UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

“Evaluación de las propiedades microbiológicas, fisicoquímicas y antioxidantes de una bebida fermentada a base de probióticos y jugo de zarzamora”

Tesis que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

L. N. LILIANA LUGO ZARATE

Directora de Tesis

DRA. NELLY DEL SOCORRO CRUZ CANSINO

Codirector de Tesis

DR. LUIS DELGADO OLIVARES

San Agustín Tlaxiaca Hgo. Octubre 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias de la Salud
School of Medical Sciences
Área Académica de Medicina
Department of Medicine

14/septiembre/2021
AAM/MCBS/80/2021
Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Liliana Lugo Zarate
Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Evaluación de las propiedades microbiológicas, fisicoquímicas y antioxidantes de una bebida fermentada a base de probióticos y jugo de zarzamora" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE	Dr. Luis Delgado Olivares	
PRIMER VOCAL	Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino	
SECRETARIO	Dra. Alicia Cervantes Elizarrarás	
SUPLENTE	Dr. José Alberto Ariza Ortega	
SUPLENTE	Dra. Esther Ramírez Moreno	

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
DIRECTOR

DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO
COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308,2361,4346,4310
medicina@uaeh.edu.mx

Agradecimientos

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 2019-000037-02NACF-16048.

Además, quiero agradecer de manera especial a la Dra. Nelly del Socorro Cruz Cansino por su apoyo incondicional y confianza depositada en mis conocimientos nutriéndolos día a día, brindándome su tiempo y experiencia.

A mi codirector Dr. Luis Delgado Olivares y la Dra. Alicia Cervantes Elizarrarás, agradezco su paciencia y empeño en brindarme parte de sus amplios conocimientos que fueron parte esencial en este proyecto, a los demás miembros de mi comité, la Dra. Esther Ramírez Moreno y el Dr. José Alberto Ariza Ortega, les doy gracias por su empeño y dedicación en asesoría metodológica para culminar el presente proyecto.

Por último, me siento dichosa y orgullosa de pertenecer a la máxima casa de estudios, la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y al Instituto de Ciencias de la Salud, quienes son la fuente estructural de que este proyecto sea posible, permitiéndome obtener el grado de Maestría.

Y a todo esto, muchas Gracias.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL 1
ÍNDICE DE FIGURAS 5
ÍNDICE DE TABLAS 6
ABREVIATURAS 7
RESUMEN 8
ABSTRACT 9
I INTRODUCCIÓN 1
II ANTECEDENTES 3
2.1 Generalidades 3
2.1.1 Bacterias ácido lácticas 3
2.1.1.1 Probióticos 3
2.1.1.2 Aislamiento de BAL 4
2.1.1.3 Métodos de identificación 5
2.1.1.4 Aislamiento e identificación de BAL en aguamiel, pulque y zarzamora 6
2.1.1.5 Mutualismo 6
2.1.2 Bebidas fermentadas 7
2.1.3 Zarzamora 7
2.1.3.2 Composición química 8
2.1.3.3 *Antioxidantes de la zarzamora* 9
2.1.3.4 Beneficios a la salud 9
2.1.4 Ultrasonido 10
2.1.4.1 Termoultrasonido 10
2.2 Antecedentes del problema 11
2.2.1 Efecto del termoultrasonido en jugos 11
2.2.2 Bebidas fermentadas 11
2.3 Planteamiento del problema 13
III JUSTIFICACIÓN 14
IV HIPÓTESIS 14
V OBJETIVOS 15

5.1 Objetivo general 15
5.2 Objetivos específicos 15
VI MATERIALES Y MÉTODOS 16
6.1 Contexto de la investigación 16
6.1.1 Tipo de estudio 16
6.2 Criterios de inclusión y exclusión 16
6.3 Diagramas de diseño experimental 16
6.4 Métodos 21
6.4.1 Material biológico 21
6.4.2 Metodologías de la etapa 1 21
6.4.2.1 Pruebas morfológicas de las BAL 21
6.4.2.1.1 Tinción Gram 21
6.4.2.1.2 Test de motilidad 22
6.4.2.2 Pruebas fisiológicas 22
6.4.2.2.1 Tolerancia de crecimiento a diferentes temperaturas 22
6.4.2.2.2 Tolerancia de crecimiento a diferentes pH 23
6.4.2.2.3 Tolerancia de crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl 23
6.4.2.3 Pruebas bioquímicas 23
6.4.2.3.1 Catalasa 23
6.4.2.4 Identificación del género mediante Kit API 24
6.4.2.5 Mutualismo de las BAL 24
6.4.2.6 Cinética de crecimiento 26
6.4.3 Metodologías de la etapa 2 27
6.4.3.1 Obtención del jugo de zarzamora 27
6.4.3.2 Microbiología 27
6.4.3.3 Proceso de fermentación del jugo de zarzamora 28
6.4.3.4 Propiedades físico-químicas 28
6.4.3.4.1 pH 28
6.4.3.4.2 Acidez titulable 29
6.4.3.4.3 Viscosidad 29
6.4.3.4.4 Estabilidad física 30
6.4.3.4.5 Índice de turbidez y oscurecimiento 30

