



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TÍTULO

Elaboración de bebidas lácteas fermentadas con las cepas probióticas *Leuconostoc mesenteroides* P45 y *Lactobacillus plantarum* P46.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

EVELYN MAYELA GALICIA ROBLES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

2020



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	Dr. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA
Vocal	M. en Bt. MARTHA GILES GÓMEZ
Secretario	Q.F.B. VERÓNICA DOMÍNGUEZ VALDEZ
1er suplente	Q.F.B. GENARO JIMÉNEZ REYES
2do suplente	Dra. PATRICIA SEVERIANO PÉREZ

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Cepario, Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM.

Anexo del Laboratorio de Evaluación Sensorial del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

SUPERVISOR TÉCNICO

M. en Bt. Martha Giles Gómez

(Nombre y Firma)

Dra. Patricia Severiano Pérez

(Nombre y Firma)

SUSTENTANTE:

Evelyn Mayela Galicia Robles

(Nombre y Firma)

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM <IN207917>

<Estudio de la diversidad microbiana, genética y metabólica del pulque por medio de un enfoque polifásico.>

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
1. RESUMEN.....	9
2. INTRODUCCIÓN.....	10
3. ANTECEDENTES.....	11
3.1 Bacterias ácido lácticas.....	11
3.2 Pulque.....	13
3.3 Probióticos.....	14
3.3.1 Efectos benéficos.....	15
3.4 Género <i>Leuconostoc</i>	17
3.4.1 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> P45.....	17
3.5. Género <i>Lactobacillus</i>	19
3.5.1. <i>Lactobacillus plantarum</i> P46.....	20
3.6 Leches fermentadas.....	20
3.7 Leches probióticas.....	22
3.8. Enfermedades gastrointestinales.....	22
3.8.1 <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium.....	23
3.8.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	24
3.9 Análisis sensorial.....	25
3.9.1 Pruebas descriptivas.....	25
3.9.2 Análisis descriptivo cuantitativo.....	26
3.9.3 Perfil flash.....	26
3.9.4 Análisis de procrustes generalizado.....	26
3.9.5 Análisis de Componentes Principales (PCA).....	27
4 JUSTIFICACIÓN.....	28
5 HIPÓTESIS.....	29
6 OBJETIVOS.....	30
6.1 Objetivo general.....	30
6.2 Objetivos particulares.....	30
7 METODOLOGÍA.....	31
7.1 Diagrama de la metodología.....	31
7.2 Activación y conservación de cepas.....	31

7.2.1 Corroboración de pureza de bacterias ácido-lácticas.	32
7.2.2 Conservación y corroboración de pureza de cepas patógenas.....	32
7.3 Evaluación del desarrollo y capacidad probiótica de las cepas aisladas del pulque en la matriz láctea.....	33
7.3.1. Cuantificación de las cepas probióticas en la matriz láctea.....	33
7.3.2. Cuantificación de resistencia a lisozima.	33
7.3.3. Cuantificación de la resistencia a pH ácido y sales biliares 0.3 % a las 24 h...	34
7.3.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos.....	34
7.3.4.1. Reactivación e inoculación de la cepa probiótica.	34
7.3.4.2. Preparación de microorganismos patógenos.	35
7.3.4.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana.	35
7.4 Elaboración de la bebida fermentada.....	36
7.5 Evaluación sensorial: perfil flash.	37
7.5.1 Generación de atributos.....	37
7.5.2 Análisis estadístico.....	38
8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	39
8.1 Reactivación y comprobación de pureza de las cepas <i>L. mesenteroides</i> P45 y <i>L. plantarum</i> P46.....	39
8.2 Reactivación y comprobación de pureza de las cepas patógenas <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium y <i>L. monocytogenes</i>	41
8.3 Cuantificación preliminar las cepas probióticas en una matriz láctea.	42
8.3.1 <i>L. mesenteroides</i> P45.	42
8.3.2 <i>L. plantarum</i> P46.....	44
8.4 Ensayo de sobrevivencia lisozima, pH ácido y sales biliares.	45
8.4.1 Resistencia a lisozima.....	47
8.4.1.1 Resistencia a lisozima de <i>L. mesenteroides</i> P45.....	47
8.4.1.2 Resistencia a lisozima de <i>L. plantarum</i> P46.	48
8.4.2 Evaluación de crecimiento de <i>L. mesenteroides</i> P45 a condiciones similares a tracto gastrointestinal.....	49
8.4.3. Evaluación de crecimiento de <i>L. plantarum</i> P46 a condiciones similares a tracto gastrointestinal.....	50
8.5 Ensayo frente a patógenos.....	53
8.5.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de <i>L. mesenteroides</i> P45.	53
8.5.2 Evaluación de actividad antimicrobiana de <i>L. plantarum</i> P46.....	54
8.6 Elaboración de las bebidas lácteas fermentadas.....	56
8.6.1. Bebida láctea fermentada con <i>L. mesenteroides</i> P45 y evaluación de estabilidad del carácter probiótico en conservación en refrigeración.....	56

8.7.1 Generación de atributos.....	63
8.7.2 Obtención del perfil sensorial y análisis estadístico.	65
9 CONCLUSIONES.....	71
10. PERSPECTIVAS	72
11. BIBLIOGRAFÍA	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Utilización de lactosa de las bacterias lácticas.
Figura 2. Mecanismo de patogenicidad de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium.
Figura 3. Diagrama de metodología empleada en el proyecto.
Figura 4. Metodología empleada para ensayo de antibiosis.
Figura 5. Morfología y Gram de <i>L. mesenteroides</i> P45 desarrollada en caldo APT.
Figura 6. Morfología y Gram de <i>L. plantarum</i> P46 desarrollada en caldo APT.
Figura 7. Morfología y Gram de <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium en caldo Luria.
Figura 8. Morfología y Gram de <i>L. monocytogenes</i> en caldo BHI
Figura 9. Comparación de crecimiento de <i>L. mesenteroides</i> P45 y <i>L. plantarum</i> P46 en distintos medios.
Figura 10. Crecimiento de las cepas P45 y P46 bajo condiciones de pH ácido y sales biliares 0.3% durante 24 h.
Figura 11. Halos de inhibición producidos por <i>L. mesenteroides</i> P45.
Figura 12. Halos de inhibición producidos por <i>L. plantarum</i> P46.
Figura 13. Ensayo de antibiosis con cepa P45 previo a la elaboración de bebidas fermentadas. A) Antagonismo frente a <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium B) antagonismo frente a <i>L. monocytogenes</i> .
Figura 14. Bebida fermentada con <i>L. mesenteroides</i> P45 para la generación de atributos.
Figura 15. Bebida producto de la fermentación con <i>L. plantarum</i> P46 para la generación de atributos.
Figura 16. Análisis de PCA proveniente del GPA para el atributo de sabor.
Figura 17. Análisis de PCA proveniente del GPA para el atributo de olor.
Figura 18. Análisis de PCA proveniente del GPA para el atributo de aspecto.
Figura 19. Análisis de PCA proveniente del GPA para el atributo de textura.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos benéficos para la salud de los probióticos.
Tabla 2. Cepas patógenas empleadas.
Tabla 3. Evaluación del crecimiento de <i>L. mesenteroides</i> P45 y <i>L. plantarum</i> P46 en matriz láctea.
Tabla 4. Resultados de pH de leche fermentada con <i>L. mesenteroides</i> P45 y <i>L. plantarum</i> P46.
Tabla 5. Comparación del crecimiento de <i>L. mesenteroides</i> P45 y <i>L. plantarum</i> P46 en distintos medios.
Tabla 6. Resistencia de las cepas <i>L. mesenteroides</i> P45 y <i>L. plantarum</i> P46 a lisozima [7 mg/mL].
Tabla 7. Resultados del desarrollo de las cepas <i>L. mesenteroides</i> P45 y <i>L. plantarum</i> P46 a condiciones de pH ácido y sales biliares 0.3%.
Tabla 8. Comparación de resistencia a pH 3.5 y sales biliares 0.3% en distintos medios.
Tabla 9. Ensayo de antibiosis contra microorganismos patógenos <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028 y <i>L. monocytogenes</i> CFQ-B-103.
Tabla 10. Parámetros iniciales de las bebidas lácteas fermentadas.
Tabla 11. Resultados de ensayos para evaluar la vida de anaquel de la bebida.
Tabla 12. Atributos de bebida fermentada con <i>L. mesenteroides</i> P45.
Tabla 13. Escala definida para atributos pertenecientes a aspecto.
Tabla 14. Escala definida para atributos pertenecientes a olor.
Tabla 15. Escala definida para atributos pertenecientes a sabor.
Tabla 16. Escala definida para atributos pertenecientes a textura.

1. RESUMEN.

Leuconostoc mesenteroides P45 y *Lactobacillus plantarum* P46, son bacterias ácido lácticas presentes en la fermentación del pulque, su capacidad probiótica se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, el uso de estos probióticos en el pulque como matriz, siendo una bebida alcohólica no destilada, no sería tan conveniente.

Debido a lo anterior, en el presente trabajo se elaboraron bebidas lácteas fermentadas con las cepas probióticas aisladas del pulque. Se evaluó inicialmente el crecimiento en leche descremada (10% v/v) como medio de cultivo. Así mismo, se realizaron ensayos *in vitro* para determinar la capacidad de resistir el contacto a lisozima, las condiciones de pH ácido (3.5) y la concentración 0.3% de sales biliares. Además, se evaluó la actividad antagónica contra patógenos de importancia clínica como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Finalmente se realizó una evaluación sensorial de las bebidas lácteas obtenidas.

Se obtuvo una concentración celular en la matriz láctea de 9.16 Log₁₀ UFC/mL para *L. mesenteroides* P45 y 9.14 Log₁₀ UFC/mL para *L. plantarum* P46. La cepa P45 creció a una concentración de 7.54 Log₁₀ UFC/mL al estar en contacto con lisozima durante 30 minutos; 9.12 Log₁₀ UFC/mL para pH ácido y 8.53 Log₁₀ UFC/mL para sales biliares. Para la actividad antimicrobiana se observaron halos de inhibición de 13 mm contra *S. Typhimurium* y 16 mm contra *L. monocytogenes*. La cepa P46, presentó concentraciones de 9.41 Log₁₀ UFC/mL de viables al estar en contacto con lisozima durante 30 minutos; 9.24 Log₁₀ UFC/mL para pH ácido y 9.45 Log₁₀ UFC/mL para sales biliares. La actividad antimicrobiana presentó halos de inhibición de 14 mm para *S. Typhimurium* y 13 mm para *L. monocytogenes*. Con estos resultados se corroboró que en la matriz láctea ambas cepas presentaron las características probióticas que las distinguen.

El perfil sensorial obtenido de la bebida fermentada con *L. mesenteroides* P45 presentó atributos de olor lácteo y fermentado, sabor ácido y cremoso, así como una textura suave y fueron de mayor agrado para los evaluadores.

2. INTRODUCCIÓN.

El pulque es una bebida alcohólica no destilada, que se obtiene a partir de la fermentación del aguamiel extraído de algunas especies de maguey, al ser su proceso de elaboración tradicional, las condiciones en las que se produce esta bebida genera una amplia diversidad microbiana (Escalante *et al.*, 2012).

Se le atribuyen al pulque propiedades benéficas hacia la salud de su consumidor tanto medicinales como nutricionales, entre las que destaca; la prevención de trastornos gastrointestinales, que están ligadas a microorganismos presentes en la bebida, ya que algunos microorganismos pertenecen a bacterias ácido-lácticas (BAL), en donde algunas son empleadas como probióticos (Saad *et al.*, 2013).

Se han realizado diversos estudios acerca de la microbiota presente en la fermentación del pulque. Campos (2010), a partir de pulque aisló BAL utilizando como criterios de aislamiento, la resistencia a pH ácido y sales biliares, obtuvo 13 cepas con potencial probiótico, dentro de las cuales destacó la cepa designada como *Leuconostoc mesenteroides* P45. Matus (2011), destacó que esta cepa presentó las mejores características probióticas al disminuir en al menos un ciclo logarítmico la infección en hígado y bazo generada con la cepa *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium. Ramírez (2018), elaboró una bebida a base de la fermentación del aguamiel con *L. mesenteroides* P45, donde demostró que conservó su carácter probiótico.

Gutiérrez (2015), realizó el aislamiento e identificación de distintos lactobacilos, tras pruebas preliminares, *L. plantarum* se destacó como microorganismo con posibilidad a ser probiótico. Morales (2019), caracterizó el potencial probiótico de *L. plantarum* P46 *in vitro* e *in vivo*.

En México, el consumo de probióticos se encuentra limitado a productos que en su mayoría son lácteos, por lo que el objetivo de este trabajo es realizar bebidas lácteas fermentadas con las cepas *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46, así como corroborar que mantienen sus propiedades probióticas.

3. ANTECEDENTES.

3.1 Bacterias ácido lácticas.

Las bacterias ácido lácticas (BAL), pertenecen al phylum *Firmicutes*, que comprende aproximadamente 20 géneros, de los más representativos se encuentran *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weisella* (Maldonado *et al.*, 2018).

La clasificación de BAL comprende un diverso grupo de microorganismos con las siguientes características: cocos y bacilos Gram-positivos, de longitud variable y de un grosor de 0.5-0.8 μm , que son aerobios facultativos o microaerófilos, no esporulados, inmóviles, catalasa-negativo y citocromo-negativo. Además de los requerimientos nutricionales, la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las BAL (Waldir *et al.*, 2007).

Gracias a sus propiedades metabólicas, las BAL desempeñan un papel importante en la industria alimentaria, por su contribución al sabor, olor, textura, características sensoriales, propiedades terapéuticas y valor nutricional. Se usan ampliamente como cultivos iniciadores para la fermentación de la leche, vegetales, carnes, bebidas y productos de panadería.

Según la fermentación de la lactosa las BAL se clasifican en homofermentativas (produce sólo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otros metabolitos) y según la temperatura de crecimiento en mesófilos y termófilos (Figura 1).

La lactosa es transportada al interior de la célula y fosforilada por un sistema de fosfotransferasa (PTS), posteriormente la lactosa-P es hidrolizada por una fosfo- β - galactosidasa en galactosa-6-P que es excretada y la glucosa que es canalizada a la glucólisis al ser fosforilada por la glucocinasa.

También se puede transportar la lactosa por una permeasa y ser hidrolizada por una β -galactosidasa en galactosa y glucosa (Lessard, *et al.* 2003).

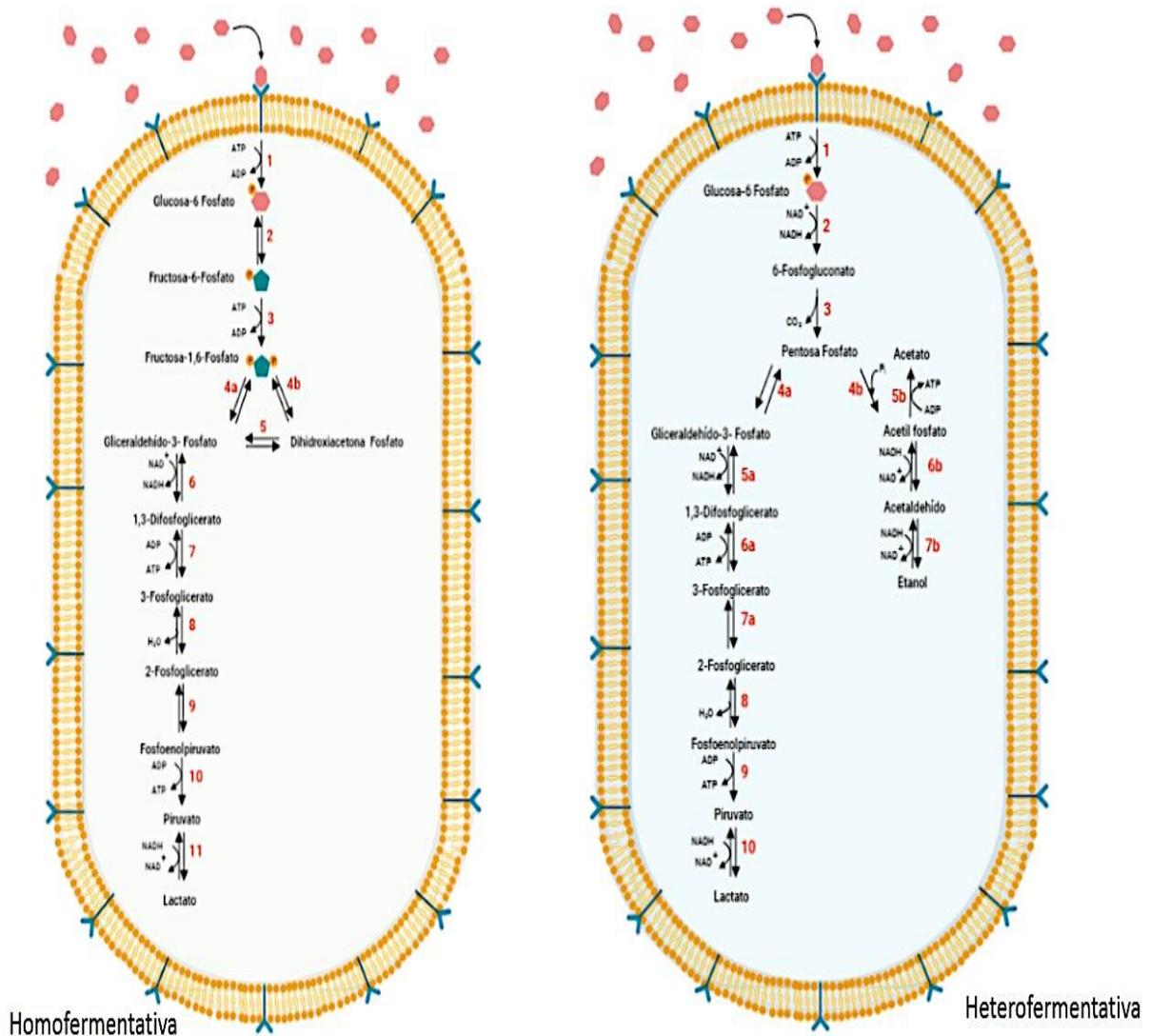


Figura 1. Utilización de lactosa de las bacterias lácticas a) Ruta homofermentativa y b) Ruta heterofermentativa de utilización de lactosa de las bacterias ácido lácticas. (Elaborado a partir de Tamang, *et al.*, 2010).

El grupo de las BAL heterofermentativas está compuesto por los géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, estas bacterias contienen la enzima fosfoacetolasa, pero carece de la aldolasa y hexosa isomerasa; así que, en lugar de seguir la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), utilizan las vías de la hexosa monofosfato o la de las pentosas.

Estas fermentan un mol de glucosa para formar un mol de ácido láctico, un mol de etanol y un mol de CO₂. Además de los productos ya mencionados, las BAL producen distintos metabolitos como acetaldehído y diacetilo, además de algunas sustancias antimicrobianas (Savadogo *et al.*, 2009).

3.2 Pulque.

El pulque es una bebida alcohólica no destilada tradicional producida por la fermentación de la savia conocida como aguamiel, la cual es extraída de especies pertenecientes al género *Agave*: *A. atrovirens*, *A. mapisaga*, *A. ferox*, *A. hookeri* y *A. americana* (Escalante *et al.*, 2008). Esta bebida es probablemente la más antigua y tradicional de México. Es un líquido blanco, viscoso, ligeramente ácido y con un contenido alcohólico menor a 6% y gracias a su impacto en el aspecto nutricional, económico y químico, ha sido la bebida más estudiada desde diferentes puntos de vista.

