetales. Además de su inclusión en alimentos, los probióticos se administran como suplementos y productos medicinales. Aunque presentan beneficios, estos microorganismos son susceptibles a condiciones gastrointestinales y de almacenamiento, lo cual se ha abordado mediante la microencapsulación. Este proceso permite la protección y liberación controlada de los probióticos. La revisión recopilada presenta los avances recientes en el diseño y producción de productos probióticos, incluyendo alimentos, suplementos y medicamentos (Espitia, 2022).

De acuerdo con los autores Marin, Cortés y Montoya (2009), de la Universidad Nacional de Colombia, los alimentos pueden considerarse probióticos si contienen concentraciones entre  $10^6$  y  $10^{11}$  UFC/mL, durante el tiempo de vida útil de los microorganismos. Es importante que la concentración se mantenga estable hasta el final del período de consumo recomendado, para garantizar la efectividad del producto. Esta concentración varía en función de varios factores, como el tipo de probiótico utilizado, la matriz alimenticia a la que se agregan y las condiciones de operación y almacenamiento. Todo esto está regulado por normativas específicas según la región, aunque también se mencionan organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la

Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de Gastroenterología (WGO). Estas establecen los niveles mínimos de viabilidad de los microorganismos para que un producto se considere probiótico y exigen pruebas rigurosas que demuestren su impacto positivo en la salud del consumidor (Codex Alimentarius, 2018) (WGO, 2011).

### III. JUSTIFICACIÓN

La creciente demanda de alimentos funcionales, impulsada por la preocupación por la salud y el bienestar, ha fomentado el interés en los probióticos debido a sus beneficios para la salud, especialmente en el sistema gastrointestinal. Tradicionalmente, los probióticos han sido incorporados en productos lácteos y suplementos, pero el mercado exige alternativas que se adapten a diversos hábitos alimenticios y preferencias. En respuesta, la industria alimentaria busca innovar y ofrecer productos funcionales que mantengan una ventaja competitiva (Bahena, 2023).

Dentro de este contexto, compuestos bioactivos como los probióticos, que van más allá de simplemente proporcionar nutrientes, están ganando terreno, respaldados por evidencia científica que avala sus beneficios para la salud. La tendencia hacia una alimentación consciente y la idea de "comida como medicina" continúan impulsando su popularidad (Tech, 2022). El uso de *Bacillus subtilis* como probiótico se destaca, no solo por su capacidad de resistir las condiciones presentes en procesos industriales, incluyendo cambios de temperatura, sino también por lo que eso conlleva, que tiene un gran potencial de mantener su viabilidad a largo plazo en productos alimentarios. Esto lo convierte en una opción atractiva en el diseño de alimentos funcionales (Villanueva, 2015).

El mercado global de alimentos funcionales está experimentando un crecimiento significativo, con proyecciones que indican un tamaño de mercado de USD 212.85 mil millones para 2028, con una tasa de crecimiento anual del 2.71 % desde 2023 (Mordor Intelligence, 2022). A pesar del crecimiento de la industria de estos alimentos, no existen estudios que demuestren la incorporación exitosa de *Bacillus subtilis* como agente probiótico en galletas, el *snack* más consumido a nivel mundial, con un consumo promedio de 5.6 kg de galletas por persona en el año 2023 (Statista, 2024). Por lo tanto, el presente trabajo de investigación analiza el cambio en la población viable de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) bajo condiciones de procesamiento, más que el desarrollo de una galleta probiótica en sí. Se evaluó la viabilidad del microorganismo tras el proceso de liofilización, comparando las concentraciones antes y después del tratamiento para cuantificar la pérdida poblacional. Posteriormente, se analizó su resistencia a temperaturas elevadas durante el horneado y se determinó la relación entre el tiempo de exposición al calor y la supervivencia de *Bacillus subtilis* cuando se incorporó en la fórmula de la galleta. Con ello, se buscó aportar evidencia científica sobre la estabilidad del microorganismo en condiciones industriales, contrastando con la percepción del mercado respecto a la efectividad de los productos probióticos disponibles.

## IV. OBJETIVOS

### **A. General**

Evaluar la resistencia de *Bacillus subtilis* a procesos de liofilización y horneado, comparando al rendimiento de población de células vivas, para establecer su aplicación en la industria de alimentos

### **B. Específicos**

Cuantificar la cantidad de *Bacillus subtilis* activas de un cultivo estándar inicial y posteriormente a un proceso de liofilización, utilizando la técnica de unidades formadoras de colonia para determinar el rendimiento de población viable luego de reconstituir el producto liofilizado.

Comprobar la resistencia de *Bacillus subtilis* en un proceso de horneado, para determinar la viabilidad de su uso en procesos con altas temperaturas y encontrar la dependencia del rendimiento con el tiempo horneado.

Comprobar la resistencia de *Bacillus subtilis* aplicada a una galleta en un proceso de horneado, para determinar la viabilidad de su uso en procesos con altas temperaturas y encontrar la dependencia del rendimiento con el tiempo horneado.

## V. MARCO TEÓRICO

### A. Probióticos

A principios del siglo XX, Henry Tissier descubrió que las bifidobacterias en el tracto intestinal de los bebés alimentados con leche materna traían muchos beneficios para cuidar la microflora intestinal. Luego, Metchnikoff, un microbiólogo ruso, identificó que las bacterias ácido-lácticas eran capaces de reducir la cantidad de toxinas producidas por las bacterias intestinales y promover la longevidad. Y a partir de eso desarrolló una dieta con leche fermentada con la bacteria que denominó *Bulgarian Bacillus*. Aquí es donde nace el estudio de los probióticos, pero no es hasta 1954 donde se utiliza por primera vez el término. Vergio habló de los efectos negativos que los antibióticos causaban en el microbiota intestinal y estableció que a los que influyera positivamente se le podría llamar “probiótico”. En 1965 los investigadores Lilley y Stiwell adoptan el término y los definen como factores de origen microbiano que estimulan la proliferación de otros microorganismos (Floratil, 2021).

Los probióticos son microorganismos vivos, principalmente bacterias, que pueden ser agregados en la fórmula de distintos productos, como alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos. Las especies más utilizadas son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque también se incluye la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunos tipos de *E. coli* y *Bacillus* (WGO, 2011). Estos actúan principalmente en el aparato digestivo, donde pueden afectar el microbiota. El microbiota es un conjunto de microorganismos vivos que colonizan la piel y las mucosas principalmente del intestino grueso. Cuando una persona consume suficientes probióticos, estos le ayudan a proteger el aparato digestivo de microorganismos nocivos, mejorar la digestión y la función intestinal. Además de proporcionar otros beneficios a la salud (Valera, 2022).

Cada grupo de especies contiene distintas bacterias con sus respectivas funciones y por tanto, efectos específicos. Sin embargo, en general, los probióticos son utilizados para prevenir diarrea, ya sea de causa infecciosa o por tratamiento, también para prevención y tratamiento del síndrome de colon irritable o de estreñimiento, para tratar cólicos del lactante o prevenir resfriados. A menudo, los microorganismos se asocian a enfermedades, aunque lo cierto es que en el cuerpo humano habitan más de 2,000 especies de bacterias que desempeñan papeles muy importantes en el funcionamiento de la digestión. Es por esto que, generalmente, el consumo de probióticos no tiene efectos adversos en personas sanas, y cuando si se tiene no es de nivel preocupante (Normon, 2019).

A diferencia de los probióticos, los prebióticos no son seres vivos, son hidratos de carbono complejos que nuestro cuerpo no puede digerir, como la fibra. Son sustancias de la dieta que se utilizan para nutrir a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino, favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas sobre las nocivas. Se encuentran de forma natural en muchas frutas, verduras, cereales y en suplementos dietéticos como la inulina. Ahora, existen combinaciones de probióticos y prebióticos, y se conocen como simbióticos, que ejercen ambos efectos (Normon, 2019).

## **B. Alimento funcional**

El concepto nació en los años 80 en Japón, cuando sus autoridades sanitarias se dieron cuenta que, para minimizar los gastos generados por la esperanza de vida de la población, tenían que mejorar la calidad de vida. De esta manera se introdujo el concepto de alimentos que mejoran la salud y reducen el riesgo de contraer enfermedades crónicas. De todas las definiciones que existen, se destaca lo más importante: un alimento funcional es aquel que además de su valor nutritivo, contiene componentes biológicamente activos que cumplen una función específica y aportan beneficios a la salud del consumidor. Con base en esto, un alimento de este tipo puede ser natural, ya sea que se la haya agregado, incrementado o eliminado algún componente (Beltrán, 2016). Los alimentos funcionales de estado natural son aquellos que aportan vitaminas, minerales, fibra, antioxidantes, ácidos grasos esenciales, entre otros. También los conocidos alimentos probióticos y prebióticos se consideran funcionales, como en el caso de los lácteos (Sanitas, s. f.).

El yogur es un alimento funcional ya que contiene diferentes tipos de bacterias lácticas, que no solo le aportan sus características principales como el sabor y textura, sino también le aporta los nutrientes necesarios. Al ser un alimento probiótico, tiene microorganismos vivos que influyen beneficiosamente al organismo humano, especialmente sobre la flora intestinal y el balance del sistema digestivo. Es uno de los métodos más sencillos, seguros y naturales para mantener el equilibrio microbiano. Lo que ha hecho a este alimento muy importante y de primera necesidad para niños, mujeres y ancianos. Los principales cultivos lácteos presentes en el producto son *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, considerados bacterias acidolácticas (Puleva, s. f.).

## **C. *Bacillus Subtilis***

**Imagen 1.** *Bacillus subtilis*.



(Bionity, 2023).

*Bacillus Subtilis* es una bacteria aeróbica, grampositiva y termófila, comúnmente encontrada en el suelo, agua, aire y materia vegetal en descomposición. Es por esto por lo que la bacteria tiene la habilidad de formar esporas, una pared gruesa que rodea su ADN y estructuras celulares internas, que le permite tolerar condiciones ambientales extremas. Es de ahí donde sale su fama por ser una bacteria termófila (iNaturalist, s. f.). Esta propiedad le confiere una ventaja mayor al utilizarse como probiótico en el procesamiento de alimentos procesados que incluyen temperaturas elevadas como en el horneado. No solo puede sobrevivir a choques térmicos, sino también a pH bajo, elevada compresión, alta acidez, elevada actividad de agua, alto contenido de azúcares y rayos UV. Lo que destaca que puede ser incorporado en cualquier etapa de un proceso productivo industrial de pan, galletas y otros productos (Villanueva, 2015).

La particularidad que tienen los *Bacillus subtilis* de formar estas esporas también las convierte de cierta forma en células en reposo que, al llegar al intestino del consumidor, germinan dando lugar a la bacteria viva para proteger al hospedador. Esto hace que también sea muy fácil incorporar la bacteria a cualquier tipo de alimento o bebida, y así conseguir con un consumo regular, los efectos beneficiosos (Ospat, 2022). Asimismo, resulta ser un excelente agente de control biológico de enfermedades causadas por hongos de duelo y bacterias (ControlBio, 2015). Algunas otras de las enfermedades que ayuda combatir este probiótico son: meningitis postraumática, otitis, mastoiditis, celulitis, neumonía, endocarditis, infección ventricular, entre otras (Fundacion iO, 2022). Dado que el *B. subtilis* es robusto y crece con rapidez, convierte fácilmente los sustratos orgánicos en productos biotecnológicos. Por ello se utiliza en producción de vitamina B2, B5, como espesante y humectante en industrias alimenticias y cosmética (Bionity, 2023).

Otra de las características relevantes del *B. subtilis* es su acción en la estabilidad del microbiota intestinal al disminuir la presencia de *E. Coli*, *Salmonelas* y *coccidias*, favoreciendo el incremento de microorganismos benéficos y la inmunidad (Medina-Saavedra et. al, 2017). Un estudio realizado en la Universidad Nacional de Rosario reveló que los probióticos *B. subtilis*, que han sido consumido durante miles de años en países asiáticos, como Japón, tienen además de su efecto beneficioso sobre el sistema inmune, la propiedad de retardar el envejecimiento y prolongar la vida humana por medio de la colonización del intestino. Esto resalta que el *Bacillus subtilis* protege contra las dos causas de muerte más comunes, las enfermedades y el envejecimiento de las células, tejidos y órganos. Los científicos lograron comprobar que la bacteria era capaz de retardar el envejecimiento de las neuronas y tenía el mismo efecto sobre el ser humano completo, no solo sobre un tipo de célula. Esto se debe a que los genes de este probiótico están implicados directamente en regular los genes del hospedador que llevan al aumento de la longevidad (Ospat, 2022).

## D. Biorreactores

Los biorreactores o fermentadores industriales son equipos esenciales en una amplia gama de industrias, desempeñando un papel fundamental en la producción a gran escala. Un biorreactor es un contenedor diseñado para alojar microorganismos, células o biomasa, proporcionando un entorno controlado en cuanto a pH, temperatura y velocidad de agitación, lo que permite su crecimiento y multiplicación. Estos dispositivos facilitan la obtención de productos de alta calidad y la realización de procesos biotecnológicos con mayor eficiencia, en sectores como farmacéutica, alimentos, química y ambiental. Existen distintos tipos de biorreactores según su aplicación:

1. Biorreactores de tanque agitado: permiten la mezcla constante de los componentes dentro del tanque. Se utilizan tanto en la producción de productos químicos, como en la fermentación de microorganismos para productos farmacéuticos y alimenticios. Entre sus ventajas se encuentran el control preciso de condiciones de reacción y su escalabilidad. Sin embargo, si pueden tener algunos desafíos en términos de homogeneidad y consumo energético.
2. Biorreactores de membrana: utilizan membranas semipermeables para separar y concentrar productos. Son empleados en aplicaciones de separación y concentración en las industrias alimentaria y química. Entre sus beneficios destacan la obtención de productos puros y la capacidad de recuperar productos valiosos. Se puede limitar por la obstrucción de las membranas, por lo que sugiere mantenimiento constante.
3. Biorreactores de lecho fijo: son ideales para cuando se requiere un soporte sólido para el crecimiento de microorganismos. Su operación implica el flujo de sustratos a través del lecho de partículas sólidas, facilitando la interacción con microorganismos inmovilizados. Tienen aplicaciones en la producción de enzimas, tratamiento de aguas residuales, entre otros. Sus ventajas incluyen la estabilidad del sistema, aunque puede presentar problemas en la transferencia de masa.
4. Biorreactores de lecho fluidizado: funcionan mediante el flujo de gas o líquido a través de partículas sólidas, creando un lecho que se comporta como un flujo. Son comunes en aplicaciones de biotecnología y química. Se caracteriza por tener una alta transferencia de masa, lo que mejora su eficiencia. Algunos factores clave son la selección del tamaño de partícula y la densidad del lecho.
5. Biorreactores anaerobios: operan sin oxígeno y se utilizan para descomponer materia orgánica. Se destacan en el tratamiento de aguas residuales y la producción de biogás, lo que ayuda a la sostenibilidad ambiental. Tienen sensibilidad a fluctuaciones en la alimentación y pueden producir subproductos no deseados.

(Acura, 2024).

## E. Medio de cultivo

Un medio de cultivo microbiano es una mezcla de sustancias que se utiliza a nivel laboratorio para promover y sustentar el crecimiento de microorganismos como bacterias, virus y hongos, aunque también se utilizan para el crecimiento de células o tejidos. Estos contienen nutrientes, fuentes de energía, factores promotores del crecimiento, minerales, metales, sales amortiguadoras y gelificantes (para los medios sólidos).

Se puede mostrar como una superficie sólida, semisólida o como una solución líquida con nutrientes y condiciones favorables para el crecimiento. Asimismo, se necesita controlar la presencia o no de oxígeno y el grado de humedad. Como cultivos sólidos, generalmente se usa agar como agente gelificante, ya que no reacciona con otros compuestos químicos y la mayoría de los microorganismos no son capaces de degradarlo.

Los medios de cultivo se clasifican:

1. Según su consistencia
  - Sólido: contiene agar a concentración 1.5 a 2 %
  - Semisólido: contiene agar hasta un 0.5 %
  - Líquido: es un caldo sin agentes gelificantes
2. Según su función
  - Medio general
  - Medio selectivo
  - Medio diferencial: donde se permite identificar una especie de otra
  - Medio de enriquecimiento: se utiliza para conseguir la proliferación de la máxima variedad de microorganismos
  - Medio mínimo: contiene la mínima cantidad de nutrientes necesarios para el crecimiento de una especie
  - Medio de transporte: como almacenamiento temporal
3. Según su origen
  - Natural
  - Sintético
  - Semisintético
4. Según su formulación
  - Químicamente definidos: se conoce la cantidad exacta de cada compuesto en el medio
  - Complejos: se realizan a partir de extractos naturales

(Rovira, 2023).

## F. Crecimiento de especie

El crecimiento de *Bacillus subtilis* se condiciona por la cantidad de sustratos esenciales como fuentes de carbono y nitrógeno. Cuando estos se limitan, los bacilos se estresan y esporulan siendo definitivos como fuentes de carbono la glucosa, sacarosa, harina de maíz y almidón; fuentes de nitrógeno, la peptona, polvo de levadura, NH<sub>4</sub>Cl, KNO<sub>3</sub>; y sales minerales: MgSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CaCO<sub>3</sub> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Castañeda y Sánchez, 2016). Asimismo, *Bacillus subtilis* es mesofílico y tiene un rango de temperatura de crecimiento de 30 a 39 °C. Puede crecer hasta a 56 °C (Ridgeway, 2013).

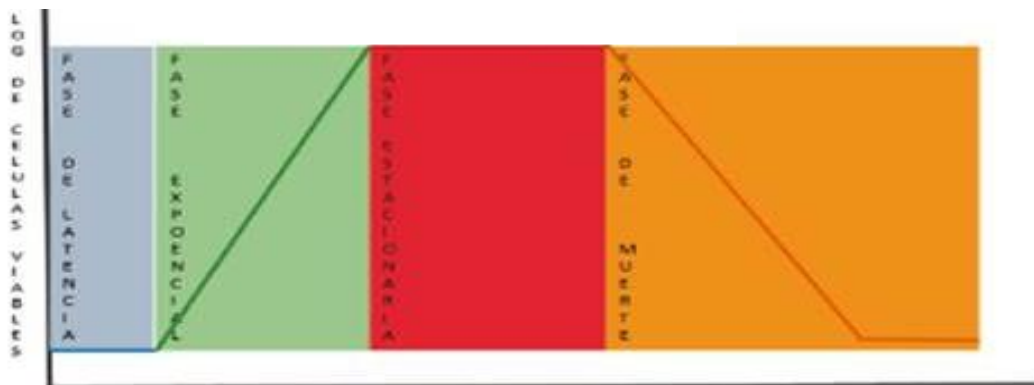
## G. Curvas de crecimiento

En el crecimiento de poblaciones en un medio líquido, se pueden identificar 4 fases de la evolución de la bacteria:

1. Fase de adaptación: las bacterias adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales y los nutrientes para iniciar su crecimiento.
2. Fase exponencial: tanto la velocidad de crecimiento como el consumo de nutrientes son máximos.
3. Fase estacionaria: No se incrementa el número de bacterias y estas presentan un metabolismo diferente al de la fase exponencial. Se observa acumulación y liberación de metabolitos secundarios que tienen importancia en el curso de infecciones e intoxicaciones. Esta fase sucede porque se agotan algunos nutrientes esenciales en el medio.
4. Fase de muerte: se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo.

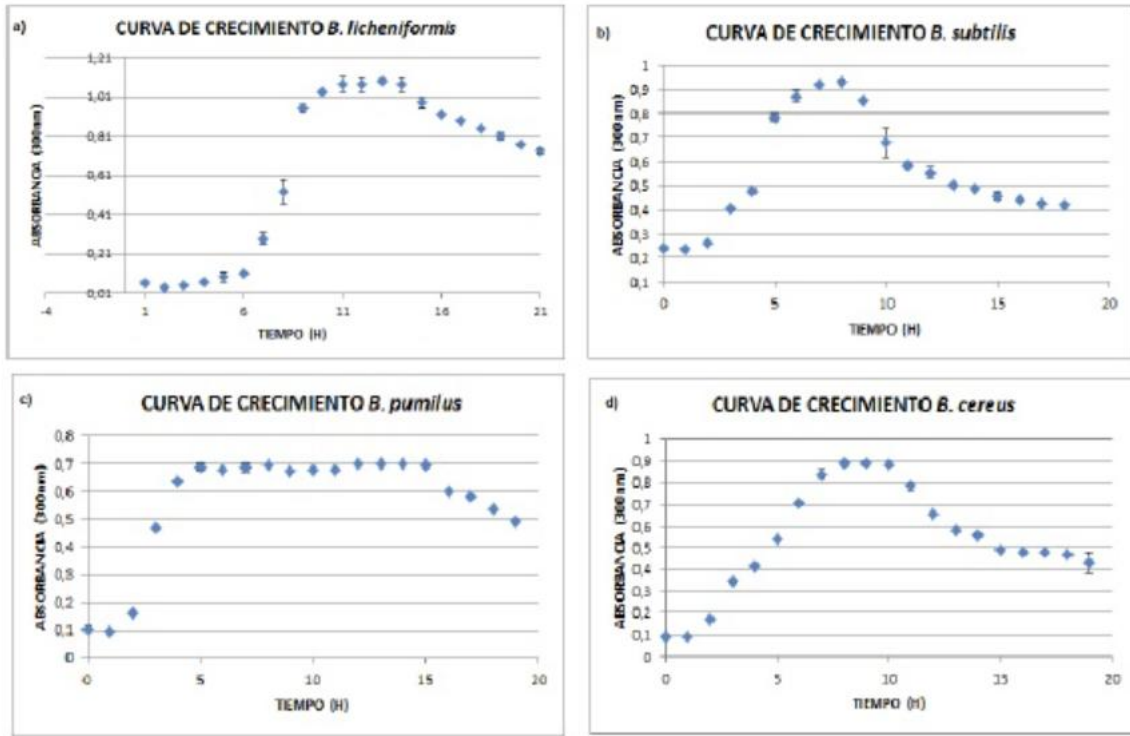
(Lozano et. al., 2021).

**Imagen 2.** Curva de las fases de crecimiento bacteriano



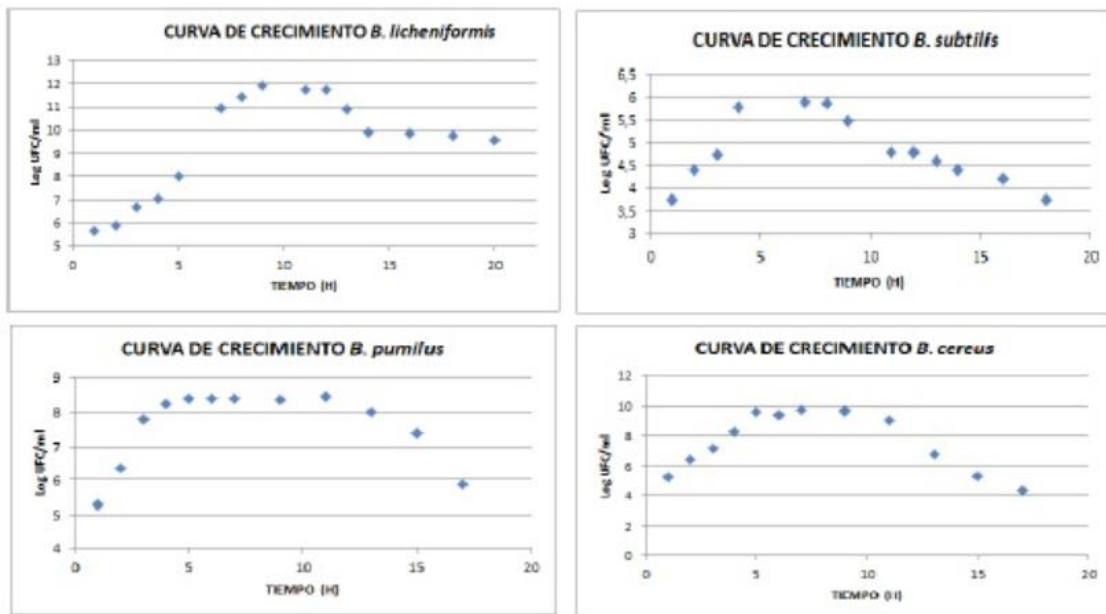
(Lozano et. al., 2021).

**Imagen 3.** Curvas de crecimiento de 4 especies de *Bacillus*, por espectrofotometría a 300 nm



(Castañeda y Sánchez, 2016, p. ).

**Imagen 4.** Curvas de crecimiento de 4 especies de *Bacillus*, por ensayo directo de recuento en placa



(Castañeda y Sánchez, 2016, p. ).

## H. Reacciones químicas

Existe muchas maneras de clasificar reacciones químicas, pero en ingeniería se dividen según el número y el tipo de fases implicadas: sistemas homogéneos y heterogéneos. Una reacción homogénea es la que se realiza en una sola fase, y una heterogénea, en al menos dos. Además de esta clasificación, se encuentran las reacciones catalíticas cuya velocidad es alterada por materiales no reactivos ni productos. Estos materiales ajenos, se conocen como catalizadores, que no se requieren en grandes cantidades y actúan como una especie de intermediarios entre los reactivos para retrasar o acelerar la reacción. Hay muchas variables que afectan la velocidad de una reacción química. En el caso de los sistemas homogéneos, se toma en cuenta lo más evidente como la temperatura, presión y composición. Mientras que, en los sistemas heterogéneos, al haber más de una fase se complica y hay que contemplar la velocidad de transferencia de masa y calor.

Para definir la velocidad de reacción, primero se debe seleccionar un componente de la reacción para considerarlo y definir la velocidad en función de este (Levenspiel, 2004). Si la velocidad de cambio en el número de moles de este componente  $i$  debido a la reacción es  $dN_i/dt$ , entonces la velocidad de reacción es (Levenspiel, 2004):

**Ecuación 1.** *Velocidad de reacción en base a la masa de un fluido*

$$r_i = \frac{1}{V} \frac{dN_i}{dt} = \frac{\text{moles de } i \text{ formados}}{(\text{volumen fluido})(\text{tiempo})}$$

Con base en la unidad de masa del sólido en sistemas sólido-fluido:

**Ecuación 2.** *Velocidad de reacción en base a la masa de un sólido*

$$r_i' = \frac{1}{W} \frac{dN_i}{dt} = \frac{\text{moles de } i \text{ formados}}{(\text{masa sólido})(\text{tiempo})}$$

Con base en la unidad de superficie de interfase en sistemas de dos fluidos, o en la unidad de superficie del sólido en sistemas gas-sólido:

**Ecuación 3.** *Velocidad de reacción es base a la superficie de interfase de un sistema de dos fluidos o un sistema gas-sólido*

$$r_i'' = \frac{1}{S} \frac{dN_i}{dt} = \frac{\text{moles de } i \text{ formados}}{(\text{superficie})(\text{tiempo})}$$

Con base en la unidad del volumen del sólido:

**Ecuación 4.** *Velocidad de reacción en base al volumen de un sólido*

$$r_i''' = \frac{1}{V_s} \frac{dN_i}{dt} = \frac{\text{moles de } i \text{ formados}}{(\text{volumen sólido})(\text{tiempo})}$$

Con base en la unidad de volumen del reactor, si es diferente de la velocidad basada en la unidad de volumen del fluido:

**Ecuación 5.** *Velocidad de reacción en base al volumen del reactor*

$$r_i'''' = \frac{1}{V_r} \frac{dN_i}{dt} = \frac{\text{moles de } i \text{ formados}}{(\text{volumen reactor})(\text{tiempo})}$$

## I. Cinética de reacciones homogéneas

En los reactores ideales se distinguen tres tipos ideales de modelos de contacto o de flujo: intermitente, flujo pistón y tanque agitado. Con frecuencia se intenta construir reactores ideales que se aproximen a estos modelos ideales. El interés de esto se debe a su facilidad de estudio, por la que se deducen ecuaciones de diseño y que generalmente uno de ellos es el mejor modelo posible para la eficiencia de producción de lo que se desee.

Se supone una reacción en una sola fase como  $aA + bB \rightarrow rR + sS$  y con esto, la velocidad de reacción del reactivo A es (Levenspiel, 2004):

**Ecuación 6.** *Velocidad de reacción del reactivo A en una reacción de una sola fase*

$$-r_A = -\frac{1}{V} \frac{dN_A}{dt} = \frac{\text{cantidad de A que desaparece}}{(\text{volumen})(\text{tiempo})}, \left[ \frac{\text{mol}}{\text{m}^3 \times \text{s}} \right]$$

El signo menos indica que desaparece el compuesto, pues al ser reactivo se consume. Asimismo, las velocidades de reacción de todos los compuestos implicados en la reacción se relacionan:

**Ecuación 7.** *Relación entre las velocidades de reacción de todos los compuestos*

$$-\frac{r_A}{a} = -\frac{r_B}{b} = \frac{r_R}{r} = \frac{r_S}{s}$$

La experimentación ha demostrado que en la velocidad de la reacción influyen la composición y la energía del material. Por energía se refiere a la temperatura (energía cinética por el movimiento de las moléculas),

intensidad de luz dentro del sistema, intensidad de campo magnético, entre otros. Pero al solo tomar en cuenta la temperatura, se centra en este factor para poder establecer:

**Ecuación 8.** *Velocidad de reacción tomando en cuenta la influencia de la temperatura*

$$-r_A = kC_A^a = k_0 e^{-\frac{E}{RT}} C_A^a$$

Donde  $k$  es la constante cinética de reacción,  $C_A$  es la concentración del compuesto,  $a$  es el orden de reacción,  $E$  es la energía de activación y el resto es término dependiente de la temperatura contemplando la constante universal de gases ideales.

Antes de poder determinar el factor de concentración en una ecuación cinética, es necesario distinguir entre los diversos tipos de reacciones, según la forma y el número de ecuaciones cinéticas utilizadas para describir el progreso de la reacción.

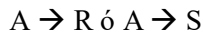
#### 1. Reacciones únicas y múltiples

Se dice que la reacción es única cuando el transcurso de esta se puede representar por una sola ecuación estequiométrica y una sola ecuación cinética. Por otro lado, se habla de reacciones múltiples cuando se representan los cambios observados con más de una ecuación estequiométrica, por lo que también requiere más de una expresión cinética para seguir las variaciones de la composición de todos los componentes en la reacción. Estas reacciones múltiples se pueden clasificar en:

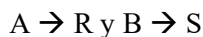
- Reacciones en serie



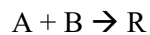
- Reacciones en paralelo
- Competitiva



- Simultánea



- En esquemas más complicados: como la reacción en paralelo respecto a B, pero en serie respecto a A, R y S.





## 2. Reacciones elementales y no elementales

Se considera una reacción simple:



Si se acepta que el mecanismo que controla la velocidad de reacción implica colisión o interacción de una sola molécula de A con una sola molécula de B, entonces el número de colisiones es proporcional a la velocidad de reacción. Pero a una temperatura dada el número de colisiones es proporcional a la concentración de los reactivos en la mezcla, por lo mismo la velocidad de desaparición de A es (Levenspiel, 2004):

**Ecuación 9.** *Velocidad de desaparición del reactivo A*

$$-r_A = kC_A C_B$$

Este tipo de reacciones, en las que la ecuación cinética corresponde a una ecuación estequiométrica, se denominan reacciones elementales. Cuando no hay correspondencia directa entre la ecuación estequiométrica y la cinética, se tienen reacciones no elementales.

