

OPTIMIZACIÓN DE PRODUCCIÓN DE BIOMASA, ÁCIDO LÁCTICO Y SUPERVIVENCIA A SIMULACIÓN GASTROINTESTINAL DE *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG CULTIVADO EN BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO

OPTIMIZATION OF BIOMASS PRODUCTION, LACTIC ACID, AND GASTROINTESTINAL SIMULATION SURVIVAL OF *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG CULTURED IN STIRRED TANK BIOREACTOR

Wilbert Gutiérrez-Sarmiento¹, Lucía M. C. Ventura-Canseco¹, Federico A. Gutiérrez-Miceli¹
María C. Luján-Hidalgo¹, Miguel Abud-Archila¹, Víctor M. Ruíz-Valdiviezo^{1*}

¹Laboratorio de Microbiología. Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Carretera Panamericana km. 1080, CP. 29050. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. (bioqvic@hotmail.com).

RESUMEN

Lactobacillus plantarum BAL-03-ITTG es una bacteria ácido láctica (BAL) aislada de la 'taberna', una bebida autóctona, fermentada, natural del Sur de México. Por sus características de fermentación esta bacteria es potencialmente útil en la industria biotecnológica y alimentaria para la producción de biomasa y ácido láctico; sin embargo, se requiere el conocimiento de las condiciones de cultivo para maximizar la producción en sistema de tanque agitado. El objetivo de esta investigación fue optimizar las condiciones de agitación, aireación y concentración de Tween 80 en un biorreactor automatizado eZ control-Applikon. La metodología usada fue la de superficie de respuesta (MSR) con diseño factorial completo aleatorizado 3^3 en los niveles de agitación 100, 200 y 300 rpm, aireación 0, 0.25 y 0.5 vvm y Tween 80 1, 3 y 5 mL L⁻¹ (v:v). Los datos de biomasa, ácido láctico y supervivencia a simulación gastrointestinal (SSG) se analizaron con ANDEVA y parámetro de deseabilidad. Los resultados indicaron que el crecimiento celular no se afectó significativamente ($p > 0.05$) dentro del rango de los factores evaluados. La producción de ácido láctico y la SSG fueron influenciados significativamente ($p \leq 0.05$) por la aireación y el Tween 80, respectivamente. Los niveles óptimos encontrados mediante el parámetro de deseabilidad fueron 300 rpm, 0.13 vvm y 3.06 mL L⁻¹. La replicación experimental de estas condiciones óptimas generó una densidad poblacional de 7.10×10^9 UFC mL⁻¹, ácido láctico de 23.8 g L⁻¹ y SSG de 84.45%. Este estudio proporciona por primera vez información útil de las condiciones de crecimiento de *L. plantarum* BAL-03-ITTG en un biorreactor de tanque agitado. El resultado de este estudio podría usarse para obtener el mayor

ABSTRACT

Lactobacillus plantarum BAL-03-ITTG is a lactic acid bacterium (BAL) isolated from *taberna*, a fermented and natural drink, native to Southern Mexico. Due to its fermentation characteristics, this bacterium is potentially useful for the production of biomass and lactic acid in the biotechnology and food industry. However, knowledge of the cultivation conditions is required to maximize its production in a stirred tank system. The objective of this research was to optimize the conditions of agitation, aeration, and Tween-80 concentration in an eZ-Control automated bioreactor (Applikon). The response surface methodology (MSR) with a completely randomized factorial design 3^3 was used at: 100, 200, and 300 rpm agitation levels; 0, 0.25, and 0.5 vvm aeration; and 1, 3, and 5 mL L⁻¹ Tween-80 (v:v). The biomass, lactic acid, and gastrointestinal simulation survival (SSG) data were analyzed with ANOVA and a desirability parameter. The results indicated that cell growth was not significantly affected ($p > 0.05$) within the range of the evaluated factors. Lactic acid production and SSG were significantly influenced ($p \leq 0.05$) by aeration and Tween-80, respectively. Based on the desirability parameter, the optimal levels were 300 rpm, 0.13 vvm, and 3.06 mL L⁻¹. Experimental replication of these optimal conditions generated a population density of 7.10×10^9 UFC mL⁻¹, lactic acid of 23.8 g L⁻¹, and SSG of 84.45%. This study provides, for the first time, useful information on the growth conditions of *L. plantarum* BAL-03-ITTG in a stirred tank bioreactor. The result of this study could be used to obtain the highest yield in the production of lactic acid and biomass, without affecting the integrity of this microorganism.

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: abril, 2019. Aprobado: agosto, 2019.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 54: 147-162. 2020.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, agitation, aeration, Tween-80, bioreactor.

rendimiento en la producción de ácido láctico y biomasa, sin afectar la integridad de este microorganismo.

Palabras clave: *Lactobacillus plantarum*, agitación, aereación, Tween-80, biorreactor.

INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que al ingerirse, en dosis adecuadas, aportan beneficios a la salud del huésped (Kechagia *et al.*, 2013), como prevención de enfermedades gastrointestinales (Ritchie y Romanuk, 2012), estimulación de la respuesta inmune (Ashraf y Shah, 2014) y modulación de la microbiota intestinal (Wang *et al.*, 2015). Las bacterias ácido lácticas (BAL) están entre los microorganismos probióticos más usados. Estas bacterias pueden mejorar el valor nutricional, las características sensoriales y la conservación de varios alimentos como leche, vino, carne y vegetales (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002). Además, los probióticos deben administrarse en cantidades mínimas de 10^7 UFC mL⁻¹ o UFC g⁻¹ en un producto alimenticio y deben tolerar condiciones de pH de 2.5 o la actividad de enzimas del tracto gastrointestinal (Corcoran *et al.*, 2007).

Lactobacillus plantarum BAL-03-ITTG es una cepa aislada de la 'taberna', una bebida fermentada naturalmente por la presencia de la comunidad bacteriana (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010). Después del aislamiento de *L. plantarum* BAL-03-ITTG los estudios iniciales demostraron características importantes como densidad poblacional de 4.69×10^9 UFC mL⁻¹, tiempo de duplicación de 1.16 h, actividad antimicrobiana contra patógenos (*E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*) y producción de exopolisacáridos de 62.21 mg mL⁻¹. También ha demostrado la capacidad de conversión de β -glucósidos en agliconas mediante la producción de β -glucosidasa, así como la disminución en el contenido de fitatos durante la fermentación de leche de soya (Mendoza-Avenidaño *et al.*, 2019).

Diversos factores se deben evaluar durante la estandarización de los procesos de fermentación. Uno de los más estudiados para el crecimiento de los microorganismos es la composición del medio de cultivo. En el caso de las bacterias ácido lácticas, la presencia de Tween 80 se reportó como

INTRODUCTION

Probiotics are live microorganisms that—ingested in adequate doses— provide benefits to the health of the host (Kechagia *et al.*, 2013), such as prevention of gastrointestinal diseases (Ritchie and Romanuk, 2012), stimulation of the immune response (Ashraf and Shah, 2014), and modulation of the intestinal microbiota (Wang *et al.*, 2015). Lactic acid bacteria (BAL) are some of the most used probiotic microorganisms. These bacteria can improve the nutritional value, sensory characteristics, and conservation of various foods, including milk, wine, meat and vegetables (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002). Additionally, probiotics should be administered in minimum amounts of 10^7 UFC mL⁻¹ or UFC g⁻¹ per food product, and they should tolerate pH conditions of 2.5 or activity of the gastrointestinal tract enzymes (Corcoran *et al.*, 2007).

Lactobacillus plantarum BAL-03-ITTG is a strain isolated from the *taberna*, a drink that is naturally fermented by the presence of the bacterial community (Alcántara-Hernández *et al.*, 2010). After the *L. plantarum* BAL-03-ITTG was isolated, the initial studies showed important characteristics such as: population density of 4.69×10^9 UFC mL⁻¹; doubling time of 1.16 h; antimicrobial activity against pathogens (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus*); and exopolysaccharide production of 62.21 mg mL⁻¹. It also has the ability to convert β -glycosides into aglycones through the production of β -glucosidase, as well as to decrease phytate content during the fermentation of soy milk (Mendoza-Avenidaño *et al.*, 2019).

Various factors must be evaluated during the standardization of fermentation processes. One of the most studied for microorganism growth is the composition of the culture medium. In the case of lactic acid bacteria, the presence of Tween-80 was reported as an essential element for the formation of the membranes of these microorganisms (Tan *et al.*, 2012; Reitermayer *et al.*, 2018). Tween-80 contributes to survival in conditions of refrigeration, drying, acidic pH and salinity, during the processing or storage of crops (Corcoran *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2015; Florence *et al.*, 2016). Although the addition of Tween-80 during cultivation is sometimes used as a defoamer, it was not used for

esencial para la formación de las membranas de estos microorganismos (Tan *et al.*, 2012; Reitermayer *et al.*, 2018). Este contribuye a la supervivencia en condiciones de refrigeración, secado, pH ácido y salinidad durante el procesamiento o almacenamiento de los cultivos (Corcoran *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2015; Florence *et al.*, 2016). Aunque la adición de Tween 80 durante el cultivo a veces suele emplearse como antiespumante, para este estudio no cumple esa intención. Además, la agitación y aereación también están entre los factores más evaluados para la estandarización de procesos. Estos son determinantes para la productividad de la fermentación por su relación con la hidrodinámica del sistema, el metabolismo y la integridad de los microorganismos. Los procesos en biorreactores de tanque agitado suelen influir sobre las propiedades bioquímicas de las células animales, vegetales, hongos y bacterias, porque están sometidos a condiciones de estrés que causan cambios metabólicos y morfológicos. Las condiciones pueden ser letales o sub-letales para el mantenimiento celular y la generación de productos (Sahoo *et al.*, 2006; Garcia-Ochoa *et al.*, 2013).