Durante la producción de pulque ocurren tres tipos de fermentación: ácida, alcohólica y viscosa; lo que hace de esta bebida un ambiente interesante de microorganismos o genes con potencial biotecnológico, como los que codifican para transportadores de azúcares, enzimas hidrolíticas, exopolisacárido (EPS), o aquellos genes de las vías fermentativas involucrados en la producción de ácido láctico o etanol podrían ser aislados. Se han determinado importantes cambios en la diversidad microbiana durante la fermentación del aguamiel hasta el producto fermentado final (Escalante *et al.*, 2008).

El proceso de fermentación se inicia en un ambiente ácido (pH= 3.8) y rico en carbohidratos, con una diversidad bacteriana compleja compuesta tanto por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas a partir de la cual las bacterias heterofermentativas *L. citreum*, *L. mesenteroides* y *L. kimchi* fueron las especies más abundante durante la primera hora de fermentación. Después de 3 h de fermentación se observan cambios importantes en la diversidad bacteriana, *Lactobacillus* sp, *L. mesenteroides* y *Enterobacter agglomerans* se convierten en las especies bacterianas predominantes. Otras bacterias como *Zymomonas mobilis*,

Acetobacter malorum y *Acinetobacter radioresistens* se encontraron relativamente constante desde la inoculación.

Al final de proceso de fermentación (6 h), la diversidad bacteriana observada se compone principalmente de *L. acidophilus*, así como las BAL heterofermentativas *L. mesenteroides* (50%), *L. lactis* subsp. *lactis* (12.5%), *Lactobacillus* spp. (Escalante *et al.*, 2008).

Se ha reportado que algunas especies de BAL son capaces de crecer en ambientes con concentraciones de etanol de hasta el 20% por lo tanto, la capacidad de las BAL para resistir altas concentraciones de etanol y su capacidad de crecer en ambientes ácidos (pH 4.5) podría explicar su abundancia relativa durante el proceso de fermentación (Escalante *et al.*, 2008).

Una de las principales propiedades distintivas de pulque es su consistencia viscosa, que es dependiente de la producción de EPS. El principal microorganismo asociado con esta propiedad ha sido *L. mesenteroides*, ampliamente estudiado por su capacidad de producir dextranas (Escalante *et al.*, 2008).

3.3 Probióticos.

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedero (Hill *et al.* 2017).

Los factores extrínsecos más importantes que afectan la viabilidad y sobrevivencia de las células probióticas son: pH (derivado de la fermentación), oxígeno disuelto (especialmente para bifidobacterias), interacciones antagónicas entre especies, composición química del medio de cultivo, concentración final de azúcares (aumento de presión osmótica), prácticas de inoculación (momento adecuado para el agregado del cultivo probiótico), temperatura y duración de la fermentación, condiciones de almacenamiento del producto (Olagniero *et al.*, 2007).

3.3.1 Efectos benéficos.

Los probióticos y su consumo favorecen algunos beneficios como: la producción de lactasa, la modificación del pH intestinal, una mejor conservación de la microbiota, la producción de sustancias antimicrobianas, la competencia contra microorganismos patógenos por nutrientes y evitar su proliferación, ayudan a una mejor asimilación de nutrientes, estimulan al sistema inmune y la generación de citocinas (Mata, 2013).

Los mecanismos de acción generales y comunes de los probióticos son: funcionan como barrera microbiológica contra patógenos, normalizan la microbiota intestinal alterada, promueven la exclusión competitiva por patógenos, aumentan la producción de ácidos grasos de cadena corta, regulan el tránsito intestinal, por destacar algunos (Tabla 1).

Los probióticos afectan al ecosistema intestinal estimulando los mecanismos inmunitarios y no inmunitarios de la mucosa a través del antagonismo y competencia con patógenos potenciales (Valdovinos *et al.*, 2017).

El efecto benéfico asociado al consumo de probióticos depende de su capacidad de adaptación y supervivencia al intestino del hospedero. Después de su ingesta se ve obligado a atravesar barreras que presentan diferentes características lo cual implica estrés para los microorganismos, entre estos factores se encuentra, la resistencia a la actividad de la lisozima (enzima presente en la saliva de humanos), los distintos pH que se presentan en el tracto gastrointestinal, la presencia de sales biliares, los mecanismos de resistencia de este tipo de bacterias mantienen la integridad de la célula (Zhang *et al.*, 2018).

El principal efecto de los probióticos es aumentar las funciones de la inmunidad innata, incluida la fagocitosis y la toxicidad celular mediada por las células asesinas naturales, y regular la síntesis de citocinas en las células T polarizadas. Debido a que las células T reguladoras desempeñan un papel importante en la amortiguación de respuestas inmunes mal dirigidas, los probióticos pueden ejercer efectos antiinflamatorios al influir en esta población de células T (Moreno *et al.*, 2014). Se

ha demostrado que las cepas probióticas difieren en su capacidad para inducir la diferenciación de células y la producción de citocinas (Ashraf *et al.*, 2014).

Tabla 1. Efectos benéficos para la salud de los probióticos.

Adaptado de Chandan (2013).

Efectos corroborados por evidencia científica	Efectos de naturaleza potencial
Ayuda en la digestión de la lactosa.	Control de infecciones por <i>Candida</i> sp. y bacterias (vaginitis).
Tratamiento de diarreas por rotavirus.	Alivio de la constipación.
Tratamiento de gastroenteritis infantil.	Efectos antimutagénicos/anticarcinogénicos.
Tratamiento de diarrea relacionada con antibióticos.	Reduce el colesterol y la presión sanguínea.
Modulación de la microbiota intestinal.	Alivio de la superpoblación microbiana en el intestino delgado.
Reducción de enzimas fecales peligrosas, biomarcadores de la iniciación del cáncer.	Alivio de dermatitis y de alergias cutáneas.
Estímulo/modulación del sistema inmune.	Prevención y tratamientos de la enfermedad de Crohn.
Efectos positivos sobre el cáncer de cérvix y de vejiga.	Tratamiento de diarrea causada por <i>Clostridioides difficile</i> .

Tradicionalmente, las bacterias probióticas han sido añadidas al yogur y a otros alimentos fermentados, los criterios para seleccionar estas cepas incluyen que sean viables y metabólicamente activas en el tracto gastrointestinal. Además, es importante que la viabilidad del microorganismo y la estabilidad de las características de las cepas puedan mantenerse durante la producción comercial, así como durante la vida útil del producto (Gilliand, 2003).

La mayoría de los probióticos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas, las cuales participan en la elaboración de diversos alimentos fermentados como el

yogurt, siendo el producto con probióticos más conocido entre la población y cuya ingesta es asociada a diversos beneficios a la salud del consumidor (Tamang *et al.*, 2010).

3.4 Género *Leuconostoc*.

El género *Leuconostoc* pertenece al *Phylum* Firmicutes, que incluye microorganismos Gram-positivos, y presenta una forma de cocoide o de tipo varilla, que a menudo forman cadenas durante el crecimiento exponencial (Pujato *et al.*, 2015). Estas bacterias generalmente se presentan en pares o cadenas cortas, son inmóviles, no forman esporas.

Las especies pertenecientes a *Leuconostoc*: *L. argentinum*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. fallax*, *L. ficulneum*, *L. fructosum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. inhae*, *L. kimchii*, *L. lactis*, *L. mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides*, se pueden encontrar principalmente en vegetales, cereales, ensilaje, frutas, vino, pescado, carne y productos lácteos (de Paula *et al.*, 2015).

Las bacterias del género *Leuconostoc* se encuentran clasificadas dentro del grupo de bacterias ácido lácticas heterofermentativas, las cuales producen mayoritariamente ácido láctico a partir de la fermentación de hidratos de carbono simples (Serrano, 2017), producen gas (CO₂), compuestos aromáticos (diacetilo, acetoína, acetato, etanol y 2,3-butilenglicol), utilizado en diversos fabricantes de alimentos fermentativos (D' Angelo *et al.*, 2017), además de valiosos polisacáridos (dextrinas) (Shobha y Agrawal, 2008).

3.4.1 *Leuconostoc mesenteroides* P45.

L. mesenteroides es una BAL previamente aislada del pulque. Es uno de los microorganismos responsables del desarrollo de la viscosidad en esta bebida, por la producción de exopolisacáridos, la cual es una de las características distintivas de esta bebida (Escalante *et al.*, 2004).

Campos (2010), aisló y caracterizó 13 bacterias lácticas del pulque con posible capacidad probiótica, por su resistencia a condiciones *in vitro* simulando el tracto gastrointestinal (pH 3.5 y sales biliares al 0.3%), posteriormente al realizar la identificación por secuenciación del ADNr 16S permitió que se identificaran como *L. mesenteroides*, *L. durionis* y *L. kimchi*. La cepa de *L. mesenteroides* P45 fue la que presentó una mayor capacidad de inhibición contra bacterias patógenas.

Matus (2011), seleccionó a la cepa *L. mesenteroides* P45 para ser probada en modelos animales. Observó que el consumo de la cepa durante siete días consecutivos disminuyó de uno a dos ciclos logarítmicos el desarrollo de *S. enterica* serovar Typhimurium en hígado y bazo de ratones Balb/c, además realizó la identificación por secuenciación del operón ribosomal, mostrando un 92% de parecido con la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8233.

Por otro lado, Cerón (2014), realizó ensayos de adhesión celular *in vitro* por parte de la cepa P45, en cuatro líneas celulares de epitelio colorectal humano Caco-2, Hep-2, HT-29 y HeLa), presentando adherencia moderada en las primeras dos líneas.

Al secuenciar el genoma de esta cepa, se encontró la secuencia de un gen codificante para una glucosiltransferasa (GTF;GtFg1:LP45), enzima responsable de la síntesis de dextrana a partir de sacarosa, dentro de los resultados obtenidos en este ensayo destacó la identificación de genes codificantes para una prebacteriocina, una lisozima (1,4- β -N-acetylmuramidasa) y un peptidoglicano amidasa (N-acetylmuramoyl-L-alanina amidasa; murain_hidrolasa) (Riveros-Mckay *et al.*, 2014).

Complementario a todos estos estudios, Martínez (2018), elaboró una bebida a base de aguamiel usando como cultivo iniciador *L. mesenteroides* P45, y demostró que conservó sus características que la distinguen como una cepa probiótica. También se hizo una evaluación sensorial del producto terminado para evaluar el nivel de agrado y aceptación del consumidor, con esto se amplió la variedad de productos fermentados probióticos, además que resultó una alternativa para la población intolerante a la lactosa.

3.5. Género *Lactobacillus*.

El género *Lactobacillus* se encuentra naturalmente asociado a plantas, productos vegetales fermentados, masas fermentadas y a bebidas alcohólicas. Son habituales en productos lácteos y algunas cepas se utilizan en la preparación de leches fermentadas (Lahtinen *et al.*, 2012).

Comprende un amplio grupo de bacterias no esporuladas, catalasa negativo, de morfología bacilar o cocobacilar de distintas longitudes, además son microaerófilos, por lo que requieren una baja presencia de oxígeno en el medio donde se desarrollen, así mismo, la mayoría de estas bacterias pueden crecer en medios cuyo pH es inferior a cuatro, por lo cual, permanecen presentes en la mayoría de los alimentos fermentados tras metabolizar los carbohidratos presentes (Vasiee, *et al.*, 2014).

Los lactobacilos presentan un papel importante en el hospedero, ya que realiza o complementa una serie de funciones metabólicas necesarias para el desarrollo del organismo, como la síntesis de vitaminas y la biodisponibilidad de minerales mediante la descomposición de taninos y fitatos (Zhang *et al.*, 2018).

Distintas cepas de este género pueden activar diversos componentes de la respuesta inmune, mediante la capacidad de producir y secretar metabolitos específicos que influyen en las células del hospedero (Su *et al.*, 2017).

El efecto benéfico asociado al consumo de lactobacilos como probióticos depende de su capacidad de adaptación al intestino del hospedero, ya que, tras su ingesta es sometido a factores de estrés como el pH gástrico y la presencia de sales biliares, por lo que, los mecanismos de resistencia de este tipo de bacterias mantienen la integridad de la célula, mediante la exportación de macromoléculas además de la detección de factores de estrés (Zhang *et al.*, 2018).

El tracto gastrointestinal alberga una compleja comunidad microbiana, en donde se ha desarrollado una relación simbiótica ya que sus interacciones presentan un efecto sobre la salud del hospedero, puesto que las bacterias presentes en el intestino modulan el desarrollo del sistema inmune (Satokari, 2019).

3.5.1. *Lactobacillus plantarum* P46.

Gutiérrez (2015), realizó la detección de la capacidad probiótica de lactobacilos aislados del pulque, destacando las cepas *L. brevis* 2sS1."12b y *L. plantarum* 2S1.9, dado que la denominación numérica de las cepas resultaba complicada, Morales (2019), renombró las cepas como *L. brevis* P47 y *L. plantarum* P46, respectivamente.

Se hicieron ensayos en donde dichas cepas se sometieron a condiciones de laboratorio que simulan al tracto gastrointestinal, sensibilidad a antibióticos y ensayos frente a patógenos, se demostró que *L. plantarum* P46 presentó mejor actividad probiótica.

Asimismo, Morales (2019), evaluó y caracterizó el potencial probiótico de *L. plantarum* P46, mediante ensayos *in vivo* frente a *S. enterica* serovar Typhimurium en ratones Balb/c, confirmando que la cepa P46 disminuyó hasta el 95% de la carga infecciosa en ratones machos.

3.6 Leches fermentadas.

Las leches fermentadas han estado presentes en la dieta humana de diversas regiones del mundo desde hace 9000 a. C., por lo que se han consumido prácticamente desde la domesticación de animales. Se ha tenido evidencia de la utilización de leches fermentadas en yacimientos arqueológicos relacionados con culturas de Mesopotamia; también se han encontrado reportes antiguos medicinales que citan este tipo de leches como saludables y con propiedades para luchar contra enfermedades (Aneja *et al.*, 2002).

Estos alimentos, son productos lácteos obtenidos por medio de la fermentación de la leche, por medio de la acción de cultivos adecuados y teniendo como resultado la disminución del pH con o sin precipitación isoeléctrica (coagulación).

Los cultivos de microorganismos utilizados para este fin deberán ser viables, activos y abundantes en el producto, hasta la fecha de caducidad (Gilliand, 2003).

Los microorganismos fermentativos degradan los azúcares presentes en la leche, como es el caso de la lactosa, en consecuencia, hace que esta sea más asimilable por los intolerantes, el principal producto de la fermentación de la lactosa es el ácido láctico, el cual se encuentra en mayor proporción, con esto se mejora la digestibilidad de las caseínas y se favorece la absorción de calcio por el intestino delgado. La composición mineral de la leche no resulta afectada por la fermentación, por lo que las leches fermentadas son una excelente fuente de calcio, fósforo, magnesio y zinc (Gilliand, 2003).

La leche es el hábitat normal de numerosas bacterias ácido-lácticas, éstas son las responsables de la acidificación cuando se mantiene a temperaturas óptimas de crecimiento de las bacterias antes mencionadas, durante el tiempo suficiente.

La leche ácida adquiere sabores y texturas dependiendo del tipo de bacterias que lleguen desde el entorno en el que se encuentre.

Los productos lácteos fermentados pueden ser considerados alimentos funcionales, el concepto general es que son alimentos o componentes alimenticios cuyo consumo además de una nutrición básica, genera beneficios para la salud y/o reduce el riesgo de enfermedad (Sarmiento, 2006; Valdés *et al.*, 2017; Salmerón, 2017).

Existe evidencia documentada que señala la relación de propiedades de las diferentes cepas probióticas con la salud del hospedero, se cree que las bacterias ácido lácticas tienen un papel importante en proporcionar efectos benéficos a los seres humanos.

Mediante estudios recientes se ha demostrado que algunos alimentos fermentados mexicanos muestran actividad probiótica (Wacher, 2014). En México existen diversos alimentos fermentados como lo son bebidas cuya producción es desarrollada en lugares específicos del país, por lo que algunos de estos alimentos únicamente son elaborados en poblados específicos, lo que genera un conocimiento limitado de su existencia, pero otros tales como el pozol, tepache, tegüino y el pulque, son elaborados en diferentes estados del país (Jiménez *et al.*, 2010).

3.7 Leches probióticas.

Las leches probióticas han adquirido importancia a partir de los años 80's. Los probióticos forman una categoría dentro de la clasificación de los alimentos funcionales.

Los alimentos funcionales son componentes alimenticios que aportan beneficios fisiológicos demostrados o que reducen el riesgo de padecer enfermedades crónicas además de sus funciones nutritivas básicas (Shah, 2001).

3.8. Enfermedades gastrointestinales.

A nivel mundial, los padecimientos gastrointestinales son problemas de salud pública, los cuales son resultado de estilos de vida poco saludables, el consumo de alimentos preparados con poca higiene, estas infecciones son de característica bacteriano o parasitario, causando gastroenteritis (Vila, *et al.*, 2009).

La alimentación y el estado inmunológico del hospedero influyen en la predisposición a contraer enfermedades de este tipo. Estas infecciones ocurren al ingerir alimentos contaminados, lo cual puede ocurrir a través de diferentes vías, 1) la contaminación de un alimento a otro, la cual ocurre en alimentos crudos; 2) de persona a alimentos, esto se debe a la manipulación al prepararlo o incluso al momento de ingerirlo.

3.8.1 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella* son bacterias patógenas Gram-negativas ligados a padecimientos gastrointestinales. Este género de bacterias es no esporulado, anaerobio facultativo, poseen flagelos por lo que son móviles. Existen dos especies, *S. bongori* y *S. enterica* a su vez, divididos en subespecie y estos últimos subdivididos en serotipos (Figuroa *et al.*, 2005).

S. enterica subespecie *enterica* puede clasificarse en 1547 serovariedades o serotipos diferentes. Las serovariedades se distinguen por la reacción con antisueros específicos frente a dos antígenos de la superficie bacteriana altamente variables el antígeno O que refleja la variación en las porciones externas del LPS de la superficie bacteriana y el antígeno H el cual refleja la variabilidad en la flagelina, proteína constituyente del flagelo bacteriano. El serovar aislado con mayor frecuencia de infecciones humanas en todo el mundo es *S. enterica* serovar Typhimurium (Figueira *et al.*, 2012).

Una vez que *Salmonella* logra introducirse en el epitelio intestinal, se adhiere mediante el uso de distintas adhesinas, con esto comienza la invasión, para el cual emplea un sistema especializado de secreción de proteínas, mediada por el sistema de Secreción Tipo III (SST3) los genes involucrados en este sistema se encuentran codificados en Islas de Patogenicidad de *Salmonella* (SPI, por sus siglas en inglés) (Haraga, 2008).

Las proteínas traslocadas hacia la célula intestinal generan cambios fisiológicos, lo cual induce modificaciones en las células blanco, permitiendo que el patógeno se internalice; una vez dentro se replica y posteriormente se disemina, induce la fagocitosis por macrófagos.

Simultáneamente, se activa una respuesta secretora en el epitelio intestinal, en donde se acumulan fagocitos, asociado a la producción de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa e interleucinas (IL-8, IL-23 e IL-1 beta), este proceso inflamatorio provoca que se desencadene la diarrea, principal sintomatología de la salmonelosis (Figura 2).

3.8.2 *Listeria monocytogenes*.

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos Gram-positivos cortos, regulares, no esporulados ni ramificados que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. Son anaerobias facultativas, catalasa positivas y oxidasa negativa. *L. monocytogenes* es la única especie implicada en patología humana. Se han aislado del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, pollo fresco, y congelado, alimentos frescos y procesados, queso, leche no procesada (Iglesias, *et al.*, 2017).