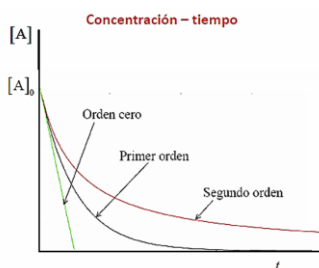
La molecularidad de una reacción elemental es el número de moléculas que intervienen en la reacción. En muchas ocasiones se encuentra que la velocidad con la que transcurre una reacción en la que intervienen las sustancias A, B, ... D, puede darse aproximadamente por una expresión:

**Ecuación 10.** *Velocidad de reacción en la que intervienen distintas sustancias*

$$-r_A = kC_A^a C_B^b \dots C_D^d \quad a + b + \dots d = n$$

Donde  $a, b, \dots d$  no necesariamente están relacionados con los coeficientes estequiométricos. El exponente al que están elevadas las concentraciones se conoce como orden de reacción.

**Imagen 5.** *Comparación de las reacciones de distintos órdenes*



(Cartagena99, s.f., p. ).

Cuando la expresión de velocidad para una reacción química homogénea se escribe en la forma de la ecuación anterior, las dimensiones de la constante cinética  $k$  para la reacción de orden  $n$  son:  $(\text{tiempo})^{-1}(\text{concentración})^{1-n}$  (Levenspiel, 2004).

## J. Ecuación cinética

Existen distintos métodos experimentales para determinar la ecuación cinética de una reacción, aunque los más utilizados son 2:

1. Método integral: método de prueba y error gráfico para cuando se tienen pocos datos y se quiere gran precisión.
  - Se determina la concentración de reactivo a distintos tiempos.
  - Se elige una ecuación de velocidad integrada en la que se sustituyen estos valores y se determina  $k$ . La ecuación con la que se obtenga un valor más constante de  $k$  es la que corresponde al orden de reacción.
  - Se realiza una representación gráfica de las ecuaciones integradas para comprobar que el orden elegido es el que mejor se ajusta a los datos experimentales.
2. Método diferencial: método rápido con mayor precisión, aunque requiere una mayor cantidad de datos.
  - Se utiliza la ecuación sin integrar a  $t = 0$ :

**Ecuación 11.** *Velocidad de reacción método diferencial*

$$v = \frac{d[A]_0}{dt}$$

**Ecuación 12.** *Logaritmo de la velocidad de reacción método diferencial*

$$\log \frac{d[A]_0}{dt} = \log k + n \log [A]_0 + m \log [B]_0$$

- Para diferentes valores de  $A_0$  con  $B_0$  constante y se determinan las  $v$  iniciales y el orden  $n$ .
- La pendiente de una curva con el eje  $x \log [A]$  y en el eje  $y \log \frac{d[A]}{dt}$ , indica el orden de reacción.

(Cartagena99, s.f.).

## K. Medición de crecimiento

El crecimiento de una población o cultivo bacteriano se puede expresar en función del aumento de masa del cultivo o según el aumento del número de células.

### 1. Medida de masa celular

A. Métodos directos: se necesita ser muy cuidadoso con la contaminación para evitar la presencia de partículas extrañas.

- Determinación de peso húmedo: no es un método tan preciso debido al líquido intercelular retenido, lo que depende de la forma y tipo de agrupaciones de la cepa.
  - Se tara un tubo de la centrífuga.
  - Se centrifuga el cultivo y se elimina el sobrenadante.
  - Se determina el peso del sedimento.
- Determinación de peso seco: el método requiere bastante tiempo y tiene problemas por la exactitud de las balanzas al pesar menos de 1mg. Suelen representar el 10-15% de los valores de peso húmedo.
  - Se tara un tubo de la centrífuga.
  - Se centrifuga el cultivo y se elimina el sobrenadante.
  - Se seca el sedimento a 105°C hasta tener un peso constante.
- Determinación de nitrógeno total: técnica de micro-Kjeldahl.
- Determinación de un componente característico: peptidoglucano, ADN, ARN, proteínas, ATP, etc. Se suele usar en bacterias para las que otros métodos más fáciles dan errores por formación de grumos o crecimiento en filamentos. Se emplean en crecimientos en ambientes naturales.

B. Métodos indirectos

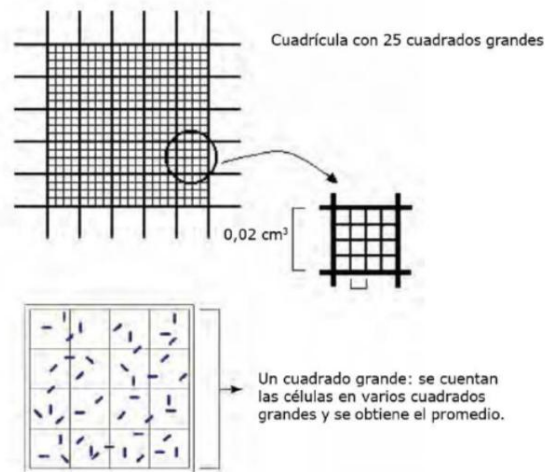
- Medida de consumo de nutrientes o de producción de algún metabolito por unidad de tiempo: consumo de oxígeno y dióxido de carbono, producción de ácidos.
- Métodos turbidimétricos (ópticos): consisten en la medición de la cantidad de luz transmitida a través de un cultivo bacteriano. Las suspensiones bacterianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula pequeña suspendida en el agua, por lo mismo la luz es proporcional a la masa del cultivo.
  - Espectrofotómetro: mide la densidad óptica, es decir la absorbancia.
  - Nefelómetro: es un aparato similar al anterior, solo que el sensor está situado en ángulo recto respecto de la dirección de la luz incidente, por lo que mide la luz dispersada. Posee mayor sensibilidad.

### 2. Medida del número de individuos

A. Métodos directos

- Cámara de recuento de Petroff-Hauser: consiste en un portaobjetos especial con una graduación en superficie y unas medidas muy concretas.
  - Excavación con 0.02 mm de profundidad.
  - Área de 1 mm<sup>2</sup>, dividida en un retículo de 25 cuadros grandes.
  - Cada cuadro grande está subdividido en 16 cuadros pequeños.
  - La muestra distribuye en 16 x 25 = 400 cuadros pequeños.

**Imagen 6.** Área de conteo de cámara Petroff-Hauser



(Hernández, 2022, p. ).

- La muestra se dispersa entre la porta y cubre objetos.
- Se deja reposar sobre el microscopio durante unos minutos.
- Se cuenta el número de células “n” en varios cuadros, generalmente en 16 de los cuadros pequeños que equivalen a uno grande.
- La concentración celular se establece a partir de (Hernández, 2022).:

**Ecuación 13.** Concentración células/mL en cámara Petroff-Hauser

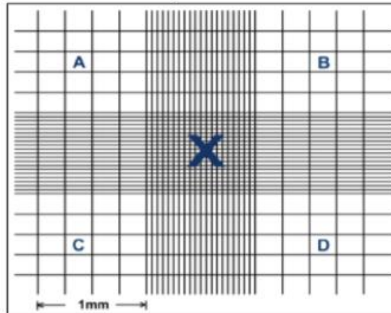
$$n \times 25 \text{ cuadros} \times 50 \text{ (factor de volumen de la cámara)} \times 1000 = \text{células/mL}$$

Una de las ventajas de este método es que es bastante rápido. Uno de los inconvenientes es que sólo sirve para suspensiones concentradas (> 10 x 10<sup>6</sup> células/mL), por debajo de este valor, el número de células vistas es muy bajo y poco significativos estadísticamente.

- Cámara Neubauer: es el mismo principio que para la cámara Petroff-Hauser, la única diferencia está en las dimensiones de la cámara y en el recuento:
  - Excavación con 0.1 mm de profundidad

- Contiene 4 secciones de 1 mm<sup>2</sup>, cada una dividida en 16 cuadros
- La muestra distribuye en 16x4 = 64 cuadros

**Imagen 7.** Área de conteo de cámara Neubauer



(Hernández, 2022, p. ).

- La muestra se dispersa entre la porta y cubre objetos.
- Se deja reposar sobre el microscopio durante unos minutos.
- Se cuenta el número de células “n” en una de las secciones de 16 cuadros o se cuentan los 64 cuadros y se hace un promedio respecto a una única sección.
- La concentración celular se establece a partir de (Hernández, 2022):

**Ecuación 14.** Concentración células/mL en cámara Neubauer

$$n \times 10^4 \times \text{factor de dilución} = \text{células/mL}$$

- Contadores electrónicos de partículas (tipo Coulter): se pasa una suspensión microbiana por un tubo capilar, entre dos polos de una corriente eléctrica, cada vez que pasa por un orificio la partícula, se interrumpe la corriente y lo detecta el dispositivo, esto se registra y detecta el número y el tamaño de las partículas. Para esto si es importante que la muestra esté libre de cualquier partícula extraña.

#### B. Métodos indirectos

- Recuento de viables en placa: Los métodos de recuento de número de células directos no distinguen entre células vivas y muertas, al menos que se les agregue algún indicador especial. Por lo que conviene contar las células vivas mediante el recuento de viables.
- Una célula se define como viable cuando se coloca en un medio de cultivo y es capaz de dividirse y reproducirse. Por lo mismo, no se puede garantizar que cada colonia no proceda de más de un individuo, el recuento se hace por unidades formadoras de colonia (UFC).

- El método para esto es sembrar pequeñas alícuotas de diluciones adecuadas de un cultivo original sobre placas de petri con medio sólido (agar).
- Cada célula viable dará origen a una colonia visible después de un tiempo de incubación.
- Contando las colonias visibles, teniendo en cuenta el factor de dilución de la que proceden y el volumen de la alícuota, es fácil de decir el número de células vivas (Iáñez, 2005):

**Ecuación 15.** *Concentración UFC/mL en recuento de viable sen placa*

$$\frac{\text{UFC contadas}}{\text{factor de dilución} \times \text{volumen de alícuota}} = \text{Unidades Formadoras de Colonia/mL}$$

Para minimizar los errores estadísticos de muestreo, se recomienda sembrar varias placas de cada dilución. Al igual que utilizar pipetas nuevas y esterilizadas en cada dilución. Es importante también contar las placas donde existan de 50 a 300 colonias para que sea significativo.

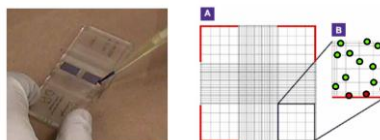
- Recuento sobre filtros: se usa para suspensiones diluidas.
  - Se pasa un gran volumen de muestra a través de una membrana de nitrocelulosa o de nylon estéril, con un diámetro de poro que retenga las bacterias, pero permita el paso de la sustancia.
  - El filtro se deposita sobre la superficie de un medio de cultivo sólido y las colonias se forman sobre el filtro a partir de las células retenidas.
  - Se cuentan las colonias, deduciendo la concentración original de viables en base al volumen de suspensión que se pasó por el filtro.

(Iáñez, 2005).

## L. Indicadores viabilidad de células

El azul tripán es un colorante que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas. Es uno de los varios empleados para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir las células vivas con membranas íntegras. En este procedimiento, una muestra de la suspensión de células es mezclada con una solución de azul tripán antes de ser observada bajo el microscopio, haciendo uso de un hemocitómetro de Neubauer. Las células muertas se observan azules y las vivas de color blanco.

**Imagen 8.** *Análisis de viabilidad de células en cámara Neubauer*



(SOPs, 2013, p. ).

A pesar de que el protocolo original estipulaba el uso de una mezcla isovolumétrica de azul tripán y suspensión celular (por ejemplo: 10  $\mu$ L de suspensión celular y 10  $\mu$ L de azul tripán), también se puede hacer uso de otros tipos de diluciones, dependiendo de la concentración de la suspensión (SOPs, 2013).

## **M. Lisis**

La lisis celular es la rotura de la membrana celular, compuesta por fosfolípidos anfipáticos que separan el contenido interno de la célula del ambiente externo. Las membranas también contienen proteínas embebidas cuya composición varía según el tipo de célula. En las células animales, la membrana es la única barrera, mientras que en plantas y bacterias está rodeada por una pared celular. La pared bacteriana está formada por peptidoglicanos. Estos tipos de barrera extracelular confieren forma y rigidez de las células.

Existen dos tipos de lisis: la lisis tradicional y la lisis por medio de detergentes.

### 1. Lisis tradicional

- A. Mecánica: cuchillas rotatorias rompen y dispersan la célula y su contenido.
  - B. Homogeneización líquida: las células se rompen al ser forzadas a pasar por espacios muy pequeños.
  - C. Sonificación: Ondas de alta frecuencia rompen las células.
  - D. Congelamiento: ciclos de congelación continuos rompen la célula induciendo la formación de cristales.
2. Lisis por medio de detergentes: es un método más delicado para romper la membrana celular. Los detergentes rompen la barrera lipídica solubilizando las proteínas. El detergente por utilizar depende de la aplicación y el tipo de célula. En muchas ocasiones se utiliza el SDS;

(Química.es, 2024).

## **N. Identificación bacteriana**

Observación macroscópica de los microorganismos:

- 1. Observación en medios de cultivo líquido
  - Enturbiamiento de toda la masa del cultivo.
  - Desarrollo de grumos que se depositan al fondo del recipiente
  - Desarrollo en la superficie formando un velo o película
  - Aparición de color debido a la síntesis de pigmentos difusibles

**Imagen 9.** *Observación macroscópica de microorganismos en cultivo líquido*



(fbioyf, 2019, p. ).

2. Observación en medios de cultivo sólido

- Colonias: es el resultado de la multiplicación de un microorganismo sobre la superficie de un medio sólido. La morfología de la colonia se relaciona con las características de la célula origen y lo que se analiza es:
  - Tamaño: uniforme para cada especie o tipo, desde muy pequeñas hasta de unos centímetros de diámetro.
  - Consistencia: blanda, seca o viscosa.
  - Forma: depende del borde y el espesor. Los bordes pueden ser lisos, ondulados, entre otros. El espesor depende de la elevación, ya sea que sean chatas, elevadas, convexas, cónicas, etc.

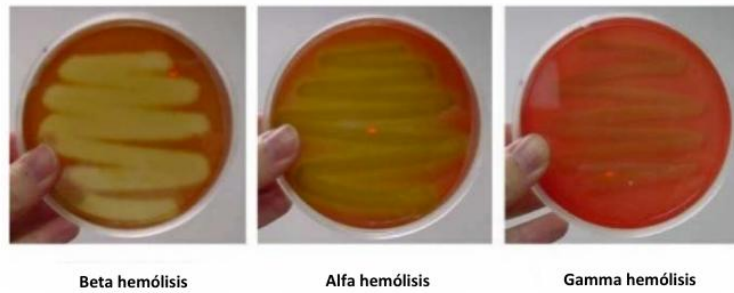
**Imagen 10.** *Observación de colonias en medios de cultivo sólido*



(fbioyf, 2019, p. ).

- Pigmentación: una característica constante e importante de las bacterias.
  - Cromóforos: el pigmento se encuentra dentro del protoplasma bacterianos.
  - Paracromóforos: el pigmento se encuentra en la pared de la célula y en el extracto mucoso pericelular. Son pigmentos no difusibles, limitados de la bacteria.
  - Cromóparos: el pigmento es segregado al exterior de la célula y difunde al medio de cultivo.
- Olor: algunas cepas desarrollan olores específicos que sirven para identificarlas.
- Hemólisis: Esta característica se observa en medios con sangre, donde se forman halos alrededor de las colonias, debido a la hemólisis de los glóbulos rojos. Esta puede ser:
  - Beta o total
  - Alfa o parcial
  - Gamma o no hemólisis

**Imagen 11.** *Tipos de hemólisis*

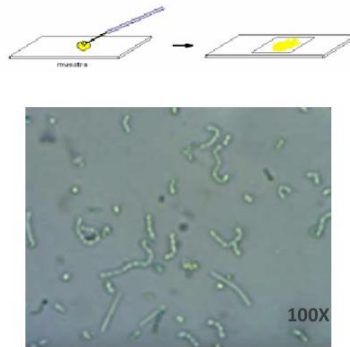


(fbioyf, 2019, p. ).

3. Observación microscópica:

- Observación al estado vivo: es el montaje directo húmedo, donde se coloca una gota del medio de cultivo en un portaobjetos. Si es demasiado espeso, se puede diluir el medio con solución salina para apreciar mejor los elementos. Se deposita suavemente el cubreobjetos sobre la superficie del material y se observa en el microscopio. Esta técnica permite estudiar la movilidad, forma y tamaño del microorganismo.

**Imagen 12.** *Montaje directo húmedo en portaobjetos y su observación microscópica*

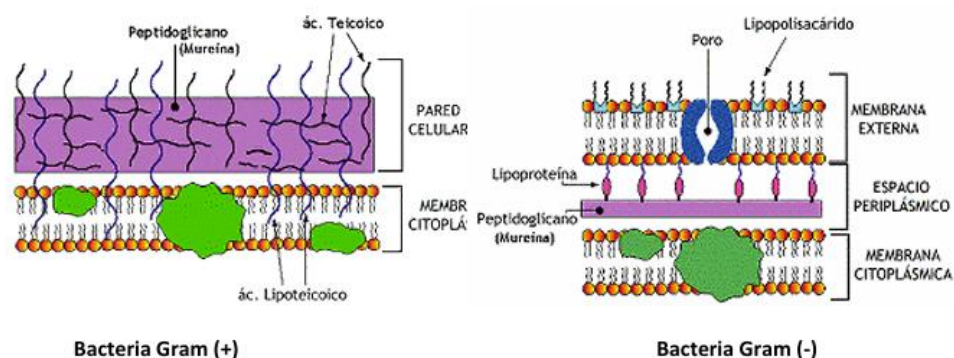


(fbioyf, 2019, p. ).

- Coloraciones: dado que las bacterias son casi incoloras y su tamaño es muy pequeño, existe muy poco contraste entre la célula y el medio que la rodea, y es difícil observar los microorganismos con un microscopio óptico normal. Por lo mismo, para aumentar el contraste y distinguir mejor las células, se pueden utilizar colorantes. Los principales procedimientos de coloración en microbiología se pueden agrupar en 3 categorías:
- Coloración simple:

- Tinción directa: se utiliza un solo colorante que tiñe los microorganismos y los hace visibles al microscopio. El azul de metileno es un colorante simple que actúa sobre todas las células bacterianas rápidamente y no produce un color tan intenso que oscurezca los detalles celulares. Se permite observar la morfología celular, tamaño y agrupación de microorganismos.
- Tinción negativa: se utiliza un colorante que proporciona color al fondo, sin alterar las células, se logra ver el perfil de estas. La sustancia utilizada es un material opaco que no tiene afinidad por los constituyentes celulares y que simplemente los rodea, como la tinta china o la nigrosina.
- Coloración diferencial: ayuda a clasificar las bacterias. Se emplean secuencialmente dos colorantes que permiten distinguir distintos tipos de microorganismos en base a las diferencias en su estructura y composición química.
- Tinción de gram: divide a las bacterias en gram positivas y gram negativas. Las diferencias estructurales entre las paredes celulares de las bacterias fundamentan el distinto comportamiento ante a la prueba:
  - La pared de la célula gram positiva es gruesa y consiste en varias capas interconectadas de peptidoglicano, generalmente entre 80 y 90 %. Al deshidratarse por acción del alcohol, se cierran los poros disminuyendo así el espacio entre las moléculas y provocando que el complejo violeta-yodo quede atrapado dentro de la pared celular.
  - Por otro lado, la pared de la célula gram negativa contiene una capa mucho más delgada, entre el 10 y 20 % de la pared es peptidoglicano, y está rodeada por una membrana de lipopolisacáridos y proteínas, que no proporcionan una barrera para los solventes orgánicos. El alcohol desorganiza y disuelve la capa lipídica más externa, penetrando fácilmente y disolviendo el complejo violeta-yodo.

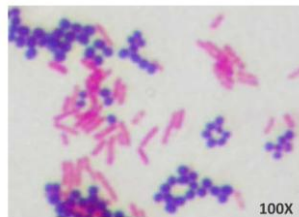
**Imagen 13.** *Diferencias estructurales entre las paredes celulares de bacterias gram positivas y gram negativas*



(fbioyf, 2019, p. ).

- En este método de coloración se coloca primero un colorante violeta que reacciona con todas las células, coloreándolas de azul oscuro.
- Luego se lava con agua y seguidamente se cubre con Lugol, un mordiente que incrementa la afinidad entre el primer colorante y las células. El mordiente, que es una solución diluida de yodo, se combina con el colorante violeta y forma un compuesto coloreado en el interior de la célula, insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos.
- Se vuelve a lavar con agua y se decolora con etanol al 80 % o con una mezcla de alcohol y acetona. Estos disolventes orgánicos eliminan el primer colorante de algunas bacterias.
- Al final se coloca un colorante de contraste, igual de carácter básico, pero de distinto color al primer colorante. Este teñirá todas las bacterias, pero solo se evidenciará en aquellas decoloradas en el paso anterior. Generalmente se utiliza fucsina o safranina, que son de color rosa.
- Los microorganismos que resisten la decoloración y siguen apareciendo de color violeta, son gram positivos. Los que, si pierden el color inicial y toman el color rosa, se clasifican como gram negativos. El comportamiento frente al gram está influenciado por la edad del cultivo, por lo que es fundamental utilizar cultivos frescos, con menor de 48 horas.

**Imagen 14.** Tinción de gram de una mezcla de *Staphylococcus aureus* (coco gram positivo) y *Escherichia coli* (bacilo gram negativo)



(fbioyf, 2019, p. ).

- Tinción de Ziehl y Nielsen: coloración de bacilos Ácido Alcohol Resistente (BAAR). Permite distinguir las bacterias que una vez teñidas resisten a la decoloración por ácidos y alcoholes. Estas bacterias pertenecen a los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia*, y se caracterizan porque sus paredes celulares contienen un elevado porcentaje de lípidos, por lo que son impermeables a los colorantes básicos y a otros compuestos químicos en solución acuosa. Debido a esta capa gruesa de compuestos lipídicos en su pared, se debe utilizar métodos especiales para forzar la entrada del primer colorante utilizado, fucsina. A partir de eso, se calienta la preparación cubierta con ese colorante hasta emitir vapor. Media vez el colorante ha penetrado en la pared celular, se suspende el calentamiento y se enfría con agua lo que solidifica nuevamente los ácidos grasos y hace que la decoloración con ácido sulfúrico, clorhídrico

o nítrico y con alcohol resulte bastante complicada. Dichos microorganismos permanecen de color rosa, mientras que el resto de las bacterias toman el colorante de contraste, azul de metileno.

- Coloración de esporas de Shaeffer y Fulton: las endosporas son estructuras que se forman en el interior de ciertos tipos de bacterias, entre los que se destacan los géneros *Clostridium* y *Bacillus*. A diferencia de la célula vegetativa de la que procede, la endospora es resistente a factores ambientales extremos, incluyendo temperaturas altas, compuestos químicos tóxicos y colorantes. Sin embargo, existen colorantes como la verde malaquita que, con calor, puede penetrar en ella. Una vez teñidas, no pierden el colorante con el lavado de agua y sí lo pierden las formas vegetativas, por lo que quedan con el colorante de contraste. La posición y morfología de las esporas en el interior de la bacteria ayuda a diferenciar especies dentro de un mismo género.

(fbioyf, 2019).

## O. Liofilización

La liofilización es un proceso que tiene como objetivo separar el agua, o cualquier otro solvente de una disolución mediante la congelación y luego sublimación del hielo a menor presión. Es el proceso menos invasivo para secar productos, por lo que es el mejor para compuestos orgánicos o inorgánicos sin alterar su composición. El proceso se lleva a cabo en condiciones de vacío y a temperaturas bajo cero, para evitar romper los enlaces moleculares que le brindan el sabor, textura y nutrientes de los productos. Los alimentos y materiales biológicos como células, tejidos, bacterias y vacunas se convierten en productos secos, evitando el paso de fase líquida y por tanto, los cambios ya sea enzimáticos, biológicos o químicos (Gidolquim, 2014).

El proceso de liofilización juega con los cambios físicos del agua. Cuando se reduce la presión lo suficiente para llegar a vacío, el agua hierve a temperatura ambiente. Al combinar los efectos de vacío con bajas temperaturas, se puede conseguir la sublimación de agua, lo que indica que pasa de hielo a vapor sin necesidad de pasar por líquido. Así pues, el secreto de la liofilización es la sublimación, permitiendo un secado y deshidratación de alimentos sin afectarlos (Barnalab, 2018).

El proceso de liofilización es bastante sencillo y sigue los siguientes pasos:

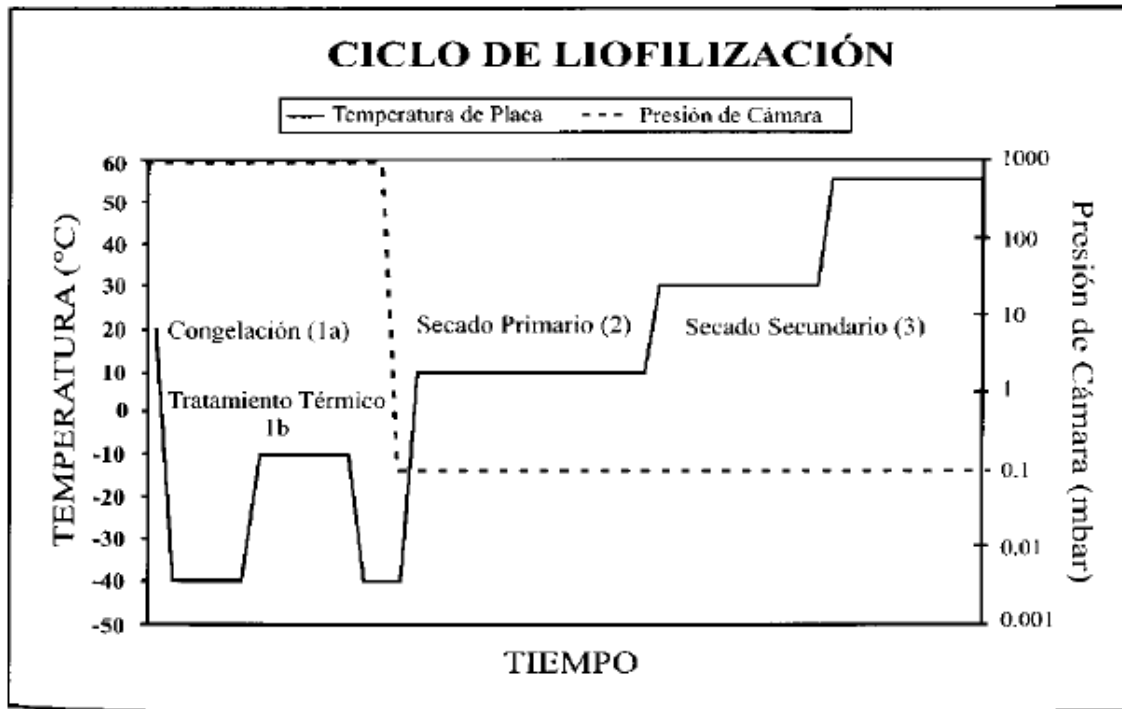
Empieza con el producto fresco a temperatura ambiente y presión atmosférica.

1. Lo primero es congelarlo hasta una temperatura aproximadamente de  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
2. Luego se baja la presión hasta un vacío cercano a 0.01mbar.
3. Se inicia el calentamiento para provocar la sublimación y separar el agua del producto.
4. El vapor se absorbe por un condensador.

5. Se recupera la presión atmosférica para poder abrir el equipo y extraer los alimentos liofilizados.

(Barnalab, 2018).

**Imagen 15.** Curva del ciclo de liofilización



(Brito, 2016, p. ).

## P. Galletas

Las galletas contienen en su mayoría cereales, lo que les brinda una alta cantidad de carbohidratos, una base importante la alimentación de un ser humano. La energía para poder realizar las actividades diarias viene de estos hidratos de carbono, que deberían de ser entre el 50 y 60 % de la ingesta diaria. Las galletas en general están compuestas por harina, grasas como mantequilla o margarina, azúcar, huevo, en algunas ocasiones agua y otros ingredientes que brindan aroma y sabor como las esencias de vainilla, almendra, etc. La composición nutricional varía según el tipo de galleta y las decoraciones o rellenos. Sin embargo, es bastante común agregarle vitaminas, minerales, fibra, fruta y más para darle un toque llamativo al consumidor, aunque siga siendo un producto con alto contenido en grasas y azúcares (Berenguer, s. f.).

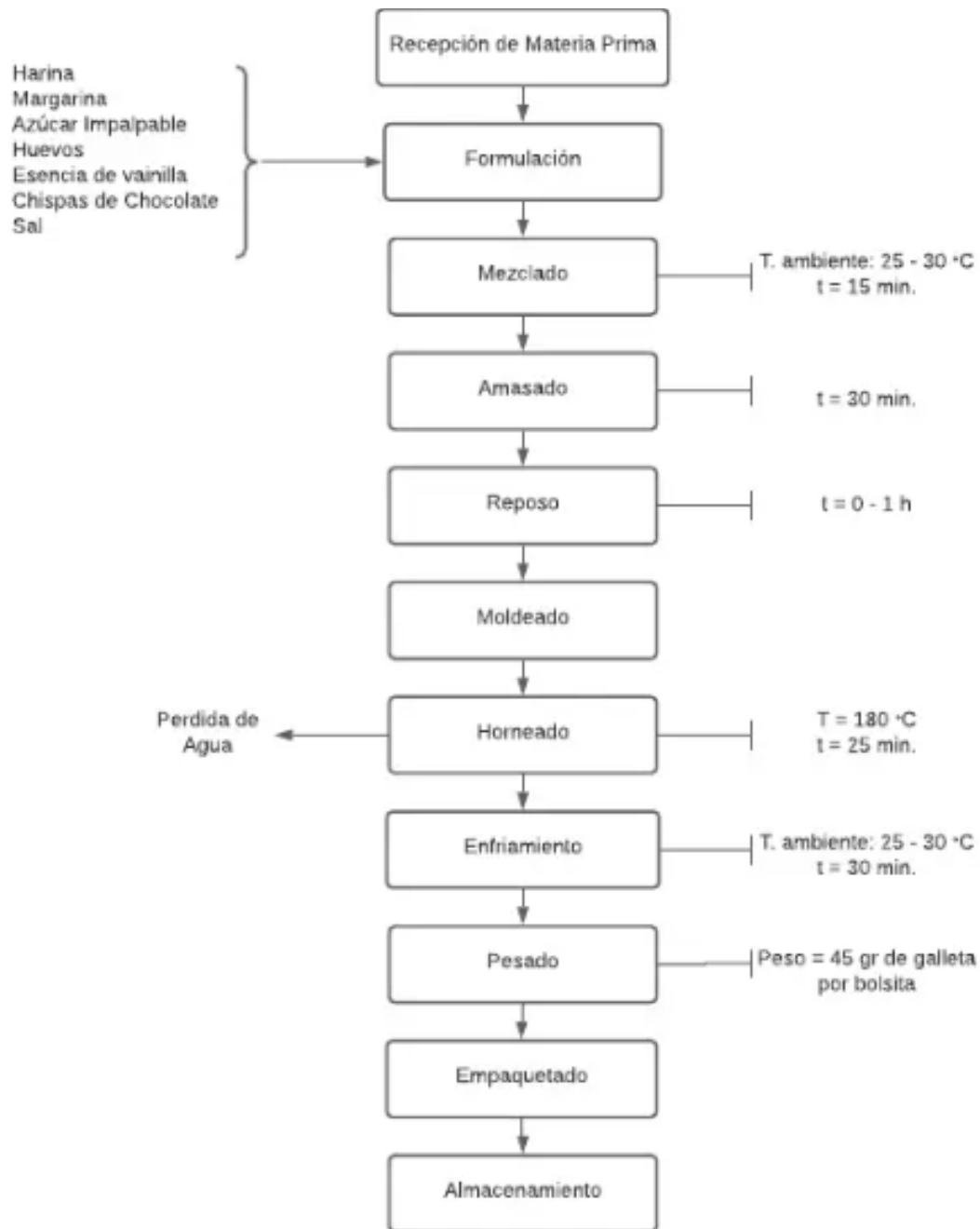
Los nutrientes son compuestos químicos necesarios para el metabolismo de un ser vivo. El humano requiere de 40 nutrientes para mantenerse sano y cada uno de ellos se encuentra en distintos alimentos, por lo que se la da la importancia a tener una dieta equilibrada y variada. Los nutrientes tienen distintas clasificaciones:

1. Según su importancia: esenciales y no esenciales.
2. Por su cantidad:
  - Los macronutrientes, que son los que aportan energía y son necesarios para cada día como los carbohidratos, proteínas y grasas.
  - Los micronutrientes, que son los que forman tejidos del cuerpo y ayudan al crecimiento, donde igual entran las proteínas, carbohidratos y minerales.
3. Por su función:
  - Energéticos como los carbohidratos, grasas y proteínas.
  - Estructurales, que son las vitaminas y minerales que ayudan al funcionamiento del organismo y digestión, al igual que las proteínas.
  - Reguladores que se encargan del buen funcionamiento del metabolismo, sin propiedades energéticas como las vitaminas, minerales fibra y agua.