La metodología de superficie de respuesta es una herramienta estadística usada en el diseño de experimentos como la optimización de parámetros de hidrólisis enzimática (Pinho *et al.*, 2010), procesos de extracción (Cho *et al.*, 2013) o estandarización de cultivo para la producción de sustancias antimicrobianas (Wang y Liu, 2008), entre otros.

No existen reportes de algún estudio en el cual se haya evaluado la interacción entre la agitación, aereación y Tween 80 en el cultivo de bacterias ácido lácticas. Esta estandarización del proceso de fermentación permite determinar las condiciones óptimas para el crecimiento, producción de metabolitos y mantenimiento de la supervivencia de los microorganismos.

El objetivo de este estudio fue optimizar las condiciones de agitación, aereación y concentración de Tween 80 con la metodología de superficie de respuesta que maximice la producción de biomasa, ácido láctico y el porcentaje de SSG de *L. plantarum* BAL-03-ITTG, al cultivarse en un biorreactor de tanque agitado automatizado eZ control-Applikon. La hipótesis de este estudio fue que el aumento de los niveles de agitación, aereación y concentración de Tween 80 podría disminuir el crecimiento y las variables bioquímicas de *L. plantarum* BAL-03-ITTG.

that purpose in this research. Agitation and aeration are also among the most frequently evaluated factors during process standardization. These are determinants for fermentation productivity, because they are related to the hydrodynamics of the system, the metabolism, and the integrity of the microorganisms. In general, processes in stirred tank bioreactors usually influence the biochemical properties of animal, plant, fungal and bacterial cells, because they undergo stress conditions that cause metabolic and morphological changes. The conditions can be lethal or sub-lethal for cell maintenance and product generation (Sahoo *et al.*, 2006; Garcia-Ochoa *et al.*, 2013).

The response surface methodology is a statistical tool used to design experiments such as optimization of enzymatic hydrolysis parameters (Pinho *et al.*, 2010), extraction processes (Cho *et al.*, 2013) or crop standardization for production of antimicrobial substances (Wang and Liu, 2008), among others.

There are no reports of any study in which the interaction between agitation, aeration and Tween-80 in the culture of lactic acid bacteria was evaluated. This standardization of the fermentation process enables the establishment of the optimal conditions for growth, metabolite production, and maintenance of the survival of microorganisms.

The objective of this study was to optimize the conditions of agitation, aeration and Tween-80 concentration using the response surface methodology to maximize the production of biomass, lactic acid and the SSG percentage of *L. plantarum* BAL-03-ITTG when it is grown in an ez-Control automated stirred tank bioreactor (Applikon, Netherlands). The hypothesis of this study was that increasing the levels of agitation, aeration and Tween-80 concentration could diminish the growth and biochemical variables of *L. plantarum* BAL-03-ITTG.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism

Lactobacillus plantarum BAL-03-ITTG was stored in glycerol 40% (v:v) at -20°C in the crop collection of the Microbiology Laboratory of Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. The access number in GenBank NCBI for strain BAL-03-ITTG of *Lactobacillus plantarum* is KY131967. This microorganism was

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Lactobacillus plantarum BAL-03-ITTG se conservó en glicerol 40% (v:v) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la colección de cultivos del Laboratorio de Microbiología del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. El número de acceso en GenBank NCBI para la cepa BAL-03-ITTG de *L. plantarum* es KY131967. La reactivación de este microorganismo se realizó cada dos semanas en tubos con caldo estéril MRS [Glucosa 20 g L^{-1} , peptona 10 g L^{-1} , extracto de carne 8 g L^{-1} , acetato de sodio 5 g L^{-1} , extracto de levadura 4 g L^{-1} , fosfato dipotásico 2 g L^{-1} , Tween-80 1 g L^{-1} , citrato de amonio 2 g L^{-1} , sulfato de magnesio 2 g L^{-1} y sulfato de manganeso 0.05 g L^{-1}] (Difco, Nueva Jersey, EUA) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, con inóculo al 10% (v:v) e incubado a temperatura ambiente ($30\text{-}35\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 8 h.

Preparación del inóculo

El inóculo de cada unidad experimental se desarrolló en matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenía 205 mL de medio MRS estéril (Difco, Nueva Jersey, EUA). El matraz se inoculó al 10% (v:v) e incubó a temperatura ambiente ($30\text{-}35\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 8 h a 100 rpm en una agitadora orbital MaxQ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Sistema de fermentación de control automatizado

Cada unidad experimental se desarrolló en un biorreactor de tanque agitado modelo eZ-Control (Applikon, Países Bajos) con capacidad total de 3 L, con accesorios para control de agitación, aereación, temperatura y pH. La esterilización se realizó a 11 lb pulg^{-2} durante 15 min de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El biorreactor se configuró bajo la geometría estándar con un volumen nominal de 2250 mL y se esterilizó con 2045 mL de caldo MRS (Difco, Nueva Jersey, EUA) e inoculó con 205 mL del matraz semilla que contenía alrededor de 3.5×10^9 UFC mL^{-1} . La agitación se realizó con un par de turbinas Rushton de 6 paletas. La aereación se efectuó con una bomba de aire 7500 CO (HI-TECH, California, EUA), un filtro de $0.30\text{ }\mu\text{m}$ (Whatman, Reino Unido) y un difusor tipo "L". El pH se mantuvo constante a un valor de 6 con una solución de NaOH 5M y a una temperatura de $36\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todos los cultivos se muestrearon cada 2 h durante las 8 h de fermentación para cuantificar biomasa, glucosa, ácido láctico y la supervivencia a la simulación gastrointestinal, descritos en el siguiente apartado.

reactivados cada dos semanas en tubos con sterile MRS broth [Glucose 20 g L^{-1} , peptone 10 g L^{-1} , meat extract 8 g L^{-1} , sodium acetate 5 g L^{-1} , extract of yeast 4 g L^{-1} , dipotassium phosphate 2 g L^{-1} , Tween-80 1 g L^{-1} , ammonium citrate 2 g L^{-1} , magnesium sulfate 2 g L^{-1} , and manganese sulfate 0.05 g L^{-1}] (Difco, New Jersey, USA) following the manufacturer's instructions, with a 10% inoculum (v:v), and incubating it for 8 h at room temperature ($30\text{-}35\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Inoculum preparation

The inoculum of each experimental unit was developed in a 500-mL Erlenmeyer flask containing 205 mL of sterile MRS medium (Difco, New Jersey, USA). The flask was inoculated at 10% (v:v) and incubated for 8 h at room temperature ($30\text{-}35\text{ }^{\circ}\text{C}$) at 100 rpm in a MaxQ 2000 orbital shaker (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Automated control fermentation system

Each experimental unit was developed in an eZ-Control automated stirred tank bioreactor (Applikon, Netherlands) with a total capacity of 3 L and accessories for agitation, aeration, temperature, and pH control. Sterilization was performed at 11 lb in^{-2} for 15 min following the manufacturer's instructions. The bioreactor was configured under standard geometry with a nominal volume of 2250 mL, sterilized with 2045 mL of MRS broth (Difco, New Jersey, USA), and inoculated with 205 mL of the abovementioned flask containing about 3.5×10^9 UFC mL^{-1} . The flask was stirred with a pair of 6-blade Rushton turbines. The aeration was carried out with a 7500 CO air pump (HI-TECH, California, USA), a $0.30\text{ }\mu\text{m}$ filter (Whatman, United Kingdom), and a "L" type diffuser. The pH was kept at a constant value of 6 with a 5M NaOH solution and at a temperature of $36\text{ }^{\circ}\text{C}$. All cultures were sampled every 2 h during the 8 h of fermentation to quantify biomass, glucose, lactic acid, and gastrointestinal simulation survival, as described in the following section.

Analytical methods

Biomass

Cell growth was determined by plating samples in Petri dishes with MRS agar (Difco, Mexico) from dilutions (10^{-7} , 10^{-8} , and 10^{-9}) with peptone water (Difco, Mexico) according to this experiment's counting needs. Petri dishes were incubated at $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 48 h. Cell growth was expressed in UFC mL^{-1} , and specific growth rates in h^{-1} .