L. monocytogenes produce una toxina citolítica y hemolítica, llamada listeriolisina O, que actúa como un importante factor de virulencia.

Cuando es fagocitado, el microorganismo empieza a fabricar la listeriolisina, que se fija al colesterol y rompe la membrana del fagolisosoma. Este puede ser el principal mecanismo de supervivencia intracelular de este patógeno (Posada, *et al.*, 2018).

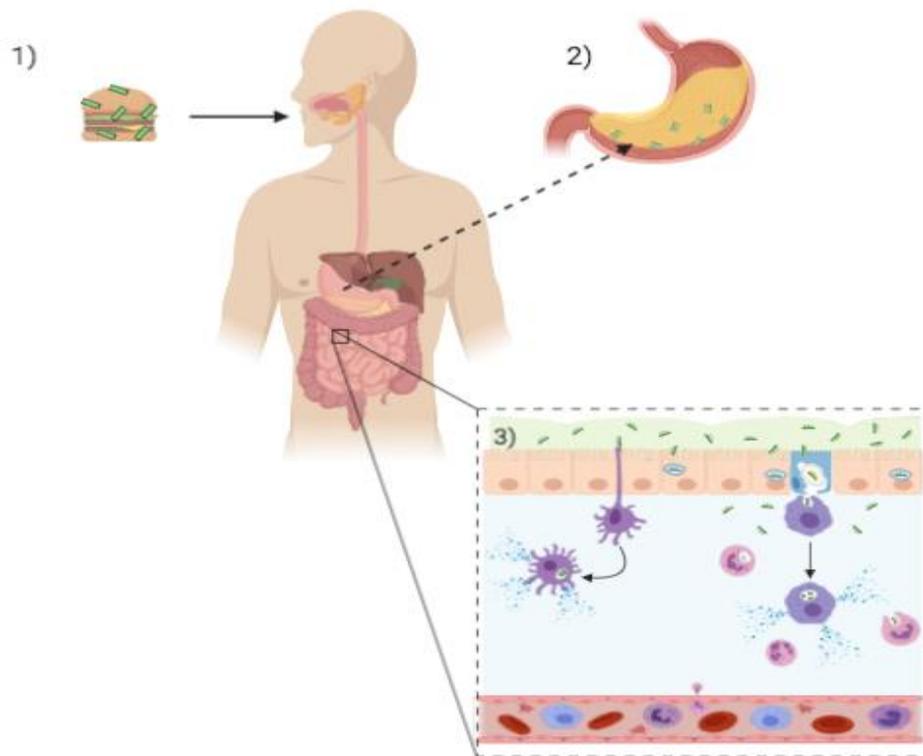


Figura 2. Mecanismo de patogenicidad de *S. enterica* serovar Typhimurium.
(Elaborado a partir de Haraga *et al.*, 2008).

3.9 Análisis Sensorial.

El análisis sensorial es la evaluación de las propiedades organolépticas realizada por medio de los sentidos humanos. Sus principios científicos están basados en la fisiología, psicología psicofísica y estadística. Su objetivo es estudiar cómo se percibe a través de los sentidos (vista, olfato, gusto, tacto y oído), las propiedades de los alimentos (Stone & Sidel, 2004).

Es la evaluación de la apariencia, olor, textura y sabor de un alimento o materia prima; esta disciplina comprende un conjunto de técnicas para la medición de las respuestas humanas hacia los estímulos provocados por los componentes de los alimentos.

Evaluar sensorialmente, es entender el papel que juegan las características que son parte de un producto en la experiencia del consumo y así conocer la aceptación o agrado de este producto.

La evaluación sensorial surge con la necesidad de evaluar la calidad de los alimentos, conocer la opinión del público consumidor y con esto mejorar los productos para conseguir la aceptación. Además, esta disciplina se encuentra relacionada con investigaciones sobre elaboración e innovación de productos nuevos para promover su introducción al mercado.

La evaluación de las características sensoriales de los productos alimenticios ha sido, y seguirá siendo un método para determinar la calidad de estos. La calidad sensorial es un parámetro que solo puede ser evaluado por humanos y consiste en una serie de pruebas objetivas que siguen una metodología definida. Hay pruebas de tipo analítica y afectiva. Dentro de los métodos analíticos se encuentran pruebas como las discriminativas descriptivas, etc.

3.9.1 Pruebas descriptivas.

Este análisis es una metodología que proporciona descripciones cuantitativas de los productos, dichas descripciones son obtenidas de las percepciones de un panel de sujetos calificados para este propósito (Keane, 1992; Brown, 2008).

Este tipo de análisis puede ser utilizado como control de calidad, ya que es capaz de monitorear los posibles cambios que los productos sufren durante el proceso de manufactura, así como durante la refrigeración del producto final.

3.9.2 Análisis descriptivo cuantitativo.

Se utilizan escalas que van de izquierda a derecha con intensidades crecientes: débil a fuerte, poco a mucho, líquido a viscoso, etc. en ellas, el panelista evalúa por sí mismo usando estas escalas.

Los valores que se asignan en esta escala sirven para obtener información sobre las diferencias o similitudes entre las muestras (Iñigo, 2013).

3.9.3 Perfil Flash.

Debido a que las pruebas descriptivas convencionales requieren de jueces entrenados y de un largo tiempo para realizar las evaluaciones, se han desarrollado otro tipo de metodologías rápidas dentro de las que se encuentra el Perfil Flash.

En el perfil flash, durante la primera sesión los evaluadores reciben un conjunto de muestras de productos y se les pide que generen (individualmente) descriptores sensoriales que hagan distinguir a los productos; posterior a esto se hace una evaluación grupal para seleccionar la lista de atributos para elaborar el perfil de la muestra, posteriormente en las siguientes sesiones los jueces evalúan todos los atributos de las muestras (Hernández, 2005).

3.9.4 Análisis de Procrustes Generalizado.

Es un método multivariado utilizado ampliamente en la evaluación sensorial perteneciente a los métodos de análisis de datos derivados de individuos. Es un

consenso multidimensional que utiliza la rotación, la traslación y el escalamiento para dar cuenta de las diferencias de los panelistas (García, 2016).

El GPA obtiene una matriz consenso con los datos de cada uno de los panelistas, y trata de conseguir que los objetos estén tan cerca como sea posible, mediante transformaciones. Una vez obtenida la matriz consenso, se realiza una gráfica de PCA (Zea, 2016).

3.9.5 Análisis de Componentes Principales (PCA).

El análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés), es una técnica utilizada para reducir las dimensiones de un conjunto de datos (Shlens, 2009), construye una transformación lineal que escoge un nuevo sistema de coordenadas para el conjunto original de datos en el cual la varianza de mayor tamaño del conjunto de datos es capturada en el primer eje (llamado Primer Componente Principal), la segunda varianza más grande es el segundo eje, y así sucesivamente (Shlens, 2009).

En la interpretación del PCA se debe contemplar:

- 1.- La suma de la información del primer y segundo eje (%), es llamada representación acumulada; la información faltante, suele ser representada por las demás dimensiones.
- 2.- Las muestras se encuentran cercanas a los vectores de los atributos que las representan.
- 3.- Mientras más cercanos estén los productos entre sí en la proyección, se demuestra semejanza entre sus propiedades sensoriales.
- 4.- Cuando existe referencia, cuanto más se acerque al centro será considerada como mejor referencia, puesto que representa el promedio de acuerdo con los atributos calificados (Flores, 2017).

4 JUSTIFICACIÓN.

Estudios previos del análisis de la diversidad bacteriana presente en aguamiel y durante la fermentación del pulque, han demostrado la presencia de una gran cantidad de BAL, *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46 cepas aisladas del pulque han destacado por su potencial probiótico.

Dentro de las principales aplicaciones de los probióticos está la prevención y tratamiento de la diarrea, por consumo de alimentos contaminados con microorganismos patógenos, así como la asociada a la ingesta de antibióticos. Actualmente, diversos estudios, han inferido que los probióticos están involucrados en procesos mucho más complejos como lo son la reducción del colesterol en suero, la estimulación del sistema inmune, y brindar calidad de vida a los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, por mencionar algunos.

En México, el consumo de probióticos se centra en alimentos de origen lácteo. Los productos lácteos funcionales que actualmente más se comercializan a nivel mundial, son las leches fermentadas. Existe evidencia sobre los beneficios para la salud del consumidor, al incorporar bacterias probióticas en leches fermentadas.

Tomando en cuenta lo anterior, el presente trabajo permitirá el desarrollo de bebidas lácteas fermentadas con las cepas *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46, con evidencia de que poseen un importante potencial probiótico, por primera vez se evaluará en una matriz distinta a la de su origen.

5 HIPÓTESIS.

Las cepas *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46 caracterizadas previamente en el pulque por su potencial probiótico, serán capaces de desarrollar y fermentar leche descremada, manteniendo *in vitro* las características de resistencia a condiciones del tracto gastrointestinal, así como su efecto antagonista frente a microorganismos patógenos, además aportará características sensoriales a la bebida final para cumplir con las expectativas de consumidores de este tipo de productos.

6 OBJETIVOS.

6.1 Objetivo General.

Elaborar una bebida láctea fermentada con potencial probiótico utilizando las cepas *Leuconostoc mesenteroides* P45 y *Lactobacillus plantarum* P46 aisladas del pulque.

6.2 Objetivos particulares.

- Realizar la fermentación de leche descremada usando como cultivo iniciador las cepas *L. mesenteroides* P45 y/o *L. plantarum* P46 aisladas del pulque.
- Evaluar la viabilidad de las cepas *L. mesenteroides* P45 y/o *L. plantarum* P46 utilizando leche descremada como medio de cultivo.
- Determinar la resistencia *in vitro* de las cepas probióticas desarrolladas en leche descremada a condiciones de pH ácido y sales biliares, simulando las condiciones gastrointestinales.
- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de las cepas probióticas desarrolladas en leche descremada frente a microorganismos patógenos asociados a enfermedades gastrointestinales.
- Evaluar el perfil sensorial de las muestras de leche descremada para conocer sus atributos de aspecto, olor, sabor, textura y resabios para relacionarlos con sus ingredientes y los metabolitos productos de la fermentación.

7 METODOLOGÍA.

7.1 Diagrama de la metodología.

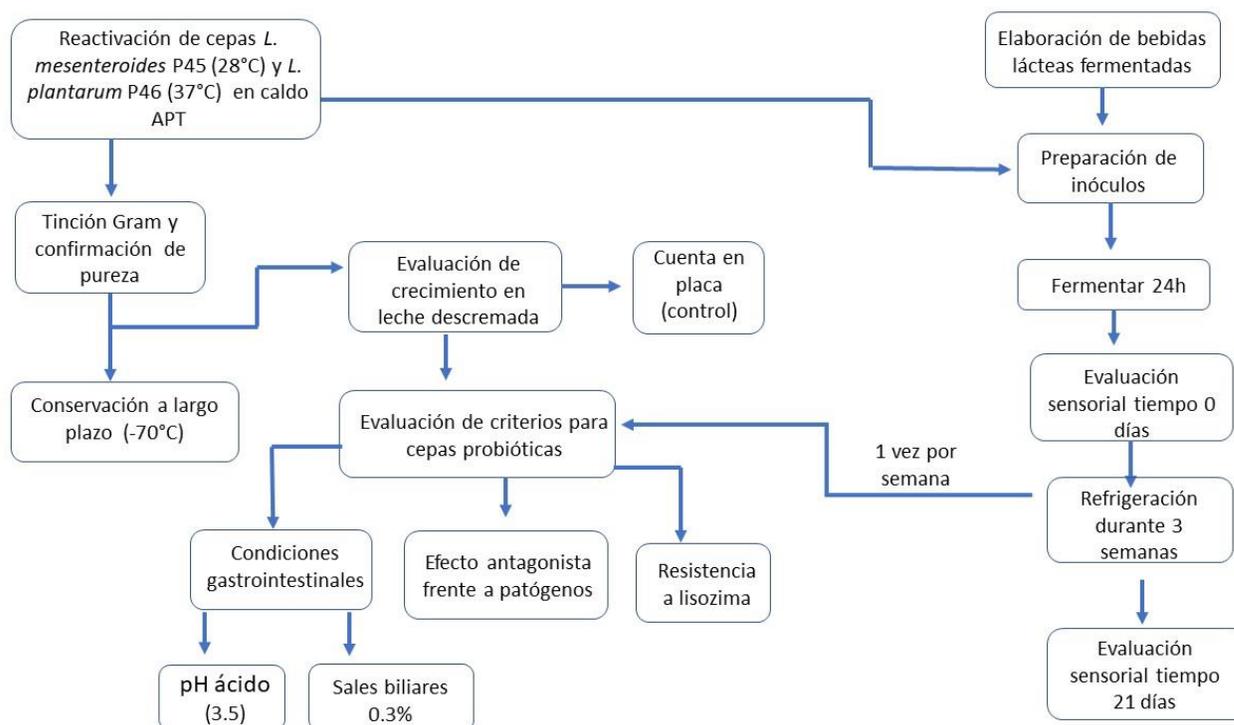


Figura 3. Metodología seguida para este proyecto.

7.2 Activación y conservación de cepas.

Las cepas *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46 fueron conservadas en ultracongelador a -70°C. Cada una se reactivó tomando con palillos de madera estériles una muestra y se inoculó en 4.5 mL de caldo APT (Difco) a 28°C/24 h y 37°C/24 h respectivamente, esta última en condiciones de microaerofilia (atmósfera rica en CO₂) esto se logró llevando a cabo la reacción de 1 g de ácido cítrico más 2 g de NaHCO₃ en jarra de anaerobiosis. Al término de la incubación, se reinocularon las cepas en placas de agar APT (Difco) por agotamiento radial, incubando a las condiciones antes descritas.

Posterior al desarrollo en el medio, se corrobó su pureza, para considerarse puras se verificó homología en forma, tamaño y características en tinción de Gram.

Se realizó una suspensión saturada de cada cepa en 4.5 mL de caldo APT (Difco), de esta se tomaron 500 µL y se depositaron en crioviales (estériles) de 1 mL de capacidad, añadiendo además 500 µL de glicerol al 50% v/v, tras homogeneizar se preservaron en ultracongelación -70°C.

7.2.1 Corroboración de pureza de bacterias ácido-lácticas.

A partir de cultivos de 24 h incubados en las condiciones descritas en el punto 7.2 se corroboró su pureza mediante la observación morfo colonial en agar APT (Difco), posteriormente se realizó la tinción Gram y se observó su morfología al microscopio, del mismo cultivo se realizó la prueba de catalasa, ya que la ausencia de dicha enzima es característica de este género (Cástulo *et al.*, 2008).

7.2.2 Conservación y corroboración de pureza de cepas patógenas.

Para los ensayos de antagonismo frente a patógenos se usaron las cepas *L. monocytogenes* CFQ-B-103 y *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. Tales microorganismos fueron seleccionados por ser previamente empleadas en retos microbianos frente a BAL (Matus, 2011; Giles-Gómez *et al.*, 2016).

Los microorganismos patógenos empleados fueron recuperados a partir de cultivos inoculados por agotamiento radial en agar luria o Agar infusión cerebro corazón (BHI), de los cuales se corroboró su pureza mediante tinción Gram, para considerarse puras se verificó la homología en forma y tamaño.

Para su conservación a largo plazo se realizó una suspensión saturada en caldo Luria o BHI (acorde a la tabla 2) a partir de cultivos incubados a 37°C durante 24 h, del cual se depositaron 500 µL en un criovial de 1.0 mL de capacidad y 500 µL de glicerol al 50% v/v tras ser homogeneizado se conservó en ultracongelación a -70°C.

Tabla 2. Cepas patógenas empleadas.

Microorganismo	Medio de cultivo	Procedencia
<i>L. monocytogenes</i> CFQ-B-103	Agar y caldo BHI (DIBICO)	Colección del Cepario de la Facultad de Química
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	Agar y caldo Luria (DIBICO)	

7.3 Evaluación del desarrollo y capacidad probiótica de las cepas aisladas del pulque en la matriz láctea.

7.3.1. Cuantificación de las cepas probióticas en la matriz láctea.

Se reactivaron las cepas como se indica en el punto 7.2.1. Posterior al desarrollo en caldo APT se midió la densidad óptica a 600nm (D.O.₆₀₀) en el espectrofotómetro Ultrospec (2000) y se ajustó a D.O.₆₀₀= 0.2 para determinar el volumen necesario para inocular en matraces con 90 mL de leche descremada 10% v/v, esto por triplicado para cada cepa probiótica. Se incubaron los matraces a 28°C / 24 h para *L. mesenteroides* P45 y a 37°C / 24 h para *L. plantarum* P46. Al término de la incubación se hicieron diluciones decimales sucesivas en solución salina 0.9% estéril hasta 10⁻⁷. Se inocularon 100 µL de las diluciones 10⁻¹, 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶ y 10⁻⁷ y se plaquearon por extensión superficial con perlas de vidrio en placas de agar APT.

Las placas fueron incubadas a las condiciones descritas anteriormente para cada cepa durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se realizó el conteo en placas, tomando como criterio de cuantificación aquellas que contenían entre 30 – 300 unidades formadoras de colonias (UFC).

7.3.2. Cuantificación de resistencia a lisozima.

Se tomaron al azar 3 colonias a partir de las cajas estadísticamente significativas (10⁻⁶) a partir de la cuantificación del desarrollo en la leche fermentada descrito en

el punto 7.3.1, y se inocularon en 4.5 mL de caldo APT con lisozima [7 mg/mL] y se incubaron a las condiciones descritas en el punto 7.2.1 durante 0.5, 1.0 y 2.0 h.

Al término de la incubación se efectuaron diluciones decimales seriadas en solución salina estéril hasta 10^{-7} . Se plaquearon únicamente de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-7} , 100 μ L por extensión superficial en placas de agar APT con perlas de vidrio.

7.3.3. Cuantificación de la resistencia a pH ácido y sales biliares 0.3 % a las 24 h.

De las colonias obtenidas en el ensayo descrito en 7.3.1 se tomaron 3 de distintas placas de las diluciones 10^{-6} las cuales se inocularon en los medios a las siguientes condiciones 1) 4.5 mL de caldo APT a pH 3.5 y 2) 4.5 mL de caldo APT con 0.3% de sales biliares (OXOID).

Después de realizar el inóculo se incubaron los medios a las condiciones descritas en 7.2.1 durante 24 h. Pasado el tiempo, se efectuaron diluciones decimales seriadas en solución salina estéril hasta 10^{-7} , se plaquearon 100 μ L únicamente de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} y 10^{-7} por extensión superficial en placas de agar APT con perlas de vidrio.

Cada una de las determinaciones descritas en los puntos 7.3.1, 7.3.2 y 7.3.3, se realizaron por triplicado y para determinar la concentración de microorganismos se consideraron las placas que tuvieran entre 30 – 300 UFC. Posteriormente, obtenidos los resultados se realizó el análisis estadístico.

7.3.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos.

7.3.4.1. Reactivación e inoculación de la cepa probiótica.

De la misma manera que se describió en el punto 7.3.2 se tomaron colonias procedentes del desarrollo en leche y se inocularon en caldo APT incubando a las condiciones anteriormente descritas durante 24 horas.

Posteriormente, utilizando el equipo Vortex (Thermolyne) se homogeneizaron las muestras durante 15 segundos, asegurándose que se generara el vórtice al centro del tubo. Posteriormente se dividió la caja en 4 cuadrantes, se transfirieron 4 gotas de 3 μ L de cultivo estandarizado a D.O.₆₀₀= 0.2, en el centro de cada cuadrante en placas de agar APT, después de 1 h, tiempo en el que se espera se absorba el cultivo en la placa de agar, se incubaron a las condiciones descritas en el punto 7.2.1.

