



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**COMPARACIÓN DE MÉTODOS TRADICIONAL Y 3M™ PETRIFILM-
LAB™ PARA LA RECUPERACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS
EN MATRICES ALIMENTARIAS ELABORADAS EN MÉXICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

PAOLA LOZANO RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. en E. OLGA DEL CARMEN VELAZQUEZ MADRAZO



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: VELAZQUEZ MADRAZO OLGA DEL CARMEN

VOCAL: Profesor: REYO HERRERA AGUSTIN

SECRETARIO: Profesor: MINA CETINA ALEIDA

1er. SUPLENTE: Profesor: HERNANDEZ PEREZ HUGO ANTONIO

2° SUPLENTE: Profesor: CRUCES MARTINEZ ANA LILIA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
LABORATORIO 4 A, ANEXO 1**

ASESOR DEL TEMA:

OLGA DEL CARMEN VELÁZQUEZ MADRAZO

SUSTENTANTE:

PAOLA LOZANO RODRÍGUEZ

ÍNDICE

Introducción	4
Objetivo general	6
Objetivos específicos	6
Hipótesis de trabajo	6
Justificación	7
Marco teórico	
1. Características de las bacterias ácido-lácticas	12
2. Fuentes de bacterias ácido-lácticas	12
3. Clasificación de bacterias ácido-lácticas	14
4. Metabolismo de las bacterias ácido-lácticas	19
4.1 Fermentación de hexosas	20
4.2 Fermentación de disacáridos	25
4.3 Fermentación de pentosas y compuestos relacionados	30
4.4 Categorías metabólicas de las bacterias ácido-lácticas	33
4.5 Destinos del piruvato	36
4.6 Metabolismo del malato, citrato, arginina y lactato	43
4.7 Proteólisis y lipólisis	48
5. Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas	51
6. Características, estabilidad y criterios de selección de las matrices alimentarias a analizar	
6.1 Hummus	55
6.2 Mayonesa	59
7. Cuantificación de bacterias ácido-lácticas	63

7.1 Métodos rápidos para la cuantificación de microorganismos	68
7.1.1 Petrifilm 3M LAB™	71
7.1.2 Comparación en la inversión y generación de desechos de los métodos de análisis	72
7.2 Validación de métodos microbiológicos en alimentos	75
7.3 Pruebas de significancia estadísticas	79
Metodología	82
Resultados	89
Conclusiones	119
Bibliografía	121

INTRODUCCIÓN

Los beneficios del uso de las bacterias ácido-lácticas (por sus siglas en español BAL) en la industria de los alimentos son ampliamente conocidos, sin embargo, su presencia no siempre es deseable en algunos productos.

Mediante diversos estudios que se han realizado en los últimos años se ha determinado que las BAL son uno de los principales grupos causantes del deterioro microbiano en diversos productos alimenticios. Aunque los lactobacilos no afectan negativamente a la salud humana, sí representan problemas y pérdidas para el productor, porque alteran las propiedades sensoriales de los productos convirtiéndolos en no comestibles (Fialová, 2008).

El método tradicional para el recuento de BAL es laborioso, ya que requiere la preparación de medios de cultivo (Agar MRS) e incubación en condiciones de anaerobiosis; en algunas matrices el análisis se complica debido a la naturaleza de las muestras, por ejemplo, la mayonesa, la cual deja una apariencia lechosa en las placas que dificulta el conteo de las colonias; además el tiempo de incubación para algunas muestras es de hasta 5 días (Vihavainen, 2008).

Actualmente existen sistemas rápidos que facilitan la determinación cuantitativa de las BAL, como son las placas Petrifilm LAB[®] desarrolladas por 3M[®]. Estas placas se caracterizan porque facilitan la cuantificación de este grupo bacteriano, no requieren preparativos, como la elaboración de medios de cultivo, tienen excelente estandarización y no requieren anaerobiosis. Además, el indicador que contiene ayuda a diferenciar las unidades formadoras de colonia (UFC) de residuos de alimento (3M, 2016).

Respecto a estos métodos rápidos o alternativos, la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014 “Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos” define como métodos alternativos aprobados a aquéllos que se encuentran descritos en las referencias internacionales como son AOAC Internacional (Asociación de Comunidades Analíticas, por sus siglas en inglés Association of Analytical Communities), AFNOR

(Asociación Francesa de Normalización, por sus siglas en francés Association Française de Normalisation), ISO (Organización Internacional para la Estandarización, por sus siglas en inglés International Organization for Standardization), FDA (Administración de drogas y alimentos, por sus siglas en inglés Foods and Drugs Administration), CODEX (Normas Alimentarias Internacionales, por sus siglas en inglés Codex Alimentarius), Internacional Food Standards, entre otras y que cuentan con validación internacional y verificación en el laboratorio de prueba; también establece que sólo pueden ser usados en el análisis del producto para el cual fue validado cada uno. A pesar de que el sistema de placas Petrifilm LAB® de 3M® cuenta con validaciones internacionales, y en principio pueden aplicarse para el análisis de alimentos, es necesario su validación para cada producto específico en el cual se utilizarán.

Las actividades relacionadas con la verificación y validación de métodos analíticos han cobrado gran importancia, debido, por un lado, al continuo desarrollo y actualización de técnicas y equipos analíticos cada vez más complejos y, por otro lado, al interés de los profesionales en garantizar la calidad de sus procesos y resultados. Los microbiólogos deben asegurar, al máximo nivel permitido por el desarrollo científico y técnico, la fiabilidad de los resultados, incluso en los métodos rápidos o alternativos (Camaró - Sala, 2015).

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que este es apto para el propósito indicado. La validación del método analítico se considera una parte esencial del desarrollo del método en sí, ya que es la evaluación de un método para asegurar que es apropiado para el análisis en cuestión y que los resultados son confiables y consistentes (Villanueva, 2017).

En Microbiología de Alimentos, la complejidad de las matrices y sus efectos sobre la población microbiana pueden tener una gran influencia sobre el método analítico empleado, por ello es necesario validar el método analítico para cada matriz alimentaria porque sólo así se puede generar la evidencia suficiente de que el producto o analito cumple con las especificaciones y que el análisis realmente nos revela sus características.

Por esta razón, se llevó a cabo este trabajo, para validar el uso de las placas Petrifilm® LAB® en el monitoreo del crecimiento de bacterias ácido-lácticas en hummus y mayonesa, productos en los cuales este grupo es responsable del deterioro.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la eficiencia del método Petrifilm LAB® 3M® frente al método tradicional para la recuperación y conteo de bacterias ácido-lácticas y determinar si el método de Petrifilm LAB® 3M® puede emplearse en lugar del método tradicional en la determinación de bacterias ácido-lácticas, en las matrices seleccionadas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer la concentración inicial de bacterias ácido-lácticas en las matrices seleccionadas: hummus y mayonesa comerciales.
- Determinar la concentración de bacterias ácido-lácticas en las matrices bajo estudio durante su vida útil.
- Llevar a cabo pruebas con inóculos conocidos de BAL, para establecer si existe o no diferencia estadísticamente significativa entre el método tradicional y Petrifilm LAB® en el recuento de este grupo microbiano, en las matrices bajo estudio.
- Comparar la eficiencia de la recuperación de las BAL por el método tradicional y el método Petrifilm LAB® 3M®.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Si no existe diferencia estadísticamente significativa entre el método tradicional y las placas Petrifilm LAB® 3M® para la determinación de bacterias ácido-lácticas en las matrices seleccionadas, entonces es posible utilizar el método Petrifilm® LAB® y aprovechar sus ventajas, en el control de dichas matrices.

JUSTIFICACIÓN

Los alimentos fabricados industrialmente deben tener una vida de anaquel considerablemente larga debido a que la cadena de suministro actualmente involucra, después de la producción, la distribución y la venta al por menor, antes del almacenamiento doméstico y consumo del producto (Johansson, 2011).

A pesar del alto control que se tiene en la industria de alimentos sobre sus procesos de producción, esto no evita que se generen desperdicios alimenticios. El 39% de las pérdidas de alimentos en la Unión Europea se producen en la fabricación de alimentos y el 5% a lo largo de la cadena de distribución (Raak, 2017), mientras que en México se pierden 10 millones de toneladas de alimentos por caducidad, lo cual representa el 37% de la producción agropecuaria en el país. Las pérdidas de alimentos en México tienen lugar en las etapas de procesamiento 6%, mercado 17%, manejo y almacenamiento 22%, producción 28%, al igual que en hogares (Sánchez, 2016).

Se considera desperdicio alimenticio a los lotes defectuosos, muestras retenidas o de análisis, o subproductos que no se recuperan para el consumo humano, así como alimentos que son rechazados y finalmente descartados a nivel minorista o doméstico porque no concuerdan con las expectativas del consumidor debido a desviaciones visuales o sensoriales o no cumplen con los requisitos legales en cuanto a calidad o seguridad. El desperdicio de alimentos está principalmente relacionado con el consumidor que decide qué comprar y consumir, pero también involucra a otros actores (agricultores, procesadores, transportistas) que son responsables de la calidad en la que los alimentos se entregan al consumidor e incluye alimentos que sufren deterioro microbiológico o daños mecánicos durante el manejo, lo que obliga al minorista a rechazarlo (Raak, 2017).

El empaquetado en atmósferas modificadas (MAP), las temperaturas de procesamiento y las temperaturas de refrigeración son algunos de los principales obstáculos utilizados por la industria alimentaria para alargar la vida de anaquel de alimentos industrializados y de esta manera evitar el excesivo desperdicio de alimentos (Johansson, 2011), es decir, el control de estos factores se aplica en la tecnología de

obstáculos para alargar la vida de anaquel de los productos industrializados, ayudando a los productores y distribuidores a disminuir el desperdicio de alimentos y promoviendo la conservación de las características esperadas y deseadas por el consumidor.

A pesar de lo anterior, y aún bajo estas circunstancias de procesamiento y almacenamiento, algunos tipos de bacterias que causan la descomposición de los alimentos, como las bacterias ácido-lácticas psicrotófas, es decir, bacterias mesófilas que pueden crecer desde temperaturas de refrigeración, prevalecen en alimentos ricos en nutrientes, como fue demostrado por Stella y colaboradores (2013), quienes determinaron que la población predominante en muestras de carne de bovino empacada al vacío durante su almacenamiento fueron los lactobacilos.

En comparación con las bacterias Gram negativas aerobias que causan deterioro en los alimentos (como *Pseudomonas*, *Serratia*, *Shewanella* y *Aeromonas*), la fase de crecimiento estacionaria asociada con la producción de cambios sensoriales es alcanzada más lentamente por las BAL, además, algunos de los productos finales de la fermentación de carbohidratos producidos por las BAL no se perciben como desagradables, como es en el caso de la degradación de proteínas o aminoácidos (Johansson, 2011).

Las BAL son ubicuas en entornos de procesamiento de alimentos, constituyen la microbiota comensal del ganado y son autóctonos en vegetales. Las rutas de introducción a las plantas de producción son numerosas y aparentemente ciertos miembros de las BAL se han adaptado con éxito a estos nichos (Pothakos, 2014). La contaminación mediada por aire es una ruta presuntiva de introducción microbiana relacionada con el deterioro en la matriz alimentaria; el contacto con superficies también podría facilitar la contaminación (Johansson, 2011).

A pesar del papel generalmente moderado de las BAL psicrotófas en el deterioro de alimentos, siguen siendo organismos de deterioro. La tasa de crecimiento de las BAL psicrotófas usualmente puede predecirse y la vida de anaquel del producto en cuestión puede estimarse con una exactitud adecuada. Sin embargo, algunas BAL,

tanto psicrotrófas como mesófilas, pueden poner en apuros a la industria de alimentos. A continuación, se presentan algunos ejemplos:

Durán (2012) reportó crecimiento de BAL a lo largo de la vida de anaquel de salchichas empacadas al vacío, empleando esta información en la estimación de la vida de anaquel del producto.

Entre 2010 y 2014 varios casos de deterioro de alimentos antes del final de su vida útil se reportaron en Bélgica. En total, siete casos involucraron BAL psicrotróficas en productos alimenticios envasados y refrigerados; algunas de estas muestras fueron devueltas a las empresas fabricantes por los consumidores que observaron las alteraciones después de comprar los productos. Los productos abarcaban una amplia gama de matrices alimentarias, entre las que se encuentran carne, productos lácteos, vegetales, ovoproductos y alimentos compuestos; denotaban diferentes defectos de deterioro (Pothakos, 2014).

En el proceso de vinificación, una proporción incontrolada de levadura, BAL y de bacterias productoras de ácido acético (BAA) provocan el deterioro del producto final (Porto, 2017).

Especies del género *Pediococcus* se han asociado durante mucho tiempo al deterioro de la cerveza por la producción de diacetilo durante la fermentación y son más a menudo aislados de la cerveza deteriorada, material destilado o de los sótanos utilizados para la fermentación (Zhang, 2014).

Leuconostoc gasicomitatum es una BAL que se encontró como causante de deterioro en tiras de carne empacadas en atmósferas modificadas. Los paquetes mostraban un claro abombamiento debido a la formación de CO₂, a los 5 días de empacado, a pesar de que la vida útil definida por el fabricante era de 14 días (Johansson, 2011).

La tabla 1 muestra las características sensoriales de alimentos deteriorados por la presencia de *L. gasicomitatum*.

Tabla 1. Productos con deterioro causado por <i>L. gasicomitatum</i> y características.				
Tipo de alimento	Producto alimenticio	Tipo de empaque	Defectos sensoriales	Productos finales asociados al deterioro
Carne fresca	Carne marinada a la parrilla	Atmósfera modificada (80% CO ₂ , 20% N ₂)	Presencia de gas, olor desagradable	CO ₂ , ácido acético
	Carne de res marinada y humectada	Atmósfera modificada (70% O ₂ , 30% CO ₂)	Color verde, olor a mantequilla	H ₂ O ₂ y diacetilo
	Carne de res marinada y sin procesar, carne de cerdo y pollo	Atmósfera modificada (0-70% O ₂ , 20-80% CO ₂ , 20-80% N ₂)	Algunos paquetes con olor a mantequilla y otros sin olor	Diacetilo y otros compuestos volátiles
Productos de pescado	Arenque preservado con ácido acético	Contenedor plástico	Presencia de limo y gas	Dextranas, CO ₂
Otros	Salchichas de verduras cocidas	Vacío	Presencia de limo y gas, olor desagradable	Dextranas, CO ₂ , ácido láctico y acético
Fuente: Johansson, 2011.				

En los productos marinos preservados con bajos niveles de sales como el cloruro de sodio, ligera acidificación, empacados al vacío y en refrigeración como son el pescado ahumado, la microbiota contaminante está compuesta de BAL, principalmente *Lactobacillus* y *Carnobacterium* así como bacterias Gram negativas como *Photobacterium phosphoreum* y psicrófilos como *Enterobacteriaceae* (Salcido, 2010).

Los casos de deterioro atribuidos a especies de BAL se dan continuamente para todo tipo de productos de origen vegetal, como salchichas vegetales (Vihavainen, 2008) y productos de origen animal, ya que son capaces de crecer rápido aún a partir de poblaciones bajas y con competencia, pueden prosperar bajo condiciones ambientales adversas y desencadenan mecanismos de respuesta al estrés que los hacen más adaptables. Además, algunas especies tienen una selectividad muy baja para sustratos, lo que facilita la contaminación cruzada (Pothakos, 2014).

Su dominio al final de la vida útil de algunos alimentos sugiere un rápido crecimiento bajo las condiciones de almacenamiento incluso de poblaciones iniciales estresadas. Por ello se requiere evaluar su potencial de deterioro a medida que alcanzan niveles elevados que constituyen una amenaza para la calidad de los alimentos (Pothakos, 2014).

La reducción del desperdicio de alimentos es uno de los objetivos principales de la investigación actual, que también ha sido declarado por las Naciones Unidas para un mundo sostenible para 2030. Estudios anteriores han determinado que entre las causas de la generación de desperdicios alimentarios por parte de los consumidores se encuentran las expectativas con respecto a la calidad o las incertidumbres sobre la comestibilidad (Raak, 2017).

Para ayudar a las empresas de procesamiento de alimentos a simplificar el trabajo implicado en el control de la calidad microbiológica, se han generado diversos métodos rápidos, eficientes y ahorradores de material, trabajo y energía, como es el caso de la compañía *3M Food Safety™* que presenta el sistema *3M™ Petrifilm™ Lactic Acid Bacteria* (LAB por sus siglas en inglés) con una eficiente solución "todo en uno" para controlar los niveles de bacterias del ácido-lácticas en los alimentos, materias primas, productos y entornos de fabricación.

MARCO TEÓRICO

Características de las bacterias ácido-lácticas.

El término de bacteria ácido-láctica no se refiere a una clase filogenética de los organismos, sino más bien a las capacidades metabólicas de este grupo. Se definen históricamente como una familia ubicua y heterogénea de microorganismos que pueden fermentar varios nutrientes en ácido láctico, principalmente (Zhang, 2014).

Las BAL son microorganismos Gram positivos, catalasa negativos por lo general, microaerófilos; poseen enzimas que se inactivan en alta disponibilidad de O₂ y sólo pueden actuar a bajas presiones de este elemento (Lázaro, 2015). A pesar de su metabolismo anaerobio, en medios de cultivo sólidos forman colonias en presencia de aire (Parra, 2010).

Debido a que las BAL son ácido tolerantes algunas pueden crecer a valores de pH tan bajos como 3.2, inclusive otras a valores tan altos como 9.6, aunque la mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no soportan la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (Ramírez, 2011).

Dentro del grupo de las bacterias ácido-lácticas existen 16 géneros, pero solo 12 son activos en el campo de la alimentación: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Parra, 2010).

Fuentes de bacterias ácido-lácticas

Las bacterias ácido-lácticas pueden ser encontradas en alimentos, productos lácteos, carnes fermentadas, masas ácidas, vegetales fermentados, bebidas, entre otros productos; de igual manera pueden ser encontradas en plantas y en aguas residuales, pero también se hallan en los genitales, los tractos intestinales y respiratorios de hombres y animales (Wood, 2012).

Debido a la diversidad del grupo, han sido aislados de varios nichos ecológicos, comenzando desde el tracto gastrointestinal de humanos, animales e insectos, pasando por materiales a base de plantas y carne, hasta el suelo y el agua (Buron-Moles, 2019).

Algunas bacterias ácido-lácticas pueden ser encontradas bajo diversos hábitats y bajo condiciones definidas tanto por factores intrínsecos como extrínsecos extremos (Holzapfel, 2014).

A continuación, se indican algunas fuentes en las cuales se han podido encontrar especies de bacterias ácido-lácticas:

Las especies del género *Leuconostoc* se han aislado principalmente de carnes congeladas y fuentes clínicas, aunque también se encontraron en asociación con material vegetal, productos lácteos fermentados y vinos (Zhang, 2014).

Weissella cibaria se ha encontrado en el kimchi coreano y otras fuentes, incluidos los alimentos fermentados, el salami griego, las salchichas españolas y los excrementos de animales y humanos (Kang, 2016).

Como se mencionó anteriormente, algunos géneros de las BAL como son *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Pediococcus* se encuentran comúnmente en la microbiota del intestino de mamíferos y algunas especies están clasificadas como probióticos y son reconocidos como seguros en el campo alimenticio. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), los probióticos son microorganismos vivos que confieren beneficios para la salud del huésped cuando se administran en las cantidades adecuadas (Porto, 2017), por este motivo las BAL son muy reconocidas y ampliamente encontradas en productos lácteos, en particular las leches fermentadas y el yogur (Linares, 2017).

El género más grande, *Lactobacillus*, incluye más de 100 especies que son ubicuas dondequiera que haya carbohidratos disponibles. Están estrechamente asociados a animales terrestres y marinos, su medio ambiente (plantas, materiales de origen vegetal, estiércol) y sus alimentos (queso, yogur) y más comúnmente

encontrados en las cavidades corporales de los seres humanos y animales. En los humanos están presentes en la cavidad oral (10^3 a 10^7 unidades formadoras de colonia (UFC/g), en el íleon (10^3 a 10^9 UFC/g) y en el colon (10^4 a 10^8 UFC/g) y es el microorganismo dominante en la vagina (Zhang, 2014).

De acuerdo con Meyer y colaboradores (2019), *Streptococcus* es uno de los géneros predominantes presentes en la leche materna.

Si bien se han mencionado diversas fuentes en donde puede encontrarse este grupo bacteriano, no todos los géneros son considerados de importancia particular en la tecnología de los alimentos, por ejemplo, algunas especies de enterococos, en particular *E. faecalis* puede ser un patógeno oportunista, y, por lo tanto, generalmente indeseable en alimentos, sin embargo, se ha demostrado que algunas especies de enterococos están presentes en algunos tipos de queso en el sureste de Europa. Por su parte, el género *Aerococcus* también tiene un interés bajo en la tecnología de alimentos, sin embargo, algunos estudios sugieren que algunos aerococos podrían ser responsables de coloraciones verdosas en productos de carne cocida (Salminen, 2004).

Clasificación de las bacterias ácido-lácticas

Las BAL pueden clasificarse de acuerdo con distintas características que presentan como son la morfología, el modo de fermentación de la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad para crecer a alta concentración de sal, entre otras (Ramírez, 2011).

Morfología

Las BAL son bacilos y cocos gram positivos, generalmente inmóviles, que no forman esporas (Khalid, 2011). Dentro de los cocos podemos encontrar a los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Streptococcus*, por el lado de los bacilos podemos encontrar géneros como *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, algunas cepas de *Weissella* (Lahtinen, 2012).

Fermentación

Las BAL son quimiotrófas, pueden obtener la energía requerida a través de la oxidación de compuestos químicos. La oxidación de azúcares constituye su principal vía para obtener energía (Khalid, 2011)

De acuerdo con el modo de la fermentación de la glucosa pueden clasificarse como homofermentadoras o heterofermentadoras basado en el producto final de su fermentación. Las BAL homofermentadoras como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de la glucólisis. Por su parte, bacterias del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacillus* son BAL heterofermentadores y convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, cantidades significantes de otros productos como acetato, etanol y CO₂ (Ramírez, 2011).

Generación de ácido láctico

La generación de diferentes formas isómericas del ácido láctico durante la fermentación de la glucosa se puede emplear para distinguir entre *Leuconostoc* y la mayoría de los lactobacilos heterofermentativos, ya que los primeros producen sólo ácido D-láctico y los últimos una mezcla racémica (ácido L-láctico y ácido D-láctico), pero algunas cepas de *Weisella* podrían causar confusión en este aspecto (Lahtinen, 2012), ya que, a pesar de ser obligatoriamente heterofermentativos, son capaces de producir tanto ácido D- láctico como una mezcla de ácido L-láctico y ácido D-láctico como principales productos finales del metabolismo del azúcar (Fusco, 2015). Cabe recordar que los isómeros son moléculas de igual composición, es decir, la misma fórmula general, pero que se diferencian por las uniones de los átomos en sus moléculas, (Koolman, 2004).

Temperatura

Las BAL también pueden clasificarse según la temperatura ideal de crecimiento en mesófilas y termófilas. Las BAL mesófilas tienen una temperatura ideal de incubación de 20 a 25°C, algunas especies mesófilas son *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Las BAL termófilas tienen una temperatura ideal de incubación de 40 a 45 °C, algunas especies termófilas son *Lactococcus delbruekii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (Parra, 2010).

Algunas BAL son consideradas psicrótrofas, es decir, que su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20 y los 25°C, incluso a 35°C, pero pueden multiplicarse a partir de temperaturas de refrigeración (Hernández, 1999). Los psicrótrofos son bacterias o arqueas tolerantes al frío que tienen la capacidad de crecer a bajas temperaturas, pero tienen temperaturas de crecimiento óptimas y máximas superiores a 15 y 20 °C, respectivamente (Moyer, 2017).

Dentro de las BAL psicrótrofas destacan los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella* y *Lactococcus* (Pothakos, 2014), por ejemplo, Jung y colaboradores (2015), aislaron y caracterizaron diez cepas de especies psicrótrofas de *Weissella* de productos imitación de palitos de cangrejo.

Sal

La tolerancia a la sal (6.5 % de NaCl), también puede usarse para distinguir entre enterococos, lactococos/ vagococos y estreptococos, a pesar de que reacciones variables pueden encontrarse entre estreptococos. La tolerancia extrema a la sal (18% de NaCl) es reservada para el género *Tetragenococcus* (Lahtinen, 2012).

De acuerdo con Mohamad y colaboradores (2020), algunas BAL como *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactococcus garviae*, presentes en el intestino de langostinos de agua dulce, toleran bien concentraciones de sal entre 1 a 6% (crecimiento 8- 10 log 10 UFC/ mL).

pH

Excepto por algunas especies del género *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus*, las BAL son neutrófilos, el pH óptimo de desarrollo se encuentra entre 5 y 9 (Guchte, 2002).

En un estudio realizado por Yang y colaboradores (2018), se pudo determinar que el pH inicial del medio de cultivo fue uno de los factores clave en el crecimiento de cuatro cepas de BAL productoras de bacteriocinas, *Lactobacillus curvatus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* y *Streptococcus thermophilus*. El pH óptimo para el crecimiento de las cuatro LAB fue de 7.4 y 8.5, mientras que no pudieron crecer a un pH bajo de 4.5, demostrando así la importancia del pH del medio de desarrollo para este grupo.

La tolerancia a condiciones ácidas y/o alcalinas también puede ser útil para la clasificación de este grupo. *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus* se caracterizan por crecer a pH relativamente alto, a pesar de que no todos pueden crecer a pH de 9.6 (Lahtinen, 2012).

La tolerancia a los ácidos es una propiedad importante de las BAL en el entorno alimentario ya que la concentración de azúcar en algunos productos como la leche es suficiente para disminuir el pH por debajo de 4.5 (Adamberg, 2003). Si bien, entornos con pH ácido no promueven el desarrollo de algunas cepas de BAL como se mencionó anteriormente, se ha demostrado su tolerancia a estos, por ejemplo, LeBlanc y colaboradores (2004), informaron que el crecimiento de *Lactobacillus fermentum* fue notablemente más lento a pH 4.5 que a otros valores de pH (5.0, 5.5 y 6.0), mientras que Mataragas y colaboradores (2003) indicaron que a pH 4.5, la biomasa final y la actividad bacteriocina de *Leuconostoc mesenteroides* eran muy bajas pero aun presente, demostrando su tolerancia y sobrevivencia a este tipo de entornos.

Diferentes mecanismos podrían ser básicos para la supervivencia o adaptación a diversos hábitats. Los rasgos de la supervivencia podrían deberse a características constitutivas de la especie o cepa, o podría depender de la respuesta al estrés. Ejemplos de lo anterior podrían estar asociados con las propiedades de la pared celular y con una

fuerte habilidad de mantener la homeostasis en un medio con condiciones adversas como presión osmótica alta o pH bajo. La habilidad de supervivencia o adaptación a condiciones extremas también depende de la respuesta al estrés incluida la tolerancia a bajas o altas temperaturas o sales biliares (Holzapfel, 2014).

Algunos ejemplos de la asociación de las BAL con condiciones extremas bajo las cuales pueden crecer o tolerar pueden ser observadas en la siguiente tabla:

Tabla 2. BAL y presencia en condiciones no óptimas de desarrollo			
Factor	Valor	Organismo	Sustrato o hábitat
pH bajo	pH 2.8	<i>Lb. suebicus</i>	Manzanas fermentadas
	pH 3.2	<i>Lb. acetotolerans</i>	Vinagre de arroz
	pH 3.0	<i>Lb. acidophilus</i>	Estómago y duodeno
pH alto	9.6	<i>Ent. faecium</i>	Soya fermentada
Sales biliares y jugo pancreáticas	Concentraciones fisiológicas	<i>C. divergens</i>	Carne
		<i>Lb. reuteri/</i> <i>Lb. paracasei</i>	Intestino
Sal (NaCl)	18- 24 %	<i>Tet. muriaticus</i>	Pescado salado fermentado
	26.4 %	<i>C. viridans</i>	Bologna empacada al vacío
Bajas temperaturas	0- 2 °C	<i>Leuc. gelidum</i>	Carne empacada al vacío
Altas temperaturas	55 °C	<i>Lb. delbrueckii</i> <i>subesp. delbrueckii</i>	Queso tipo Emmental
	50 °C	<i>Strep. thermophilus</i>	Queso duro tipo italiano
Nitrito	>150 ppm	Diversas BAL	Carnes curadas
Ácido sórbico	>2 g/ Kg	Diversas BAL	Jugos pasteurizados
Etanol	15 %	<i>Lb. fructivorans</i>	Aislados de ketchup
	13 %	<i>O. oeni</i>	Vino

Fuente: Holzapfel, 2014.

En la tabla 3, se muestran diversas características que permiten diferenciar a algunas bacterias ácido-lácticas.

Tabla 3. Características diferenciales de bacterias ácido-lácticas.

Característica	Bacilos		Cocos						
	<i>Carno-bacterium</i>	<i>Lacto-bacillus</i>	<i>Aero-coccus</i>	<i>Entero-coccus</i>	<i>Lacto-coccus y Vago-coccus</i>	<i>Leuco-nostoc y Oeno-coccus.</i>	<i>Pedio-coccus</i>	<i>Strepto-coccus</i>	<i>Weisella</i>
Formación de CO ₂	-	±	-	-	-	+	-	-	+
Crecimiento a 10 °C	+	±	+	+	+	+	±	-	+
Crecimiento a 45 °C	-	±	-	+	-	-	±	±	-
Crecimiento en 6.5 % NaCl	ND	±	+	+	-	±	±	-	±
Crecimiento en 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	±
Crecimiento a pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Ácido láctico producido	L	D, L, DL	L	L	L	D	L, DL	L	D, DL

+ positivo, - negativo, ± respuesta variable entre especies, ND no determinado.

Fuente: Lahtinen, 2012.

Metabolismo de las bacterias ácido-lácticas

Las propiedades sensoriales, vida útil y seguridad de la mayoría de los alimentos fermentados están determinados por la actividad metabólica de las BAL que participan en este proceso (Gänzle, 2015).

Las bacterias ácido-lácticas son un grupo diverso de organismos con una capacidad metabólica diferente. Esta diversidad hace al grupo muy adaptable a un amplio rango de condiciones y también es mayormente responsable de su éxito en la fermentación de alimentos (Holzapfel, 2014).

Una de las características esenciales del metabolismo de las BAL es que, aunque no llevan a cabo el ciclo de Krebs, logran la fermentación eficiente de carbohidratos, acoplada a fosforilación a nivel de sustrato (Lahtinen, 2012).

Las bacterias que constituyen este grupo son organismos fastidiosos y necesitan nutrientes ricos y complejos para el crecimiento, por ejemplo, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y minerales. Además, algunas BAL necesitan factores de crecimiento especiales como el suero de leche. Las BAL degradan una cantidad de carbohidratos y compuestos relacionados a través de diferentes procesos metabólicos. El ATP, generado por la fosforilación a nivel de sustrato, se usa para el transporte de solutos a través de la membrana celular y para propósitos biosintéticos. Es bien sabido que las condiciones ambientales influyen en las vías metabólicas utilizadas por este grupo (Holzapfel, 2014).

Las BAL se han clasificado como homofermentativas obligadas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas. Además, las principales diferencias metabólicas y ramificaciones dependen de la ruta empleada para fermentación de hexosas más que de la capacidad de fermentar pentosas (Gänzle, 2015).

Principales vías de fermentación

Fermentación de hexosas

Existen dos vías principales para la fermentación de la glucosa dentro de las BAL.

La glicólisis (vía de Embden-Meyerhof-Parnas), usado por todas las BAL excepto *Leuconostoc*, el grupo 3 de lactobacilos, oenococos, y *Weissella*, se caracteriza por la formación de fructosa-1,6-difosfato (FDP), el cual es separado por una FDP- aldolasa en dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) y gliceraldehido-3-fosfato (GAP). El GAP es entonces convertido a piruvato en una secuencia metabólica que incluye la fosforilación a nivel de sustrato en dos sitios. Bajo condiciones normales, es decir, en exceso de azúcar y acceso limitado a oxígeno, el piruvato es reducido a ácido láctico por una lactato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (nLDH), reoxidando con ello el NADH formado

durante las etapas glicolíticas anteriores. Se obtiene así un balance redox, el ácido láctico es virtualmente el único producto final, y el metabolismo es conocido como una fermentación homoláctica (Lahtinen, 2012).

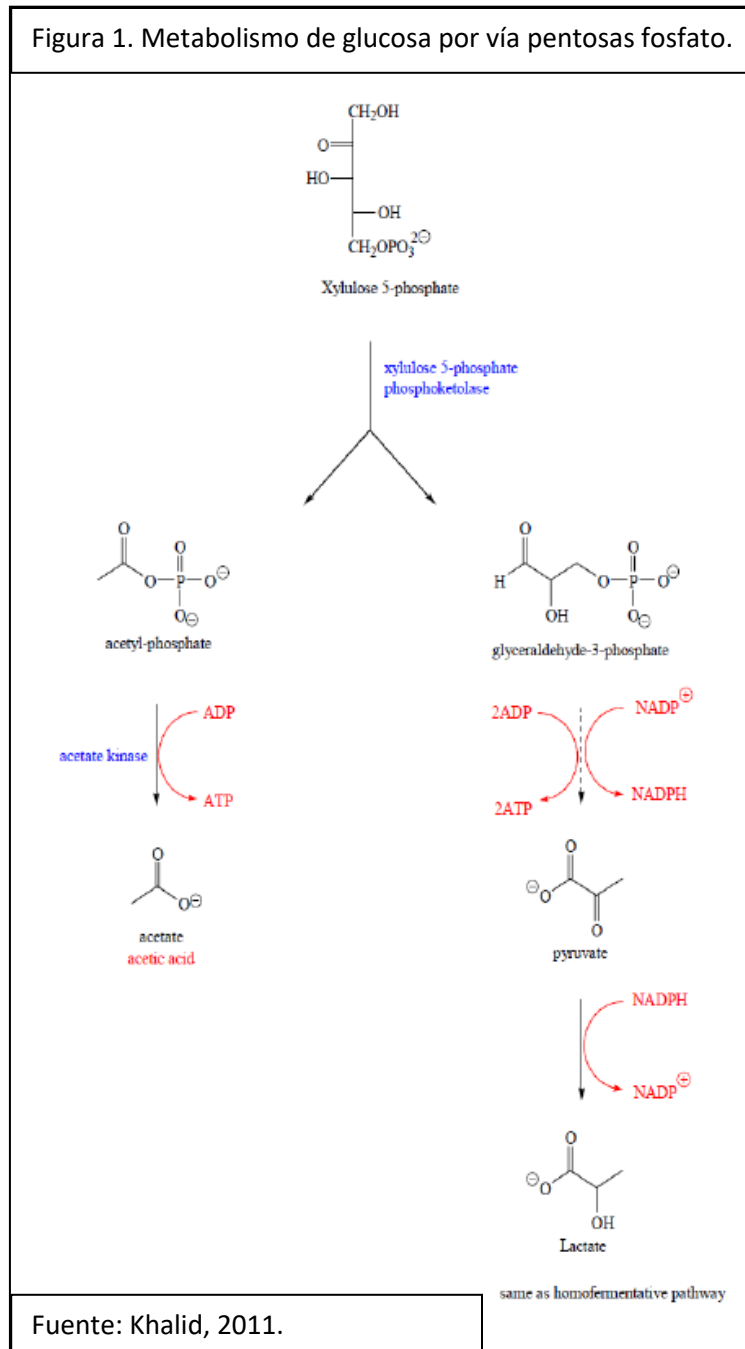
Las bacterias que emplean la vía heterofermentativa, la otra vía principal de fermentación, como por ejemplo *Leuconostoc* (la bacteria más importante en enología) emplean la vía de las pentosas fosfato. Después de ser transportada a la célula, una glucocinasa fosforila la glucosa en glucosa 6-fosfato. Su destino es completamente diferente al de la vía homofermentativa. Se producen dos reacciones de oxidación: la primera conduce al gluconato 6-fosfato y la segunda, acompañada de una descarboxilación, forma ribulosa 5- fosfato. En cada una de estas reacciones se reduce una molécula de NADP+. En seguida, la ribulosa 5-fosfato puede epimerizarse a ribosa 5-fosfato o a xilulosa 5-fosfato. A continuación, la xilulosa 5-fosfato se escinde en acetil fosfato y gliceraldehído 3-fosfato. El gliceraldehído 3-fosfato se metaboliza en ácido láctico siguiendo la misma vía que en la vía homofermentativa. El acetil fosfato tiene dos posibles destinos, dependiendo de las condiciones ambientales (Khalid, 2011).

Cuando no hay un aceptor adicional de electrones disponible, el acetil fosfato es reducido a etanol vía acetil CoA y acetaldehído. Desde este metabolismo se obtienen cantidades significativas de otros productos finales (CO₂, etanol) además del ácido láctico, lo cual es conocido como fermentación heteroláctica (Lahtinen, 2012), o bien el acetil fosfato puede producir acetato (ácido acético) a través de la enzima acetato cinasa. Esta reacción también produce una molécula de ATP, los productos finales de esta vía son entonces ácido láctico y ácido acético (Khalid, 2011).