Métodos analíticos

Biomasa

El crecimiento celular se determinó mediante siembra en placa en cajas de Petri con agar MRS (Dibico, México) a partir de diluciones (10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9}) con agua peptonada (Dibico, México) de acuerdo con las necesidades de conteo. Las cajas Petri se incubaron a 36 °C durante 48 h. El crecimiento celular se expresó en UFC mL⁻¹, y las velocidades específicas de crecimiento en h⁻¹.

Ácido láctico

El ácido láctico se cuantificó en un cromatógrafo HPLC 200 (PerkinElmer, Massachusetts, EUA) con detector de IR (PerkinElmer, Massachusetts, EUA). Dos mililitros del cultivo se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min a 4 °C en una centrifuga Eppendorf 5810 R (Eppendorf, Alemania). El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.22 µm (Millipore, Dublin, Irlanda). La cuantificación se realizó con una columna Hi-Plex Ca (300×7.7 mm) (Agilent, Waldbronn, Alemania) a 40 °C. Agua tridestilada se utilizó como fase móvil con un flujo de 0.3 mL min⁻¹ en condiciones isocráticas (Lai *et al.*, 2016).

Supervivencia a simulación gastrointestinal (SSG)

La SSG se midió de acuerdo al método modificado de Picot y Lacroix (2004). 100 mL del cultivo de fermentación se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min a 4 °C en una centrifuga Eppendorf 5810 R (Eppendorf, Alemania). El pellet celular se suspendió en 9 mL de jugo gástrico con pepsina (HYCEL, México) a una concentración de 0.26 g L⁻¹ y se ajustó a pH 1.9 con HCl 0.1 M. Una siembra se realizó para determinar el número de UFC mL⁻¹ al inicio de la evaluación. Después de 1 h en jugo gástrico, la suspensión se ajustó a pH 7.5 con NaOH 1 N y se realizó una siembra en placa para determinar el número de UFC mL⁻¹ al final de la etapa gástrica. Después se adicionaron 1.5 mL de amortiguador fosfato de sodio 0.25 M a pH 7.5 y 2 mL de solución (15 g L⁻¹) de sales biliares (Sigma-Aldrich, Francia). El volumen se ajustó a 14 mL con agua destilada estéril y se adicionó 1 mL de jugo pancreático con pancreatina (HYCEL, México) a una concentración de 1.95 g L⁻¹ y pH de 7.5. Esta suspensión se incubó 6 h a 37 °C y 80 rpm. Al final de la incubación se realizó siembra en placa para determinar el número final de UFC mL⁻¹.

Diseño y análisis estadístico

El método para análisis fue de superficie de respuesta con diseño factorial 3³ completamente aleatorizado (Cuadro 1).

Lactic acid

Lactic acid was quantified on an HPLC 200 chromatograph (PerkinElmer, Massachusetts, USA) with IR detector (PerkinElmer, Massachusetts, USA). Two milliliters of the culture were centrifuged at 10 000 rpm for 10 min at 4 °C in an Eppendorf 5810 R centrifuge (Eppendorf, Germany). The supernatant was filtered using a 0.22 µm membrane (Millipore, Dublin, Ireland). Quantification was performed at 40 °C with a Hi-Plex Ca column (300×7.7 mm) (Agilent, Waldbronn, Germany). Tridistilled water was used as the mobile phase, with a flow of 0.3 mL min⁻¹ under isocratic conditions (Lai *et al.*, 2016).

Gastrointestinal simulation survival (SSG)

The SSG was measured according to the modified method of Picot and Lacroix (2004). One-hundred mL of the fermentation culture were centrifuged at 4000 rpm for 15 min at 4 °C, in an Eppendorf 5810 R centrifuge (Eppendorf, Germany). The cell pellet was suspended in 9 mL of gastric juice with a 0.26 g L⁻¹ concentration of pepsin (HYCEL, Mexico) and adjusted to pH 1.9 with 0.1 M HCl. At the beginning of the evaluation, a sowing was carried out in order to determine the number of UFC mL⁻¹. After one hour in gastric juice, the suspension was adjusted to pH 7.5 with 1 N NaOH. At the end of the gastric stage, a sowing was carried out in a plate to determine the number of UFC mL⁻¹. Afterward, 1.5 mL of 0.25 M sodium phosphate buffer at pH 7.5 and 2 mL of solution (15 g L⁻¹) of bile salts (Sigma-Aldrich, France) were added. The volume was adjusted to 14 mL with sterile distilled water and 1 mL of pancreatic juice with a 1.95 g L⁻¹ concentration of pancreatin with pH 7.5 (HYCEL, Mexico) was added. This suspension was incubated for 6 h at 37 °C and 80 rpm. At the end of the incubation, plating was performed to determine the final number of UFC mL⁻¹.

Design and statistical analysis

The analysis method was a response surface methodology with a completely randomized factorial design 3³ (Table 1). All analytical determinations were performed in triplicate. The results were expressed as the mean ± SD (standard deviation). The analysis of variance (ANOVA), mathematical model, regression analysis, and optimization were performed with Statgraphics Centurion XV.II. The levels that maximized the response variables were obtained through the desirability parameter, which combines all the measurements and predicts the optimal levels of the independent variables; the closer

Cuadro 1. Factores y niveles de estudio con diseño factorial 3^3 .**Table 1.** Factors and study levels with a factorial design 3^3 .

Factor (unidad)	Símbolo	Niveles		
		-1	0	+1
Agitación (rpm)	<i>A</i>	100	200	300
Aereación (vvm)	<i>B</i>	0.0	0.25	0.50
Tween 80 (mL L ⁻¹)	<i>C</i>	1	3	5

Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como la media \pm DE (desviación estándar). El análisis de varianza (ANDEVA), modelo matemático, análisis de regresión y optimización se realizó con el software Statgraphics Centurion XV.II. Los niveles que maximizaron a las variables de respuesta se obtuvieron mediante el parámetro de deseabilidad, el cual conjuga todas las mediciones y predice los niveles óptimos de las variables independientes; entre más cercano sea a 1; este parámetro indica que la combinación resulta favorable para todas las respuestas como un todo. Las diferencias fueron significativas si $p \leq 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La optimización de procesos biotecnológicos se aplicó con éxito en estudios para aumentar la productividad de sistemas fermentativos como la producción de probióticos (Noori *et al.*, 2016), la obtención de metabolitos como ácido láctico (Liu *et al.*, 2010), así como para incrementar la capacidad funcional de estos microorganismos (Gomez-Mascaraque *et al.*, 2016).

En este estudio se implementaron 27 tratamientos aleatorios como parte del diseño factorial completo del estudio. En el Cuadro 2 se muestra el resultado obtenido de todas las variables de respuesta analizadas. El crecimiento máximo de *L. plantarum* BAL-03-ITTG se observó en un rango de 5.74 a 8.56×10^9 UFC mL⁻¹, con velocidades específicas de crecimiento (*m*) desde 0.48 h⁻¹ hasta 0.59 h⁻¹, mientras que la producción de ácido láctico osciló entre 17.56 y 22.80 g L⁻¹, además el porcentaje de SSG se encontró en un rango desde 72.69% hasta 85.36%.

La agitación y aereación modifican directamente la hidrodinámica del sistema y por lo tanto el mezclado. En este estudio observamos que los niveles de

this parameter is to 1 is an indication that the combination is favorable for all responses as a whole. The differences were significant if $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

The optimization of biotechnological processes was successfully applied in other studies to increase the productivity of fermentative systems such as the probiotics production (Noori *et al.*, 2016), and to obtain metabolites such as lactic acid (Liu *et al.*, 2010), as well as to increase the functional capacity of these microorganisms (Gomez-Mascaraque *et al.*, 2016).

In this work, 27 randomized treatments were implemented as part of the full factorial design of the study. Table 2 shows the result obtained from all the response variables analyzed. The maximum growth of *L. plantarum* BAL-03-ITTG was observed in the 5.74- 8.56×10^9 UFC mL⁻¹ range, with specific growth rates (*m*) from 0.48 h⁻¹ to 0.59 h⁻¹, while the lactic acid production had a 17.56-22.80 g L⁻¹ range; additionally, the SSG percentage had a 72.69-85.36% range.

Agitation and aeration directly modify the hydrodynamics of the system and, therefore, the mixing. In this study, biomass levels were lower in treatments where agitation and aeration were null (UE 8, 10, and 24, Table 2). Consequently, the increase in the efficiency of mixing in bioreactors favors the homogeneity of the medium, the availability of substrate, and the increase in oxygen transfer that modify the growth and generation of cellular metabolism products (Garcia-Ochoa *et al.* 2013; Neunstoecklin *et al.*, 2015). However, excessive agitation and aeration can also affect the productivity of the system.

biomasa fueron menores en los tratamientos donde la agitación y aereación fueron nulos (UE 8, 10 y 24, Cuadro 2). Esto se debe a que el aumento en la eficiencia del mezclado en los biorreactores favorece a la homogeneidad del medio, la disponibilidad de sustrato y el aumento en la transferencia de oxígeno que modifica el crecimiento y la generación de productos del metabolismo celular (García-Ochoa *et al.* 2013; Neunstoecklin *et al.*, 2015). Sin embargo, el exceso de agitación y aereación también puede afectar la productividad del sistema.