7.3.4.2. Preparación de microorganismos patógenos.

A partir de los cultivos conservados según lo descrito en el punto 7.2.2, se reactivaron los microorganismos patógenos en sus medios líquidos de acuerdo con la tabla 2, incubando durante 24 h a 37°C, después del tiempo de incubación se recurrió a una segunda reactivación de los microorganismos con el fin de utilizar células competentes viables siguiendo las mismas condiciones de incubación.

Se procedió a medir la D.O. de cada microorganismo y llevando a cabo el ajuste a $DO_{600}= 0.2$ con el fin de conocer el volumen de patógeno a adicionar en 9 mL de medio semisólido BHI o Luria (de acuerdo con la Tabla 2), adicionado con 0.5% de agar bacteriológico, el cual previamente fundido y a una temperatura aproximada de 45°C.

Una vez obtenida la mezcla final de patógeno con medio semisólido se procedió a homogeneizar la muestra durante 15 segundos, procurando generar el vórtice. Se hizo este procedimiento para cada microorganismo patógeno utilizado.

7.3.4.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Con las mezclas de cada uno de los patógenos, se procedió a verterlas en las placas obtenidas en el punto 7.3.4.1 procurando se realice de la parte media de la placa generando la extensión hacia los alrededores de esta, siguiendo el mismo

procedimiento para todos los microorganismos. Una vez solidificado el agar, se realizó la incubación de las placas a 37°C/ 24 h, posterior al tiempo de incubación se determinó el efecto antagonista de las cepas probióticas contra patógenos observando la presencia o ausencia de halos de inhibición, registrando su diámetro en mm.

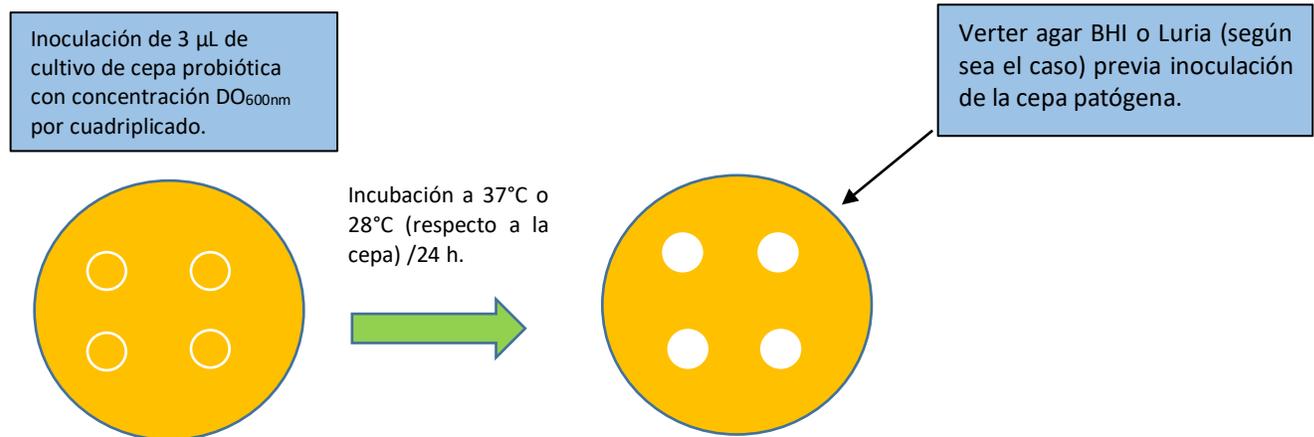


Figura 4. Metodología empleada para el ensayo de antibiosis contra cepas patógenas.

7.4 Elaboración de la bebida fermentada.

Se reactivaron las cepas probióticas de acuerdo con lo descrito en el punto 7.2, posterior a esto se realizó una reinoculación de ellas en 100 mL de caldo APT siguiendo las mismas condiciones de incubación de cada cepa durante 24 h.

Terminado el tiempo de incubación se realizó el ajuste de $D.O._{600nm} = 0.2$ para conocer el volumen de cultivo necesario para adicionar (~ 50 mL) a 500 mL de leche descremada. Estos lotes obtenidos de cada cepa fueron utilizados para la evaluación sensorial.

En el caso de los probióticos, es fundamental comprobar la viabilidad, así como las características de la cepa utilizada como cultivo iniciador, para asegurarle al

consumidor que al ingerirlos obtendrá los beneficios a la salud de los que ya se ha hablado antes, para evaluar esto los ensayos de viabilidad en leche, resistencia a sales biliares y pH ácido, además de antagonismo frente a patógenos se repitieron de acuerdo a lo descrito en los puntos 7.3.1, 7.3.2, 7.3.3, 7.3.4, después de 7, 14 y 21 días de refrigeración (10°C), esta información podría servir a futuro para determinar la vida de anaquel del producto final.

7.5 Evaluación sensorial: Perfil Flash.

Se realizó el perfil flash en los días 1 y 21 de fermentación, del lote de la bebida fermentada con la cepa probiótica *L. mesenteroides* P45, durante este periodo se mantuvo bajo condiciones de refrigeración (10°C). Se colocaron 20 mL de cada una de las muestras en vasos de plástico del #0 codificados con 3 dígitos de números aleatorios. Las muestras se conservaron bajo condiciones de refrigeración hasta el momento de la evaluación.

7.5.1 Generación de atributos.

Se realizó una reunión con jueces entrenados en metodología descriptiva del área de Evaluación Sensorial, esto con el fin de generar los atributos de la muestra de la bebida fermentada. Durante la sesión, a cada juez se le presentó una charola de plástico con la muestra de leche, así como un vaso de agua potable, servilletas y una galleta, con el objetivo de no saturar a los gustos de los jueces.

De esta muestra se le pidió a los jueces señalaran todos los atributos que eran capaces de percibir con el fin de agruparlos en las categorías: aspecto, color, olor, sabor y textura. Posteriormente en una reunión grupal se revisaron los atributos generados por el grupo de jueces y se seleccionaron aquellos que consideraron importantes de ser evaluados, con esta información se procedió a elaborar los cuestionarios.

Se evaluaron sensorialmente dos muestras de leche fermentada, una con la cepa P45 y otra con la cepa P46, con ayuda de un panel de 25 jueces con un rango de edad entre 20 y 28 años.

Las muestras se prepararon como se describe en el punto 7.4 de este apartado. Esta evaluación se efectuó bajo condiciones controladas: luz blanca, en mamparas blancas, las muestras previamente codificadas se colocaron en una charola acompañadas de servilletas y un vaso de agua purificada, así como laptops en las que se encontraban cargados los cuestionarios diseñados en el software FIZZ Acquisition 2.5.1 mediante el empleo de la técnica de Perfil Flash. Esta evaluación se realizó en el anexo del Laboratorio 4D, Laboratorio de Evaluación Sensorial del Departamento de Alimentos y Biotecnología.

7.5.2 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en la evaluación sensorial, se utilizó un software electrónico FIZZ (2.3) módulo Calculations 2.50 (BYOSISTEMES, 2007, Courtenon, France). El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el software estadístico XLSTAT versión 10.0 (Addinsoft, 2012) mediante el Análisis de Procrustes Generalizado (PGA por sus siglas en inglés).

Dicho análisis procesa los datos originales mediante transformación de la matriz de los resultados de cada juez resolviendo las diferencias producidas por el efecto de la escala, el efecto de interpretación y el efecto de magnitud, con la restricción de conservar las proporciones entre los productos para cada juez, el análisis Procrustes cada panelista corresponde a una matriz de datos y se produce un consenso espacial (Dijksterhuis, 1996; Lawless y Heymann, 1998). Una vez que se obtiene la matriz consenso, los promedios grupales espaciales de los jueces por muestra, se realiza un Análisis de Componentes Principales (ACP) por este se puede obtener un porcentaje que explique la varianza de las dimensiones (Dijksterhuis, 1996).

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1 Reactivación y comprobación de pureza de las cepas *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46.

Se logró la recuperación de las cepas *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46 en caldo APT a 28°C y 37°C respectivamente. Esto indicó que se encontraban viables tras el tiempo de almacenamiento, y así generar inóculos de los microorganismos de estudio. Para ambas cepas se observaron en agar APT colonias blancas, puntiformes, bordes enteros y elevación convexa.

Se hicieron observaciones al microscopio de tinciones Gram realizadas a cultivos de 24 h a 28°C de la cepa *L. mesenteroides* P45, se observaron diplococos Gram-positivos (Figura 5).

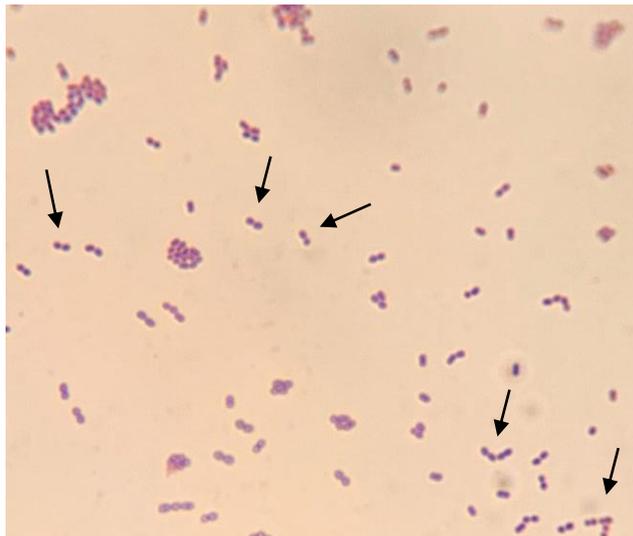


Figura 5. Morfología y Gram de *L. mesenteroides* P45 desarrollada en caldo APT a 28°C por 24 h. Aumento total: 1000X. Las flechas muestran Diplococos Gram-positivos.

La observación macroscópica de las colonias de la cepa P45 fueron colonias grandes, blancas, de 0.5 – 1.5 mm de ancho, bordes redondos, con forma lenticular en agar APT.

Las cepas de *Leuconostoc* son Gram-positivas, generalmente cocos ovoides, en agrupación de diplococos, que a menudo forman cadenas durante su crecimiento exponencial, son inmóviles, no formadoras de esporas, anaerobias facultativas con características mesofílicas, con un crecimiento óptimo entre 20°C y 30°C (de Paula *et al.*, 2014).

En la Figura 6, se presentan las observaciones al microscopio de la tinción de Gram (aumento 1000x) de la cepa *L. plantarum* P46 la cual es Gram positiva, se observaron cadenas cortas de dos bacilos de grosor mayor y de extremos redondos (Melgar-Lalanne *et al.*, 2012).

Dentro de las características del género *Lactobacillus* se encuentra la carencia de la enzima catalasa, ya que, al ser microorganismos aerotolerantes, no hay producción de peróxido de hidrógeno en el medio al ser este uno de los productos finales del metabolismo aeróbico (Madigan *et al.*, 2015), esto coincide con los resultados obtenidos para la prueba de catalasa, dando un resultado negativo.



Figura 6. Morfología y Gram de *L. plantarum* P46 desarrollada en caldo APT, incubada a 28°C por 24 h. Aumento total: 1000X. Las flechas muestran bacilos en cadenas, Gram-positivos.

L. mesenteroides P45 y *L. plantarum* P46, que fueron aisladas de la fermentación del pulque (Giles *et al.*, 2016 y Gutiérrez, 2015), se evaluó su capacidad de crecimiento en una matriz láctea dado que la gran mayoría de los alimentos probióticos se encuentran en productos lácteos.

8.2 Reactivación y comprobación de pureza de las cepas patógenas *S. enterica* serovar Typhimurium y *L. monocytogenes*.

Se recuperaron las cepas patógenas *S. enterica* serovar Typhimurium y *L. monocytogenes* en los medios correspondientes según la Tabla 2.

En la figura 7, se muestra la microscopía de *S. enterica* serovar Typhimurium, se muestran bacilos cortos, formando cadenas o de forma individual, las cepas de *S. enterica* serovar Typhimurium son no esporuladas, anaerobias facultativas, móviles (Figuroa *et al.*, 2005)

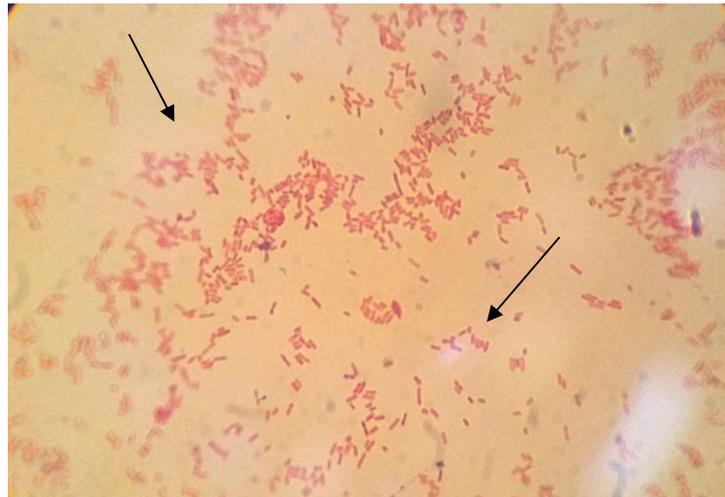


Figura 7. Morfología y Gram de *S. enterica* serovar Typhimurium desarrollada en caldo Luria, incubada a 37°C / 24 h. Aumento total: 1000X. Las flechas muestran bacilos cortos, Gram-negativos.



Figura 8. Morfología y Gram de *L. monocytogenes* desarrollada en caldo BHI, incubada a 37°C/ 24 h. Aumento total: 1000X. Las flechas muestran bacilos cortos Gram-positivos.

Las bacterias del género *Listeria*, son bacilos cortos Gram-positivos, regulares, no esporulados, suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. En la figura 8, se muestran los resultados de la microscopía de *L. monocytogenes*, se observan bacilos Gram-positivos, cortos, algunos de forma individual y otros en pequeñas cadenas.

8.3 Cuantificación preliminar las cepas probióticas en una matriz láctea.

La cuantificación se realizó con el fin de tener una referencia del crecimiento de los microorganismos en la matriz láctea, además de poder realizar la comparación sobre su capacidad de crecimiento a condiciones similares a las del tracto gastrointestinal.

8.3.1 *L. mesenteroides* P45.

La cuenta de las células viables de la cepa *L. mesenteroides* P45, cuando se inoculó en leche descremada en una concentración de 10% v/v, resultó de 9.16 Log₁₀ UFC/mL (100%), (luego del ajuste de DO₆₀₀ = 0.2) incubado a 28°C/24 h. Estas cuantificaciones se realizaron con el fin de tener una referencia sobre el crecimiento de este microorganismo en la matriz láctea.

En este trabajo *L. mesenteroides* P45 fue evaluada por primera vez en un ambiente distinto al de su origen, además de poder realizar comparaciones sobre su capacidad de desarrollo en otros ensayos que se efectuaron para evaluar su potencial probiótico en un ambiente lácteo; así como la posible viabilidad que pudiera tener la cepa en la bebida final.

El requisito básico para los probióticos es que los productos deben contener suficientes cantidades de microorganismos hasta su fecha de caducidad (Sharma *et al.*, 2014); en este sentido (Iglesias *et al.* 2017), señalan que la concentración mínima de probióticos con efecto en la salud humana tiene un rango que va de 5 – 9 Log₁₀ UFC/mL.

En este sentido, el crecimiento y viabilidad de la cepa probiótica, permite la obtención de una bebida láctea con características adecuadas para su consumo y comercialización, así como el cumplimiento de normas internacionales respecto al diseño de alimentos funcionales probióticos.

Tabla 3. Resultados de la evaluación del crecimiento de *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46 en leche al 10% (v/v)

Microorganismo Medio	<i>L. mesenteroides</i> P45 (Log ₁₀ UFC/mL)	<i>L. plantarum</i> P46 (Log ₁₀ UFC/mL)
Leche descremada	9.16	9.14

Al realizar la primera evaluación de viabilidad para la cepa antes mencionada, en medio lácteo mostro un 97.03% de supervivencia, comparado con el control (caldo APT); este porcentaje fue considerablemente más alto comparado con la viabilidad que presenta *L. mesenteroides* P45 en aguamiel (Figura 9), esto podría atribuirse a que el medio contiene factores de crecimiento idóneos para el crecimiento óptimo de la cepa ya mencionada.

Tabla 4. Resultados de pH de matriz láctea fermentada con *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46.

Microorganismo	<i>L. mesenteroides</i> P45	<i>L. plantarum</i> P46
pH	5.4	4.6

Existen diversas investigaciones enfocadas en el estudio de microorganismos aislados del pulque, Ramírez (2018), efectuó la cuantificación de la cepa P45 en caldo APT registrando un crecimiento de 9.44 Log₁₀ UFC/mL (Tabla 5) después de incubar durante 24 h a 28°C, se elaboró una bebida a base de aguamiel, demostrando un crecimiento de 8.70 Log₁₀ UFC/mL (después de 24 h de fermentación), observando que mantiene su viabilidad. El nivel de crecimiento mostrado en la bebida de aguamiel fue de 81.77%.

8.3.2 *L. plantarum* P46.

La cuenta de las células viables de la cepa *L. plantarum* P46, cuando se inoculó en leche descremada en una concentración de 10% v/v, resultó de 9.14 Log₁₀ UFC/mL (100%), (luego del ajuste de DO_{600nm} = 0.2) incubado a 37°C/24 h, tomando como referencia el criterio de la FAO/OMS (2002), para considerar un alimento probiótico y la concentración de desarrollo de esta cepa, cumple con el primer criterio para ser un alimento funcional.

Gutiérrez (2015), aisló a *L. plantarum* P46 del pulque quien además caracterizó cualitativamente sus propiedades probióticas; Morales (2019), corroboró el potencial probiótico a partir de cultivos en concentración estandarizadas en caldo APT incubando durante 24 a 37°C en condiciones de microaerofilia, reportando una concentración de células viables de 7.72 Log₁₀ UFC/mL, con un porcentaje de crecimiento de 89.98%.

El % de crecimiento de la cepa P46 (100.66%), fue más alto comparado con el % reportado por Morales (2019), en caldo APT (Figura 9), este porcentaje indicó una extraordinaria adaptación de la cepa a la matriz láctea. Algunas de las cepas del género *Lactobacillus* son de la más utilizadas como cultivos iniciadores de la

fermentación de muchos productos lácteos comerciales y no comerciales (Iñiguez-Palomares *et al.*, 2014).

Tabla 5. Evaluación del crecimiento de *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46 en distintos medios. (Elaborada a partir de Giles *et al.*, 2016; Ramírez 2018 y Morales 2019).

Microorganismo	<i>L. mesenteroides</i> P45 (Log ₁₀ UFC/mL)	<i>L. plantarum</i> P46 (Log ₁₀ UFC/mL)
Caldo APT Ajuste a D.O. 600nm = 0.2	9.44	9.08
Aguamiel Ajuste a D.O. 600nm = 0.2	8.72	N.D.
% de crecimiento	81.77%	N.D.
Leche descremada Ajuste a D.O. 600nm = 0.2	9.16	9.14
% de crecimiento	97.03%	100.66%

N.D.: No se ha determinado el crecimiento de *L. plantarum* P46 en aguamiel.

En la actualidad, cada vez es más común que la población presente intolerancia a la lactosa, debido a la deficiencia de actividad la enzima β -galactosidasa, por lo cual la lactosa no es digerida, lo que origina diversos, como puede ser dolor abdominal, diarrea y flatulencias (Savaino *et al.*, 2013).