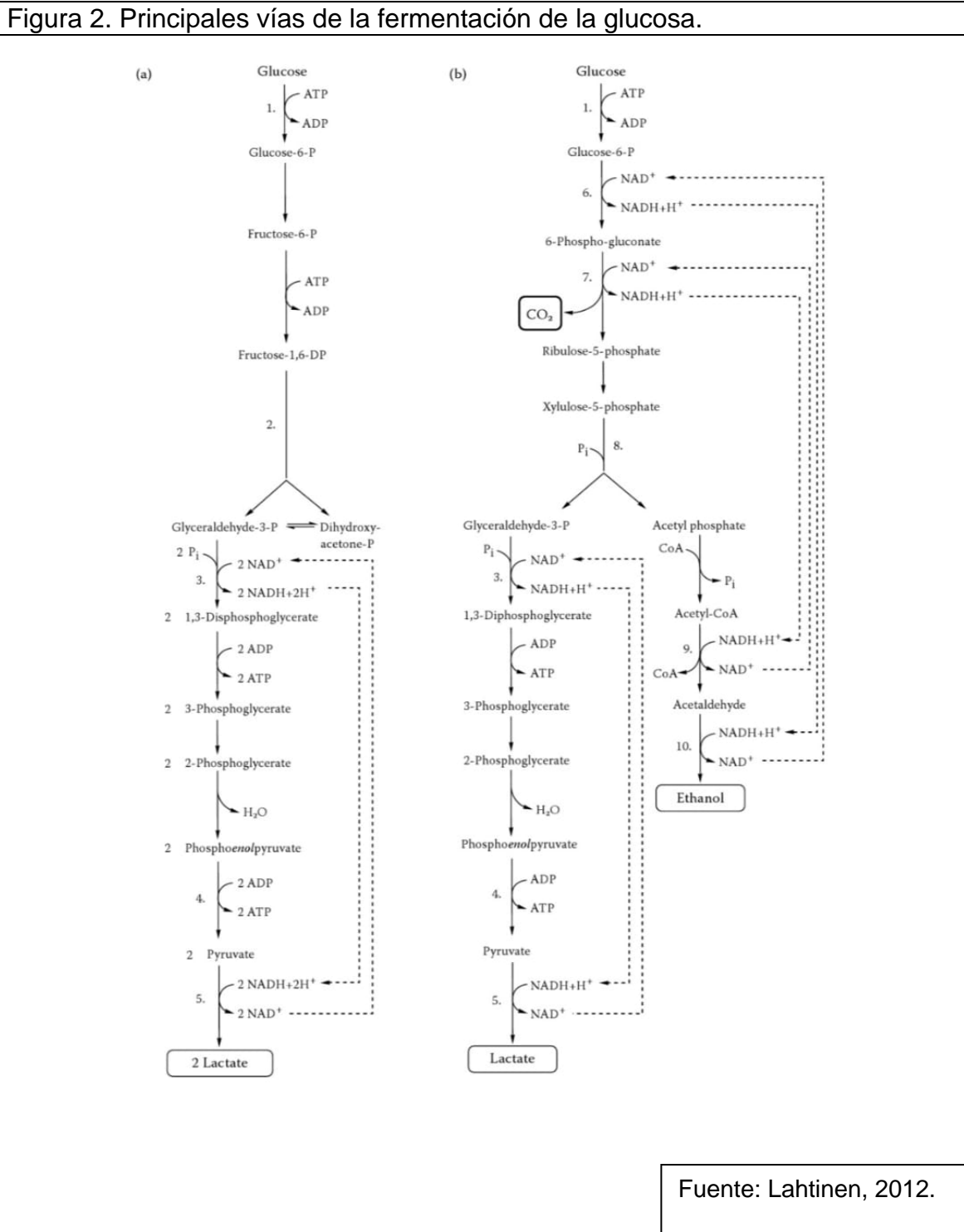
Miembros de la familia *Carnobacteriaceae*, a saber, los géneros *Alkalibacterium*, *Carnobacterium*, *Marinilactibacillus* y *Trichococcus*, producen ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético y etanol a partir de glucosa. El dióxido de carbono no se produce, excepto por *Carnobacterium spp.* A pesar de que la proporción de los productos difiere entre los organismos, el ácido láctico y el ácido fórmico son los principales productos finales. La proporción en la que se producen estos productos finales está influenciada por la presencia de aceptores de electrones y el pH de crecimiento inicial (Holzapfel, 2014).

La terminología relativa a estas vías y a las bacterias que las utilizan puede ser confusa, por lo que es conveniente señalar que, en general, el término de “BAL homofermentativas” se refiere a aquel grupo que usa la vía de la glicólisis para la fermentación de la glucosa, mientras que las “BAL heterofermentativas” son aquel grupo que usa la vía de las pentosas fosfato. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la glicólisis puede dar lugar a una fermentación heteroláctica bajo ciertas condiciones (Lahtinen, 2012). A continuación, la figura 1 muestra el metabolismo heterofermentativo de la glucosa a través de la vía pentosas fosfato con la formación de ácido acético a través de acetil fosfato.

Figura 1. Metabolismo de glucosa por vía pentosas fosfato.

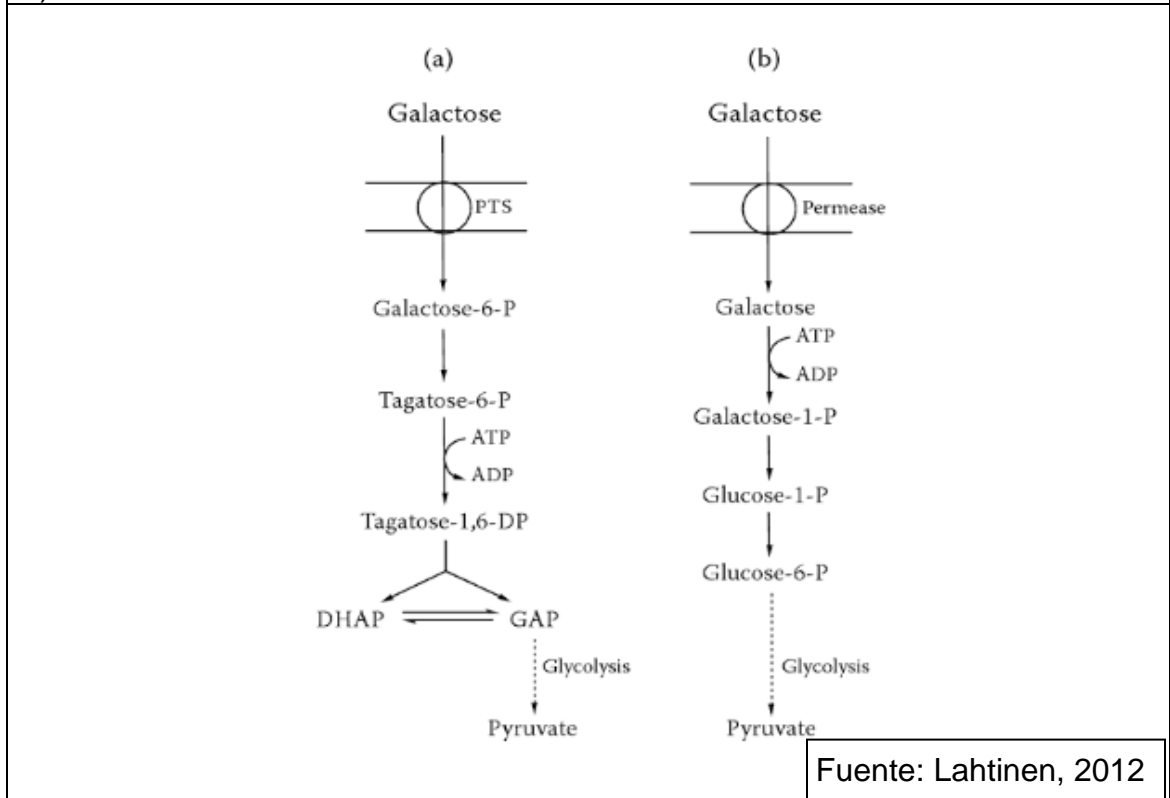


Y la figura 2 muestra ambas rutas metabólicas; del lado izquierdo, a) Fermentación homoláctica (glicólisis, vía de Embden- Meyerhof- Parnas) y del lado derecho, b) Fermentación heteroláctica (vía de las pentosas fosfato).



La mayoría de las BAL también fermentan la fructosa, la galactosa y la manosa, fuentes de carbono comunes clasificadas como hexosas. La vía glicolítica o fosfoacetolasa se usa para el metabolismo de fructosa y manosa. La fructosa no solo sirve como sustrato, sino también como aceptor de electrones, lo cual, de acuerdo con Gänzle (2015), puede incrementar el rendimiento energético de esta vía metabólica. La galactosa se metaboliza a través de dos vías diferentes. Si el azúcar se transporta a través de la membrana celular mediante el sistema fosfotransferasa (PTS por sus siglas en inglés), el azúcar fosforilada (galactosa-6-fosfato) se metaboliza a través de la ruta tagatosa-6-fosfato. Si la galactosa se transporta por la galactosa permeasa, se metaboliza mediante una combinación de la vía de Leloir y la vía glucolítica (Holzapfel, 2014). La representación de ambas rutas metabólicas de la galactosa se muestra en la figura 3.

Figura 3. Metabolismo de la galactosa en BAL, a) Vía de la tagatosa- 6- fosfato, b) Vía de Leloir.



De acuerdo con un estudio realizado por Buron- Moles y colaboradores (2019), en donde fueron probadas las capacidades metabólicas de 56 cepas de BAL que comprendían especies de los géneros *Lactobacillus* (n= 42), *Lactococcus* (n= 8), *Leuconostoc* (n= 3), *Pediococcus* (n= 2) y *Streptococcus* (n= 1), la D-glucosa es la única hexosa que puede ser degradada por las 56 cepas. Con algunas excepciones, las BAL estudiadas pueden metabolizar D-galactosa (algunas excepciones son *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *Lb. oeni*, *Lb. acidophilus*), D-fructosa (exceptuando *Lb. fermentum*, *Le. mesenteroides* spp. *cremoris*) y D-manosa (a excepción de cepas como *St. salivarius* spp. *thermophilus*, *Lb. reuteri*, *Lb. silagei*, *Lb. kefir*). Otras hexosas como D-tagatosa, D-fucosa y L-fucosa pueden degradarse por menos cepas de BAL, como por ejemplo *Lc. salivarius* D- tagatosa y *Lb. zeae* L- fucosa.

Fermentación de disacáridos

Los disacáridos, carbohidratos compuestos por dos monosacáridos unidos por un enlace glicosídico, como D-maltosa, D-lactosa y D-sacarosa, son fuentes de energía comunes para las células bacterianas (Buron- Moles, 2019).

Algunas BAL metabolizan disacáridos como celobiosa, lactosa, maltosa, melibiosa, sacarosa, entre otros. Estos azúcares son transportados a través de la membrana celular, ya sea como azúcares libres o fosforilados, y luego se dividen en dos monosacáridos o un monosacárido y un monosacárido fosfato (Holzapfel, 2014).

Como se mencionó anteriormente, dependiendo del modo de transporte, los disacáridos entran a la célula tanto como azúcares libres o como azúcares fosfatados. En el primer caso, los disacáridos libres son transformados por hidrolasas específicas a monosacáridos, los cuales entran a las principales vías descritas anteriormente. En el segundo caso, cuando un sistema de azúcar fosfotransferasa (PTS) está involucrado, fosfohidrolasas específicas transforman los disacáridos fosfatados en dos elementos, un monosacárido libre y un monosacárido fosfatado (Lahtinen, 2012).

Del estudio realizado por Buron- Moles y colaboradores, (2019), el cual se mencionó anteriormente, se pudo determinar que en general, todas las cepas estudiadas pueden fermentar D-lactosa y D-sacarosa, con algunas excepciones. Por ejemplo,

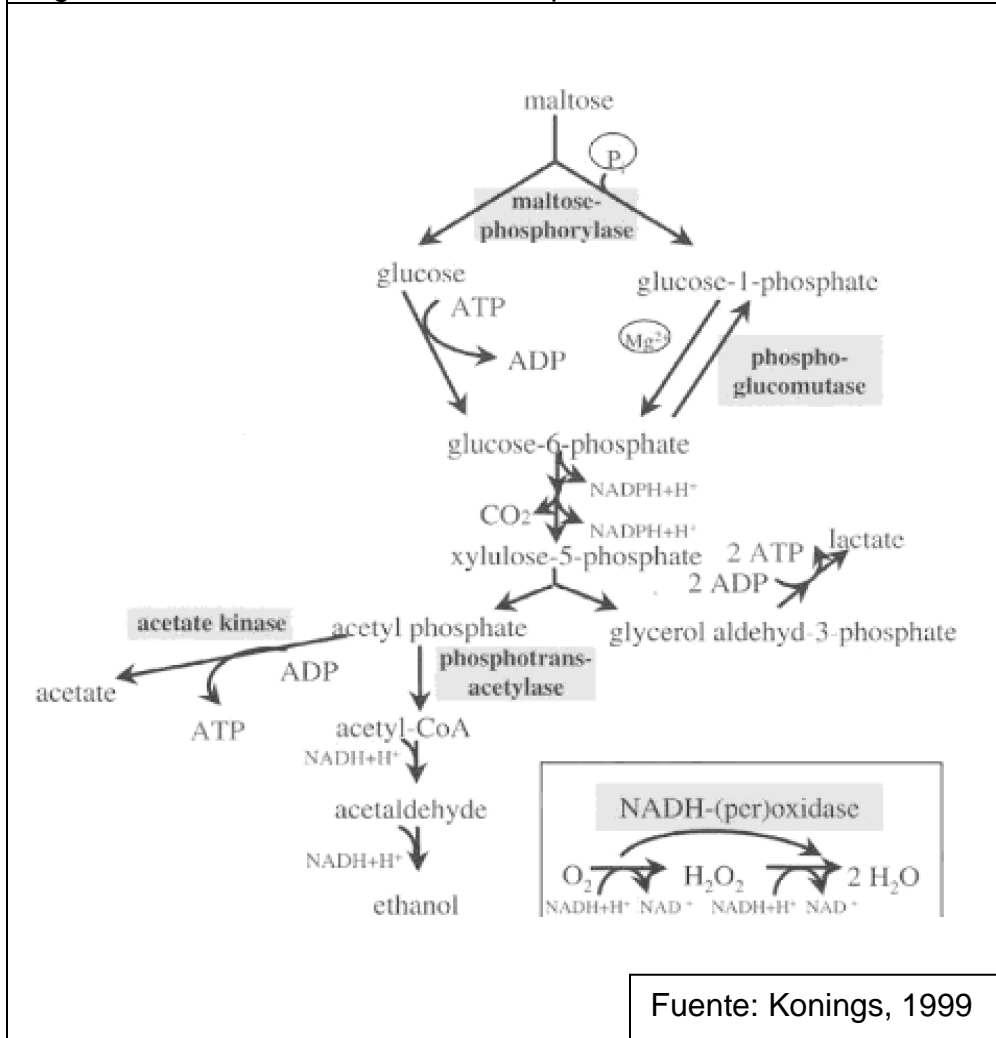
Leuconostoc no puede degradar la D-lactosa y las cepas de *Lactococcus* no pueden utilizar D-sacarosa.

Algunas BAL prefieren disacáridos en lugar de monosacáridos como sustratos de crecimiento, a pesar de que la fermentación de disacáridos parece ser más complicada en comparación con la fermentación de monosacáridos. Algunos ejemplos de esta preferencia son la fermentación de la lactosa por BAL en productos lácteos y la fermentación de la maltosa en la masa fermentada por acción de las BAL (Holzapfel, 2014).

La fermentación de la maltosa entre las BAL se ha estudiado ampliamente en lactobacilos. Pareciera que un sistema de transporte (permeasa) podría estar involucrado. Una característica interesante del metabolismo de la maltosa en *L. lactis* es que la maltosa es dividida por una maltosa fosforilasa en glucosa y β -glucosa-1- fosfato. Únicamente la mitad de la glucosa es usada en la glicólisis, mientras que la β - glucosa-1-fosfato es probablemente un precursor de la síntesis de la pared celular (Lahtinen, 2012).

En la figura 4, se muestra esquemáticamente el metabolismo de la maltosa por *L. sanfranciscensis*.

Figura 4. Metabolismo de la maltosa por *L. sanfranciscensis*.

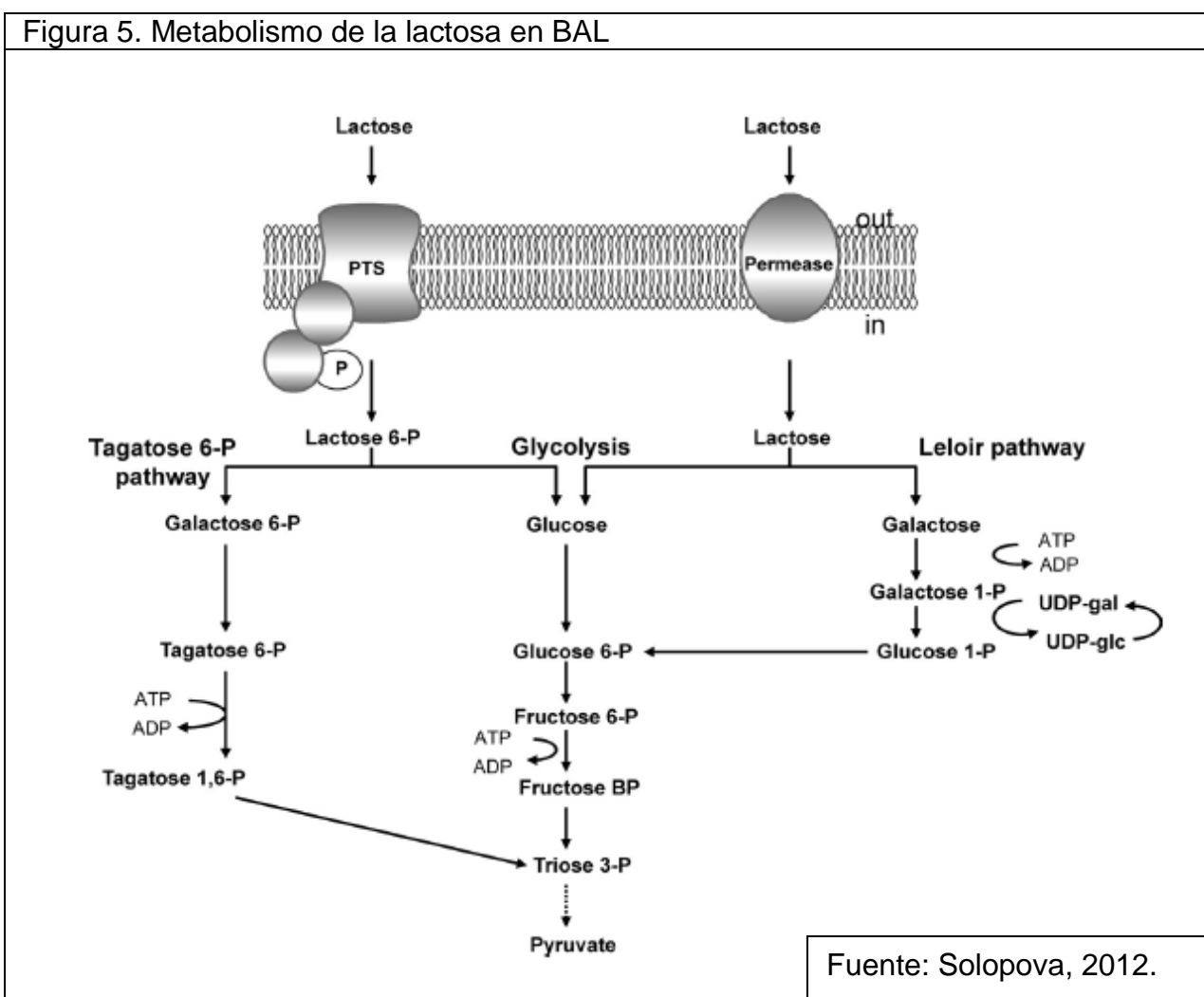


La utilización de disacáridos podría tener beneficios no solo para el metabolismo de las BAL, sino también para la estabilidad microbiana de los alimentos. En el caso de la masa madre, en donde la maltosa y la sacarosa son componentes principales de la harina, se ha documentado que contiene *Saccharomyces cerevisiae* combinado con *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus sanfranciscensis*. La estabilidad microbiana de estas masas es causada, al menos en parte, por múltiples interacciones tróficas entre los miembros del consorcio que dependen de la disponibilidad de componentes en el medio ambiente. Se demostró que las BAL y las levaduras asociadas a la masa madre estimulan el crecimiento mutuo mediante la hidrólisis de maltosa, en beneficio de las cepas de *S. cerevisiae* que no pueden hidrolizar y utilizar maltosa, y la hidrólisis de

sacarosa, en beneficio de *L. plantarum*, que crece de manera óptima en glucosa (Siewverts, 2018).

En el caso de la lactosa, las BAL no la metabolizan directamente, pero, al usar una lactosa-permeasa, este sustrato se transfiere a la célula donde se hidroliza a glucosa y galactosa por la acción de la enzima β -D-galactosidasa, ambos monosacáridos son metabolizados por las vías mencionadas anteriormente (Matijević, 2011).

En la figura 5 puede observarse esquemáticamente el metabolismo de la lactosa por las bacterias ácido-lácticas.



Es importante mencionar que no todas las BAL pueden metabolizar la galactosa. De hecho, aunque se describe que algunas cepas de *Streptococcus thermophilus* exhiben una vía activa de Leloir, se sabe que las cepas de esta especie fermentan parcialmente la lactosa. Así, tras la escisión de la lactosa por la β -galactosidasa, las cepas de *S. thermophilus* galactosa negativas metabolizan el resto de glucosa y excretan galactosa en el medio gracias a una permeasa que permite el intercambio de lactosa / galactosa. De manera similar, las cepas de *Lactobacillus delbruckii* metabolizan la glucosa y liberan galactosa en el medio extracelular (Iskandar, 2019).

La fermentación de la sacarosa mediada por un sistema de permeasa es iniciada por la ruptura del azúcar mediante la sacarosa-hidrolasa para producir glucosa y fructosa, las cuales entran a las principales vías de fermentación. En algunos lactococos, la sacarosa es transportada mediante un PTS y una hidrolasa específica (sacarosa-6-fosfato-hidrolasa) divide a la sacarosa-6-fosfato a glucosa-6-fosfato y fructosa. La sacarosa también puede actuar como donador de monosacáridos para la formación de exo-polisacáridos por algunas BAL. En la producción de dextrana por *L. mesenteroides*, la sacarosa es dividida por una enzima asociada a la pared celular, la dextran-sacarasa. La mitad de la glucosa es usada en la síntesis de dextrana y la fructosa es fermentada de manera usual (Lahtinen, 2012).

Por mencionar un ejemplo de la fermentación de sacarosa por BAL, Harlé y colaboradores (2020), probaron la capacidad de 276 cepas de BAL de 25 especies para fermentar los principales carbohidratos del jugo de soya, sacarosa (50%), rafinosa (10%) y estaquiosa (40%) en medios sintéticos y un jugo de soya, determinando que todos los *Streptococcus*, el 83% de *Leuconostoc* y *Lactobacillus* y el 41% de las cepas de *Lactococcus* fueron sacarosa positivas, es decir, fueron capaces de fermentar la sacarosa, mientras que sólo el 36% de todas las cepas de BAL analizadas fueron rafinosa positivas y el 6% estaquiosa positivo, empleando cada disacárido como única fuente de carbono. Con respecto a la sacarosa, *S. thermophilus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* fueron las especies más capaces de degradar la sacarosa, con un 100% de cepas positivas para sacarosa dentro de las 48 h de fermentación, en el caso de la rafinosa, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus*

y *L. helveticus* son consideradas especies apropiadas para degradarlo, mientras que *L. acidophilus* fue eficiente en el uso de estaquiosa (50% de las cepas positivas a estaquiosa).

Fermentación de pentosas y compuestos relacionados

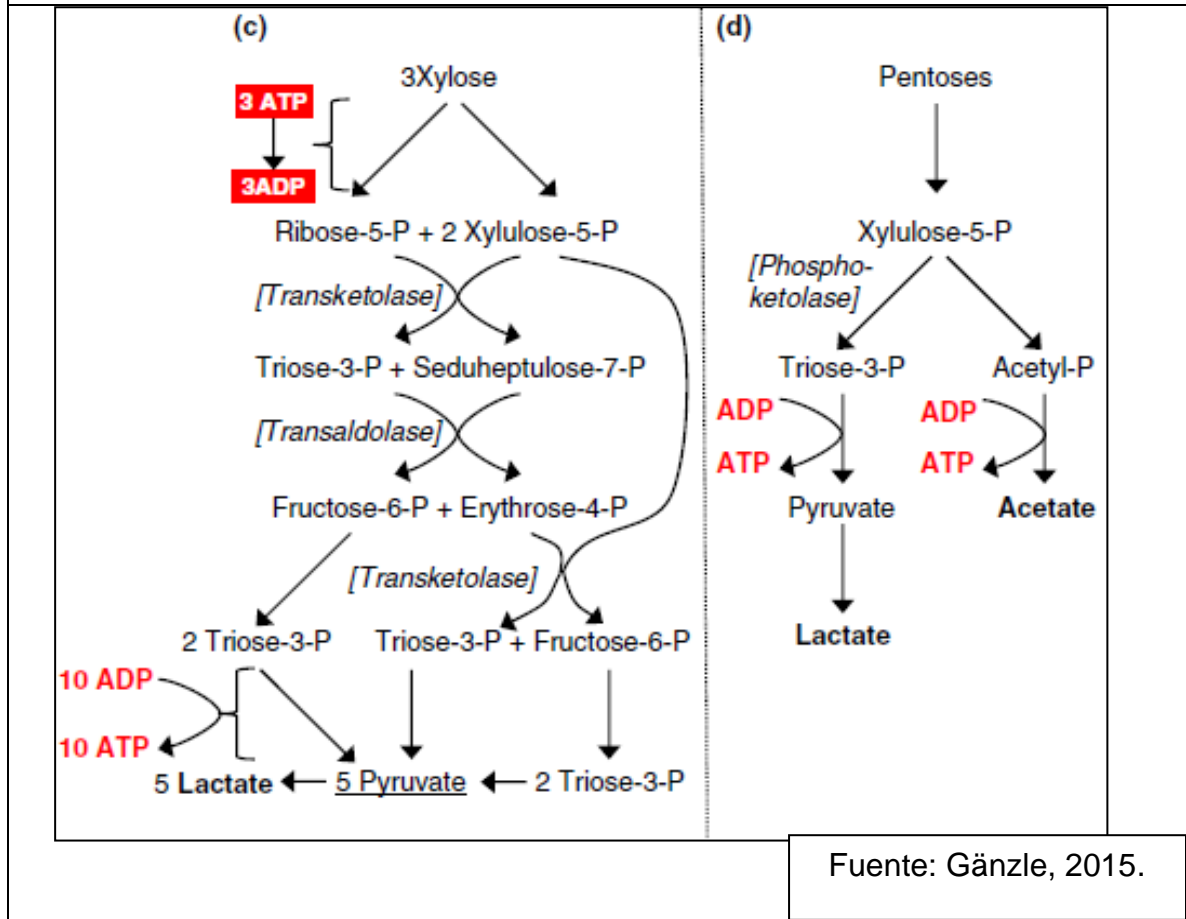
Muchas BAL son capaces de metabolizar pentosas, por ejemplo, arabinosa, ribosa y xilosa, así como carbohidratos relacionados como el gluconato. Los compuestos son generalmente transportados a las células por permeasas y metabolizados por la vía de la fosfocetolasa (Holzapfel, 2014).

En el metabolismo homofermentativo de las pentosas, la conversión de 3 moles de pentosas a través de reacciones de transcetolasa y transaldolasa produce 5 moles de triosa fosfato; la ganancia neta de energía en la vía (7 mol de ATP / 3 mol de pentosa) es, por tanto, ligeramente superior en comparación con el catabolismo de la pentosa a través de la vía de la fosfocetolasa (Gänzle, 2015).

La fermentación heteroláctica de pentosas resulta en un producto final diferente, comparado con la fermentación de la glucosa. No se forma CO₂ y puesto que no son necesarias etapas de deshidrogenación para alcanzar el intermediario xilulosa-5-fosfato, la reducción de acetil fosfato a etanol se vuelve redundante. En su lugar, el acetil fosfato es usado por la enzima acetato cinasa en un paso de fosforilación a nivel de sustrato produciendo acetato y ATP. La fermentación de las pentosas, por lo tanto, lleva a la producción de cantidades equimolares de ácido láctico y ácido acético (Lahtinen, 2012), sin embargo, *Lactobacillus vini* produce grandes cantidades de ácido láctico y muy poco ácido acético y etanol de arabinosa y ribosa, con 1.6 – 1.7 moléculas de ácido láctico producidas por cada pentosa consumida (Holzapfel, 2014).

La figura 6 muestra las formas de metabolizar pentosas: la vía homofermentativa marcada con (c), a través de las pentosas fosfato y el metabolismo heterofermentativo de las pentosas a través de la vía de la fosfocetolasa (d).

Figura 6. Metabolismo de pentosas por BAL, c) Vía de pentosas fosfato, homofermentativa, d) vía de la fosfoacetolasa, heterofermentativa.



En el estudio realizado por Buron- Moles y colaboradores (2019), también se analizó la capacidad de algunas BAL para fermentar pentosas, determinándose que solo *Lb. zae* puede degradar la D-arabinosa, mientras que diferentes cepas del grupo bajo estudio son capaces de metabolizar la L-arabinosa entre los que se encuentran *Lb. vini*, *Pd. acidilactici*, *Pd. pentosaceus*, *Le. citreum*, *Lb. sanfrascincensis* y *Lb. buchneri*. Otras pentosas como D-ribosa pueden ser degradadas por diversas cepas del grupo como *Lc. lactis* spp. *lactis*, *Lb. nagelii*, *Lb. plantarum*, *Lb. hilgardii* y *Lb. curvatus*, sin embargo, no puede ser degradada por cepas *Leuconostoc*, mientras que la D-xilosa, un estereoisómero de la ribosa (aldopentosa), no puede ser metabolizada por ninguno de los BAL probados.

El metabolismo eficiente de las pentosas por parte de este grupo es particularmente importante cuando se aborda la fermentación de la hemicelulosa, polímero natural compuesto por diversos monómeros como la arabinosa, manosa, galactosa, glucosa y xilosa. Un número creciente de BAL ha demostrado que metaboliza la celobiosa y oligosacáridos cortos derivados de la hidrólisis de hemicelulosa (por ejemplo, xilano, β -glucano), algunas cepas como *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc lactis* pueden metabolizar tanto la arabinosa como la xilosa a través del metabolismo heterofermentativo. En *Lactococcus lactis* IO-1 se identificó una vía de fermentación de xilosa adicional que presenta mayores rendimientos de producción de ácido láctico. En esta cepa, en altas concentraciones de xilosa, el catabolismo se desplaza de la vía de la fosfoacetolasa a la vía de las pentosas fosfato, realizando una conversión homoláctica (Tarraran, 2018).

Como se mencionó anteriormente, las BAL también presentan la capacidad de fermentar el gluconato. A pesar de que el gluconato no es una pentosa, éste es fermentado de la misma manera que las pentosas mediante la vía de las pentosas fosfato, produciendo una fermentación heteroláctica por especies consideradas como homofermentativas (Lahtinen, 2012).

El proceso se parece a la fermentación de la glucosa y se sigue el mismo patrón general; la glucosa, el gluconato y el 2-cetogluconato se metabolizan a lactato que a su vez se metaboliza a etanol, acetato y CO₂, sin embargo, ya que el gluconato y el 2-cetogluconato tienen 2 y 4 átomos de hidrogeno menos que la glucosa, respectivamente, medio mol de etanol y acetato podrían esperarse del metabolismo del gluconato y solo un mol de acetato del 2-cetogluconato (Gunsalus, 2012).

Dentro del estudio realizado por Buron-Moles y colaboradores (2019), además de evaluar la capacidad de degradar diversos azúcares, también se evaluó la capacidad de degradar otras fuentes de carbono por parte de las BAL, como por ejemplo las sales de gluconato de potasio, 2-cetogluconato de potasio y 5-cetogluconato de potasio. El gluconato de potasio es la sal de potasio del ácido glucónico, que se obtiene a partir de la glucosa por fermentación y posterior neutralización con una fuente de potasio. De las tres sales empleadas, el gluconato de

potasio fue el más fermentado por las BAL en estudio, seguido por el 5-cetogluconato de potasio con la excepción de *St. salivarius* ssp. *thermophilus* y los lactococos bajo estudio, que no pueden metabolizar esta sal. Finalmente, cinco cepas fueron capaces de metabolizar el 2-cetogluconato de potasio *Le. citreum*, *Lb. kéfiri*, *Lb. zaeae*, *Lb. casei* y *Lb. composti*.

Fermentación de azúcar y categorías metabólicas de las bacterias ácido-lácticas

Es posible dividir al extenso grupo en tres categorías metabólicas en función de las vías utilizadas para fermentar la glucosa y la capacidad para metabolizar pentosas.

La primera categoría incluye al grupo I de *Lactobacillus* (*Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, *Lb. salivarius*) y algunas especies individuales de otros géneros los cuales son homofermentativos obligados, lo cual significa que los azúcares solo pueden ser fermentados por glicólisis (Lathinen, 2012), pero no pueden fermentar pentosas y compuestos relacionados (Holzapfel, 2014).

Dentro de este grupo también se encuentran especies de *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, debido a su capacidad para fermentar solo hexosas casi completamente a ácido láctico por la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), mientras que las pentosas no son degradadas por todos los homofermentadores (Buron- Moles, 2019).

Las BAL homolácticas existen como microbiota de fermentación única en muchos productos fermentados a base de carne y lácteos, así como la fermentación de condimentos a altas concentraciones de sal. Como se mencionó anteriormente, el metabolismo homofermentativo de los carbohidratos en los alimentos produce lactato como único o principal producto del metabolismo; las excepciones incluyen fermentaciones de soja con *Tetragenococcus halophilus* donde bajas concentraciones de hexosas favorecen el metabolismo por piruvato formiato liasa. *Carnobacterium* spp., el cual desarrolla en carnes al vacío y pescados envasados, metabolizan hexosas a través de la vía piruvato formiato liasa (Gänzle, 2015).

La segunda categoría incluye a *Leuconostoc*, al grupo III de *Lactobacillus* (*Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum* y *Lb. reuteri*), oenococos y *Weisella*, los cuáles son heterofermentativos obligados, lo cual significa que únicamente la vía de las pentosas fosfato está disponible para la fermentación de azúcares (Lathinen, 2012).

Las BAL heterofermentativas obligadas no pueden utilizar hexosas a través de la vía EMP debido a la falta de la enzima glucolítica fructosa-1,6-difosfato aldolasa. En cambio, degradan las hexosas por la vía del fosfogluconato, produciendo no solo ácido láctico como producto final, sino también cantidades significativas de etanol o ácido acético y dióxido de carbono (Buron-Moles, 2019).

La clasificación como obligatoriamente homofermentativa y obligatoriamente heterofermentativa depende de la presencia o ausencia de la fructosa 1,6-difosfato aldolasa (FDP por sus siglas en inglés) o fosfocetolasa, las enzimas clave en la glucólisis y la vía fosfocetolasa, respectivamente. Las BAL obligatoriamente homofermentativas poseen FDP aldolasa pero no fosfocetolasa, mientras que las BAL obligatoriamente heterofermentativas poseen fosfocetolasa, pero no FDP aldolasa (Holzapfel, 2014).

Algunas especies heterofermentativas obligadas son *Lb. parakefiri*, *Lb. kéfiri*, *Lb. hilgardii* y *Lb. malefermentans* (Buron-Moles, 2019).

Un ejemplo de BAL de este grupo es *Fructobacillus spp*, microorganismo capaz de metabolizar glucosa a cantidades casi equimolares de ácido láctico y ácido acético y muy poco etanol (Endo et al., 2009). Es probable que este metabolismo se lleve a cabo utilizando la vía de la fosfocetolasa, y grandes cantidades de ácido acético deben formarse a partir del acetil fosfato en lugar de etanol. Sin embargo, curiosamente, *Fructobacillus spp*. carecen de la capacidad de metabolizar pentosas. Esto puede deberse a la ausencia de pentosa cinasa, epimerasas o isomerasas. Aunque *Fructobacillus spp*. carecen de las enzimas importantes para el metabolismo de la pentosa, deben clasificarse como obligatoriamente heterofermentativas debido a su metabolismo de glucosa (Holzapfel, 2014).

La tercera categoría incluye a las BAL restantes, el grupo II de *Lactobacillus* (*Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*) y muchas especies de enterococos, lactococos,

pediococos, estreptococos, tetragenococos y vagococos, quienes permanecen en una posición intermedia. Estos se parecen a las BAL homofermentativas obligadas en que poseen una fructosa difosfato aldolasa constitutiva, lo cual resulta en el uso de la glicólisis para la fermentación de hexosas. Pero en este grupo, la presencia de pentosas induce la síntesis de la enzima fosfocetolasa, resultando en una fermentación heteroláctica. Estas BAL son así: homofermentativas con respecto a las hexosas y heterofermentativas con respecto a las pentosas y algunos otros sustratos; deberían, por lo tanto, ser consideradas como heterofermentativas facultativas (Lahtinen, 2012).