(Instituto de la Galleta, 2023).

El proceso de producción de las galletas varía según el tipo de galleta que se quiera obtener, sin embargo, hay diagramas generales de lo que siempre ocurre.

Imagen 16. Proceso de producción de galletas



(Ordoñez, s.f., p. ).

## VI. METODOLOGÍA

### A. Materiales

#### 1. Cristalería

- 21 tubos de ensayo
- 6 erlenmeyer de 250 mL
- 1 erlenmeyer de 2000 mL
- 1 probeta de 1000 ± 5 mL
- 1 probeta de 100 ± 0.5 mL
- 1 probeta de 10 ± 0.1 mL
- 14 beakers de 100 mL
- 1 varilla de agitación
- 1 beaker de 2000 mL
- 1 pipeta volumétrica de 10 ± 0.05 mL
- 1 pipeta volumétrica de 1 ± 0.008 mL
- 1 micropipeta de 100 µL – 1 mL
- 21 cajas petri de vidrio

#### 2. Instrumentos

- 2 espátulas
- 1 asa bacteriológica
- 1 bol mediano
- 1 tamizador de harina
- 2 bandejas para hornear

#### 3. Equipos

- Campana de extracción de gases SerProma, Clase 100
- Balanza analítica Ohaus, Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g
- Agitador magnético con calentamiento Thermo Scientific
- Autoclave Precisa, Tuttnauer 2840ELV
- Incubadora Lab-line Imperial III
- Shaker New brunswick scientific, serie 25
- Biorreactor de tanque agitado de 15000 mL New Brunswick Scientific, Bioflo 415

- Centrifugadora de 1000 mL Sorvall RT7
- Centrifugadora de 400 mL Eppendorf 5804 R, versión 15 amp
- Liofilizador de secado por bandejas Harvest Right, LLC. HRFD-PLrg-SS
- Horno de convección por gravedad Symphony VWR
- Horno eléctrico Oviedo, Indurama
- Refrigerador Whirpool
- Vortex mixer Fisher Scientific
- Microscopio Leica DM500
- Cámara Neubauer R's Science

#### 4. Materiales

- Fuente de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)
- 11440 mL de agua destilada
- 168.75 g de azúcar comercial
- 1041 mL de solución salina
- Papel mantequilla
- Parafilm

#### 5. Reactivos

- 28.8 g de agar nutritivo sólido Merck 1.11471.0500
- 30 g de extracto de levadura granulado Merck 1.03753.0500
- 70 g de peptona de caseína (triptona) Merck 1.07213.1000
- Solución de 0.4 % azul tripán R's Science
- Cristal violeta
- Lugol
- Acetona
- Safranina
- Aceite de inmersión

## B. Métodos

### 1. Preparación de medio de cultivo en dos escalas diferentes para el crecimiento de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

El siguiente procedimiento se hizo con base en lo establecido por Pineda et. al (2019):

- Lavar y secar la cristalería a utilizar: 8 tubos de ensayo de 10 mL con tapadera de rosca, 6 erlenmeyer de 250 mL y 1 Erlenmeyer de 2000 mL.
- Pesar 22.5 g de azúcar comercial, 4.5 g de extracto de levadura granulado Merck 1.03753.0500 y 10.5 g de peptona de caseína (triptona) Merck 1.07213.1000, con la balanza analítica Ohaus, Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g, y juntar todo en el erlenmeyer de 2000 mL.
- Con una probeta de  $1000 \pm 5$  mL, llenar el erlenmeyer de 2000 mL con 1500 mL de agua destilada.
- Agregar una barra magnética de agitación al erlenmeyer de 2000 mL y con un agitador magnético con calentamiento Thermo Scientific, agitar sin temperatura a 350 rpm durante 1 min aproximadamente hasta obtener una mezcla homogénea.
- Verter 10 mL del caldo en cada uno de los tubos de ensayo con una probeta de  $10 \pm 0.1$  mL y el restante repartido entre los erlenmeyer de 250 mL, aproximadamente 235 mL en cada uno con una probeta de  $1000 \pm 5$  mL.
- Cerrar parcialmente los tubos de ensayo con su tapadera y tapar los erlenmeyer con aluminio.
- Colocar los tubos de ensayo en un bote de vidrio para mantenerlos de manera vertical en todo momento.
- Rotular para identificar toda la cristalería y colocar una tira de cinta testigo en cada uno.
- Encender la autoclave Precisa, Tuttnauer 2840 ELV y manteniendo la tapadera del equipo abierta, seleccionar el método “medios” para esterilizar el caldo con un ciclo programado a 121 °C y 26 psia durante aproximadamente hora y media.
- Ingresar toda la cristalería a la autoclave y cerrar la tapadera del equipo, esperar a escuchar el seguro y presionar el botón de inicio.
- Al terminar el ciclo y llegar a una temperatura considerable de aproximadamente 60 °C, presionar el botón de “stop” y abrir cuidadosamente la tapadera del equipo.
- Con guantes térmicos sacar la cristalería y esperar a que enfríe un poco a temperatura ambiente.
- Cuando ya esté listo y se pueda tocar con la mano sin ningún problema, cerrar bien los tubos de ensayo y guardar la cristalería con el medio de cultivo dentro de la refrigeradora a 5 °C hasta su uso.

## 2. Primera escala de crecimiento de 10mL de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) para cuantificar antes del proceso de liofilización

El siguiente procedimiento se hizo con base en lo establecido por Rossi (2022):

- Al tener la fuente de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), una caja petri con la cepa en agar sólido, y los tubos de ensayo con el medio de cultivo, se ingresan a la incubadora Lab-line Imperial III durante 10 min hasta alcanzar una temperatura ambiente.
- Mientras se espera, se desinfecta el área de trabajo de la campana de extracción de gases SerProma, Clase 100 con etanol al 70 % v/v y se enciende un mechero para mantener el área estéril.
- Al tener ya todo listo, se colocan todos los tubos de ensayo en una rejilla dentro de la campana para mantenerlos verticalmente y ordenados para inocular.
- Utilizar guantes de látex y mascarilla quirúrgica para manipular la cristalería y el microorganismo sin contaminar nada.
- Se esteriliza un asa bacteriológica manteniéndola constante en la llama del mechero durante unos segundos hasta que la punta de esta se torne de un color rojo vivo.
- Esperar a que se enfríe un poco y raspar suavemente sobre el agar de la caja petri para transferir un poco de los bacilos al caldo preparado esterilizado.
- Repetir los pasos 5 y 6 para inocular cada uno de los tubos de ensayo.
- Cerrar parcialmente los tubos de ensayo con su tapadera, rotular con el nombre de la cepa y la fecha de inoculación y colocar dentro de la incubadora, nuevamente en el frasco en el que se colocaron.
- Dejar incubar en aerobiosis durante 48 hasta 72 horas, a una temperatura entre 33 – 37 °C.

## 3. Segunda escala de crecimiento de 250 mL *Bacillus subtilis* (ATCC11774) para cuantificar antes del proceso de liofilización

El siguiente procedimiento se hizo con base en lo establecido por Rossi (2022):

- Cuando hayan pasado las 72 horas se sacan los tubos de ensayo de la incubadora Lab-line Imperial III, se confirma por medio de la turbidez a simple vista que si haya crecido un poco los bacilos.
- Se sacan los 6 erlenmeyer previamente preparados con caldo y se ingresan a la incubadora, durante 15 min hasta alcanzar una temperatura ambiente.
- Mientras se espera, se desinfecta el área de trabajo de la campana de extracción de gases SerProma, Clase 100 con etanol al 70 % v/v y se enciende un mechero para mantener el área estéril.
- Al tener ya todo listo, se colocan todos los tubos de ensayo en una rejilla y los erlenmeyer dentro de la campana para inocular.

- Utilizar guantes de látex y mascarilla quirúrgica para manipular la cristalería y el microorganismo sin contaminar nada.
- Se abre uno por uno de los tubos de ensayo y se pasa rápidamente la boquilla del tubo por el mechero para asegurar que esté limpio para verter el líquido inoculado en los erlenmeyer.
- Se trasvasa cada uno de los tubos de ensayo a los erlenmeyers, uno a uno, vertiendo los 2 tubos de ensayo restantes en los 2 erlenmeyers que estén más vacíos o tengan más volumen para llenar.
- Tapar los erlenmeyer con aluminio, rotular con el nombre de la cepa y la fecha de inoculación y colocar dentro del shaker New brunswick scientific, serie 25 a 1000 rpm y 35 °C.
- Dejar incubar en aerobiosis durante 48 hasta 72 horas.

#### 4. Preparación de medio de cultivo para el crecimiento de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) a una tercera escala

El siguiente procedimiento se hizo con base en lo establecido por Rossi (2022) y New Brunswick Scientific (2024):

- Desatornillar el área donde se alimenta el biorreactor de 15000 mL New Brunswick Scientific, Bioflo 415 en la parte superior.
- Llenar el reactor de agua con ayuda de un embudo y un pichel, verificando al inicio que la válvula de purga esté cerrada.
- Cerrar el tornillo del reactor de la parte de la alimentación.
- Abrir la válvula de paso de agua al equipo.
- Encender el equipo.
- Establecer condiciones para la limpieza de este: agitación a 250 rpm y luego la temperatura a 60 °C.
- Cuando haya alcanzado la temperatura, dejar 30 min trabajando.
- Mientras tanto, se puede preparar el medio de cultivo. Para eso pesar 127.5 g de azúcar comercial, 25.5 g de extracto de levadura granulado Merck 1.03753.0500 y 59.5 g de peptona de caseína (triptona) Merck 1.07213.100, con la balanza analítica Ohaus, Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g.
- Juntar todo en una cubeta, previamente lavada con agua y jabón, y llenarla con 8500 mL de agua destilada con ayuda de una probeta de  $1000 \pm 5$  mL. Agitar con una paleta de madera durante unos minutos hasta que la mezcla se vea homogénea.
- Al terminar el tiempo del reactor, bajar la temperatura establecida a 25 °C.
- Al alcanzar la nueva temperatura, apagar la agitación y la temperatura, desatornillar el área donde se alimenta el reactor y conectar una maguera a la salida de purga.
- Abrir la válvula de purga y vaciar el reactor directo a la tubería de desagüe.

- Cerrar la válvula de purga.
- Desatornillar el tornillo donde se alimenta el reactor y llenarlo con los 8500 mL de caldo preparado con la ayuda del embudo y el pichel.
- Cerrar el tornillo del reactor de la parte de la alimentación.
- Establecer condiciones para la esterilización de este: agitación a 150 rpm, temperatura a 85 °C y abrir el paso de aire del reactor.
- Cuando haya alcanzado la temperatura, dejar esterilizar el medio por 2 horas.
- Al pasar las 2 horas, bajar la temperatura establecida a 37 °C.
- Cuando haya bajado la temperatura, cerrar el paso del aire del reactor.

##### 5. Tercera escala de crecimiento de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) para cuantificar antes del proceso de liofilización

El siguiente procedimiento se hizo con base en lo establecido por Rossi (2022) y New Brunswick Scientific (2024):

- Cuando hayan pasado las 72 horas se sacan los erlenmeyers del shaker New Brunswick Scientific, serie 25 y se confirma por medio de la turbidez a simple vista que si haya crecimiento de bacilos.
- Esterilizar otro embudo con etanol al 70 % v/v y encender un mechero para mantener el área estéril.
- Utilizar guantes de látex y mascarilla quirúrgica para manipular la cristalería, el equipo y el microorganismo sin contaminar nada.
- Se abre uno por uno de los erlenmeyers y se pasa rápidamente la boquilla de estos por el mechero para asegurar que esté limpio para verter el líquido inoculado en el biorreactor de 15000mL New Brunswick Scientific, Bioflo 415.
- Se trasvasa cada uno de los erlenmeyers al reactor con el embudo.
- Cerrar el tornillo del reactor de la parte de la alimentación.
- Al no tener contacto directo con oxígeno, se activa el flujo de aire a 2 SLPM.
- Dejar incubar en aerobiosis a 150 rpm y 37 °C durante 24 horas.

##### 6. Cuantificación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) antes del proceso de liofilización

- Lavar y secar la cristalería a utilizar: 19 tubos de ensayo de 10 mL con tapadera de rosca, 1 frasco de vidrio para meter los tubos, 1 probeta de 100 ± 0.5 mL, 1 erlenmeyer de 250 mL, 1 pipeta volumétrica de 10 ± 0.05 mL y 1 pipeta volumétrica de 1 ± 0.008 mL.
- Llenar todos los tubos de ensayo, menos uno, con 9mL solución salina con la pipeta volumétrica de 10 ± 0.05 mL y cerrarlos parcialmente con su tapadera, meterlos en el bote de vidrio.

- Para el erlenmeyer pesar 1.8 g de agar nutritivo Merck 1.11471.0500, con la balanza analítica Ohaus, Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g, y llenar con 90 mL de agua destilada con una probeta de  $100 \pm 0.5$  mL.
- Agregar una barra magnética de agitación al erlenmeyer de 250 mL y con un agitador magnético con calentamiento Thermo Scientific, agitar con alta temperatura a 350 rpm durante 5 min aproximadamente hasta obtener una mezcla homogénea y llegar a su punto de ebullición.
- Quitar el erlenmeyer del fuego con guantes térmicos y tapar con aluminio.
- Rotular toda la cristalería para identificarla colocar una tira de cinta testigo a cada una.
- Encender la autoclave Precisa, Tuttnauer 2840 ELV y manteniendo la tapadera del equipo abierta, seleccionar el método “medios” para esterilizar el agar con un ciclo programado a 121 °C y 26 psia durante aproximadamente hora y media.
- Ingresar toda la cristalería a la autoclave y cerrar la tapadera del equipo, esperar a escuchar el seguro y presionar el botón de inicio.
- Al terminar el ciclo y llegar a una temperatura considerable de aproximadamente 60 °C, presionar el botón de “stop” y abrir cuidadosamente la tapadera del equipo.
- Con guantes térmicos sacar la cristalería y esperar a que enfríe un poco a temperatura ambiente.
- Mientras se espera, se desinfecta el área de trabajo de la campana de extracción de gases SerProma, Clase 100 con etanol al 70 % v/v y se enciende un mechero para mantener el área estéril.
- Utilizar guantes de látex y mascarilla quirúrgica para manipular la cristalería y el microorganismo sin contaminar nada
- Cuando ya esté todo listo y se pueda tocar con la mano la cristalería sin ningún problema, dentro de la campana, verter 30 mL de agar en 3 cajas petri.
- Esperar a que solidifique, sellar las cajas con parafilm y rotular.
- Utilizar uno de los tubos esterilizados para purgar una muestra directo del biorreactor de 15000 mL New Brunswick Scientific, Bioflo 415 y confirmar por medio de la turbidez a simple vista que si haya crecimiento de bacilos.
- Dentro de la misma campana, colocar todos los tubos de ensayo en una rejilla para mantenerlos verticalmente y ordenados para realizar las diluciones.
- En uno de los tubos de ensayo con 9 mL de solución salina, diluir 1 mL de la muestra concentrada del reactor con la micropipeta de  $1 \pm 0.008$  mL y puntas estériles.
- Agitar bien esa dilución y obtener una alícuota de 1mL para diluirla en otro tubo de ensayo con 9mL de solución.
- Realizar 4 diluciones más de la misma manera.
- Realizar los pasos 17-19, 2 veces más para obtener en triplicado.

- Se esteriliza un asa bacteriológica manteniéndola constante en la llama del mechero durante unos segundos hasta que la punta de esta se torne de un color rojo vivo.
- Esperar a que se enfríe un poco y mientras tanto, se agita bien la última dilución
- Abrir una de las cajas petri con agar y verter sobre la misma 0.1 mL de una de la última dilución con la micropipeta.
- Regar cuidadosamente la alícuota con el asa sobre el agar y volver a sellar la caja con parafilm.
- Esperar a que se absorba un poco y darle vuelta a la caja para rotularla con la fecha de inoculación y la cepa de bacilos.
- Ingresar la caja petri a la incubadora Lab-line Imperial III con el agar hacia arriba.
- Realizar los pasos 23-26, 2 veces más con las otras diluciones del triplicado.
- Dejar incubar en aerobiosis durante 48 hasta 72 horas, a una temperatura entre 33 – 37 P°C.
- Observar los cambios en el crecimiento de colonias en el agar y contar las UFC.
- Contemplando el volumen de la muestra sembrada y el factor de dilución, calcular las UFC/mL.

#### 7. Centrifugación de biomasa para liofilizar

El siguiente procedimiento se hizo con base en lo establecido por El Crisol (2017):

- Al obtener la mayoría de crecimiento con las 24 horas de los bacilos en el biorreactor de 15000 mL New Brunswick Scientific, Bioflo 415, vaciar todo el contenido en recipientes esterilizados con etanol al 70 % v/v, siempre con un mechero en el área para mantener libre de contaminación.
- Desinfectar la campana de extracción de gases SerProma, Clase 100 con etanol al 70 % v/v y encender un mechero para proteger el área.
- Transferir 1000 mL del cultivo a 4 botes de centrifugación estériles de 250 mL.
- Pesar los botes para confirmar que tengan una masa similar en la balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g.
- Utilizar la centrifugadora de 1000 mL Sorvall RT7, durante 15 minutos a una temperatura constante de 20 °C y a 4000 rpm, para permitir la sedimentación de las células y obtener la biomasa del medio de cultivo.
- Eliminar el líquido sobrenadante y repetir del paso 93-95 hasta terminar de centrifugar los 9850 mL y obtener toda la biomasa.
- Guardar la biomasa en el refrigerador a 5 °C hasta su liofilización.

## 8. Centrifugación de biomasa para peso seco

El siguiente procedimiento se hizo con base en lo establecido por El Crisol (2017):

- Para el resto del cultivo, 150 mL, se utilizó la centrifugadora de 400 mL Eppendorf 5804 R, versión 15 amp.
- De igual forma, se pesaron los 3 botes de 50 mL previamente esterilizados con etanol al 70 % v/v, para confirmar el peso similar.
- Se centrifugó durante 15 minutos a una temperatura constante de 20 °C y a 3000 rpm.
- Se sacó la biomasa con la ayuda del asa bacteriológica y se colocó la de cada tubo en un pedacito de aluminio previamente tarado en la balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g para sacar peso seco.
- Se colocaron los aluminios con la biomasa dentro del horno de convección por gravedad Symphony VWR, a 60 °C durante 72 horas.
- Cuando pasó el tiempo y ya no quedaba nada de líquido en las muestras se volvió a pesar los aluminios para obtener el peso de la biomasa en 50 mL de caldo inoculado, en triplicado.

## 9. Liofilización de la biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

El siguiente procedimiento se hizo con base en lo establecido por Mamun, y Mamun (2022):

- Utilizar un liofilizador de secado por bandejas Harvest Right, LLC. Modelo HRFD-PLrg-SS con la configuración predeterminada.
- Asegurar que la puerta esté bien cerrada, la válvula de drenaje esté cerrada y la manguera de la bomba de vacío esté conectada.
- Encender el liofilizador presionando el interruptor de encendido/apagado y realizar una prueba rápida para asegurar la configuración y que la cámara esté libre de suciedad, completamente seca.
- Presionar “inicio” en la pantalla táctil y la pantalla indicará cerrar la válvula de drenaje, hacer eso y presionar “continuar”. Presionar la hoja de la esquina superior izquierda para encender la bomba de vacío y esperar 10-15 minutos para que reduzca la presión por debajo de 500 mTorr. Cuando eso ocurra, la prueba fue exitosa y ya se puede apagar el liofilizador y abrir la válvula de drenaje para liberar la presión y abrir la puerta para comenzar con el primer lote. Si no se alcanzan los 500 mTorr, comprobar si hay fugas de aire y repetir la prueba.
- Asegurar nuevamente que la puerta esté bien cerrada, la válvula de drenaje esté cerrada y la manguera de la bomba de vacío esté conectada.

- Preparar la biomasa obtenida de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) y colocarla sobre papel encerado en las bandejas con la ayuda de una espátula, de una capa de espesor uniforme para conseguir un mismo resultado en menos tiempo.
- Colocar las bandejas en la estantería dentro del liofilizador. Insertar la almohadilla aislante, cerrar la puerta acrílica y girar el pestillo de la puerta en el sentido de las agujas del reloj hasta el tope, comprimiendo la puerta contra la junta de goma. Verificar visualmente que la puerta esté sellada.
- Como el material no está precongelado, después de presionar “inicio” se indica cerrar la válvula de drenaje, luego se presiona “continuar” y la unidad comenzará a “congelar”.
- Todo es automático. Retirar las bandejas cuando el proceso emita un pitido para notificar que se completó.
- Cuando termine el proceso, presionar “continuar” en la pantalla “listo para finalizar”. Se indica abrir la válvula de drenaje para ventilar, antes de eso sacar la manguera de del balde y revisar que esté vacío. Luego abrir la puerta, retirar la almohadilla aislante y retirar las bandejas.
- Revisar que el material esté seco. Si todavía hay humedad, presionar “más tiempo de secado” y dejar que el liofilizador termine.
- Quitar las bandejas, asegurar la manguera para drenar y presionar “descongelar”
- Empacar material en pequeñas bolsas taradas en la balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g, y numeradas previamente, sacando el aire por completo de las mismas y utilizando una selladora, para evitar que se rehidrate por la humedad natural del aire.
- Pesar nuevamente las bolsas para obtener la masa que contiene cada una de las bolsas y poder guardar un registro.
- Almacenar las bolsas en un lugar fresco.

#### 10. Cuantificación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) luego del proceso de liofilización

- Se pesaron 0.022 g de liofilizado en la balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g, que fue lo obtenido en promedio del peso seco, y se rehidrataron en 50 mL de solución salina esterilizada, en un erlenmeyer de 100 mL con una probeta de  $100 \pm 0.5$  mL.
- Se agregó una barra magnética de agitación al erlenmeyer de 100 mL y con un agitador magnético con calentamiento Thermo Scientific, agitar sin temperatura a 350 rpm durante 10 min aproximadamente hasta obtener una mezcla homogénea.
- Se llevo a cabo el mismo procedimiento de la cuantificación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) antes del proceso de liofilización. Es importante mencionar, que en lugar de utilizar como muestra concentrada la purga obtenida del reactor, se utilizará la rehidratación del liofilizado y una muestra de esta es la que se guarda en el primer tubo de ensayo.

### 11. Experimentación horneada del medio de cultivo de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

El siguiente procedimiento se hizo con base en lo establecido por García (2020):

- Precalentar el horno eléctrico Oviedo, Indurama a 177 °C.
- Colocar 2 mL del crecimiento a segunda escala de bacilos, en medio de cultivo líquido, en 7 tubos de ensayo con tapadera parcialmente cerrada, en triplicado.
- Colocar los tubos de muestra en una rejilla para mantenerlos estables.
- Cuando el horno haya alcanzado la temperatura establecida colocar la rejilla dentro.
- Sacar las primeras 3 muestras sin hornear y luego ir sacando de tres en tres cada 5 minutos a partir de eso hasta llegar a 30 min, el doble de lo necesario para las galletas.
- Tomar fotos y anotar cambios visibles.
- Guardar las muestras, cerrando los tubos completamente con su tapadera, para luego analizarlas y ver las UFC presentes.

### 12. Cuantificación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) luego del proceso de horneado

- Se llevo a cabo el mismo procedimiento de la cuantificación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) antes del proceso de liofilización, solo que en este caso no se va a utilizar como muestra concentrada la purga obtenida del reactor, se utilizarán las muestras horneadas del medio de cultivo, sin diluciones. Asimismo, se realizará 7 veces el procedimiento, para cada muestra.

### 13. Preparación de base alimenticia

El siguiente procedimiento se hizo con base en lo establecido por (García, 2020):

- Preparar área de trabajo con los materiales a utilizar: 1 bol mediano, un tamizador de harina, papel mantequilla y bandejas de horneo.
- Pesar ingredientes en la balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g: 63.75 g de harina, 18.75 g de azúcar, 46.88 g de mantequilla y 1.7 g de biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) para tener 21 galletas con  $1 \times 10^6$  UFC.
- Mezclar con guantes todos los ingredientes de la galleta a temperatura ambiente y por último agregar los bacilos, amasar cuidadosamente hasta distribuir todo bien.
- Pesar la masa y dividirla para tener 21 galletas, aproximadamente de 6 g cada una.
- Hacer bolitas y aplastarlas con la mano para obtener todas de un mismo grosor de 0.5 cm
- Colocar las galletas sobre la bandeja con papel mantequilla.

#### 14. Experimentación de galletas horneadas con *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

El siguiente procedimiento se hizo con base en lo establecido por García (2020):

- Precalentar el horno eléctrico Oviedo, Indurama a 177 °C.
- Cuando el horno haya alcanzado la temperatura establecida colocar la bandeja dentro.
- Sacar las primeras 3 galleta sin hornear y luego ir sacado de tres en tres cada 5 minutos a partir de eso hasta llegar a 30 min, el doble de lo necesario de la receta de las galletas.
- Tomar fotos y anotar cambios visibles.
- Guardar las muestras en duplicado en pequeñas bolsas plásticas, sacando todo el aire, para luego analizarlas y ver las UFC presentes.

#### 15. Cuantificación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) luego del proceso de galletas horneadas

- Se diluye cada una de las muestras horneadas en 9 mL de solución salina.
- Se llevo a cabo el mismo procedimiento de la cuantificación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) antes del proceso de liofilización, solo que en este caso no se va a utilizar como muestra concentrada la purga obtenida del reactor, se utilizarán las muestras de galletas horneadas y si se diluirá 3 veces, tomando inicialmente 1 g de la galleta y luego 1 alícuota de 1 mL de la dilución inicial y 9 mL de solución salina. Asimismo, se realizará 7 veces el procedimiento, para tener cada muestra en triplicado.

#### 16. Cuantificación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) en cámara de Neubauer

El siguiente procedimiento se hizo con base en lo establecido por Hernández (2022) y SOPs (2013):

- Preparar solución de azul tripán R's Science al 0.4 % en solución salina.
- Se prepara la muestra de suspensión bacteriana a analizar y se mezcla para asegurar una distribución uniforme de células.
- Mezclar la muestra bacteriana en una proporción aproximada 1:1 con la solución de azul tripán y dejar reposar por 1 min.
- Limpiar y secar bien el hemocitómetro Neubauer R's Science y el cubreobjetos
- Colocar el cubreobjetos sobre el hemocitómetro Neubauer.
- Usar una micropipeta para cargar entre 10-20  $\mu$ L de la mezcla de la muestra en el borde de la cámara para que se distribuya por toda la capilaridad bajo el cubreobjetos.
- Colocar la cámara de Neubauer en el microscopio Leica DM500 ajustando el enfoque a un aumento de 40X o 100X, dependiendo del tamaño de las células.

- Las células muertas aparecen teñidas de azul, mientras que las vivas serán transparentes o con el contorno levemente coloreado.
- Contar la cantidad de células vivas en por lo menos uno de los cuadros grandes de la cámara, compuesto por 16 cuadros pequeños. Si se cuenta más de un cuadro grande, como son 4, sacar un promedio.
- Si la concentración de bacterias es muy alta, realizar diluciones de la muestra inicial para obtener un número manejable de células y repetir procedimiento.
- Calcular concentración de células.

### 17. Análisis tinción de gram de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

El siguiente procedimiento se hizo en base a lo establecido por fbioyf (2019):

- Limpiar y secar bien el portaobjetos de vidrio.
- Si la muestra bacteriana proviene de un cultivo sólido, se toma una pequeña porción de la colonia con un asa bacteriológica y se coloca sobre el portaobjetos. Si es cultivo líquido, se toma una gota y se coloca sobre el portaobjetos.
- Luego de haber colocado la muestra, pasar el portaobjetos rápidamente de un lado a otro sobre la llama de un mechero, hasta ver la muestra seca y fija.
- Aplicar una gota del reactivo cristal violeta sobre la muestra, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Agregar una gota de Lugol sobre la muestra, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Decolorar la muestra con alcohol etílico al 95 % o acetona, durante 10 a 15 segundos, hasta que deje de salir el color. Enjuagar con agua destilada.
- Aplicar safranina o fucsina sobre la muestra, esperar 1 minuto y lavar con agua destilada.
- Colocar el portaobjetos en el microscopio Leica DM500 y enfocar la muestra con el objetivo de baja potencia.
- Colocar por último una gota de aceite de inmersión para que cubra la muestra.
- Para ya observar las bacterias con detalle, utilizar el objetivo 100X
- Observar las bacterias, las grampositivas aparecen de color púrpura y las bacterias gramnegativas, de color rojo o rosa.