Efecto sobre la producción de biomasa

En los tratamientos 9, 13 y 25 se observaron las mayores concentraciones de biomasa, lo que se

Effect on biomass production

The highest concentrations of biomass were observed in treatments 9, 13, and 25; this situation is related to the highest level of agitation evaluated (300 rpm) and to medium or low aeration and Tween-80 levels (-1 or 0). This was corroborated by observing that maximum levels of aeration (0.5 vvm) and Tween-80 (5 mL L⁻¹) did not favor cell growth, as a result of the physiological characteristics of lactic acid bacteria—which have an anaerobic metabolism and minimum polysorbate 80 requirements for the membrane composition. Although hydrodynamic stress generated in stirred tank systems can affect morphology (Senz *et al.*, 2015), metabolism (Gómez *et al.*, 2015), and the

Cuadro 2. Cantidad de biomasa, ácido láctico y SSG en cada unidad experimental.
Table 2. Biomass quantity, lactic acid, and SSG in each experimental unit.

U E	Factores / Niveles			$X_{m\acute{a}x}$ (UFC $\times 10^9$ mL ⁻¹)	Ácido Láctico (g L ⁻¹)	SSG (%)
	A (rpm)	B (vvm)	C (mL L ⁻¹)			
1	+1	+1	+1	5.8 ± 0.01	21.5 ± 2.45	77.4 ± 0.08
2	+1	-1	-1	7.0 ± 0.04	21.2 ± 0.02	77.7 ± 0.30
3	-1	+1	-1	7.1 ± 0.02	17.5 ± 0.56	79.7 ± 0.59
4	0	-1	-1	5.9 ± 0.02	20.5 ± 1.40	75.1 ± 0.64
5	+1	+1	-1	6.5 ± 0.02	19.7 ± 1.23	74.9 ± 0.27
6	+1	+1	0	7.1 ± 0.47	22.3 ± 1.16	82.8 ± 0.64
7	-1	0	-1	6.0 ± 0.07	22.8 ± 0.56	73.2 ± 0.79
8	-1	-1	-1	6.0 ± 0.05	22.1 ± 0.60	79.9 ± 0.27
9	-1	0	+1	8.5 ± 0.03	20.7 ± 1.22	81.6 ± 0.36
10	-1	-1	0	6.7 ± 0.03	21.7 ± 0.73	85.2 ± 0.08
11	-1	+1	0	6.5 ± 0.01	22.3 ± 2.44	82.8 ± 0.36
12	-1	+1	+1	6.3 ± 0.05	19.5 ± 0.06	74.2 ± 0.64
13	+1	-1	0	8.5 ± 0.05	21.8 ± 1.16	83.0 ± 0.42
14	+1	0	+1	7.2 ± 0.08	21.8 ± 1.15	82.6 ± 0.38
15	0	0	-1	5.7 ± 0.04	20.9 ± 3.11	79.3 ± 0.13
16	0	-1	0	6.1 ± 0.05	21.7 ± 2.99	84.3 ± 0.71
17	0	0	0	5.9 ± 0.04	22.6 ± 0.67	83.5 ± 0.25
18	-1	0	0	6.6 ± 0.03	22.3 ± 1.83	85.2 ± 0.08
19	0	+1	0	6.7 ± 0.03	22.5 ± 1.22	83.2 ± 0.38
20	0	+1	-1	6.5 ± 0.03	18.7 ± 0.55	74.1 ± 0.71
21	0	+1	+1	8.2 ± 0.10	20.6 ± 1.77	72.6 ± 0.56
22	+1	0	0	6.7 ± 0.01	22.5 ± 0.14	85.3 ± 0.26
23	+1	-1	+1	6.7 ± 0.04	20.5 ± 1.17	78.4 ± 0.52
24	-1	-1	+1	6.0 ± 0.02	20.5 ± 1.77	76.5 ± 1.35
25	+1	0	-1	8.5 ± 0.01	20.7 ± 0.62	75.2 ± 0.65
26	0	0	+1	6.3 ± 0.11	21.5 ± 2.38	75.0 ± 1.07
27	0	-1	+1	6.8 ± 0.01	20.5 ± 1.85	80.9 ± 0.21

UE: unidad experimental, A: agitación, B: aereación, C: Tween 80, $X_{m\acute{a}x}$: biomasa máxima, SSG: supervivencia a simulación gastrointestinal ❖ UE: experimental unit, A: agitation, B: aeration, C: Tween-80, $X_{m\acute{a}x}$: maximum biomass, SSG: gastrointestinal simulation survival.

relaciona con el mayor nivel de agitación evaluado (300 rpm) y con niveles medios o bajos (-1 o 0) de aereación y Tween 80. Esto se corroboró al observar que con niveles máximos de aereación (0.5 vvm) y de Tween 80 (5 mL L⁻¹) no favorecieron el crecimiento celular debido a las características fisiológicas de las bacterias ácido lácticas, las cuales poseen un metabolismo anaeróbico y con requerimientos mínimos de polisorbato 80 para la composición de membrana. Aunque se ha descrito que el estrés hidrodinámico generado en sistemas de tanque agitado puede afectar la morfología (Senz *et al.*, 2015), el metabolismo (Gómez *et al.*, 2015) y la integridad de células animales, vegetales, hongos, levaduras y bacterias (Sahoo *et al.*, 2006; García-Ochoa *et al.*, 2013), en este estudio no se observó una diferencia significativa ($p > 0.05$) (Cuadro 3) en la generación de biomasa, lo cual indicó que las variables no causaron efectos letales sobre los microorganismos. Una característica sobresaliente de *L. plantarum* BAL-03-ITTG es su capacidad de crecimiento en orden de 10⁹ UFC mL⁻¹, similar al de cepas probióticas comerciales reportadas por Avonts *et al.* (2004) cuyas densidades poblacionales y de dosis fueron concentraciones de 1×10⁹ UFC mL⁻¹ a 4×10¹⁰ UFC mL⁻¹. En estudios similares realizados por Hwang *et al.* (2011) sobre el crecimiento de una cepa de *L. plantarum* LP02 en diferentes niveles de agitación (0, 150 y 300 rpm) y aereación (0.0, 0.5 y 1.0 vvm), el mayor crecimiento (2.2 g m.s. L⁻¹) se obtuvo en condiciones

integrity of animal, plant, fungal, yeast and bacteria cells (Sahoo *et al.*, 2006; García-Ochoa *et al.*, 2013), no significant difference ($p > 0.05$) was observed regarding biomass generation in our work (Table 3). This result indicates that the variables did not have lethal effects on microorganisms. An outstanding characteristic of *L. plantarum* BAL-03-ITTG is its growth capacity in the order of 10⁹ UFC mL⁻¹, similar to the commercial probiotic strains reported by Avonts *et al.* (2004), whose population and dose densities had 1×10⁹ UFC mL⁻¹ to 4×10¹⁰ UFC mL⁻¹ concentrations. In similar studies on the growth of a strain of *L. plantarum* LP02 with different levels of agitation (0, 150, and 300 rpm) and aeration (0.0, 0.5, and 1.0 vvm), Hwang *et al.* (2011) found that the highest growth (2.2 g ms L⁻¹) was obtained under conditions of agitation from 150 to 300 rpm and an aeration from 0.0 to 0.5 vvm. All this suggests that *L. plantarum* BAL-03-ITTG shares the growth capacity of other *Lactobacillus* within this wide range of hydrodynamic conditions, without causing significant deficiencies in cell metabolism and development. Table 3 shows the ANOVA obtained for biomass.

Effect on the production of lactic acid

Lactic acid is a metabolite of industrial importance due to its large number of applications in food, pharmaceuticals, cosmetics, skin products, textiles,

Cuadro 3. Análisis de varianza multifactorial para biomasa.

Table 3. Multifactorial analysis of variance for biomass.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Efectos principales					
A: Agitación	2.08003	2	1.04001	1.73	0.2378
B: Aereación	0.191252	2	0.0956259	0.16	0.8557
C: Tween 80	0.37943	2	0.189715	0.32	0.7383
Interacciones					
AB	4.9425	4	1.23563	2.05	0.1795
AC	3.35006	4	0.837515	1.39	0.3194
BC	1.9369	4	0.484226	0.80	0.5554
Residuos	4.81527	8	0.601909		
Total (corregido)	17.6955	26			

Significativo $p \leq 0.05$. A: efecto lineal de agitación, B: efecto lineal de aereación, C: efecto lineal de Tween 80, AB: efecto de interacción de agitación y aereación, AC: efecto de interacción de agitación y Tween 80, BC: efecto de interacción de aereación y Tween 80. ❖ Significant with $p \leq 0.05$. A: lineal effect of agitation, B: lineal effect of aeration, C: lineal effect of Tween-80, AB: interaction effect of agitation and aeration, AC: interaction effect of agitation and Tween-80, BC: interaction effect of aeration and Tween-80.

de agitación de entre 150 y 300 rpm, con una aereación de entre 0.0 y 0.5 vvm. Todo esto sugiere que *L. plantarum* BAL-03-ITTG comparte la capacidad de crecimiento de otros *Lactobacillus* dentro de este amplio rango de condiciones hidrodinámicas estudiadas sin causar deficiencias importantes en el desarrollo y en el metabolismo celular. En el Cuadro 3 se muestra el ANDEVA obtenido para la biomasa.