Las especies de BAL heterofermentativas facultativas degradan las hexosas a ácido láctico a través de la vía EMP y también pueden metabolizar pentosas y, a menudo, gluconato, ya que poseen las enzimas aldolasa y fosfocetolasa (Buron-Moles, 2019).

La fermentación de vegetales y cereales se encuentran asociados con BAL heterolácticas, algunos ejemplos son el vino, sidra, papillas de cereales, masa madre, chucrut o kimchi (Gänzle, 2015).

Algunos ejemplos de BAL heterofermentativos facultativos son *Lactobacillus alimentarius* encontrado en productos de pescado marinados, *Lactobacillus plantarum* ssp. *plantarum* presente en col en vinagre, *Lactobacillus casei* presente en queso, *Lactobacillus curvatus* aislado de la leche, *Lactobacillus coryniformis* ssp. *coryniformes* presente en ensilajes (Buron-Moles, 2019).

La posición de especies de algunos géneros como *Carnobacterium* es algo incierta. Estas bacterias fueron clasificadas primero como heterofermentativas, debido a la producción de gas y ácido acético en cantidades significativas, pero debido a que *Carnobacterium* generalmente fermenta la ribosa y el gluconato, debería probablemente considerarse como heterofermentativo facultativo (Lahtinen, 2012).

Los miembros de *Carnobacteriaceae* probablemente metabolizan la glucosa en piruvato usando la glucólisis, con piruvato metabolizado a ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético y etanol con o sin CO₂ (Holzapfel, 2014).

En la siguiente tabla, se muestran algunas características del metabolismo homoláctico y heteroláctico.

Tabla 4. Comparación de propiedades metabólicas del metabolismo homoláctico y heteroláctico.		
	Metabolismo homoláctico	Metabolismo heteroláctico
Metabolismo de glucosa	Vía Emden–Meyerhoff-Parnas / glucolisis	Vía fosfocetolasa / vía de las pentosas fosfato
Metabolismo de galactosa	Vía de tagatosa y/o Leloir	Vía de Leloir
Metabolismo de la fructosa	Vía Emden–Meyerhoff-Parnas	Manitol- deshidrogenosa, vía fosfocetolasa
Metabolismo de las pentosas	Vía fosfocetolasa o vía pentosas fosfato	Vía fosfocetolasa, metabolismo simultaneo de hexosas y pentosas
Sustrato preferido	Glucosa	Lactato, acetato
Productos alternativos de piruvato	Formiato, etanol y acetato; lactato o acetoína	Lactato, acetato
Productos finales alternativos de acetilfosfato	Acetato	Etanol o acetato
Productos del metabolismo del lactato	Acetato o acetoína	1,2-propanodiol y acetato
Fuente: Gänzle, 2015.		

Destinos del piruvato

El destino del piruvato es el punto de ramificación clave del metabolismo homoláctico de las hexosas, el cual depende de la disponibilidad de oxígeno y sustratos (Gänzle, 2015).

El piruvato es un intermediario de la mayoría de las vías de fermentación de los azúcares y es generalmente reducido a ácido láctico. Sin embargo, los aceptores externos de electrones y/ o la limitación de los carbohidratos tienen impactos en el metabolismo del piruvato, resultando en la producción de otros componentes químicos. La vía del diacetilo- acetoína, la vía del piruvato formiato liasa, la vía del piruvato deshidrogenasa y la vía de la piruvato oxidasa son las principales vías de utilización de este compuesto (Holzapfel, 2014).

Vía del diacetilo / acetoína

El diacetilo es el compuesto causante del aroma a mantequilla, por lo que es de gran significancia tecnológica en los lácteos fermentados. Se forma a partir del piruvato producido a lo largo de la fermentación láctica, pero se puede reducir rápidamente a acetoína y 2, 3 butanodiol, reacciones reversibles que son comunes entre las BAL. La producción de diacetilo a partir de piruvato sólo se produce en un grado significativo si hay un excedente de piruvato en la célula y se conserva en función del potencial redox del ambiente; modificar estas dos variables, es una forma de controlar la cantidad final de diacetilo (Leroy et al., 2004). Un excedente de piruvato puede generarse mediante la adición de:

- a) una fuente de piruvato diferente del carbohidrato fermentado en el medio de crecimiento y
- b) otros aceptores de electrones, ahorrando así el piruvato formado por la fermentación de carbohidratos.

El piruvato es proporcionado por el metabolismo del citrato vía oxaloacetato como un aceptor de electrones adicional, y el metabolismo del citrato mejora bajo condiciones ácidas por el mantenimiento de la homeostasis (Holzapfel, 2014).

El citrato es transportado dentro de la célula por una citrato permeasa y su ruptura es causada por una citrato liasa para producir oxalacetato y acetato. El oxalacetato es descarboxilado a piruvato y CO₂. En general, bajas concentraciones de azúcar y bajo pH favorecen la formación de diacetilo y acetoína. El diacetilo es formado por la descomposición del α - acetolactato, esta reacción es favorecida por la aireación y el pH bajo (Lahtinen, 2012).

Esta vía es importante para BAL empleadas en la industria láctea. *Lactococcus lactis* subs. *Lactis diacetylactis* usa esta vía en la fermentación de la leche para producir diacetilo y acetoína (Holzapfel, 2014).

Por otro lado, la formación de diacetilo en la cerveza constituye un evento de deterioro, mientras que el compuesto es un contribuyente deseado al sabor del vino (Gänzle, 2015).

Contrario al diacetilo, la acetoína no contribuye al aroma en productos lácteos, incluso aunque la acetoína sea producida en mayores cantidades que el diacetilo (Holzapfel, 2014), sin embargo, la formación de acetoína afecta la calidad de los alimentos incluso si es solo un metabolito menor. La oxidación química del α -acetolactato, un intermedio de la formación de acetoína, produce diacetilo, que, como se mencionó anteriormente, afecta el sabor de la cerveza, el vino, el pan y los productos lácteos. La formación de acetoína durante el metabolismo de hexosas o pentosas y citrato se observa en *Leuconostoc mesenteroides* y *Oenococcus* spp. pero no en lactobacilos heterofermentativos (Gänzle, 2015).

El sistema piruvato formiato liasa

Otra rama del metabolismo del piruvato consiste en el sistema piruvato formiato liasa. La enzima piruvato formiato liasa cataliza la reacción de piruvato y CoA a formiato y acetil CoA. La acetil CoA puede ser utilizada como un aceptor de electrones, resultando en la formación de etanol, como un precursor para la fosforilación a nivel de sustrato vía acetil fosfato, produciendo como producto final acetato, o ambas (Lahtinen, 2012).

La piruvato formiato liasa es inhibida por un abundante suministro de sustrato y por un pH bajo, y es inactivada por el oxígeno. En *Lc. Lactis*, los azúcares que son importados por los sistemas PTS (sistema fosfotransferasa, por sus siglas en ingles), favorecen la conversión de piruvato en lactato, mientras que los azúcares no PTS favorecen el metabolismo a través de piruvato formiato liasa (Gänzle, 2015).

El sistema piruvato formiato liasa es encontrado únicamente en BAL homofermentativas obligadas y en BAL heterofermentativas facultativas que usan la vía bajo condiciones anaeróbicas y bajo limitación de sustratos. Debido a la baja actividad de la lactato deshidrogenasa bajo estas condiciones, el piruvato es convertido a formiato mediante la formiato piruvato liasa (Holzapfel, 2014).

Carnobacterium spp., que desarrolla en productos como carnes al vacío y pescados envasados, metaboliza preferentemente las hexosas vía piruvato formiato liasa (Gänzle, 2015).

Vía de la piruvato oxidasa

El oxígeno tiene un profundo efecto en el destino del piruvato en las BAL. Este efecto puede ser directo, mediado por la enzima piruvato oxidasa, o indirecto, a través de las reacciones del oxígeno con enzimas como la NADH: H₂O₂ oxidasa y NADH: H₂O oxidasa. La piruvato oxidasa convierte el piruvato a CO₂ y acetil fosfato con la formación de H₂O₂ (Lahtinen, 2012). El acetil fosfato producido, es convertido a su vez en acetato mediante una acetato cinasa (Gänzle, 2015).

La piruvato oxidasa de *Lactobacillus plantarum* ha sido bien caracterizada. Esta especie usa esta vía bajo condiciones de limitación de sustrato. Esto podría ser debido a otros rendimientos del ATP en la vía (Holzapfel, 2014).

El acetato y la acetoína son productos menores de la mayoría de los organismos en condiciones aeróbicas; sin embargo, el lactato puede convertirse en acetato durante la fase estacionaria de crecimiento. *Tetragenococcus halophilus* produce acetato como producto principal en condiciones aeróbicas (Gänzle, 2015).

Vía de la piruvato deshidrogenasa

Diversas BAL heterofermentativas usan esta vía cuando son cultivadas bajo condiciones aeróbicas, la cual resulta en la formación de acetato y CO₂ (Holzapfel, 2014).

La piruvato deshidrogenasa puede jugar un rol similar al sistema de piruvato formiato liasa en el catabolismo, pero principalmente bajo condiciones aeróbicas. Cultivos aireados de células de *L. lactis* pueden llevar a cabo una fermentación homoacética bajo limitación de sustrato. En este caso, todo el piruvato formado es canalizado a través del complejo piruvato deshidrogenasa, generando ácido acético (y

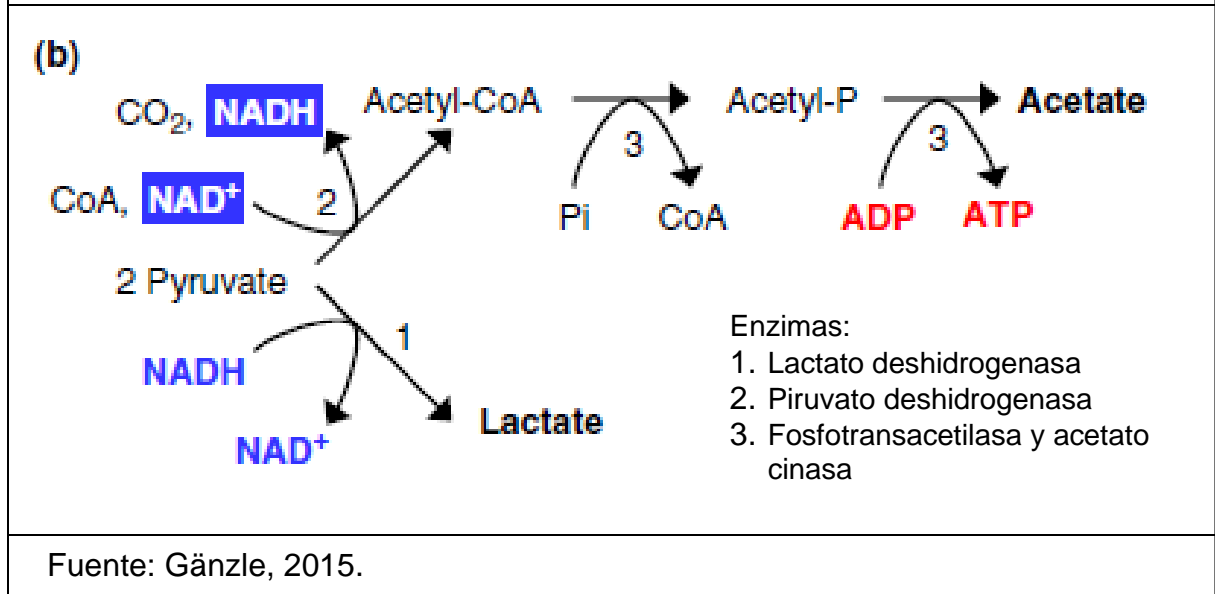
presumiblemente CO₂) como producto final. Un prerrequisito para que este metabolismo pueda ocurrir es que el NADH formado durante la glicólisis y la reacción de la piruvato deshidrogenasa pueda ser reoxidado por NADH oxidasas (Lahtinen, 2012).

En *L. lactis*, se ha visto que tanto la enzima piruvato formiato liasa (PFL) y el complejo de piruvato deshidrogenasa (PDH) pueden ser activos, donde la PFL solo es activa en ausencia de oxígeno y la PDH es bastante sensible a la relación NADH / NAD⁺ (Liu, 2019).

Oenococcus oeni y *Leuconostoc mesenteroides* convierten las hexosas por fermentación heteroláctica en lactato, etanol y CO₂. La formación de etanol a partir de acetilfosfato (o acetil CoA) es necesaria para la reoxidación de NAD(P)⁺ H, que se produce en la vía de las pentosas fosfato durante la oxidación de la hexosa, sin embargo, cuando el acetil CoA es limitante, la baja capacidad de reoxidación de NAD(P)⁺ H por la vía del etanol limita el metabolismo y la tasa de crecimiento, por esta razón se emplean vías alternativas para la reoxidación. Las bacterias pueden emplear aceptores de electrones externos para la reoxidación, estas dos BAL pueden emplear fructosa, O₂ y piruvato como aceptores de electrones. Wagner y colaboradores, (2005) determinaron que, cuando se suministra piruvato en exceso como aceptor de electrones, el piruvato no solo cumple esta función, si no que el crecimiento de *O. oeni* y *L. mesenteroides* se da por la fermentación directa de piruvato, el cual se convierte en lactato, acetato y CO₂. Una molécula de piruvato se descarboxila a acetil CoA, lo que permite la generación de ATP por la acetato cinasa. La enzima clave de la vía es la piruvato deshidrogenasa (PDH), la función de esta enzima en la fermentación de piruvato presumiblemente representa un “mal uso” o una adaptación de una vía que normalmente no está destinada a la PDH.

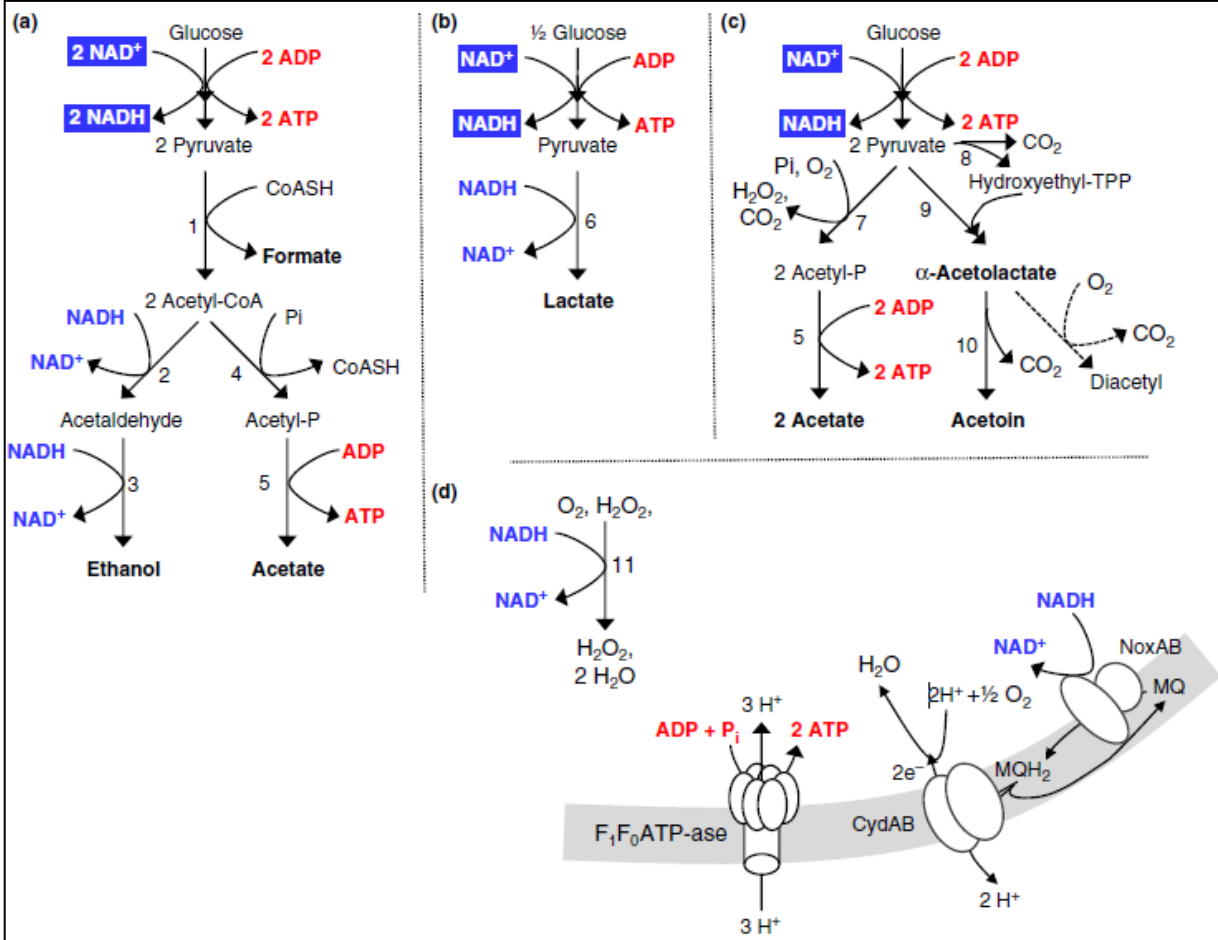
En la figura 7 se representa el metabolismo del piruvato en *Leuconostoc* spp. y *Oenococcus oeni*. Note los nombres de las enzimas participantes en la parte inferior derecha de la imagen.

Figura 7. Metabolismo del piruvato por *Oenococcus oeni* y *Leuconostoc* spp



En la figura 8, se indican las rutas metabólicas de los destinos alternativos del piruvato en las BAL, a) metabolismo por piruvato formiato liasa, b) metabolismo por lactato deshidrogenasa, c) metabolismo por piruvato oxidasa y formación de diacetilo y acetoína, d) oxidación de cofactores reducidos en condiciones aeróbicas y en condiciones aeróbicas que favorecen la respiración. Los principales productos finales están marcados en negrita. La formación de cofactores reducidos y oxidados se indica como fuente blanca sobre fondo azul o como fuente azul, respectivamente. La síntesis de ATP en fuente roja. Las flechas discontinuas indican conversiones químicas.

Figura 8. Destinos alternativos del piruvato



Vías metabólicas

- a) metabolismo por piruvato formiato liasa,
- b) metabolismo por lactato deshidrogenasa,
- c) metabolismo por piruvato oxidasa y formación de diacetilo y acetoína,
- d) oxidación de cofactores reducidos en condiciones aeróbicas y en condiciones aeróbicas que favorecen la respiración.

Enzimas participantes:

- | | |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| 1. piruvato formiato liasa; | 2. acetaldehído deshidrogenasa; |
| 3. alcohol deshidrogenasa; | 4. fosfotransacetilasa; |
| 5. acetato cinasa; | 6. lactato deshidrogenasa; |
| 7. piruvato oxidasa; | 8. piruvato deshidrogenasa; |
| 9. acetolactato sintasa; | 10. acetolactato descarboxilasa, |
| 11. NADH oxidasa o NADH peroxidasa. | |

Fuente: Gänzle, 2015

Metabolismo del malato, citrato, arginina y lactato.

La fermentación de ácidos orgánicos juega un papel importante en el metabolismo energético de diversas BAL heterofermentativas.

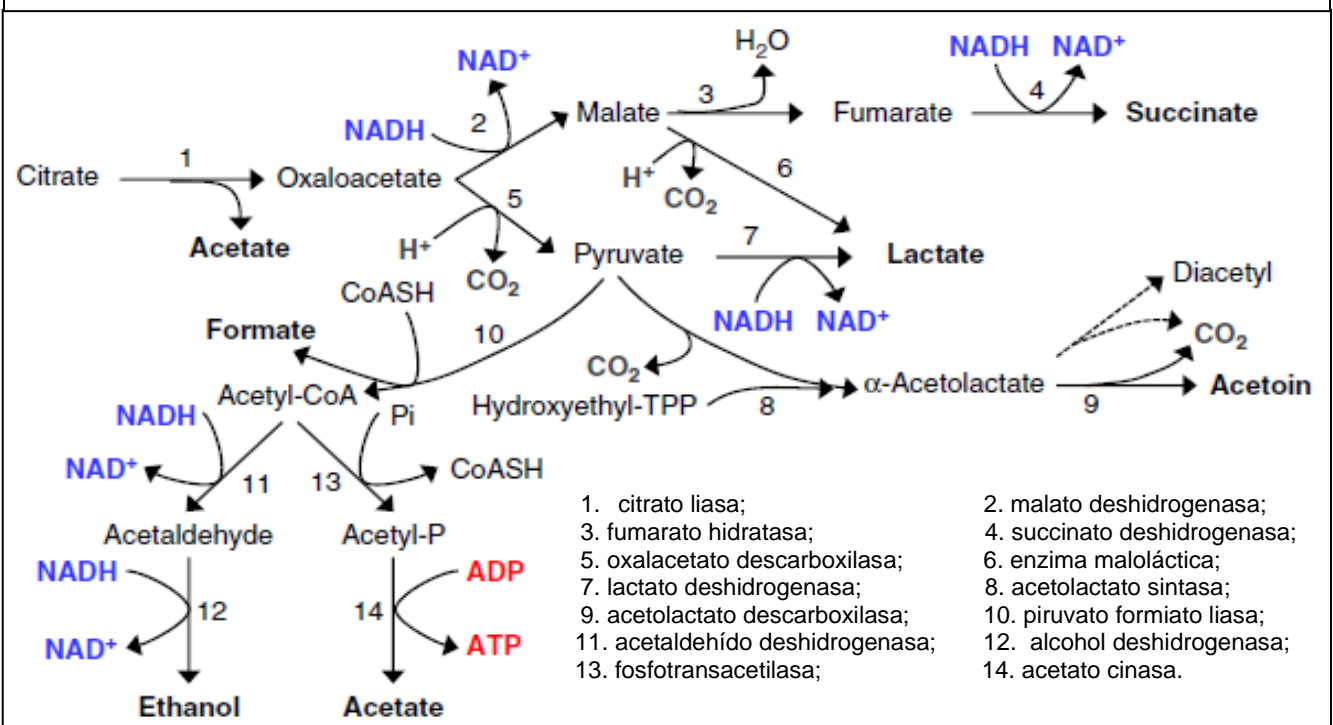
El metabolismo del malato es importante durante la fermentación secundaria de productos como el vino. Muchas BAL del vino usan esta fermentación para producir L-lactato y CO₂ como productos finales. La fermentación, conocida como fermentación maloláctica, contribuye a la acidificación del vino. Únicamente L- malato, pero no D- malato, es convertido a L- lactato. *Oenococcus oeni* y algunas BAL, como *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus casei* pueden usar L- lactato como única fuente de energía (Holzapfel, 2014).

La fermentación maloláctica de *O. oeni* no solo afecta el nivel de acidez y, por tanto, el sabor ácido del vino, en particular de los vinos blancos, sino que también modifica la concentración de compuestos volátiles relacionados con el sabor a través del metabolismo de los carbohidratos y los citratos (Gänzle, 2015), sin embargo, las BAL también pueden producir compuestos de aroma y sabor indeseables, como fenoles volátiles o aminas biogénicas, ambos relacionados con la pérdida de calidad y problemas de salud para los seres humanos. Este problema podría resolverse con una selección de cepas bacterianas, según el tipo de vino y sus propiedades organolépticas, que se modularían en función del perfil sensorial buscado y preferencias de los consumidores. Además, el uso de cepas seleccionadas permite un mejor control del período de tiempo de degradación del ácido L-málico (Izquierdo, 2020).

El citrato es usualmente empleado como aceptor de electrones durante el co-metabolismo con otros azúcares. Sin embargo, este no es usado como un aceptor de electrones directo, sino como un precursor para un aceptor de electrones. El oxaloacetato, producto de la ruptura del citrato, es descarboxilado a piruvato, y el piruvato es usado como un aceptor de electrones. A través de esta vía los componentes causantes del aroma tales como el diacetilo, la acetoína y el ácido acético son formados (Holzapfel, 2014).

Las BAL producen succinato, lactato, acetato y etanol o acetoína como productos finales alternativos del citrato. El citrato se convierte en succinato para lograr la regeneración de dos cofactores reducidos, o en acetoína para lograr el consumo de protones mediante dos reacciones de descarboxilación. La conversión de citrato en lactato o acetato y etanol combina la oxidación de un mol de NADH y una reacción de descarboxilación. Los lactobacilos convierten el citrato en succinato o lactato combinando así una descarboxilación que consume protones con la regeneración de NADH reducido. *T. halophilus* convierte el citrato a través de piruvato formiato liasa en acetato y etanol, mientras que el citrato se convierte en los productos finales alternativos acetoína y lactato por *Lc. Lactis*, *Leuconostoc spp.* y *O. oeni*. La conversión de citrato en acetoína se produce a través de dos reacciones de descarboxilación (Gänzle, 2015).

Figura 9. Destino metabólico de citrato y malato en BAL heterofermentativas



Fuente: (Gänzle, 2015).

La figura 9 muestra los diferentes destinos alternativos del citrato y malato en BAL heterofermentativas, los cuales contribuyen con la homeostasis del pH o la regeneración de cofactores. Los principales productos finales del metabolismo están indicados en negrita. La formación de cofactores oxidados se indica como fuente azul, las reacciones de descarboxilación que consumen protones se indican en gris. Las enzimas se indican mediante números.

El metabolismo de los carbohidratos por las BAL en las fermentaciones de alimentos suele estar limitado por la acidificación y el pH bajo, este último cambia el metabolismo láctico de la fermentación de hexosa a la utilización de aminoácidos. La glutamina, el glutamato y la arginina desempeñan un papel importante en la homeostasis del pH y la sobrevivencia en la fase estacionaria de las BAL (Gänzle, 2015).

Metabolismo de aminoácidos por BAL

El metabolismo de la arginina es llevado mediante la vía de la deiminasa, la cual incluye la deiminasa arginina, la transcarbamilasa y la carbamato cinasa. Una molécula de ornitina, CO₂ y ATP y dos moléculas de NH₃ son producidas por molécula de arginina consumida (Holzapfel, 2014), generando así energía metabólica por fosforilación a nivel de sustrato y un aumento en el pH intracelular y extracelular (Gänzle, 2015).

El metabolismo ha sido encontrado en varias cepas de BAL heterofermentativas obligadas y algunas BAL heterofermentativas facultativas. Este es también importante para la sobrevivencia de las BAL bajo condiciones de estrés, debido a que la producción de NH₃ incrementa el pH (Holzapfel, 2014).

Los mecanismos de resistencia a los ácidos en *L. reuteri* emplean los sustratos urea, glutamato / glutamina y arginina. La urea está disponible en los ambientes gástricos de los mamíferos, pero está ausente en las fermentaciones de alimentos; mientras que la arginina y la glutamina se liberan por proteólisis de los alimentos. De acuerdo con un estudio realizado por Teixeira y colaboradores (2014), se confirmó la alcalinización citoplasmática como resultado de la conversión de arginina en *L. reuteri*.

Por tanto, la conversión de arginina proporciona protección predominantemente a niveles moderados de acidez.

El alto catabolismo de la arginina durante la fermentación del kimchi sugiere la importancia de este aminoácido en el proceso de fermentación. Para comparar la población de BAL y el catabolismo de la arginina en el kimchi, Hwang y Lee (2018), cuantificaron los contenidos de arginina, citrulina y ornitina en muestras comerciales de kimchi obtenidas del mercado, en las cuales se cultivaron algunas BAL y se correlacionó el contenido de arginina con el crecimiento de estas. Se empleó como BAL *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc lactis*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Weissella confusa*. Del estudio determinaron que la concentración total de arginina fue menor que la concentración informada. El contenido de arginina inicial en el kimchi era de 50-60 µg / mL y disminuyó a 1-2 µg / mL durante el transcurso de la fermentación; la pequeña cantidad de arginina en el kimchi detectada en el estudio puede reflejar el consumo de este aminoácido, una posibilidad respaldada por la observación de mayores contenidos de ornitina, recordando que este es un producto del metabolismo de la arginina.

La conversión de arginina por las BAL en los alimentos constituye un deterioro o bien contribuye al sabor; la citrulina, un intermedio de la vía de la arginina desaminasa es un precursor de la formación de carbamato de etilo, tóxico en el vino y las bebidas, mientras que, en los productos horneados, la conversión de arginina por las BAL proporciona ornitina como precursor del compuesto 2-acetil-1-pirrolina, importante contribuyente al olor de la corteza en el pan (Gänzle, 2015).

El lactato es el principal producto del metabolismo cuando los carbohidratos fermentables son abundantes (Gänzle, 2015).

El metabolismo del lactato es inusual en las BAL. Sin embargo, algunas especies metabolizan el ácido láctico a ácido acético, etanol, CO₂, y H₂ cuando son cultivadas a un pH neutral (mayor a 4.0) bajo condiciones de limitación de sustrato. Algunas cepas de *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus parabuchneri* pueden también fermentar ácido láctico a ácido acético, 1,2- propanodiol y cantidades traza de etanol

bajo condiciones anaeróbicas, sin requerir un aceptor de electrones externo (Holzapfel, 2014).

Un fenómeno único que se observa con frecuencia en la respiración de *L. lactis* es que el lactato acumulado se puede consumir cuando la glucosa se vuelve limitada, en conjunto con la acumulación de productos alternativos del metabolismo del piruvato (como acetato, diacetilo y acetoína) y un aumento del pH. Esto sugiere que el lactato se oxida a piruvato por una enzima durante dicho proceso. La enzima l- lactato deshidrogenasa dependiente de NAD (l-nLDH) juega un papel importante en la fermentación al producir lactato a partir del piruvato mientras regeneran el NAD. Por otro lado, la enzima l- lactato deshidrogenasa independiente de NAD (l-iLDH) incluyen dos miembros de la α -hidroxiácido deshidrogenasa, la lactato oxidasa y flavocitocromo, un complejo enzimático de hierro-azufre sin flavina y un grupo de flavina y hierro-azufre que contiene oxidorreductasa. Generalmente, el l-lactato se oxida por las l-iLDH, en algunos casos se puede encontrar más de una l-iLDH en organismos que utilizan l-lactato, aunque algunos pueden ser inactivos en la utilización de este (Zhao, 2013).

La degradación anaeróbica del lactato se describió en las fermentaciones de ensilaje y masa madre, así como un evento de deterioro en los encurtidos, ya que el consumo de lactato y el metabolismo de los dióles resultan en un aumento del pH y comprometen la estabilidad higiénica del producto (Gänzle, 2015).

Proteólisis y lipólisis.

Las tres vías principales que participan en el desarrollo del sabor en los productos alimenticios fermentados son la glucólisis (fermentación de azúcares), la lipólisis (degradación de grasas) y la proteólisis (degradación de proteínas). La contribución de las BAL en la lipólisis es relativamente pequeña, pero la proteólisis es la vía bioquímica clave para el desarrollo del sabor en los alimentos fermentados (Bintsis, 2018).

La proteólisis es la hidrólisis de enlaces peptídicos en proteínas para generar péptidos y aminoácidos libres. La formación de aminoácidos libres y su posterior participación en las reacciones de descarboxilación, desaminación, transaminación y desulfuración juegan un papel crucial en la determinación del sabor de los alimentos (García, 2019).

Las BAL son microorganismos exigentes y no pueden sintetizar muchos aminoácidos, vitaminas y bases de ácidos nucleicos. Dado que los aminoácidos libres en la leche son limitados y están presentes como componentes proteicos, el crecimiento de las BAL requiere la hidrólisis de las proteínas de la leche (Bintsis, 2018). Como muchos cultivos lácticos iniciadores, las BAL son altamente proteolíticas, por lo cual pueden generar péptidos bioactivos, además, las enzimas proteolíticas aisladas de las BAL también se han utilizado con éxito para liberar péptidos bioactivos de las proteínas de la leche (Atanasova, 2014).

La proteólisis es una de las reacciones enzimáticas más importantes y complejas que ocurren en los productos lácteos. Las BAL poseen un sistema de proteinasa / peptidasa muy complejo que consta de tres componentes: proteasas unidas a la pared celular que inician la degradación de la caseína en oligopéptidos, transportadores de péptidos y peptidasas intracelulares que degradan los péptidos en péptidos más cortos y aminoácidos libres. Los componentes del sistema proteolítico de las BAL se han estudiado mediante análisis del genoma; sin embargo, la complejidad de este sistema dificulta la purificación e identificación de muchas proteínas involucradas (García, 2019).

A continuación, se enlistan algunos estudios realizados que han comprobado la actividad proteolítica de BAL en alimentos, Kliche y colaboradores (2017), llevaron a cabo fermentaciones de leche desnatada con cepas de lactobacilos seleccionados, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* para la generación de péptidos bioactivos, determinando que las tres cepas degradaron α y β -caseína; mientras que en el estudio realizado por García y colaboradores (2019), analizaron 137 cepas de BAL aisladas de productos lácteos (incluida la leche cruda, leche en polvo, suero de leche en polvo, yogur, queso y crema) para detectar actividades tanto lipolíticas como proteolíticas, determinando que 84 de las 137 cepas aisladas presentaron actividad proteolítica, lo que corresponde al 61,3% del total de aislamientos.

Como se ha mencionado antes, las BAL pueden encontrarse en productos cárnicos (Durán 2012; Stella, 2013; Kang, 2016), aunque tienen una acción proteolítica débil sobre las proteínas miofibrilares en productos cárnicos fermentados. Sin embargo, algunas especies como *Lb. casei*, *Lb. plantarum* y *Lb. curvatus* contribuyen activamente a la hidrólisis de las proteínas sarcoplásmicas y a la posterior descomposición de péptidos en aminoácidos (Bintsis, 2018).

Diversos tipos de genes de proteinasas son clonados de BAL lácteas, incluidos *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subs. *Bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (Holzapfel, 2014).

La lipólisis es la hidrólisis de triglicéridos para producir ácidos grasos libres, glicerol y compuestos intermedios como mono y diglicéridos. Estos compuestos intermedios emulsionan otros componentes alimentarios, ayudando en el desarrollo de la textura del producto final (García, 2019).

En lo que respecta a los ácidos grasos, ciertos ácidos grasos libres son compuestos de sabor esenciales en algunos quesos, por ejemplo, quesos de leche de cabra (Bintsis, 2018), mientras que algunos otros pueden ser transformados por microorganismos a otros compuestos de sabor, a menudo más potentes, que incluyen

metil cetonas, lactonas, ésteres, alcoholes secundarios y aldehídos, afectando directamente el sabor de diferentes productos como el queso (Abeijón, 2009).

En diversas BAL, incluyendo *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum* y *Lb. rhamnosus*, se ha reportado la actividad lipolítica. La lipólisis en el queso usualmente ocurre vía el sistema estereasa/ lipasa de las BAL, bacterias ácido-propiónicas, mohos y levaduras (Holzapfel, 2014).

El papel de las estererasas de las BAL en la lipólisis y en la transformación de ácidos grasos libres en otros compuestos de sabor en los productos lácteos es en gran parte indefinido. Presumiblemente las estererasas son responsables de la liberación de ácidos grasos de cadena corta de la grasa de la leche a una actividad de agua elevada y la síntesis de ésteres etílicos de cadena corta cuando la actividad de agua disminuye con la maduración (Abeijón, 2009), adicional, se ha detectado que los ésteres contribuyen al sabor característico del queso suizo y el queso blanco en salmuera (Bintsis, 2018).

El grado de lipólisis desarrollado por las BAL ayuda a la selección de las cepas utilizadas como cultivos iniciadores. Esta propiedad es extremadamente relevante para la fermentación de vegetales, aplicaciones en alimentos horneados y desarrollo del sabor en productos lácteos fermentados. En general, se considera que las BAL son débilmente lipolíticas en relación con las especies de los géneros *Penicillium* y *Pseudomonas*, sin embargo, en productos como los quesos con períodos de maduración prolongados, la actividad lipolítica de los BAL contribuye al desarrollo del sabor y sirve como sustratos para reacciones posteriores (García, 2019).

A continuación, se presentan algunos ejemplos de la actividad lipolítica de las BAL en alimentos: Abeijon y colaboradores (2009), demostraron la contribución en la liberación de ácidos grasos libres por parte de las BAL *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* y *Lactobacillus plantarum* Ov 236 durante la maduración de queso de leche de oveja, el aumento de los ácidos grasos libres de cadena corta durante la maduración implicaría así la acción de estererasas ubicadas en la fracción pared-membrana de las cepas iniciadoras, por su parte Dinçer y Kivanç (2017)

demonstraron la capacidad de producción de enzimas lipolíticas por parte de BAL presentes en muestras de pastirma (producto cárnico curado salado tradicional de Turquía), determinando que 25 cepas presentaban actividad lipolítica, siendo *Lactobacillus plantarum* quien presentaba la mayor actividad, del estudio realizado por García y colaboradores (2019), mencionado anteriormente, se determinó que siete cepas, *L. casei*, dos cepas de *L. paracasei*, dos cepas de *L. plantarum* y dos cepas de *P. acidilactici*, mostraron una alta actividad lipolítica y proteolítica, demostrando que la lipólisis fue mayor en las cepas aisladas en comparación con el control positivo (*L. lactis*).

Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas

Las BAL con frecuencia se comportan como inhibidoras de otros microorganismos y este comportamiento es la base de su capacidad para mejorar la calidad de conservación y la inocuidad de muchos productos alimenticios. Los factores más importantes de esta capacidad inhibidora son la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores como el peróxido de hidrógeno (Mokoena, 2017).

En la tabla 5, se enlistan los principales compuestos derivados de la actividad metabólica de las BAL y su espectro antimicrobiano.