Las bacterias del género *Lactobacillus*, producen la enzima β -galactosidasa, la cual actúa igual que la enzima de origen humano, permitiendo su digestión en personas con deficiencia en la actividad de esta enzima (Madry *et al.*, 2012), favoreciendo así la disminución de los malestares causados por el consumo de productos lácteos.

8.4 Ensayo de sobrevivencia Lisozima, pH ácido y sales biliares.

La FAO y la OMS (2002), han establecido criterios y recomendaciones para la evaluación de la funcionalidad de microorganismos como probióticos dentro de los cuales se encuentran: tolerancia a condiciones del tracto gastrointestinal pH ácido y sales biliares, adhesión a células epiteliales e inhibición de patógenos.

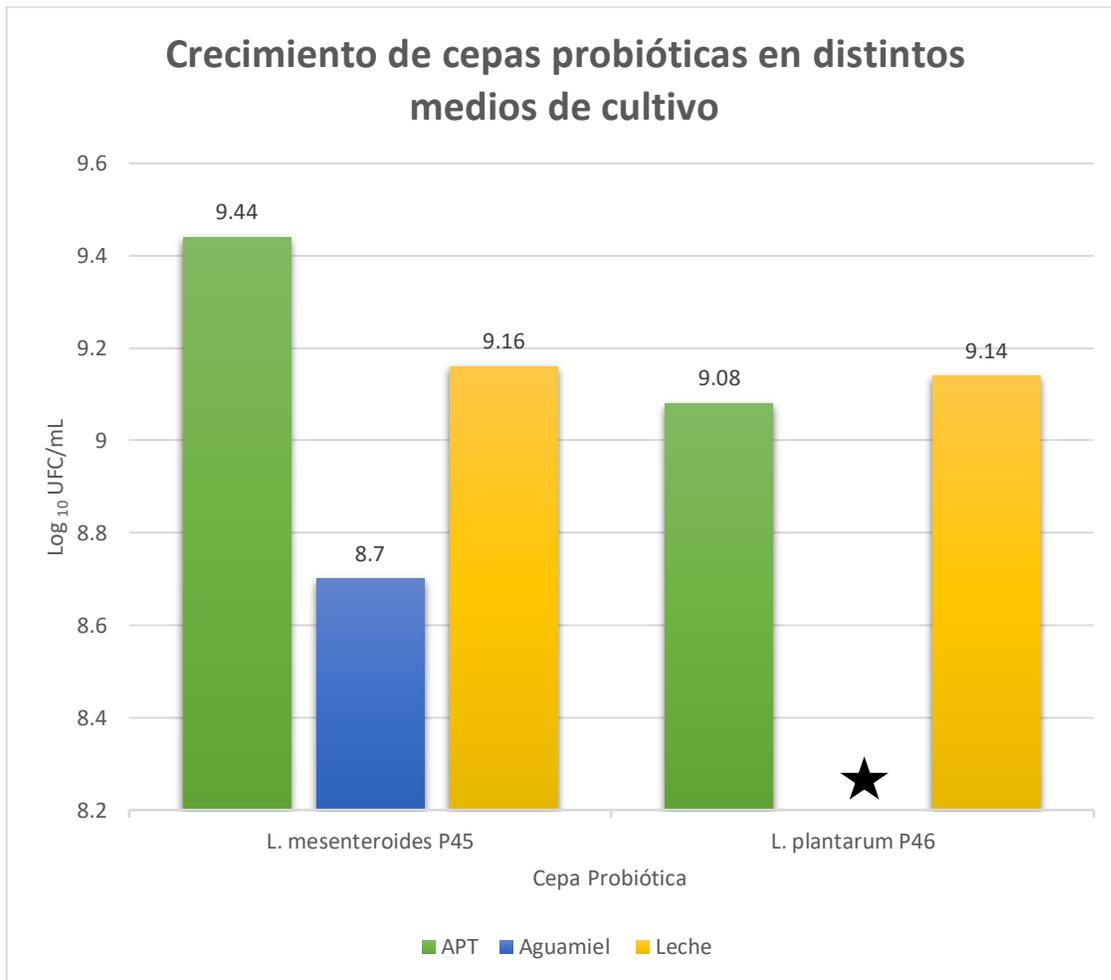


Figura 9. Evaluación del crecimiento de las cepas probióticas en distintos medios
 Nota ★: No se ha evaluado en estudios el crecimiento de *L. plantarum* P46 en aguamiel

Es importante garantizar la sobrevivencia de las BAL a las condiciones del tracto gastrointestinal de los seres humanos, para esto es necesario probar su estabilidad y resistencia a lisozima, a pH ácido y a sales biliares (Giles *et al.*, 2016) esto con el fin de asegurar su potencial benéfico en el huésped.

En todos los factores descritos anteriormente se han evaluado las cepas probióticas empleadas en el presente estudio, sin embargo al haber desarrollado la fermentación en una matriz láctea pudieran cambiar dichas características. Por ello se realizaron los ensayos correspondientes a resistencia a lisozima, pH 3.5 y sales biliares 0.3%, dichas condiciones fueron definidas dado que el primer paso de la digestión de alimentos se da en la boca, lugar donde se encuentra la enzima

lisozima, por otro lado en el estómago se presentan las condiciones más extremas de acidez (pH entre 2.5 y 3.5). Una vez que han sobrevivido a estas condiciones, llegan a intestino delgado donde se encuentra el segundo reto, las sales biliares presentes (0.35%) para la digestión de los alimentos (De Castro y Pérez, 2006; Ganong, 1996).

8.4.1 Resistencia a lisozima.

La lisozima es una enzima que tiene la capacidad de romper la pared celular de bacterias, esto porque hidroliza los enlaces glucosídicos beta 1,4 entre el ácido N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG); esta se encuentra presente en sustancias segregadas por los seres vivos, tales como las lágrimas, leche y la saliva.

Por esto es importante evaluar la resistencia de las cepas involucradas en la fermentación de las bebidas a realizar en el presente trabajo, al ingerir, la saliva va a participar en el primer paso de digestión y al mismo tiempo será el primer obstáculo al que deberán enfrentarse.

8.4.1.1 Resistencia a lisozima de *L. mesenteroides* P45.

Después de permanecer en contacto a lisozima durante 30 minutos, *L. mesenteroides* P45 presentó 7.54 Log₁₀ UFC/mL de células viables, esto representó un 82.31% de nivel de crecimiento.

La cepa P45 al fermentar una matriz distinta a la de su origen, sigue siendo una cepa de alta resistencia a esta enzima, lo cual garantiza que sobreviva al primer paso de la digestión de los alimentos.

La resistencia de la cepa P45 fue reportada previamente. Esta cepa después de desarrollar en caldo APT y al ser sometida a una concentración de 100 mg/mL de lisozima, presentó un nivel de crecimiento del 89.56% (Giles *et al.*, 2016), por lo que

es posible afirmar que en la matriz láctea esta cepa presentó un comportamiento similar.

Tabla 6. Resistencia de las cepas *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46 a lisozima [7 mg/mL].

Tiempo de incubación	<i>L. mesenteroides</i> P45 (Log ₁₀ UFC/mL)	<i>L. plantarum</i> P46 (Log ₁₀ UFC/mL)
30 minutos	7.54	9.41
60 minutos	7.36	9.39
120 minutos	7.17	9.36

8.4.1.2 Resistencia a lisozima de *L. plantarum* P46.

L. plantarum P46, al realizar el ensayo frente a lisozima [7 mg/mL], presentó una concentración de 9.41 Log₁₀ UFC/mL de células viables (Tabla 6), haciendo una comparación con su viabilidad en leche, presenta crecimiento de 97.13%.

Cabe destacar que esta es la primera ocasión en la que la cepa se pone a prueba a dicha condición, demostrando a pesar de no estar en su ambiente de origen, presenta una alta resistencia en contacto con lisozima.

Las BAL son capaces de resistir el efecto producido por la enzima lisozima debido a que pueden presentar modificaciones en los componentes que forman su pared celular, (Chapot *et al.*, 2014) describen que existen mecanismos de O-acetilación, N-acetilación o amidación de N-acetilmurámico (NAM) y N-acetilglucosamina (NAG), lo cual impide que la lisozima reconozca el enlace glucosídico entre estos (Pushkaram, *et al.*, 2015).

8.4.2 Evaluación de crecimiento de *L. mesenteroides* P45 a condiciones similares a tracto gastrointestinal.

Estos ensayos se realizaron con la metodología descrita en el inciso 7.3.3. Posterior a la inoculación e incubación en la matriz láctea, se observó que la cepa P45 muestra una concentración de 9.12 Log₁₀ UFC/m en el reto de condiciones de acidez, y de 8.53 Log₁₀ UFC/mL en el reto de sales biliares (Tabla 7), se registraron porcentajes de sobrevivencia de 91.13% y 89.18% respectivamente (Tabla 7). Con esto se corroboró la presencia de células viables después del tiempo de incubación ante dicha condición gastrointestinal. Este resultado concordó con estudios previos, Campos (2010), Matus (2011) y Giles *et al.*, (2016), reportaron una evaluación de la cepa P45 ante dichas condiciones, mostrando que mantuvo su viabilidad (Figura 10).

Hasta este punto, *L. mesenteroides* P45, demostró además de ser viable en la matriz láctea, que conservó sus propiedades que la hacen una cepa resistente a condiciones similares a las que enfrentaría en el tracto gastrointestinal, con esto ya ha cumplido con dos de los criterios más importantes para ser parte de un producto probiótico.

Tabla 7. Resultados del desarrollo de las cepas *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46 a condiciones de pH ácido y sales biliares 0.3%.

Cepa	Control (Desarrollo en leche) (Log ₁₀ UFC/mL)	pH 3.5 (Log ₁₀ UFC/mL)	Sales biliares 0.3% (Log ₁₀ UFC/mL)
<i>L. mesenteroides</i> P45	9.16	9.12	8.53
<i>L. plantarum</i> P46	9.14	9.24	9.45

8.4.3. Evaluación de crecimiento de *L. plantarum* P46 a condiciones similares a tracto gastrointestinal.

L. plantarum P46 al ser sometida al reto de acidez presentó una concentración de viables de 9.24 Log₁₀ UFC/mL (Tabla 7) un % de crecimiento de 101.10%, comparado con lo reportado por Morales (2019), en caldo APT.

8.4.3. Evaluación de crecimiento de *L. plantarum* P46 a condiciones similares a tracto gastrointestinal.

L. plantarum P46 al ser sometida al reto de acidez presentó una concentración de viables de 9.24 Log₁₀ UFC/mL (Tabla 7) un % de crecimiento de 101.10%, comparado con lo reportado por Morales (2019) en caldo APT.

En cuanto al reto de sales biliares presentó una viabilidad 9.45 Log₁₀ UFC/mL (Tabla 6), con un % de crecimiento de 103.39%, (Tabla 7), comprobando que la cepa además de adaptarse a la matriz láctea fue capaz de mantener su resistencia a condiciones de pH ácido y sales biliares.

Morales (2019), al realizar ensayos con concentraciones estandarizadas de cultivo de la cepa P46 reportó que pierde viabilidad en el reto frente a sales biliares, sin embargo, en la matriz láctea no se presentó una disminución en la viabilidad ya que en ella se presentó un porcentaje de crecimiento de 103.39%, comparada con el control desarrollado en caldo APT donde se obtuvo un porcentaje de crecimiento de 6.22% (Figura 8), lo cual indicó un incremento en la viabilidad de 97.17%.

Wang *et al.*, (2018), mencionan algunos de los mecanismos de resistencia a ambientes ácidos descritos para BAL, los cuales incluyen el sistema arginina deshidrolasa, a partir del cual, los microorganismos producen sustancias alcalinas tales como la urea, arginina y amoniaco, que neutralizan los ácidos.

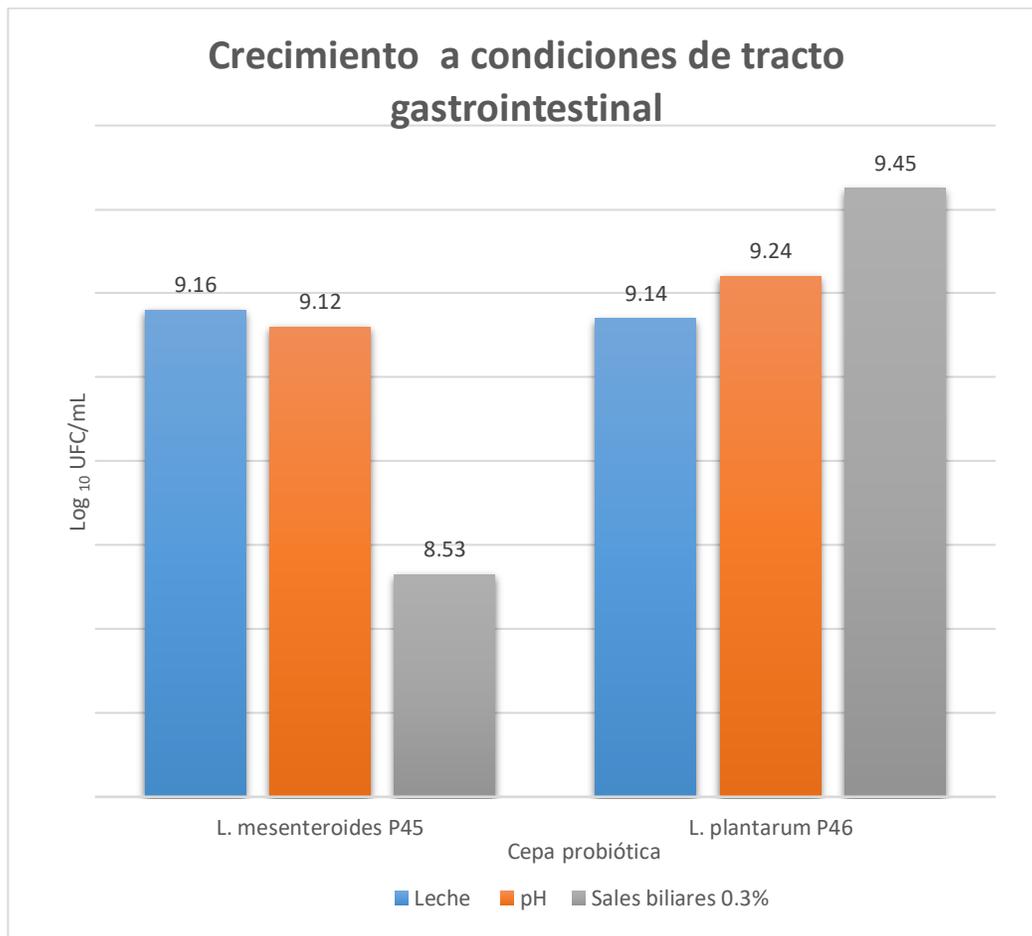


Figura 10. Crecimiento de las cepas P45 y P46 bajo condiciones de pH ácido y sales biliares 0.3% durante 24 h.

La resistencia de las cepas probióticas a sales biliares es una característica esperada en estos microorganismos al tener contacto con tracto intestinal. La función de las sales biliares es actuar como detergentes biológicos que emulsifican y solubilizan las grasas, con ello también pueden ser capaces de emulsificar y solubilizar fosfolípidos y proteínas presentes en la membrana celular, confiriéndole así un potencial antimicrobiano (Miremadia *et al.*, 2014).

Se sabe que la bilis se produce en el hígado, se concentra en la vesícula biliar y se libera en el duodeno, donde ayuda a la digestión de las grasas al emulsionar y solubilizar los lípidos. El nivel de concentración fisiológica de la bilis humana varía y depende de la raza, condiciones fisiológicas y el género. Además la bilis es una sustancia antimicrobiana, que se compone de ácidos biliares, colesterol y fosfolípidos. Las cepas probióticas con alta tolerancia (>0.3%) a la bilis se desarrollan mejor en el intestino delgado superior (de Paula *et al.*, 2014).

Tabla 8. Comparación de crecimiento a pH 3.5 y sales biliares 0.3%.
Realizado a partir de Giles *et al.*, 2016; Morales, 2019 y Ramírez, 2018.

Cepa	<i>L. mesenteroides</i> P45	<i>L. plantarum</i> P46
APT		
pH 3.5	74.98%	39.6%
Sales biliares 0.3%	100%	6.22%
Aguamiel		
pH 3.5	95.17%	N.D.
Sales biliares 0.3%	96.09%	N.D.
Leche descremada		
pH 3.5	91.13%	101.10%
Sales biliares 0.3%	89.18%	103.39%

N.D.: No se ha determinado el crecimiento de *L. plantarum* P46 en aguamiel.

Algunas BAL tienen la capacidad de hidrolizar las sales biliares enzimáticamente por medio de la enzima hidrolasa de sales biliares, este fenómeno aumenta la demanda de colesterol, que a su vez provoca más síntesis de sales biliares; como resultado de este proceso se puede conducir a la reducción de los niveles de colesterol sérico (de Paula *et al.*, 2014).

La actividad de la enzima hidrolasa de las sales biliares, se encarga de la hidrólisis de enlaces peptídicos con el aminoácido al cual se encuentran conjugados, lo cual provoca la pérdida de su actividad antimicrobiana (de Paula *et al.*, 2014). Estos ensayos implican un gran desafío para los microorganismos ya que es uno de los parámetros para poder considerarse probióticos.

8.5 Ensayo frente a patógenos.

Las BAL, por medio de su metabolismo, son capaces de producir ácido láctico, acético, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas como sustancias antimicrobianas, estas suprimen la multiplicación de microorganismos patógenos. Por lo cual, se determinó el efecto inhibitorio de cada cepa probiótica desarrollada en la matriz láctea.

8.5.1 Evaluación de actividad antimicrobiana de *L. mesenteroides* P45.

En el caso de *L. mesenteroides* P45 se observaron halos de inhibición de 13 mm frente a *S. enterica* serovar Typhimurium y de 16 mm (Figura 11), contra *L. monocytogenes* (Tabla 9), estos resultados nos indicaron que esta cepa conservó su actividad antimicrobiana frente a los patógenos antes mencionados, esta es de las características más importantes para describir el efecto benéfico que se confiere al consumidor de probióticos.

Cerón (2014), describió genes que codifican para moléculas con actividad antimicrobiana en el genoma de la cepa P45, encontrando genes para una prebacteriocina, una lisozima (1,4- β -N-acetylmuramidasa) y una peptidoglicano amidasa. La bacteriocina descrita induce la formación de poros en la membrana de las células blanco.

Las bacteriocinas son péptidos, sintetizados con antagonismo contra bacterias (Messaoudi *et al.*, 2013). Han sido estudiadas por su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas tales como *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* spp. (Flores, 2013).



Figura 11. Halos de inhibición producidos por *L. mesenteroides* P45
 a) Frente a *L. monocytogenes*
 b) Frente a *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028.

8.5.2 Evaluación de actividad antimicrobiana de *L. plantarum* P46.

En el ensayo de antibiosis de la cepa P46 contra la cepa patógena se presentaron halos de inhibición de 14 mm (Figura 12) frente a *S. enterica* serovar Typhimurium, mientras que para *L. monocytogenes* fueron de 13 mm (Tabla 9), con este ensayo se demostró que mantuvo su capacidad antagónica frente a estos microorganismos patógenos, estos resultados presentaron una mayor actividad antimicrobiana en comparación con los obtenidos a partir del crecimiento en caldo APT.