Efecto sobre la producción de ácido láctico

El ácido láctico es un metabolito de importancia industrial debido al amplio número de aplicaciones en alimentos, farmacéuticos, cosméticos, pieles, textiles, químicos y bioplásticos (Wang *et al.*, 2014). La producción de este ácido orgánico se realiza a través de la fermentación con diversos microorganismos, sustratos y sistemas. En este estudio, *L. plantarum* BAL-03-ITTG demostró la mayor capacidad de producción de ácido láctico (22.80 g L^{-1}) en condiciones del tratamiento 7 (Cuadro 2) donde la agitación fue 100 rpm, la aereación fue 0.25 vvm y la adición de Tween 80 fue 1 ml L^{-1} . La aereación afecta la producción de ácido láctico debido a las características metabólicas durante el desarrollo de microorganismos del género *Lactobacillus*. Fu y Mathews (1999) reportaron la fermentación de lactosa con un rendimiento de 2.3 veces mayor en condiciones anaeróbicas comparado a las condiciones aeróbicas empleando una cepa de *L. plantarum*. Los lactobacillales se reconocen como microorganismos anaerobios tolerantes al oxígeno con metabolismo fermentativo que carecen de catalasas y de una cadena activa de transporte de electrones (Ianniello *et al.*, 2016; Zotta *et al.*, 2017), por lo que utilizan la vía glucolítica para la obtención de energía y la conversión de un mol de carbohidratos en dos moles de lactato (Martínez *et al.*, 2013). Sin embargo, varias cepas de grupos de *L. casei*, *L. sakei* y *L. plantarum* pueden sintetizar una cadena respiratoria mínima y utilizar oxígeno como un receptor de electrones terminal (Zotta *et al.*, 2017). Se ha propuesto que *L. plantarum* WCFS1, una cepa de referencia aislada de la saliva humana y la primera cuyo genoma fue completamente secuenciado (Kleerebezem *et al.*, 2003), contiene una cadena ramificada de transporte de electrones capaz de usar oxígeno o nitrato como un electrón extracelular aceptador. A pesar de la carencia del sistema de transporte de electrones completa de unión hemo, la generación de ATP adicional

chemicals and bioplastics (Wang *et al.*, 2014). This organic acid is produced through fermentation with various microorganisms, substrates and systems. In this study, *L. plantarum* BAL-03-ITTG had the highest production capacity of lactic acid (22.80 g L^{-1}) under treatment conditions 7 (Table 2): 100 rpm agitation, 0.25 vvm aeration, and the addition of 1 ml L^{-1} of Tween-80. Aeration affects the production of lactic acid due to its metabolic characteristics, during the development of the microorganisms of *Lactobacillus* genus. Fu and Mathews (1999) reported lactose fermentation with a 2.3 times higher yield under anaerobic conditions, compared to aerobic conditions, using a strain of *L. plantarum*. Lactobacillales were recognized as oxygen-tolerant anaerobic microorganisms with fermentative metabolism that generally do not have catalase and an active chain of electron transport (Ianniello *et al.*, 2016; Zotta *et al.*, 2017); therefore they use the glycolytic pathway to obtain energy and convert one mole of carbohydrates into two moles of lactate (Martínez *et al.*, 2013). However, several strains of groups of *L. casei*, *L. sakei*, and *L. plantarum* can synthesize a minimal respiratory chain and use oxygen as a terminal electron receptor (Zotta *et al.*, 2017). It has been proposed that *L. plantarum* WCFS1, a reference strain isolated from human saliva and the first whose genome was completely sequenced (Kleerebezem *et al.*, 2003), contains a branched chain of electron transport able to use oxygen or nitrate as an extracellular electron acceptor. Despite the lack of the complete heme-linked electron transport system, the generation of additional ATP through this pathway benefits microbial development in the presence of oxygen (Ianniello *et al.*, 2016). However, the excess of oxygen can increase the specific activity of the enzymes pyruvate oxidase, NADH oxidase, and NADH peroxidase, accumulating hydrogen peroxide (H_2O_2) and inhibiting the growth of these microorganisms, as a result of their lack of catalase (Guidone *et al.*, 2013).

Likewise, we observed a significant statistical effect of Tween-80 (Table 4) on the lactic acid production, which matches the findings of Broadbent *et al.* (2014) who reported that a 0.2% polysorbate 80 supplementation significantly increases the amount of lactic acid produced by *Lactobacillus casei* ATCC 334. Partanen *et al.* (2001) also showed that Tween-80 is the best source of fatty acids for the

mediante esta vía beneficia el desarrollo microbiano en presencia de oxígeno (Ianniello *et al.*, 2016); sin embargo, el exceso de oxígeno puede incrementar la actividad específica de las enzimas piruvato oxidasa, NADH oxidasa y NADH peroxidasa, lo cual acumula el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e inhibe el crecimiento de estos microorganismos por carecer de catalasas (Guidone *et al.*, 2013).

En este estudio también se observó un efecto estadístico significativo del Tween 80 (Cuadro 4) sobre la producción de ácido láctico, lo cual concuerda con Broadbent *et al.* (2014), quienes reportaron que un suplemento de 0.2% de polisorbato 80 incrementa significativamente la cantidad de ácido láctico producido por *Lactobacillus casei* ATCC 334. Además, Partanen *et al.* (2001) demostraron que Tween 80 es la mejor fuente de ácidos grasos para el cultivo de *Lactobacillus delbrueckii* en comparación con Tween 20, Tween 40 y Tween 60 y, además que el suplemento con este polisorbato es esencial para el crecimiento en concentraciones inferiores a 0.02%. Esto se debe a que sintetizan la enzima ciclopropano sintasa, la cual convierte al ácido oleico proveniente del Tween 80 a ácidos grasos ciclopropano y confiere mejores propiedades a la membrana (Montanari *et al.*, 2010). Shabala y Ross (2008) informaron que la habilidad de los microorganismos para sobrevivir a las condiciones ácidas se debe a esta presencia de los ácidos grasos ciclopropano que reducen la permeabilidad de las membranas a los H^+ y aumentan la capacidad de las células para expulsar protones. Incluso, Tu *et al.* (2015) describieron Tween 80 como un agente o vehículo para la transferencia o excreción de metabolitos a través de las membranas celulares.

En el Cuadro 4 se presenta el análisis de varianza multifactorial ($p \leq 0.05$) para la producción del ácido láctico.

La Ecuación 1 representa el ajuste para la producción de ácido láctico a través de los factores evaluados, con un coeficiente de determinación de 0.79 que indica la adecuación del modelo para explicar la variabilidad.

$$Y_{AL} = 21.37 - 1.22E-2*A - 1.26*B + 1.78*C + 0.02*AB + 1.32*BC + 1.6E-3*AC + 1.0E-5*A^2 - 14.72*B^2 - 0.39*C^2 \quad (1)$$

donde: *A*: agitación (rpm). *B*: aereación (vvm). *C*: Tween 80 ($mL L^{-1}$).

cultivation of *Lactobacillus delbrueckii*, compared to Tween-20, Tween-40, and Tween-60; additionally, they proved that supplementation with this polysorbate is essential for growth in concentrations below 0.02%. This is due to the fact that they synthesize the cyclopropane synthase enzyme, which converts oleic acid from Tween-80 to cyclopropane fatty acids and confers better membrane properties (Montanari *et al.*, 2010). Shabala and Ross (2008) demonstrated that the ability of microorganisms to survive under acidic conditions is the result of the presence of cyclopropane fatty acids that reduce the permeability of membranes to H^+ and increase the ability of cells to expel protons. Even more, Tu *et al.* (2015) described Tween-80 as an agent or vehicle for metabolite transfer or excretion through cell membranes.

Table 4 shows the multifactorial analysis of variance ($p \leq 0.05$) for the production of lactic acid.

Equation 1 represents the adjustment for the production of lactic acid through the factors evaluated, with a 0.79 determination coefficient that indicates whether or not the model can adequately explain the variability.

$$Y_{AL} = 21.37 - 1.22E-2*A - 1.26*B + 1.78*C + 0.02*AB + 1.32*BC + 1.6E-3*AC + 1.0E-5*A^2 - 14.72*B^2 - 0.39*C^2 \quad (1)$$

where: *A*: agitation (rpm). *B*: aeration (vvm). *C*: Tween-80 ($mL L^{-1}$).