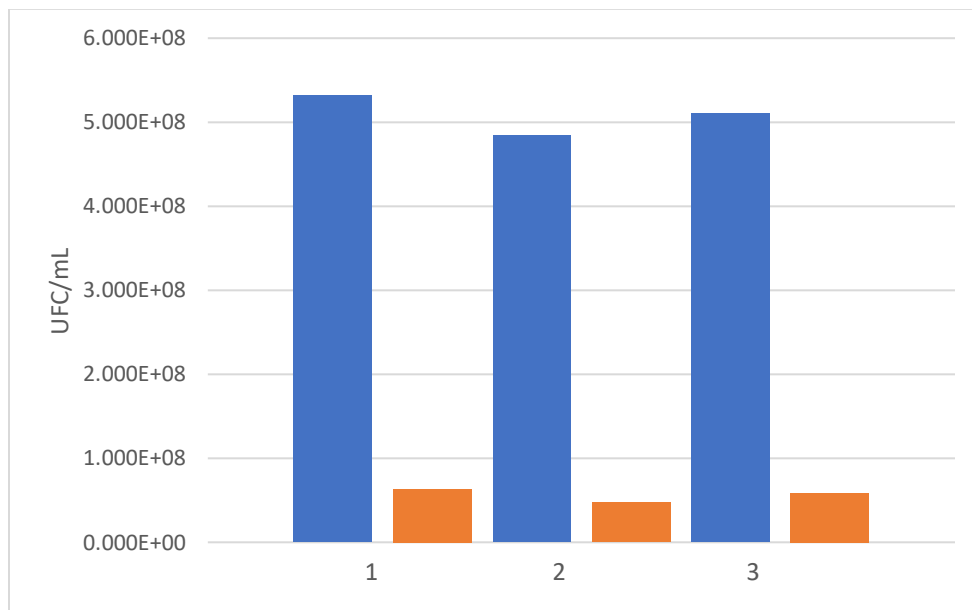
## VII. RESULTADOS

**Cuadro 1.** Cuantificación UFC/mL antes y después del proceso de liofilización de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Corrida	Concentración antes de la liofilización ( $\pm 5.314 \times 10^6$ UFC/mL)	Concentración después de la liofilización ( $\pm 5.314 \times 10^6$ UFC/mL)	Cambio de concentración antes y después de la liofilización ( $\pm 7.516 \times 10^6$ UFC/mL)	Reducción de viabilidad (%)
1	$5.314 \times 10^8$	$6.377 \times 10^7$	$4.667 \times 10^8$	$88.000 \pm 1.666$
2	$4.836 \times 10^8$	$4.783 \times 10^7$	$4.358 \times 10^8$	$90.110 \pm 1.843$
3	$5.102 \times 10^8$	$5.846 \times 10^7$	$4.517 \times 10^8$	$88.542 \pm 1.738$
Media (UFC/mL)	$5.084 \times 10^8$	$5.669 \times 10^7$	$4.517 \times 10^8$	88.884
Desviación estándar (UFC/mL)	$2.396 \times 10^7$	$8.118 \times 10^6$	$1.594 \times 10^7$	1.096

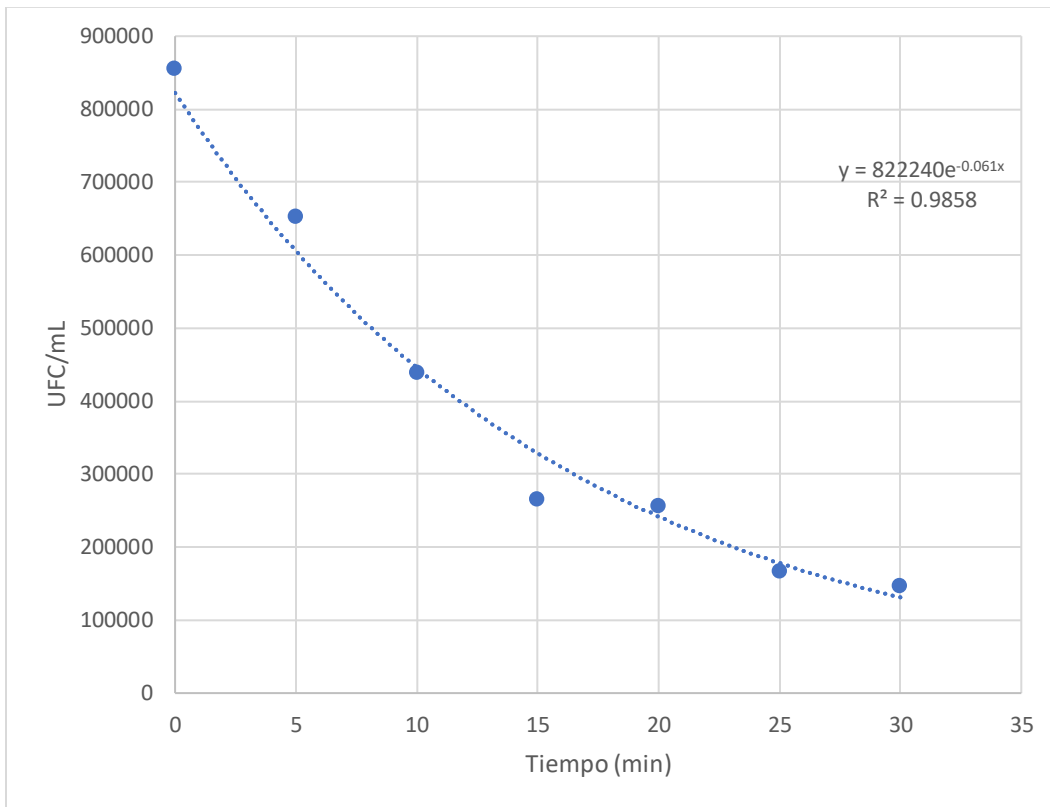
Nota: Obtenido de experimentación propia. El proceso de liofilizado se realizó en un liofilizador de secado por bandejas marca Harvest Right, LLC. HRFD-PLrg-SS, con una presión de vacío de 500 mTorr y a una temperatura de congelación de  $-4^\circ\text{C}$ , durante un ciclo de 9.7 horas. El liofilizado utilizado para el análisis fue el primero obtenido, sus datos se presentan en el Cuadro 21. La cuantificación de unidades formadoras de colonia por mL se realizó con el método de recuento de viables en placa, con agar nutritivo sólido Merck 1.11471.0500, en base a un factor de dilución de  $1.882 \times 10^{-6}$  y un inóculo en la caja petri de 0.1 mL. Calculado a partir de los datos originales del Cuadro 19 y el Cálculo 2. El cambio de concentraciones se realizó a partir del Cálculo 3 y el porcentaje de reducción de viabilidad, en base al Cálculo 4. Las incertidumbres de las concentraciones se calcularon en base al mismo Cálculo 2, las del cambio de concentración, a partir del Cálculo 17, y las del % de reducción de viabilidad en base al Cálculo 18. Para la desviación estándar se utilizó el Cálculo 16.

**Figura 1.** Comparación de la cuantificación UFC/mL antes y después del proceso de liofilización de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)



Nota: Obtenido de experimentación propia. Las barras azules representan a los valores de la concentración de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) en UFC/mL antes del proceso de liofilización, y las barras anaranjadas, después del proceso de liofilización, de cada corrida presentadas en el Cuadro 1.

**Figura 2.** Curva de muerte promedio de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) según el triplicado de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L



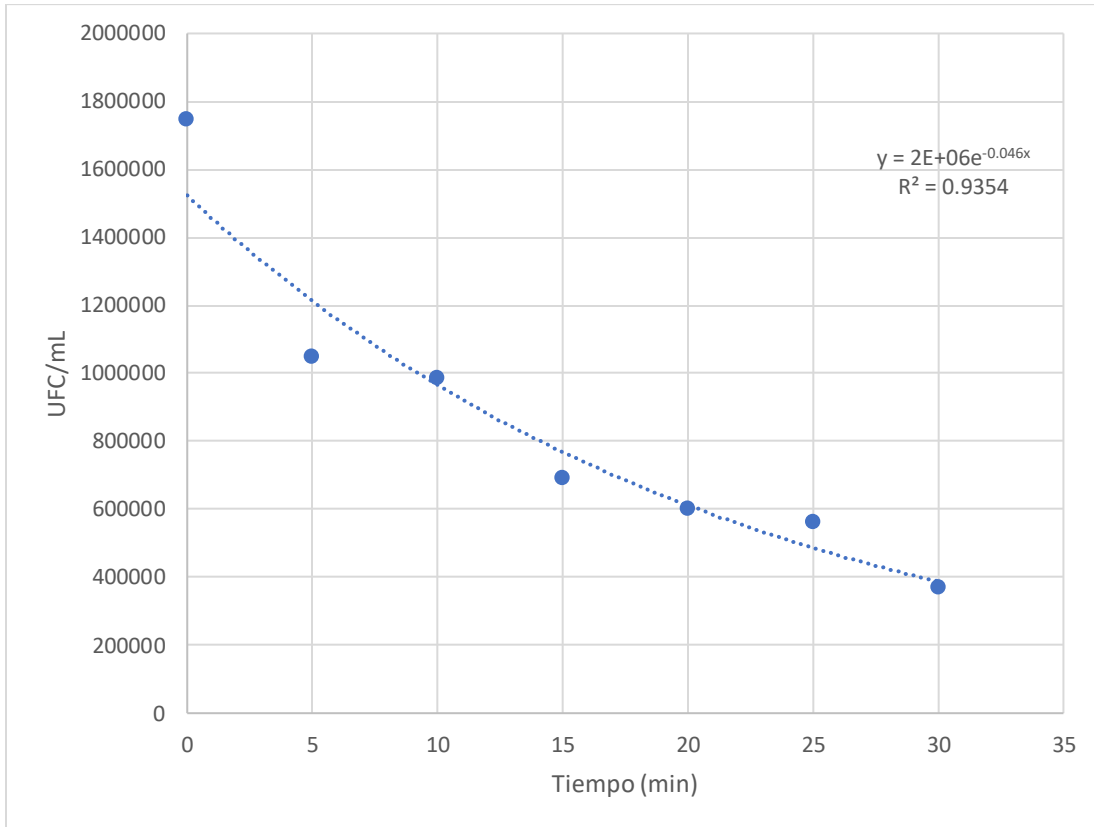
Nota: Obtenido de experimentación propia. Los puntos representan los valores experimentales del Cuadro 41 y la línea punteada, el modelo de regresión exponencial que se ajusta a los puntos según la ecuación presentada con  $R^2 = 0.9858$ . Para los datos se tomaron en total 21 muestras de 2 mL del medio de cultivo de 2 L de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), en tubos de ensayo, con una pipeta volumétrica de  $1 \pm 0.008$  mL, lo que implica una concentración inicial de  $2.680 \times 10^6$  UFC/mL. Estas se colocaron en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a  $177^\circ\text{C}$  durante los tiempos presentados en la curva, en triplicado. Se contaron las células vivas de cada una de las muestras en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, sin ningún factor de dilución, utilizando el microscopio Leica DM500, como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science, y así se obtuvo las concentraciones promedio de cada tiempo según los Cálculos 14 y 10.

**Cuadro 2.** Modelo cinético de la curva de muerte promedio de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) según el triplicado de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L

Variable	Valor
No (UFC/mL)	8.222x10 <sup>5</sup>
k (min <sup>-1</sup> )	0.061
n = orden de reacción	1
r <sub>n</sub> = expresión de la velocidad (UFC/mL*min)	$\frac{dN}{dt} = -k[N]^n$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Los datos fueron recuperados de la Figura 2 y con base en el Cálculo 14.

**Figura 3.** Curva de muerte promedio de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) según el triplicado de las pruebas de horneado de galletas con biomasa



Nota: Obtenido de experimentación propia. Los puntos representan los valores experimentales del Cuadro 46 y la línea punteada, el modelo de regresión exponencial que se ajusta a los puntos a los puntos según la ecuación presentada con  $R^2 = 0.9354$ . Para los datos se colocaron en total 21 galletas de mantequilla, con una concentración de biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) de  $1 \times 10^6$  UFC/g, en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a  $177^\circ\text{C}$  durante los tiempos presentados en el cuadro, en triplicado. Se tomó 1g de cada galleta horneada según los tiempos presentados y se diluyeron en 9mL de solución salina, en tubos de ensayo. Se mezcló bien con la ayuda del vortex mixer marca Fisher Scientific y se realizaron otras 2 diluciones, teniendo un factor de dilución de  $1 \times 10^{-3}$ . Se contaron las células vivas de cada una de las muestras en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, utilizando el microscopio Leica DM500, como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science y así se obtuvo la concentración promedio de cada tiempo según los Cálculos 14 y 10.

**Cuadro 3.** Modelo cinético de la curva de muerte promedio de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) según el triplicado de las pruebas de horneado de galletas con biomasa

Variable	Valor
No (UFC/mL)	2.000x10 <sup>6</sup>
k (min <sup>-1</sup> )	0.046
n = orden de reacción	1
r <sub>n</sub> = expresión de la velocidad (UFC/mL*min)	$\frac{dN}{dt} = -k[N]^n$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Los datos fueron recuperados de la Figura 3 y con base en el Cálculo 14.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La elección de *Bacillus subtilis* para este estudio se basa en su capacidad para sobrevivir a los procesos de producción de alimentos horneados, ya que es conocida por ser una bacteria termófila (iNaturalist, s. f.). Esta característica le otorga una ventaja como probiótico en el procesamiento de alimentos que incluyen temperaturas elevadas, permitiendo que tenga potencial para obtener al final del proceso un conteo viable suficiente para que el producto se considere un alimento probiótico (Marin et al., 2009). Para cumplir con este objetivo, se seleccionó la cepa *Bacillus subtilis* (ATCC11774), que ha sido reportada como probiótica (Srinivasa et. al., 2023). Además, esta cepa presenta un crecimiento acelerado, lo que facilita su uso en experimentación (Castañeda y Sánchez, 2016). En consecuencia, se realizó un proceso de crecimiento que se escaló comenzando con tubos de ensayo de 10 mL de medio de cultivo inoculado con *Bacillus subtilis* (ATCC11774), y finalizando con la producción de 10 L de medio en un biorreactor.

Se propusieron dos rutas para la obtención del alimento probiótico. La primera consistió en el crecimiento *Bacillus subtilis* (ATCC11774) y, tras obtener la biomasa, someterla a un proceso de liofilización para agregarla a la fórmula de las galletas de mantequilla. La segunda ruta implicó el crecimiento *Bacillus subtilis* (ATCC11774) y la posterior adición de la biomasa activa directamente a la masa de galletas. Ambas rutas fueron diseñadas con el fin de encontrar la opción que mejor se adaptara al proceso de producción de las galletas. Asegurando al mismo tiempo una concentración de  $10^6$  UFC/mL en el producto final para cumplir con los estándares necesarios para su comercialización y eficacia funcional (Marin et al., 2009).

Para la cuantificación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) activas de un medio de cultivo estándar inicial y posteriormente a un proceso de liofilización, se utilizó la técnica de unidades formadoras de colonia, y así se determinó el rendimiento de población viable luego de reconstituir el producto liofilizado. Inicialmente, se llevó a cabo una prueba antes de comenzar con la verdadera experimentación del trabajo de graduación, para comprender el funcionamiento del liofilizador de secado por bandejas marca Harvest Right, LLC. HRFD-PLrg-SS, con la configuración estándar trabajando a  $12.8\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $55\text{ }^{\circ}\text{F}$ ) y  $66.7\text{ Pa}$  ( $500\text{ mTorr}$ ) (Mamun, y Mamun, 2022). Durante este proceso, se destacó la importancia que tiene que la biomasa esté uniformemente regada sobre una bandeja con papel mantequilla. Pues como se puede observar en la Imagen 22, se colocó en una caja petri con toda la biomasa obtenida en 1 L de medio de cultivo con *Bacillus subtilis* (ATCC11774), y por el área superficial reducida, no se logró eliminar toda la humedad durante el proceso de liofilización y por lo mismo, no se logró mantener las condiciones del liofilizado a largo plazo. Ya al conocer esto, se pudo empezar con el crecimiento total de *Bacillus subtilis* (ATCC11774). Se hizo un

crecimiento a 3 escalas, para obtener un mayor rendimiento de reproducción del microorganismo. Primero se inocularon 8 tubos de ensayo, luego de 72 horas estos tubos se trasvasaron a 6 erlenmeyers de 250 mL y nuevamente, al pasar el tiempo de incubación, se añadieron al biorreactor de 15 L New Brunswick Scientific, Bioflo 415, para obtener 10 L de medio de cultivo con *Bacillus subtilis* (ATCC11774). El liofilizado de la biomasa obtenida de esta última escala, se presenta en la Imagen 28. Se realizó en duplicado de igual forma, por lo que se recuperó  $5.501 \pm 5.000 \times 10^{-4}$  g como se muestra en el Cuadro 23 y en caso de no ser suficiente para toda la experimentación, se obtuvo otros  $6.101 \pm 5.000 \times 10^{-4}$  g de los valores presentados en el Cuadro 24 de la segunda corrida de crecimiento.

La cuantificación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) del crecimiento a tercera escala, se realizó por el método indirecto de recuento de viables en placa, con agar nutritivo sólido Merck 1.11471.0500, del primer liofilizado obtenido. Este análisis se realizó en triplicado, obteniendo una concentración media inicial de  $5.084 \times 10^8$  UFC/mL, de lo cual, luego del proceso de liofilización quedó  $5.669 \times 10^7$  UFC/mL. Se establece entonces el cambio de la concentración, como la población celular que ha perdido su viabilidad, que es en promedio  $4.517 \times 10^8$ , el  $88.884 \pm 1.096$  %. Esta diferencia entre concentraciones se puede ver gráficamente en la Figura 1. La desviación estándar entre los valores presentados, de la concentración antes del proceso de liofilización, en el Cuadro 1 es de  $2.396 \times 10^7$  UFC/mL, y la de la concentración posterior al proceso, es de  $8.118 \times 10^6$  UFC/mL, por lo que el cambio de ambos tiene  $1.594 \times 10^7$  UFC/mL de desviación. Estos datos tienen valores de incertidumbres y desviación con casi el mismo orden de magnitud de los datos experimentales, por lo que es un método de cuantificación sensible y requiere de varias pruebas de la misma muestra para evitar errores (Iáñez, 2005).

Se pueden presentar fuentes de error aleatorias frecuentes, como en el caso de la contaminación del área, que no se haya esterilizado completamente, o en el caso que ya la muestra estuviera contaminada por el uso de los equipos y la muestra no siempre sale con colonias identificables para su recuento. Además de que se utilizó agar nutritivo, un medio de cultivo utilizado con frecuencia para el aislamiento de microorganismos con pocas exigencias nutritivas, lo que incluye una gran variedad de bacterias (MCD, s.f.). Otro factor que también pudo afectar en la cuantificación exclusiva de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), y por lo que se repitió varias veces el análisis para obtener los resultados. A pesar de esto, se puede observar el tamaño, consistencia y forma de las colonias presentadas en la Imagen 24, que al comparar con la Imagen 21, que es de la multiplicación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), desde su fuente original, en caja petri con agar nutritivo sólido, se observan similares. Tomando en cuenta el factor de dilución involucrado, la única diferencia identificada es la pigmentación, lo que ocurre en ciertas ocasiones por las condiciones a las que fue sometido el medio de cultivo. La pigmentación se puede dar dentro de la célula o disperso en el medio de cultivo, sin inhibir el crecimiento de la bacteria *Bacillus subtilis* (Villanueva et. al., 2013).

Para comprobar la resistencia de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), en un proceso de horneado, para determinar la viabilidad de su uso en procesos con altas temperaturas y encontrar la dependencia del rendimiento con el tiempo horneado, se realizaron pruebas con medio de cultivo de 2 L inoculado, Imagen 31. Las condiciones utilizadas fueron las mismas establecidas para la formulación de galletas, 177 °C y variación de tiempos de horneado desde 0 hasta 30 minutos, debido a que el tiempo ideal de las galletas de mantequilla a trabajar es de 15 min, se decidió abarcar un rango de análisis del doble del tiempo requerido. Asimismo, confirmar esto antes de empezar con la experimentación, se realizó una prueba de las galletas a utilizar próximamente para estar seguros de la temperatura y los tiempos a utilizar (García, 2020). Como evidencia, está la Imagen 30. Se tomaron 21 muestras de 2 mL en tubos de ensayo parcialmente cerrados, para sacar del horno eléctrico Oviedo Indurama, 3 de ellas cada 5 minutos y tener resultados del análisis en triplicado.

Para la cuantificación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) luego de este proceso, se utilizó el método directo de la cámara de recuento Neubauer, con solución 0.4 % azul tripán - solución salina R's Science, como indicador de viabilidad en el microscopio Leica DM500. Este método fue seleccionado para presentar los resultados debido a la variación tan alta en las muestras de recuento de viables en placa que se muestra en las Imágenes 32, 34 y 38. La concentración media alcanzada en el crecimiento de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) fue de  $2.680 \times 10^6 \pm 6.928 \times 10^4$  UFC/mL, según los valores del recuento en triplicado del Cuadro 27. Ya con esto, a los 3 días que se realizaron las pruebas de horneado, donde se obtuvo una concentración promedio inicial de  $8.567 \times 10^5$  UFC/mL con una desviación estándar de  $2.082 \times 10^4$  UFC/mL. Agregando tiempo en el horno, a los 5 min se obtuvo  $6.533 \times 10^5$  UFC/mL con una desviación estándar de  $5.774 \times 10^3$  UFC/mL; a los 10 min, bajó a  $4.400 \times 10^5$  UFC/mL con  $1.000 \times 10^4$  UFC/mL de desviación; en el minuto 15 de horneado, se tuvo  $2.667 \times 10^5$  UFC/mL con desviación de  $1.528 \times 10^4$  UFC/mL; a los 20 min se mantuvo casi igual en  $2.567 \times 10^5$  UFC/mL con  $1.155 \times 10^4$  UFC/mL de desviación; 25 min y llega a  $1.667 \times 10^5$  UFC/mL con la misma desviación estándar que la anterior, y por último; en 30 min, se obtuvo  $1.467 \times 10^5$  UFC/mL con  $2.517 \times 10^4$  UFC/mL de desviación. Todos estos datos se presentan en el Cuadro 43 y se pueden observar mejor en la curva de muerte promedio de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) de la Figura 2, donde se presenta un modelo exponencial que se ajusta a los resultados con un  $R^2 = 0.9858$ . Esto da un resultado positivo sobre el ajuste del modelo a los datos, al ser cercano a 1, se puede decir que la variabilidad entre los datos está explicada casi en su totalidad por la ecuación que incluye.

Vale la pena mencionar, que, en la mayoría de los casos, las bacterias por encima de 63 °C empiezan a perder viabilidad. *Bacillus subtilis* es una bacteria termófila, lo que la caracteriza por presentar rendimiento entre 50 y 75 °C, pero tiene temperaturas máximas de 80-113 °C (Iáñez, 2005). En base a esto y a la

experimentación, se destaca que *Bacillus subtilis* (ATCC11774) no resiste a la temperatura de 177 °C como para ser incorporado, con la concentración deseada, a un proceso de alimentos horneados. Pues, aunque si sigue una fracción de las células viable, no cumple con los requisitos para considerarse un alimento con probióticos. Debería tener una concentración mínima de  $10^6$  UFC/mL, durante el tiempo de vida útil de los microorganismos y del producto (Marin et al., 2009). El problema se vuelve aún más crítico al considerar que la concentración de microorganismos tiende a disminuir durante el tiempo de almacenamiento. Hay que tomar en cuenta que la humedad restante en el ambiente del microorganismo también afecta. Al someterse a condiciones de horneado, la humedad residual es mínima abajo del 7 %, y *Bacillus subtilis* es altamente susceptible a la desecación. En ambientes muy secos, pierden viabilidad rápidamente debido a la deshidratación de sus estructuras celulares, lo que afecta la viabilidad de los probióticos y pone en riesgo cumplir con los niveles mínimos requeridos a lo largo de la vida útil del producto (Yáñez, 2012).

Los errores que se pueden presentar en esta parte, y en la siguiente, de la experimentación son prácticamente los mismos. Errores aleatorios de contaminación, así como también hay ciertos problemas o desventajas al momento de utilizar el conteo en cámara Neubauer. Entre esto resalta la alta varianza en las mediciones realizadas, por la sensibilidad tanto del equipo como de las muestras. Por lo mismo, se requiere de varias pruebas de la misma muestra para evidenciar cualquier error que se presente. Así como que es un proceso fatigante para la vista del humano y puede afectar en el conteo al realizar demasiados análisis seguidos (García, 2011).

Para comprobar la resistencia de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) aplicada a una galleta en un proceso de horneado, y para establecer de la misma manera la viabilidad de su uso en procesos con temperaturas entre el rango de cocción de galletas, encontrando la dependencia del rendimiento con el tiempo horneado, se realizaron pruebas con la biomasa obtenida del medio de cultivo de 2 L. Las condiciones utilizadas fueron las mismas establecidas para las pruebas del medio de cultivo, 177 °C y variación de tiempos de horneado desde 0 hasta 30 minutos. Se preparó una masa de galletas a base de mantequilla, considerando que una matriz lipídica estable puede contribuir a la protección de los microorganismos durante el horneado. Además, la mantequilla es un ingrediente fundamental en la formulación de galletas, ya que mejora su textura y sabor. Su uso también permitió una receta más sencilla y accesible para la experimentación. Se calculó una receta para tener 21 galletas de aproximadamente  $6.14 \pm 5.000 \times 10^{-4}$  g. Estas galletas se colocaron en una bandeja del horno eléctrico Oviedo Indurama, sobre papel mantequilla, para sacar 3 de ellas cada 5 minutos y tener resultados del análisis en triplicado.

Igual que en el proceso anterior, para la cuantificación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) en las galletas horneadas, se utilizó el método directo de la cámara de recuento Neubauer, con solución 0.4 % azul tripán - solución salina R's Science, como indicador de viabilidad en el microscopio Leica DM500. La

concentración media con la que se trabajó de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), como ya se mencionó, fue de  $2.680 \times 10^6 \pm 6.928 \times 10^4$  UFC/mL, según los valores del recuento en triplicado del Cuadro 27. La concentración promedio inicial de esta prueba fue de  $1.747 \times 10^6$  UFC/mL con una desviación estándar de  $1.021 \times 10^5$  UFC/mL. Agregando tiempo en el horno, a los 5 min se obtuvo  $1.050 \times 10^6$  UFC/mL con una desviación estándar de  $4.359 \times 10^4$  UFC/mL; a los 10 min, bajó a  $9.867 \times 10^5$  UFC/mL con  $6.506 \times 10^4$  UFC/mL de desviación; en el minuto 15 de horneado, se tuvo  $6.933 \times 10^5$  UFC/mL, con desviación de  $1.528 \times 10^4$  UFC/mL; a los 20 min fue de  $6.033 \times 10^5$  UFC/mL, con  $3.055 \times 10^4$  UFC/mL de desviación, a los 25 min llegó a  $5.633 \times 10^5$  UFC/mL, con la desviación estándar de  $4.041 \times 10^4$  UFC/mL; y por último, en 30 min, se obtuvo  $3.700 \times 10^5$  UFC/mL con  $3.000 \times 10^4$  UFC/mL de desviación. Todos estos datos se presentan en el Cuadro 48 y se pueden observar mejor en la curva de muerte promedio de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) de la Figura 3, donde se presenta un modelo exponencial que se ajusta a los resultados con un  $R^2 = 0.9354$ . Esto da un resultado sobre el ajuste del modelo a los datos bajo, no lo suficiente como para deducir que la variabilidad entre los datos está explicada casi en su totalidad por la ecuación que incluye. Esto se debe a que, en este caso, hay una matriz alimentaria a la cual se agregó el probiótico y altera sus cambios conforme el tiempo de horneado. Los *Bacillus subtilis* consumen nutrientes disponibles en el entorno para sobrevivir y reproducirse, incluso después de haber sido añadidos al alimento, por lo que tiene una fuente de nutrientes mientras al mismo tiempo la temperatura empieza a degradar su estructura y no es tan fluida la curva de muerte (Ospat, 2022).

Los parámetros del modelo cinético para las pruebas de horneado del medio de cultivo estándar, de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), se presentan en el Cuadro 2. El valor de la constante cinética  $k$  es de 0.061 y se encuentra negativa, pues la población viable de la bacteria está disminuyendo con el tiempo por el proceso de horneado. De la misma manera, se muestra el modelo para las pruebas de galletas horneadas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774). Para esta adaptación, el valor de  $k$  es 0.046, negativo. Ambos valores indican que la reducción de viabilidad de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) es más rápida en el medio de cultivo que en las galletas. Esto podría deberse a diferencias en la matriz, en el caso de la masa que retiene cierto calor del aplicado, y proporciona protección a las células bacterianas durante el proceso de horneado. Mientras que en el caso del medio de cultivo no hay nada que proteja a la bacteria de la temperatura, lo que resulta en una mayor tasa de muerte. A pesar de la diferencia, esta es relativamente pequeña, lo que indica que, aunque el entorno de las galletas sea más favorable, sigue habiendo una disminución considerable en la viabilidad de las bacterias. Para obtener una concentración final de  $10^6$  UFC/mL, tomando en cuenta los valores del modelo cinético del horneado de galletas, se necesitaría aproximadamente una concentración inicial de  $1.994 \times 10^6$  UFC/mL, lo que implica 0.150 g de biomasa por galleta, representando un 2.385 % del peso total. Esto podría ser un limitante de rentabilidad, que debe estudiarse a detalle.

La constante indica la tasa de reducción en el conteo de microorganismos, es decir, la correlación entre el cambio de la concentración de la cepa al inicio y al final. Los resultados sugieren que, en un medio de cultivo líquido, esta reducción es más rápida. Mientras que, en la masa, el proceso de transferencia de calor es más lento. Sin embargo, en ambos casos se observa una disminución en el conteo. De hecho, antes de alcanzar el tiempo mínimo necesario para cocer la masa, la concentración ya se reduce a un nivel inferior al requerido para que el producto pueda clasificarse como un alimento probiótico. Algunas de las desventajas que pueden afectar el ajuste de los modelos cinéticos planteados a los resultados, es que se requiere una gran cantidad de datos y exactitud de los mismos, pues es a partir de ellos se obtiene la velocidad de reacción. Además de los errores aleatorios mencionados anteriormente.

Los resultados obtenidos en este estudio permiten establecer varias conclusiones importantes. En primer lugar, los modelos desarrollados facilitan el cálculo de la concentración inicial de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) que debe agregarse al producto, lo que es clave para asegurar que se alcance la concentración deseada al final del proceso de horneado. Además, se resalta la necesidad de complementar este análisis con un estudio sobre la viabilidad de la cepa a lo largo del tiempo de almacenamiento, para garantizar que, antes de la fecha de vencimiento, el alimento mantenga su característica probiótica. Estos hallazgos plantean la posibilidad de realizar investigaciones adicionales que consideres otros factores que puedan influir en la estabilidad y efectividad del producto final.

## IX. CONCLUSIONES

1. La cuantificación del promedio de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) activas de un medio de cultivo estándar fue de  $5.084 \times 10^8 \pm 2.396 \times 10^7$  UFC/mL. Tras un proceso de liofilización, la concentración disminuyó a  $5.669 \times 10^7 \pm 8.118 \times 10^6$  UFC/mL, lo que indica que la población celular que perdió viabilidad fue en promedio de  $4.517 \times 10^8 \pm 1.594 \times 10^7$ , representando una reducción en la viabilidad de  $88.884 \pm 1.096$  %. Estos resultados muestran que el rendimiento de la población viable, después de reconstituir el producto liofilizado, no es funcional para formular alimentos con esta cepa.
2. Cuando *Bacillus subtilis* (ATCC11774) en medio de cultivo fue sometida a un proceso de horneado durante 15 minutos, redujo su viabilidad en un  $68.872 \pm 18.740$  %. Este comportamiento puede ser predicho mediante un modelo exponencial de la curva de muerte promedio, el cual se ajusta con una constante cinética de reacción de  $-0.061 \text{ min}^{-1}$  a los resultados con un  $R^2 = 0.9858$ , evidenciando el comportamiento acelerado de la lisis celular durante el proceso de horneado.
3. Al agregar biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) a una galleta, después de 15 minutos de horneado, se observó una reducción en su viabilidad de  $60.305 \pm 6.483$  %. Esto sugiere que la matriz alimentaria influye en la viabilidad del probiótico. Este comportamiento también se modela mediante una curva exponencial de muerte, el cual se ajusta con una constante cinética de reacción de  $-0.046 \text{ min}^{-1}$  con un ajuste a los resultados de  $R^2 = 0.9354$ . Evidenciando un comportamiento más lento de lisis celular durante el proceso de horneado, en comparación con la del medio líquido.