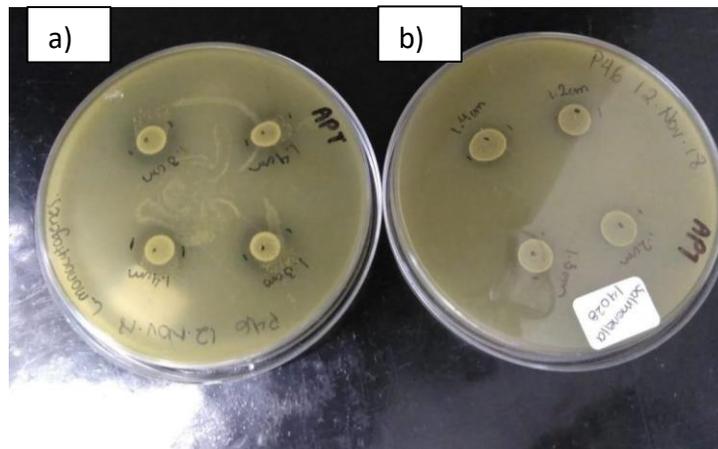


Figura 12. Halos de inhibición producidos por *L. plantarum* P46
 a) Frente a *L. monocytogenes*
 b) Frente a *S. enterica* serovar Typhimurium

Gutiérrez (2015), realizó un ensayo preliminar para determinar la posible actividad antimicrobiana de BAL aisladas del pulque de manera cualitativa. Asimismo, Morales (2019), realizó ensayos más precisos estandarizando la concentración de la cepa probiótica P46, obteniendo halos de inhibición que demuestran la actividad antimicrobiana.

L. plantarum al desarrollar en la matriz láctea, es capaz de generar halos de inhibición ligeramente más grandes comparados con los generados a partir del crecimiento en caldo APT.

Como se mencionó para el caso de la cepa P45, las cepas de BAL probióticas producen una gran variedad de compuestos, algunos de ellos, ácidos orgánicos, que en conjunto provocan una disminución del pH del medio, lo cual a su vez genera un efecto antimicrobiano sobre bacterias entericas (O' hara *et al.*, 2007), lo cual puede explicar la inhibición del desarrollo de bacterias patógenas como las antes mencionadas, ya que el pH del medio después de 24 h de crecimiento fue 4.46.

Además, un mecanismo que posiblemente explica el tratamiento con probióticos contra diarrea, causada por infecciones gastrointestinales, es que estas bacterias compiten por la colonización del epitelio intestinal, mediante la producción de sustancias antimicrobianas; así mismo pueden estar involucrados en potenciar la respuesta del sistema inmunológico (Valdovinos *et al.*, 2017).

Tabla 9. Ensayo de antibiosis contra microorganismos patógenos *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 y *L. monocytogenes* CFQ-B-103.

Patógeno	halo de inhibición (mm)
<i>L. mesenteroides</i> P45	
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	13
<i>monocytogenes</i> CFQ-B-103	16
<i>L. plantarum</i> P46	
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	14
<i>monocytogenes</i> CFQ-B-103	13

8.6 Elaboración de las bebidas lácteas fermentadas.

Dado que ya se ha determinado que las cepas *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46, conservaron su potencial probiótico en la matriz láctea, se procedió a la elaboración de las bebidas lácteas, para posteriormente efectuar la evaluación sensorial.

A partir de los inóculos de cada cepa aislada de pulque desarrollados y estandarizados de acuerdo con el inciso 7.3.1, se inocularon lotes con 500 mL de leche descremada en frascos de vidrio con tapón de rosca (para uso de laboratorio) (KIMAX). Posterior a la inoculación se incubaron a 28°C (*L. mesenteroides* P45) y 37°C (*L. plantarum* P46) durante 24 h. Se volvieron a corroborar las propiedades de resistencia a pH ácido, sales biliares y actividad antimicrobiana de acuerdo con los incisos 7.3.2, 7.3.3 y 7.3.4 para tener los parámetros del potencial probiótico inicial de cada bebida (Tabla 10).

8.6.1. Bebida láctea fermentada con *L. mesenteroides* P45 y evaluación de estabilidad del carácter probiótico en conservación en refrigeración.

La cepa *L. mesenteroides* P45 presentó una concentración de 9.36 Log₁₀ UFC/mL durante el desarrollo de células viables en la cuantificación inicial de la bebida fermentada después de incubar durante 24 h a la temperatura previamente descrita, comparado con la cuantificación en el ensayo preliminar en leche se obtuvo una viabilidad de 9.16 Log₁₀ UFC/mL (inciso 8.3.1), lo cual indicó un incremento del 2% (Tabla 10).

En los ensayos preliminares de resistencia a lisozima de la cepa *L. mesenteroides* P45, se obtuvieron concentraciones de 7.54 Log₁₀ UFC/mL, después de 3 semanas de permanecer en refrigeración se obtuvo una concentración de 6.95 Log₁₀ UFC/mL, disminuyendo 7.8% la viabilidad de la cepa, sin embargo esta concentración se encuentra dentro de los límites establecidos para ser un cultivo con potencial probiótico.

Respecto a los parámetros de resistencia a pH ácido y sales biliares 0.3% descritos en la Tabla 6, los resultados de la bebida fermentada después de 24 h de incubación presentaron concentraciones de 8.53 Log₁₀ UFC/mL para pH ácido y 7.88 Log₁₀ UFC/mL (Tabla 10) para sales biliares. En este sentido, se observó una disminución de la viabilidad de 5% y 3% (Tabla 10), sin embargo, se conservó el carácter de resistencia a estas condiciones dado que la concentración de viables cumplió con los criterios establecidos para ser un probiótico.

En cuanto al efecto antagónico contra cepas patógenas, se obtuvieron halos de inhibición de 12 mm para *S. enterica* serovar Typhimurium (Figura 13A) y 14 mm para *L. monocytogenes* (Figura 13B). Los resultados no presentaron diferencias con los determinados en las evaluaciones preliminares (inciso 8.5).

Después de 24 de incubación para obtener la bebida fermentada, ésta se conservó en refrigeración a una temperatura de 10°C durante 3 semanas. Cada semana se realizaron evaluaciones de estos parámetros para determinar la estabilidad de la cepa probiótica P45 en la bebida durante la conservación.

La primera semana de refrigeración se obtuvo una concentración de viables de 8.95 Log₁₀ UFC/mL, lo cual significó una pérdida de la viabilidad en un 8% a partir de la concentración inicial de la bebida fermentada. Con respecto a la resistencia a pH=3.5 y sales biliares al 0.3%, la cepa después de la primera semana presentó una concentración de microorganismos viables de 8.68 y 7.62 Log₁₀ UFC/mL, respectivamente.

Esto significó para el pH ácido un incremento de viabilidad de 1.5% mientras que en sales biliares una disminución del 1%. Respecto a la actividad antimicrobiana, se observó una disminución de 1 mm en el diámetro del halo de inhibición para ambas cepas patógenas (Tabla 11).

En la segunda semana de evaluación, al determinar la concentración se obtuvo una cuenta de viables en la bebida de 8.63 Log₁₀ UFC/mL, indicando un 10 % menos que la concentración inicial de la bebida fermentada.

Tabla 10. Parámetros iniciales de las bebidas fermentadas.

Microorganismo	<i>L. mesenteroides</i> P45	<i>L. plantarum</i> P46
Parámetro		
pH	5.47	4.46
Crecimiento en leche (Log ₁₀ UFC/mL)	9.36	8.17
Resistencia a pH 3.5 (Log ₁₀ UFC/mL)	8.53	8.24
Resistencia a sales biliares 0.3% (Log ₁₀ UFC/mL)	7.88	3.45
Halo de inhibición <i>S.</i> <i>enterica</i> serovar Typhimurium (mm)	12	14
Halo de inhibición <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> (mm)	14	14

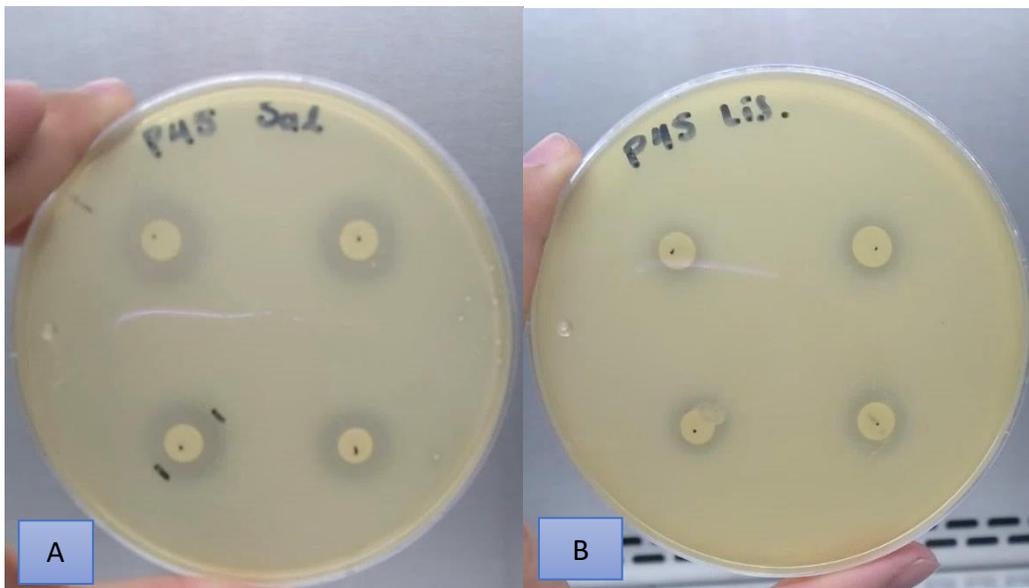


Figura 13. Ensayo de antibiosis con cepa P45 previo a la elaboración de bebidas fermentadas.

- A) Antagonismo frente a *S. enterica* serovar Typhimurium
- B) antagonismo frente a *L. monocytogenes*.

Para la evaluación de la concentración de viables a pH=3.5 y sales biliares se obtuvieron concentraciones de 8.65 Log₁₀ UFC/mL y 7.62 Log₁₀ UFC/mL, lo que indicó que en el caso de sales biliares se mantuvo la viabilidad de la semana 1, sin embargo en condiciones de pH ácido aumentó 1.4% comparado con la inicial y disminuyó 0.34% comparado con los resultados de la primera semana. En cuanto a la actividad antimicrobiana, se observaron halos de inhibición de 10mm para *S. enterica* serovar Typhimurium, 4 mm menos que en la evaluación preliminar; y 9 mm para *L. monocytogenes*, 3 mm menos (Tabla 11).

En el último tiempo de evaluación de estos parámetros (3 semanas), se determinó una concentración de viables de 8.76 Log₁₀ UFC/mL, 8% mayor que la inicial en la bebida, lo cual indicó que la cepa continúa viable, en el caso de las determinaciones a pH ácido, se obtuvo una concentración de 7.62 Log₁₀ UFC/mL 20% menos que la inicial, asimismo en el caso del ensayo a sales biliares 0.3%, presentó una concentración de 6.77 Log₁₀ UFC/mL, disminuyendo un 15% comparado con la concentración inicial.

Ramírez (2018), al realizar una bebida a base de aguamiel con la cepa *L. mesenteroides* P45 evaluó la estabilidad de la cepa durante la refrigeración de la bebida durante 14 días, realizando monitoreos a los 7 y 14 días.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el monitoreo de 1 semana de refrigeración del ensayo a condiciones de pH ácido, obtuvo concentración de viables de 8.26 Log₁₀ UFC/mL, mostrando un aumento de la viabilidad de la cepa de 5%, en el caso de la bebida láctea obtenida en el presente proyecto, al realizar el monitoreo después de una semana de refrigeración se obtuvo un aumento de 1.5%, de la viabilidad, lo que demuestra que la cepa se sigue adaptando al medio y a las condiciones generadas después de la fermentación tanto en aguamiel, como en la matriz láctea.

En el ensayo de resistencia a sales biliares, después de 7 días de refrigeración obtuvo concentraciones de 8.28 Log₁₀ UFC/mL, mostrando un descenso de la viabilidad de 8.7%, en el caso de la bebida láctea en el monitoreo de la estabilidad después de una semana se registró una disminución de 1% en la viabilidad; en este

caso se observa que la resistencia de la cepa a esta condición se mantiene en la matriz láctea, potenciando su carácter probiótico.

De acuerdo con esto, a los 14 días se obtuvo una concentración de células viables de 7.24 Log₁₀ UFC/mL para el reto de sales biliares, mostrando una disminución de la viabilidad de 13.39% con respecto a los resultados después de incubar 24 h.

En la segunda semana de evaluación de estabilidad en la bebida láctea se obtuvo una concentración de 7.62 Log₁₀ UFC/mL, en esta misma condición, disminuyendo la viabilidad 3.3%, con esto se demuestra que la cepa además de adaptarse adecuadamente a la matriz láctea, se conserva estable en condiciones de sales biliares, luego de 14 días.

En el caso de condiciones de altas concentraciones de pH, se obtuvieron concentraciones de microorganismos viables de 7.26 Log₁₀ UFC/mL en el monitoreo de 14 días, registrando una pérdida de la viabilidad de 12.31% con respecto a los parámetros luego de incubar durante 24 h (8.28 Log₁₀ UFC/mL); en cambio en la bebida láctea, en la segunda semana de monitoreo se observa un aumento de la viabilidad de 1.40% respecto a la concentración luego de incubar durante 24 h (8.53 Log₁₀ UFC/mL), lo cual es indicativo de que se mantiene estable luego de 14 días de refrigeración.

L. mesenteroides P45, ha demostrado ser una cepa resistente a condiciones de estrés ambiental como pH ácido y sales biliares, Ramírez (2018), al realizar una bebida fermentada a base de aguamiel, corroboró su potencial probiótico, sin embargo al realizar ensayos de estabilidad durante la refrigeración de la misma, ésta demostró pérdida gradual de la viabilidad, lo cual más evidente en los 14 días de refrigeración, mostrando una disminución de 13.39% para pH ácido y 12.31% para concentraciones altas de sales biliares.

En cambio, en la bebida láctea fermentada con esta cepa se observó que, en condiciones de sales biliares, disminuye la concentración de viables solo un 3.3% mientras que a pH ácido aumenta la viabilidad de esta 1.40%. Demostrando que se adapta favorablemente a la matriz láctea, mantiene su carácter probiótico, y además

después de 2 semanas de refrigeración estas características se mantuvieron dentro de los criterios establecidos para ser un producto probiótico, cumpliendo con el tiempo de viabilidad de productos lácteos.

VidyaLaxme *et al.* (2014), señaló que algunos de los factores que afectan considerablemente el rendimiento general de la fermentación, son la composición del sustrato y los requerimientos nutricionales de la cepa, además el crecimiento microbiano también depende de factores ambientales como el pH, la temperatura y la acumulación de productos metabólicos.

Las BAL utilizadas como cultivos iniciadores están expuestas a muchos factores adversos (factores de estrés) durante su preparación y almacenamiento, así como durante la fabricación del producto fermentado. Los factores de estrés son diversos e incluyen variación de pH (acidez o alcalinidad), temperatura (calor y frío), cambios oxidativos y osmóticos entre otros.

El determinar la estabilidad de las características probióticas de la cepa en la bebida láctea fermentada se realizó como un estudio preliminar para un eventual estudio de vida de anaquel de esta. Se conoce como vida de anaquel al período de tiempo en el que un alimento conserva los atributos esperados por los consumidores, además se considera como el momento adecuado para ser comercializado.

Es importante medir los atributos críticos del alimento en relación con el sabor, textura, color y otras características sensoriales que predominan en alimentos lácteos fermentados, asimismo, conocer las variables que pudieran provocar el deterioro de éstos. Las principales causas del deterioro de los alimentos son de origen químico, físico o microbiológico.

8.6.2 Elaboración de la bebida láctea con *L. plantarum* P46.

La cepa *L. plantarum* P46 presentó una concentración de 8.17 Log₁₀ UFC/mL (Tabla 10) durante el desarrollo de células viables en la cuantificación inicial de la bebida fermentada después de incubar durante 24 h a la temperatura previamente descrita,

comparado con la cuantificación en el ensayo preliminar en leche se obtuvo una viabilidad de 9.14 Log₁₀ UFC/mL (inciso 8.3.1), lo cual indicó un descenso del 25%.

Tabla 11. Resultados de ensayos de estabilidad de la bebida fermentada láctea con *L. mesenteroides* P45 en condiciones de refrigeración.

Crecimiento en leche (Log ₁₀ UFC/mL)	pH 3.5 (Log ₁₀ UFC/mL)	Sales biliares 0.3% (Log ₁₀ UFC/mL)	Antagonismo frente a patógenos (halos de inhibición mm)	Lisozima [7 mg/mL] 30 minutos (Log ₁₀ UFC/mL)
SEMANA 1				
8.95	8.68	7.62	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium: 13 <i>L. monocytogenes</i> : 11	
SEMANA 2				
8.83	8.65	7.62	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium: 10 <i>Listeria monocytogenes</i> : 9	
SEMANA 3				
8.76	8.58	6.77	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium: 8 <i>L. monocytogenes</i> : 6	6.95

Se obtuvieron concentraciones de 8.24 Log₁₀ UFC/mL y 3.45 Log₁₀ UFC/mL, para pH ácido y sales biliares 0.3% respectivamente; comparado con los ensayos preliminares, se observa una pérdida de la viabilidad de 10% para condiciones ácidas, y de 85% para condiciones de sales biliares, este último coincide con lo descrito por Morales (2019), quien observó que la cepa P46 pierde viabilidad de hasta 80% luego de efectuar este ensayo en caldo APT.

Sin embargo, en la evaluación sensorial preliminar de esta bebida fermentada con la cepa P46, los resultados demuestran que no cuenta con las características sensoriales esperadas por consumidores de este tipo de productos, al resaltar más la nota ácida.

Esto se debe al descenso de pH del producto del propio metabolismo, además de tener una consistencia desagradable, por lo que se sugirió cambiar el tipo de matriz láctea por una leche comercial, se procedió a realizar la evaluación preliminar en leche Alpura 2000.

8.7 Evaluación sensorial: perfil flash

8.7.1 Generación de atributos



Figura 14. Bebida fermentada con *L. mesenteroides* P45 para la generación de atributos. (LOTE P45t0)

Esta bebida presenta una apariencia suave sin separación del suero, un olor característico de leche fermentada (acidificada), un color blanquecino y una consistencia viscosa.

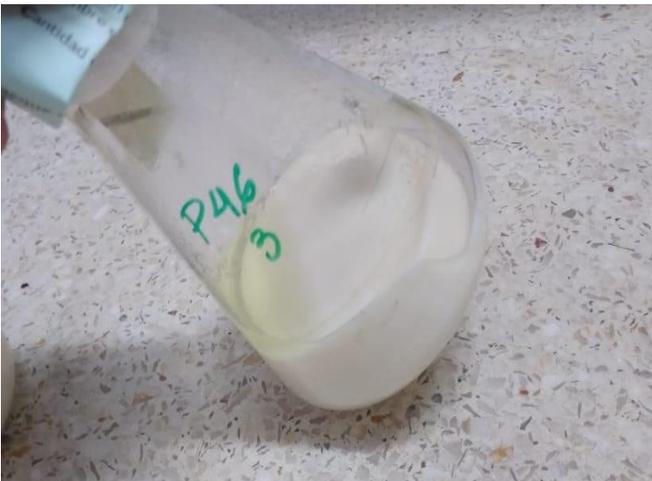


Figura 15. Bebida producto de la fermentación con *L. plantarum* P46 para la generación de atributos. LOTEP46t0.

La bebida presentó una apariencia suave con separación de suero, con un color natural al de la leche, olor característico a leche acidificada, sabor ácido y consistencia aflanada, al ser agitada se presentó la formación de grumos.

La generación de atributos se realizó con jueces entrenados del Anexo del Laboratorio 4D, Laboratorio de Evaluación Sensorial, del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química.