Tabla 5. Compuestos derivados de la actividad metabólica de las BAL y su acción inhibidora			
Compuesto	Microorganismo productor	Vía metabólica	Espectro antimicrobiano
Ácido láctico	Todas las BAL	Metabolismo central	Levaduras, Gram ±
Ácido acético	BAL heterofermentativas	Metabolismo central	Levaduras, Gram ±
Ácido benzoico	<i>L. plantarum</i>	Metabolismo secundario, bioconversión	Mohos, Gram -
Ácido propiónico	<i>L. buchneri</i> , <i>L. diolivorans</i>	Metabolismo central	Mohos
Peróxido de hidrogeno	Todas las BAL	Metabolismo central	Levaduras, Gram ±

Continuación. Tabla 5. Compuestos derivados de la actividad metabólica de las BAL y su acción inhibitoria.			
Compuesto	Microorganismo productor	Vía metabólica	Espectro antimicrobiano
Dióxido de carbono	BAL heterofermentativas	Metabolismo central	Crea anaerobiosis. Tiene actividad antimicrobiana que previene el crecimiento de hongos en la fermentación de vegetales (Muhialdin, 2011)
Etanol	BAL heterofermentativas	Metabolismo central	
Diacetilo, acetoína	<i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Pediococcus</i>	Metabolismo central	Levaduras, Gram ±
Fuente: Siedler, 2019.			

Los mecanismos detrás de la inhibición de algunos compuestos individuales abarcan desde la desestabilización de la membrana, la interferencia del gradiente de protones, la inhibición enzimática, hasta la creación de especies reactivas de oxígeno, sin embargo, la contribución individual en la inhibición es difícil de cuantificar, ya que los niveles de los compuestos antimicrobianos producidos por las BAL suelen estar considerablemente por debajo de las concentraciones que ejercen efectos inhibitorios cuando se analizan individualmente en el laboratorio. Esto sugiere que los compuestos pueden contribuir a la inhibición general al tener un efecto sinérgico o aditivo. De hecho, a veces sólo determinadas combinaciones de compuestos, que actúan de forma sinérgica, muestran un efecto inhibitorio (Siedler, 2019).

Dentro de los compuestos que proporcionan actividad antimicrobiana destacan además las bacteriocinas, las cuales son péptidos o proteínas bacterianas que generalmente son activas frente a especies emparentadas íntimamente con el organismo que las produce, en este caso, principalmente bacterias Gram positivas que les permite ganar ventaja sobre algunos microorganismos al competir por nutrientes en el ambiente, y son metabolizados como productos primarios (Mokoena, 2017).

Las bacteriocinas de las BAL tienen aplicaciones biotecnológicas potenciales porque son fáciles de producir, no son tóxicas para los humanos, son estables a valores de pH bajos y sensibles a las proteasas. Muchas bacteriocinas son termoestables y conservan su actividad después de varios meses de almacenamiento en condiciones de congelación o refrigeración y después del secado. Las pediocinas producidas por BAL tienen actividad bactericida contra bacterias grampositivas y también son candidatas adecuadas para su uso como bioconservantes de alimentos (Yang, 2018).

La capacidad inhibidora de las BAL contribuye a disminuir la presencia de bacterias patógenas en los alimentos como demuestran diversos estudios; por ejemplo, Ali y colaboradores (2016) probaron la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas producidas por las BAL contra dos bacterias patógenas presentes en alimentos *E. coli* y *S. aureus*, el estudio realizado por Mirzaei y colaboradores (2018) demostró que las bacterias ácido-lácticas aisladas del yogurt tradicional y la leche tienen propiedades antimicrobianas contra cepas de *Shigella*, mientras que el estudio de Kalkan y colaboradores (2017) demostró el efecto de inhibición que tienen algunas bacterias ácido lácticas (*L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. rhamnosus*) sobre el desarrollo de algunas bacterias patógenas importantes transmitidas por los alimentos como son *E. coli*, *E. coli* O157: H7 ATCC 35150, *Bacillus cereus*, *S. aureus* ATCC 25923 y *Salmonella enteritidis*.

Además del efecto que tienen las BAL sobre bacterias patógenas, también se ha demostrado que tienen efectos sobre otros microorganismos como son los mohos, el estudio realizado por Demirbas y colaboradores (2017) demostró que algunas cepas de BAL (*L. paraplantarum* y *L. paralimentarius*) aisladas de la masa madre tienen efectos antifúngicos importantes sobre *Aspergillus niger* y *Penicillium chrysogenum*, mientras que Russo y colaboradores (2017), determinaron en su estudio que *L. plantarum* inhibió completamente el crecimiento de *Fusarium culmorum* en muestras de pan contaminadas de manera controlada, después de una semana de almacenamiento, moduló el crecimiento de moho en muestras contaminadas con *Aspergillus flavus*,

Penicillium chrysogenum y *Penicillium expansum*, indicando así el potencial de *L. plantarum* como agente de control biológico en la producción de pan.

Asimismo, se ha demostrado que algunos géneros de BAL se unen a carbohidratos específicos de enterobacterias e inhiben su adhesión mediante agentes antimicrobianos y la producción de sustancias de bajo peso molecular, produciendo efectos tóxicos sobre otras bacterias, al adherirse a receptores de sus superficies (Fernández, 2014).

En la tabla 6, se resumen los ejemplos anteriormente mencionados sobre la capacidad inhibidora de las BAL contra microorganismos tanto patógenos como de descomposición.

Tabla 6. Capacidad inhibidora de las BAL contra microorganismos patógenos y de descomposición.			
Bacteria ácido láctica	Efecto inhibidor	Microorganismo inhibido	Referencia
<i>Lactobacillus curvatus</i>, <i>Lactobacillus graminis</i>	Generación de bacteriocinas	<i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	Ali y colaboradores, 2016.
<i>Lb. paracasei</i> Y1-3, <i>Lb. paracasei</i> Y8-1 y <i>Lb. fermentum</i> Y2-2, BAL aisladas de yogur; <i>Lb. paracasei</i> M18-1, <i>Lb. parelimentarius</i> M4-3 y <i>Lb. plantarum</i> M19-1 BAL aisladas de leche.	Producción de ácidos orgánicos y H ₂ O ₂ . Algunos <i>Lactobacillus</i> spp. también producen bacteriocinas	Diversas cepas de <i>Shigella</i> (ocho <i>S. flexneri</i> , cuatro <i>S. sonnei</i>)	Mirzaei y colaboradores, 2018.
<i>L. acidophilus</i>, <i>L. casei shirota</i>, <i>L. rhamnosus</i>	Producción de metabolitos activos antimicrobianos como ácidos orgánicos, H ₂ O ₂ , y también otros compuestos, como péptidos antifúngicos	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> O157: H7, <i>S. aureus</i> .	Kalkan y colaboradores, 2017.
<i>Lactobacillus curvatus</i>, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>, <i>L. casei</i>, <i>L. pentosus</i> y <i>L. sakei</i>	Efecto sobre el crecimiento micelial y la biomasa fúngica, así como producción de compuestos tóxicos	<i>A. flavus</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Penicillium commune</i> y <i>Rhizopus oryzae</i>	Kim, 2005

Continuación. Tabla 6. Capacidad inhibidora de las BAL contra microorganismos patógenos y de descomposición.

Bacteria ácido láctica	Efecto inhibidor	Microorganismo inhibido	Referencia
<i>L. paraplantarum</i> y <i>L. paralimentarius</i>	Producción de componentes antibacterianos y antifúngicos	<i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i>	Demirbas y colaboradores, 2017
<i>L. plantarum</i>	Producción de metabolitos secundarios como ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, CO ₂ , etanol, H ₂ O ₂ , ácidos grasos, acetoína, diacetilo y dipéptidos cíclicos.	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> y <i>Penicillium expansum</i>	Russo y colaboradores, 2017

Características de las matrices alimentarias a analizar

Hummus

Muchos alimentos tradicionales del Medio Oriente se basan en legumbres de las cuales el *fuol* o *Medamis*, el *falafel* y el *hoummos* o hummus, son los más populares. Estos alimentos se consideran fuentes relativamente baratas de proteínas. El hummus está ganando bastante aceptación internacional ya que es muy popular como aperitivo (Yamani, 2011).

Se prepara normalmente con los siguientes ingredientes: garbanzos (*Cicer arietinum* L.), tahini, que es una grasa líquida y viscosa obtenida por molienda de semillas de sésamo tostadas y descascarilladas, zumo de limón o ácido cítrico, ajo y sal (Yamani, 1994).

El hummus se considera como una salsa para untar que se prepara con puré de garbanzos y otros ingredientes como tahini, aceite de oliva, jugo de limón y ajo. El hummus disponible comercialmente también proporciona fibra dietética, ácido fólico, minerales como calcio, magnesio, fósforo y potasio, así como aceites insaturados (Alvarez, 2017).

La preparación tradicional del hummus se lleva a cabo de la siguiente manera: los garbanzos se remojan durante la noche, luego se hierven con bicarbonato de sodio hasta que estén blandos, después se mezclan con el tahini y los otros ingredientes para obtener la mezcla base del hummus (Yamani, 1994). En la actualidad a esta mezcla base se le adicionan otros complementos y sabores para llegar a más consumidores, por lo que la composición del hummus industrial se modifica y adapta continuamente con el propósito de producir un producto más saludable y sabroso (Alvarez, 2017).

La composición media del hummus por 100 g de porción comestible es 49.5 g de agua, 9.6 g proteína y 19.7 g de grasa, y además aporta energía (300 kcal) (Yamani, 1994). Como se mencionó anteriormente, en la actualidad la composición del hummus puede variar, de acuerdo con Álvarez y colaboradores (2017), el hummus comercial contiene 25.3% de grasa y 6.8% de proteína.

De acuerdo con la norma regional para hummus con tahina en conserva, CODEX-STAN- 257R- 2007, algunos factores de calidad para este producto son los siguientes: contenido máximo de sal: 2 % (m/m), contenido mínimo de sólidos totales: 27 % (m/m) y contenido máximo de acidez total: 1 % (m/m), como ácido cítrico. Así mismo permite el uso de los siguientes aditivos alimentarios: ácido cítrico como regulador de la acidez, carbonato sódico como anti aglutinante y carbonato potásico como estabilizador.

Los valores de pH reportados para productos comerciales oscilan en el intervalo de 4.50 a 6.30, dependiendo de los ingredientes agregados, y la actividad del agua es generalmente alta (0.975-0.992) (Pazlopez, 2014).

Estabilidad microbiológica del hummus

En general, del 80 al 90% de las bacterias asociadas con los vegetales son bacilos gram negativos, predominantemente especies de *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Erwinia*, sin embargo, también se han detectado bacterias ácido-lácticas en ensaladas mixtas que se mantienen por encima de 30 ° C (Almualla, 2010).

Se sabe que el hummus como muchos otros alimentos, contiene diferentes tipos de microorganismos, introducidos a partir de materias primas y utensilios empleados

durante su preparación, así como de los trabajadores y del ambiente. El impacto de estos microorganismos se intensifica ya que, con excepción de la ebullición de los garbanzos, ningún tratamiento térmico se utiliza en la preparación del hummus, por lo tanto, la mayoría de los hummus producidos comercialmente sólo pueden ser considerados productos mínimamente procesados. Lo que en realidad ayuda a la estabilidad e inocuidad del hummus, es una “tecnología de barreras” (*hurdle technology*) es decir un proceso en el cual se combinan factores de conservación, de manera que se logra un efecto sinérgico entre ellos (Leistner, 2000). En el hummus específicamente, están actuando el tratamiento térmico de cocción de los garbanzos, con el pH, el almacenamiento en refrigeración y, en algunos casos, conservadores.

Sin embargo, como en muchos otros productos, no siempre se mantiene bajo refrigeración, y en algunas veces, el producto se expone a temperatura ambiente durante varias horas, condiciones que limitan su vida útil (Hagan, 2011), cabría aclarar que este manejo inadecuado del producto podría presentarse principalmente por parte del consumidor final y no precisamente por parte del productor o distribuidor. Por todo ello, el hummus es un producto muy adecuado para el crecimiento de una amplia gama de microorganismos, incluyendo las bacterias ácido-lácticas, tales como *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Leuconostoc*, así como levaduras y enterobacterias. Esto está asociado con las características intrínsecas del hummus incluyendo el pH moderadamente ácido (aproximadamente 5,1), la alta actividad acuosa (por encima de 0,98) y la alta concentración de oligosacáridos (Yamani, 2011).

El hummus en mal estado tiene un fuerte sabor amargo y una textura aguada, características no deseables en este producto (Yamani, 2011).

Si bien se han realizado diversos estudios sobre la calidad microbiológica del hummus (Al-Holy, 2006, Almualla, 2010, Alali, 2012) en pocos de estos se considera el análisis de las BAL. A continuación, se presentan algunos estudios en donde se ha detectado la presencia de BAL en el producto: Yamani y Al-Dababseh (1994) analizaron 60 muestras de hummus de quince restaurantes jordanos diferentes para evaluar la presencia de microorganismos patógenos e indicadores (bacterias mesofílicas aerobias, coliformes y BAL), en el caso de las BAL se detectó una concentración de 1.6×10^8 UFC / g; en un

estudio más reciente realizado por Pazlopez (2014), cuyo objetivo era establecer las mejores condiciones de procesamiento y formulación para garantizar la seguridad y calidad del hummus aplicando diversos obstáculos (se estableció la combinación más efectiva de ácido- antimicrobiano, evaluando el efecto de tres ácidos, ácido cítrico, ácido acético y glucono- delta- lactona o GDL así como el efecto de cuatro conservantes antimicrobianos: natamicina, compuestos amargos de plantas (o *plant bitters* en inglés), sorbato de potasio y benzoato de sodio; una vez establecida la mejor combinación ácido-antimicrobiano esta se probó con tres temperaturas de llenado 76.7 ° C, 82.2 ° C u 87.8 ° C), se detectó la presencia de BAL en muestras de hummus con un pH de 4.6 almacenado a 15 °C durante 3 semanas, tanto en la muestra control como en las muestras adicionadas con las diferentes combinaciones de ácido.

Criterios de selección para el uso de esta matriz.

De acuerdo con la FAO (2016) las legumbres son ricas por su valor nutricional, son alimentos ricos en proteínas (el doble que el trigo y tres veces más que el arroz), bajos en grasas y ricos en fibra, por lo que son excelentes para controlar el colesterol, la salud digestiva y la regulación de los niveles de energía. De ahí que estos alimentos constituyan una importante fuente de proteínas. En México, con base en lo reportado por el INEGI (2021) en la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares (ENIGH) 2018, los mexicanos consumen alimentos a base legumbres como son frijoles, lentejas, habas, garbanzos y soya en promedio 4.5 días de la semana destinando un 11.7% del gasto en alimentos y bebidas en este tipo de productos. A esto se suma la tendencia del mercado hacia reducir o eliminar el consumo de productos de origen animal y aumentar el consumo de productos de origen vegetal, que hace que el consumo de productos a base de legumbres como el hummus haya ganado gran popularidad entre la población mexicana. Esta popularidad ha sido impulsada a diversos sectores a través de medios de comunicación como son los medios digitales, por poner algunos ejemplos, en publicaciones de la página *Vogue* (Santoyo, 2016) se ha promovido el consumo de este alimento bajo el argumento de ser un excelente sustituto de proteína animal, fuente de fibra, y minerales como el hierro, fósforo, magnesio, zinc, así como altas dosis de ácido fólico (recomendable durante el embarazo), mientras que recientemente en la página

Runner's World (Smith, 2020) se promueve el consumo de hummus (de manera moderada) como un refrigerio saludable, nutritivo, lleno de proteínas y que es especialmente bueno para los atletas. Estos beneficios también son promovidos por los productores, de acuerdo con la página web de la marca *Obela* (2014), este producto está constituido de garbanzos frescos, pasta de ajonjolí o tahini, aceite vegetal, hierbas y especias importadas de origen Mediterráneo ofreciendo un producto de gran valor nutrimental y en el cual destacan los siguientes beneficios: aporta proteína y grasas buenas (insaturadas), no contiene grasas trans, es libre de colesterol, es un producto Kosher y vegetariano. Adicionalmente y, teniendo en cuenta que este cambio en los hábitos alimenticios es cada vez más adoptado entre la población mexicana, los productores han desarrollado sabores que se adapten a las costumbres y tradiciones de la región, adicionando elementos típicos de nuestra alimentación con son los sabores picantes. Por esta tendencia y popularidad, se eligió el hummus para el presente trabajo.

Mayonesa

La mayonesa es una emulsión alimentaria de aceite en agua con un alto contenido de aceite disperso en una fase acuosa continua, es muy utilizado como ingrediente en aderezos y salsas. Los componentes principales son aceite vegetal, huevo, leche en polvo e ingredientes que dan un sabor extra y características específicas como la mostaza, sal, vinagre y diversas especias (Teneva, 2020)

Los alimentos a base de aceites y grasas, como es el caso de la mayonesa, representan un elevado porcentaje del aporte energético en la dieta de los consumidores en la mayor parte del mundo (ICMSF, 1998), sin embargo, es un componente primordial en el producto ya que la grasa contribuye al sabor, apariencia, textura y vida útil (Su, 2010).

De acuerdo con la norma mexicana NMX-F-021-S-1979. MAYONESA. *MAYONNAISE*. NORMAS MEXICANAS, la mayonesa es el producto alimenticio resultante de la emulsión cremosa que se obtiene con aceites vegetales comestibles, yema de huevo líquido o su equivalente en cualquiera de sus formas, vinagre, adicionado o no de jugo de limón, sal, edulcorantes nutritivos, acidulantes permitidos, mostaza, paprica u otras especias o extractos y aceites esenciales de las mismas con excepción de azafrán y

cúrcuma. El contenido de aceite vegetal comestible no será menor de 65% en peso y de yema de huevo líquida de 6% o su equivalente en yema de huevo deshidratada, o su equivalente de huevo entero líquido o deshidratado.

En dicha Norma Mexicana no se establece qué agentes acidificantes están permitidos en la mayonesa, solamente se establece un intervalo de acidez total como ácido acético de 0.25% a 0.50%, sin embargo, de acuerdo con la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF por sus siglas en inglés) pueden usarse los ácidos: acético, cítrico, láctico, málico y tartárico y las sales de estos. Además de los estabilizantes, antioxidantes, colorantes y aromatizantes está permitido el uso de conservadores como el ácido sórbico y el ácido benzoico, así como sus sales (ICMSF, 1998).

Estabilidad microbiológica de la mayonesa

La mayonesa y otros aderezos para ensaladas se deterioran por diversas razones: la separación de la emulsión, la oxidación, la hidrólisis de los aceites por los procesos estrictamente químicos y por el crecimiento de microorganismos. La vida de anaquel de una mayonesa, preparada adecuadamente, es de 3 a 6 meses; sin embargo, es común que la mayonesa industrial tenga una vida de anaquel de entre 9 y 12 meses (Vanderzant, 2005).

La mayonesa es sensible al deterioro debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados que pueden sufrir autooxidación fácilmente (Hussein, 2016).

Este es un producto microbiológicamente estable, debido a su alto contenido de grasa (700 a 800 g/kg) y a la adición de ácidos orgánicos e ingredientes ácidos, que además de contribuir al sabor, disminuyen el pH final del producto e inhiben a los microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos (Fialová, 2008), *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Yersinia enterocolitica* no sobreviven cuando se inoculan en mayonesa (Hussein, 2016).

De acuerdo con la Norma Mexicana NMX-F-021-S-1979, el pH de la mayonesa deberá estar comprendido entre 3.4 y 4.0.; la mayonesa tiene un pH en el intervalo de 3.5- 4.0,

pero algunos productos bajos en calorías (salsas de mayonesa, etc.) contienen menos ácido y aceite, por lo que el pH está alrededor de 4.5 (Teneva, 2020). El porcentaje de sal y azúcar no está fijado por disposiciones, pero generalmente es entre 1 y 12% de la fase acuosa (ICMSF, 1998); de acuerdo con Palma y colaboradores (2004), el contenido de azúcar representa un 2 %, mientras que el contenido de sal representa el 1%. La actividad acuosa de una mayonesa con un 12% de sal es de alrededor de 0.925 (Vanderzant, 2005), mientras que la actividad de agua de las mayonesas bajas en grasa es más alta (0.95), que la de la mayonesa entera (0.93) debido al aumento de la capacidad de retención de agua de las formulaciones (Hussein, 2016). El nivel de ácido acético en la fase acuosa se halla típicamente comprendido entre el 0.8 y el 3% (ICMSF, 1998). Actualmente la cantidad de ácido acético empleado en la producción de mayonesa ya sea la versión común o la versión reducida en grasa o *light* ha cambiado, ya que está se encuentra entre el 4.0 y el 4.5 % (Levy, 2012) lo cual afecta directamente la estabilidad microbiana del producto.

En general, algunos conservadores como el benzoato de sodio, el benzoato de potasio, el sorbato de potasio y el ácido sórbico son componentes de la mayonesa (Teneva, 2020).

Las buenas prácticas de manufactura, la baja actividad de agua y las condiciones ácidas minimizan en gran medida el crecimiento de bacterias indeseables en la mayonesa preparada comercialmente; pero algunas de ellas pueden sobrevivir y causar deterioro en el producto. En sus estudios en mayonesa y aderezos para ensaladas de origen comercial, Smittle (1977) y Kurtzman (1976) (ambos en Fialová, 2008) llegaron a la conclusión de que los lactobacilos, levaduras y algunas bacterias formadoras de esporas anaerobias fueron las principales causantes de deterioro en dichos productos.

Mediante diversos estudios se ha identificado que *L. plantarum* y *L. fructivorans* son algunos microorganismos típicos causantes del deterioro de la mayonesa y de productos a base de mayonesa (Vermeulen, 2007). Estos microorganismos causan la degradación sensorial de los productos, generando algunas de las siguientes características: producción de gas, limo, cambios de textura, sabor indeseable, entre otros; aunado a esto, las bacterias ácido-lácticas son generalmente tolerantes a la adición de ácido

benzoico y sórbico que son los conservantes químicos más usados en mayonesas y aderezos, por lo que su uso generalmente no afecta el crecimiento de este grupo bacteriano (Kucerová, 2007).

La fermentación gaseosa podría no ser evidente en mayonesa y aderezos de ensalada deteriorados después de algunas semanas de elaborado. Algunos microorganismos que causan deterioro podrían ser detectados únicamente por el incremento en la acidez o el cambio en el sabor, especialmente BAL homofermentativas, tales como *L. casei* y *L. plantarum* (Vanderzant, 2005).

Criterios de selección para el uso de esta matriz.

La mayonesa es un producto que forma parte de la dieta de los mexicanos, es consumida en diversos platillos y preparaciones típicas y se encuentra disponible en el territorio nacional tanto en tiendas de autoservicio como tiendas de conveniencia. De acuerdo con la Cámara Nacional de la Industria de Conservas Alimenticias, (CANAINCA, 2021) en 2020 se tuvo un volumen de producción de mayonesa (y otros aderezos) de 205.3 millones de toneladas, generando ventas de 9,039.8 millones de pesos en el mismo año. Con base en lo reportado por el INEGI (2021) en la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares (ENIGH) 2018, los mexicanos consumen productos derivados de grasas y aceites (como la mayonesa) en promedio 6 días de la semana destinando un 1.3% del gasto en alimentos y bebidas en este tipo de productos. Teniendo en cuenta la importancia de este producto en la dieta de los mexicanos y considerando que es un alimento no perecedero cuya vida de anaquel es de meses aun a temperatura ambiente (García, 2008), se eligió esta matriz para realizar el estudio.

Cuantificación de bacterias ácido-lácticas

El gran número de medios propuestos para la cuantificación de BAL, particularmente para la cuantificación de estreptococos y lactobacilos, es indicativo de las dificultades encontradas en el cultivo de algunas cepas de estos organismos. La elección del medio se rige, en cierta medida, por las cepas particulares estudiadas y, por tanto, por el producto o hábitat en el que se encuentren estos microorganismos. Los medios de cultivo enlistados en la tabla 7 se emplean para el desarrollo de colonias de BAL, pero no son altamente selectivos, y algunos, como el agar Eugon, no son selectivos en absoluto. Por lo tanto, organismos diferentes a las BAL pueden desarrollar en estos medios y producir ácido (Vanderzant, 2005).

Las bacterias, en general, requieren un entorno bioquímico y biofísico apropiado para crecer y expresar actividades metabólicas, las condiciones del entorno bioquímico están disponibles a través de nutrientes en los medios de cultivo. Teniendo en consideración los requisitos nutricionales especiales de algunas especies de BAL, se ha desarrollado una gran variedad de medios de cultivo con diferentes propósitos y usos. Los BAL se conocen como microorganismos exigentes que no pueden crecer en medios minerales simples complementados únicamente con una fuente de carbono. Además de los carbohidratos, los medios de cultivo de BAL suelen complementarse con varios aminoácidos libres, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, ésteres de ácidos grasos, minerales, vitaminas y agentes tamponantes (Hayek, 2013).

Como se ha mencionado anteriormente, mientras que las BAL en general son tolerantes al pH bajo (LeBlanc 2004, Mataragas 2003) pueden ser muy sensibles a otras condiciones adversas. Las muestras por examinar no deben ser congeladas antes del análisis. Muchas de las BAL pueden morir fácilmente o ser dañadas por la congelación (Vanderzant, 2005).

Estas bacterias no crecen bien aeróbicamente, aunque muchas de ellas son consideradas como facultativas. Por lo tanto, es importante colocar varias capas del medio apropiado sobre la superficie del agar solidificado en las placas que contienen las BAL. Una alternativa es la incubación de las cajas en un medio que contenga poco o

nada de oxígeno (Vanderzant, 2005). Los sistemas de generación de gas GasPak® son sistemas multiuso que producen atmósferas adecuadas para favorecer el aislamiento y cultivo primarios de bacterias anaerobias, microaerófilas o capnófilas mediante el uso de sobres generadores de gas en el interior de recipientes de incubación multiuso. El sistema de generación de gas GasPak® consta de un sobre de reactivo que contiene carbonato inorgánico, carbón activado, ácido ascórbico y agua. Cuando se extrae el sobre de su envoltorio externo, la exposición al aire provoca la activación del sobre. El sobre con reactivo activado y las muestras se colocan en el recipiente de incubación y éste se sella. El sobre reduce rápidamente la concentración de oxígeno en el interior del recipiente. Al mismo tiempo, el carbonato inorgánico produce dióxido de carbono (Dyksa, 2021).

La tabla 7 muestra los principales medios de cultivo utilizados para detectar y enumerar BAL en diversas muestras, sus principales aplicaciones y algunas limitantes que se pueden presentar.

Tabla 7. Medios de cultivo empleados la detección y cuantificación de BAL, aplicaciones y limitaciones

Nombre del medio	Utilización	Aplicaciones	Limitaciones
Caldo MRS o agar MRS	Este medio fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharp (de ahí MRS) para favorecer el crecimiento de varios lactobacilos, particularmente aquellos de origen láctico. <i>Pediococcus</i> y <i>Leuconostoc</i> crecen muy bien en este medio. Si al caldo MRS se le adiciona agar, puede ser usado para preparar placas.	Aislamiento y recuento de lactobacilos y otras BAL de muestras clínicas y alimentos, especialmente productos lácteos (Britania Lab). Se ha utilizado ampliamente como medio de cultivo general y como medio basal para realizar diferentes pruebas de temperatura, pH, alcohol, sal, entre otras. (Hayek, et. al, 2019)	La rentabilidad, la preparación y la baja densidad celular son algunas limitaciones de este medio, adicional se considera un medio costoso debido a su fuente de nitrógeno (extracto de carne y levadura). No es completamente selectivo. Muchas cepas de BAL crecen bien a 42–43 ° C y dan mayores recuperaciones cuando se enumeran usando medios MRS modificados (Hayek et. al, 2019).
Agar RMW	El agar desarrollado por Rogosa, Mitchell y Wiseman es un medio selectivo para el cultivo de lactobacilos de origen oral y fecal, también puede usarse para el aislamiento de pediococos.	Este medio se utiliza para el aislamiento, enumeración e identificación de lactobacilos de origen oral, heces, muestras vaginales y alimentos. (Difco)	Debido a que algunos lactobacilos pueden no desarrollar en este medio si se incubaba aeróbicamente, las placas deben ser incubadas en una atmósfera enriquecida con CO ₂ . La sal en la formulación hace que el medio no sea adecuado para el aislamiento de lactobacilos lácteos; por ejemplo, <i>L. lactis</i> , <i>L. bulgaricus</i> y <i>L. helveticus</i> (Difco)
Agar M-16	Es una modificación del medio de Rogosa, desarrollado para apoyar el crecimiento de estreptococos lácticos.	Cultivo y enumeración de estreptococos lácticos utilizados en la fabricación de queso cheddar (HiMedia Laboratories, 2015).	Se presenta una rápida disminución del pH por el crecimiento bacteriano (Hayek, et. al, 2019). Se requiere de atmósfera enriquecida con CO ₂ (HiMedia Laboratories, 2015).

Continuación Tabla 7. Medios de cultivo empleados la detección y cuantificación de BAL, aplicaciones y limitaciones			
Nombre del medio	Utilización	Aplicaciones	Limitaciones
Agar M-17	Modificado a partir del M-16, este medio fue desarrollado para favorecer el crecimiento de estreptococos lácticos.	Medio rico en nutrientes que se utiliza para el cultivo y enumeración de estreptococos lácticos exigentes. Se recomienda para aislar <i>Streptococcus thermophilus</i> del yogur y es adecuado para cultivar y mantener cultivos iniciadores para la fabricación de queso y yogur. (Condalab, 2019).	No es un medio selectivo, sin embargo, junto con el agar MRS se considera uno de los medios estándar más utilizados (Hayek, et. al., 2019). Se requieren pasos de preparación específicos y necesitan un tiempo de incubación prolongado (Hayek, et. al. 2013), de hasta 2 semanas si es necesario (Condalab, 2019).
Agar Eugon	Desarrollado por Vera para lograr crecimiento abundante de BAL por lo que se usa en cultivos masivos.	Medio de enriquecimiento, recomendado para el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. Produce un alto nivel de crecimiento (crecimiento eugónico) incluso con bacterias que son más difíciles de cultivar, como <i>Haemophilus</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Pasteurella</i> , <i>Brucella</i> , <i>Lactobacillus</i> , entre otras. Es muy útil en bacteriología médica y pruebas de alimentos, como carnes curadas, productos lácteos y otros alimentos. (Condalab, 2019)	

Continuación Tabla 7. Medios de cultivo empleados la detección y cuantificación de BAL, aplicaciones y limitaciones			
Nombre del medio	Utilización	Aplicaciones	Limitaciones
Agar APT	(<i>All purpose tween 80</i>) es un medio empleado para el cultivo y enumeración de BAL heterofermentativas en productos cárnicos curados.	Se emplea para el aislamiento de <i>Lactobacillus</i> (Hayek, et. al, 2019)	El medio puede ser empleado para identificar colonias sospechosas de bacterias que causan el enverdecimiento de productos cárnicos, sin embargo, pueden desarrollar bacterias formadoras de pigmentos, como <i>Pseudomonas</i> (Condalab, 2019)
Agar LBS oxgall	(<i>Lactobacillus Selection Oxgall</i>) es un medio selectivo empleado para el cultivo de BAL resistentes a la bilis, por la incorporación de 0.15% de bilis de buey (<i>oxgall</i>) en la formulación.	Se recomienda para el aislamiento selectivo, cultivo y recuento de <i>Lactobacillus</i> (HiMedia Laboratories, 2011)	
Fuentes: Vanderzant, 2005 y HiMedia Laboratories, 2015			

Los tensoactivos como lecitina o algunos Tweens también se pueden usar en medios de cultivo para BAL. Estos compuestos protegen las células contra condiciones adversas, mejoran la absorción de nutrientes y, por lo tanto, el crecimiento de las BAL. Los tensoactivos como Tween 80 y 85 contienen ácido oleico y el Tween 20 contiene ácido láurico. Estos ácidos grasos como mejoran el crecimiento de BAL. Aunque no todos los tensoactivos son importantes para el crecimiento de las BAL, el Tween 80, tensoactivo presente en medios como el agar MRS y el agar APT es bien conocido por su capacidad para mejorar el crecimiento de la mayoría de los géneros de BAL. Se ha informado que el Tween 80 tiene un efecto significativo sobre la capacidad de recuperación, la tolerancia a la bilis y la actividad metabólica de las BAL (Hayek, 2019).

Métodos rápidos para la cuantificación de microorganismos

El recuento de células viables en alimentos, superficies y del aire de las industrias alimentarias es un parámetro importante en el control de calidad de los alimentos. Tradicionalmente, el método estándar de recuento en placa ha sido ampliamente utilizado en los últimos 100 años en microbiología de los alimentos. Sin embargo, aunque sencillo, resulta laborioso, requiere de un volumen considerable de tubos de ensayo, pipetas, preparación de grandes volúmenes de medio para las diluciones, así como de espacio para el almacenamiento y la incubación de las placas de cultivo. Como consecuencia de estas limitaciones, en los últimos 20 años se han registrado distintos avances que permiten simplificar el proceso (Martín, 2010).

Los métodos de referencia en microbiología de alimentos se basan principalmente en la microbiología convencional. Los métodos innovadores, también llamados 'métodos rápidos', se han desarrollado para lograr resultados dentro de un tiempo más corto y, a veces, con un mayor rendimiento que los métodos "clásicos" basados en microbiología convencional (Lombard, 2010).

Se define como método rápido a cualquier método destinado a la detección, recuento, caracterización y subtipificación de microorganismos (patógenos y de deterioro) mediante el cual se obtienen resultados de manera sencilla, fiable y en menor tiempo que con los métodos convencionales. Los métodos rápidos se basan en técnicas fisicoquímicas (películas de medios de cultivos deshidratados generales o selectivos, sistemas para determinar el número más probable, medios cromogénicos y fluorogénicos), bioquímicas (galerías miniaturizadas y automatizadas), inmunológicas (precipitación, aglutinación, inmunofluorescencia, citometría, radioinmunoensayo, enzimoimmunoensayo, inmunocromatografía, nefelometría, inmunomicroscopía) y moleculares (hibridación, PCR de punto final, PCR en tiempo real, ribotipificación, microarrays, biochips) (Leotta, 2009).

Estos métodos rápidos o también llamados métodos alternativos se pueden clasificar en tres tipos principales (Lombard, 2010):

- (1) medios de cultivo sólidos, distintos de los prescritos en los métodos de referencia estándar, basados principalmente en sustratos cromogénicos para facilitar un reconocimiento visual de la bacteria diana u objetivo en las placas, como es el caso de Petrifilm® 3M®,
- (2) kits inmunoenzimáticos, tales como ELISA, y
- (3) métodos basados en moléculas, tales como las sondas de hibridación o PCR, convencionales o en tiempo real.

Los principales requisitos que deben cumplir los métodos rápidos de análisis microbiológico de los alimentos pueden resumirse en los siguientes puntos (Martín, 2010):

- Exactitud en la obtención de resultados de acuerdo con los requerimientos establecidos: sensibilidad, límites de detección mínimos, especificidad del sistema de análisis, versatilidad, aplicación potencial y comparación con métodos de referencia.
- Rapidez: tiempo mínimo requerido para la obtención de resultados, así como el número de muestras procesadas en cada ensayo.
- Costo mínimo: inicial, por análisis, reactivos, trabajo.
- Aceptabilidad: por parte de la comunidad científica y de las agencias reguladoras de los sistemas analíticos.
- Sencillez de manejo: preparación de la muestra, funcionamiento del equipo analítico y procesamiento informático de los datos.
- Cualificación y formación del personal adecuada para la técnica a realizar.
- Reactivos: facilidad de preparación, estabilidad, disponibilidad.
- Fiabilidad del método: avalada por la compañía u organismo responsable de la técnica analítica.

- Mínimo espacio util requerido.

Estos métodos están diseñados para mayor conveniencia y comodidad al emplearlos, para tener mejor estandarización y para mayor efectividad en el control de peligros en la cadena alimentaria (sistemas HACCP), especialmente en productos con vida útil corta y para el manejo de las crisis alimentarias (Lombard, 2010).

Si bien, en microbiología de alimentos este tipo de métodos rápidos fueron desarrollados principalmente para la detección de microorganismos patógenos en muestras que potencialmente podrían afectar a la salud humana, la comercialización de alimentos exentos de alteraciones constituye también una de las principales preocupaciones de las industrias alimentarias. Se considera que la principal causa de alteración de los alimentos se debe a la proliferación en ellos de bacterias, levaduras y mohos (Martín, 2010), por lo que en la actualidad también se han desarrollado métodos rápidos para la cuantificación de microorganismos causantes de alteración en los alimentos como los mencionados anteriormente.

Es importante mencionar que estos métodos se diseñan para usarse en lugar del método de referencia correspondiente (Lombard, 2010). Generalmente las agrupaciones de analistas profesionales y las instituciones de normalización y/o certificación hacen amplias validaciones de estos métodos, pero siempre es necesario validarlos para las matrices alimentarias específicas ya que éstas, por su complejidad, pueden afectar el uso y resultado del método analítico.