## X. RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio sobre el impacto de las condiciones de liofilización en la viabilidad de *Bacillus subtilis*, con el objetivo de definir un procedimiento que maximice la cantidad de células viables en el producto liofilizado.
2. Determinar la relación entre la concentración inicial de *Bacillus subtilis* y el decaimiento de su viabilidad tras las pruebas de liofilización y horneado es clave para ajustar dichas concentraciones iniciales, maximizando así la supervivencia de la cepa en el producto final.
3. Validar experimentalmente la concentración final deseada utilizando una concentración inicial de  $1.994 \times 10^6$  UFC/mL.
4. Incluir pruebas con otros métodos de procesamiento, como el congelamiento y el mezclado, para evaluar si estos procesos afectan la viabilidad de *Bacillus subtilis* durante la producción de galletas.
5. Realizar pruebas de resistencia al horneado en esporas de *Bacillus subtilis*, induciéndolas mediante la adición de decoyina o hadacidina.
6. Realizar un estudio sobre los efectos en la salud de consumir dosis de *Bacillus subtilis* inferiores a  $10^6$  UFC/mL, evaluando su impacto en la funcionalidad probiótica.
7. Analizar el comportamiento de *Bacillus subtilis* después del horneado de la galleta para evaluar su viabilidad a lo largo de la vida útil del producto.
8. Evaluar la influencia de las condiciones de almacenamiento sobre la viabilidad de *Bacillus subtilis* en productos horneados, con el fin de establecer el tiempo máximo de conservación en función de su estabilidad como probiótico. Esto permitirá definir prácticas que aseguren la funcionalidad del microorganismo y garanticen sus beneficios para el consumidor durante la vida útil del producto.
9. Estudiar el comportamiento de otras cepas reportadas como probióticos para determinar la influencia que tiene la temperatura sobre su decaimiento poblacional, con el fin de formular alimentos funcionales que garanticen la concentración de los microorganismos ante la ingesta del consumidor.
10. Comparar el tiempo de viabilidad de almacenamiento de *Bacillus subtilis* con el de otras cepas probióticas, y analizar si alguna presenta mayor potencial para su inclusión en productos funcionales, considerando sus ventajas comparativas en términos de almacenamiento y funcionalidad.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Acura. (2024). *Biorreactores o fermentadores industriales: Tipos y características*. Grupo Acura. <https://grupoacura.com/es/blog/biorreactores/>
- Bahena, L. (2023). *Cada vez más consumidores están interesados en alimentos funcionales*. THE FOOD TECH - Medio de noticias líder en la Industria de Alimentos y Bebidas. <https://thefoodtech.com/normatividad-y-certificaciones/cada-vez-mas-consumidores-estan-interesados-en-alimentos-funcionales/>
- Barnalab. (2018). *Qué es la liofilización | Proceso de liofilización*. Barnalab Liofilizados. <https://www.barnalab.com/que-es-la-liofilizacion/>
- Beltrán, M. (2016). *Alimentos funcionales*. Farmacia Profesional. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-alimentos-funcionales-X0213932416546681>
- Berenguer, E. (s. f.). *Galletas*. Universitas Miguel Hernandez. <https://badali.umh.es/assets/documentos/pdf/artic/galletas.pdf>
- Bionity. (2023). Microbio del año 2023: Bacillus subtilis - para la salud y la tecnología. *El Bacillus subtilis ya es indispensable en muchas industrias y se esperan muchas más innovaciones*. <https://www.bionity.com/es/noticias/1179022/microbio-del-ano-2023-bacillus-subtilis-para-la-salud-y-la-tecnologia.html>
- Brito, H. (2016). Fig. 1.3.10-1. *Ciclo de la liofilización*. ResearchGate. [https://www.researchgate.net/figure/10-1-Ciclo-de-la-liofilizacion\\_fig9\\_314808506](https://www.researchgate.net/figure/10-1-Ciclo-de-la-liofilizacion_fig9_314808506)
- Cartagena99 (s.f.). *Cinética química: Tema 2 – Velocidad de reacción*. <https://www.cartagena99.com/recursos/alumnos/apuntes/Apuntes%20Tema%202-Velocidad%20Reaccion.pdf>
- Castañeda, E. y Sánchez, L. (2016). *Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género Bacillus sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre Fusarium sp.* Nova, 14(26), 53-62. Recuperado 9 agosto, 2024 [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702016000200006&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702016000200006&lng=en&tlng=es).

C. Lozano, L. Ramírez, L. Corrales y Suárez, D. Trujillo. (2021). *Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química*. Nova, 19(36), 49-94. Epub January 17, 2021. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>

Codex Alimentarius. (2018). *Documento de debate sobre las directrices armonizadas sobre el uso de probióticos en alimentos y complementos alimenticios*. FAO. [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-720-40%252FWD%252Fnf40\\_12s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-720-40%252FWD%252Fnf40_12s.pdf)

ControlBio. (2015). *Uso de bacillus subtilis como biofungicida en agricultura y jardinería*. [https://controlbio.es/es/blog/c/76\\_uso-de-bacillus-subtilis-como-biofungicida-en-agricultura-y-jardineria.html](https://controlbio.es/es/blog/c/76_uso-de-bacillus-subtilis-como-biofungicida-en-agricultura-y-jardineria.html)

El Crisol. (2017). *Centrífugas para laboratorio y tipos de centrifugación*. El Crisol. <https://elcrisol.com.mx/blog/post/centrifugas-para-laboratorio-tipos-centrifugacion>

Espitia, K. (2022). *Diseño y formulación de productos probióticos*. Universidad de Cartagena, facultad de ciencias farmacéutica. <https://repositorio.unicartagena.edu.co/server/api/core/bitstreams/11742947-f68a-46bd-a774-dc855690c0e7/content>

fbioyf. (2019). *Trabajo práctico No. 3 Identificación bacteriana*. Fbioyf. [https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/183670/mod\\_resource/content/1/2019%20TP3%20FARMACIA.pdf](https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/183670/mod_resource/content/1/2019%20TP3%20FARMACIA.pdf)

Floratil. (2021). *Breve historia de los probióticos: del yoghurt a los probióticos farmacéuticos*. Floratil MX. <https://floratil.mx/breve-historia-de-los-probioticos-del-yoghurt-a-los-probioticos-farmacaceuticos/>

Fundacion iO. (2020). *Bacillus* - Fundación IO. Fundación iO. <https://fundacionio.com/salud-io/enfermedades/bacterias/bacillus/#:~:text=subtilis%3A%20meningitis%20postraum%C3%A1tica%2C%20otitis%2C,una%20derivaci%C3%B3n%20ventricular%2C%20gastroenteritis%20emetizante.>

García, E. (2020). *Receta de galletas con tres ingredientes*. Gastronomía. <https://www.20minutos.es/noticia/4127540/0/galletas-solo-tres-ingredientes-las-mas-faciles-de-hacer/>

Garcia, O. (2011). ES2405938A2 - *Sistema de conteo de partículas adaptable a un instrumento óptico*. - Google Patents. <https://patents.google.com/patent/ES2405938A2/es>

GIDOLQUIM. (2014). Tema 4. *El proceso de la liofilización* | Técnicas y operaciones avanzadas en el Laboratorio químico (TALQ). Univeritat de Barcelona. <https://www.ub.edu/talq/es/node/261>

- Grauer, A., Grunberg, K., & Zardo, S. (2015). *Puesta a punto de un protocolo de liofilización para la creación de bancos bacterianos*. Universidad ORT Uruguay. <https://rad.ort.edu.uy/server/api/core/bitstreams/a62fa677-0b47-4490-8202-6768905f9717/content>
- Hernández, O. (2022). *¿Cómo se realiza un conteo en una cámara Neubauer o Petroff-Hauser?* <https://www.studocu.com/es-mx/document/universidad-autonoma-de-guerrero/bacteriologia/tarea-para-el-lunes-12-de-septiembre-del-2022/34636674>
- Iáñez, E. (2005). *Agentes físicos*. <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm>
- Iáñez, E. (2005, Mayo 9). *Ciclo celular y crecimiento*. <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm>
- iNaturalist. (s. f.). *Bacillus subtilis*. iNaturalist Ecuador. <https://ecuador.inaturalist.org/taxa/245605-Bacillus-subtilis>
- Instituto de la Galleta. (2023). *Energía saludable*. Instituto de la Galleta, Nutrición y Salud. <http://institutodelagalleta.com/energiaSaludable.php#:~:text=Las%20galletas%20son%20un%20alimento,una%20dieta%20equilibrada%20y%20saludable.>
- K. H. Srinivasa, M. Ganapathi Naik, M. S. Jayashri, K. B. Kushala, H. Harshitha, K. S. Darshan, S. B. Dheeraj, M. S. Nithin, S. K. Girisha and T. Suresh (2023) *Probiotic potential of Lactobacillus rhamnosus (ATCC 53103), Bacillus subtilis (ATCC 11774) and Sacchromyces cerevisiae (PS 42571-1) with antagonistic activity, safety and pathogenicity assessments on Pangasianodon hypophthalmus*. J. Exp. Zool. India 26, 957-965. DOI: <https://doi.org/10.51470/jez.2023.26.1.957>, DocID: <https://connectjournals.com/03895.2023.26.957>
- Levenspiel, O. (2004). *Ingeniería de las reacciones químicas*. 3ra. Edición. Editorial Limusa, S.A. México.
- Mamun, y Mamun. (2022). *HARVEST RIGHT Pharma Freeze dryer manual del propietario de 10.25 pies cuadrados*. Manuals+. <https://manuals.plus/es/harvest-right/pharma-freeze-dryer-10-25-sq-ft-manual#axzz8JIOIpdMX>
- Marin A, Cortéz R, Misael, y Montoya C, Olga I. (2009). *Evaluación de la viabilidad de crecimiento de la cepa nativa lactobacillus plantarum lpbm10 y la cepa comercial lactobacillus casei atcc 393 en pulpa de uchuva y en solución isotónica de glucosa*. Vitae, 16(2), 210-217. Recuperado 29 de agosto, 2024 [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-40042009000200005&lng=en&tlng=es.](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042009000200005&lng=en&tlng=es)

MCD. (s.f.). Agar Nutritivo. MCD Lab.  
[https://mcd.com.mx/index.php?controller=attachment&id\\_attachment=22671](https://mcd.com.mx/index.php?controller=attachment&id_attachment=22671)

Medina-Saavedra, Tarsicio, Arroyo-Figueroa, Gabriela, Herrera-Méndez, Carlos, y Mexicano-Santoyo, Lilia. (2017). *Bacillus subtilis como probiótico en avicultura: aspectos relevantes en investigaciones recientes*. *Abanico veterinario*, 7(3), 14-20. <https://doi.org/10.21929/abavet2017.73.1>

Mitani, T. (1977). *Induction of sporulation in Bacillus subtilis by decoyinine or hadacidin*. *Science Direct*.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006291X77800946>

Mordor Intelligence. (2022). *Mercado de alimentos funcionales* Insights.  
<https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/global-functional-food-market#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20tan%20grande%20es%20el,212.85%20mil%20millones%20p ara%202028>.

Muñoz, J., y Abad, J. (2016). *Control de viabilidad celular*. ASAV. <https://www.asav.es/wp-content/uploads/2016/05/Taller-3-ControldeViabilidadcelular-Jorge-Munoz-Juan-Carlos-Abad.pdf>

New Brunswick Scientific. (2024). *Sip fermentation system*. New Brunswick Scientific.  
<https://www.somatco.com/BioFlo-415-Fermenter.pdf>

NORMON. (2019). *¿Cómo actúan los probióticos en la flora intestinal?* NORMO.  
<https://www.normon.es/articulo-blog/como-actuan-probioticos-flora-intestinal>

Ordoñez, A. (s.f.). *Diagrama de Flujo de Elaboración de Galleta*. Scribd.  
<https://www.scribd.com/document/482854513/Diagrama-de-Flujo-de-elaboracion-de-Galleta>

Ospat. (2022). *Bacillus subtilis: la bacteria que alojada en el intestino podría prolongar la vida humana*. OSPAT. <https://www.ospat.com.ar/blog/medicina/bacillus-subtilis-la-bacteria-que-podria-prolongar-la-vida-humana/>

Pineda, D. y Villamizar, S. y Rueda-Forero, Nohora & Reyes, E. y Suarez, M. (2019). *Formulación de un medio de cultivo para la producción de  $\delta$ -endotoxinas de Bacillus thuringiensis*. *UstaSalud*. 17. 34-39. 10.15332/us.v17i0.2185.

Puleva. (s. f.). *El yogur, alimento funcional de primera necesidad*. Recuperado 15 de noviembre de 2023, de <https://www.lechepuleva.es/todo-sobre/la-leche/yogur>

Química.ES. (2024). *Lisis*. Recuperado 19 de septiembre, 2024, from <https://www.quimica.es/enciclopedia/Lisis.html>

- Ridgeway, B. (2013). *Organismos y sus aplicaciones en los indicadores biológicos*. Tiselab, 10(1). <https://www.tiselab.com/spore%20news/spore%20news%2010.1.pdf>
- Ritter, A., Folmer, A., Fonseca, F., y Brandelli, A. (2018). *Characterization of Bacillus subtilis available as probiotics*. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul. [https://www.researchgate.net/profile/Ana-Ritter/publication/325531928\\_Characterization\\_of\\_Bacillus\\_subtilis\\_Available\\_as\\_Probiotic/links/5b12af7b0f7e9b498104ef25/Characterization-of-Bacillus-subtilis-Available-as-Probiotic.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Ana-Ritter/publication/325531928_Characterization_of_Bacillus_subtilis_Available_as_Probiotic/links/5b12af7b0f7e9b498104ef25/Characterization-of-Bacillus-subtilis-Available-as-Probiotic.pdf)
- Rossi, A. (2022). *Nutritivo Caldo*. Laboratorios Britania. [https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_6070769bd7fef.pdf](https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070769bd7fef.pdf)
- Rovira, M. (2023). *Medios de Cultivo*. Microbiología Para Humanos. <https://microbiologiaparahumanos.wordpress.com/medios-de-cultivo/>
- Sanitas. (s. f.). *Alimentos funcionales*. Sanitas. Recuperado 15 de noviembre de 2023, de <https://www.sanitas.es/biblioteca-de-salud/dieta-alimentacion/alimentos/alimentos-funcionales>
- Skoog, D. D West, F. Holler & S. Crouch. (2010). *Química Analítica*. 8va. edición. Cengage Learning, México, D.F.
- SOPs. (2013). *Conteo celular y evaluación de viabilidad*. Creative Commons. [https://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell\\_counts\\_SPA.pdf](https://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf)
- Statista. (2024). *Snacks: consumo per cápita global por segmento 2023* | Statista. <https://es.statista.com/estadisticas/1350295/consumo-per-capita-de-snacks-a-nivel-mundial-por-segmento/#:~:text=Consumo%20per%20c%C3%A1pita%20de%20snacks%20a%20nivel%20mundial%20por%20segmento%202023&text=En%202023%2C%20se%20consumieron%20a.m%C3%A1s%20popular%20entre%20la%20poblaci%C3%B3n.>
- Tech, R. T. F. (2022). *Alimentos funcionales y nutraceuticos, una tendencia que sigue en aumento*. THE FOOD TECH - Medio de Noticias Líder En la Industria de Alimentos y Bebidas. <https://thefoodtech.com/tecnologia-de-los-alimentos/alimentos-funcionales-y-nutraceuticos-una-tendencia-que-sigue-en-aumento/>
- Valera, J. G. (2022). *Probióticos: qué son, para qué se usan y cuándo hay que tomarlos*. CuidatePlus. <https://cuidateplus.marca.com/bienestar/2020/12/30/probioticos-son-hay-tomarlos-176079.html>
- Villanueva-Arce, R., Aguilar-Pompa, C. A., Gómez y Gómez, Y. de las M., Valencia-Del Toro, G., Piña-Guzmán, A. B., & Bautista-Baños, S. (2013). *Control de bacterias patógenas y hongos de postcosecha con extractos del pigmento de Gibberella zeae (Fusarium graminearum)*. Agrociencia, 47(7), 691-705.

Recuperado en 15 de septiembre de 2024, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952013000700006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952013000700006&lng=es&tlng=es).

Villanueva, R. (2015). *Probióticos: una alternativa para la industria de alimentos*. Universidad de Lima. [https://revistas.ulima.edu.pe/index.php/Ingenieria\\_industrial/article/view/545](https://revistas.ulima.edu.pe/index.php/Ingenieria_industrial/article/view/545)

WGO. (2011). *Probióticos y prebióticos*. Guías Mundiales De La WGO. <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-spanish-2011.pdf>

Yáñez, V. (2012). *Potencial de la cepa CPA-8 de Bacillus subtilis como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de fruta*. Universitat De Lleida. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/80456/Tvrym1de1.pdf>

## XII. APÉNDICE

### A. Datos de placa

**Cuadro 4.** *Datos de placa de la campana de extracción de gases*

Equipo	Campana de flujo
Marca	SerProma
Tipo	Clase 100
Modelo	CF1H600
Voltaje	115 V
Amperaje	4 A
Frecuencia	60 Hz

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 5.** *Datos de placa de la balanza analítica*

Equipo	Balanza analítica
Marca	OHAUS
Tipo	Pioneer
Capacidad	160 g
Incertidumbre	$\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g
Modelo	PX163
Serie	C122853906

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 6.** *Datos de placa del agitador magnético con calentamiento*

Equipo	Agitador magnético con calentamiento
Marca	Thermo Scientific
Modelo	CIMAREC
Velocidad	50 – 1500 rpm

Rango temperatura	0-540 °C
-------------------	----------

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 7.** *Datos de placa del autoclave*

Equipo	Esterilizador a vapor
Marca	Precisa
Tipo	Tuttbauer
Modelo	2840 ELV
Serie	191110541
Presión máx.	2.8 bar
Voltaje	230 V
Amperaje	10 A
Frecuencia	60 Hz
Potencia	2.4 kW

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 8.** *Datos de placa de la incubadora*

Equipo	Incubadora
Marca	LAB-LINE
Tipo	Imperial III
Modelo	310
Serie	0599-0437
Voltaje	120 V
Amperaje	500 A
Frecuencia	50/60 Hz
Potencia	600 W

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 9.** *Datos de placa del shaker*

Equipo	Agitador incubadora
Marca	New Brunswick Scientific
Tipo	Serie 25
Modelo	G-25
Serie	890614928
Voltaje	120 V
Frecuencia	50/60 Hz
Potencia	1200 W

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 10.** *Datos de placa del biorreactor*

Equipo	Fermentador industrial de tanque agitado
Marca	New Brunswick Scientific
Tipo	Bioflo 415
Modelo	33611
Capacidad	15.6 L

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 17.** *Fotografía del biorreactor utilizado en la experimentación*



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 11.** *Datos de placa de la centrifuga de 1000 mL*

Equipo	Centrifugadora
Marca	Sorvall
Modelo	RT7
Capacidad	1 L
Rpm máx.	4000

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 12.** *Datos de placa de la centrifuga de 400 mL*

Equipo	Centrifugadora
Marca	Eppendorf
Modelo	5804 R
Versión	15 amp
Capacidad	400 mL
Serie	0033302
Velocidad máx.	14000 min <sup>-1</sup>
Energía cinética	27450 Nm
Densidad del líquido máx.	1.2 kg/dm <sup>3</sup>
Voltaje	120 V
Amperaje	12 A
Frecuencia	60 Hz
Potencia	1300 W
Presión de operación	25 bar

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 13.** *Datos de placa del liofilizador*

Equipo	Liofilizador de secado por bandejas
Marca	Harvest Right, LLC
Modelo	HRFD-PLrg-SS
Serie	05924
Voltaje	115 V

Frecuencia	60 Hz
Amperaje	20 A
Bomba de vacío	2.0 – 7.0 Psi
Presión máx.	2.8 MPa
Presión min.	0.44 MPa

Nota: Datos obtenidos del Manual del equipo.

**Imagen 18.** *Fotografía del liofilizador utilizado en la experimentación*



Nota: Imagen obtenida del manual del equipo que se utilizó para realizar el análisis (Mamun, y Mamun, 2022).

**Cuadro 14.** *Datos de placa del horno de convección por gravedad*

Equipo	Horno de convección por gravedad
Marca	Symphony
Tipo	VWR
Serie	001FCAC5
Temperatura de operación	60 °C

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 15.** *Datos de placa del horno de convección por gravedad*

Equipo	Horno de convección por gravedad
Marca	Symphony
Tipo	VWR
Serie	001FCAC5
Temperatura de operación	60 °C

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 16.** *Datos de placa del horno eléctrico*

Equipo	Horno eléctrico
Marca	Indurama
Modelo	Oviedo
Tipo	Quarzo

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 17.** *Datos de placa del refrigerador*

Equipo	Refrigerador
Marca	Whirpool
Modelo	WT1800N
Capacidad	504 L
Sistema de deshielo	Automático/ Ajustable
Consumo de Energía	454 kWh/año
Límite de consumo de Energía	478 kWh/año

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 18.** *Datos de placa del vortex*

Equipo	Vortex mixer
Marca	Fisher Scientific
Serie	091130019
Voltaje	115 V
Frecuencia	50/60 Hz

Potencia	150 W
----------	-------

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 19.** *Datos de placa del microscopio*

Equipo	Microscopio
Marca	Leica
Modelo	DM500

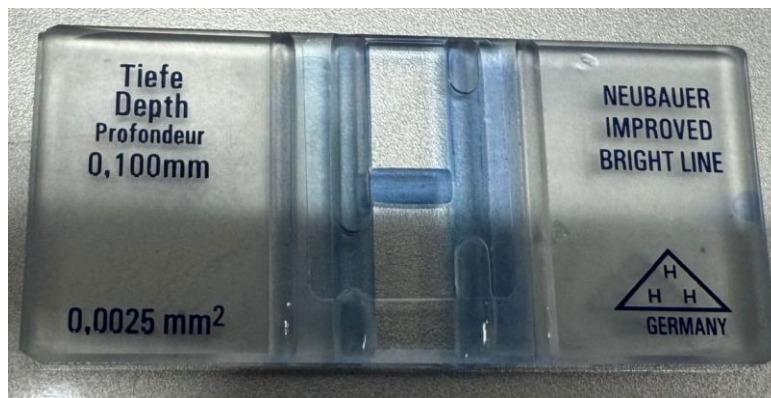
Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Cuadro 20.** *Datos de placa de la cámara de Neubauer*

Equipo	Hemacitómetro Neubauer
Marca	R's Science

Nota: Datos obtenidos del Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 19.** *Fotografía del cámara Neubauer utilizado en la experimentación*



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

## B. Datos originales

**Cuadro 21.** *Cuantificación UFC antes y después del proceso de liofilización de Bacillus subtilis (ATCC11774)*

Corrida	Colonias contadas antes de la liofilización ( $\pm 1$ UFC)	Colonias contadas después de la liofilización ( $\pm 1$ UFC)
1	100	12
2	91	9
3	96	11

Nota: Obtenido de experimentación propia. La cuantificación de unidades formadoras de colonia por mL se realizó con el método de recuento de viables en placa, con agar nutritivo Merck 1.11471.0500, en base a un factor de dilución de  $1.882 \times 10^{-6}$  y un inóculo en la caja petri de 0.1 mL. El proceso de liofilizado se realizó en un liofilizador de secado por bandejas marca Harvest Right, LLC. HRFD-PLrg-SS, con una presión de vacío de 500 mTorr y a una temperatura de congelación de  $-4$  °C, durante un ciclo de 9.7 horas. El liofilizado utilizado para el análisis fue el primero obtenido, sus datos se presentan en el Cuadro 23.

**Cuadro 22.** *Determinación de peso seco del cultivo de Bacillus subtilis (ATCC11774)*

Corrida	Masa aluminio ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)	Masa aluminio con bacilos secos ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)	Peso seco ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)
1	0.633	0.656	0.023
2	0.816	0.838	0.022
3	0.793	0.815	0.022

Nota: Obtenido de experimentación propia. El peso seco se realizó con muestras de 50 mL del medio de cultivo con la concentración final del tercer escalamiento y se dejaron 72 horas en el horno de convección por gravedad Symphony VWR a 60 °C. Se utilizó una balanza analítica OHAUS, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g para el análisis.

**Cuadro 23.** *Primer liofilizado obtenido de Bacillus subtilis (ATCC11774)*

No. Bolsa	Bolsa ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)	Bolsa con liofilizado ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)	Liofilizado ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)
1	0.386	0.968	0.583
2	0.416	0.744	0.329
3	0.493	0.859	0.367

4	0.463	0.842	0.380
5	0.502	0.846	0.344
6	0.503	0.751	0.248
7	0.356	0.506	0.150
8	0.327	0.687	0.360
9	0.360	0.802	0.442
10	0.315	0.916	0.601
11	0.278	0.580	0.303
12	0.396	0.760	0.364
13	0.507	0.949	0.441
14	0.476	0.775	0.299
15	0.462	0.630	0.169
16	0.436	0.560	0.124
Total liofilizado obtenido (g)			5.501 ± 0.0028

Nota: Obtenido de experimentación propia. El liofilizado recuperado es de los 10 L del medio de cultivo del crecimiento a tercera escala de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), realizado la primera vez. El proceso de liofilizado se realizó en un liofilizador de secado por bandejas marca Harvest Right, LLC. HRFD-PLrg-SS, con una presión de vacío de 500 mTorr y a una temperatura de congelación de -4 °C, durante un ciclo de 9.7 horas. Se utilizó una balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g para calcular la cantidad obtenida. Para la incertidumbre del total de liofilizado obtenido se utilizó el Cálculo 17.

**Cuadro 24.** Segundo liofilizado obtenido de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

No. Bolsa	Bolsa ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)	Bolsa con liofilizado ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)	Liofilizado ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)
1	0.413	0.621	0.208
2	0.476	0.795	0.319
3	0.414	0.557	0.143
4	0.300	0.524	0.224
5	0.441	0.705	0.264
6	0.438	0.619	0.181
7	0.341	0.563	0.222
8	0.494	0.728	0.234
9	0.500	0.643	0.143

10	0.515	0.746	0.231
11	0.498	0.939	0.441
12	0.369	0.471	0.102
13	0.360	0.452	0.092
14	0.354	0.489	0.135
15	0.408	0.696	0.288
16	0.399	0.553	0.154
17	0.392	0.578	0.186
18	0.359	0.512	0.153
19	0.482	0.702	0.220
20	0.314	0.454	0.140
21	0.367	0.511	0.144
22	0.357	0.461	0.104
23	0.452	0.501	0.049
24	0.514	0.636	0.122
25	0.564	0.777	0.213
26	0.424	0.627	0.203
27	0.488	0.657	0.169
28	0.435	0.679	0.244
29	0.404	0.61	0.206
30	0.376	0.504	0.128
31	0.442	0.680	0.238
32	0.428	0.629	0.201
Total liofilizado obtenido (g)			6.101 ± 0.004

Nota: Obtenido de experimentación propia. El liofilizado recuperado es de los 10 L del medio de cultivo del crecimiento a tercera escala de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), realizado una segunda vez. El proceso de liofilizado se realizó en un liofilizador de secado por bandejas marca Harvest Right, LLC. HRFD-PLrg-SS, con una presión de vacío de 500 mTorr y a una temperatura de congelación de -4 °C, durante un ciclo de 9.7 horas. Se utilizó una balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g para calcular la cantidad obtenida. Este segundo liofilizado se obtuvo con la finalidad de tener bastante biomasa liofilizada en caso se quisiera agregar como parte de la fórmula de las galletas. Para la incertidumbre del total de liofilizado obtenido se utilizó el Cálculo 17.

**Cuadro 25.** Biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) obtenida con el crecimiento de 2 L para las pruebas horneadas

Tubo centrífuga	Masa neta ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)	Masa tubo lleno 1 ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)	Masa solo medio de cultivo 1 ( $\pm 7.000 \times 10^{-4}$ g)	Masa tubo y biomasa 1 ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)	Masa solo biomasa 1 ( $\pm 7.000 \times 10^{-4}$ g)
1	37.331	290.2	252.869	39.210	1.879
2	36.689	290.6	253.911	44.948	8.259
3	36.370	292.0	255.630	44.524	8.154
4	36.909	290.2	253.291	50.530	13.621
Total (g)			1015.701 $\pm$ 0.0014		

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se centrifugo el primer litro del crecimiento de 2 L de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) que se hizo para las pruebas horneadas. Se utilizó una balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g y una centrifugadora de 1 L marca Sorvall RT7 para el análisis. Para las incertidumbres se utilizó el Cálculo 17.

**Cuadro 26.** Biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) obtenida con el crecimiento de 2 L para las pruebas horneadas

Tubo centrífuga	Masa neta ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)	Masa tubo lleno 2 ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)	Masa solo medio de cultivo 2 ( $\pm 9.000 \times 10^{-4}$ g)	Masa tubo y biomasa total ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)	Masa solo biomasa total ( $\pm 7.000 \times 10^{-4}$ g)
1	37.331	284.2	244.990	47.882	10.551
2	36.689	286.4	241.452	51.296	14.607
3	36.370	284.6	240.076	52.756	16.386
4	36.909	285.7	235.170	57.882	20.973
Total (g)			961.688 $\pm$ 0.0017		62.517 $\pm$ 0.0014

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se centrifugo el resto de los 2 L del crecimiento de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) que se hizo para las pruebas horneadas, sobre la biomasa recuperada en el litro anterior. Se utilizó una balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g y una centrifugadora de 1 L marca Sorvall RT7 para el análisis. Para las incertidumbres se utilizó el Cálculo 17.

**Cuadro 27.** Cuantificación en triplicado de la biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) obtenida con el crecimiento de 2 L para las pruebas horneadas

Cuadro No.	Número de células viables ( $\pm 1$ UFC)		
	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3
1	15	10	27
2	16	14	14
3	21	9	18
4	15	11	10
5	9	23	23
6	14	12	21
7	28	8	26
8	17	10	14
9	15	16	17
10	25	21	12
11	16	17	23
12	28	19	20
13	8	12	18
14	14	20	16
15	24	19	14
16	11	24	10
Total (UFC)	276 $\pm$ 4	245 $\pm$ 4	283 $\pm$ 4

Nota: Obtenido de experimentación propia. De la biomasa obtenida de los 2 L del crecimiento de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) que se hizo para las pruebas horneadas, se contó las células viables presentes en uno de los cuadros grandes de la cámara Neubauer, sin ningún factor de dilución, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Para las incertidumbres del total de UFC se utilizó el Cálculo 17.

**Cuadro 28.** Concentración de la biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) obtenida con el crecimiento de 2 L para las pruebas horneadas

Factor	Valor
Densidad del medio de cultivo	1.037 $\pm$ 0.008 g/mL

Masa total del medio de cultivo	1977.389 ± 0.002 g
---------------------------------	--------------------

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se calculó la densidad en base a la masa de un mL del medio de cultivo homogéneo. Se utilizó una pipeta volumétrica de  $1 \pm 0.008$  mL y una balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g. Se determinó la masa real de los 2 L del crecimiento de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) que se hizo para las pruebas horneadas.