En la primera evaluación, se detectó que el sabor del LOTEP46 estaba extremadamente ácido, y al ser agitada se formaron grumos que volvieron desagradable la textura y la apariencia; por lo que se decidió no continuar con la evaluación preliminar para la generación de sus atributos.

Respecto al LOTE P45, la evaluación preliminar tuvo mejores resultados, ya que fue posible la generación de los atributos a evaluar con el Perfil Flash, además, se hicieron pruebas adicionando esencias artificiales de sabor vainilla, chocolate y fresa (de la marca DEIMAN), se determinó usar el saborizante a fresa, dado que fue el más compatible con el perfil ácido de la muestra, y el más solicitado por los consumidores de estos productos lácteos.

Por su alto poder edulcorante también se adicionó sucralosa. La sucralosa no se absorbe adecuadamente en el tracto gastrointestinal y la poca absorbida se elimina intacta en la orina, y la porción que no es posible absorber se excreta con las heces, es por esto que no agrega valor nutritivo. Se mantiene estable al calor y a condiciones ácidas durante el proceso y almacenamiento de los alimentos.

En la tabla 12, se muestran los atributos generados para la bebida fermentada con *L. mesenteroides* P45.

Tabla 12. Atributos de Bebida fermentada con *L. mesenteroides* P45.

ASPECTO	OLOR	SABOR	TEXTURA
Color beige	Agrio	Lácteo	Viscosidad
Brillante	Fermentado	Dulce	Sensación grasa
Homogéneo	Lácteo	Agrio	Creмосidad
	Dulce	Fermentado	
	Fresa	Salado	
		Fresa	
		Ácido	

Con los descriptores principales definidos, y una vez generados los cuestionarios, se definió la escala a utilizar en la evaluación final. En las tablas, 13, 14, 15 y 16 se muestran las escalas definidas para evaluar atributos.

Tabla 13. Escala definida para atributos pertenecientes a aspecto.

ATRIBUTO	ESCALA
Color beige	Claro – intenso
Brillante	Opaco – brillante
Homogéneo	Heterogéneo – homogéneo

Tabla 14. Escala definida para atributos pertenecientes a olor.

ATRIBUTO	ESCALA
Agrio	Suave – Intenso
Fermentado	Suave – Intenso
Lácteo	Suave – Intenso
Dulce	Suave – Intenso
Fresa	Suave – Intenso

Tabla 15. Escala definida para atributos pertenecientes a sabor.

ATRIBUTO	ESCALA
Lácteo	Suave – Intenso
Dulce	Suave – Intenso
Agrio	Suave – Intenso
Fermentado	Suave – Intenso
Salado	Suave – Intenso
Fresa	Suave – Intenso
Ácido	Suave – Intenso

Tabla 16. Escala definida para atributos pertenecientes a textura.

ATRIBUTO	ESCALA
Viscosidad	Líquido – Viscoso
Sensación grasa	Poca – Intensa
Cremosidad	Suave – Intensa

8.7.2 Obtención del perfil sensorial y análisis estadístico.

Obtenidos todos los atributos para la muestra, se procedió a realizar la evaluación sensorial a la muestra después de 24 h de incubación con el cultivo iniciador, y después de 21 días bajo condiciones de refrigeración, colocando las muestras, así como una galleta y un vaso con agua potable, como enjuague entre muestra y muestra.

En la Figura 16, se muestran los resultados provenientes del PCA, obtenidos a través de un análisis GPA para los atributos sensoriales de sabor, se observa que el componente F1 explica el 59.34% de la variabilidad de los datos, mientras que el segundo componente (F2), explica el 40.66% de la variabilidad de los datos. Correlacionadas positivamente al componente 1 se encuentran las cepas P45 -t0 caracterizadas por un sabor fermentado y ácido y la cepa P45-t21 caracterizada por un sabor agrio y salado que son dos sabores que se potencian y esto podría producir rechazo en el consumidor. Por otro lado la cepa CEPA P46 fue diferente a la cepa P45 independientemente del tiempo de almacenamiento y presentó un sabor fresa dulce y láctea.

En el PCA (Figura 17), muestra que el componente o eje 1 explica el 58.31% de la variabilidad de los datos, mientras que el eje 2 el 41.69%. Correlacionados al componente 1 se encuentra la muestra de la CEPA P45- t21 y el lote CEPA P46, mostrando similitud en el atributo de olor a fresa; el saborizante añadido a la bebida, además de proporcionarle la nota fresa también aporta compuestos volátiles que son captados por la nariz.

Por otro lado, se observa que la muestra CEPA P45-t0 presenta correlación con los atributos de olor dulce, lácteo, fermentado y agrio, lo que demuestra que después de los 21 días de refrigeración la muestra CEPA P45 disminuye la intensidad de los atributos antes mencionados los cuales son importantes porque son los esperados en alimentos de este tipo, por lo que se espera que se mantuvieran a lo largo del tiempo de almacenamiento para que el producto cumpla con las expectativas del consumidor.

El PCA para el atributo de aspecto (Figura 18), se muestra que el componente 1 explica el 59.30% de la variabilidad de los datos, correlacionados positivamente a este componente se encuentra la CEPA P45 a t0 y al t21 días, mostrando similitud en las características correspondientes al aspecto de color beige, por otro lado, el componente 2 explica el 40.70% de la variabilidad, la muestra con la CEPA P46 presenta correlación a este con el atributo de aspecto brillante y homogéneo.

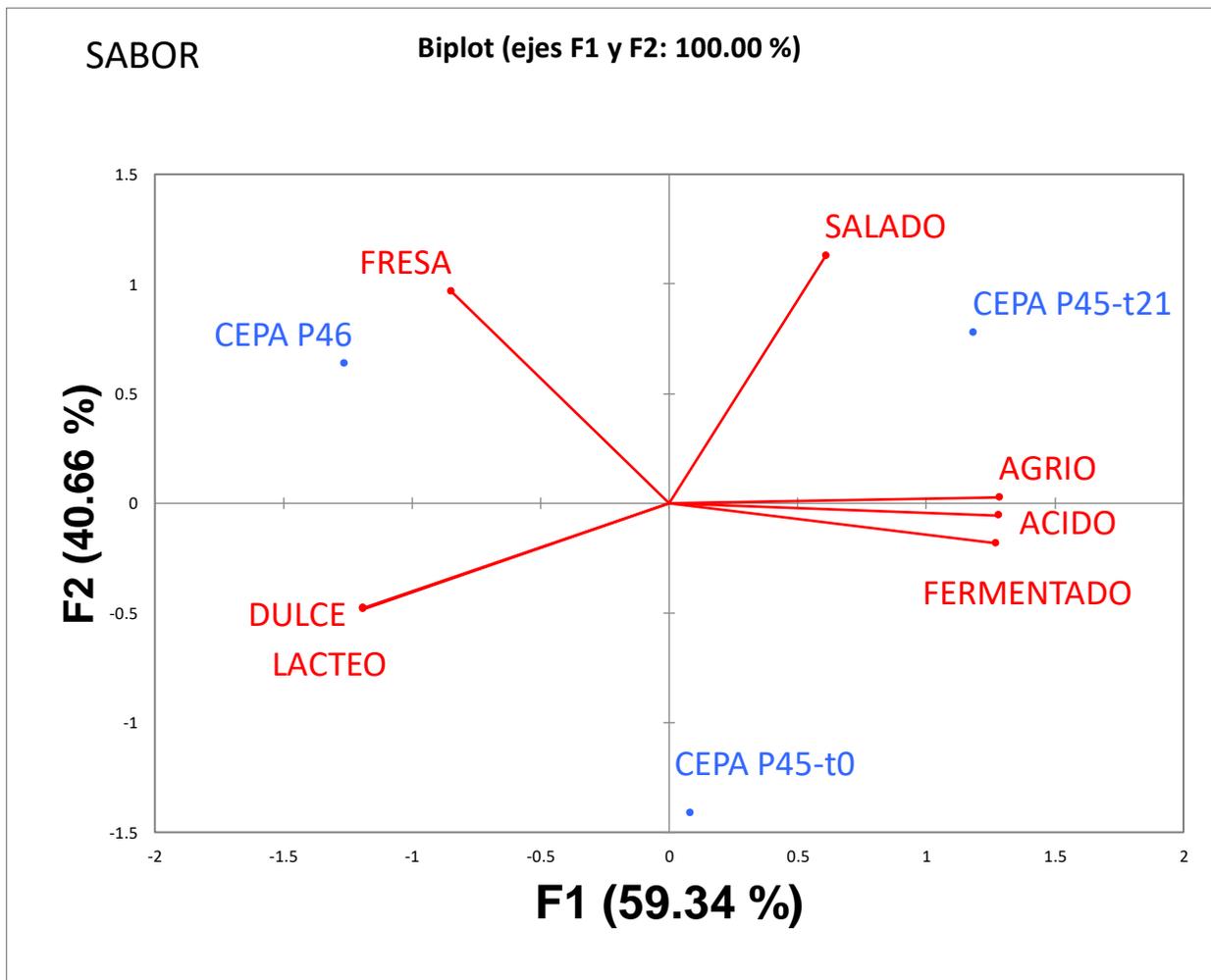


Figura 16. Análisis de PCA proveniente del GPA para el atributo de sabor de las muestras de leche fermentadas con P45 Y P46 respectivamente.

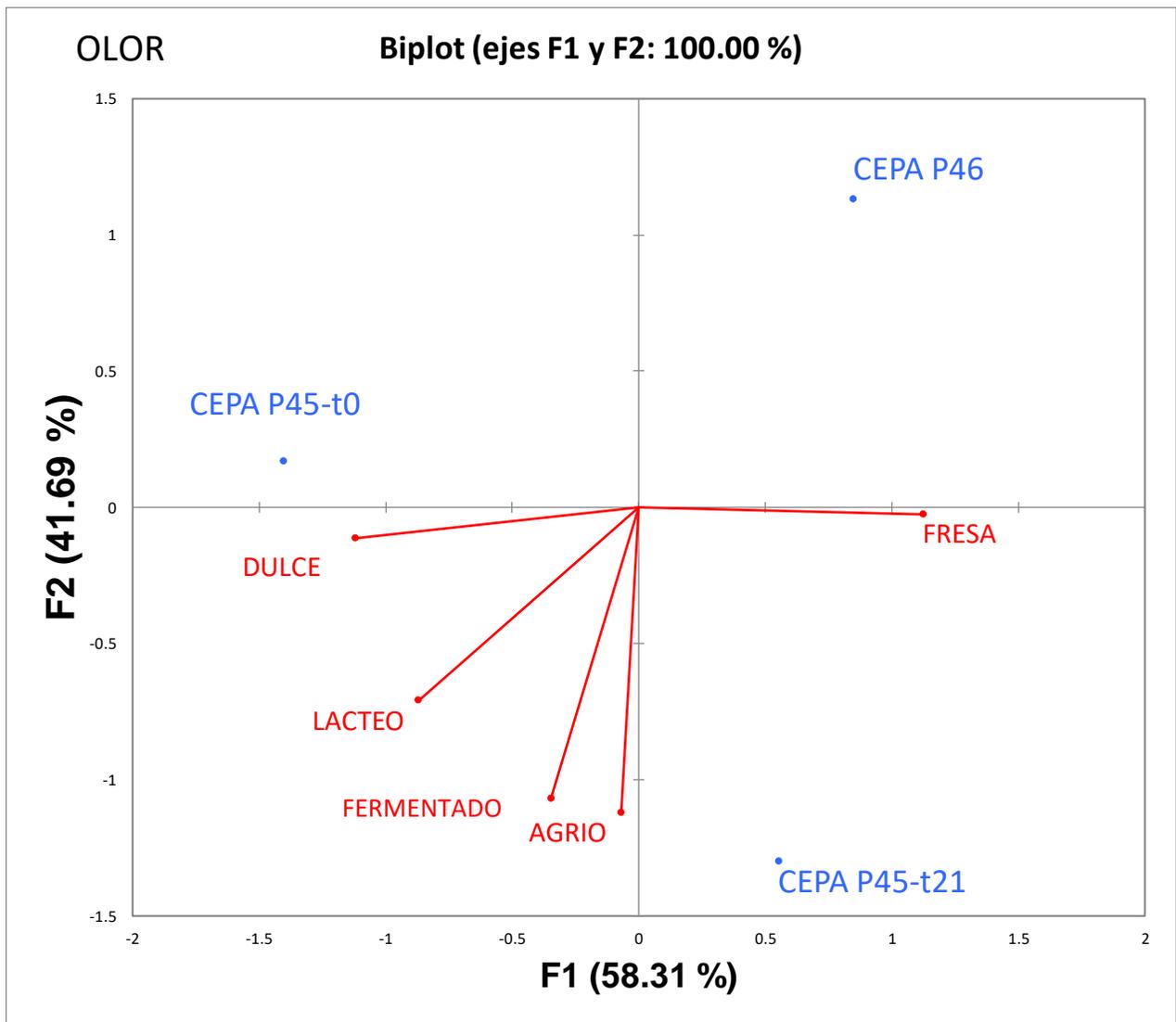


Figura 17. Análisis de PCA proveniente del GPA para el atributo de olor de las muestras de leche fermentadas con P45 Y P46 respectivamente.

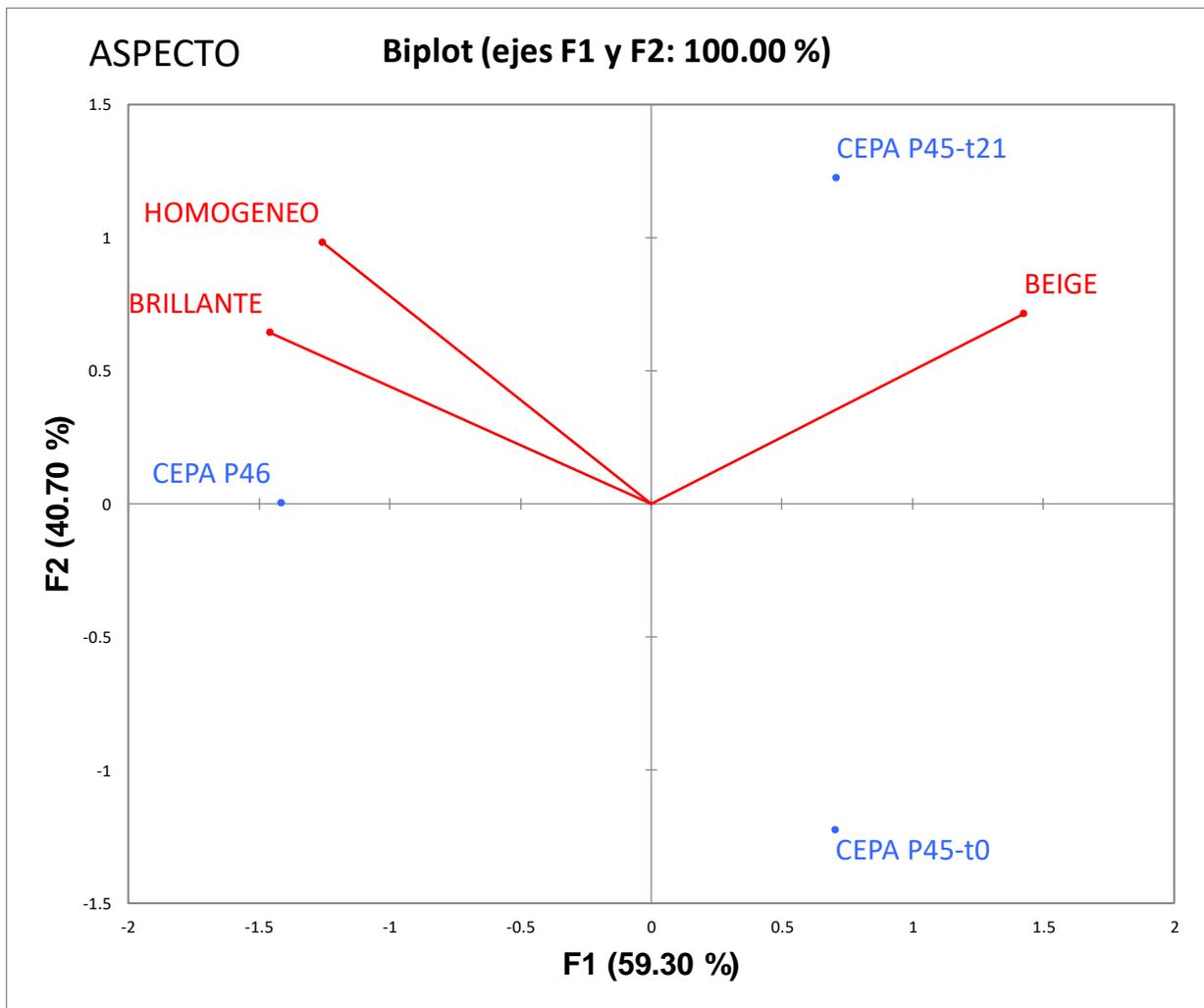


Figura 18. Análisis de PCA proveniente del GPA para el atributo de aspecto de las muestras de la bebida de leche fermentadas con P45 Y P46 respectivamente.

El PCA para atributos sensoriales de textura (Figura 19), el eje 1 explica el 61.99% de la variabilidad de los datos, correlacionado a este se encuentran las muestras de las bebidas CEPA P46 y CEPA P45 t21, mostrando similitud en el atributo de cremosidad, mientras que la bebida CEPA P45 t0 se encuentra correlacionada al componente 2, resaltando atributos de viscosidad y sensación grasa.

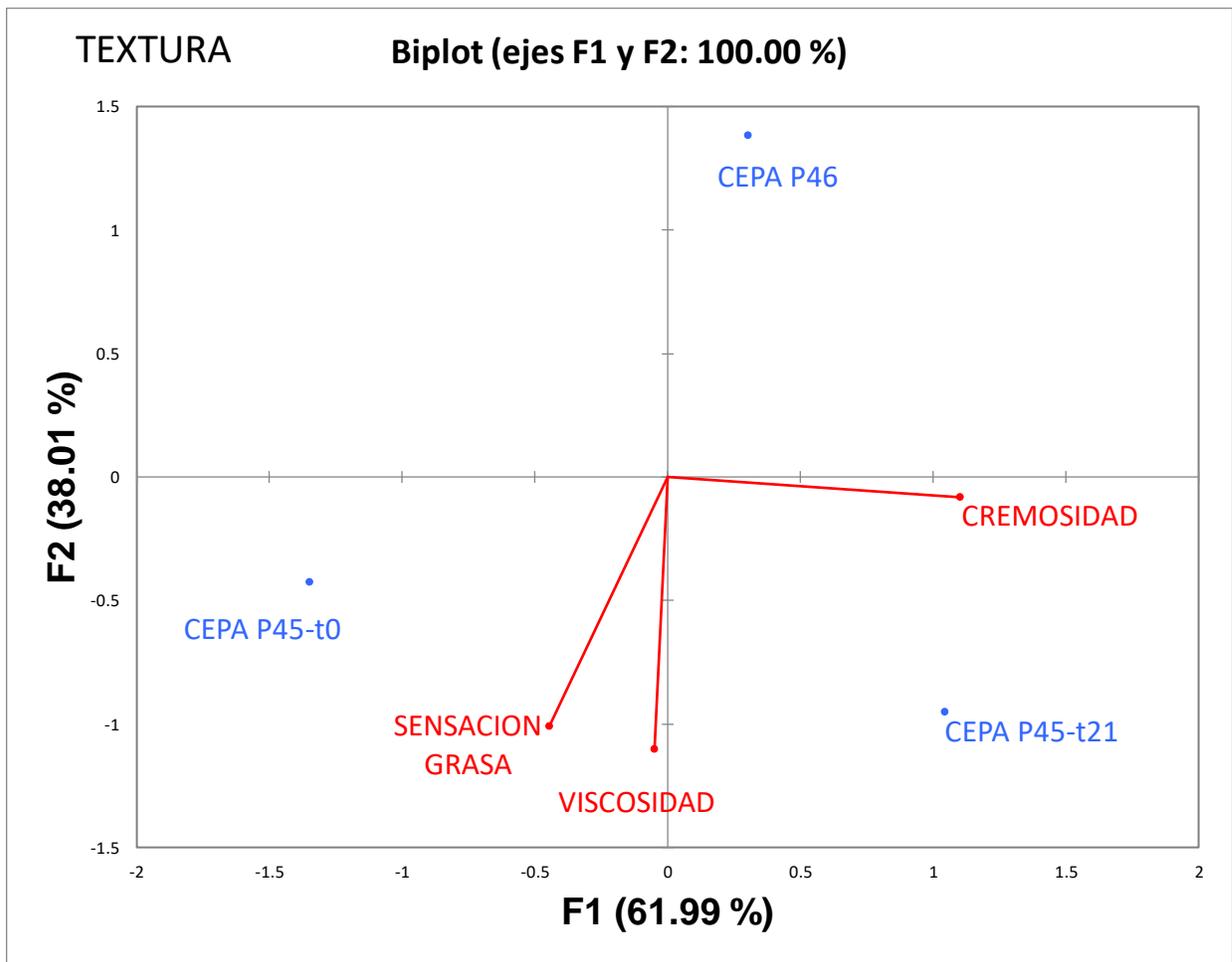


Figura 19. Análisis de PCA proveniente del GPA para el atributo de textura de las muestras de leche fermentadas con P45 y P46 respectivamente.