Effect on SSG

The survival of microorganisms through the gastrointestinal tract is a major criterion among the characteristics of probiotics. This represents the ability of a probiotic to overcome the biological barriers of the human system and exert a beneficial effect on consumer health (Musa and Seri, 2009). In this study, the highest percentages of SSG were obtained in treatments 10, 16, 18, and 22; this situation is related to the average level (0) of Tween-80 evaluated ($3 mL L^{-1}$) and to low aeration levels. Izquierdo *et al.* (2008) evaluated the levels of gastrointestinal simulation survival of probiotic strains of the *Bifidobacterium* genus used in commercial products and reported similar SSG values (68.57-96.05%). This gastrointestinal

Cuadro 4. Análisis de varianza multifactorial para ácido láctico.**Table 4.** Multifactorial analysis of variance for lactic acid.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Efectos principales					
A: Agitación	0.47475	2	0.23737	0.58	0.5810
B: Aereación	7.10516	2	3.55258	8.70	0.0098
C: Tween 80	15.3309	2	7.66543	18.78	0.0010
Interacciones					
AB	2.89662	4	0.72415	1.77	0.2272
AC	2.12311	4	0.53077	0.30	0.3474
BC	10.3319	4	2.58298	6.33	0.0139
Residuos	3.26558	8	0.40819		
Total (corregido)	41.528	26			

Significativo con $p \leq 0.05$. A: efecto lineal de agitación, B: efecto lineal de aereación, C: efecto lineal de Tween 80, AB: efecto de interacción de agitación y aereación, AC: efecto de interacción de agitación y Tween 80, BC: efecto de interacción de aereación y Tween 80. ❖ Significant with $p \leq 0.05$. A: lineal effect of agitation, B: lineal effect of aeration, C: lineal effect of Tween-80, AB: interaction effect of agitation and aeration, AC: interaction effect of agitation and Tween-80, BC: interaction effect of aeration and Tween-80.

Efecto sobre la SSG

La supervivencia de los microorganismos a través del tracto gastrointestinal es un criterio importante entre las características de los probióticos. Este representa la capacidad de un probiótico para superar las barreras biológicas del sistema humano y ejercer un efecto benéfico en la salud del consumidor (Musa y Seri, 2009). En este estudio los mayores porcentajes de SSG se obtuvieron en los tratamientos 10, 16, 18 y 22 lo que se relaciona con el nivel medio (0) de Tween 80 evaluado (3 mL L^{-1}) y con niveles bajos de aereación. Izquierdo *et al.* (2008) evaluaron los niveles de supervivencia a simulación gastrointestinal de cepas probióticas del género *Bifidobacterium* usadas en productos comerciales y reportaron valores similares de 68.57% a 96.05% de SSG. Esta supervivencia a simulación gastrointestinal es una variable que depende de la capacidad de los probióticos para tolerar bajos niveles de pH y otras condiciones fisiológicas gastrointestinales *in vitro*. En el estómago, el pH suele tener un valor de 1.0 y tras el consumo de alimentos como la leche fermentada puede modificarse hasta pH 2.8-4.2 (Vinderola *et al.*, 2017). Después, la sal biliar sintetizada en el hígado y liberada al intestino delgado también puede reducir la supervivencia de los microorganismos mediante la lisis de ácidos grasos y fosfolípidos que componen la membrana celular (Kato *et al.*, 2019).

Corcoran *et al.* (2007) demostraron que la adición de Tween 80 está asociado con el cambio en la

simulation survival is a variable that depends on the ability of probiotics to tolerate low pH levels and other gastrointestinal physiological conditions *in vitro*. In the stomach, the pH usually has a value of 1.0; however, after the consumption of such foods as fermented milk, pH can change to 2.8-4.2 (Vinderola *et al.*, 2017). Subsequently, bile salt synthesized in the liver and released to the small intestine can also reduce the survival of microorganisms, as a result of the lysis of the fatty acids and phospholipids that form the cell membrane (Kato *et al.*, 2019).

Corcoran *et al.* (2007) showed that the addition of Tween-80 is associated with the change in the composition of the fatty acids of the membrane, which increases the presence of oleic acid and cyclopropane fatty acids, while it reduces the palmitic acid concentration in *Lactobacillus rhamnosus* GG. This increase in the capacity of SSG could be the result of the incorporation of the oleic acid from Tween-80 into the membranes of lactobacilli and its transformation into cyclopropane fatty acids. This modification increases the fluidity of the microorganism membrane that protects against adverse effects such as pressure, extreme temperatures, and acidic pH (Montanari *et al.*, 2010; Reitermayer *et al.*, 2018).

The ANOVA demonstrated that Tween-80 was the only factor that had a significant influence ($p \leq 0.05$) on the SSG. The values of p obtained for this variable are shown in Table 5.

composición de los ácidos grasos de la membrana, incrementando la presencia de ácido oleico y ácidos grasos ciclopropano, mientras se reduce la concentración de ácido palmítico en *Lactobacillus rhamnosus* GG. Este aumento en la capacidad de SSG podría deberse a la incorporación del ácido oleico proveniente del Tween 80 hacia las membranas de los lactobacillus y su transformación a ácidos grasos ciclopropano. Esta modificación provoca un incremento en la fluidez de la membrana de los microorganismos que confiere protección ante efectos adversos como presión, temperaturas extremas y pH ácido (Montanari *et al.*, 2010; Reitermayer *et al.*, 2018).

El ANDEVA demostró que el Tween 80 fue el único factor que influyó significativamente ($p \leq 0.05$) a la SSG. En el Cuadro 5 se muestran los valores de p obtenidos para esta variable.

A través del análisis de estos resultados se obtuvo la ecuación de regresión de ajuste (Ecuación 2) con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.75 que indica un ajuste adecuado a la variabilidad de los factores evaluados.

$$Y_{SSG} = 74.28 - 0.06 * A + 7.41 * B + 9.88 * C + 2.5E-3 * AB - 1.28 * BC + 4.7E-3 * AC - 16.67 * B^2 + 1.0E-4 * A^2 - 1.70 * C^2 \quad (2)$$

donde: *A*: agitación (rpm). *B*: aereación (vvm). *C*: Tween 80 (mL L⁻¹).

Based on the analysis of these results, the adjusted regression equation (Equation 2) was obtained with a 0.75 determination coefficient (R^2), indicating an appropriate adjustment to the variability of the factors evaluated.

$$Y_{SSG} = 74.28 - 0.06 * A + 7.41 * B + 9.88 * C + 2.5E-3 * AB - 1.28 * BC + 4.7E-3 * AC - 16.67 * B^2 + 1.0E-4 * A^2 - 1.70 * C^2 \quad (2)$$

where: *A*: agitation (rpm). *B*: aeration (vvm). *C*: Tween-80 (mL L⁻¹).

Factor optimization

With the optimization of multiple responses, a desirability parameter was obtained that simultaneously maximizes the three response variables. Figure 1 shows the response surface through this parameter; its 0.82 value indicates a high degree of adjustment and reliability of the variables. The optimal levels of the factors were: 300 rpm of agitation, 0.13 vvm of aeration, and 3.06 mL L⁻¹ of Tween-80, with a prediction of 7.34×10^9 UFC mL⁻¹ in biomass, 22.80 g L⁻¹ in lactic acid, and 85.27% in SSG.

Subsequently, the optimal conditions were validated by triplicate and the growth kinetic was obtained (Figure 2). Having validated these conditions, the following data were obtained: a

Cuadro 5. Análisis de varianza multifactorial para SSG.
Table 5. Multifactorial analysis of variance for SSG.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
Efectos principales					
A:Agitación	7.2554	2	3.6277	0.36	0.7084
B:Aereación	26.7564	2	13.3782	1.33	0.3178
C:Tween 80	284.23	2	142.115	14.10	0.0024
Interacciones					
AB	7.23231	4	1.80808	0.18	0.9427
AC	15.6937	4	3.92343	0.39	0.8109
BC	22.8976	4	5.72439	0.57	0.6934
Residuos	80.615	8	10.0769		
Total (corregido)	444.68	26			

Significativo con $p \leq 0.05$. *A*: efecto lineal de agitación, *B*: efecto lineal de aereación, *C*: efecto lineal de Tween 80, *AB*: efecto de interacción de agitación y aereación, *AC*: efecto de interacción de agitación y Tween 80, *BC*: efecto de interacción de aereación y Tween 80. ❖ Significant with $p \leq 0.05$. *A*: lineal effect of agitation, *B*: lineal effect of aeration, *C*: lineal effect of Tween-80, *AB*: interaction effect of agitation and aeration, *AC*: interaction effect of agitation and Tween-80, *BC*: interaction effect of aeration and Tween-80.

Optimización de los factores

Con la optimización de múltiples respuestas se obtuvo un parámetro de deseabilidad que maximiza simultáneamente a las tres variables de respuesta. En la Figura 1 se observa la superficie de respuesta mediante este parámetro cuyo valor fue 0.82, el cual indica un alto grado de ajuste y confiabilidad de las variables. Los niveles óptimos de los factores fueron: 300 rpm de agitación, 0.13 vvm de aereación y 3.06 mL L⁻¹ de Tween 80, con una predicción de 7.34 × 10⁹ UFC mL⁻¹ en biomasa, 22.80 g L⁻¹ en ácido láctico y 85.27% en SSG.