**Cuadro 29.** Primera corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Cuadro No.	Número de células viables ( $\pm 1$ UFC)						
	0 ( $\pm 0.5$ min)	5 ( $\pm 0.5$ min)	10 ( $\pm 0.5$ min)	15 ( $\pm 0.5$ min)	20 ( $\pm 0.5$ min)	25 ( $\pm 0.5$ min)	30 ( $\pm 0.5$ min)
1	7	8	5	0	5	0	2
2	3	4	1	0	3	2	1
3	3	4	3	4	3	4	0
4	5	3	0	0	3	0	1
5	0	4	1	3	0	1	0
6	2	11	1	3	2	0	2
7	8	4	6	3	2	2	3
8	3	0	1	1	0	4	0
9	4	6	2	2	0	0	0
10	5	6	3	2	1	0	0
11	5	3	4	0	1	0	2
12	21	5	2	1	1	0	0
13	3	6	5	1	1	1	2
14	4	0	3	3	0	2	1
15	2	2	2	2	1	1	1
16	10	0	4	0	2	1	2
Total (UFC)	85 ± 4	66 ± 4	43 ± 4	25 ± 4	25 ± 4	18 ± 4	17 ± 4

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se tomaron 7 muestras en tubos de ensayo con 2 mL del medio de cultivo de 2 L con *Bacillus subtilis* (ATCC11774) homogéneo antes de centrifugar, con una pipeta volumétrica de  $1 \pm 0.008$  mL, lo que implica una concentración inicial de  $2.680 \times 10^6$  UFC/mL. Estas se

colocaron en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a 177 °C durante los tiempos presentados en el cuadro. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, sin ningún factor de dilución, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4% azul tripán R's Science. Para las incertidumbres del total de UFC se utilizó el Cálculo 17.

**Cuadro 30.** Segunda corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Cuadro No.	Número de células viables ( $\pm 1$ UFC)						
	0 ( $\pm 0.5$ min)	5 ( $\pm 0.5$ min)	10 ( $\pm 0.5$ min)	15 ( $\pm 0.5$ min)	20 ( $\pm 0.5$ min)	25 ( $\pm 0.5$ min)	30 ( $\pm 0.5$ min)
1	5	8	4	2	2	3	1
2	7	2	7	1	2	1	0
3	4	2	1	0	4	0	0
4	11	3	1	0	5	0	2
5	4	5	0	0	1	1	0
6	0	7	2	4	0	1	1
7	15	12	3	3	0	3	1
8	4	4	3	2	3	1	0
9	5	2	6	1	1	1	1
10	8	1	2	1	1	0	0
11	6	0	4	0	2	0	3
12	3	0	1	2	0	1	0
13	3	8	3	3	1	0	0
14	2	1	4	5	0	1	0
15	2	3	3	2	2	3	1
16	9	7	1	1	1	0	2
Total (UFC)	88 $\pm$ 4	65 $\pm$ 4	45 $\pm$ 4	27 $\pm$ 4	25 $\pm$ 4	16 $\pm$ 4	12 $\pm$ 4

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se tomaron otras 7 muestras en tubos de ensayo con 2 mL del medio de cultivo de 2 L con *Bacillus subtilis* (ATCC11774) homogéneo antes de centrifugar, con una pipeta volumétrica de  $1 \pm 0.008$  mL, lo que implica una concentración inicial de  $2.680 \times 10^6$  UFC/mL. Estas se

colocaron en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a 177 °C durante los tiempos presentados en el cuadro. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, sin ningún factor de dilución, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Para las incertidumbres del total de UFC se utilizó el Cálculo 17.

**Cuadro 31.** Tercera corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Cuadro No.	Número de células viables ( $\pm 1$ UFC)						
	0 ( $\pm 0.5$ min)	5 ( $\pm 0.5$ min)	10 ( $\pm 0.5$ min)	15 ( $\pm 0.5$ min)	20 ( $\pm 0.5$ min)	25 ( $\pm 0.5$ min)	30 ( $\pm 0.5$ min)
1	4	9	2	0	5	0	0
2	5	3	4	1	2	0	2
3	5	2	5	0	5	1	0
4	3	2	2	0	3	3	0
5	1	7	1	4	1	4	0
6	4	12	0	3	0	1	1
7	6	1	7	2	0	0	1
8	10	3	3	3	0	1	2
9	6	5	1	1	2	0	3
10	7	4	5	1	1	0	0
11	5	4	3	0	3	2	0
12	2	2	3	2	1	1	0
13	0	6	2	5	2	0	1
14	13	1	1	2	1	3	3
15	8	3	2	1	0	0	1
16	5	1	3	3	1	0	1
Total (UFC)	84 $\pm$ 4	65 $\pm$ 4	44 $\pm$ 4	28 $\pm$ 4	27 $\pm$ 4	16 $\pm$ 4	15 $\pm$ 4

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se tomaron otras 7 muestras en tubos de ensayo con 2 mL del medio de cultivo de 2 L con *Bacillus subtilis* (ATCC11774) homogéneo antes de centrifugar, con una pipeta volumétrica de  $1 \pm 0.008$  mL, lo que implica una concentración inicial de  $2.680 \times 10^6$  UFC/mL. Estas se

colocaron en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a 177 °C durante los tiempos presentados en el cuadro. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, sin ningún factor de dilución, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Para las incertidumbres del total de UFC se utilizó el Cálculo 17.

**Cuadro 32.** Masa de galletas para incorporar *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Masa	Valor ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)
Masa de galleta total (21 UN)	128.94
Galleta individual	6.14

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se utilizó una balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g para preparar los ingredientes a utilizar y obtener la masa al final de proceso. Se decidió la cantidad de galletas para obtener las pruebas de horneado en triplicado según los tiempos de análisis.

**Cuadro 33.** Primera corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Cuadro No.	Número de células viables ( $\pm 1$ UFC)						
	0 ( $\pm 0.5$ min)	5 ( $\pm 0.5$ min)	10 ( $\pm 0.5$ min)	15 ( $\pm 0.5$ min)	20 ( $\pm 0.5$ min)	25 ( $\pm 0.5$ min)	30 ( $\pm 0.5$ min)
1	17	5	6	6	3	7	3
2	7	8	3	10	7	5	2
3	15	2	7	5	5	7	1
4	10	5	10	5	3	1	2
5	9	7	7	6	6	3	2
6	14	2	2	3	4	9	1
7	15	4	8	3	5	3	3
8	11	10	5	3	5	3	1
9	12	10	9	5	5	4	1
10	14	9	11	6	5	2	3
11	13	12	8	3	2	5	4
12	8	8	5	2	3	1	0
13	9	5	9	2	1	3	2

14	10	5	4	5	3	6	4
15	8	8	6	2	5	1	4
16	10	10	5	2	1	0	4
Total (UFC)	182 ± 4	110 ± 4	105 ± 4	68 ± 4	63 ± 4	60 ± 4	37 ± 4

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se colocaron 7 galletas de mantequilla, con una concentración de biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) de  $1 \times 10^6$  UFC/g, en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a 177 °C durante los tiempos presentados en el cuadro. Se tomó 1 g de cada galleta horneada según los tiempos presentados y se diluyeron en 9 mL de solución salina, en tubos de ensayo. Se mezcló bien con la ayuda del vortex mixer marca Fisher Scientific y se realizaron otras 2 diluciones, para lograr analizar la muestra. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Para las incertidumbres del total de UFC se utilizó el Cálculo 17.

**Cuadro 34.** Segunda corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Cuadro No.	Número de células viables ( $\pm 1$ UFC)						
	0 ( $\pm 0.5$ min)	5 ( $\pm 0.5$ min)	10 ( $\pm 0.5$ min)	15 ( $\pm 0.5$ min)	20 ( $\pm 0.5$ min)	25 ( $\pm 0.5$ min)	30 ( $\pm 0.5$ min)
1	8	7	5	8	3	1	2
2	13	9	2	7	3	5	2
3	9	3	8	4	5	4	3
4	7	2	11	3	4	4	5
5	10	10	4	2	7	8	3
6	16	3	8	2	3	5	1
7	14	2	4	3	3	2	2
8	11	11	6	7	5	1	3
9	15	6	10	4	7	1	2
10	8	9	6	6	8	5	3
11	10	4	5	6	2	4	4
12	9	10	7	1	1	7	1
13	7	4	4	5	1	3	0

14	14	6	9	3	2	2	2
15	12	5	8	4	4	3	0
16	16	12	2	4	3	2	7
Total (UFC)	179 ± 4	103 ± 4	99 ± 4	69 ± 4	61 ± 4	57 ± 4	40 ± 4

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se colocaron otras 7 galletas de mantequilla, con una concentración de biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) de  $1 \times 10^6$  UFC/g, en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a 177 °C durante los tiempos presentados en el cuadro. Se tomó 1 g de cada galleta horneada según los tiempos presentados y se diluyeron en 9 mL de solución salina, en tubos de ensayo. Se mezcló bien con la ayuda del vortex mixer marca Fisher Scientific y se realizaron otras 2 diluciones, para lograr analizar la muestra. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Para las incertidumbres del total de UFC se utilizó el Cálculo 17.

**Cuadro 35.** Tercera corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Cuadro No.	Número de células viables ( $\pm 1$ UFC)						
	0 ( $\pm 0.5$ min)	5 ( $\pm 0.5$ min)	10 ( $\pm 0.5$ min)	15 ( $\pm 0.5$ min)	20 ( $\pm 0.5$ min)	25 ( $\pm 0.5$ min)	30 ( $\pm 0.5$ min)
1	14	10	12	4	2	4	1
2	11	8	4	5	4	6	1
3	12	5	5	7	7	5	2
4	9	7	8	2	5	3	4
5	7	11	6	3	8	2	3
6	8	3	4	4	3	5	3
7	11	7	3	4	1	3	1
8	10	4	3	7	5	6	0
9	11	5	5	5	3	5	0
10	8	6	4	3	5	2	5
11	10	8	10	2	2	3	4
12	9	10	4	1	2	4	1

13	12	7	3	5	3	0	1
14	8	6	9	7	1	2	5
15	8	3	8	8	5	1	2
16	15	2	4	4	1	1	1
Total (UFC)	163 ± 4	102 ± 4	92 ± 4	71 ± 4	57 ± 4	52 ± 4	34 ± 4

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se colocaron otras 7 galletas de mantequilla, con una concentración de biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) de  $1 \times 10^6$  UFC/g, en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a 177 °C durante los tiempos presentados en el cuadro. Se tomó 1 g de cada galleta horneada según los tiempos presentados y se diluyeron en 9 mL de solución salina, en tubos de ensayo. Se mezcló bien con la ayuda del vortex mixer marca Fisher Scientific y se realizaron otras 2 diluciones, para lograr analizar la muestra. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Para las incertidumbres del total de UFC se utilizó el Cálculo 17.

## C. Cálculo de muestra

**Cálculo 1.** *Determinación del factor de dilución para los cálculos de la concentración de Bacillus subtilis (ATCC11774)*

**Ecuación 16.** *Factor de dilución*

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{alícuota de muestra (mL)} * (\text{factor de dilución anterior})}{\text{volumen de dilución (mL)}}$$

$$\frac{1 \text{ mL} * (1)}{9 \text{ mL}} = 1.111 \times 10^{-1}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utilizó únicamente estequiometría según las dimensionales requeridas en el resultado. Se realiza el mismo procedimiento consecutivamente, dependiendo de la cantidad de diluciones realizadas. Al utilizar una alícuota de la dilución anterior, el factor de dilución que multiplica al numerador en la ecuación va cambiando. Los valores utilizados y sus resultados se muestran en el Cuadro 36.

**Cálculo 2.** *Determinación de la concentración en UFC/mL de Bacillus subtilis (ATCC11774) de la primera prueba antes del proceso de liofilización*

$$\frac{UFC}{\text{mL}} = \frac{\text{Unidades Formadoras de Colonia contadas}}{\text{volúmen del inóculo en caja Petri (mL)} * \text{factor de dilución de la muestra analizada}}$$

$$\frac{100 \text{ UFC}}{0.1 \text{ mL} * (1.882 \times 10^{-6})} = 5.314 \times 10^8 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utilizó estequiometría como en la Ecuación 15, tal cual indica Iáñez (2005), según las dimensionales requeridas en el resultado de la cuantificación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), en agar nutritivo sólido. El factor de dilución se destaca del Cuadro 36, al realizar 6 diluciones para el análisis. Se realiza el mismo procedimiento para las otras dos pruebas del triplicado antes del proceso de liofilización y para las 3 pruebas después del mismo. Los resultados se muestran en el Cuadro 37.

**Cálculo 3.** Determinación del cambio de concentración en UFC/mL provocado por el proceso de liofilización de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), de la primera prueba

**Ecuación 17.** Cambio de concentración

$$\Delta \frac{UFC}{mL} = \left( \frac{UFC}{mL} \text{ antes del proceso de liofilización} \right) - \left( \frac{UFC}{mL} \text{ después del proceso de liofilización} \right)$$

$$\left( 5.314 \times 10^8 \frac{UFC}{mL} \right) - \left( 6.377 \times 10^7 \frac{UFC}{mL} \right) = 4.677 \times 10^8 \frac{UFC}{mL}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utilizó únicamente una resta entre los valores de la primera prueba del Cuadro 37, de la concentración de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) antes del proceso de liofilización y después del mismo. Se realiza el mismo procedimiento para las otras dos pruebas y la media de estas, todos los resultados se presentan en el Cuadro 37.

**Cálculo 4.** Determinación del porcentaje de reducción de viabilidad de los *Bacillus subtilis* (ATCC11774) provocado por el proceso de liofilización, para la primera prueba

**Ecuación 18.** Porcentaje de reducción de viabilidad

$$\% \text{ reducción de viabilidad} = \left( 1 - \left( \frac{\text{Concentración final}}{\text{Concentración inicial}} \right) \right) * 100$$

$$\left( 1 - \left( \frac{6.377 \times 10^7 \frac{UFC}{mL}}{5.314 \times 10^8 \frac{UFC}{mL}} \right) \right) * 100 = 88.000 \%$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utiliza la ecuación de porcentaje de viabilidad obtenida de Muñoz y Abad (2016). Se le resta el valor a 1 para saber el porcentaje de la población bacteriana que perdió su viabilidad. Se utilizaron los valores de la primera prueba del Cuadro 37, de la concentración de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) antes del proceso de liofilización y después del mismo. Se realiza el mismo procedimiento para las otras dos pruebas y la media de estas del Cuadro 37, así como también para todos los demás porcentajes de la reducción de viabilidad que se presentan en los Cuadros 40-43 y los Cuadros 45-48.

**Cálculo 5.** *Determinación de la concentración en UFC/g de Bacillus subtilis (ATCC11774) de la primera prueba luego del proceso de liofilización*

**Ecuación 19.** *Concentración en UFC/g*

$$\frac{UFC}{g} = \frac{UFC}{mL} * (\text{relación peso seco})$$

$$6.377 \times 10^7 \frac{UFC}{mL} * \left( \frac{50 \text{ mL medio de cultivo}}{0.022 \text{ g peso seco}} \right) = 1.430 \times 10^{11} \frac{UFC}{g}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utilizó únicamente estequiometría según las dimensionales requeridas en el resultado de la cuantificación de UFC/g de *Bacillus subtilis* (ATCC11774). Se utiliza la concentración de UFC/mL que se obtuvo a partir de la cuantificación en agar nutritivo sólido, presentados en el Cuadro 37 y el resultado promedio del peso seco que se muestra en el Cuadro 22. Se realiza el mismo procedimiento para las otras dos pruebas del triplicado después del proceso de liofilización. Los resultados se muestran en el Cuadro 38.

**Cálculo 6.** *Determinación de la cantidad de Bacillus subtilis (ATCC11774) liofilizado, necesario para obtener  $1 \times 10^6$  UFC/g de la primera prueba luego del proceso de liofilización*

**Ecuación 20.** *Cantidad de liofilizado obtenido*

$$g \text{ liofilizado} = \frac{UFC \text{ requeridos}}{\text{Concentración obtenida del liofilizado}}$$

$$\frac{1 \times 10^6 \text{ UFC}}{1.430 \times 10^{11} \frac{UFC}{g \text{ liofilizado}}} = 6.994 \times 10^{-6} \text{ g liofilizado}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utilizó únicamente estequiometría según las dimensionales requeridas en el resultado de la cantidad del liofilizado de *Bacillus subtilis* (ATCC11774). Se utiliza la concentración de UFC/g que se obtuvo a partir del Cálculo 5, presentado en el Cuadro 38 y se realiza el mismo procedimiento para las otras dos pruebas del triplicado después del proceso de liofilización. Los resultados se muestran de la misma manera en el Cuadro 38.

**Cálculo 7.** *Determinación de la cantidad de Bacillus subtilis (ATCC11774) liofilizado, necesario para obtener  $1 \times 10^6$  UFC por gramo de galleta para la primera prueba luego del proceso de liofilización*

**Ecuación 21.** *Cantidad de liofilizado por galleta*

$$\frac{g \text{ liofilizado}}{galleta} = \left( \frac{UFC}{g} \text{ requerido} \right) * \left( \frac{g}{galleta} \right) * \left( \frac{1}{\text{concentración obtenida} \left( \frac{UFC}{g} \right)} \right)$$

$$\left( 1 \times 10^6 \frac{UFC}{g} \right) * \left( \frac{6.14 g}{1 galleta} \right) * \left( \frac{1 g \text{ liofilizado}}{1.430 \times 10^{11} UFC} \right) = \frac{4.294 \times 10^{-5} g \text{ liofilizado}}{galleta}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utilizó únicamente estequiometría según las dimensionales requeridas en el resultado de la cantidad del liofilizado de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) para obtener  $1 \times 10^6$  UFC/g de galleta. Se utiliza la concentración de UFC/g que se obtuvo a partir del Cálculo 3, presentado en el Cuadro 38 y se realiza el mismo procedimiento para las otras dos pruebas del triplicado después del proceso de liofilización. Los resultados se muestran de la misma manera en el Cuadro 38.

**Cálculo 8.** *Determinación de la cantidad de Bacillus subtilis (ATCC11774) liofilizado, necesario para obtener 21 galletas con una concentración  $1 \times 10^6$  UFC/g para la primera prueba luego del proceso de liofilización*

**Ecuación 22.** *Cantidad de liofilizado por receta de galletas*

$$\frac{g \text{ liofilizado}}{\text{receta de galletas}} = \frac{g \text{ liofilizado}}{galleta} * (\text{cantidad de galletas})$$

$$\frac{4.294 \times 10^{-5} g \text{ liofilizado}}{galleta} * (21 galletas) = \frac{9.018 \times 10^{-4} g \text{ liofilizado}}{\text{receta 21 galletas}}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utilizó únicamente estequiometría según las dimensionales requeridas en el resultado de la cantidad del liofilizado de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) para obtener una receta de 21 galletas con  $1 \times 10^6$  UFC/g. Se utiliza la concentración de UFC/g de galleta que se obtuvo a partir del Cálculo 7, presentado en el Cuadro 38 y se realiza el mismo procedimiento para las otras dos pruebas del triplicado después del proceso de liofilización. Los resultados se muestran de la misma manera en el Cuadro 38.

**Cálculo 9.** *Determinación del volumen total del medio de cultivo de Bacillus subtilis (ATCC11774) preparado para las pruebas horneadas*

**Ecuación 23.** *Volumen del medio de cultivo*

$$\text{Volumen del medio de cultivo} = \frac{\text{Masa total del medio de cultivo}}{\text{densidad del medio de cultivo}}$$
$$\frac{1977.389 \text{ g}}{\frac{1.037 \text{ g}}{\text{mL}}} = 1906.836 \text{ mL}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utilizó únicamente estequiometría según las dimensionales requeridas en el resultado del volumen del medio de cultivo de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) preparado para las pruebas horneadas. Se utiliza la masa total obtenida del medio de cultivo y la densidad calculada con 1 mL, presentadas en el Cuadro 28. Los resultados se muestran en el Cuadro 39.

**Cálculo 10.** *Determinación de la concentración promedio en UFC/mL del medio de cultivo de Bacillus subtilis (ATCC11774) preparado para las pruebas horneadas*

$$\frac{\text{UFC}}{\text{mL}} = \frac{\text{Unidades Formadoras de Colonia contadas} * (10^4)}{\text{factor de dilución}}$$
$$\frac{268 \text{ UFC} * (10^4)}{1} = 2.680 \times 10^6 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utilizó la ecuación que indica el kit de la cámara Neubauer en la Ecuación 14, así como también menciona Hernández (2022). Se utiliza el promedio de la cantidad de UFC contadas de la muestra del medio de cultivo de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) preparado para las pruebas horneadas, en triplicado. Este valor se presenta en el Cuadro 27. El resultado se muestra en el Cuadro 39. Se realizó el mismo cálculo para la determinación de la concentración del resto de las pruebas de horneado del medio de cultivo y de las galletas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), para cada una de las 7 muestras de todas las corridas y sus promedios. Estos resultados se presentan en los Cuadros 40-43 y los Cuadros 45-48.

**Cálculo 11.** *Determinación de la concentración promedio total del medio de cultivo de Bacillus subtilis (ATCC11774) preparado para las pruebas horneadas*

**Ecuación 24.** *Concentración total en el medio de cultivo*

$$\frac{UFC}{\text{volumen total del medio de cultivo}} = \frac{UFC}{mL} * (\text{volumen del medio de cultivo (mL)})$$

$$2.680 \times 10^6 \frac{UFC}{mL} * (1906.836 \text{ mL}) = 5.110 \times 10^9 \frac{UFC}{1906.836 \text{ mL}}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utilizó únicamente estequiometría según las dimensionales requeridas en el resultado de la concentración de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) para todo el volumen del medio de cultivo preparado para las pruebas horneadas. Se utiliza la concentración de UFC/mL que se obtuvo a partir del Cálculo 10 y el volumen total del medio de cultivo, presentados en el Cuadro 39. Los resultados se muestran de la misma manera en el Cuadro 38.

**Cálculo 12.** *Determinación de la cantidad de biomasa promedio de Bacillus subtilis (ATCC11774), necesario para obtener 1 x 10<sup>6</sup> UFC por gramo de galleta*

**Ecuación 25.** *Cantidad de biomasa por galleta*

$$\frac{g \text{ biomasa}}{galleta} = \left( \frac{UFC}{g} \text{ requerido} \right) * \left( \frac{g}{galleta} \right) * \left( \frac{1}{\text{concentración obtenida} \left( \frac{UFC}{g} \right)} \right)$$

$$\left( 1 \times 10^6 \frac{UFC}{g} \right) * \left( \frac{6.14 \text{ g}}{1 \text{ galleta}} \right) * \left( \frac{62.517 \text{ g biomasa}}{5.110 \times 10^9 \text{ UFC}} \right) = \frac{0.075 \text{ g biomasa}}{galleta}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utilizó únicamente estequiometría según las dimensionales requeridas en el resultado de la cantidad de biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) para obtener 1 x 10<sup>6</sup> UFC/g de galleta. Se utiliza la concentración de UFC total que se obtuvo a partir del Cálculo 11 y la cantidad de biomasa total obtenida, que se presenta en el Cuadro 26. Los resultados se muestran en el Cuadro 44.

**Cálculo 13.** *Determinación de la cantidad de biomasa promedio de Bacillus subtilis (ATCC11774), necesario para obtener 21 galletas con una concentración 1 x 10<sup>6</sup> UFC/g*

**Ecuación 26.** *Cantidad de biomasa por receta de galletas*

$$\frac{g \text{ biomasa}}{\text{receta de galletas}} = \frac{g \text{ biomasa}}{galleta} * (\text{cantidad de galletas})$$

$$\frac{0.075 \text{ g biomasa}}{\text{galleta}} * (21 \text{ galletas}) = \frac{1.577 \text{ g biomasa}}{\text{receta 21 galletas}}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utilizó únicamente estequiometría según las dimensionales requeridas en el resultado de la cantidad de biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) para obtener una receta de 21 galletas con  $1 \times 10^6$  UFC/g. Se utiliza la concentración de UFC/g de galleta que se obtuvo a partir del Cálculo 12, presentado en el Cuadro 44. Los resultados se muestran de la misma manera en el Cuadro 44.

**Cálculo 14.** *Determinación de la ecuación de la velocidad de reacción a partir del modelo cinético obtenido de la curva de muerte de Bacillus subtilis (ATCC11774)*

$$N + \Delta T \rightarrow N_f \quad (14.1)$$

$$r_N = -k[N]^n \quad (14.2)$$

**Ecuación 27.** *Derivada de la velocidad de la reacción elemental*

$$\frac{dN}{dt} = k[N]^n \quad (14.3)$$

**Ecuación 28.** *Integral de la velocidad de reacción*

$$\int \frac{dN}{N^n} = \int k dt \quad (14.4)$$

$$N = N_o e^{-kt} \quad (14.5)$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Como referencia se utilizó lo establecido por Levenspiel (2004). La ecuación (14.1) representa la reacción que ocurre al incrementar la temperatura en la concentración inicial de la cepa. La ecuación (14.2) expresa la velocidad de la reacción elemental, como se muestra en la Ecuación 10, siguiendo la estequiometria. A partir de esta, se integra para obtener la ecuación del modelo cinético por el método diferencial, resultando en el término final (14.5), como se muestra en los Cuadros 2 y 3, y en las Figuras 2 y 3.

**Cálculo 15.** *Determinación de la concentración inicial de Bacillus subtilis (ATCC11774) para obtener al final del proceso  $1 \times 10^6$  UFC/mL*

$$N = N_o e^{-kt}$$

$$N_o = \frac{N}{e^{-kt}}$$

$$\frac{1 \times 10^6 \text{ UFC/mL}}{e^{-0.046 \times 15}} = 1.994 \times 10^6 \text{ UFC/mL}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Como referencia se utilizó lo establecido por Levenspiel (2004). A partir de la ecuación del modelo cinético obtenido por el método diferencial (14.5) con los valores que se muestran en el Cuadro 2.

**Cálculo 16.** *Determinación de la cantidad de biomasa promedio de Bacillus subtilis (ATCC11774), necesario para obtener al final del proceso 1 x 10<sup>6</sup> UFC por gramo de galleta*

$$\frac{g \text{ biomasa}}{galleta} = \left( \frac{UFC}{g} \text{ requerido} \right) * \left( \frac{g}{galleta} \right) * \left( \frac{1}{\text{concentración obtenida} \left( \frac{UFC}{g} \right)} \right)$$

$$\left( 1.994 \times 10^6 \frac{UFC}{g} \right) * \left( \frac{6.14 g}{1 galleta} \right) * \left( \frac{62.517 g \text{ biomasa}}{5.110 \times 10^9 UFC} \right) = \frac{0.150 g \text{ biomasa}}{galleta}$$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Para este cálculo se utilizó únicamente estequiometría según las dimensionales requeridas en el resultado de la cantidad de biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) para obtener 1 x 10<sup>6</sup> UFC/g de galleta al final de todo el proceso. Se utiliza la concentración de UFC total que se obtuvo a partir del Cálculo 15 y la cantidad de biomasa total obtenida, que se presenta en el Cuadro 26.

## D. Datos calculados

**Cuadro 36.** Factor de dilución para los cálculos de la determinación de la concentración de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Alicuota ( $\pm 0.008$ mL)	Dilución ( $\pm 0.05$ mL)	Factor de dilución
1	9	$1.111 \times 10^{-1} \pm 1.082 \times 10^{-3}$
1	9	$1.235 \times 10^{-2} \pm 1.701 \times 10^{-4}$
1	9	$1.372 \times 10^{-3} \pm 2.314 \times 10^{-5}$
1	9	$1.524 \times 10^{-4} \pm 2.969 \times 10^{-6}$
1	9	$1.694 \times 10^{-5} \pm 3.688 \times 10^{-7}$
1	9	$1.882 \times 10^{-6} \pm 4.489 \times 10^{-8}$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Al hacer diluciones de las muestras se utiliza una alícuota 1mL de la muestra, con una pipeta volumétrica de  $1 \pm 0.008$  mL, y 9 mL de solución salina, con una pipeta volumétrica de  $10 \pm 0.05$  mL. Esto se realiza las veces que sea necesario para el análisis. Los valores se obtuvieron en base al Cálculo 1. Para las incertidumbres del factor de dilución se utilizó el Cálculo 18.

**Cuadro 37.** Concentración antes y después del proceso de liofilización de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Corrida	Concentración antes de la liofilización ( $\pm 5.314 \times 10^6$ UFC/mL)	Concentración después de la liofilización ( $\pm 5.314 \times 10^6$ UFC/mL)	Cambio de concentración antes y después de la liofilización ( $\pm 7.516 \times 10^6$ UFC/mL)	Reducción de viabilidad (%)
1	$5.314 \times 10^8$	$6.377 \times 10^7$	$4.667 \times 10^8$	$88.000 \pm 1.666$
2	$4.836 \times 10^8$	$4.783 \times 10^7$	$4.358 \times 10^8$	$90.110 \pm 1.843$
3	$5.102 \times 10^8$	$5.846 \times 10^7$	$4.517 \times 10^8$	$88.542 \pm 1.738$
Media (UFC/mL)	$5.084 \times 10^8$	$5.669 \times 10^7$	$4.517 \times 10^8$	88.884
Desviación estándar (UFC/mL)	$2.396 \times 10^7$	$8.118 \times 10^6$	$1.594 \times 10^7$	1.096

Nota: Obtenido de experimentación propia. El proceso de liofilizado se realizó en un liofilizador de secado por bandejas marca Harvest Right, LLC. HRFD-PLrg-SS, con una presión de vacío de 500 mTorr y a una temperatura de congelación de  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante un ciclo de 9.7 horas. El liofilizado utilizado para el análisis fue el primero obtenido, sus datos se presentan en el Cuadro 23. La cuantificación de unidades formadoras de colonia por mL se realizó con el método de recuento de viables en placa, con agar nutritivo Merck 1.11471.0500, en base a un factor de dilución de  $1.882 \times 10^{-6}$  y un inóculo en la caja petri de 0.1 mL. Calculado a partir de los datos originales del Cuadro 21 y el Cálculo 2. El cambio de concentraciones se realizó a partir del Cálculo 3 y el porcentaje de reducción de viabilidad, en base al Cálculo 4. Las incertidumbres de las concentraciones se calcularon en base al mismo Cálculo 2, las del cambio de concentración, a partir del Cálculo 17 y las del % de reducción de viabilidad en base al Cálculo 18. Para la desviación estándar se utilizó el Cálculo 16.