9 CONCLUSIONES.

Se realizaron bebidas lácteas fermentadas con potencial probiótico utilizando como cultivos iniciadores las cepas *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46, se evaluó y caracterizó el potencial probiótico de las cepas ya mencionadas por primera vez en una matriz láctea, demostrando que son viables. A través de la evaluación de la resistencia a condiciones simuladas de tracto gastrointestinal (lisozima, pH ácido, sales biliares 0.3%) se demostró que las cepas conservan su viabilidad ante dichas condiciones.

Las cepas P45 y P46 presentaron actividad antagonista contra los microorganismos patógenos *S. enterica* serovar Typhimurium y *L. monocytogenes*.

Con los resultados obtenidos de viabilidad en la matriz láctea, y sobrevivencia a condiciones simuladas de tracto gastrointestinal se demuestra que las cepas conservaron sus características probióticas.

Finalmente se realizó un monitoreo, cada semana durante los 21 días de refrigeración para evaluar que se conservara el potencial probiótico, demostrando que conserva sus características probióticas.

Por otro lado, los resultados del perfil sensorial muestran que la bebida producida con la cepa P45 presentó atributos de sabor, olor esperados en bebidas lácteas. La bebida fermentada con la cepa *L. plantarum* P46 presentó características organolépticas que resultaron desagradables para los jueces.

10. PERSPECTIVAS

Determinar si *L. mesenteroides* P45 y *L. plantarum* P46 presentan capacidad de adherencia a células epiteliales además de los mecanismos de modulación de la respuesta inmune de manera *in vitro* e *in vivo*

Evaluar el alimento funcional con *L. mesenteroides* P45 con consumidores tipo.

Evaluar la viabilidad de *L. plantarum* P46 en leche comercial, para comprobar si se mejoran los atributos sensoriales. Posteriormente realizar ensayos de resistencia a pH ácido, sales biliares, lisozima y antagonismo frente a patógenos para seguir siendo considerado un alimento funcional.

Realizar análisis sensorial de la bebida obtenida a partir de la fermentación con *L. plantarum* P46.

11. BIBLIOGRAFÍA

Aneja, R.P., Mathur, B.N., Ed. Gupta, P.R., Chandan, RC., Banerjee, A.K. (2002). Technology of Indian Milk Products. A Dairy India Publication, Delhi, India. pp:158-180.

Ashraf, R. Vasiljevic, T. Day, S.L, Smith, S.C., Donkor, O.N. (2014). Lactic acid bacteria and probiotic microorganism induce different cytokine profile and regulatory T cells mechanism. Journal of Funcional Foods, 6,pp:395-409.

Brown, M. (2008). Sensory characteristics and classification of commercial and experimental plain yogurts. University of Delaware Thesis. pp: 9-16.

Campos, I. (2010). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas del pulque con capacidad probiótica. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

Cástulo, I., Del Campo, M., Gómez, H. & Alaníz, R., (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocigénica aisladas de quesos frescos. E-Gnosis-Universidad de Guadalajara, vol. 6, pp: 10-17.

Cerón, I. (2014) Estudio de la capacidad probiótica in vitro de la cepa de *Leuconostoc* P45 aislada de pulque. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

Chandan, R. C., & O'Rell, K. (2013). Principles of yogurt processing. *Manufacturing yogurt and fermented milks*, 2° edition, vol. 9. Pp: 386 -418.

Chapot-Chartier M., Kulakauskas S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microbe Cell Factories* 13:59.

de Paula, A, Jeronymo-Ceneviva, A.B., Silva, L.F., Todorov, S.D., Franco, B.D., Choiset, Y., Haertlé T., Chobert, J.M., Dousset, X., Penna, A.L. (2014). *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: A bacteriocinogenic strain isolated from brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6 (4), 186-197.

D' Angelo, L. Cicotello, J., Zago, M., Guglielmotti, D., Quiberoni, A., Suárez, V. (2017). *Leuconostoc* strains isolated from dairy products: Response against food stress conditions. *Food Microbiology*, 66, 28-39.

De Castro S., Pérez J.L. (2006). Fisiopatología y patogenia general del aparato digestivo. En De Castro, S. y Pérez, J.L. Manual de Patología General. Barcelona España:MASSON, PP 338-345.

de Paula, A, Jeronymo-Ceneviva, A.B., Todorov, S.D. & Penna, A.L. (2015) The two faces of *Leuconostoc mesenteroides* in food systems, Food Reviews International, 31:2, 147-171.

Dijksterhuis, G. (1996) Procrustes analysis in sensory research. Elsevier, Netherlands, 185-219.

Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M.S., López-Munguía, A., Gosset, G., Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. International Journal of Food Microbiology, 124 (2), 126-134.

Escalante, A., Rodríguez, M.E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. FEMS Microbiology Letters, 235 (2), 273-279.

Escalante, A., Giles-Gómez, M., Esquivel, G., Matus. V., Moreno, R., López, A. Lappe P., (2012). Pulque fermentation. En: Handbook of plant-based fermented food and beverage technology, CRC press, pp: 691-706.

FAO/OMS. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food (2002), Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.

Figueroa, I.M., Verdugo A. (2005) Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp* Revista Latinoamericana de Microbiología 47(1-2):25-42

Figueira R., W. Holden D. (2012) Functions of the *Salmonella* pathogenic island 2 (SPI-2) type III secretion system effectors. Microbiology, 1147-1161. DOI: 10.1099/mic.0.58115-0.

Flores, G. (2013). Caracterización de bacterias ácido lácticas aisladas de una bebida fermentada de origen Maya, para su posible empleo como probiótico. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.

Flores, M. (2017). Características sensoriales de textura y color de salchichas comercializadas en la CDMX. Tesis de Licenciatura. CDMX. Universidad Nacional Autónoma de México.

Ganong, W. (1996). Regulación de la función gastrointestinal. En: Ganong, W. Fisiología médica. México, D.F.: En: El manual moderno, pp: 517-519.

García, J. (2016). Caracterización sensorial (perfil flash) y afectiva (internal preference mapping) de alimentos de la milpa de la Sierra Madre Tarahumara. Tesis de Licenciatura, México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.

Giles-Gómez M., Sandoval, J.G., Matus, V., Campos, I., Bolívar, F., and Escalante A. (2016). *In vitro* and *in vivo* probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. SpringerPlus. 2016. 5(1):1-10.

Gilliand S.E. (2003) Probiotics. In: Cabellero, B. Truco, L, and Finglas, P.M., editors. Encyclopedia of Food, Sciences and Nutrition, 2nd edition. Academic Press, London, UK.

Gutiérrez, E. (2015). Detección de lactobacilos aislados del pulque con capacidad probiótica. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

Haraga, A. Ohlson, M.B., Miller, S.I., (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. Nature Reviews. Microbiology. (6) 53-66. DOI: 10.1038/nrmicro1788

Hernández, E. (2005). Evaluación Sensorial. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). 1° ed. Bogotá.

Hill C., Okeeffe, T., Ross, P. (2017) Antimicrobial factors produced by lactic acid bacteria. Encyclopedia of Food Sciences Nutrition. Vol. 14. Pp: 273-285.

Iglesias, M.B., Abadias. M., Anguera, M., Viñasa, J. (2017) Antagonistic effect of probiotic bacteria against foodborne pathogens on fresh-cut pear. LWT- Food Science and Technology, 81, 243-249.

Iñiguez-Palomares, C., Bolado-Martínez, E. &Acedo-Félix, E. (2014). Probióticos: principios y aplicaciones prácticas. Capítulo 10. En: González-Aguilar A., Los alimentos funcionales un nuevo reto para la industria de alimentos, editorial: AGT Editor, S.A.

Iñigo, N. (2013) Evaluación de perfil sensorial de bebidas lácteas fermentadas. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.

Jiménez, R., González, N., Magaña, A. & Corona, A. (2010). Evaluación microbiológica y sensorial de fermentados de pozol blanco, con cacao (*Theobroma cacao*) y coco (*Cocos nucifera*), Revista venezolana de ciencia y tecnología en alimentos, Vol. 1, No. 1, pp: 70-80.

Keane, P. (2009). The factor profile. En: Manual on descriptive analysis testing for sensory evaluation. Baltimore American Society for Testing and Materials pp:1-14.

Lahtinen, S., Ouwehand A., Salminen, S., Von Wright. (2012). Lactic acid bacteria, Microbiological and functional aspects. 4° Edición.

Lawless, H.T., Heymann H. (1998). Sensory Evaluation of Food, Principles and Practices. Ed. Springer, United States, 341-371.

Lessard, C. (2003). Phosphorylation of *Streptococcus salivarius* Lactose Permease (LacS) by HPr(His~P) and HPr(Ser-P)(His~P) and Effects on Growth. *Journal of Bacteriology*, 6764–6772

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. & Stahl, D. (2015). Brock biology of microorganisms, 14° edición, Illinois, Pearson Education, pp: 170, 171, 402-408.

Madry, E., Krasin, B., Drzyma, S., Sands, D., Lisowska, A., Grebowiec, P., Minarowska, A., Oralewska, B., Mankowski, P. & Moczko, J. (2012). Lactose malabsorption is a risk factor for decreased bone mineral density in pancreatic insufficient cystic fibrosis patients. *European journal of human genetics*, Vol. 20, pp: 1092-1095.

Maldonado, C., Aristimuño, C., Mansilla, F., Melián, C., Hébert, E. & Vignolo G. (2018) Identification, characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria as probiotic for feedlot cattle, *Livestock science*, Vol. 212, pp:99-110.

Mata, J. (2013). Análisis de las tendencias actuales de alimentos funcionales (Health and wellness) y la disponibilidad de los mismos en los principales supermercados de la ciudad de Cuenca. Tesis de Licenciatura. Cuenca, Ecuador. Universidad del Azuay.

Matus, V. (2011) Caracterización de la capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas del pulque. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.

Melgar-Lalanne, G., Rivera-Espinoza, Y. & Hernández, H. (2012). *Lactobacillus plantarum*: an overview with emphasis in biochemical and healthy properties en el

libro: *Lactobacillus*: classification, uses and health implications, México, D.F., Nova Publishing.

Messaoudi, S., Manai, M. Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.M., Dousset, X. (2013). *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. Food Microbiology, 36 (2), 296-304.

Miremadia, F., Ayyashb, M., Sherkatc, F., Stojanovskaa, L. (2014). Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. Journal of Functional Foods, 9. 295-305.

Morales, X. (2019) Tesis. Determinación del potencial probiótico de *L. brevis* y *L. plantarum* aislados del pulque. Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Moreno-Vileta, L., García-Hernández, M.H., Delgado-Portales, R.E., Corral-Fernández N.E., Cortez-Espinosa, N., Ruiz-Cabrera, M.A., Portales-Pereza, D.P. (2014). In vitro assessment of agave fructans (Agave salmiana) as prebiotics and immune system activators. International Journal of Biological Macromolecules, 63, 181-187.

O'hara, M. & Shanahan, F. (2007). Gut microbiota: mining for therapeutic potential, Clinical gastroenterology and hepatology vol. 5, pp:274-284.

Olagnero G., Genevois C., Irei V., Marcenado J., Bendersky S. (2007). Alimentos funcionales: conceptos, definiciones y marco legal. DIAETA, 25 (119), 31-39.

Posada, S. Vera, J.F. (2018) Probióticos en diarrea aguda, asociada a antibióticos y nosocomial: evidencia en pediatría. Revista Colombiana de Gastroenterología, 33 (1) DOI:10.22516/25007440.230

Pujato, S., Mercanti, D., Guglielmotti, D., Rousseau, G., Moineau, S., Reinheimer, J., Quiberonia, A. (2015). Ohages of dairy Leuconostoc mesenteroides: Genomics and factors influencing their adsorption. International Journal of Food Microbiology, 201, 58-65.

Pushkaram, AC., Nataraj N., Nair, N., Götz F., Biswas R., Mohan CG. (2015). Understanding the structure-function relationship of lisozyme resistance in Staphylococcus aureus by peptidoglycan O-acetylation using molecular docking, dynamics and lysis assay. J. Chem Inf Model 55:760-770.

Ramírez, C. (2018) Tesis. Elaboración de una bebida funcional a partir de bacterias ácido-lácticas aisladas del pulque. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Ramírez, J.C., Ulloa, P.R., Velázquez, M.Y., Ulloa, J.A., Arce, F. (2011) Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. Revista Fuente (2) (7). ISSN 2007-0713.

Riveros-Mckay, F., Campos, I., Giles-Gómez, M., Bolívar F., Escalante A. (2014) Draft genome sequence of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage. American Society for Microbiology, 2 (6), 1-2.

Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. & Bresollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. Food science and technology. 50, pp:1-16.

Salmerón I. (2017). Fermented cereal beverages: from probiotic, prebiotic and symbiotic towards Nanoscience designed healthy drinks. Letters in Applied Microbiology, 65 (2), 114-124.

Sarmiento, L.A. (2006). Alimentos funcionales, una nueva alternativa de alimentación. Revista ORINOQUIA, 10 (1), 16-23.

Satokari, R. (2019) Modulation of Gut Microbiota for Health by Current and Next-Generation Probiotics. Journal Nutrients 11, 1921.

Savadogo, A., Ouattara, C., Bassoe, I. & Traore, S. (2009). Bacteriocins and lactic bacteria- a minireview, African journal of biotechnology, Vol. 5, No. 9, pp: 678-683.

Savaiano, D., Ritter, A., Klaenhammer, T., James, G., Longcore, A., Chandler, J., Walter, A. & Foyt, H. (2013). Improving lactose digestion and symptoms of lactose intolerance with a novel galacto-oligosaccharide (RP-G28): a randomized, double-blind clinical trial, Nutrition journal, Vol. 12, No. 160.

Serrano, E. (2017). Efecto de la administración de *Leuconostoc mesenteroides* P45 aislada del pulque, como modulador de alteraciones metabólicas en ratones alimentados con una dieta alta en grasa. Tesis de Licenciatura. CDMX. Universidad Nacional Autónoma de México.

Shah, N.P. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. Food Technology 55(11):46-53.

Sharma, P., Kumar, S., Pawas, T., Vikas, G., Rameshwar, S. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. Food Research International, 57, 176-195.

Shlens, J. (2009). A tutorial on Principal Component Analysis. Center for neural science. New York University. Pp 1-5.

Shobha, P., and Agrawal, R. (2008). Effect on cellular membrane fatty acids in the stressed cells of *Leuconostoc mesenteroides*: A native probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Food Biotechnology*, 22 (1), 47-63.

Stone, H & Sidel, J.L. (2004). *Sensory Evaluation Practices*. London: Academic Press, Inc. p. 336.

Su, Y., Chen, X., Liu, N. & Guo, X. (2017). Effect of three lactobacilli with strain-specific activities on the growth performance faecal microbiota and ileum mucosa proteomies of piglets. *Journal of animal science and biotechnology*, Vol. 8, No.52..

Tamang JP, Samuel D (2010) *Functional Yeasts and Molds*. In: *Fermented foods and beverages of the world*, 1 st ed [JP Tamang and K Kailasapathy, editors] New York: CRC Press Taylor and Francis Group 2010: pp 128-145.

Valdés-Varela, L., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M. (2017). In vitro fermentation of different fructo-oligosaccharides by Bifidobacterium strains for the selection of symbiotic combinations. *International Journal of Food Microbiology*, 242, 19-23.

Valdovinos, M.A., Montijo, E., Abreu, A.T., Hellerd, S., González – Garay, A., Bacarreza, D., Bielsa- Fernández, M., Bojórquez-Ramos, M.C., Bosques-Padilla, F., Burguete-Garcia, A.I., Carmona-Sanchez, A., Coss-Adamea, E., Chavez-Barrera, J.A., Ariñon, de M., Flores-Calderon, J., Gómez-Escudero, O., González-Huezo, M.S. Guarner, F. (2017). Consenso mexicano sobre probióticos en gastroenterología. *Revista de Gastroenterología de México*, 82, 156-178.

Vasiee, A., Tabatabaei, Y., Mortazavi, A & Edalatian, M. (2014). Isolation, identification and characterization of probiotic *Lactobacilli spp.* From Tarkhineh, *International food research journal*, Vol. 21. No. 6 pp:2487-2492.

VidyaLaxme, B., Rovetto, A., Grau, R., Agrawal, R. (2014). Synergistic effects of probiotic *Leuconostoc mesenteroides* and *Bacillus subtilis* in malted ragi (Eleusine corocana) food for antagonistic activity against *V. cholerae* and other beneficial properties. *Journal of Food Science and Technology*, 51 (11), 3072-3082.

Vila, J., Álvarez-Martínez, F., Buesa, J. & Castillo, J. (2009). Diagnostico microbiológico de las infecciones gastrointestinales, *Enfermedades infecciosas y microbiología*, vol. 27, No. 7, pp: 406 – 411.

Wacher, C. (2014). La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. *Revista Digital Universitaria*, Vol. 15 No. 8 pp: 1- 14.

Waldir, Estela, Rychtera, Mojmír, Melzoch, Karel, Quillama, Elena, & Egoavil, Erida. (2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista Peruana de Biología*, 14 (2), 271-276.

Wang, R., Chen, S., Jin, J., Ren, F., Li, Y., Quiao, Z., Wang, Y. & Zhao, L. (2015). Survival of *Lactobacillus casei* strain Shirota in the intestines of healthy Chinese adults, *Microbiol Immunol*, Vol. 59 No. 5. pp: 268-276.

Zea, A. (2016). Caracterización sensorial (Perfil Flash) y nivel de agrado (Internal Preference Mapping) de los quintoniles de las especies *Amaranthus cruentus* L., *Amaranthus hypochondriacus* L. (Sierra Norte de Puebla) y *Amaranthus hybridus* L. (Ciudad de México). Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México.

Zhang, Z., Lv, J., Pan, L. & Zhang, Y. (2018). Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains, *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 102, pp: 8135-8143.