Después se validaron las condiciones óptimas por triplicado y se obtuvo la cinética de crecimiento que se observa en la Figura 2. Mediante la valida-

biomass production of $7.10 \pm 0.42 \times 10^9$ UFC mL⁻¹, a lactic acid production of 23.80 ± 1.0 g L⁻¹, and a SSG percentage of $84.45 \pm 0.5\%$, as well as specific growth rate kinetic parameters (μ) of 0.52 ± 0.12 h⁻¹, and a doubling time (t_d) of 1.33 ± 0.08 h. Additionally, a substrate conversion efficiency (ϵ_s) of 97.2% was obtained. This percentage was higher than the one obtained by Lee *et al.* (2017) who cultivated *Lactobacillus plantarum* 23 in a reactor at pH 5.5 and 30 °C in an MRS medium, obtaining a 74.87% efficiency.

When this experimental result was compared with the values predicted by the desirability parameter, it showed a variation of 3.2% in biomass production, 4.3% in lactic acid production, and 0.96% in SSG. This indicates a very good approximation of

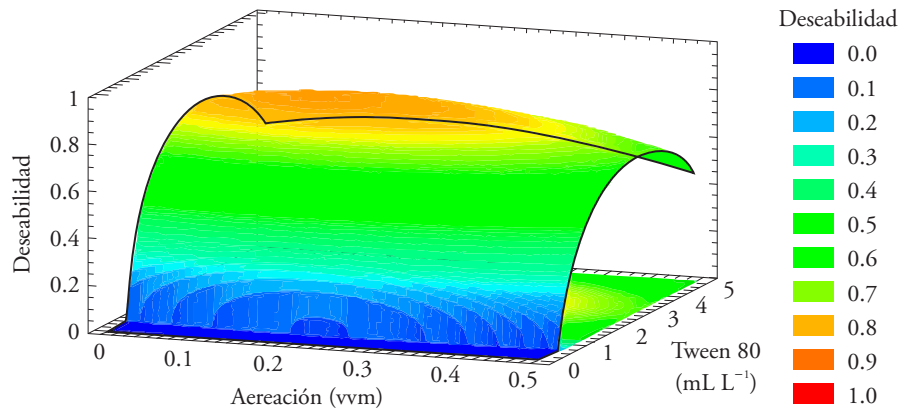


Figura 1. Superficie de respuesta del parámetro de deseabilidad para los tres factores óptimos para una fermentación a 300 rpm.

Figure 1. Response surface of the desirability parameter for the three optimal factors in order to achieve fermentation at 300 rpm.

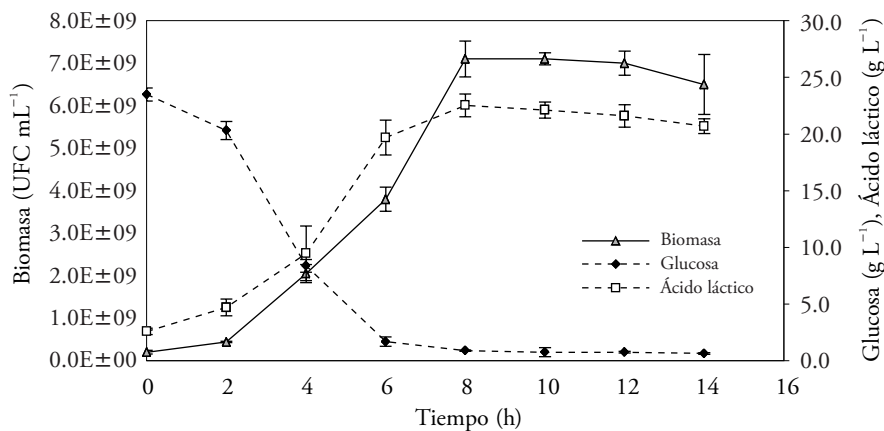


Figura 2. Cinética de crecimiento de *L. plantarum* BAL-03-ITTG en condiciones óptimas.

Figure 2. Growth kinetic of *L. plantarum* BAL-03-ITTG in optimal conditions.

ción de estas condiciones se obtuvo una producción de biomasa de $7.10 \pm 0.42 \times 10^9$ UFC mL⁻¹, una producción de ácido láctico de 23.80 ± 1.0 g L⁻¹ y un porcentaje de SSG de $84.45 \pm 0.5\%$, así como parámetros cinéticos de velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.52 ± 0.12 h⁻¹ y tiempo de duplicación (t_d) 1.33 ± 0.08 h. Además, la eficiencia de conversión de sustrato (ϵ_s) obtenida fue 97.2, la cual es mayor a lo obtenido por Lee *et al.* (2017) al cultivar *L. plantarum* 23 en un reactor a pH 5.5 y 30 °C en medio MRS y la eficiencia fue 74.87%.

La comparación de este resultado experimental con los valores predichos por el parámetro de deseabilidad mostró una variación del 3.2% en la producción de biomasa, 4.3% en la producción de ácido láctico y 0.96% en SSG, lo cual nos indica una muy buena aproximación de los resultados y confiabilidad en la optimización de las variables estudiadas, similar a lo reportado por Olusegun-Omolola *et al.* (2018) para la optimización y validación de datos predichos en el proceso de secado de plátano en horno a través de una metodología de superficie de respuesta.

CONCLUSIONES

En este estudio se obtuvieron las condiciones óptimas de agitación, aeración y concentración de Tween 80 para maximizar el crecimiento celular, la generación de ácido láctico y mantener la supervivencia a las condiciones gastrointestinales simuladas de *L. plantarum* BAL-03-ITTG cuando se cultiva en un biorreactor de tanque agitado automatizado. Se demostró que ninguno de los factores afectó significativamente la producción de biomasa, mientras que las condiciones microaerofílicas favorecieron la producción de ácido láctico, así como la presencia de Tween 80 ayudó en la supervivencia a la simulación gastrointestinal. Las condiciones óptimas de cultivo fueron: 300 rpm, 0.13 vvm y 3.06 mL L⁻¹ con deseabilidad de 0.82 para obtener una densidad poblacional de 7.10×10^9 UFC mL⁻¹, ácido láctico de 23.8 g L⁻¹ y SSG de 84.45%. Por lo tanto, las condiciones óptimas obtenidas en este estudio podrían utilizarse como parámetro estándar y una base para el cultivo industrial del probiótico de *L. plantarum* BAL-03-ITTG.

the results and the reliability of the optimization of the variables studied, similar to the findings of Olusegun-Omolola *et al.* (2018) regarding the optimization and validation of predicted data in the oven drying process of banana, through a response surface methodology.

CONCLUSIONS

In this study, the optimal agitation, aeration, and Tween-80 concentration conditions required to maximize cell growth, to generate lactic acid, and to maintain the survival of *L. plantarum* BAL-03-ITTG under gastrointestinal simulation conditions were obtained, when it is cultured in an automated stirred tank bioreactor. None of the factors significantly affected the biomass production, while microaerophilic conditions favored the lactic acid production and the presence of Tween-80 helped the gastrointestinal simulation survival. The optimal culture conditions required to obtain a population density of 7.10×10^9 UFC mL⁻¹, lactic acid of 23.8 g L⁻¹, and SSG of 84.45% were: 300 rpm, 0.13 vvm, and 3.06 mL L⁻¹, with a desirability of 0.82. Therefore, the optimal conditions obtained in this study could be used as a standard parameter and a basis for the industrial cultivation of the *L. plantarum* BAL-03-ITTG probiotic.

—End of the English version—



AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (636047/331900) para cursar la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica dentro del programa de PNPC del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

LITERATURA CITADA

Alcántara-Hernández, R. J., J. A. Rodríguez-Álvarez, C. Valenzuela-Encinas, F. A. Gutiérrez-Miceli, H. Castañón-González, R. Marsch, T. Ayora-Talavera, and L. Dendooven. 2010. The bacterial community in 'taberna' traditional beverage of Southern Mexico. *Lett. Appl. Microbiol.* 51: 558-563.