**Cuadro 38.** Concentración del liofilizado de 10 L de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Corrida	Concentración del liofilizado (UFC/g)	Liofilizado requerido para tener $1 \times 10^6$ (g)	Liofilizado por galleta de 6.14g (g)	Liofilizado por receta de 21 galletas (g)
1	$1.430 \times 10^{11}$ $\pm 1.235 \times 10^{10}$	$6.994 \times 10^{-6}$ $\pm 6.041 \times 10^{-7}$	$4.294 \times 10^{-5}$ $\pm 3.709 \times 10^{-6}$	$9.018 \times 10^{-4}$ $\pm 7.789 \times 10^{-5}$
2	$1.072 \times 10^{11}$ $\pm 1.216 \times 10^{10}$	$9.325 \times 10^{-6}$ $\pm 1.058 \times 10^{-6}$	$5.725 \times 10^{-5}$ $\pm 6.493 \times 10^{-6}$	0.001 $\pm 1.364 \times 10^{-4}$
3	$1.311 \times 10^{11}$ $\pm 1.228 \times 10^{10}$	$7.629 \times 10^{-6}$ $\pm 7.149 \times 10^{-7}$	$4.684 \times 10^{-5}$ $\pm 4.390 \times 10^{-6}$	$9.837 \times 10^{-4}$ $\pm 9.218 \times 10^{-5}$
Media	$1.271 \times 10^{11}$	$7.983 \times 10^{-6}$	$4.901 \times 10^{-5}$	0.001
Desviación estándar	$1.820 \times 10^{10}$	$1.205 \times 10^{-6}$	$7.399 \times 10^{-6}$	$1.554 \times 10^{-4}$

Nota: Obtenido de experimentación propia. El proceso de liofilizado se realizó en un liofilizador de secado por bandejas marca Harvest Right, LLC. HRFD-PLrg-SS, con una presión de vacío de 500 mTorr y a una temperatura de congelación de  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante un ciclo de 9.7 horas. La concentración UFC/g, se calculó a partir de los valores calculados del Cuadro 37 y del valor promedio del peso seco mostrado en el Cuadro 22, según el Cálculo 5. Asimismo, se calculó la cantidad requerida de liofilizado en caso se quisiera agregar como parte de la fórmula de las galletas. Se utilizó una balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g. Para las incertidumbres se utilizó el Cálculo 17. Para la desviación estándar se utilizó el Cálculo 16.

**Cuadro 39.** Concentración del medio de cultivo de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) obtenido con el crecimiento de 2 L para las pruebas horneadas

Factor	Valor
Volumen total del medio de cultivo	1906.836 ± 15.282 mL
Concentración	2.680 x 10 <sup>6</sup> ± 6.928 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL
Concentración total	5.110 x 10 <sup>9</sup> ± 1.383 x 10 <sup>8</sup> UFC/1906.836 mL

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se calculó el volumen total del medio de cultivo tomando en cuenta la densidad mencionada en el Cuadro 28, como se muestra en el Cálculo 9. La cuantificación de unidades formadoras de colonia por mL es el promedio del análisis en triplicado que se realizó en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. La concentración UFC/mL se obtuvo a partir de los datos originales del Cuadro 27 y el Cálculo 10, y la concentración total promedio en base al Cálculo 11. Para la incertidumbre de la concentración UFC/mL se utilizó el mismo Cálculo 10 y para las otras el Cálculo 17.

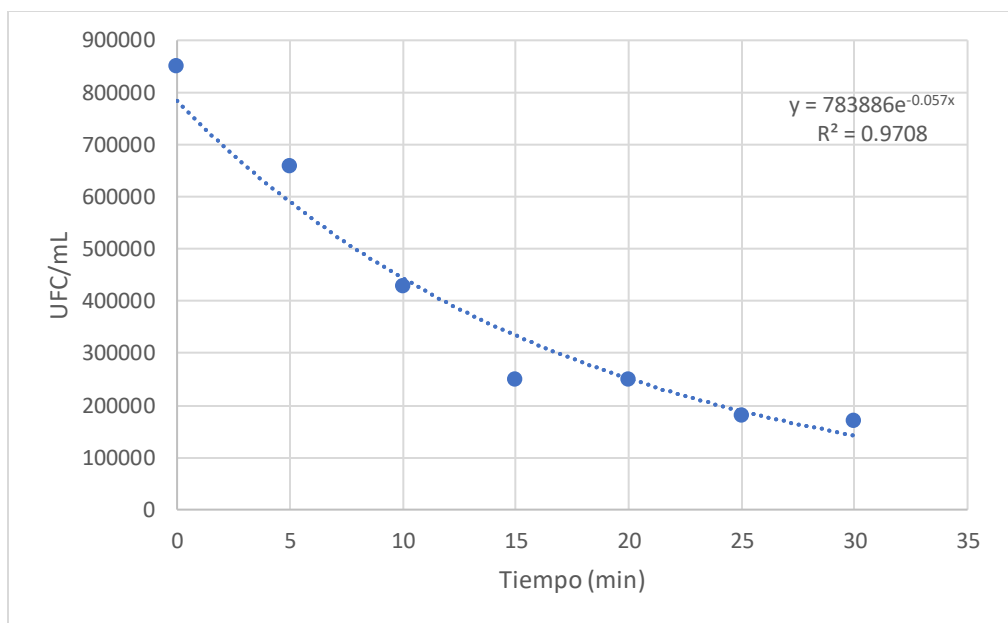
**Cuadro 40.** Concentraciones de la primera corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Tiempo (± 0.5 min)	Concentración (± 4.000 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL)	Reducción de viabilidad (%)
0	8.500 x 10 <sup>5</sup>	0.000 ± 0.000
5	6.600 x 10 <sup>5</sup>	22.353 ± 1.715
10	4.300 x 10 <sup>5</sup>	49.412 ± 5.151
15	2.500 x 10 <sup>5</sup>	70.588 ± 11.772
20	2.500 x 10 <sup>5</sup>	70.588 ± 11.772
25	1.800 x 10 <sup>5</sup>	78.824 ± 17.905
30	1.700 x 10 <sup>5</sup>	80.000 ± 19.196

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se tomaron 7 muestras en tubos de ensayo con 2 mL del medio de cultivo de 2 L con *Bacillus subtilis* (ATCC11774) homogéneo antes de centrifugar, con una pipeta volumétrica de 1 ± 0.008 mL, lo que implica una concentración inicial de 2.680 x 10<sup>6</sup> UFC/mL. Estas se colocaron en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a 177 °C durante los tiempos presentados en el cuadro. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, sin ningún factor de dilución, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Se obtuvo la concentración a partir de los datos originales del

Cuadro 29 y el Cálculo 10. El porcentaje de reducción de viabilidad, en base al Cálculo 4. Para las incertidumbres de la concentración se utilizó el Cálculo 17 y para las del porcentaje de reducción de viabilidad, el Cálculo 18.

**Figura 4.** Curva de muerte de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) en la primera corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L



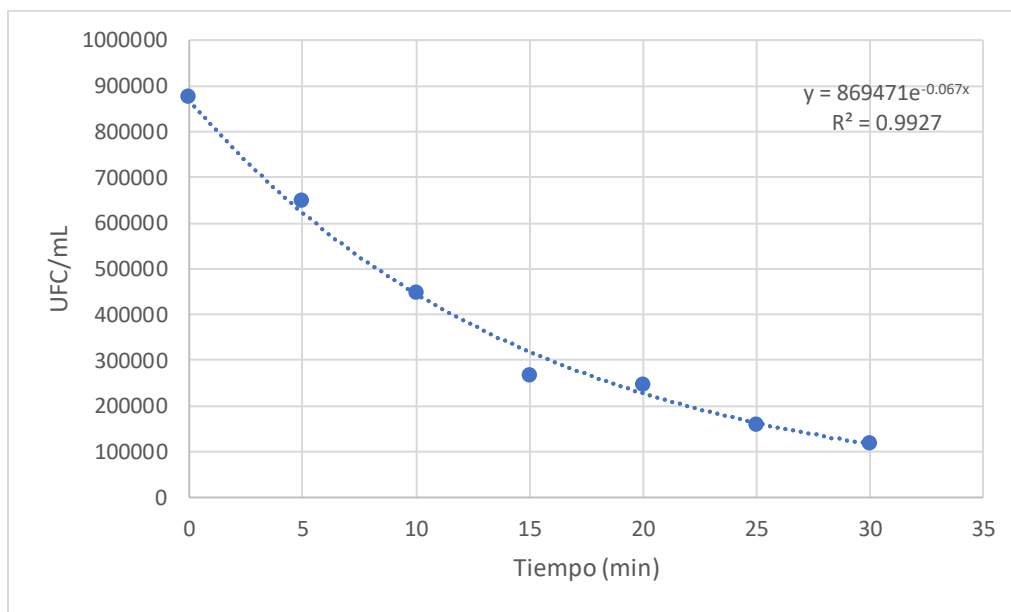
Nota: Obtenido de experimentación propia. Los puntos representan los valores experimentales del Cuadro 40 y la línea punteada, el modelo de regresión exponencial que se ajusta a los puntos a los puntos según la ecuación presentada con  $R^2 = 0.9708$ .

**Cuadro 41.** Segunda corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Tiempo ( $\pm 0.5$ min)	Concentración ( $\pm 4.000 \times 10^4$ UFC/mL)	Reducción de viabilidad (%)
0	$8.800 \times 10^5$	$0.000 \pm 0.000$
5	$6.500 \times 10^5$	$26.136 \pm 2.000$
10	$4.500 \times 10^5$	$48.864 \pm 4.878$
15	$2.700 \times 10^5$	$69.318 \pm 10.742$
20	$2.500 \times 10^5$	$71.591 \pm 11.908$
25	$1.600 \times 10^5$	$81.818 \pm 20.790$
30	$1.200 \times 10^5$	$86.364 \pm 29.054$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se tomaron otras 7 muestras en tubos de ensayo con 2 mL del medio de cultivo de 2 L con *Bacillus subtilis* (ATCC11774) homogéneo antes de centrifugar, con una pipeta volumétrica de  $1 \pm 0.008$  mL, lo que implica una concentración inicial de  $2.680 \times 10^6$  UFC/mL. Estas se colocaron en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a  $177^\circ\text{C}$  durante los tiempos presentados en el cuadro. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, sin ningún factor de dilución, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Se obtuvo la concentración a partir de los datos originales del Cuadro 30 y el Cálculo 10. El porcentaje de reducción de viabilidad, en base al Cálculo 4. Para las incertidumbres de la concentración se utilizó el Cálculo 17 y para las del porcentaje de reducción de viabilidad, el Cálculo 18.

**Figura 5.** Curva de muerte de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) en la segunda corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L



Nota: Obtenido de experimentación propia. Los puntos representan los valores experimentales del Cuadro 41 y la línea punteada, el modelo de regresión exponencial que se ajusta a los puntos a los puntos según la ecuación presentada con  $R^2 = 0.9927$ .

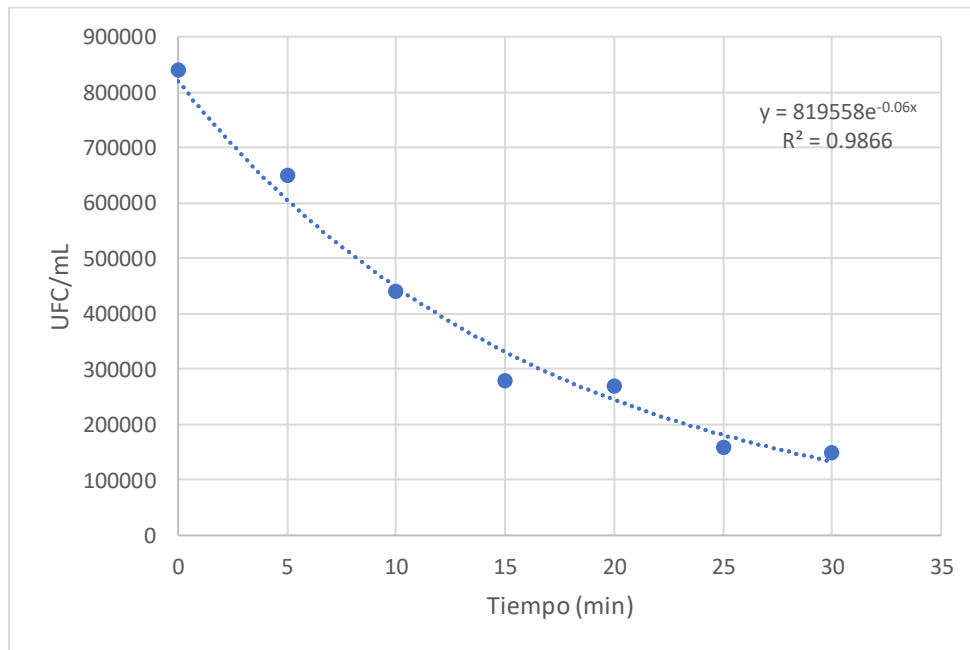
**Cuadro 42.** Tercera corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Tiempo ( $\pm 0.5$ min)	Concentración ( $\pm 4.000 \times 10^4$ UFC/mL)	Reducción de viabilidad (%)
0	$8.400 \times 10^5$	$0.000 \pm 0.000$

5	$6.500 \times 10^5$	$22.619 \pm 1.760$
10	$4.400 \times 10^5$	$47.619 \pm 4.887$
15	$2.800 \times 10^5$	$66.667 \pm 10.039$
20	$2.700 \times 10^5$	$67.857 \pm 10.559$
25	$1.600 \times 10^5$	$80.952 \pm 20.602$
30	$1.500 \times 10^5$	$82.143 \pm 22.251$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se tomaron otras 7 muestras en tubos de ensayo con 2 mL del medio de cultivo de 2 L con *Bacillus subtilis* (ATCC11774) homogéneo antes de centrifugar, con una pipeta volumétrica de  $1 \pm 0.008$  mL, lo que implica una concentración inicial de  $2.680 \times 10^6$  UFC/mL. Estas se colocaron en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a  $177^\circ\text{C}$  durante los tiempos presentados en el cuadro. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, sin ningún factor de dilución, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Se obtuvo la concentración a partir de los datos originales del Cuadro 31 y el Cálculo 10. El porcentaje de reducción de viabilidad, en base al Cálculo 4. Para las incertidumbres de la concentración se utilizó el Cálculo 17 y para las del porcentaje de reducción de viabilidad, el Cálculo 18.

**Figura 6.** Curva de muerte de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) en la tercera corrida de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L



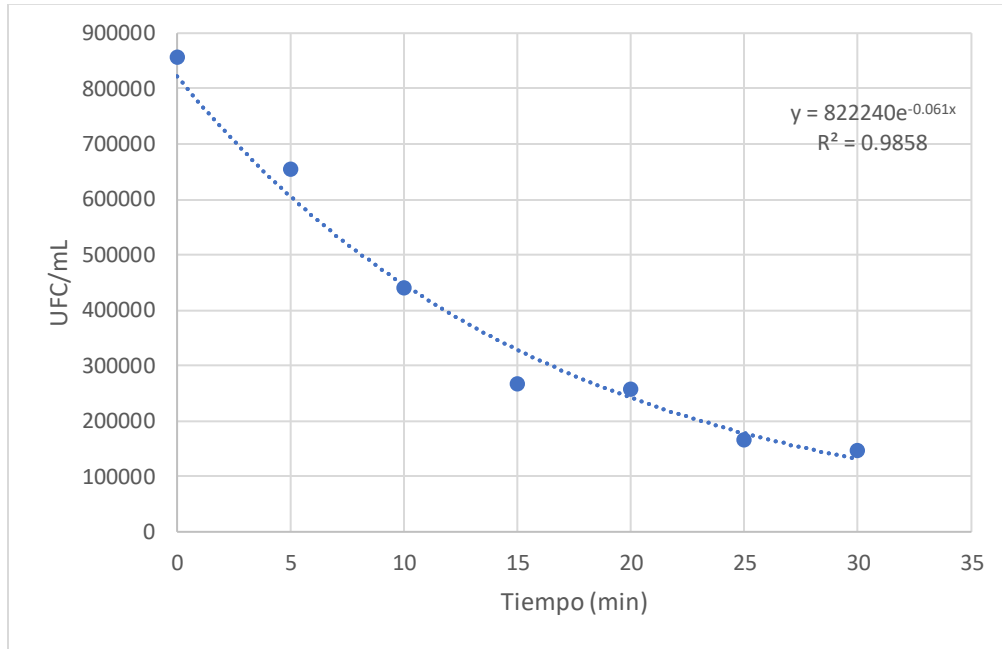
Nota: Obtenido de experimentación propia. Los puntos representan los valores experimentales del Cuadro 42 y la línea punteada, el modelo de regresión exponencial que se ajusta a los puntos a los puntos según la ecuación presentada con  $R^2 = 0.9866$ .

**Cuadro 43.** Promedio del triplicado de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Tiempo ( $\pm 0.5$ min)	Concentración promedio (UFC/mL)	Reducción de viabilidad (%)	Desviación estándar (UFC/mL)
0	$8.567 \times 10^5$	$0.000 \pm 0.000$	$2.082 \times 10^4$
5	$6.533 \times 10^5$	$23.735 \pm 3.165$	$5.774 \times 10^3$
10	$4.400 \times 10^5$	$48.638 \pm 8.610$	$1.000 \times 10^4$
15	$2.667 \times 10^5$	$68.872 \pm 18.740$	$1.528 \times 10^4$
20	$2.567 \times 10^5$	$70.039 \pm 19.736$	$1.155 \times 10^4$
25	$1.667 \times 10^5$	$80.545 \pm 34.110$	$1.155 \times 10^4$
30	$1.467 \times 10^5$	$82.879 \pm 39.720$	$2.517 \times 10^4$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se tomaron en total 21 muestras en tubos de ensayo con 2 mL del medio de cultivo de 2 L con *Bacillus subtilis* (ATCC11774) homogéneo antes de centrifugar, con una pipeta volumétrica de  $1 \pm 0.008$  mL, lo que implica una concentración inicial de  $2.680 \times 10^6$  UFC/mL. Estas se colocaron en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a  $177^\circ\text{C}$  durante los tiempos presentados en el cuadro. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, sin ningún factor de dilución, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Se calculó la concentración promedio a partir de los datos originales de los Cuadros 29, 30 y 31. y el Cálculo 10. El porcentaje de reducción de viabilidad, en base al Cálculo 4. Para las incertidumbres del porcentaje de reducción de viabilidad se utilizó el Cálculo 18. Para la desviación estándar se utilizó el Cálculo 16.

**Figura 7.** Curva de muerte promedio de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) según el triplicado de las pruebas de horneado del medio de cultivo de 2 L



Nota: Obtenido de experimentación propia. Los puntos representan los valores experimentales del Cuadro 43 y la línea punteada, el modelo de regresión exponencial que se ajusta a los puntos a los puntos según la ecuación presentada con  $R^2 = 0.9858$ .

**Cuadro 44.** Biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) que se incorpora a la masa de galletas para tener  $1 \times 10^6$  UFC/g

Masa	Valor ( $\pm 5.000 \times 10^{-4}$ g)
Biomasa por galleta	0.075
Biomasa total para la masa de galleta	1.577

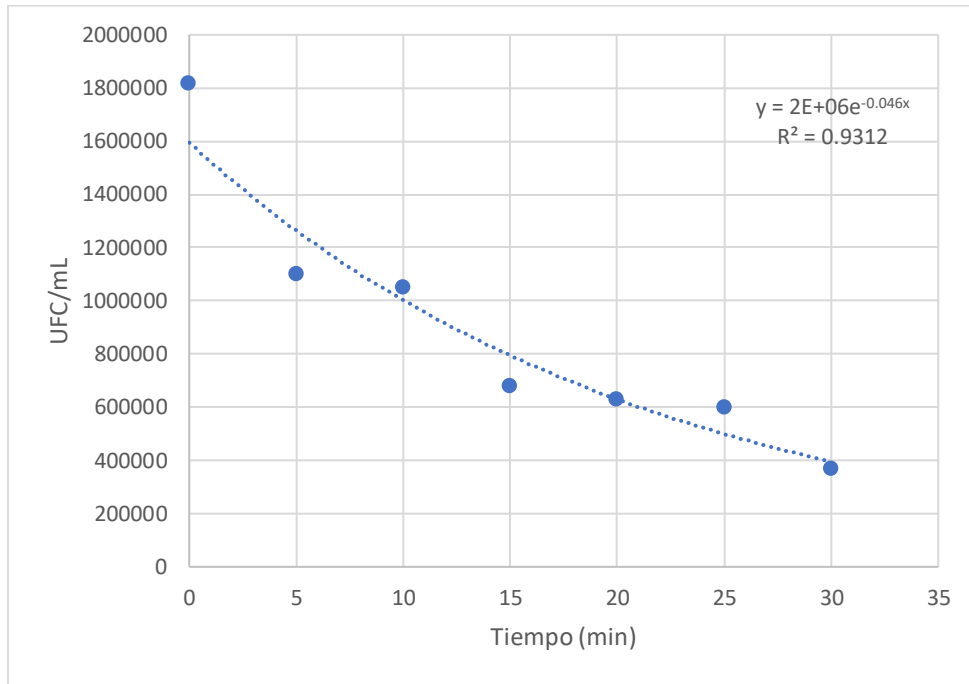
Nota: Obtenido de experimentación propia. El cálculo se basó en la cantidad de biomasa obtenida del medio de cultivo de 2 L con *Bacillus subtilis* (ATCC11774), presentada en el **Cuadro 32**, según el **Cálculo 12**, para lograr una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC por gramo de masa de galleta. Se utilizó una balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer con  $\pm 5.000 \times 10^{-4}$  g.

**Cuadro 45.** Primera corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Tiempo ( $\pm 0.5$ min)	Concentración ( $\pm 4.000 \times 10^4$ UFC/mL)	Reducción de viabilidad (%)
0	$1.820 \times 10^6$	$0.000 \pm 0.000$
5	$1.100 \times 10^6$	$39.560 \pm 1.681$
10	$1.050 \times 10^6$	$42.308 \pm 1.861$
15	$6.800 \times 10^5$	$62.637 \pm 3.933$
20	$6.300 \times 10^5$	$65.385 \pm 4.393$
25	$6.000 \times 10^5$	$67.033 \pm 4.705$
30	$3.700 \times 10^5$	$79.670 \pm 8.789$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se colocaron 7 galletas de mantequilla, con una concentración de biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) de  $1 \times 10^6$  UFC/g, en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a  $177^\circ\text{C}$  durante los tiempos presentados en el cuadro. Se tomó 1 g de cada galleta horneada según los tiempos presentados y se diluyeron en 9 mL de solución salina, en tubos de ensayo. Se mezcló bien con la ayuda del vortex mixer marca Fisher Scientific y se realizaron otras 2 diluciones, para lograr analizar la muestra. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Se obtuvo la concentración a partir de los datos originales del Cuadro 33 y el Cálculo 10. El porcentaje de reducción de viabilidad, en base al Cálculo 4. Para las incertidumbres de la concentración se utilizó el Cálculo 17 y para las del porcentaje de reducción de viabilidad, el Cálculo 18.

**Figura 8.** Curva de muerte de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) en la primera corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa



Nota: Obtenido de experimentación propia. Los puntos representan los valores experimentales del Cuadro 45 y la línea punteada, el modelo de regresión exponencial que se ajusta a los puntos a los puntos según la ecuación presentada con  $R^2 = 0.9312$ .

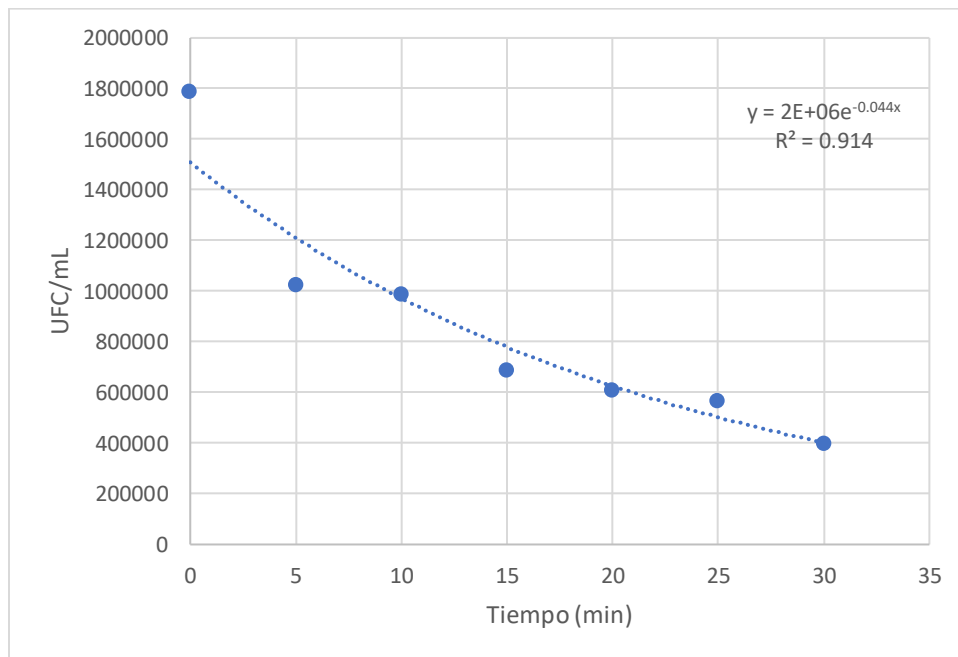
**Cuadro 46.** Segunda corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Tiempo ( $\pm 0.5$ min)	Concentración ( $\pm 4.000 \times 10^4$ UFC/mL)	Reducción de viabilidad (%)
0	$1.790 \times 10^6$	$0.000 \pm 0.000$
5	$1.030 \times 10^6$	$42.458 \pm 1.902$
10	$9.900 \times 10^5$	$44.693 \pm 2.064$
15	$6.900 \times 10^5$	$61.453 \pm 3.818$
20	$6.100 \times 10^5$	$65.922 \pm 4.567$
25	$5.700 \times 10^5$	$68.156 \pm 5.020$
30	$4.000 \times 10^5$	$77.654 \pm 7.957$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se colocaron otras 7 galletas de mantequilla, con una concentración de biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) de  $1 \times 10^6$  UFC/g, en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a  $177^\circ\text{C}$  durante los tiempos presentados en el cuadro. Se tomó 1 g de cada galleta

horneada según los tiempos presentados y se diluyeron en 9 mL de solución salina, en tubos de ensayo. Se mezcló bien con la ayuda del vortex mixer marca Fisher Scientific y se realizaron otras 2 diluciones, para lograr analizar la muestra. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Se obtuvo la concentración a partir de los datos originales del Cuadro 34 y el Cálculo 10. El porcentaje de reducción de viabilidad, en base al Cálculo 4. Para las incertidumbres de la concentración se utilizó el Cálculo 17 y para las del porcentaje de reducción de viabilidad, el Cálculo 18.

**Figura 9.** Curva de muerte de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) en la segunda corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa



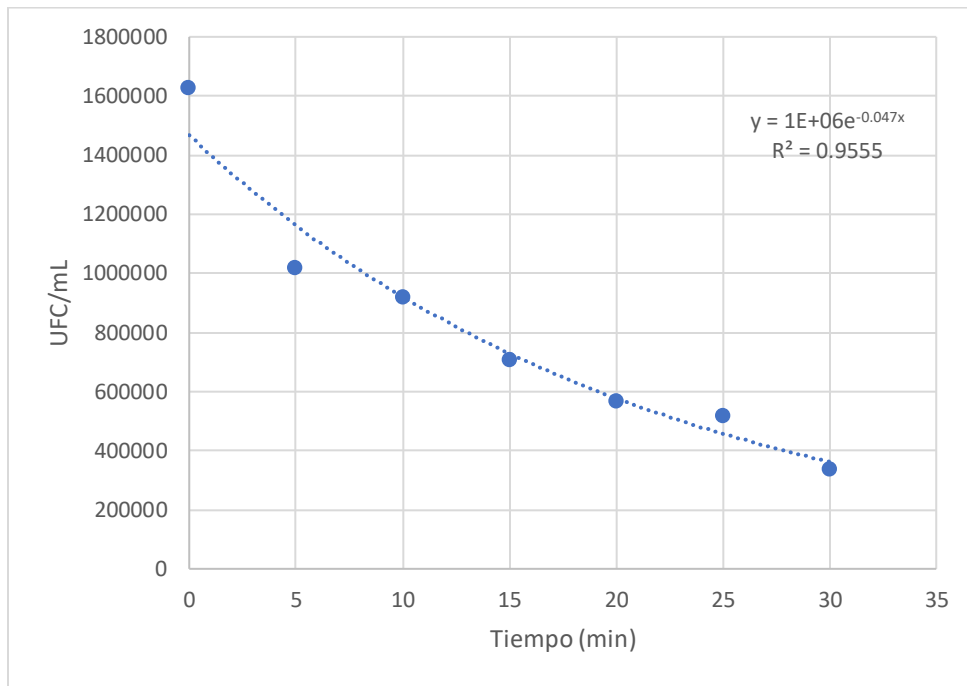
Nota: Obtenido de experimentación propia. Los puntos representan los valores experimentales del Cuadro 46 y la línea punteada, el modelo de regresión exponencial que se ajusta a los puntos a los puntos según la ecuación presentada con  $R^2 = 0.914$ .

**Cuadro 47.** Tercera corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Tiempo ( $\pm 0.5$ min)	Concentración ( $\pm 4.000 \times 10^4$ UFC/mL)	Reducción de viabilidad (%)
0	$1.630 \times 10^6$	$0.000 \pm 0.000$
5	$1.020 \times 10^6$	$37.423 \pm 1.731$
10	$9.200 \times 10^5$	$43.558 \pm 2.175$
15	$7.100 \times 10^5$	$56.442 \pm 3.468$
20	$5.700 \times 10^5$	$65.031 \pm 4.835$
25	$5.200 \times 10^5$	$68.098 \pm 5.498$
30	$3.400 \times 10^5$	$79.141 \pm 9.511$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se colocaron otras 7 galletas de mantequilla, con una concentración de biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) de  $1 \times 10^6$  UFC/g, en el horno eléctrico Oviedo, Indurama a  $177^\circ\text{C}$  durante los tiempos presentados en el cuadro. Se tomó 1 g de cada galleta horneada según los tiempos presentados y se diluyeron en 9 mL de solución salina, en tubos de ensayo. Se mezcló bien con la ayuda del vortex mixer marca Fisher Scientific y se realizaron otras 2 diluciones, para lograr analizar la muestra. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Se obtuvo la concentración a partir de los datos originales del Cuadro 35 y el Cálculo 10. El porcentaje de reducción de viabilidad, en base al Cálculo 4. Para las incertidumbres de la concentración se utilizó el Cálculo 17 y para las del porcentaje de reducción de viabilidad, el Cálculo 18.

**Figura 10.** Curva de muerte de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) en la tercera corrida de las pruebas de horneado de galletas con biomasa



Nota: Obtenido de experimentación propia. Los puntos representan los valores experimentales del Cuadro 47 y la línea punteada, el modelo de regresión exponencial que se ajusta a los puntos a los puntos según la ecuación presentada con  $R^2 = 0.9555$ .