Placas Petrifilm

Es un ingenioso desarrollo que utiliza medios de cultivo deshidratados sobre películas plásticas. El medio deshidratado contiene además de los compuestos selectivos para adaptar su uso a propósitos concretos, un componente que permite la gelificación en frío y colorantes para la tinción de las colonias desarrolladas, facilitando su identificación y recuento. El medio deshidratado puede incluir sustratos para detectar microorganismos que presenten una actividad enzimática concreta. El medio se rehidrata al añadir la dilución de la muestra a analizar. Esta técnica requiere de la adaptación de la composición del medio y condiciones de trabajo al alimento del que se parta, así como al

tipo de microorganismos que se pretendan aislar. La principal ventaja del método Petrifilm® consiste en que no requiere preparación previa de los medios de cultivo, lo que reduce costos y tiempo de preparación (Martín, 2010).

Placas Petrifilm 3M® LAB®

Estas placas se caracterizan porque contienen nutrientes y agentes selectivos deshidratados, un agente gelificante soluble en agua fría y compuestos que remueven el oxígeno creando así un ambiente anaerobio para la recuperación de BAL tanto homofermentativas como heterofermentativas; la presencia de BAL heterofermentativas puede detectarse fácilmente en la placa, debido a que el gas (CO₂) producido como consecuencia del metabolismo de las bacterias, queda retenido en la placa. Además, no se requiere de preparación, tienen gran facilidad de utilización y excelente estandarización; el tiempo de incubación de las placas es de sólo 2 días comparado con el método tradicional (3M, 2016), que puede llegar a ser de hasta 5 días en condiciones de anaerobiosis (Vihavainen, 2008).

Aunado a las características mencionadas, las placas contienen cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio como indicador, el cual permite detectar fácilmente el crecimiento microbiano y diferenciarlo de residuos de la matriz. En la placa Petrifilm LAB®, las BAL homofermentativas se manifiestan como colonias rojo-violeta, sin gas; mientras las BAL heterofermentativas se ven como colonias rojo-violeta con una burbuja de gas asociada (3M, 2016).

Otra de las ventajas de las placas es que el diseño y la fabricación de 3M Food Safety cuentan con la certificación correspondiente de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO por sus siglas en inglés) 9001 (3M, 2016).

Un factor importante para considerar antes de implementar su utilización es la necesidad de validarlas para cada matriz alimentaria, ya que estas no han sido sometidas a evaluación con todos los productos alimenticios, protocolos de prueba posibles, ni con todas las cepas de microorganismos (3M, 2016), por lo que estos factores podrían afectar la transferencia directa de este método rápido.

Comparación en la inversión y generación de residuos de los métodos empleados

Como se ha mencionado, el uso de métodos microbiológicos alternativos o rápidos conlleva algunas ventajas, dentro de las cuales destacan la poca preparación de materiales para su uso, así como la notable disminución en la generación de desechos.

En la tabla 8, se enlistan los materiales requeridos para cada una de las metodologías y su respectivo costo, a fin de poder comparan la inversión inicial para el análisis de bacterias ácido- lácticas por los dos métodos, tradicional y Petrifilm LAB. Es importante mencionar que no se consideraron los materiales que se necesitan en ambos métodos como serían diluyentes, bolsas estériles, pipetas, autoclaves, entre otras; solo se hace referencia a aquellos materiales que son necesarios para el uso de cada método en particular.

Tabla 8. Materiales empleados en cada método y su costo	
Método tradicional	Método Petrifilm LAB 3M
Agar MRS- Frasco con 500 g Costo: \$2,383.00 (Fuente: Merck, 2021)	Placas Petrifilm LAB 3M- Paquete con 50 piezas. Costo: \$1,300.56- \$1,581.23 (Fuente: CTR Scientific, 2021 y Distribuciones Biotecnológicas, 2021)
Cajas Petri desechables- Caja con 500 piezas Costo: \$1,786.04 (Fuente: Prolab, 2021)	Esparcidor para control de 3M™ Petrifilm™ (difusor de inoculo) Costo: \$299.19 (Fuente: Distribuciones Biotecnológicas, 2021)
Jarra GasPak para anaerobiosis 100-mm x 15-mm (capacidad 11 placas) Costo: \$13,161.26 (Fuente: Dikysa, 2021)	No se requieren
Sobres generadores de anaerobiosis GasPak- Caja con 20 piezas Costo: \$2,381.82 (Fuente: Dikysa, 2021)	

A continuación, se plantea un ejemplo de un lote de análisis para bacterias ácido- lácticas en el cual se emplearían ambos métodos; se considera un lote de 5 muestras diferentes de alimento, de cada una de ellas se realizarán 3 diluciones por duplicado, adicionalmente se deben considerar dos controles del lote (control positivo y control negativo), obteniendo así 32 placas de medio para cada lote de 5 muestras. En el caso

del método tradicional, para la generación de anaerobiosis se emplean 3 jarras y 1 sobre para cada una de ellas, a fin de incubar las 32 placas totales. Para el costo de las jarras de anaerobiosis, se consideró que este se amortiza en un año, usándolas una vez por semana. Se usó la misma consideración (Costo /52 semanas) para el difusor o esparcidor de inóculo de Petrifilm LAB.

Con las consideraciones anteriores, en la siguiente tabla se indican los costos que tendría el análisis de este lote por cada uno de los métodos.

Tabla 9. Costos de análisis para lote de 5 muestras por ambos métodos de trabajo.				
Etapa o insumo	Método Tradicional		Método Petrifilm LAB	
	Costo unitario	Por 5 muestras	Costo unitario	Por 5 muestras
Medio de cultivo	68.2 g agar /L de medio, 0.61 L medio por lote	\$198.30	Costo unitario \$31.63 32 placas por lote	\$1012.16
Cajas estériles	Costo unitario: \$3.57 32 cajas por lote	\$114.30		
Jarras anaerobiosis (costo entre 52 semanas) c/u	Uso por una jarra: \$253.10 3 jarras por lote	\$759.30	No se requieren	
Sobres de anaerobiosis	Costo unitario: \$119.10 3 sobres por lote	\$357.30		
Difusor	No se requiere			\$5.75
SUBTOTAL		\$1,429.20		\$1,017.91
RESULTADO	Petrifilm LAB es aproximadamente 30% más barato que el MT y no tiene la limitación de espacio en las jarras de anaerobiosis.			
Residuos generados		640 g		210 g
Recolección y tratamiento de RBI	\$650.00 por 0.1 a 10 kg (Fuente: CM Ecotecnología y Sistemas Empresariales, 2021)			
		\$41.60		\$13.70
RESULTADO	La disposición de los residuos generados por el método Petrifilm cuesta 65% menos que la disposición de residuos del método tradicional			

Finalmente, en la eliminación de residuos se consideró que cada placa producida por el método tradicional tiene un peso aproximado de 20 g (considerando el peso de la caja, el agar, la muestra y el diluyente), se generarían 640 g de RPBI (Residuos Peligrosos

Biológico-Infeciosos) por cada lote de 5 muestras, mientras que para el método Petrifilm LAB se tendrían 210 g de RPBI, considerando que cada placa usada pesa cerca de 6.5 g.

Como se ha mencionado anteriormente, el uso de las placas Petrifilm LAB también permite reducir los tiempos de preparación de material y, por lo tanto, su empleo reduce los tiempos de análisis de las muestras en general. A continuación, se enlistan los pasos requeridos para el análisis de BAL por ambos métodos:

Tabla 10. Pasos requeridos para el análisis de BAL por ambos métodos		
Etapa del análisis	Método Tradicional	Método Petrifilm 3M LAB
Preparación del medio de cultivo	1. Disolución del agar mediante calentamiento. 2. Esterilización del agar (esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ° C o 118 ° C), (Merck, 2021) 3. Para su uso, el agar debe mantenerse fundido a una temperatura de 45 °C (Camacho, 2009)	No requiere algún tipo de preparación, placas listas para usar (3M, 2017).
	Diferencia estimada de tiempo: 45 minutos	
Preparación de la dilución primaria	Pesado de la muestra en condiciones asépticas, transferencia de la muestra al diluyente en condiciones asépticas, homogeneización de la dilución, ajuste de pH.	
	No hay diferencia de tiempo	
Preparación de diluciones decimales	Realización de diluciones decimales adicionales.	
	No hay diferencia de tiempo	
Inoculación de la muestra en las placas	Transferencia de las diluciones seleccionadas a cada placa en condiciones asépticas.	
	No hay diferencia de tiempo	
Adición del medio de cultivo	Vertido en placa, adición de 18 a 20 mL de agar fundido y mantenido a 45 °C (Camacho, 2009).	No se requiere adicionar medio de cultivo a la placa, (3M, 2017)
	Diferencia estimada de tiempo: 6 minutos	
Distribución del inóculo	Mezclar mediante 6 movimientos en cada uno de los 4 sentidos, hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio (Camacho, 2009)	La distribución del inóculo se realiza mediante el uso del Difusor Petrifilm (3M, 2017).

Continuación. Tabla 10. Pasos requeridos para el análisis de BAL por ambos métodos		
Etapa del análisis	Método Tradicional	Método Petrifilm 3M LAB
Distribución del inóculo	Diferencia estimada de tiempo: 6 minutos	
Reposo de la placa	El medio de cultivo debe solidificar (Camacho, 2009)	La placa debe dejarse por lo menos un minuto para gelificar (3M, 2017)
	Diferencia estimada de tiempo: 20 minutos	
Incubación	Las condiciones de incubación dependen de cada tipo de muestra, no se modifican entre métodos cuando se trabaja una misma muestra.	
	No hay diferencia de tiempo	
Recuento de UFC	Difícil. El tiempo depende de la densidad de colonias en la placa. Promedio estimado 90 s / placa	Se facilita por la coloración de las colonias. Se estima que se cuentan en 25 % menos tiempo: 70 s/ placa
	Diferencia estimada de tiempo: 10 minutos	
Diferencia de tiempo	Diferencia estimada de tiempo: 1:07 horas por lote de 5 muestras	

Como se indica en la tabla 10, hay una diferencia estimada de 1:07 horas entre el análisis de un lote de 5 muestras diferentes por el método tradicional y el método Petrifilm, siendo más rápido el método Petrifilm al no tener que preparar algún material para el análisis como lo es el medio de cultivo para el caso del método tradicional.

Validación de métodos microbiológicos en alimentos

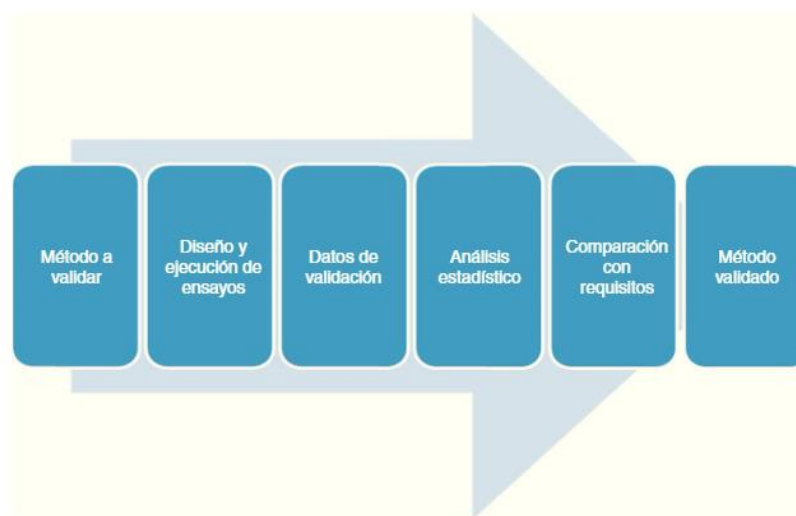
Los métodos innovadores se han desarrollado y comercializado con varias ventajas, pero los usuarios necesitan garantías de su actuación. En general, la validación de un método consiste en confirmar, mediante el examen y la provisión de pruebas objetivas, que los requisitos particulares para un uso específico previsto se cumplen (Lombard, 2010).

Una validación requiere una serie de actividades o criterios generales (Camaró, 2015):

- 1) Definición de requisitos: será en función del tipo de método y definirá rangos para los parámetros.
- 2) Definición del método.
- 3) Obtención de muestras o cepas con valor de referencia para poder realizar comparaciones.
- 4) Aplicación del método a las muestras en las condiciones establecidas.
- 5) Obtención de valores de los parámetros.
- 6) Comprobación del cumplimiento de requisitos y declaración de validez del método.

En la figura 10 se indican las fases del proceso de validación:

Figura 10. Fases del proceso de validación.



Fuente: Camaró y colaboradores, 2015.

En un método alternativo, la validación consiste en demostrar que los resultados obtenidos con este son comparables con los resultados que se habrían obtenido con el método de referencia. En esta definición, la palabra "comparable" puede entenderse como al menos equivalente, o bien, estadísticamente sin diferencia significativa (Lombard, 2010).

Para la validación es conveniente utilizar una o varias de las siguientes técnicas para la determinación del desempeño de un método (Camaró- Sala, 2015):

- Contaminación de las muestras. La validación de los métodos microbiológicos debe ser reflejo de las condiciones de ensayo reales. Esto se puede conseguir utilizando muestras contaminadas natural o artificialmente, o bien, muestras fortificadas a un determinado nivel. En general, el proceso consiste en agregar el material interferente a una muestra real que contenga el material a ensayar.
- Uso de materiales de referencia o certificados. Esta alternativa tiene algunos inconvenientes como el elevado costo, la posibilidad y facilidad de encontrar un material de referencia suficientemente representativo de la muestra a validar.
- Comparación de resultados obtenidos con otros métodos alternativos. Se analizan muestras por el método en estudio y otro método de comparación, luego se estima el error sistemático en las diferencias observadas entre ambos métodos.
- Comparación interlaboratorios.

En microbiología existen otro tipo de materiales que se utilizan para controlar los medios de cultivo utilizados para análisis microbiológicos, son las denominadas cepas de referencia. Se entiende coloquialmente por cepa de referencia a un cultivo procedente de una colección reconocida (Camaró- Sala, 2015).

De acuerdo con la norma ISO-16140:2003 y el complemento EN ISO-16140, el protocolo de validación comprende dos fases: (1) un estudio comparativo del método alternativo (MA) con el método de referencia correspondiente (MR) realizado por un

laboratorio, y (2) un estudio entre laboratorios sobre ambos métodos en paralelo, organizado por el laboratorio a cargo de la primera fase (Lombard, 2010).

Protocolo técnico para métodos cuantitativos

Estudio de comparación de métodos

Esta primera fase del estudio permite evaluar cuatro conjuntos de criterios: linealidad y veracidad, límite de detección/ cuantificación, sensibilidad e inclusividad/ exclusividad. La linealidad se define como la capacidad del MA, para una determinada matriz, para obtener resultados que son proporcionales a la cantidad de analito presente en la muestra. Veracidad se define como el grado de correspondencia entre el MA y el MR en muestras idénticas. El límite de detección se define como la cantidad más pequeña de analito que se puede detectar, pero no se cuantifica con una alta probabilidad, es decir, el 95%, mientras que el límite de cuantificación es la cantidad más pequeña de analito que se puede medir y cuantificar con una precisión y veracidad definida. La sensibilidad es la capacidad del MA para detectar dos cantidades ligeramente diferentes de analito medido por el MR. El límite de detección se define como el menor número de microorganismos cultivables que se pueden detectar en el 50% de las ocasiones. La inclusividad y la exclusividad son criterios combinados; se evalúa la capacidad del MA para detectar el microorganismo objetivo y su falta de interferencia con un rango de microorganismos no objetivo (Lombard, 2010).

Estudio entre laboratorios

El estudio entre laboratorios aborda la precisión y la veracidad del MA contra el MR, mediante la estimación de los parámetros conocidos como repetibilidad (variabilidad aleatoria mínima), reproducibilidad (variabilidad aleatoria máxima) y sesgo (error sistemático) (Lombard, 2010).

Las muestras se preparan a partir de una matriz, contaminadas en cuatro niveles, incluido un control negativo y analizados por duplicado tanto por el MA como por el MR. Los resultados obtenidos son en primer lugar transformados a log₁₀, un paso

común en la microbiología cuantitativa para acercarse a una distribución normal de los datos y para estabilizar la varianza sobre los niveles de contaminación (Lombard, 2010).

Las características de precisión se calculan con bases estadísticas sólidas. Para cada nivel de contaminación, la precisión relativa del MA contra el MR se calcula por la mediana de la diferencia de los laboratorios entre las pruebas duplicadas para el MA y el MR (Lombard, 2010).

Pruebas de significancia estadísticas

Es frecuente utilizar pruebas de significancia estadísticas durante el proceso de validación de los métodos, en este sentido, se aplican comúnmente las siguientes:

1. Prueba t- Student para identificar errores sistemáticos (sesgo).
2. Prueba F-Fisher para identificar errores aleatorios (precisiones).

Al hacer una prueba de significancia se comprueba la veracidad de una hipótesis experimental, llamada “hipótesis alternativa” (H_1 , si hay diferencia,) con respecto a la hipótesis nula (H_0 , no hay diferencia) (Duffau, 2010).

Prueba t de Student

Esta prueba permite comparar las medias de dos grupos de datos y determinar si entre estos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas (Duffau, 2010).

En la prueba t, se determina el valor t de Student calculado, obtenido de la experiencia analítica, y este valor posteriormente se compara con el llamado valor crítico, este valor crítico se obtiene de la tabla de t de Student para un determinado porcentaje de confiabilidad (normalmente se utiliza el 95% de confianza, es decir, un valor α de 0.05). Si no existen diferencias significativas entre los dos grupos, el t calculado debería ser inferior al t crítico (Duffau, 2010).

Es la hipótesis alternativa la que determina el número de colas. Si la hipótesis alternativa contiene la frase “mayor que” ó “menor que”, la prueba es de una cola. Si la hipótesis alternativa contiene la frase “no es igual que”, la prueba es de dos colas.

Para calcular el valor crítico de t se emplea la siguiente ecuación:

$$t_c = \frac{x_1 - x_2}{\sigma * \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde:

x_1 : media del método 1

x_2 : media del método 2

σ : varianza

n_1 : tamaño de la muestra 1

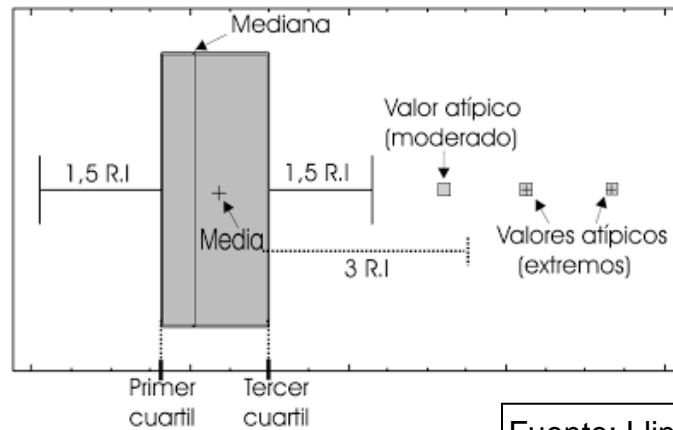
n_2 : tamaño de la muestra 2

Diagrama de cajas y bigotes o boxplot

El diagrama de cajas y bigotes proporciona una representación gráfica de los datos mediante un resumen de cinco números. Esta herramienta de análisis exploratorio de datos permite estudiar la simetría de estos, detectar los valores atípicos y vislumbrar un ajuste de los datos a una distribución de frecuencia determinada (Llinás, 2006).

El diagrama divide los datos en diagramas de igual frecuencia, una caja central dividida en dos áreas por una línea vertical y otras dos áreas representadas por dos segmentos horizontales (bigotes) que parten del centro de cada lado de la caja. La caja central encierra el 50% de los datos. En el interior de la caja central se acostumbra a representar la media y se dibuja la mediana como una línea vertical. Si esta línea está en el centro de la caja no hay asimetría de los datos (Llinás, 2006). En la figura 11, se muestra un ejemplo de un diagrama de cajas y bigotes.

Figura 11. Ejemplo de un diagrama de cajas y bigotes.

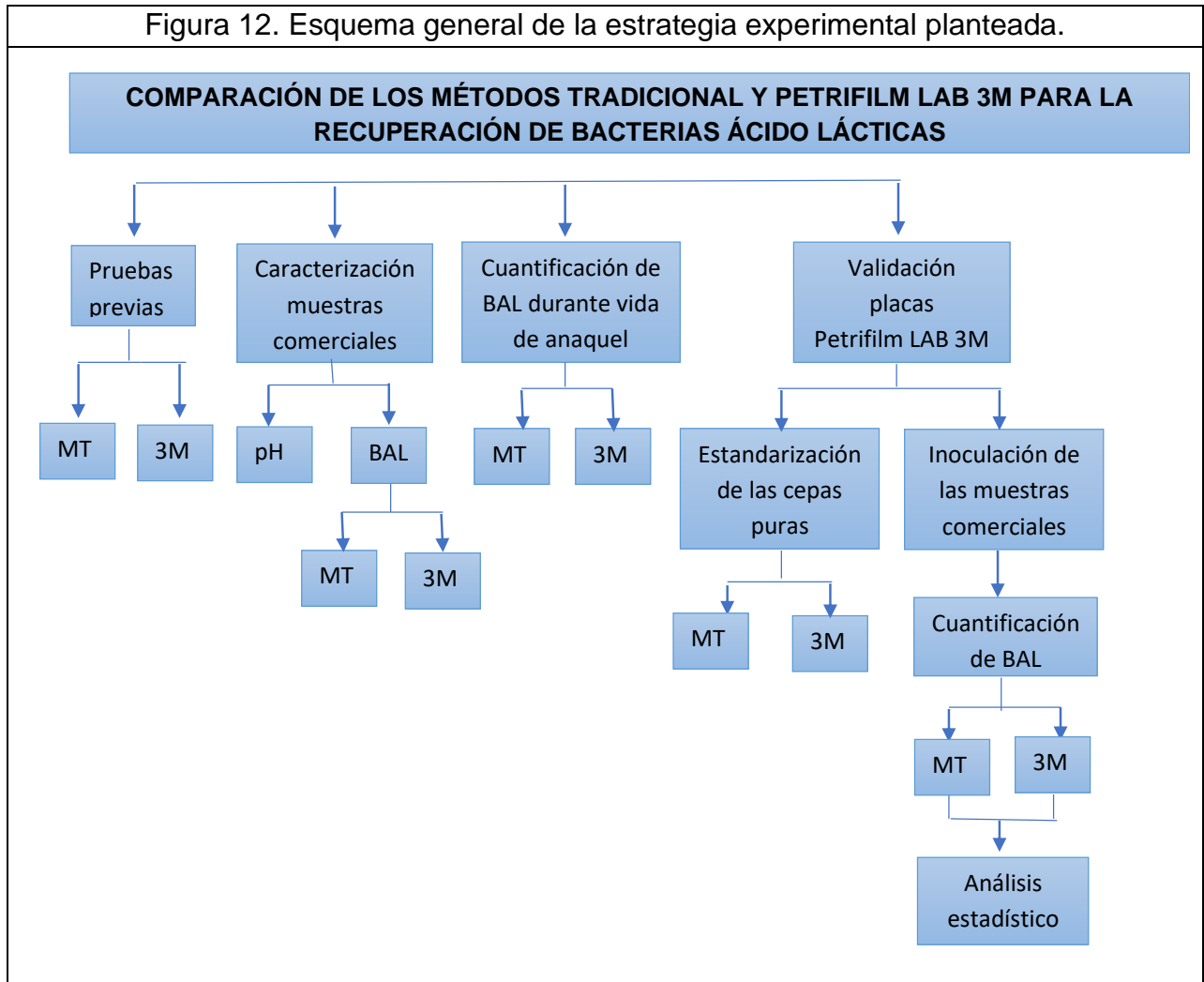


Fuente: Llinás, 2006.

El uso de gráficos no reemplaza el procedimiento de una prueba estadística, sin embargo, como una herramienta de la prueba, los gráficos proporcionan información visual para guiar al analista; con frecuencia el gráfico es el mejor medio para comunicar la evidencia. De manera semejante, una figura aclara por qué se encuentra o no diferencia significativa. Para la comparación de medias, las gráficas de cajas y bigotes proporcionan información visual concreta (Walpole, 2012).

METODOLOGÍA

Estrategia experimental.



- 1. Pruebas previas. Detección de BAL en yogur.** Con la finalidad de observar el desarrollo de las BAL en ambos métodos y evitar errores durante la interpretación de las placas, antes de realizar el análisis en las muestras seleccionadas, se realizaron pruebas previas con un producto que contiene este grupo bacteriano, el yogur. Las pruebas se realizaron mediante ambos métodos, tradicional y Petrifilm®, hasta lograr resultados reproducibles, proporcionales y confiables.

Criterios de selección para el uso de esta matriz: el control de BAL es esencial en este producto ya que el contenido de este grupo microbiano es uno de los atributos normados, debe contener al menos 10^7 UFC/g (Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI/SAGARPA-2018, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba). En la comercialización de derivados de leche los yogures bebibles y con frutas y/o cereales ocupan el primer y tercer lugar en ventas respectivamente, lo que hace importante el adecuado control de sus atributos, especialmente considerando la tendencia del mercado hacia productos con beneficios funcionales (De la Rosa, 2020).

2. **Determinación de BAL en muestras comerciales.** Se realizó la cuantificación de las BAL en las matrices seleccionadas, hummus y mayonesa, para confirmar la aplicabilidad de la metodología para el recuento de este grupo bacteriano, o en caso contrario, realizar las modificaciones necesarias antes de llevar a cabo los siguientes pasos del ensayo, el análisis de las muestras a lo largo de su vida útil y la inoculación de estas con una cepa pura.
3. **Determinación de las condiciones ideales de trabajo para la cuantificación de BAL en las muestras comerciales de mayonesa.** Debido a que los primeros resultados obtenidos de la cuantificación de BAL en mayonesa no fueron satisfactorios, tanto los obtenidos por el método tradicional como por el método Petrifilm LAB®, se realizaron pruebas para determinar las condiciones ideales de trabajo en esta matriz alimentaria en particular. Con base en información encontrada en la literatura acerca de las condiciones que favorecen el desarrollo de este grupo microbiano en la mayonesa (Vanderzant, 2005 y Fialová, 2008), se probaron dos temperaturas de incubación, 30 °C y 37 °C, dos periodos de incubación, 2 y 3 días y dos condiciones de ajuste de pH 4.5 y 7. Las pruebas se realizaron por ambos métodos.
4. **Determinación de la cantidad de BAL en las muestras comerciales durante su vida útil.** Con la finalidad de establecer el comportamiento del grupo bacteriano en las matrices seleccionadas con el paso del tiempo, cada 15 días se realizaron los análisis pertinentes para determinar la cantidad de BAL en las muestras bajo estudio,

estos análisis se realizaron hasta la fecha de caducidad establecida por el fabricante o hasta la evidente descomposición del producto.

5. Validación de las placas Petrifilm LAB en las muestras comerciales seleccionadas. Para poder determinar la eficiencia de recuperación de las BAL se realizó la cuantificación de este grupo tanto en la muestra inoculada como en la muestra sin inocular.

5.1. Estandarización de las cepas puras. El Cepario de la Facultad de Química de la UNAM nos proporcionó dos cepas puras de BAL: *Lactococcus lactis* (CFQ-B-212) y *Pediococcus cerevisiae* (CFQ-B-115).

Se utilizaron dos métodos para determinar la concentración celular de las cepas puras, cultivo en placa y conteo de células mediante la cámara de Neubauer.

Cultivo en placa: se cultivaron las dos cepas en medio líquido, para ello se tomaron de 1 a 2 asadas y se inocularon en 5 mL de caldo MRS estéril, el cual se incubó a 30 ± 2 °C por 18 ± 2 h. Pasado este tiempo se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-10} . Se sembraron por duplicado las diluciones 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} y 10^{-9} en las placas Petrifilm LAB® y se realizó vertido en placa empleando agar MRS. Las placas Petrifilm LAB® se incubaron a 30 ± 2 °C por 18 ± 2 h (Vanderzant, 2005); las placas con agar MRS se incubaron en anaerobiosis bajo las mismas condiciones. Se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en las placas y se obtuvieron las UFC por mililitro de la dilución.

Cámara de Neubauer: se colocó un portaobjetos limpio sobre la cámara; para llenar la cámara por capilaridad se colocó una pipeta automática que contenía un poco de la dilución 1:10 en el centro de la parte superior de la misma, esta dilución se realizó a partir de un cultivo líquido de 24 h de nuestras cepas. Debido a que las células eran muy pequeñas se añadió una gota de colorante, cristal violeta, para facilitar su conteo. Una vez que la cámara contenía la muestra se colocó en el microscopio y se enfocó la cuadrícula a 100X, para contar las células se cambió a 1000X. Se contaron las células contenidas en 10 cuadros pequeños de la cámara, se realizó un promedio y se obtuvieron las UFC/mL de la dilución empleada.

5.2 Inoculación de las muestras. Se eligió a *Lactococcus lactis* para esta etapa; se inocularon 250 µL del cultivo líquido del microorganismo en la dilución 1: 10 de la muestra a analizar, para de esta manera tener 150 UFC en cada placa.

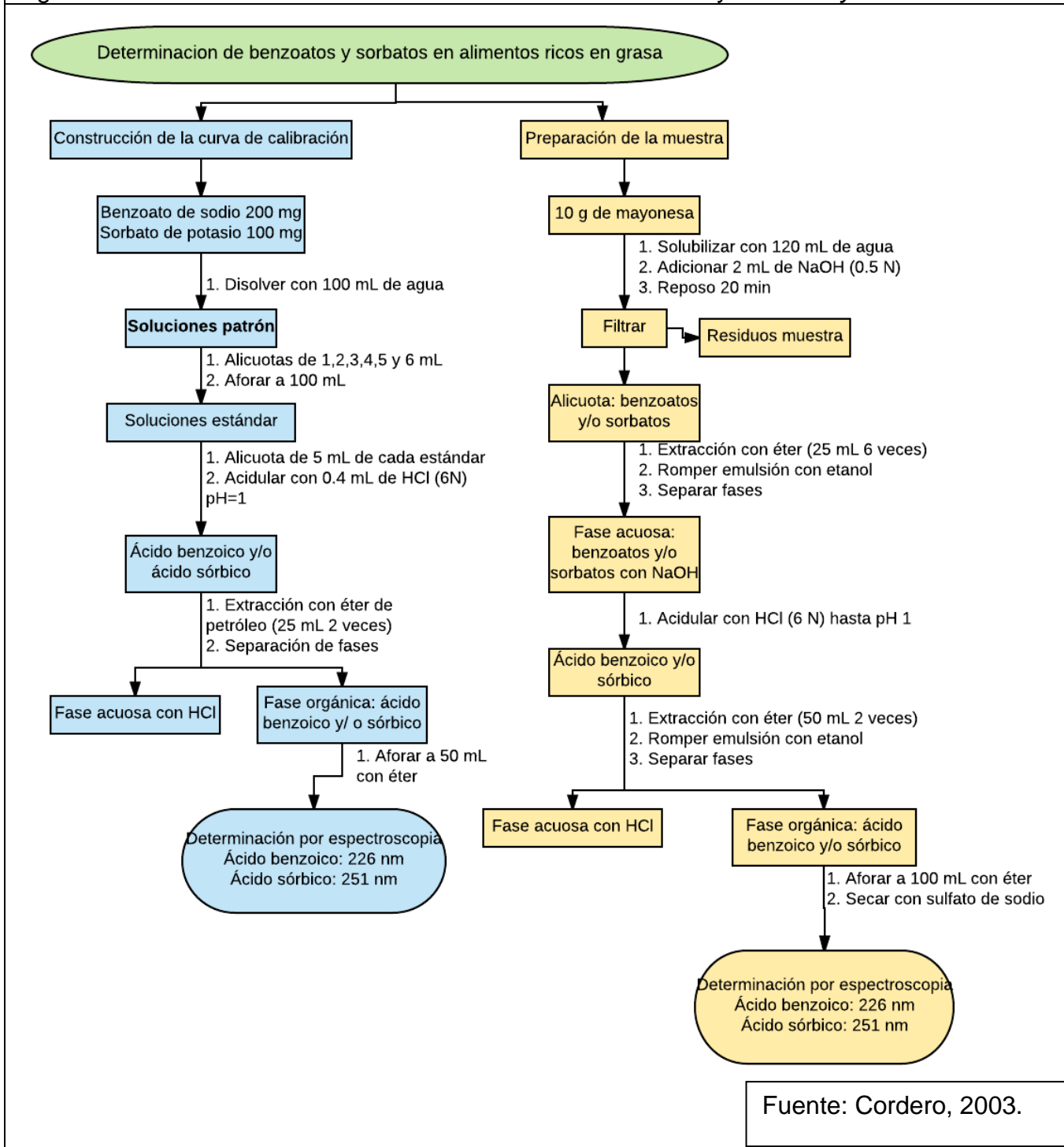
Se realizaron 30 repeticiones de cada análisis para poder comparar estadísticamente. El análisis se realizó al mismo tiempo por ambos métodos. Además, se incluyeron controles negativos (placa inoculada con buffer de fosfatos estéril) y positivos (placa inoculada con *L. lactis*).

6. Análisis estadístico. Con los 30 datos recabados se realizó una prueba estadística para comparar el método tradicional y el método desarrollado por 3M®, para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa o no entre ambos. La prueba que se llevó a cabo fue la “t” de Student a dos colas.

7. Pruebas de inhibición en mayonesa. Debido a que en la prueba de validación de la muestra comercial de esta matriz la cantidad de BAL en la muestra inoculada es mucho menor a la cantidad de *L. lactis* inoculada se decidió realizar estas pruebas.

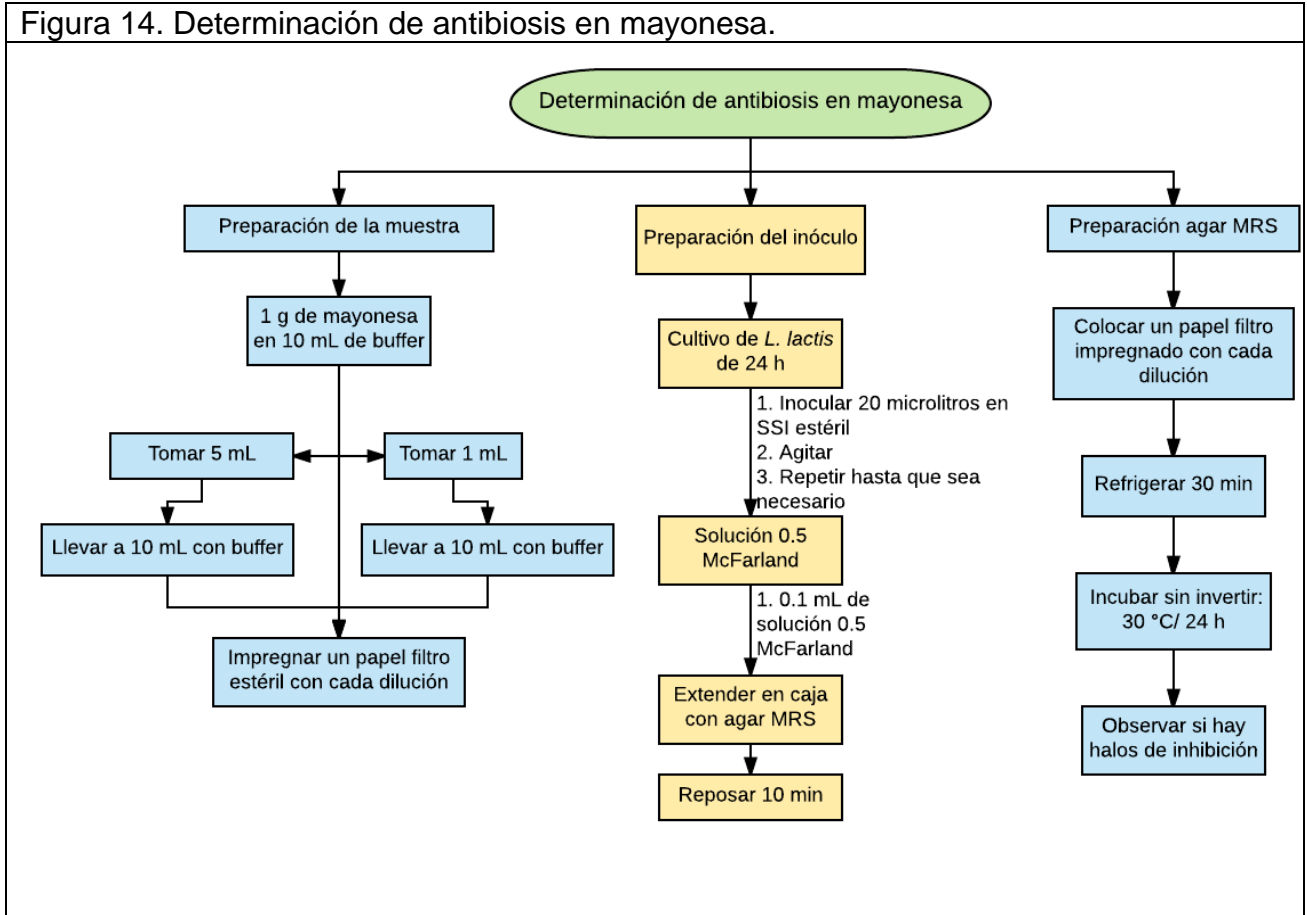
Inhibición del crecimiento de BAL por presencia de benzoato y/o sorbato: En la lista de ingredientes de la mayonesa *Mayorela*, muestra que fue empleada para llevar a cabo la validación, no se declara la presencia de conservadores como el ácido benzoico o sórbico, pero de acuerdo con el ICMSF el uso de estos dos conservadores es común en la fabricación de la mayonesa, por ello se decidió buscar la presencia de ambos en la muestra. La metodología empleada se muestra a continuación, en la figura 13:

Figura 13. Determinación de conservadores en muestra de mayonesa *Mayorela*.