- Ashraf, R., and N. P. Shah. 2014. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 54: 938-956.
- Avonts, L., E. Van Uytven, and L. De Vuyst. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. *Int. Dairy J.* 14: 947-955
- Broadbent, J. R., T. S. Oberg, J. E. Hughes, R. E. Ward, C. Brighton, D. L. Welker, and J. L. Steele. 2014. Influence of polysorbate 80 and cyclopropane fatty acid synthase activity on lactic acid production by *Lactobacillus casei* ATCC 334 at low pH. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41: 545-553.
- Cho, H. S., Y. K. Oh, S. C. Park, J. W. Lee, and J. Y. Park. 2013. Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renew. Energy.* 54: 156-160.
- Corcoran, B. M., C. Stanton, G. F. Fitzgerald, and R. P. Ross. 2007. Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice. *Microbiol.* 153: 291-299.
- Florence, A. C. R., M. N. de Oliveira, A. Delile, and C. Béal. 2016. Survival of Bifidobacterium strains in organic fermented milk is improved as a result of membrane fatty acid composition. *Int. Dairy J.* 61: 1-9.
- Fu, W., and A. P. Mathews. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochem. Eng. J.* 3: 163-170.
- García-Ochoa, F., E. Gomez, A. Alcon, and V. E. Santos. 2013. The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36: 911-925.
- Gómez, E., A. Alcon, S. Escobar, V. E. Santos, and F. García-Ochoa. 2015. Effect of fluid dynamic conditions on growth rate and biodesulfurization capacity of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. *Biochem. Eng. J.* 99: 138-146.
- Gomez-Mascaraque, L. G., R. C. Morfin, R. Pérez-Masiá, G. Sanchez, and A. Lopez-Rubio. 2016. Optimization of electrospraying conditions for the microencapsulation of probiotics and evaluation of their resistance during storage and in-vitro digestion. *LWT-Food Sci. Technol.* 69: 438-446.
- Guidone, A., R. G. Ianniello, A. Ricciardi, T. Zotta, and E. Parente. 2013. Aerobic metabolism and oxidative stress tolerance in the *Lactobacillus plantarum* group. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 1713-1722.
- Hwang, C. F., J. N. Chen, Y. T. Huang, and Z. Y. Mao. 2011. Biomass production of *Lactobacillus plantarum* LP02 isolated from infant feces with potential cholesterol lowering ability. *Afr. J. Biotechnol.* 10: 7010-7020.
- Ianniello, R. G., T. Zotta, A. Matera, F. Genovese, E. Parente, and A. Ricciardi. 2016. Investigation of factors affecting aerobic and respiratory growth in the oxygen-tolerant strain *Lactobacillus casei* N87. *PLoS One.* 11: e0164065.
- Izquierdo, E., M. Medina, S. Ennahar, E. Marchioni, and Y. Sanz. 2008. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. *Curr. Microbiol.* 56: 613-618.
- Kato, S., H. Tobe, H. Matsubara, M. Sawada, Y. Sasaki, S. Fukiya, N. Morita, and A. Yokota. 2019. The membrane phospholipid cardiolipin plays a pivotal role in bile acid adaptation by *Lactobacillus gasseri* JCM1131T. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids.* 1864: 403-412.
- Kechagia, M., D. Basoulis, S. Konstantopoulou, D. Dimitriadi, K. Gyftopoulou, N. Skarmoutsou, and E. M. Fakiri. 2013. Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutr.* 481651.
- Kleerebezem, M., J. Boekhorst, R. van Kranenburg, D. Molenaar, O. P. Kuipers, R. Leer, R. Tarchini, S. A. Peters, H. M. Sandbrink, M. W. E. J. Fiers, W. Stiekema, R. M. K. Lankhorst, P. A. Bron, S. M. Hoffer, M. N. N. Groot, R. Kerkhoven, M. de Vries, B. Ursing, W. M. de Vos, R. J. Siezen, and W. Stiekema. 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 100: 1990-1995.
- Lai, B., M. R. Plan, M. P. Hodson, and J. O. Krömer. 2016. Simultaneous determination of sugars, carboxylates, alcohols and aldehydes from fermentations by high performance liquid chromatography. *Fermentation.* 2: 6.
- Lee, T. M., Y. F. Tseng, C. L. Cheng, Y. C. Chen, C. S. Lin, H. Y. Su, T. J. Chow, C. Y. Chen, and J. S. Chang. 2017. Characterization of a heat-tolerant *Chlorella* sp. GD mutant with enhanced photosynthetic CO₂ fixation efficiency and its implication as lactic acid fermentation feedstock. *Biotechnol. Biofuels.* 10: 214.
- Liu, B., M. Yang, B. Qi, X. Chen, Z. Su, and Y. Wan. 2010. Optimizing l-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As. 1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. *Biochem. Eng. J.* 52: 212-219.
- Martinez, F. A. C., E. M. Balciunas, J. M. Salgado, J. M. D. González, A. Converti, and R. P. de Souza Oliveira. 2013. Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 30: 70-83.
- Mendoza-Avendaño, C., R. Meza-Gordillo, S. L. Ovando-Chacón, M. C. Luján-Hidalgo, M. A. Ruiz-Cabrera, A. Grajales-Lagunes, V. M. Ruiz-Valdiviezo, F. A. Gutiérrez-Miceli, and M. Abud-Archila. 2019. Evaluation of bioactive and anti-nutritional compounds during soy milk fermentation with *Lactobacillus plantarum* BAL-03-ITTG and *Lactobacillus fermentum* BAL-21-ITTG. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 18: 967-978.
- Montanari, C., S. L. S. Kamdem, D. I. Serrazanetti, F. X. Etoa, and M. E. Guerzoni. 2010. Synthesis of cyclopropane fatty acids in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus sanfranciscensis* and their cellular fatty acids changes following short term acid and cold stresses. *Food Microbiol.* 27: 493-502.
- Musa, H. H., and H. I. Seri. 2009. The potential benefits of probiotics in animal production and health. *J. Anim. Vet. Adv.* 8: 313-321.
- Neunstoecklin, B., M. Stettler, T. Solacroup, H. Broly, M. Morbidelli, and M. Soos. 2015. Determination of the maximum operating range of hydrodynamic stress in mammalian cell culture. *J. Biotechnol.* 194: 100-109.
- Noori, F., M. T. Ebrahimi, and P. Jafari. 2016. Growth optimization of *Lactobacillus plantarum* T5jq301796. 1, an Iranian indigenous probiotic in lab scale fermenter. *Appl. Food Biotechnol.* 3: 188-193.
- Olusegun-Omolola, A. O., A. I. Obiefuna-Jideani, P. Francis-Kapila, and V. Adaora-Jideani. 2018. Optimization of oven drying conditions of banana (*Musa* spp., aaa group, cv 'Luvhele' and 'Mabonde') using response surface methodology. *Agrociencia.* 52: 539-551.

- Partanen, L., N. Martinen, and T. Alatossava. 2001. Fats and fatty acids as growth factors for *Lactobacillus delbrueckii*. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 500-506.
- Picot, A., and C. Lacroix. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. Dairy J.* 14: 505-515.
- Pinho, C., A. Melo, C. Mansilha, and I. M. Ferreira. 2010. Optimization of conditions for anthocyanin hydrolysis from red wine using response surface methodology (RSM). *J. Agric. Food Chem.* 59: 50-55.
- Reitermayer, D., T. A. Kafka, C. A. Lenz, and R. F. Vogel. 2018. Interrelation between Tween and the membrane properties and high pressure tolerance of *Lactobacillus plantarum*. *BMC Microbiol.* 18: 72.
- Ruas-Madiedo, P., J. Hugenholz, and P. Zoon. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 12: 163-171.
- Ritchie, M. L., and T. N. Romanuk. 2012. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PLoS One.* 7: e34938.
- Sahoo, S., K. K. Rao, and G. K. Suraishkumar. 2006. Reactive oxygen species induced by shear stress mediate cell death in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 94: 118-127.
- Senz, M., B. van Lengerich, J. Bader, and U. Stahl. 2015. Control of cell morphology of probiotic *Lactobacillus acidophilus* for enhanced cell stability during industrial processing. *Int. J. Food Microbiol.* 192: 34-42.
- Shabala, L., and T. Ross. 2008. Cyclopropane fatty acids improve *Escherichia coli* survival in acidified minimal media by reducing membrane permeability to H⁺ and enhanced ability to extrude H⁺. *Res. Microbiol.* 159: 458-461.
- Tan, W. S., M. F. Budinich, R. Ward, J. R. Broadbent, and J. L. Steele. 2012. Optimal growth of *Lactobacillus casei* in a Cheddar cheese ripening model system requires exogenous fatty acids. *J. Dairy Sci.* 95: 1680-1689.
- Tu, G., Y. Wang, Y. Ji, and X. Zou. 2015. The effect of Tween 80 on the polymeric acid and pullulan production by *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223. *World J. Microb. Biot.* 31: 219-226.
- Vinderola, G., M. Gueimonde, C. Gomez-Gallego, L. Delfederico, and S. Salminen. 2017. Correlation between *in vitro* and *in vivo* assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 68: 83-90.
- Wang, Z. W., and X. L. Liu. 2008. Medium optimization for antifungal active substances production from a newly isolated *Paenibacillus* sp. using response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 99: 8245-8251.
- Wang, C., Q. Li, D. Wang, and J. Xing. 2014. Improving the lactic acid production of *Actinobacillus succinogenes* by using a novel fermentation and separation integration system. *Process. Biochem.* 49: 1245-1250.
- Wang, J., H. Tang, C. Zhang, Y. Zhao, M. Derrien, E. Rocher, J. E-H Vlieg K. Strissel, L. Zhao, M. Obin, and J. Shen. 2015. Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J.* 9: 1.
- Yang, X., X. Hang, M. Zhang, X. Liu, and H. Yang. 2015. Relationship between acid tolerance and cell membrane in *Bifidobacterium*, revealed by comparative analysis of acid-resistant derivatives and their parental strains grown in medium with and without Tween 80. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 5227-5236.
- Zotta, T., E. Parente, and A. Ricciardi. (2017). Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry. *J. Appl. Microbiol.* 122: 857-869.