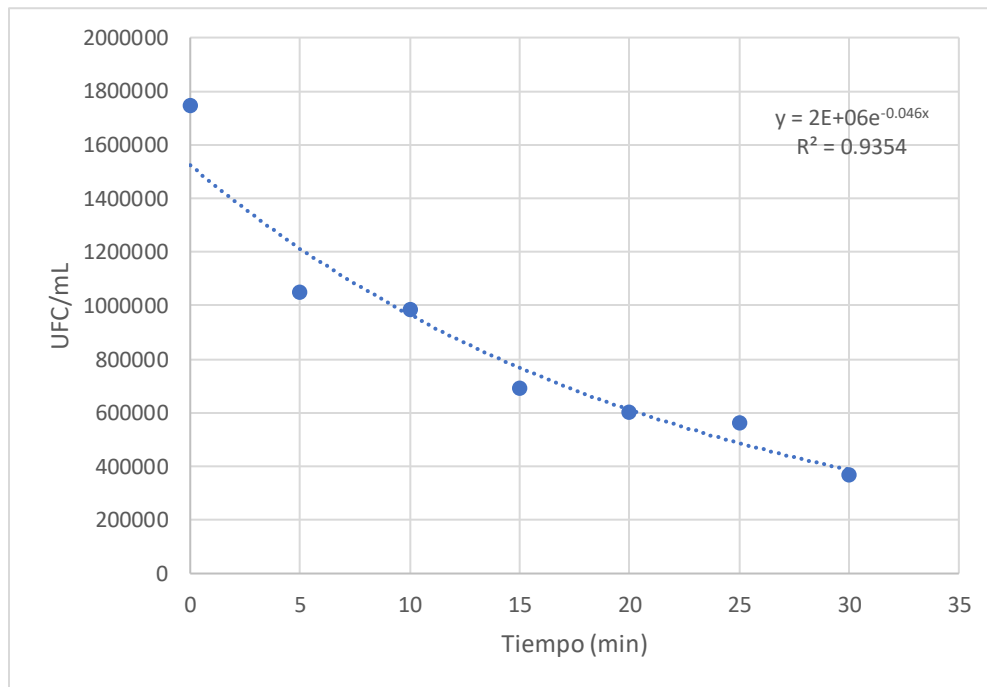
**Cuadro 48.** Promedio del triplicado de las pruebas de horneado de galletas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)

Tiempo ( $\pm 0.5$ min)	Concentración promedio (UFC/mL)	Reducción de viabilidad (%)	Desviación estándar (UFC/mL)
0	$1.747 \times 10^6$	$0.000 \pm 0.000$	$1.021 \times 10^5$
5	$1.050 \times 10^6$	$39.885 \pm 3.071$	$4.359 \times 10^4$
10	$9.867 \times 10^5$	$43.511 \pm 3.509$	$6.506 \times 10^4$
15	$6.933 \times 10^5$	$60.305 \pm 6.483$	$1.528 \times 10^4$
20	$6.033 \times 10^5$	$65.458 \pm 7.952$	$3.055 \times 10^4$
25	$5.633 \times 10^5$	$67.748 \pm 8.755$	$4.041 \times 10^4$
30	$3.700 \times 10^5$	$78.817 \pm 15.086$	$3.000 \times 10^4$

Nota: Obtenido de experimentación propia. Se colocaron en total 21 galletas de mantequilla, con una concentración de biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) de  $1 \times 10^6$  UFC/g, en el horno eléctrico

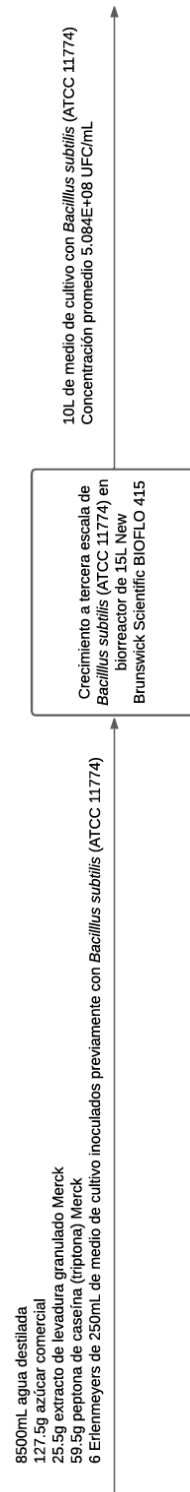
Oviedo, Indurama a 177 °C durante los tiempos presentados en el cuadro. Se tomó 1 g de cada galleta horneada según los tiempos presentados y se diluyeron en 9 mL de solución salina, en tubos de ensayo. Se mezcló bien con la ayuda del vortex mixer marca Fisher Scientific y se realizaron otras 2 diluciones, para lograr analizar la muestra. Se contaron las células vivas, de cada una de las muestras, en uno de los cuadros grandes presentes en la cámara Neubauer, utilizando el microscopio Leica DM500 y como indicador la solución de 0.4 % azul tripán R's Science. Se obtuvo la concentración promedio a partir de los datos originales del Cuadros 33, 34 y 35 y el Cálculo 10. El porcentaje de reducción de viabilidad, en base al Cálculo 4. Para las incertidumbres del porcentaje de reducción de viabilidad se utilizó el Cálculo 18. Para la desviación estándar se utilizó el Cálculo 16.

**Figura 11.** Curva de muerte promedio de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) según el triplicado de las pruebas de horneado de galletas con biomasa



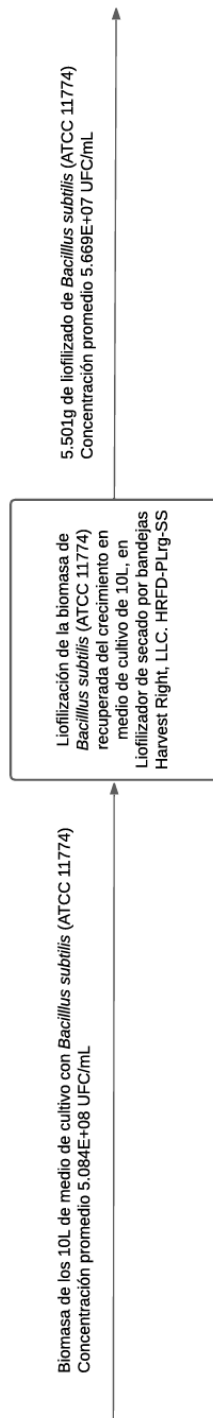
Nota: Obtenido de experimentación propia. Los puntos representan los valores experimentales del Cuadro 48 y la línea punteada, el modelo de regresión exponencial que se ajusta a los puntos a los puntos según la ecuación presentada con  $R^2 = 0.9354$ .

**Figura 12.** Balance de masa del proceso del crecimiento a tercera escala de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)



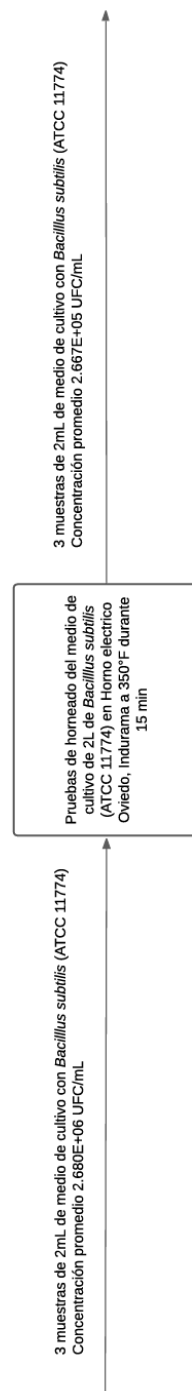
Nota: Obtenido de experimentación propia. Los datos recuperados se presentan en el Cuadro 37.

**Figura 13.** Balance de masa del proceso de liofilización de la biomasa recuperada de los 10 L del medio de cultivo con *Bacillus subtilis* (ATCC11774)



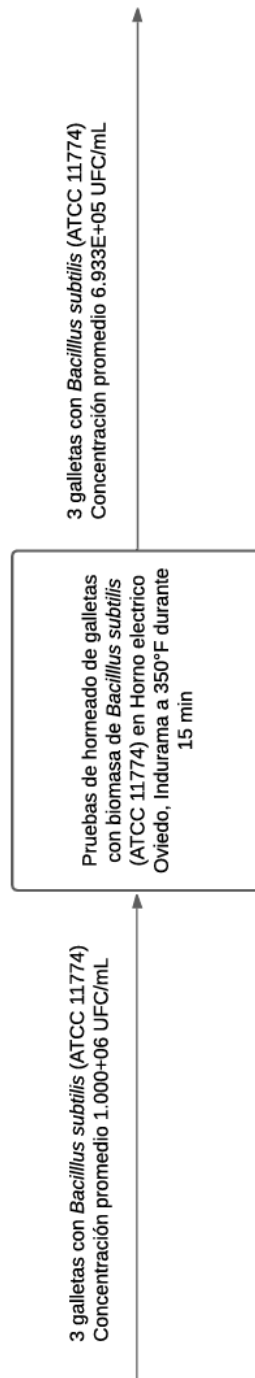
Nota: Obtenido de experimentación propia. Los datos recuperados se presentan en los Cuadros 23 y 37.

**Figura 14.** Balance de masa del proceso de horneado de las muestras de 2 mL del medio de cultivo de 2 L con *Bacillus subtilis* (ATCC11774)



Nota: Obtenido de experimentación propia. Los datos recuperados se presentan en el Cuadro 43. Se utiliza el tiempo de horneado de 15 min, al ser lo requerido para la obtención de galletas según su formulación.

**Figura 15.** Balance de masa del proceso de horneado de galletas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)



Nota: Obtenido de experimentación propia. Los datos recuperados se presentan en el Cuadro 48. Se utiliza el tiempo de horneado de 15 min, al ser lo requerido para la obtención de galletas según su formulación.

## E. Análisis de error

**Cálculo 15.** *Media de las concentraciones antes del proceso de liofilización de Bacillus subtilis (ATCC11774)*

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$
$$\frac{(5.314 \times 10^8 \frac{UFC}{mL}) + (4.836 \times 10^8 \frac{UFC}{mL}) + (1.594 \times 10^8 \frac{UFC}{mL})}{3} = 3.437 \times 10^8 \frac{UFC}{mL}$$

Nota: obtenido de la experimentación propia. Para este cálculo se utilizó la ecuación de la media, obtenida de Skoog (2010), donde  $x$  representa los valores de la muestra y  $n$  la cantidad de la muestra. Se utilizaron los valores de las 3 corridas que se realizaron para encontrar la concentración antes del proceso de liofilización. Estos valores se encuentran en el Cuadro 37. Se realizó el mismo procedimiento para los valores de las corridas para luego del proceso de liofilización, así como también para el resto de los valores promedio presentados en los Cuadros anteriores.

**Cálculo 16.** *Desviación estándar de las concentraciones antes del proceso de liofilización de Bacillus subtilis (ATCC11774)*

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$
$$\sqrt{\frac{[(5.314 \times 10^8 \frac{UFC}{mL}) - (3.437 \times 10^8 \frac{UFC}{mL})]^2 + [(4.836 \times 10^8 \frac{UFC}{mL}) - (3.437 \times 10^8 \frac{UFC}{mL})]^2 + [(1.594 \times 10^7 \frac{UFC}{mL}) - (3.437 \times 10^8 \frac{UFC}{mL})]^2}{3 - 1}}$$
$$= 2.848 \times 10^8 \frac{UFC}{mL}$$

Nota: obtenido de la experimentación propia. Para este cálculo se utilizó la ecuación de desviación estándar, obtenida de Skoog (2010), donde  $(x_i - \bar{x})$  es la diferencia entre un valor de la muestra y la media, y  $n$  representa la cantidad de la muestra. Se utilizaron los valores de las 3 corridas que se realizaron para encontrar la concentración antes del proceso de liofilización. Estos valores se encuentran en el Cuadro 37. Se realizó el mismo procedimiento para todos los valores para los cuales se calculó una media. Estos resultados se presentan los Cuadros anteriores.

**Cálculo 17.** *Incertidumbre de sumas y restas para el cálculo de la masa de uno de los tubos de la centrífuga con medio de cultivo, del crecimiento de 2 L de Bacillus subtilis (ATCC11774), para las pruebas horneadas*

$$\Delta\bar{x} = \sqrt{a^2 + b^2 + c^2 + \dots}$$

$$\sqrt{(5.000 \times 10^{-4} g)^2 + (5.000 \times 10^{-4} g)^2} = \pm 7.071 \times 10^{-4} g$$

Nota: obtenido de la experimentación propia. Para este cálculo se utilizó la ecuación de incertidumbre para sumas y restas, obtenida de Skoog (2010), donde  $\Delta\bar{x}$  es la incertidumbre del resultado y a, b, c... son las incertidumbres de cada valor. Se utilizaron los valores del primer tubo de la centrífuga, de la primera corrida de centrifugación del medio de cultivo de 2 L de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), estos datos se presentan en el Cuadro 25. Se realizó el mismo procedimiento para los otros 3 tubos de la centrífuga en las dos corridas realizadas, así como también, para todas las incertidumbres presentadas en los Cuadros anteriores según los cálculos que requirieran la sumatoria o resta de valores con incertidumbres individuales.

**Cálculo 18.** *Propagación de error de multiplicaciones y divisiones para el cálculo de la densidad del medio de cultivo del crecimiento de 2 L de Bacillus subtilis (ATCC11774), para las pruebas horneadas*

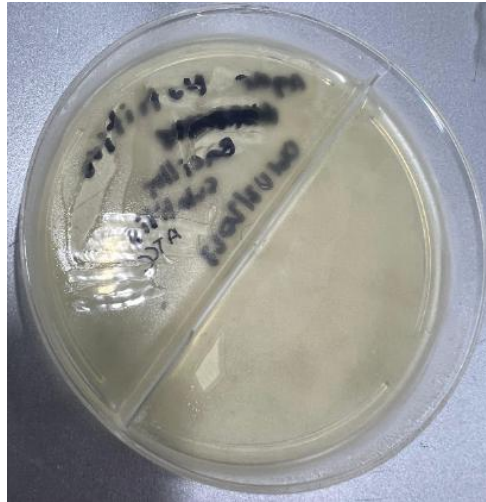
$$\frac{S_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{S_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{S_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{S_c}{c}\right)^2 + \dots}$$

$$\left(1.037 \frac{g}{mL}\right) * \sqrt{\left(\frac{0.008 mL}{1 mL}\right)^2 + \left(\frac{5.000E - 04 g}{1.037 g}\right)^2} = \pm 0.008 \frac{g}{mL}$$

Nota: obtenido de la experimentación propia. Para este cálculo se utilizó la ecuación de propagación de error para multiplicaciones y divisiones, obtenida de Skoog (2010), donde  $S_y$  es la incertidumbre del resultado “y”, y  $S_a$ ,  $S_b$ ,  $S_c$ ... son las incertidumbres de cada uno de los valores a, b, c... Se utilizaron los valores de la densidad calculada a partir de la masa que presentó 1mL de medio de cultivo, estos se encuentran en el Cuadro 28. Se realizó el mismo procedimiento para todas las incertidumbres presentadas en los Cuadros anteriores, según los cálculos que requirieran la multiplicación o división de valores con incertidumbres individuales.

## F. Pruebas de la experimentación

**Imagen 20.** Fuente original de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), en caja petri con agar nutritivo sólido



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 21.** Multiplicación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), desde su fuente original, en caja petri con agar nutritivo sólido



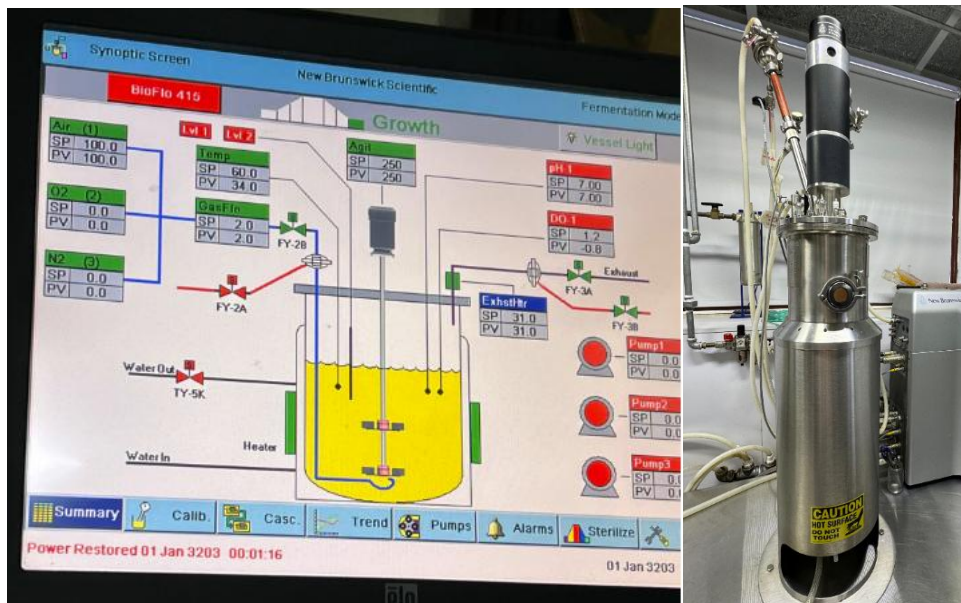
Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala. Esto se hizo en caso no fuera suficiente la cantidad de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) obtenida en la fuente original de caja petri con agar nutritivo sólido. Se realizó únicamente, regando un poco de las bacterias en varias cajas petri con agar nutritivo sólido Merck 1.11471.0500, utilizando un asa bacteriológica.

**Imagen 22.** Primera prueba del proceso de liofilización de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), a partir de un medio de cultivo de 1 L



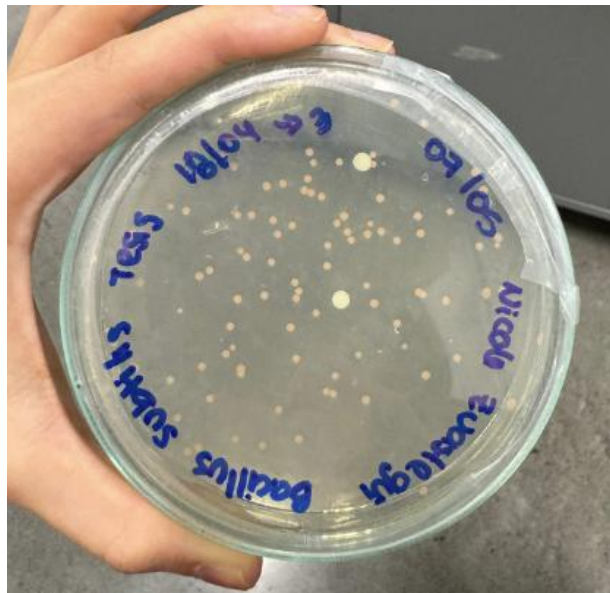
Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala. Esto se hizo antes de empezar la experimentación del trabajo de investigación, para comprender el funcionamiento de los equipos y analizar el comportamiento *Bacillus subtilis* (ATCC11774) ante estos procesos. La imagen fue tomada una semana después del proceso de liofilización.

**Imagen 23.** Condiciones del biorreactor a utilizar para el crecimiento a tercera escala de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 24.** Cuantificación de UFC de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), en agar nutritivo sólido, obtenida de una muestra del medio de cultivo de la tercera escala de crecimiento.



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 25.** Biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) obtenida de la centrifugación de 50 mL de medio de cultivo de la tercera escala de crecimiento.



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 26.** *Peso seco de Bacillus subtilis (ATCC11774) obtenido de 50 mL del medio de cultivo de la tercera escala de crecimiento.*



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 27.** *Biomasa total de Bacillus subtilis (ATCC11774) obtenida del medio de cultivo de la tercera escala de crecimiento.*



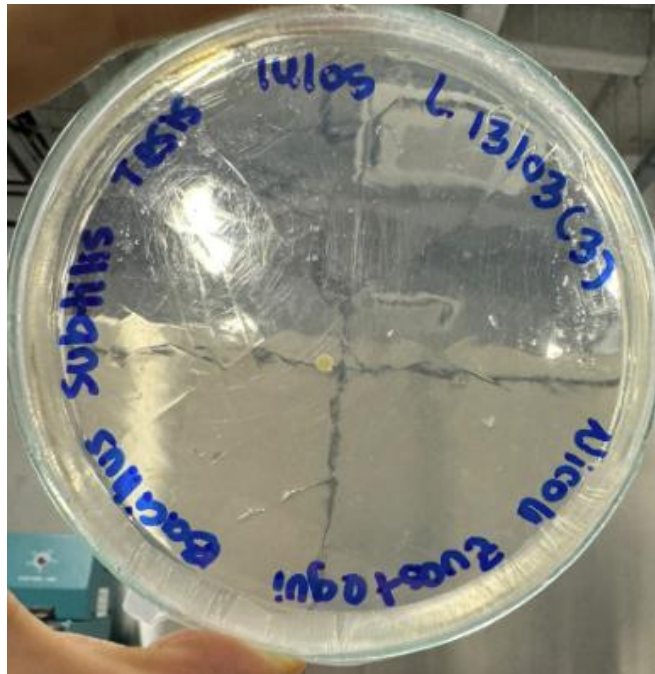
Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 28.** Liofilizado de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) obtenido de la biomasa total del medio de cultivo de la tercera escala de crecimiento.



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 29.** Cuantificación de UFC de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), en agar nutritivo sólido, obtenida de una muestra rehidratada del liofilizado de la tercera escala de crecimiento.



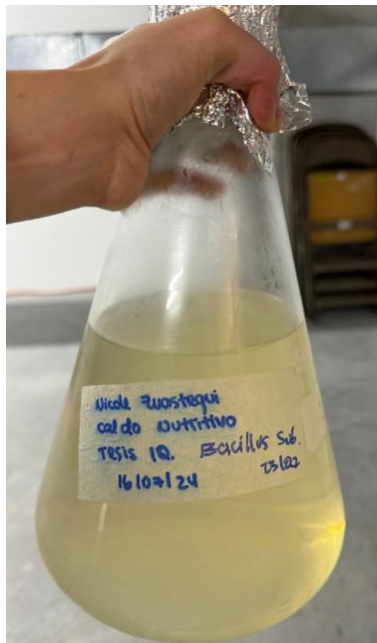
Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 30.** Primera prueba del proceso de horneado de galletas sin *Bacillus subtilis* (ATCC11774)



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en una cocina de propiedad privada en Guatemala. Esto se hizo antes de empezar la experimentación de horneado del trabajo de investigación, para analizar el comportamiento de las galletas según su formulación, sin agregar *Bacillus subtilis* (ATCC11774). Ver tiempos requeridos de horneado, confirmar temperaturas y saber las cantidades próximas a utilizar de cada ingrediente.

**Imagen 31.** Crecimiento de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) en medio de cultivo de 2 L



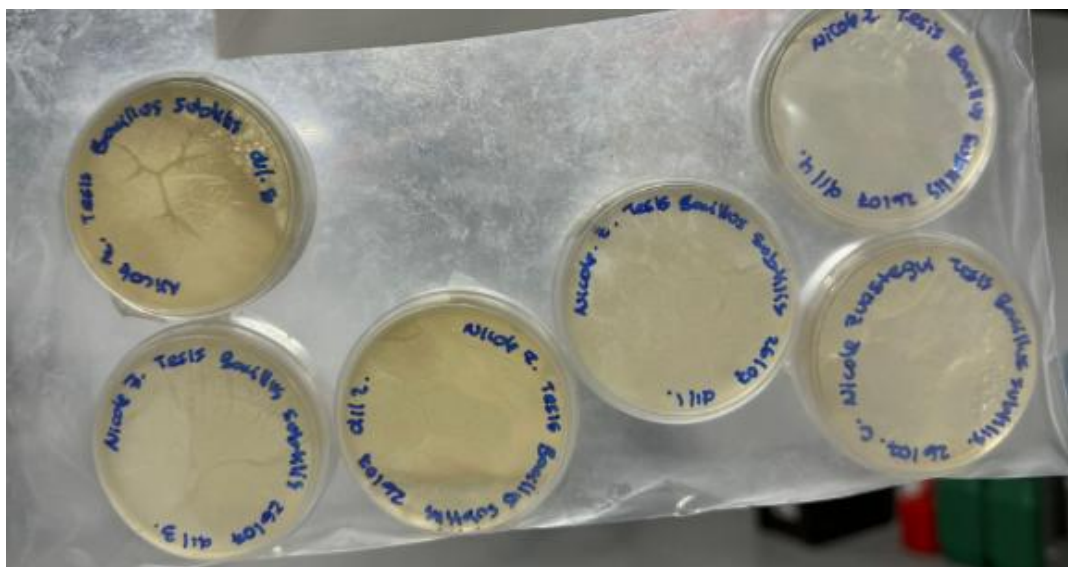
Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 32.** Pesaje de la centrifugación de *Bacillus subtilis* (ATCC11774) del medio de cultivo de 2 L



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 33.** Cuantificación de UFC de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), en agar nutritivo sólido, obtenida de una muestra del medio de cultivo del crecimiento de 2 L.



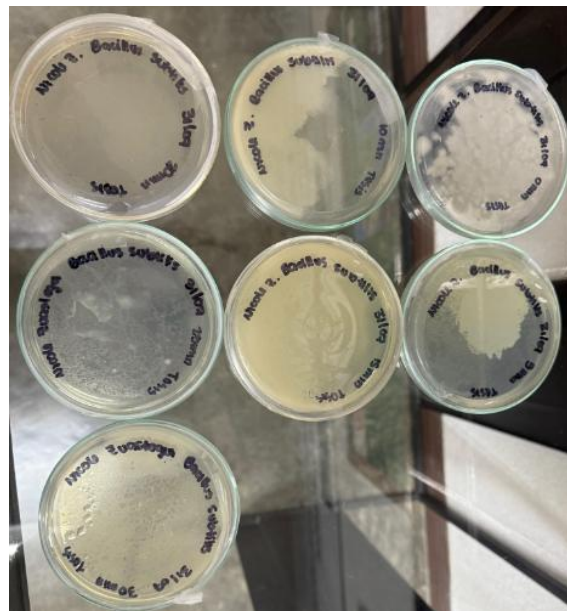
Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 34.** Muestras horneadas de 2 mL del medio de cultivo del crecimiento de 2 L de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 35.** Cuantificación de UFC de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), en agar nutritivo sólido, obtenido de las muestras horneadas de 2 mL del medio de cultivo del crecimiento de 2 L



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 36.** Masa de galletas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774)



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 37.** Galletas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), horneadas



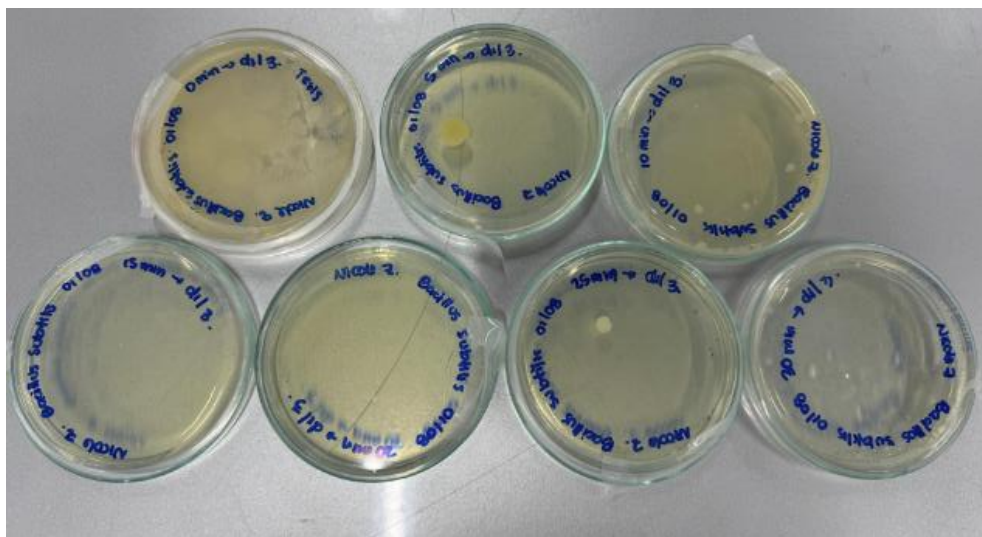
Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 38.** Dilución de galletas con biomasa de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), horneadas, para su análisis



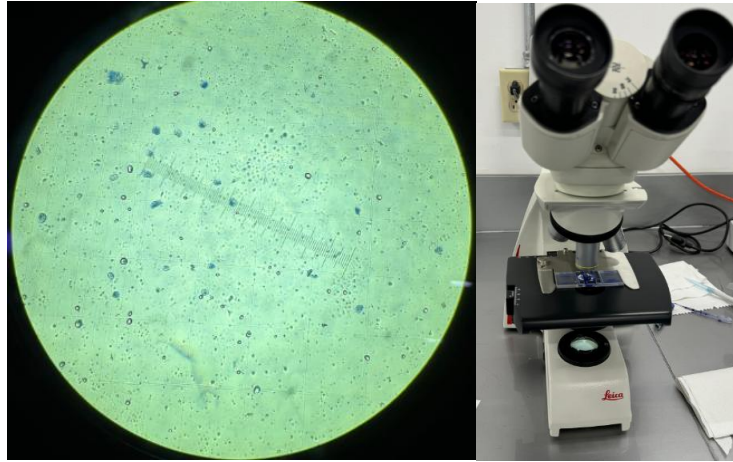
Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 39.** Cuantificación de UFC de *Bacillus subtilis* (ATCC11774), en agar nutritivo sólido, obtenido de las galletas con biomasa, horneadas



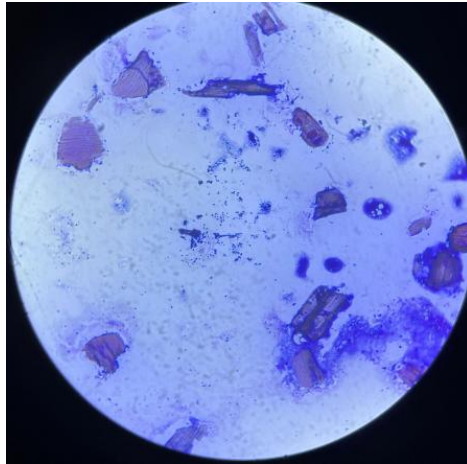
Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 40.** *Cuantificación de UFC de Bacillus subtilis (ATCC11774), en cámara Neubauer*



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

**Imagen 41.** *Prueba tinción de gram de Bacillus subtilis (ATCC11774)*



Nota: Imagen obtenida dónde se realizó el análisis, en el Laboratorio de Bioprocesos Industriales de la Universidad del Valle de Guatemala.

### XIII. GLOSARIO

Alimento funcional: aquel que además de aportar nutrientes, también contiene componentes biológicamente activos que proporcionan beneficios adicionales a la salud (Beltrán, 2016).

Bacillus subtilis: bacteria aeróbica, grampositiva y termófila (Villanueva, 2015).

Bacteria termófila: bacteria que puede tolerar condiciones ambientales extremas, temperaturas por arriba de 65°C (iNaturalist, s. f.).

Biorreactores: equipos diseñados para alojar microorganismo, células o biomasa, proporcionando un entorno controlado (Acura, 2024).

Cámara Neubauer: es una medida del número de individuos, un método directo para medir el crecimiento de una población bacteriana (Hernández, 2022).

Curva de muerte: es la última fase de la evolución de una bacteria, cuando se reduce el número de células viables en el cultivo (Lozano, et. al., 2021).

Galleta: producto horneado, generalmente dulce, hecho de harina, azúcar y grasa (Berenguer, s. f.).

Liofilización: proceso de deshidratación por congelación y sublimación (GIDOLQUIM, 2014).

Lisis: la lisis celular se refiere al proceso de ruptura de la membrana celular, liberando el contenido intracelular al ambiente exterior (QUÍMICA.ES, 2024).

Medio de cultivo: es una mezcla de sustancias que se utiliza para promover el crecimiento de microorganismos como bacterias, virus y hongos (Rovira, 2023).

Probiótico: microorganismos vivos que cuando se consumen en cantidades adecuadas, proporcionan beneficios para la salud, específicamente intestinal (Valera, 2022).

Viabilidad: cuando una célula se coloca en un medio de cultivo y es capaz de dividirse y reproducirse (Iáñez, 2005).