Inhibición del crecimiento de L. lactis por la presencia de BAL presentes en la muestra:
 Se decidió realizar esta prueba para determinar si existe un efecto de antibiosis entre las BAL presentes en la muestra de mayonesa y la cepa pura. La metodología empleada se muestra a continuación:

Figura 14. Determinación de antibiosis en mayonesa.



Metodología para el recuento de bacterias ácido-lácticas

La metodología que a continuación se presenta se empleó para el análisis de todas las muestras, desde el análisis de yogur hasta el análisis de las muestras comerciales.

Preparación de la muestra: En condiciones asépticas, diez gramos de la muestra se suspendieron en 90 mL de buffer de fosfato estéril con el fin de obtener la dilución 1:10 de la muestra, a partir de esta se realizaron diluciones decimales en serie.

En el caso de la mayonesa, se adicionó Tween 80 como tensoactivo para evitar la separación de las fases de la muestra en la dilución de esta, se añadió 1 mL de Tween 80 estéril a 40 °C a la dilución 1:10 de cada muestra de mayonesa a 40 °C (Peterkin, 1980).

Método tradicional: Se inoculó 1 mL de la dilución correspondiente en una caja Petri y se adicionaron aproximadamente 18 mL de agar MRS a 45 °C adicionado con 1% (v/v) de cloruro de trifeníl tetrazolio (TTC). Las placas Petri inoculadas se incubaron a 37 ± 2 °C, en el caso del yogur y del hummus y a 30 ± 2 °C en el caso de la mayonesa por 48 ± 2 h en condiciones de anaerobiosis, mediante el uso de una cámara de anaerobiosis y sobres GasPak® EZ.

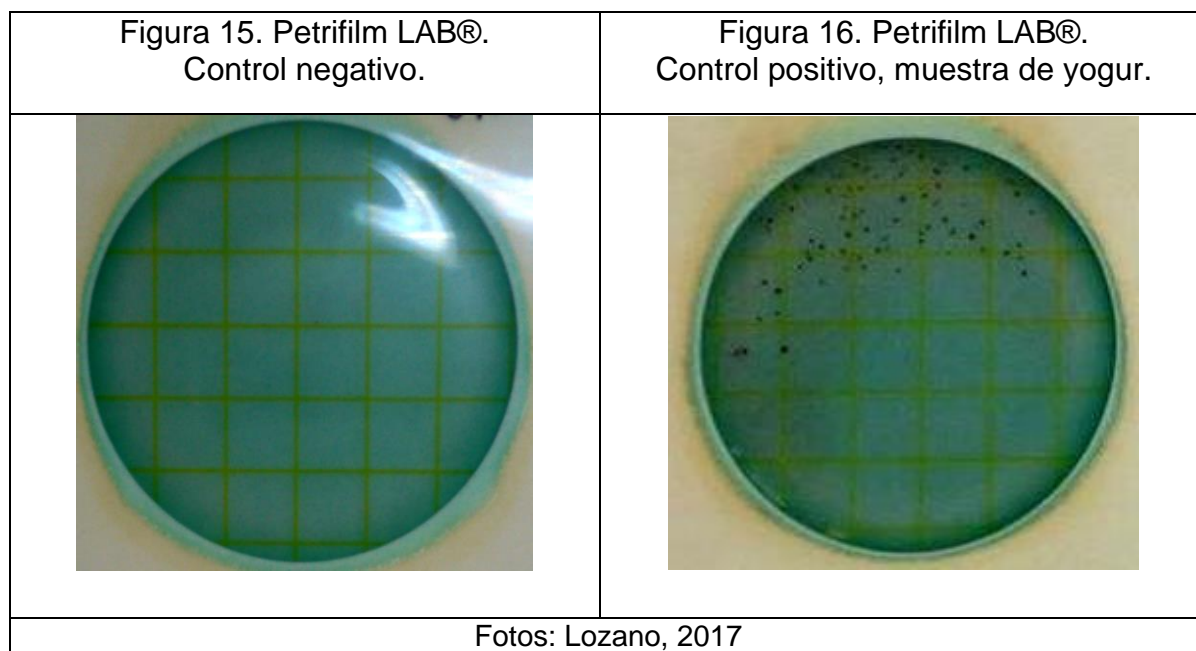
Método 3M: Las placas Petrifilm se inocularon con 1 mL de la dilución correspondiente, se sellaron y también se incubaron a 37 ± 2 °C o a 30 ± 2 °C, dependiendo de la muestra, por 48 ± 2 h, solo que estas no requieren condiciones de anaerobiosis (3M, 2016).

RESULTADOS

ETAPA 1. Pruebas previas. Detección de bacterias ácido-lácticas en yogur.

Como se mencionó en la estrategia experimental, el objetivo de esta etapa del proyecto era determinar la forma en la cual se observaba el desarrollo de las BAL en las placas inoculadas por ambos métodos.

En la figura 15 se puede observar una placa Petrifilm LAB® inoculada con agua destilada estéril, la cual se empleó como control negativo de crecimiento de BAL, donde el medio es color azul. En la figura 16 se puede ver el desarrollo de las BAL presentes en el yogur en las placas Petrifilm LAB®, se aprecian de manera clara las colonias de color púrpura.



En lo que respecta al método tradicional, en las siguientes figuras se muestran una caja Petri con agar MRS inoculada con agua destilada estéril como control negativo, figura 17, y una caja con agar MRS inoculada con una muestra de yogur, figura 18, ambas vistas con un cuenta colonias, ya que el uso de este ayudo considerablemente a apreciar de una mejor manera las colonias presentes en las placas.

Figura 17. Placa convencional MRS.
Control negativo.

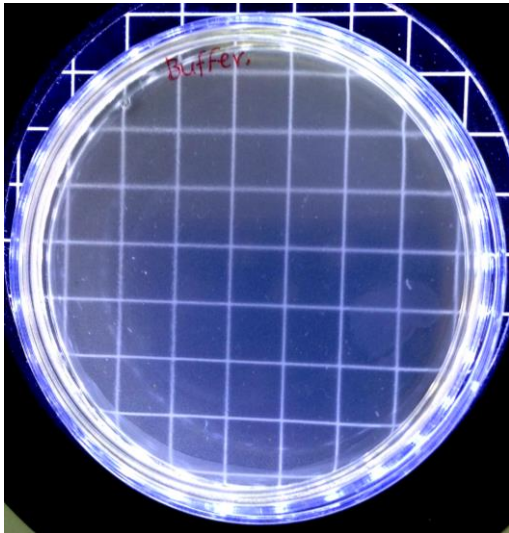
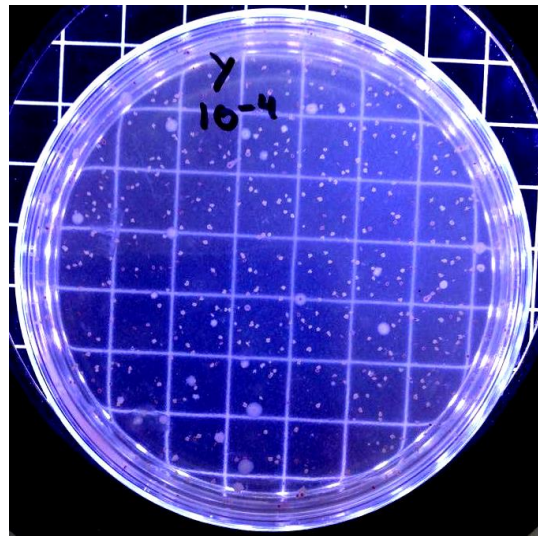


Figura 18. Placa convencional MRS.
Control positivo, muestra de yogur.

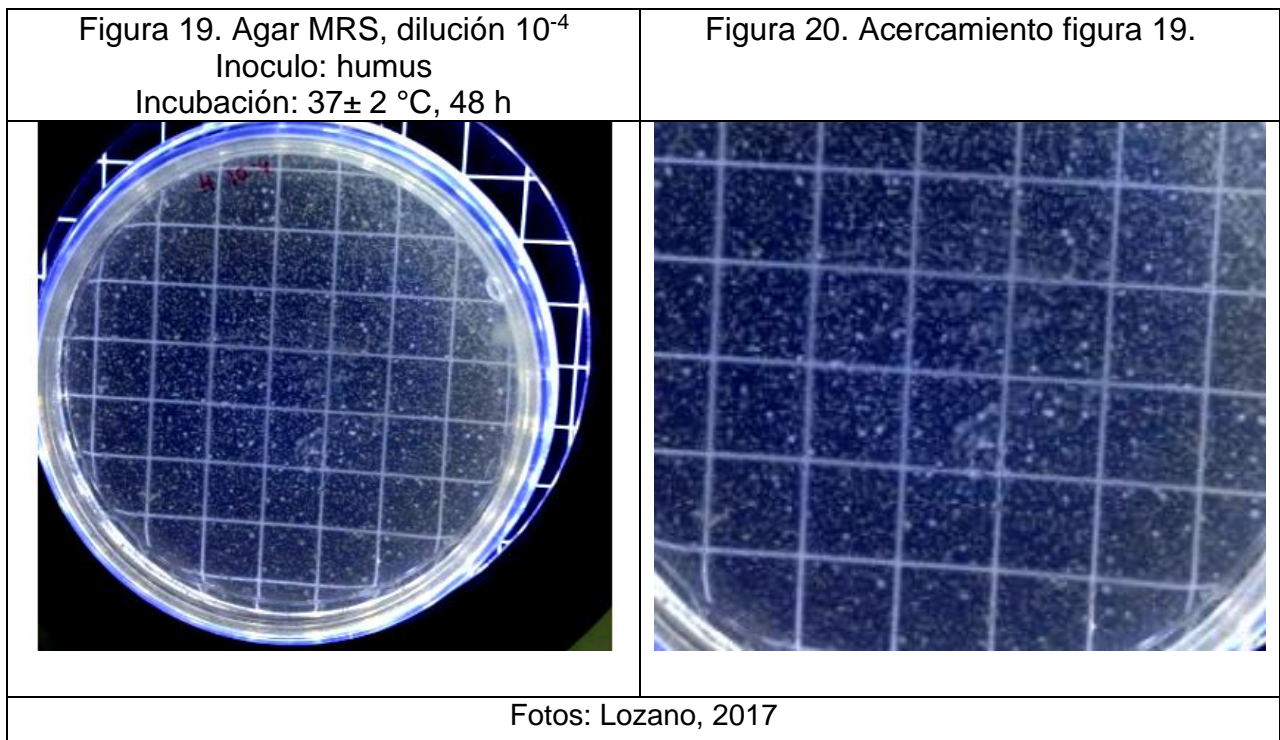


Fotos: Lozano, 2017

ETAPA 2. Determinación de BAL en muestras comerciales.

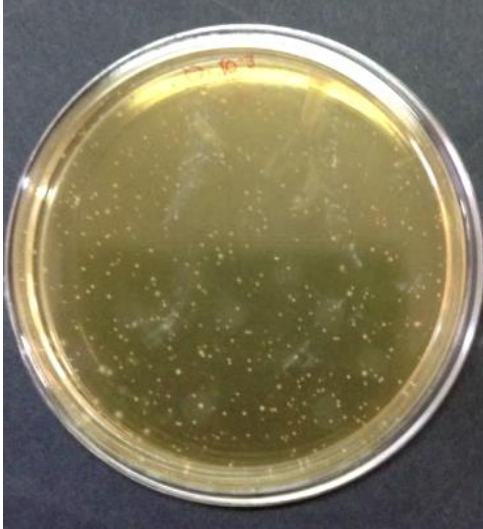
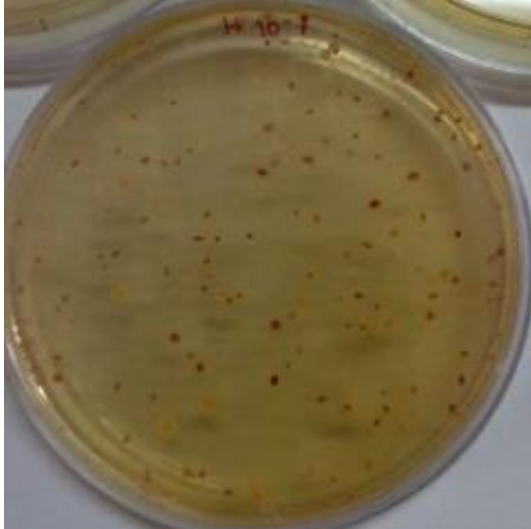
Humus

Durante las primeras pruebas realizadas a las muestras de humus se presentaron algunas dificultades en el recuento de las colonias por el método tradicional, ya que estas eran muy pequeñas, comparadas con las observadas en las pruebas previas, como se observa en las figuras 19 y 20, por lo cual se podían confundir con partículas de alimento.



Para resolver el problema se empleó el indicador TTC (siglas en inglés del cloruro de trifeníl tetrazolio) en el método tradicional, a fin de diferenciar las UFC de las partículas de alimento. La adaptación fue muy útil para el conteo de las bacterias que desarrollaron en las placas, pues con el uso de este indicador las colonias se tiñen de un color rojo intenso, en presencia de bacterias, el TTC se reduce a formazán rojo, evidenciando así la presencia de células viables activas (Moussa, 2013).

El uso de este indicador redox fue muy útil para el conteo de las bacterias, como se puede apreciar en las figuras 21 y 22, en donde se presentan dos placas de agar MRS inoculadas con humus, en la figura 21 se muestra una placa en donde no se emplea TTC y la segunda empleando el indicador, en la figura 22 se observa que las colonias se tiñen de un color rojo intenso que permite detectarlas claramente, diferenciando de partículas de alimento.

Figura 21. Inóculo de humus en agar MRS sin TTC.	Figura 22. Inóculo de humus en agar MRS con TTC.
	
Fotos: Lozano, 2017.	

En las figuras 23 y 24 se pueden observar las colonias teñidas de rojo por el uso del indicador, así como partículas de alimento, que siguen estando presentes incluso en diluciones mayores de la muestra, las cuales presentan un color diferente del rojo característico del crecimiento bacteriano.

Figura 23. Inóculo de humus en agar MRS, dilución: 10^{-7}

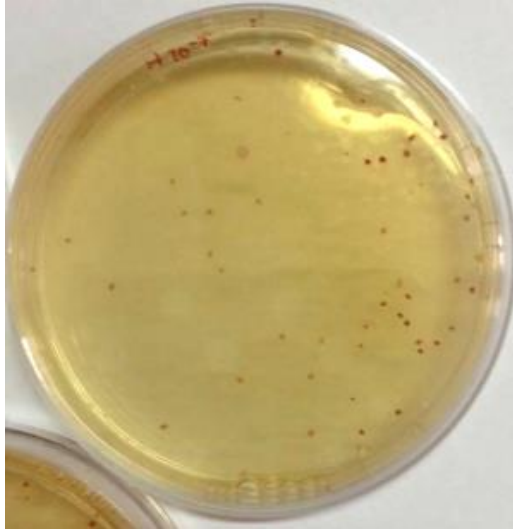
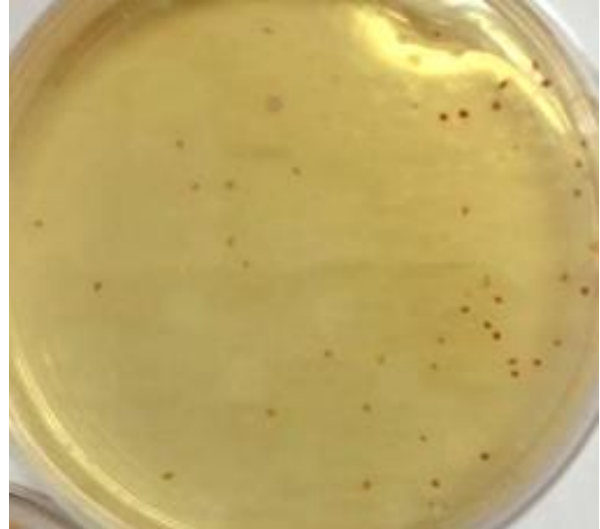


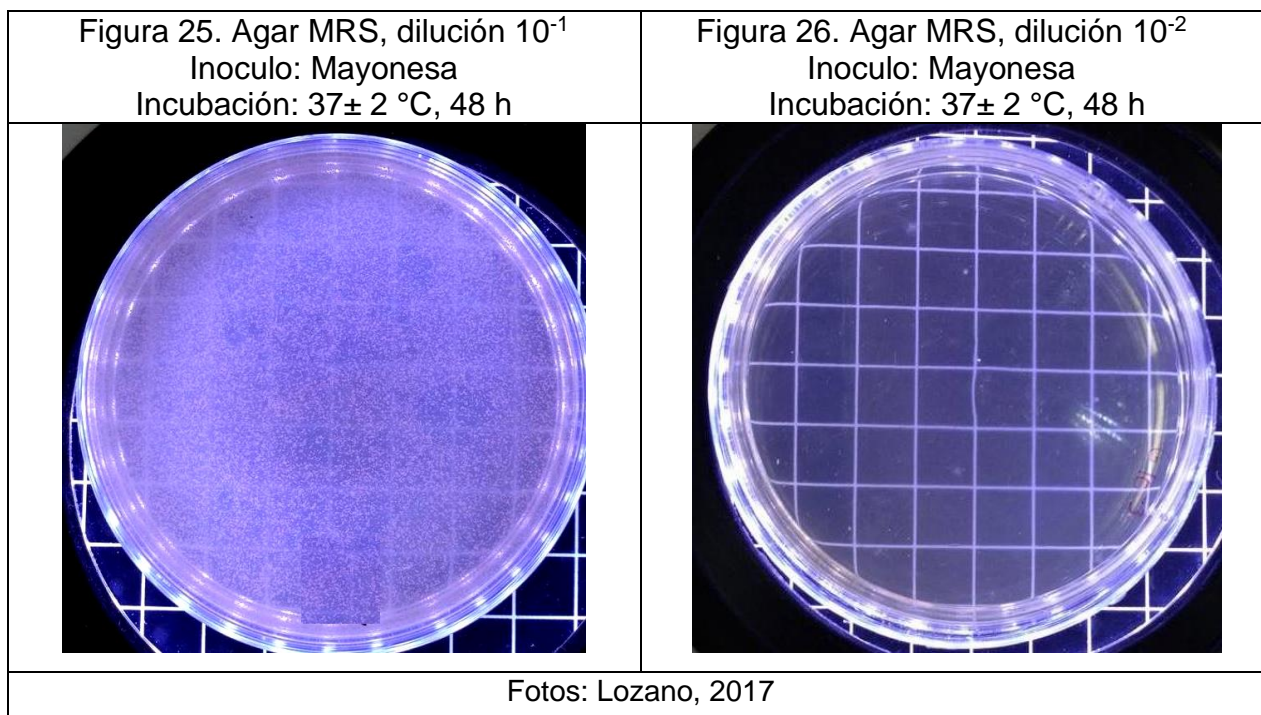
Figura 24. Acercamiento figura 23.



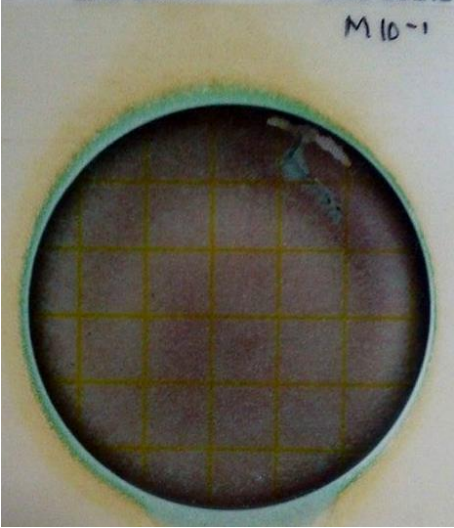
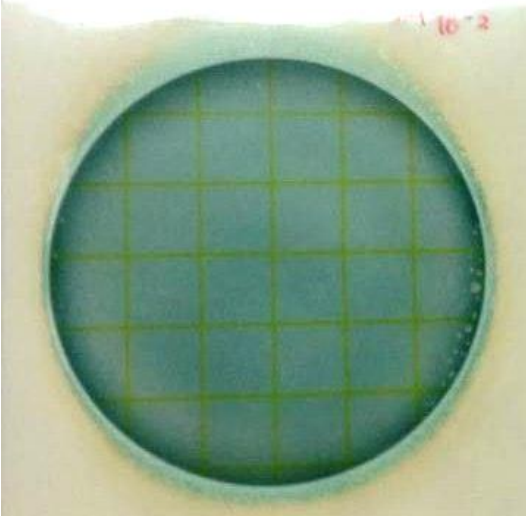
Fotos: Lozano, 2017.

Mayonesa

Como se explica en la estrategia experimental del proyecto, en las primeras pruebas realizadas a la mayonesa no se obtuvieron resultados satisfactorios en el recuento de BAL. En el método tradicional se observó que en la primera dilución de la muestra las UFC obtenidas eran MNPC (muy numerosas para contar), como muestra la figura 25 y en la siguiente dilución no se presentó desarrollo como muestra la figura 26.



En los resultados obtenidos por el método Petrifilm se presentó un comportamiento similar, en la primera dilución la placa completa vira a un color púrpura homogéneo, lo cual indica, de acuerdo con la Guía de interpretación de 3M Petrifilm LAB, que la concentración de BAL es muy alta, como muestra la figura 27, y en la segunda dilución las colonias son demasiado pequeñas para contabilizarse, como se muestra en la figura 28. Además, se puede notar que todas las colonias desarrollan en la periferia de la placa, provocando un vire que no permite contabilizarlas.

<p>Figura 27. Placa Petrifilm, dilución 10^{-1} Inóculo: mayonesa Incubación: 37 ± 2 °C, 48 h</p>	<p>Figura 28. Placa Petrifilm, dilución 10^{-2} Inóculo: mayonesa Incubación: 37 ± 2 °C, 48 h</p>
	
<p>Fotos: Lozano, 2017.</p>	

Por este motivo y considerando que en la literatura de referencia empleada (Vanderzant, 2005 y Fialová, 2008), se indica que las BAL pueden desarrollar en diversas condiciones de incubación, se hicieron pruebas para encontrar las condiciones ideales de crecimiento de las BAL presentes en las muestras de mayonesa.

ETAPA 3. Determinación de las condiciones ideales de trabajo para la cuantificación de BAL en las muestras comerciales de mayonesa.

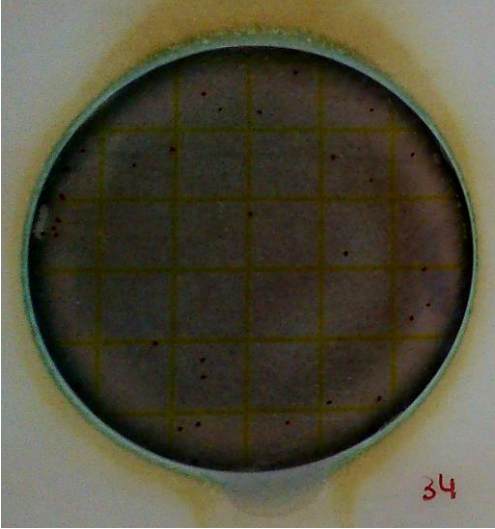
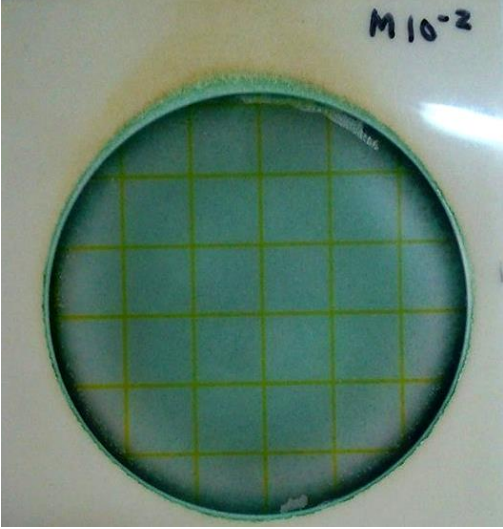
Debido a que en la literatura consultada (Vanderzant, 2005 y Fialová, 2008) se indica que las BAL presentes en muestras de mayonesa pueden desarrollar en diferentes intervalos de temperatura, tiempo y pH se realizaron modificaciones en la prueba para establecer las condiciones ideales de trabajo y así poder obtener mejores resultados en el análisis de esta matriz en particular.

A continuación, se presentan los cambios realizados, así como los resultados obtenidos de estas modificaciones.

Tiempo de incubación.

Considerando el estudio realizado por Fialová y colaboradores (2008), en donde se analizaron diferentes muestras de salsa, entre ellas mayonesa, la cual fue incubada durante 72 h a 37 °C, se realizó esta modificación.

Como puede observarse en las figuras 29 y 30, las capas plásticas del borde exterior de las placas Petrifilm LAB al tercer día de incubación se observaban quemadas, adicional, la tendencia observada en la etapa 2 seguía presentándose, en la primera dilución de la muestra se observaba un vire completo de la placa, como se muestra en la figura 29, mientras que en la segunda dilución se observaba un vire en el borde de la placa, sin distinguirse colonias en sí, como se puede ver en la figura 30.


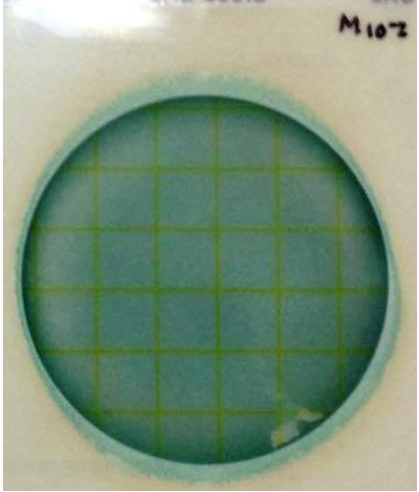
<p>Figura 29. Placa Petrifilm, dilución 10^{-1} Inóculo: mayonesa Incubación: 37 ± 2 °C, 72 h</p>	<p>Figura 30. Placa Petrifilm, dilución 10^{-2} Inóculo: mayonesa Incubación: 37 ± 2 °C, 72 h</p>
	
<p>Fotos: Lozano, 2017.</p>	

De los resultados obtenidos de esta prueba se concluyó que el tiempo de incubación no es un factor clave para la cuantificación de BAL en la muestra de mayonesa, ya que con esta modificación no se obtuvieron mejores resultados que los obtenidos en la segunda etapa. Es importante mencionar que la apariencia quemada de las placas incubadas a 72 horas presenta concordancia con lo indicado por el proveedor, ya que la compañía 3M indica que el tiempo máximo de incubación de las placas es de 51 horas, con esta consideración, se descartó la modificación del tiempo de incubación para la cuarta etapa del estudio.

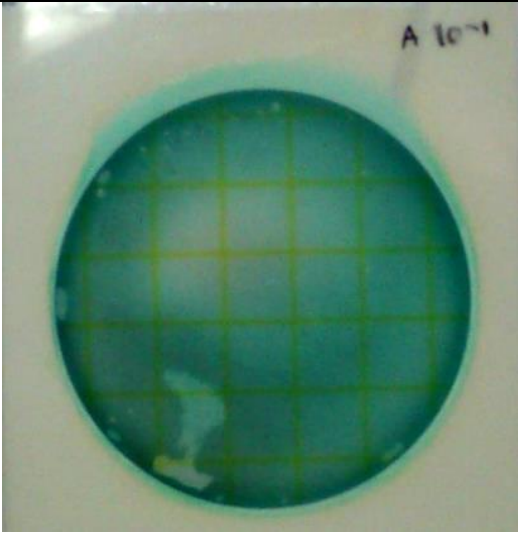

pH de la dilución primaria.

De acuerdo con el estudio realizado por Fialová y colaboradores (2008), las BAL presentes en muestras de mayonesa y salsas pueden desarrollar en medios con pH 4.5 y 7.0, por este motivo la dilución primaria de la muestra de mayonesa fue ajustado a estos dos valores previo a la inoculación de las placas.

Como se observa en la figura 31, en el borde de la placa de la primera dilución que fue ajustada a pH 4.5 se observa el vire de color morado, el cual evidencia la presencia de BAL, sin embargo, no es posible realizar el conteo de las colonias. En la siguiente dilución este vire aún se observa, aunque un poco más tenue (figura 32).

<p>Figura 31. Placa Petrifilm, dilución 10^{-1} Inóculo: mayonesa Incubación: 37 ± 2 °C, 48 h, pH: 4.5</p>	<p>Figura 32. Placa Petrifilm, dilución 10^{-2} Inóculo: mayonesa Incubación: 37 ± 2 °C, 48 h, pH: 4.5</p>
	
<p>Fotos: Lozano, 2017.</p>	

En el caso del ajuste del pH a 7 de la dilución primaria, como se muestra en las figuras 33 y 34, el vire en el borde de la placa se observa en ambas diluciones, sin embargo, tampoco es posible realizar el conteo de colonias, ya que no se aprecian colonias aisladas.

<p>Figura 33. Placa Petrifilm, dilución 10^{-1} Inóculo: mayonesa Incubación: 37 ± 2 °C, 48 h, pH: 7</p>	<p>Figura 34. Placa Petrifilm, dilución 10^{-2} Inóculo: mayonesa Incubación: 37 ± 2 °C, 48 h, pH: 7</p>
	
<p>Fotos: Lozano, 2017.</p>	

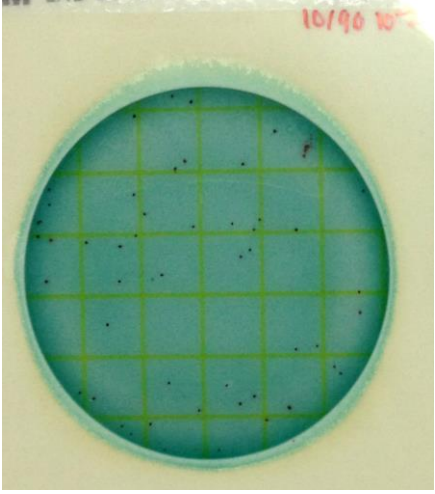
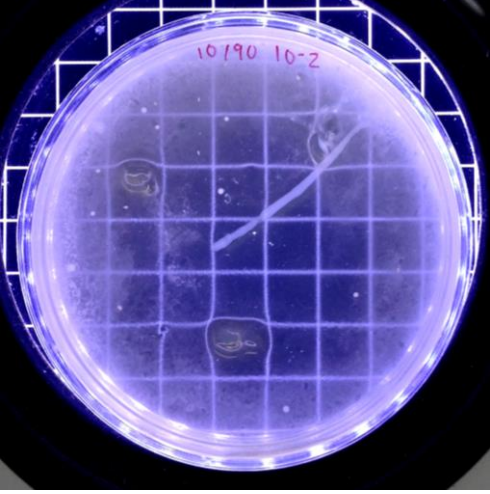
Considerando que en ninguno de los dos casos es posible distinguir aún colonias aisladas con las características del desarrollo de BAL en este tipo de método, se descarta la modificación del ajuste del pH de la dilución primaria como un factor determinante para el desarrollo de las BAL presentes en la muestra.

Temperatura de incubación.

De acuerdo con Vanderzant (2005), la temperatura ideal de desarrollo de las BAL es de 30 ± 2 °C, temperatura que también fue probada con resultados favorables por Fialová y colaboradores (2008) en muestras de mayonesa, por este motivo se considero realizar la incubación de las muestras a esta temperatura a fin de determinar si este cambio mejora la visualización de las colonias aisladas.

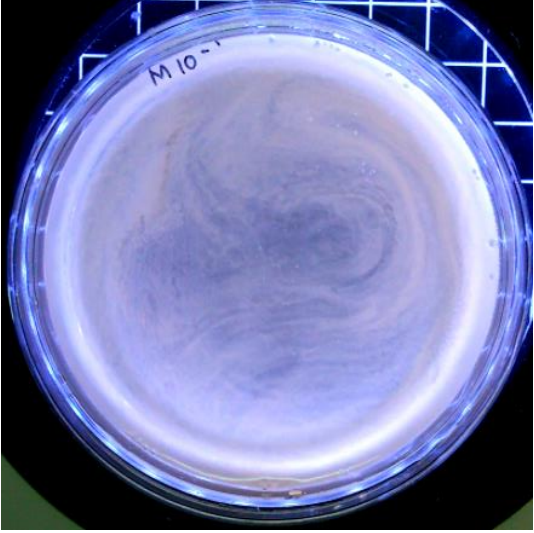
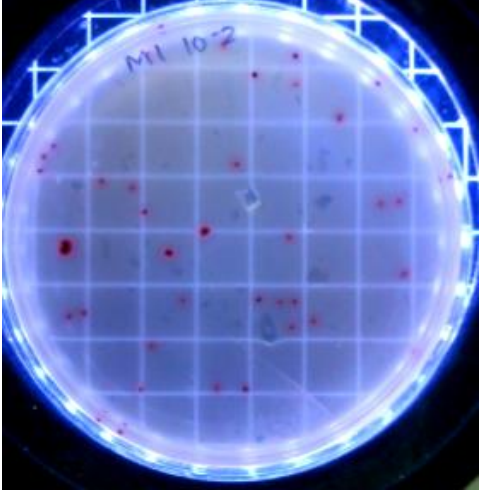
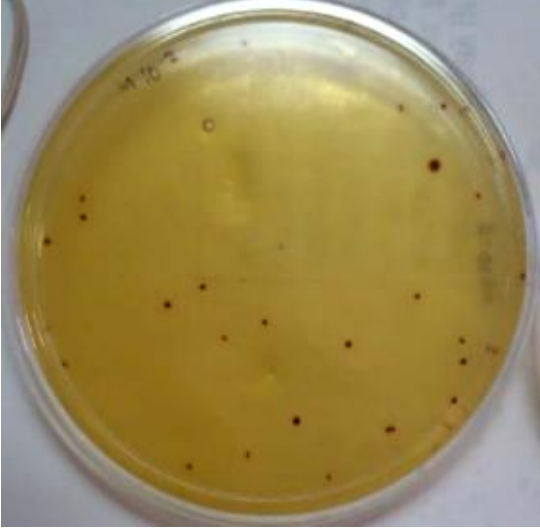
En la figura 35 se muestra una placa Petrifilm LAB incubada a 30 ± 2 °C por 48 h, el pH de dilución de la muestra no fue ajustado (sin ajustar o s.a.) y como puede apreciarse en la imagen las colonias se observan claramente. En lo que respecta al método tradicional, estas condiciones de trabajo también son las ideales, ya que como se

muestra en la figura 36, las colonias también pueden apreciarse claramente en la dilución 10^{-2} de la muestra.

Figura 35. Placa Petrifilm, dilución 10^{-2} Inóculo: mayonesa Incubación: 30 ± 2 °C, 48 h, pH: 3.9 (s.a.)	Figura 36. Agar MRS, dilución 10^{-2} Inóculo: mayonesa Incubación: 30 ± 2 °C, 48 h, pH: 3.9 (s.a.)
	
Fotos: Lozano, 2017.	

Por lo tanto, con base en los resultados de esta tercera etapa, se puede concluir que las condiciones óptimas de trabajo para la cuantificación de BAL en mayonesa por el método tradicional y Petrifilm son: temperatura óptima: 30 ± 2 °C, tiempo de incubación: 48 ± 2 h; no es necesario ajustar el pH de la dilución.

El uso de TTC también ayudo de manera considerable para el recuento de las colonias desarrolladas en la mayonesa mediante el uso del método tradicional, como se observa en la figura 37 en la primera dilución no es posible contabilizar las colonias, principalmente por dos motivos: la alta carga microbiana y la apariencia “lechosa” producida por la matriz, como puede observarse en la figura 38 en la siguiente dilución las colonias son perfectamente distinguibles por el intenso color rojo que presentan, el cual es distinguible aun sin el uso del cuenta colonias, como se aprecia en la figura 39.

<p>Figura 37. Agar MRS, dilución 10^{-1} Inóculo: mayonesa Incubación: 30 ± 2 °C, 48 h, pH: 3.9 (s.a.)</p>	<p>Figura 38. Agar MRS, dilución 10^{-2} Inóculo: mayonesa Incubación: 30 ± 2 °C, 48 h, pH: 3.9 (s.a.)</p>
	
<p>Figura 39. Agar MRS, dilución 10^{-2} Inóculo: mayonesa Incubación: 30 ± 2 °C, 48 h, pH: 3.9 (s.a.)</p>	
	
<p>Fotos: Lozano, 2017.</p>	

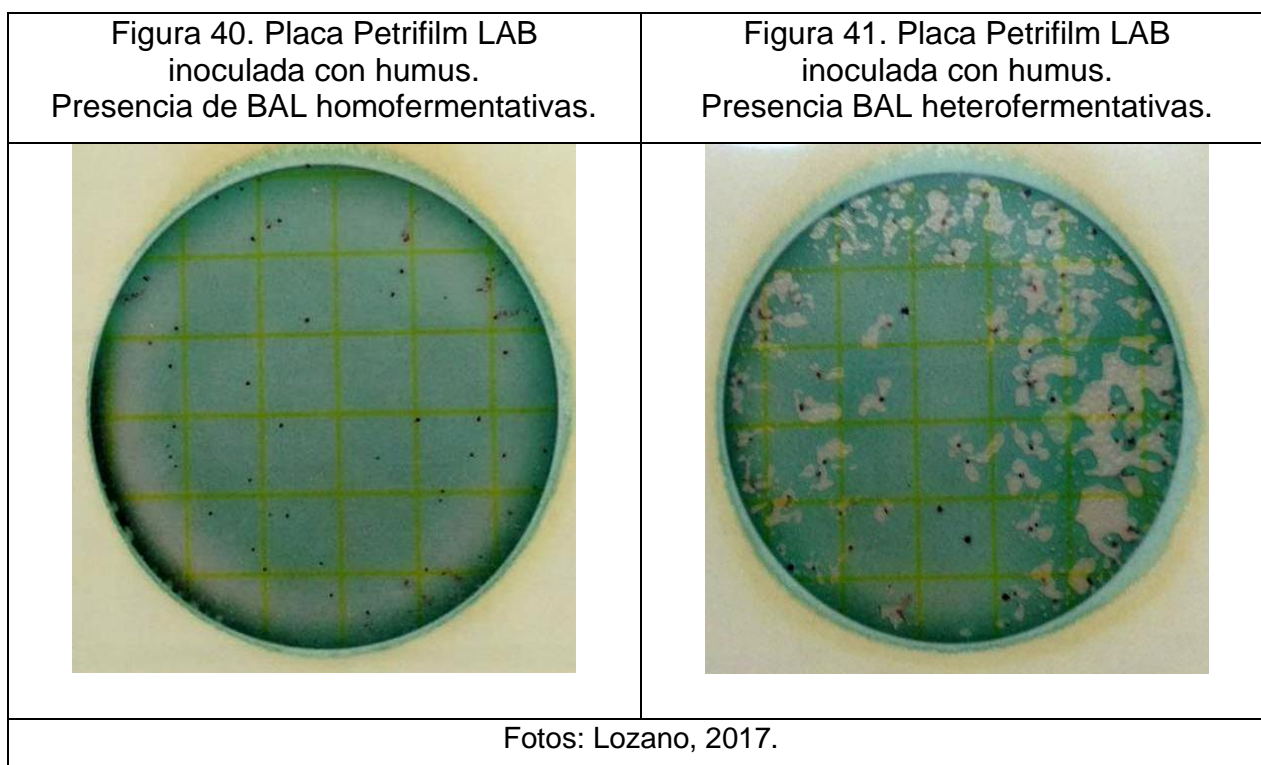
Una vez establecidas estas condiciones, se procedió a la siguiente etapa.

Etapla 4. Cuantificación de BAL durante la vida de anaquel de las muestras bajo estudio.

❖ **Humus**

Tabla 11. Caracterización microbiológica de humus comerciales durante su vida de anaquel									
BAL (UFC/g)									
Tiempo (días)	<i>Obela</i>			<i>Hommos</i>			<i>Libanius</i>		
	pH	MT	3M LAB™	pH	MT	3M LAB™	pH	MT	3M LAB™
0	5.0	84x10 ⁴	66x10 ⁴	4.8	25x10 ⁵	9x10 ⁴	4.7	>25x10 ⁵ (v.e.)	>25x10 ⁵ (v.e.)
15	4.8	24x10 ⁵	18x10 ⁵	4.8	50x10 ⁷	34x10 ⁷	4.4	35x10 ⁸	19x10 ⁸
30	4.7	35x10 ⁶	53x10 ⁶	4.7	90x10 ⁸	20x10 ⁸	4.4	60x10 ⁸	10x10 ⁸

MT: método tradicional; 3M LAB™: placas Petrifilm LAB; v.e.: valor estimado



Como se mencionó anteriormente, una de las ventajas del uso de las placas Petrifilm LAB es la fácil identificación del tipo de bacterias ácido lácticas presentes en la

muestra, en el caso de las BAL homofermentativas, como se aprecia en la figura 40, no se presenta gas en las placas, mientras que las BAL heterofermentativas se pueden distinguir de las primeras por la presencia de gas asociado a las colonias, como se observa en la figura 41. Ambos tipos de BAL se presentaron en las muestras de humus analizadas.

Figura 42. Comportamiento de las BAL presentes en el humus *Obela* durante su vida de anaquel.

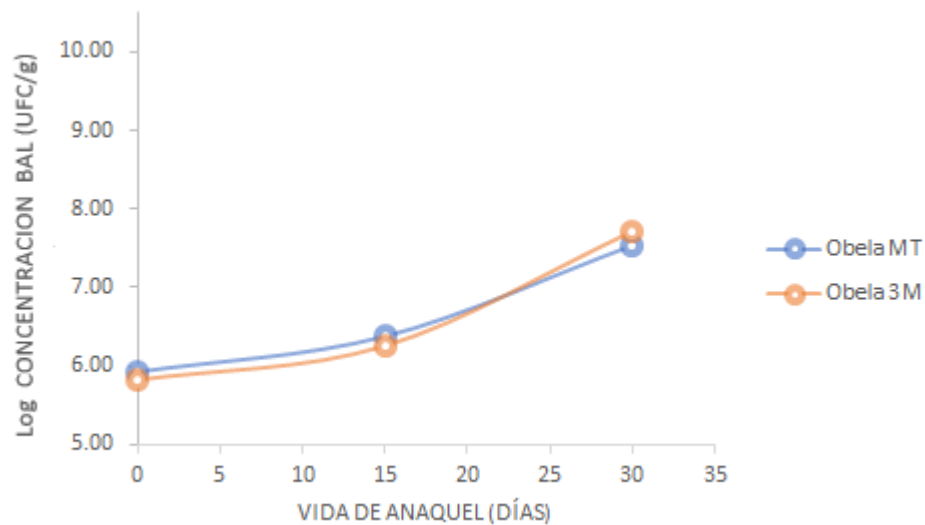


Figura 43. Comportamiento de las BAL presentes en el humus *Hommos* durante su vida de anaquel.

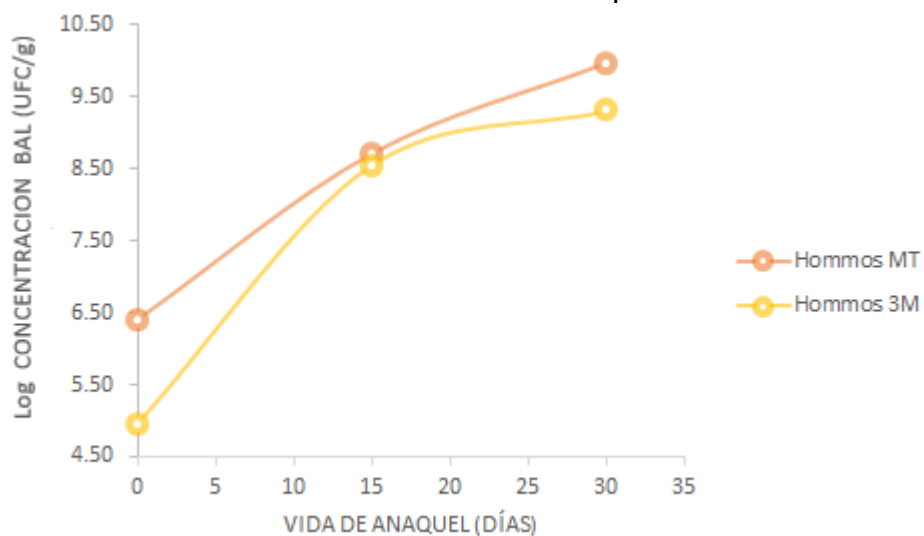
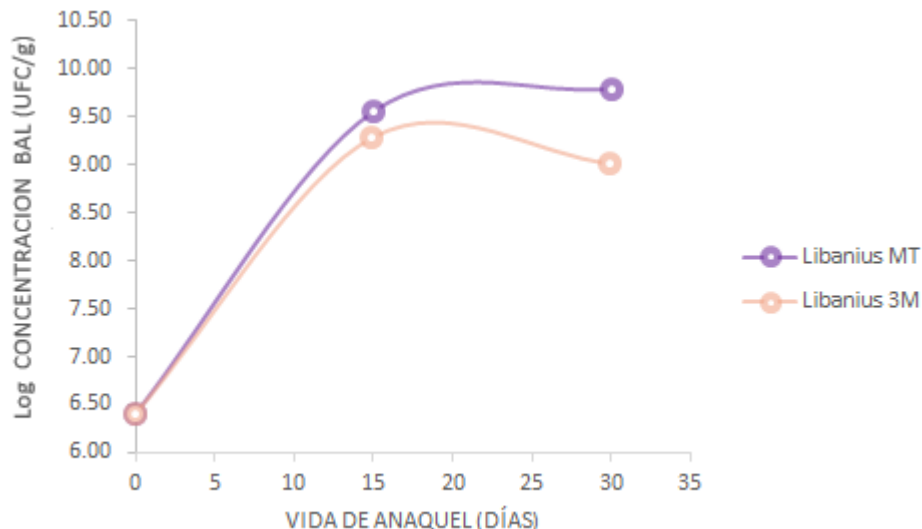


Figura 44. Comportamiento de las BAL presentes en el humus *Libanius* durante su vida de anaquel.



En la tabla 11 se presentan los resultados de la cuantificación de BAL durante la vida de anaquel en las tres muestras comerciales de humus analizadas. Se puede ver que el pH de las muestras disminuye con el tiempo lo cual se esperaba, ya que a partir de la utilización de diversos sustratos se producen ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico), consecuencia del metabolismo de este grupo bacteriano, siendo la muestra de humus *Libanius* la que presenta el pH más bajo durante todo el estudio.

En las figuras, 42, 43, 44 se presenta de manera gráfica el comportamiento de este grupo microbiano a través del tiempo de almacenamiento de las unidades de prueba, mismo que se llevó a cabo de acuerdo con lo establecido por los fabricantes: las muestras se mantuvieron perfectamente cerradas, en refrigeración.

Con base en los resultados obtenidos, se puede decir que en las tres muestras el comportamiento de las BAL siguió la misma tendencia, la población de BAL aumentó durante el periodo de almacenamiento de los productos. Estos resultados presentan concordancia con lo obtenido en otros estudios como el realizado por Fialová y colaboradores (2008), en donde se determinó que el desarrollo de lactobacilos en muestras de salsa tártara y salsa tártara adicionada con lactobacilos incrementó a través de la vida útil de estas muestras; por otra parte, Stella y colaboradores (2013),

determinaron que la población predominante en muestras de carne de bovino empacada al vacío durante su almacenamiento fueron los lactobacilos, sin detectar la presencia de *Pseudomonas*, *E. coli* o *Clostridium* sulfito reductor, tales resultados reflejaron además una selección de la población de lactobacilos, que superó a las otras clases de bacterias durante el almacenamiento prolongado (100 días).

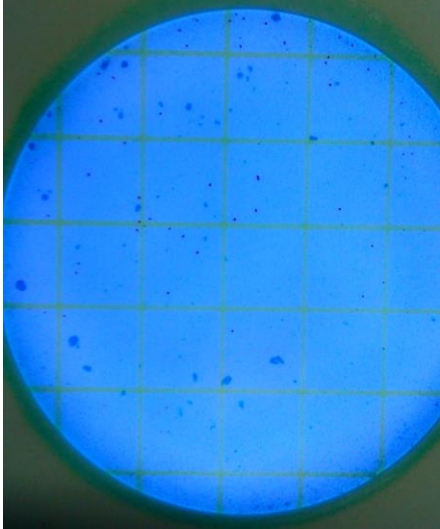
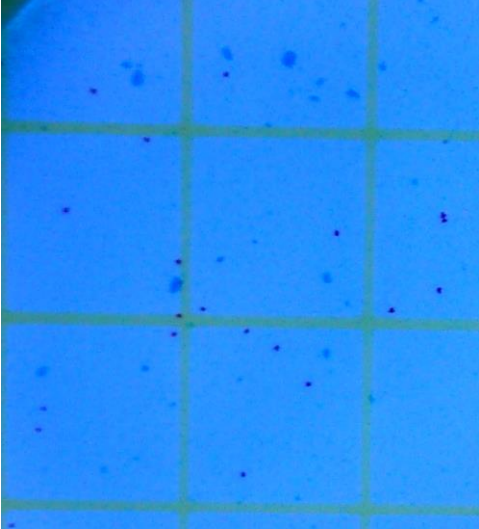
En la figura 44 podemos ver una excepción a esta tendencia, ya que la concentración de BAL a los 30 días de almacenamiento de la muestra comercial de humus *Libanius* disminuye respecto a la concentración presentada en el día 15, esta tendencia puede observarse específicamente en el caso de la cuantificación de este grupo mediante el uso de las placas Petrifilm LAB. Esta tendencia podría ser explicada por el pH final que presenta la muestra, como se comentó anteriormente, la muestra en cuestión tenía un pH final de 4.4 siendo este el pH más bajo de todas las muestras, considerando algunos estudios realizados con anterioridad, como el realizado por LeBlanc y colaboradores (2004), quienes informaron que el crecimiento de *Lactobacillus fermentum* fue notablemente más lento a pH 4.5 que a otros valores de pH (5.0, 5.5 y 6.0), mientras que Mataragas y colaboradores (2003) indicaron que a pH 4.5, la biomasa final y la actividad bacteriocina de *Leuconostoc mesenteroides* eran muy bajas podría ser cierto.

En las figuras 42, 43 y 44 también se puede observar que, de manera general, la cantidad de BAL cuantificada por el método Petrifilm LAB es ligeramente menor que la cantidad cuantificada por el método tradicional.

Este resultado podría deberse a una sobre estimación de la cantidad de BAL por el método tradicional, relacionado principalmente con dos factores: el primero, la interferencia de la matriz alimentaria en la interpretación de las placas, ya que en estas quedaban partículas pequeñas del alimento que podían llegar a confundirse con colonias, las cuales son muy pequeñas. El segundo, a la baja selectividad del medio de cultivo empleado para la determinación. De acuerdo con la hoja técnica del agar MRS de laboratorios Britania (2017) el monoleato de sorbitán, las sales de sodio, magnesio y manganeso contenidas en el agar MRS proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos, mientras que el citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram

negativas; con base en lo anterior, se puede suponer que otras bacterias Gram positivas diferentes de las BAL presentes en las muestras de humus, pueden desarrollar en el agar MRS, y por lo tanto, afectar los resultados obtenidos. No se puede decir mucho acerca de la selectividad del medio de cultivo de las placas Petrifilm LAB™, debido a que la compañía 3M no indica la composición del medio, solo se establece que las placas contienen agentes selectivos. Con base en esto y en los resultados obtenidos se puede suponer que estos agentes selectivos sean mejores que los presentes en el agar MRS y por lo tanto las placas Petrifilm LAB son más selectivas que el medio MRS.

Una de las ventajas del uso de las placas Petrifilm LAB® para el análisis de muestras que contienen sólidos pequeños, como el humus, es que estas partículas no interfieren en la interpretación de los resultados, ya que las partículas sólidas del alimento no se tiñen de color violeta como las BAL. En las figuras 45 y 46 se puede observar la presencia de manchas color azul en las placas Petrifilm LAB® además de la presencia de colonias de BAL de color violeta; mediante una tinción de Gram pudo determinarse que dichas manchas azules no son colonias de bacterias, sino partículas de alimento.

<p>Figura 45. Placa Petrifilm LAB. Muestra: humus, dilución 10⁻³</p>	<p>Figura 46. Acercamiento figura 45.</p>
	
<p>Fotos: Lozano, 2017.</p>	

❖ **Mayonesa**

Debido a las dificultades para el recuento de las BAL presentes en las muestras comerciales de mayonesa, se agotó el material Petrifilm disponible y ya no fue posible determinar la concentración de BAL presente en muestras comerciales de mayonesa durante su vida útil.

Etapa 4. Validación de las placas Petrifilm LAB® 3M®

❖ **Humus**

Las hipótesis de trabajo son:

H₀: No existe diferencia estadística significativa en los resultados del recuento de bacterias ácido-lácticas en el humus, entre los métodos Petrifilm 3M LAB® y el método tradicional.

H₁: Sí hay diferencia estadísticamente significativa entre el recuento promedio de bacterias ácido-lácticas en el humus, entre los métodos Petrifilm 3M LAB® y el método tradicional.

Por lo tanto, las dos hipótesis a probar son:

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$$H_1: \mu \neq \mu_0$$

Donde μ es la media obtenida del análisis tradicional y μ_0 es la media obtenida del análisis por el método Petrifilm.

Tabla 12. Parámetros estadísticos del recuento de BAL en humus.				
Parámetro estadístico	Muestra sin inocular (log UFC/g humus)		Muestra inoculada (log UFC/g humus)	
	MT	3M LAB	MT	3M LAB
Promedio (x)	1.445	1.370	2.433	2.278
Desviación (S)	0.126	0.111	0.058	0.150
Varianza (σ)	0.013	0.012	0.003	0.022
Grados de libertad	29		29	
t crítica	± 2.045		± 2.045	
t calculada	2.53		5.40	
DIFERENCIA SIGNIFICATIVA	SI HAY (Nivel de confianza=95, $\alpha= 0.025$)		SI HAY (Nivel de confianza=95, $\alpha= 0.025$)	

Figura 47. Diagrama de cajas y bigotes para el análisis de humus sin inocular

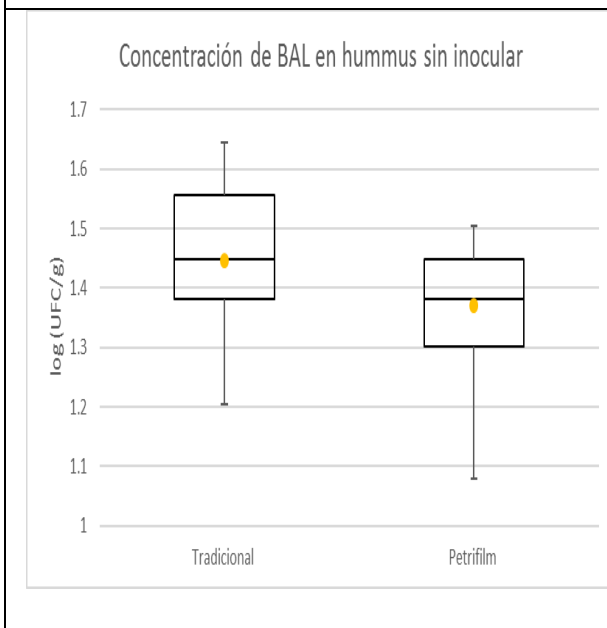
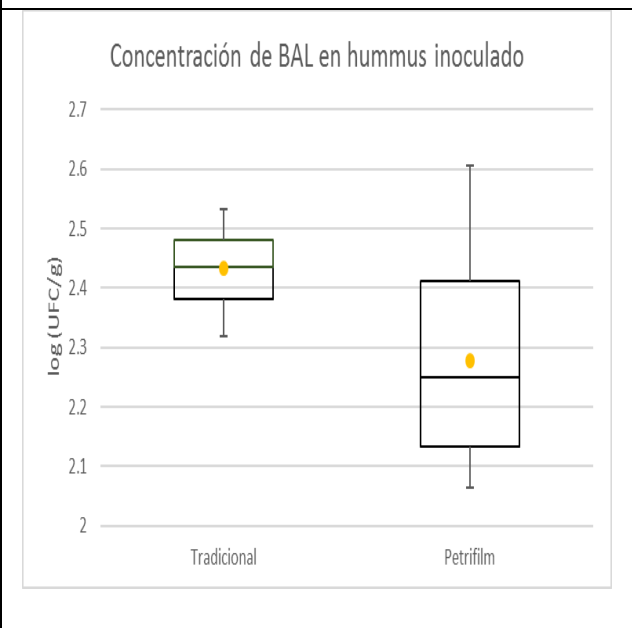


Figura 48. Diagrama de cajas y bigotes para el análisis de humus inoculado.



La tabla 12 muestra los parámetros estadísticos de la prueba t para la determinación de BAL en la muestra de humus *Obela* sin inocular e inoculada con *L. lactis*. La prueba t de Student muestra que sí existe diferencia estadísticamente significativa en la determinación de BAL por ambos métodos. Mediante el análisis de los diagramas de cajas y bigotes (figuras 47 y 48) elaborados con los resultados obtenidos de la validación del método Petrifilm LAB para la cuantificación de BAL en humus podemos

decir que, respecto al análisis de la muestra sin inocular, el método Petrifilm presenta una eficiencia de recuperación similar a la que presenta el método tradicional, ya que la dispersión de los datos es muy similar entre ambos métodos, pero aun así es significativamente diferente, según la t de Student. La dispersión de los datos es muy similar entre ambos métodos, por ello el valor de t calculado es bastante cercano al valor de t crítico. En el caso de la muestra inoculada podemos observar que el método tradicional es más eficiente en el recuento de las bacterias presentes, además de que la dispersión de los datos es considerablemente menor en MT en comparación con Petrifilm LAB.

Además, se puede observar que la media de UFC BAL/ g de humus del método tradicional es mayor que la media obtenida por el método Petrifilm LAB, lo cual concuerda con los resultados obtenidos de la cuantificación de BAL durante la vida de anaquel del producto.

Debido a las características de la muestra, se observó la presencia de partículas de alimento en las diversas diluciones realizadas, este hecho interfiere en la interpretación de las placas obtenidas por el método tradicional. Para este estudio se utilizó TTC como indicador de metabolismo celular como se recomienda en la literatura (Leuschner, 2002; Colombo, 2014), pero cuando no se utiliza, puede generar una sobre estimación de la cantidad de BAL

❖ **Mayonesa**

Las hipótesis de trabajo son las siguientes:

H₀: el recuento promedio de bacterias ácido-lácticas en la mayonesa por el método Petrifilm LAB[®] 3M[®] no presenta diferencia estadísticamente significativa respecto al recuento promedio de bacterias ácido-lácticas por el método tradicional.

H₁: el recuento promedio de bacterias ácido-lácticas en la mayonesa por el método Petrifilm LAB[®] 3M[®] presenta diferencia estadística significativa respecto al recuento promedio de bacterias ácido-lácticas por el método tradicional.

Por lo tanto, las dos hipótesis a probar son:

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$$H_1: \mu \neq \mu_0$$

Donde μ es la media obtenida del análisis tradicional y μ_0 es la media obtenida del análisis por el método Petrifilm.

Tabla 13. Parámetros estadísticos del recuento de BAL en mayonesa.				
Parámetro estadístico	Muestra sin inocular (log UFC/g mayonesa)		Muestra inoculada (log UFC/g mayonesa)	
	MT	3M LAB	MT	3M LAB
Promedio (x)	2.550	2.628	2.403	2.404
Desviación (s)	0.210	0.154	0.254	0.240
Varianza (σ)	0.043	0.023	0.062	0.055
Grados de libertad	29		29	
t crítica	± 2.045		± 2.045	
t calculada	1.678		0.002	
DIFERENCIA SIGNIFICATIVA	NO HAY (Nivel de confianza=95, $\alpha= 0.025$)		NO HAY (Nivel de confianza=95, $\alpha= 0.025$)	

Figura 49. Diagrama de cajas y bigotes para el análisis de mayonesa sin inocular.

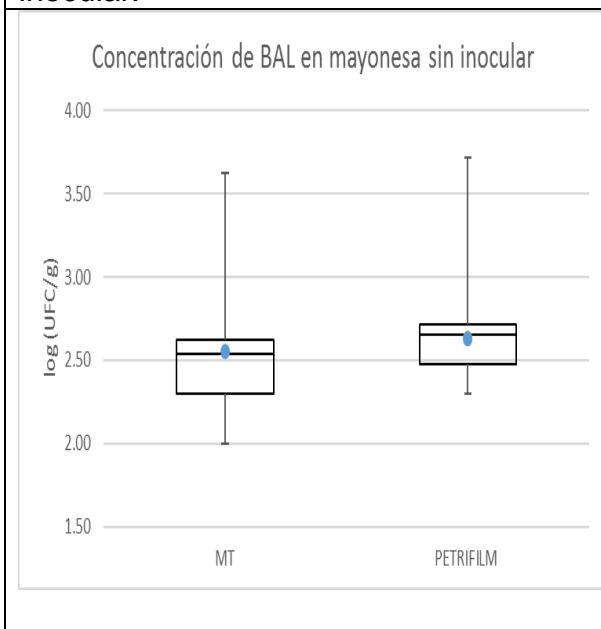
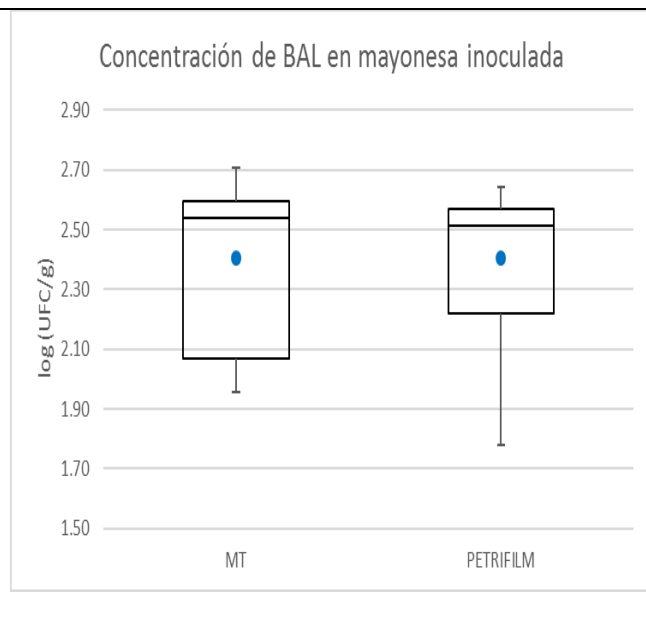


Figura 50. Diagrama de cajas y bigotes para el análisis de mayonesa inoculada.



La tabla 13 muestra los parámetros estadísticos de la prueba t para la determinación de BAL en la muestra de mayonesa *Mayorela* sin inocular e inoculada con *L. lactis*. La prueba t de Student muestra que no existe diferencia estadísticamente significativa en la determinación de BAL por ambos métodos. Mediante el análisis de la figura 49 que corresponde al diagrama de cajas y bigotes del análisis de mayonesa sin inocular, podemos decir que la eficiencia para el recuento de BAL del método Petrifilm LAB es muy similar a la presentada por el método tradicional ya que la media de ambos métodos es muy cercana, inclusive se podría decir que la eficiencia del método Petrifilm LAB es ligeramente mayor, aunque la diferencia no es significativa estadísticamente. Además, la dispersión de los datos obtenidos por el método Petrifilm LAB es menor.

Mediante el análisis de la figura 50, el cual corresponde al diagrama de cajas y bigotes de la determinación de BAL en la muestra de mayonesa inoculada se puede decir que la eficiencia de ambos métodos es prácticamente igual, pero en Petrifilm LAB, la dispersión de los datos es menor que en MT.

En la tabla 13 y en las figuras 49 y 50 también se puede observar que la cantidad promedio de BAL es mayor en la muestra sin inocular que en la muestra inoculada, este resultado no es lo que se esperaba, ya que en el análisis de la muestra inoculada se cuantifica la cantidad de BAL presentes en la muestra más la cantidad que se adiciona de manera intencional, por lo tanto, podríamos decir que algo interfirió en el análisis de la muestra inoculada. A partir de este resultado se decidió hacer las pruebas de inhibición de la muestra de mayonesa empleada, para determinar si esto fue lo que afectó el análisis.

También se recomienda realizar pruebas de no interferencia para determinar si otras bacterias Gram positivas pueden desarrollar en agar MRS y/o en las placas Petrifilm LAB.

Etapa 5. Pruebas de inhibición en la mayonesa.

❖ Determinación de ácido benzoico y/o ácido sórbico

Ácido benzoico		Ácido sórbico		
	Concentración ácido benzoico (mg/mL)	ABS promedio (226 nm)	Concentración ácido sórbico (mg/mL)	ABS promedio (251 nm)
1	0.0008	0.085	0.0004	0.174
2	0.0016	0.246	0.0008	0.314
3	0.0024	0.387	0.0012	0.492
4	0.0032	0.537	0.0016	0.684
5	0.0040	0.664	0.0020	0.898
6	0.0048	0.783	0.0024	1.064
M	-----	0.091	-----	0.249

M: mayonesa

Figura 51. Curva patrón ácido benzoico

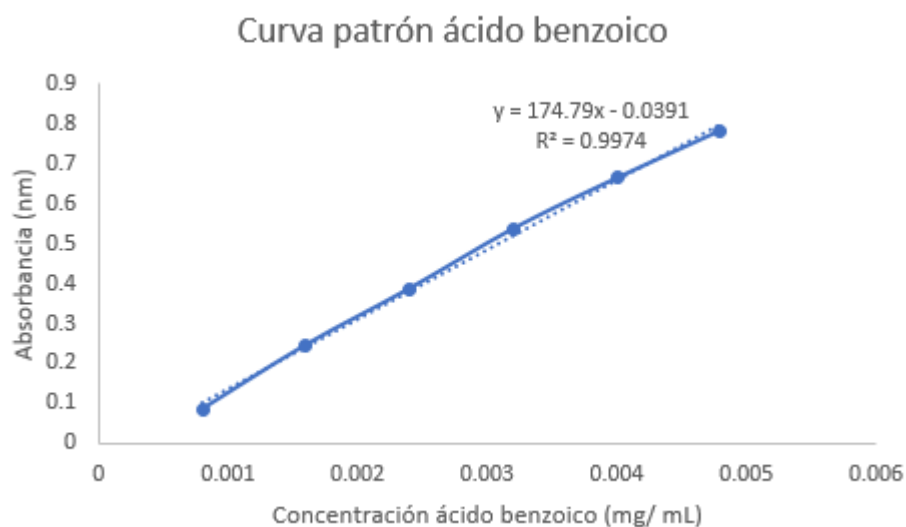
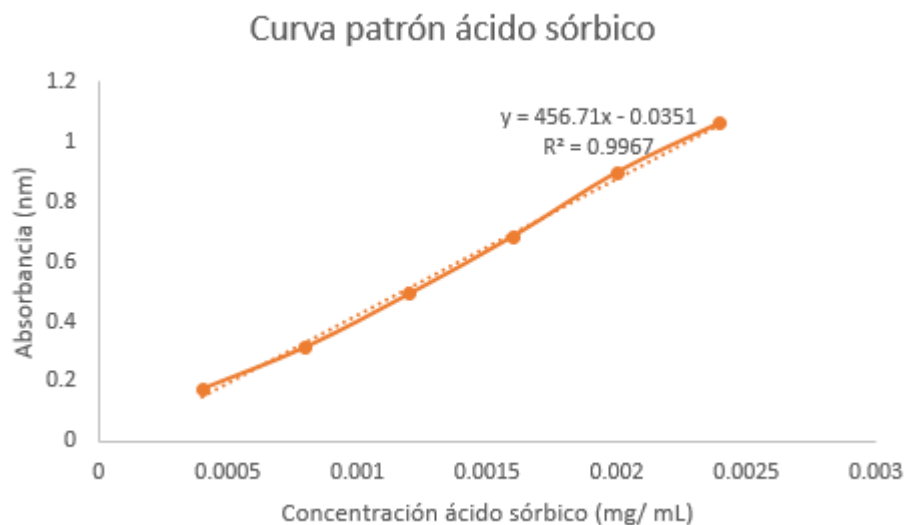


Figura 52. Curva patrón ácido sórbico



Cálculo de ácido benzoico y ácido sórbico en la muestra de mayonesa.

$$[AB] = \frac{0.091 + 0.0391}{174.79} = \left(\frac{0.000744 \text{ mg AB}}{\text{mL éter}} \right) \left(\frac{100 \text{ mL éter}}{10 \text{ g mayonesa}} \right) = \frac{0.00744 \text{ mg AB}}{\text{g mayonesa}}$$

$$[AB] = \frac{0.00744 \text{ mg AB}}{\text{g mayonesa}} = \frac{7.44 \text{ mg AB}}{\text{kg mayonesa}}$$

$$[AS] = \frac{0.249 + 0.0351}{456.71} = \left(\frac{0.000622 \text{ mg AS}}{\text{mL éter}} \right) \left(\frac{100 \text{ mL éter}}{10 \text{ g mayonesa}} \right) = \frac{0.0062 \text{ mg AS}}{\text{g mayonesa}}$$

$$[AS] = \frac{0.0062 \text{ mg AS}}{\text{g mayonesa}} = \frac{6.22 \text{ mg AS}}{\text{kg mayonesa}}$$

En la tabla 14, se presentan las absorbancias promedio obtenidas de la elaboración de la curva patrón para el ácido benzoico y el ácido sórbico, también se presentan las absorbancias obtenidas en la muestra de mayonesa y los cálculos realizados para obtener la concentración de estos conservadores en el producto.

Mediante los resultados obtenidos podemos decir que sí hay presencia de ambos conservadores en la muestra, a pesar de que en la etiqueta del producto no está reportado su uso.

A continuación, se presentan algunos estudios en donde se probó el efecto inhibitor de estos conservadores sobre las bacterias ácido-lácticas:

De acuerdo con Bell y colaboradores (1959), hay inhibición del crecimiento de algunas bacterias ácido-lácticas, específicamente de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Streptococcus* cuando en el medio de cultivo se adiciona ácido sórbico al 0.1 %, cabe recordar que la efectividad de los conservadores como el ácido sórbico y el ácido benzoico depende del pH de la muestra (Bell, 1959). La eficacia de los ácidos orgánicos como tratamiento antimicrobiano depende, no solo de la mezcla de ácidos, sino también del pH en el que se colocan ya que son más efectivos cuando el pH del medio es más bajo que su pKa (Limin, 2018).

Por otra parte Woolford (1975), realizó un estudio para determinar el efecto individual del sorbato de potasio y del benzoato de sodio sobre algunos microorganismos, mostró que la adición de sorbato de potasio inhibe el desarrollo de las bacterias formadoras de esporas (*Clostridium* y *Bacillus*), y la adición de benzoato de sodio afectó el crecimiento de las bacterias del ácido láctico (principalmente heterofermentativas) en alimentos, en condiciones de laboratorio y observó que tienen buenas propiedades antimicrobianas a pH 3 y 4.

En estudios más recientes, Knarreborg y colaboradores (2002) evaluaron el efecto de diversos ácidos (benzoico, fumárico, láctico, butírico, fórmico y propiónico) sobre el crecimiento de bacterias coliformes y bacterias ácido-lácticas en un medio con pH de 4.5 (tracto gastrointestinal de puerco), determinando que el ácido benzoico y, en menor medida, el ácido fumárico ejercieron fuertes propiedades destructoras sobre las bacterias del ácido láctico; el ácido benzoico fue empleado a diversas concentraciones (0, 12.5, 25, 50, 100 y 200 mM), de los resultados obtenidos determinaron que bajas dosis de ácido benzoico inhibieron el crecimiento de las BAL, mientras que las dosis de 50, 100 y 200 mM exhibieron claramente un efecto bactericida. Por otra parte

Østergaard y colaboradores (2014), determinaron el efecto antimicrobiano del ácido sórbico sobre algunas cepas de BAL presentes en queso cottage; en dicho estudio probaron 12 concentraciones, de 0.0 a 2.6 mM de ácido sórbico sin disociar, contra la cepa iniciadora de la fermentación y la cepa encargada de generar aromas en el producto, determinaron que hay una disminución del desarrollo de BAL incluso con concentraciones bajas de ácido sórbico sin disociar (0.5 mM), adicional, mediante el uso de un modelo matemático pudieron establecer la cantidad mínima inhibitoria de ácido sórbico sobre las cepas ($4.62 \pm 0,35$ mM y $5.50 \pm 0,36$ mM de ácido sórbico no disociado para el cultivo iniciador y la cepa encargada de generar aroma, respectivamente). Mientras que, en estudio realizado por Saïdi y colaboradores (2003) se mostró que el sorbato de potasio redujo el crecimiento de las bacterias del ácido láctico y la producción de ácido durante la incubación y el almacenamiento de muestras de yogur, todas las muestras tratadas con sorbato tenían valores de pH más altos y recuentos bacterianos más bajos que las muestras sin sorbato añadido, después de cualquier tiempo de incubación, demostrando así el efecto inhibitorio del sorbato de potasio en BAL.

La muestra de mayonesa empleada para la validación de los métodos presentó un pH de 4.0, una concentración de ácido sórbico de 6.22 mg/ kg y una concentración de ácido benzoico de 7.44 mg/ kg.

Como se mencionó anteriormente, durante la etapa de validación de los métodos empleados para la determinación de BAL en la muestra de mayonesa, se observó que la cantidad promedio de bacterias es mayor en la muestra sin inocular que en la muestra inoculada con la cepa pura. Considerando que en la muestra se detectó la presencia de ácido benzoico y sórbico, podríamos decir que estos conservadores sí presentan un efecto inhibitorio sobre las BAL presentes en el producto, sobre la cepa pura o en ambos.

Esta teoría tendría respaldo con algunos de los estudios antes mencionados, como el realizado por Østergaard (2014), en donde se determinó que el ácido sórbico tenía un efecto inhibitorio sobre las BAL aun a bajas concentraciones (0.1 mM), o el estudio de

Saïdi y colaboradores (2003), en donde se observó que el sorbato de potasio redujo el crecimiento de las bacterias del ácido láctico en un producto en donde la población es considerablemente alta, como es el yogur, o bien, el estudio realizado por Bell y colaboradores (1959), o en el caso del ácido benzoico, los estudios realizados por Woolford (1975) y Knarreborg y colaboradores (2002), en donde se demostró que tanto el benzoato de sodio como el ácido benzoico pueden afectar el desarrollo de las BAL.

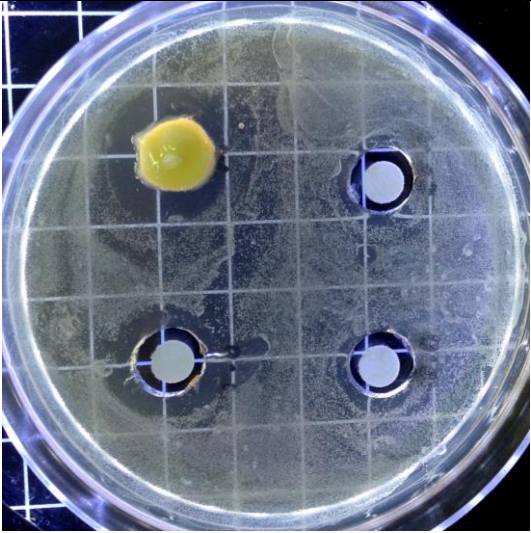
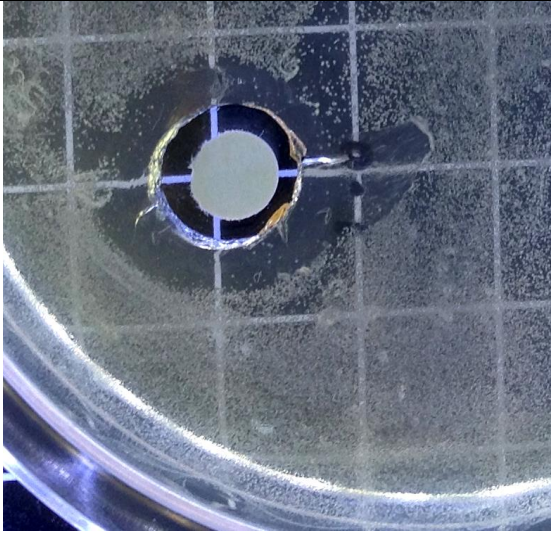


Cabe recordar que en la norma NMX-F-021-S-1979, para la mayonesa no se establece el uso de ácido benzoico o ácido sórbico como conservador, y por lo tanto no hay un límite de uso, sin embargo, la concentración detectada de ácido benzoico en el producto bajo estudio rebaso el límite establecido para el yogur, producto en donde la presencia de BAL es deseable y en donde se requiere cierta concentración de microorganismos vivos, de acuerdo con Esfandiari (2016) los niveles permitidos de ácido benzoico en yogur son de 1.5 a 5 mg/kg, mientras que en la muestra de mayonesa se detectó un valor de 7.44 mg/ kg, en el caso del ácido sórbico la cantidad detectada en la muestra es baja comparada con lo reportado en los estudios antes mencionado, por ejemplo, 6.22 mg/ kg comparada con 0.1 % de ácido sórbico reportado por Bell y colaboradores (1959).

De acuerdo con Limin (2018), los ácidos orgánicos son más efectivos cuando el pH del medio es más bajo que su pKa. En el caso del ácido benzoico su pKa es de 4.2 (Harris, 2007), mientras que el pKa del ácido sórbico es de 4.67 (Ulloa, 2007), considerando que la mayonesa presento un pH de 4.0, podemos decir que ambos ácidos se encontraban en mayor concentración en su forma no disociada, la cual presenta una mayor efectividad en cuanto a inhibición.

❖ **Prueba de antibiosis en mayonesa**

Como se explicó anteriormente, esta prueba se realizó para determinar si existe un efecto de inhibición de la mayonesa sobre el desarrollo del inóculo puro, *L. lactis*, empleado para la prueba de validación. Esta prueba se realizó con la muestra de mayonesa que se empleó para las pruebas de validación.

A continuación, se presentan los resultados de esta determinación.

Pruebas de inhibición en mayonesa <i>Mayorela</i> sobre <i>L. lactis</i> .	
Figura 53. Agar MRS, inóculo <i>L. lactis</i> .	Figura 54. Agar MRS acercamiento figura 53. Concentración de mayonesa 0.1 g/ mL buffer.
	
Figura 55 Agar MRS, acercamiento figura 53. Concentración de mayonesa 0.05 g/ mL buffer.	Figura 56. Agar MRS, acercamiento figura 53. Concentración de mayonesa 0.01 g/ mL buffer.
	
Fotos: Lozano, 2017.	

Como puede observarse en las figuras 53, 54, 55 y 56 hay presencia de un halo de inhibición en la caja Petri con agar MRS en la cual se llevó a cabo la prueba, esto quiere

decir que en el área en donde el cultivo puro *L. lactis* estuvo en contacto con la muestra de mayonesa no se permitió el desarrollo; esto se observa en todas las concentraciones que fueron analizadas (0.1, 0.05 y 0.01 g mayonesa/ mL buffer), dos de las cuales son las concentraciones de mayonesa con las que se trabajó durante la validación de las placas Petrifilm LAB (0.1 g mayonesa/ mL de buffer y 0.01 g mayonesa/ mL de buffer).

Mediante esta prueba se puede comprobar que la matriz empleada sí afecta el desarrollo de la cepa pura, por ello la concentración de BAL cuantificada mediante ambos métodos en la muestra inoculada es inferior a la cantidad determinada en la muestra sin inocular.

La inhibición de la cepa de prueba puede deberse tanto a la presencia de ácido benzoico y ácido sórbico en la muestra de mayonesa empleada para la validación, así como al efecto de antibiosis por parte de las BAL presentes en la muestra de manera natural.

En la figura 50 podemos observar que la cantidad cuantificada de BAL en la muestra inoculada, por ambos métodos es menor a la cantidad cuantificada en la muestra sin inocular, por lo tanto, se puede decir que el efecto de inhibición del crecimiento de *L. lactis* es similar en ambos métodos. Este resultado tampoco se esperaba, ya que se considera que, en el método tradicional, el inhibidor se diluye aún más ya que se adicionan de 18 a 20 mL de agar a la dilución de la matriz alimentaria, a diferencia del método Petrifilm, en donde no hay ninguna dilución posterior de la muestra, ya que las placas empleadas cuentan con el medio de cultivo deshidratado. Esto nos hace pensar que el mayor efecto de inhibición sobre *L. lactis* es la antibiosis por otras BAL presentes en la muestra.

CONCLUSIONES

El uso de las placas Petrifilm 3M LAB[®] permite el fácil recuento de bacterias ácido-lácticas en productos alimenticios como el yogur, humus y mayonesa.

Para realizar adecuadamente el recuento de las bacterias ácido-lácticas en la mayonesa fue necesario determinar la temperatura óptima de desarrollo mediante ambos métodos, tradicional y Petrifilm 3M LAB[®]. La temperatura óptima es de 30°C y con una incubación de 48 h.

Se recomienda realizar pruebas previas para encontrar las condiciones de trabajo ideales para el recuento de bacterias ácido-lácticas en otras matrices alimenticias por el método Petrifilm 3M LAB[®], ya que el intervalo de crecimiento de este grupo es bastante amplio y por lo tanto la temperatura de incubación de las placas Petrifilm 3M LAB[®] también lo es.

La cantidad de BAL en el humus aumentó conforme aumentaba el tiempo de almacenamiento; la población de BAL afecta las características sensoriales deseadas por el consumidor en este producto, por la alta producción de metabolitos; por ello es muy importante el monitoreo y recuento de este grupo bacteriano en los alimentos perecederos.

Los resultados de la validación del método Petrifilm 3M LAB[®] frente al método tradicional en agar MRS y anaerobiosis, son los siguientes:

Para la determinación de bacterias ácido-lácticas en humus, sí existe diferencia estadísticamente significativa ($P= 0.05$), por lo tanto, el método tradicional no puede reemplazarse con las placas Petrifilm LAB[®] 3M[®] para esta determinación, con el límite de confianza establecido.

Para la determinación de bacterias ácido-lácticas en mayonesa, no existe diferencia estadísticamente significativa entre métodos ($P= 0.05$), por lo tanto, se recomienda el uso de las placas Petrifilm 3M LAB[®] para determinar bacterias ácido-lácticas en esta matriz alimentaria, con el límite de confianza establecido; así se pueden aprovechar las

ventajas que éstas presentan, como es la comodidad de uso, la facilidad de interpretación, el ahorro de energía, tiempo de análisis y espacio durante la incubación, entre otros.

El método Petrifilm LAB® 3M® presenta una mayor eficiencia de recuperación de las bacterias ácido-lácticas presentes en dos de las tres matrices alimenticias analizadas, yogur y mayonesa, comparada con el método tradicional.

En la tercera matriz alimenticia, el hummus, la eficiencia de recuperación fue menor por el método Petrifilm LAB® 3M®, esto demuestra la importancia de la validación del método para cada matriz específica. Aunque en este caso no influyó por el uso de TTC, debe considerarse la posibilidad de una sobre estimación de las unidades formadores de colonias cuantificadas por el método tradicional, debido a la interferencia de partículas de hummus que quedan en las placas con agar MRS; como este problema no se presenta en las placas Petrifilm 3M LAB® vale la pena revisar las habilidades de los analistas y considerar el uso de TTC.

Con base en lo anterior podemos decir que las placas Petrifilm LAB® 3M® son una buena opción para el análisis de muestras heterogéneas cuyas partículas interfieren en la interpretación de resultados obtenidos por otros métodos (como el tradicional), ya que los indicadores que contiene ayudan a la fácil diferenciación de colonias y residuos de alimentos.

El uso de las placas Petrifilm LAB® 3M® también permite la fácil identificación de las bacterias ácido-lácticas homofermentativas y heterofermentativas presentes en una matriz alimentaria, esto debido a su diseño y a la presencia de agentes que remueven el oxígeno presente en el medio de la placa.

La presencia de conservadores como el ácido benzoico y ácido sórbico afecta el recuento de bacterias ácido-lácticas en matrices alimentarias como la mayonesa, tanto mediante el uso del método tradicional como el uso de las placas Petrifilm LAB® 3M®.

Se recomienda realizar pruebas de no interferencia para determinar si la presencia de otros microorganismos en las matrices alimentarias a analizar afecta el recuento de bacterias ácido-lácticas.

BIBLIOGRAFIA

- Abeijón, M., R. Medina, M. Katz, R. Pivotto, P. Gatti y S. González. (2009). Contribution of Lactic Acid Bacteria Esterases to the Release of Fatty Acids in Miniature Ewe's Milk Cheese Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1036–1044
- Adamberg, K., S. Kask, T. Laht y Y. Paalme. (2003). The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study, *International Journal of Food Microbiology*, 85 (1–2), 171-183
- Al-Holy, M., H. Al-Qadiri , M. Lin y B. Rasco. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* in humus by a combination of nisin and citric acid. *Journal of Food Protection*, 69 (6), 1322-1327.
- Alali, W., D. Mann y L. Beuchat. (2012). Viability of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in delicatessen salads and humus as affected by sodium content and storage temperature. *Journal of Food Protection*, 75 (6), 1043-1056.
- Ali, N. M., S. Andleeb, B. Mazhar, I. Khadija y B. Kalim. (2016). Antibacterial activity and optimization of bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from beef (Red meat) samples. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series*. **59** (2): 85-98.
- Almualla, N., L. Laleye, A. Abushelaibi, R. Al-Qassemi, A. Wasesa y J. Baboucarr. (2010). Aspects of the Microbiological Quality and Safety of Ready-to-Eat Foods in Sharjah Supermarkets in the United Arab Emirates. *Journal of Food Protection*, **73**, 1328–1331
- Alvarez, M., R. Fuentes, G. Guerrero y W. Canet. (2017). Characterization of commercial Spanish humus formulation: Nutritional composition, rheology, and structure. *International Journal of Food Properties*, **20** (4), 845-863
- Atanasova, J., P. Moncheva y I. Ivanova. (2014). Proteolytic and antimicrobial activity of lactic acid bacteria grown in goat milk. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **28** (6), 1073-1078
- Bell, A. T., I. J. Etchells y F. A. Borg. (1959). Influence of sorbic acid on the growth of certain species of bacteria, yeasts and filamentous fungi. *Journal of Bacteriology*. 77 (5), 573-580. May 1959.
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, **4**, 665–684.

- Britania LAB (2017). Disponible a través de internet en: https://www.britanialab.com/productos/producto/2/medios_de_cultivo_deshidratados/-/-/404/mrs_agar Consultado última vez 24 de marzo 2021.
- Buron-Moles, G., A. Chailyan, I. Dolejs, J. Forster y M. Hanna. (2019). Uncovering carbohydrate metabolism through a genotype-phenotype association study of 56 lactic acid bacteria genomes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 3135–3152
- Camacho A., M. Giles, A. Ortegón, M. Palao, B. Serrano y O. Velázquez. (2009). Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. Segunda Edición, Facultad de Química, UNAM. México.
- Camaró- Sala, L., R. Martínez- García, P. Olmos- Martínez, V. Catalá- Cuenca, M. D. Ocete- Mochón, y C. Gimeno- Cardona. (2015). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. **33** (7), 31-36.
- CANAINCA (2021). Disponible a través de internet en: <https://www.canainca.org.mx/index.php/canainca/memoria-estadistica/capitulo-14-valor-de-las-ventas-totales-2012-2020/14-3-mayonesa-mostaza-y-aderezos> y <https://www.canainca.org.mx/index.php/canainca/memoria-estadistica/capitulo-4-perspectiva-de-la-industria-para-2020/4-1-ventas-2020> Consultado por última vez 03 de julio de 2021.
- CM Ecotecnología y Sistemas Empresariales, (2021). Disponible a través de internet en https://residuos peligrosos.mx/?gclid=Cj0KCKQjw6NmHBhD2ARIsAI3hrM2NmI-WnKpwwry-M543ZVHhsLdYELaLp5rwJMBuo9MM1uQ2E1EZw7QaAsP9EALw_wcB Consultado por última vez 21 de julio de 2021.
- Colombo, M., E. A. Zimmermann, A. Fernandes y A. L. Nero. (2014). Development of an alternative culture médium for the selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milk. *Science Direct*, **39**, 89-95.
- Condalab, (2019). Disponible a través de internet en: <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1090-5511-agar-m17.html>; <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/28-4665-agar-eugon.html>; <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/1294-11567-agar-apt-all-purpose-tween.html> Consultada por última vez 18 de abril 2021.
- Cordero, E. (2003). *Comparación de dos métodos analíticos para la determinación de conservadores en productos cárnicos*. [Tesis de Licenciatura], Facultad de Química. UNAM. México.
- CTR Scientific. (2021). Disponible a través de internet en <https://www.ctr.com.mx/marca/3m> Consultado por última vez 21 de julio 2021.
- De la Rosa, T. (2020, octubre). En la guerra de los quesos ganó la 4T. Eje Central, disponible en línea a través de <https://www.ejecentral.com.mx/en-la-guerra-de-los-quesos-gano-la-4t/> Consultado por última vez 18 de julio de 2021.

- Demirbas, F., H. Ispirli, K. A. Ayse, Y.M. Tahsin y E. Dertli. (2017). Antimicrobial and functional properties of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs. *LWT- Food Science and Technology*, **79**, 361-366.
- Difco. Disponible a través de internet en: https://legacy.bd.com/europe/regulatory/assets/ifu/difco_bbl/248020.pdf Consultada por última vez 17 de abril 2021.
- Dikysa Reactivos y equipo para laboratorio (2021). Disponible a través de internet en: <http://dikysa.com.mx/index.php/producto/bd-gaspak/> Consultada por última vez 01 abril 2021.
- Dinçer, E. y M. Kivanç. (2017). Lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from turkish pastirma. *Anadolu University Journal of Science and Technology C- Life Sciences and Biotechnology*, **7** (1), 12-19
- Distribuciones Biotecnológicas, (2021). Disponible a través de internet en <https://www.distribucionesbiotecnologicas.com.mx/3m-placas-petrefilm> Consultado por última vez 21 de julio de 201.
- Duffau, B., et al. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Instituto de Salud Pública de Chile.
- Durán de León, P. (2012). *Evaluación de placas Petrifilm para el recuento de bacterias lácticas en productos cárnicos procesados y para estimación de vida de anaquel*. [Tesis de Licenciatura] Facultad de Química, UNAM. México.
- Endo, A., Y. Futagawa-Endo y L. M. Dicks (2009). Isolation and characterization of fructophilic lactic acid bacteria from fructose-rich niches. *Systematic and Applied Microbiology*, **32**, 593–600.
- Esfandiari, Z., M. Saraji, A. R. Madani y E. Jahanmard. (2016). Status of benzoic acid amount during processing from yogurt to its by-product drink (doogh). *Italian Journal of Food Science*. **28** (3), 536-541.
- FAO, (2016). Disponible a través de internet en <http://www.fao.org/pulses-2016/news/news-detail/es/c/405378/> Consultado por última vez 04 de julio de 2021.
- Fernández, K. J., I. C. Chanci, L. Wilches y J. A. Cardona. (2014). Caracterización de los metabolitos de bacterias ácido-lácticas y efecto inhibidor de las bacteriocinas en microorganismos patógenos en alimentos: revisión sistemática de la literatura, 2008-2012. *Revista Biosalud* 2014; **13**, (1), 45-61.
- Fialová, J., J. Chumchalová, K. Miková y I. Hrusová. (2008). Effect of food preservatives on the growth of spoilage lactobacilli isolated from mayonnaise-based sauces. *Food Control* **19**, 706–713.
- Fusco, V., F. M. Quero, G. Cho, J. Kabisch, D. Meske, et. al. (2015). The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 155.

- Gänzle, M. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, **2**, 106–117.
- García, B. C. y M. E. Molina (2008). Estimación de la vida útil de una mayonesa mediante pruebas aceleradas. *Ingeniería*, **18**, 57-64.
- García, I., D. Rocha, J. Ortega, K. Wang, E. Kosmerl y R. Jimenez. (2019). Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**, 5243–5257
- Guchte, M., P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvina, S. Ehrlich y E. Maguin. (2002). Stress response in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, **82**, 187-216.
- Gunsalus, I. C. y R. Y. Stanier. (2012). *The Bacteria, A Treatise on Structure and Function, Volume II: Metabolism*. Academic Press Inc. London. Páginas 125-127.
- Hagan, E. E. (2011). *A Multidisciplinary Approach to Food Safety Evaluation: Humus Spoilage and Microbial Analysis of Kitchen Surfaces in Residential Child Care Institutions (rcci) in Massachusetts, University of Massachusetts Amherst*. Dissertation thesis. U.S.A.
- Harlé, O., H. Falentin, J. Niay, F. Valence, C. Corselaud, V. Chuat, M. Maillard, E. Guédon, S. Deutsch y A. Thierry. (2020). Diversity of the metabolic profiles of a broad range of lactic acid bacteria in soy juice fermentation. *Food Microbiology*, **89**, 1034102
- Harris, D. C. (2007). Análisis químico cuantitativo. 3ª edición, Editorial Reverté S. A. Barcelona, España, pág. 214
- Hayek, S., R. Gyawali, S. Aljalud, A. Krastanov y S. Ibrahim. (2019). Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. *Journal of Dairy Research*, **86**, 490–502.
- Hayek, S. y S. Ibrahim. (2013). Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, **4**, 73-87
- Hernández, R. M. y G. A. Sastre. (1999). *Tratado de nutrición*. Ediciones Diaz de Santos S.A. Madrid. Página 365.
- HiMedia Laboratories (2011). Disponible a través de internet en: <https://www.himedialstore.com/lactobacillus-selection-oxgall-agar-base-lbs-oxgall-agar> Consultada por última vez 17 abril 2021.
- HiMedia Laboratories (2015). Disponible a través de internet en: <https://www.himedialstore.com/> Consultada por última vez 01 abril 2021
- Himedia Laboratories, (2015). Disponible a través de internet en: <https://exodocientifica.com.br/technical-data/M600.pdf> Consultada por última vez 17 de abril 2021.
- Holzappel, W. y B. Wood. (2014). *Lactic Acid Bacteria. Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley and Sons, Ltd

- Hussein, M., T. Rababah, S. Gammoh, K. Ereifej, M. Al- Mahasneh, S. Kubow y D. Tawalbeh. (2016). 16 - Emulsified protein filaments: types, preparation, nutritional, functional, and biological properties of mayonnaise en *Nanotechnology in the Agri-Food Industry, Emulsions*, Academic Press, editores: Alexandru Mihai Grumezescu, páginas: 557-572
- Hwang, H. y J. Lee. (2018). Characterization of Arginine Catabolism by Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi. *MDPI, Molecules*, **23**, 3049
- ICMSF. (1998). *Microorganisms in Food 6. Microbial Ecology of Food Commodities*. Zaragoza. Editorial Aspen Publishers, Inc. Páginas: 368, 369, 372.
- INEGI, (2021). Disponible a través de internet en: https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/enigh/nc/2018/doc/enigh2018_ns_preseleccion_resultados.pdf y <https://www.inegi.org.mx/programas/enigh/nc/2018/#Tabulados> Consultado por ultima vez 03 de julio de 2021.
- Iskandar, C. F., C. Cailliez-Grimal, F. Borges y A. Revol-Junelles. (2019). Review of lactose and galactose metabolism in Lactic Acid Bacteria dedicated to expert genomic annotation, *Trends in Food Science & Technology*, **88**, 121-132
- Izquierdo, P., M. Ríos, E. García, A. Mena, J. Heras y G. Cordero. (2020). Co-Existence of Inoculated Yeast and Lactic Acid Bacteria and Their Impact on the Aroma Profile and Sensory Traits of Tempranillo Red Wine. *MDPI, Fermentation*, **6**, 17
- Johansson, P., L. Paulin. E. Säde, N. Salovuori, E. R. Alatalo, K. J. Björkroth y P. Auvinen. (2011). Genome sequence of a food spoilage lactic acid bacterium *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811T in association with specific spoilage reactions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, July: 4344–4351. Disponible a través de Internet en: <http://aem.asm.org/content/77/13/4344.full>
- Jung, S., A. Mijanur y S. Ju. (2015). Identification and Evaluation of Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria from Imitation Crab Sticks to Develop a Microbial Time Temperature Integrator. *Food Science and Biotechnology*, **24**, 141-153
- Kalkan, S., E. Tas, Z. Erginkaya y T. E Unal. (2017). Determination of Antimicrobial Effects of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Garlic Extract Against Some Foodborn Pathogenic Bacteria. *Turkish Journal of Agriculture: Food Science and Technology*. **5** (2), 125-131.
- Kang, B., M. Cho y D. Park. (2016). Red pepper powder is a crucial factor that influences the ontogeny of *Weissella cibaria* during kimchi fermentation. *Scientific Reports*, **6**, 28232
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences (IJB)*, **1** (3), 1-13
- Kim, J. (2005). Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi Against *Aspergillus fumigatus*. *The Korean Society of Mycology. Mycobiology*, **33** (4), 210-214
- Kliche, T., B. Li, W. Bockelmann, D. Habermann, M. Klempt, M. De Vrese, A. Wutkiwski, I. Clawin- Raedecker y K. Heller. (2017). Screening for proteolytically active lactic acid

- bacteria and bioactivity of peptide hydrolysates obtained with selected strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 7621–7633
- Knarreborg, A., N. Miquel, T. Granli y B.B. Jensen. (2002), Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Science and Technology*, **99**, 131–140
- Koolman, J. y K. Rohm. (2004). *Bioquímica texto y atlas*. 3ª ed. Madrid. Editorial Médica Panamericana. Página 8.
- Konings, W. N., O. P. Kuipers y J. H. J. Huis in't Veld. (1999). *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Springer- Science+Business Media, B. V. Página: 407.
- Kucerová, K., J. Chumchalová, K. Míková y S. Cupaková. (2007). Screening of lactic acid bacteria for antimicrobial properties from mayonnaise-based products and raw materials. *Europe Food Res Technology*. **226**, 265–272.
- Lázaro, L. A., et al. (2015). *Microbiota*. Madrid, Ediciones i.
- Lahtinen, S., A. Ouwehand, S. Salminen y A. Von Wright. (2012). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. 4th ed. New York. CRC Press. Páginas: 2- 9.
- LeBlanc, J., M. Garro y G. Savoy. (2004). Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, α -galactosidase activity and fermentation products. *Appl Microbiol Biotechnol*, **65**, 119–123
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. Review. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 181–186. Disponible a través de RedUNAM en: www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro
- Leotta, G., (2009), Métodos rápidos: una herramienta útil y práctica para el análisis microbiológico de los alimentos. *Revista Argentina de Microbiología*, **41**, (2), 63-64. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016783001>
- Leroy, F. y L. De Vuyst. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 67–78
- Leuschner, G. K. R., J. Bew, P. Simpson, R. P. Ross y C. Stanton. (2002). A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic bifidobacterial in animal feed. *International Journal of Food Microbiology*. **83**, 161-170.
- Levy, A. y B. Carolina. (2012). *Mayonesa: Estrategia, cognición y poder competitivo*. 3ª edición. Ediciones Granica SA de CV. Buenos Aires.
- Lombard, B. y A. Leclercq. (2010). Validation of Innovative Food Microbiological Methods According to the EN ISO 16140 Standard. *Food Analytical Methods*. 2011, June. 4. 2: 163- 172.
- Limin, K. J., M. L. Smith, E. B. da Silva, M. C. Windle, T. C. da Silva y S. A. Polukis (2018). An evaluation of the effectiveness of a chemical additive based on sodium benzoate,

- potassium sorbate, and sodium nitrite on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*, **101**, 5949–5960
- Linares, D., C. Gomez, E. Renes, et. al. (2017). Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria with Potential to Design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods. *Front Microbiol*, **8**, 846
- Liu, J., J. Chen, C. Solem y P. Jensen. (2019). A Guide for Understanding and Developing Improved Strains of Lactic Acid Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, **10**, Article 876
- Llinás, S. H. y A. C. Rojas. (2006). *Estadística descriptiva y distribuciones de probabilidad*. Barranquilla, Ediciones Uninorte. Páginas 74-75.
- Martín, R. (2010). Métodos rápidos y automatizados aplicados al análisis microbiológico de los alimentos. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, p. 67-98.
- Mataragas, M., J. Metaxopoulos, M. Galiotou y E. Drosinos. (2003). Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, **64** (3), 265-271
- Matijević, B., K. Lisak, R. Božanić y L. Tratnik. (2011). *Impact of enzymatic hydrolyzed lactose on fermentation and growth of probiotic bacteria in whey*. *Probiotic bacteria in whey*, *Mljekarstvo* 61 (2), 154-160.
- Merck, (2021). Disponible a través de internet en <https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/MRS-agar-de-MAN-ROGOSA-and-SHARPE.MDA-CHEM-110660> Consultado por última vez 21 julio de 2021.
- Meyer, K., M. Engevik y K. Aagaard. (2019). Human milk oligosaccharides (HMOs) promote growth of commensal *Streptococcus* spp. abundant in human milk. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **220** (1), S605-S606
- Mirzaei, I. Z., E. Lashani y A. Davoodababi. (2018). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from traditional yogurt and milk against *Shigella* strains. *GMS Hygiene And Infection Control*. **13**, 55-68.
- Mohamad, N., H. Manan, M. Sallehuddin, N. Musa y M. Ikhwanuddin. (2020), Screening of Lactic Acid Bacteria isolated from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) as potential probiotics. *Aquaculture Reports*, **18**, 100523
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A mini review. *Molecules*. **22**, 12-55.
- Moussa, S., A. Tayel, A. Al- Hassan y A. Farouk. (2013). Tetrazolium/Formazan Test as an Efficient Method to Determine Fungal Chitosan Antimicrobial Activity. *Journal of Mycology*, **2013**, 7
- Moyer, C., E. Collins y R. Morita. (2017). Psychrophiles and Psychrotrophs, *Reference Module in Life Sciences*, Elsevier. Disponible en internet (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128096338022822>) última consulta 28 marzo 2021.

- Muhaladin, B., Z. Hassan y S. Sadon. (2011). Biopreservation of food by lactic acid bacteria against spoilage fungi. *Annals. Food Science and Technology*, **12**, 1
- Norma Mexicana. NMX-F-021-S-1979. MAYONESA. MAYONNAISE. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS. [en línea] Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-021-S-1979.PDF>
- Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI/SAGARPA-2018, Yogurt- Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba, [en línea]. Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5549317&fecha=31/01/2019,
- Obela, (2014). Disponible a través de internet en <http://obela.com.mx/> Consultado por última vez 03 de julio 2021.
- Østergaard, N., A. Eklöw y P. Dalgaard. (2014). Modelling the effect of lactic acid bacteria from starter- and aroma culture on growth of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *International Journal of Food Microbiology*, **188**, 15–25.
- Palma, A., M. Aziz, M. Chawdhury, M. Uddin y M. Alam. (2004). Effect of oils on quality and shelf life of low fat mayonnaise. *Pak. J. Nutr.* **3**, 340-343
- Parra, H. R. A. (2010). *Bacterias ácido-lácticas: Papel funcional en los alimentos*. Facultad de ciencias agropecuarias. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. **8** (1), 93-105.
- Pazlopez, C. (2014). Strategies for small-scale production of dried apples and humus products with natural ingredients. Faculty of the Graduate School of Cornell University In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science.
- Peterkin, P. y A. Sharpe. (1980). Membrane filtration of dairy products for microbiological analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **39** (6), 1138-1143
- Porto, M., T. Kuniyoshi, P. Zevedo, M. Vitolo y R. Oliveira. (2017), *Pediococcus spp.*: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*. **35** (3), 361-374.
- Pothakos, V., C. Nyambi, B. Zhang, A. Papastergiadis, B. De Meulenaer y F. Devlieghere. (2014). Spoilage potential of psychrotrophic lactic acid bacteria (LAB) species: *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* and *Lactococcus piscium*, on sweet bell pepper (SBP) simulation medium under different gas compositions. *International Journal of Food Microbiology* **178**, 120–129.
- Pothakos, V., B. Taminiau, G. Huys, C. Nezer, G. Daube y F. Devlieghere. (2014). Psychrotrophic lactic acid bacteria associated with production batch recalls and sporadic cases of early spoilage in Belgium between 2010 and 2014. *International Journal of Food Microbiology* **191**, 157–163.

- Prolab (2021). Disponible a través de internet en https://www.prolab.com.mx/caja_petri_desechable_esteril_9015mm_1266.html Consultado por última vez 21 de julio de 2021.
- Raak, N., C. Symmank, S. Zahn, J. Aschemann-Witzel y Y. Rohm. (2017). Processing- and product-related causes for food waste and implications for the food supply chain. *Waste Management*, 461-472.
- Ramírez, R. J. C., R. P. Ulloa, M. Y. Velázquez y R. F., Arce. (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, Año 2, 7: 1-16.
- Russo, P., C. Fares, A. Longo y V. Capozzi. (2017). Lactobacillus plantarum with Broad Antifungal Activity as a Protective Starter Culture for Bread Production. MDPI, Foods, 6 (12), 110.
- Saïdi, B., M. Faid y J. Warthesen. (2003). Effect of sorbate on yogurt fermentation and stability of sorbate. *Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc)*, 23(1)
- Salcido, N. y J. Barboza. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*. 2010, 20(1), 43-52. ISSN: 0188-6266. Disponible a través de internet: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41613084005> [fecha de consulta 24 de febrero de 2021].
- Salminen, S., A. Wright y A. Ourwehand. (2004). Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. Third Edition Revised and Expanded. Marcel Dekker, Inc., páginas 8-11
- Sánchez, A., J. Angelino, D. Temoltzin y A. Águila. (2016). Programación e implementación del software de aplicación “Fácil Hogar” para aminorar el índice de desperdicio de alimentos en los hogares de Tlaxcala. *Advances in Software Engineering and its Applications*. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Computación. México 2016 (https://www.rcs.cic.ipn.mx/2016_126/RCS_126_2016.pdf#page=97) Consultado por última vez 27/03/2021
- Santoyo, R. (2016, 19 de abril), Los beneficios del Hummus, *Vogue*, recuperado el día 04 de julio de 2021 de <https://www.vogue.mx/belleza/bienestar/articulos/los-beneficios-del-hummus/6039>
- Siedler, S., R. Balti y A. Rute. (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology*, 56:138–146
- Sieuwerts, S., P. A. Bron y E. J. Smid. (2018). Mutually stimulating interactions between lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in sourdough fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 201–206
- Smith, J. (2020, 10 de abril), ¿Es realmente saludable el hummus? Los expertos hablan, *Runner's World*, recuperado el día 04 de julio de 2021 de <https://www.runnersworld.com/es/nutricion-deportiva/a32030544/hummus-beneficios-saludable-corredores/>

- Solopova, A., H. Bachmann, B. Teusink, J. Kok, A. Neves y O. Kulpers. (2012). A Specific Mutation in the Promoter Region of the Silent *cel* Cluster Accounts for the Appearance of Lactose-Utilizing *Lactococcus lactis* MG1363. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 5612–5621
- Stella, S., B. Ripamonti, S. Vandoni, C. Benardi y C. Sgoifo. (2013). Microbiological and physicochemical quality evaluation of vacuum-packed argentine beef imported into Italy. *Journal of Food Quality*, **36**, 253–262
- Su, H., C. Lien, T. Lee y J. Ho. (2010). Development of low-fat mayonnaise containing polysaccharide gums as functional ingredients. *J. Sci. Food Agric.*, **90**, 806–812
- Tarraran, L. y R. Mazzoli. (2018). Alternative strategies for lignocellulose fermentation through lactic acid bacteria: the state of the art and perspectives. *FEMS Microbiology Letters*, **365**, No. 15
- Teixeira, J., A. Seeras, A. Sanchez- Maldonado, C. Zhang, M. Su y M. Gänzle. (2014). Glutamine, glutamate, and arginine-based acid resistance in *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiology* **42**, 172- 180
- Teneva, D., Z. Denkova, R. Denkova-Kostova, B. Goranov, G. Kostov, A. Slavchev, Y. Hristova-Ivanova, G. Uzunova y P. Degraeve. (2020). Biological preservation of mayonnaise with *Lactobacillus plantarum* LBRZ12, dill, and basil essential oils, *Food Chemistry*, **344**
- Ulloa, J. A. (2007). Frutas auto estabilizadas en el envase por la tecnología de obstáculos. Universidad Autónoma de Nayarit, Tepic, Nayarit, México. Primera edición, pág. 87
- Vanderzant, C. y D. Splittstoesser. (2005). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. 3rd ed. Washington, DC: American Public Health Association, Páginas: 225, 228, 231-234, 975- 981.
- Vermeulen, A., F. Devlieghere, K. Bemaerts, J. Van Impe y J. Debevere. (2007). Growth/no growth models describing the influence of pH, lactic and acetic acid on lactic acid bacteria developed to determine the stability of acidified sauces. *International Journal of Food Microbiology*. **119**, 258–269.
- Vihavainen, E., A. Murros y K. J. Björkroth. (2008). *Leuconostoc* Spoilage of Vacuum-Packaged Vegetable Sausages. *Journal of Food Protection*, **71** (11), 2312–2315.
- Villanueva, M. C. (2017). Desarrollo y validación de un método analítico para perfiles de disolución de esomeprazol por UV.
- Walpole, R., R. Myers, S. Myers y K. Ye. (2012). Probabilidad y estadística. 9^a ed. Editorial Pearson Educación de México. México. Páginas: 354-355.
- Wagner, N., Q. Hon, H. Richter, P. Selzer y G. Uden. (2005). Pyruvate Fermentation by *Oenococcus oeni* and *Leuconostoc mesenteroides* and Role of Pyruvate Dehydrogenase in Anaerobic Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, **71** (9), 4966–4971.

- Wood, B. J. B. y W. H. N. Holpzafel. (2012). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Springer-Science+ Business Media, BV. pp. 8, 13, 19
- Woolford, M. K. (1975). Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **26**, 229–237.
- Yamani, I. M. y A. B. Al-Dababseh. (1994). Microbial Quality of Humus (Chickpea Dip) Commercially Produced in Jordan. *Journal of Food Protection*. **57** (5), 431-435
- Yamani, I. M. y F. G. Mehyar. (2011). Effect of chemical preservatives on the shelf life of humus during different storage temperatures. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, **7** (1), 19-31.
- Yang, E., L. Fan, J. Yan, et al. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Expr* **8**, 10
- Zhang, H. y Y. Cai. (2014). *Lactic Acid Bacteria, Fundamentals and Practice*. Springer. Páginas: 1-2, 103- 172.
- Zhao, R., S. Zheng, C. Duan, F. Liu, L. Yang y G. Huo. (2013). NAD-dependent lactate dehydrogenase catalyses the first step in respiratory utilization of lactate by *Lactococcus lactis*. *FEBS Open Bio*. **3**, 379-386
- 3M Science Applied to Life. (2016). 3M Petrifilm Lactic Acid Bacteria Count Plates. Disponible a través de Internet en: http://www.3m.com/3M/en_US/company-us/all-3m-products/~3M-Petrifilm-Lactic-Acid-Bacteria-Count-Plates?N=5002385+8709322+8710780+8711017+8711295+8711414+8711726+8716589+8737785+3291809224&rt=rud [Último acceso 22 de septiembre de 2016]
- 3M Ciencia Aplicada a la Vida (2017). 3M™ Petrifilm™ Placas Bacterias Ácido Lácticas 6461. Disponible a través de Intertek en https://www.3m.com.mx/3M/es_MX/p/d/v000253965/ Consultado por última vez 21 de julio de 2021.