6.4.4 Metodologías de la etapa 3 31
6.4.4.1 Antioxidantes 31
6.4.4.1.1 Contenido de fenoles totales 31
6.4.4.1.2 Antocianinas 32
6.4.4.2 Actividad antioxidante 32
6.4.4.2.1 Actividad antioxidante por ABTS•+ 32
6.4.4.2.2 Actividad antioxidante por DPPH•+ 33
6.4.4.2.3 Actividad antioxidantes por FRAP 33
6.4.4.2.4 Actividad quelante 34
6.4.5 Análisis estadístico 35
VII RESULTADOS 36
7.1 Confirmación de pureza de las cepas: etapa 1 36
7.1.1 Identificación bioquímica 38
7.1.2 Mutualismo 41
7.1.3 Confirmación de presencia estructural por tinción Gram 42
7.1.4 Cinética de crecimiento 43
7.1.5 Cálculo del inóculo para el inicio de fermentación del jugo de zarzamora termoultrasonicado 44
7.2 Evaluación fisicoquímica durante la fermentación del jugo de zarzamora: Etapa 2 45
7.2.1 Cinética de crecimiento durante la fermentación del jugo 45
7.2.2 Cambios de pH, acidez y sólidos solubles totales durante la fermentación del jugo de zarzamora 46
7.2.3 Estabilidad y viscosidad 49
7.2.4 Índice de turbidez y oscurecimiento 50
7.3 Evaluación de las propiedades antioxidantes del jugo de zarzamora fermentado: Etapa 3 51
7.3.1 Contenido antioxidante 51
VIII DISCUSIÓN 54
8.1 Caracterización de microorganismos aislados de aguamiel, pulque y zarzamora: Etapa 1 54
8.1.1 Pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas 54
8.1.2 Identificación bioquímica de las cepas: Fermentación con galería de carbohidratos 57
8.2 Caracterización del cultivo iniciador para la fermentación del jugo de zarzamora 57

8.2.1 Mutualismo 57
8.2.2 Cinética de crecimiento 60
8.2.3 Cultivo iniciador para la fermentación del jugo de zarzamora termoultrasonicado 61
8.3 Evaluación del jugo fermentado: Etapa 2 61
8.3.1 Cinética de crecimiento en el jugo 61
8.3.2 pH, porcentaje de ácido láctico y sólidos solubles totales 62
8.3.3 Estabilidad y viscosidad 63
8.3.4 Turbidez y oscurecimiento 64
8.3.5 Contenido antioxidante: Etapa 3 65
8.3.6 Actividad antioxidante 66
IX CONCLUSIONES 68
X RECOMENDACIONES 69
XI REFERENCIAS 70
XII ANEXOS 95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama metodológico de la primera etapa de estudio. 18
Figura 2. Diagrama metodológico de la segunda etapa de estudio. 19
Figura 3. Diagrama metodológico de la tercera etapa de estudio 20
Figura 4. Esquema de mutualismo 26
Figura 5. Características morfológicas de las cepas 37
Figura 6. Mutualismo de las mezclas de BAL seleccionadas para la inoculación. 42
Figura 7. Tinción Gram de las combinaciones de BAL seleccionadas para la inoculación 43
Figura 8. Cinética de crecimiento de diferentes combinaciones de BAL en caldo MRS 44
Figura 9. Cinética de crecimiento de diferentes combinaciones de BAL en jugo de zarzamora termoultrasonicado 46
Figura 10. Estabilidad A) y viscosidad B) de las diferentes mezclas de jugo de zarzamora fermentado 49
Figura 11. Índice de turbidez A) y oscurecimiento B) de las diferentes mezclas de jugo de zarzamora fermentado 50
Figura 12. Contenido antioxidante de las diferentes mezclas de jugo de zarzamora fermentado. . 51
Figura 13. Actividad antioxidante de las diferentes mezclas de jugo de zarzamora fermentado... 53
Figura 14. Tabla de identificación fenotípica 95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la zarzamora. 8

Tabla 2. Evidencia y efecto de la fermentación en jugos por microorganismos. 12

Tabla 3. Cepas de BAL seleccionadas 21

Tabla 4. Mutualismo de BAL 25

Tabla 5. Pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de cepas aisladas de zarzamora, aguamiel y pulque. 37

Tabla 6. Identificación bioquímica de las BAL por los Kits API 38

Tabla 7. Recuento de BAL a las 24 horas incubación en caldo MRS 44

Tabla 8. Inóculo necesario (mL) de cada BAL* para cubrir la unidad mínima terapéutica para la inoculación en el jugo termoultrasonicado (10 mL) 44

Tabla 9. Cambios durante la fermentación de pH, % ácido láctico y sólidos solubles totales. 47

Tabla 10. Cinética de crecimiento (UFC Log/mL) de diferentes combinaciones de BAL en caldo MRS 96

Tabla 11. Cinética de crecimiento (UFC Log/mL) de diferentes combinaciones de BAL en jugo de zarzamora 96

ABREVIATURAS

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

EAG: Equivalentes de Ácido Gálico

Cy-3-GI: Cyanidin-3-glusido

ABTS•+: Ácido 2,2 azinobis (3-etilbenzotiazilina-6-sulfonato)

EAA: Equivalentes de Ácido Ascórbico

DPPH•+: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

ET: Equivalentes de Trolox

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power

E Fe (II): Equivalentes de hierro ferroso

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos que fomentan la conservación por el proceso de acidificación, extracción de compuestos bioactivos y síntesis de compuestos antimicrobianos, mediante la fermentación de los alimentos como la zarzamora. Este fruto es originario de América, es consumido en fresco y procesado para la obtención de jugos, colorantes, entre otros. Su composición nutrimental varía al estado de madurez, su contenido en antioxidantes es considerable por lo tanto ha generado importancia en la industria alimentaria y la salud, sin embargo, los métodos comunes de conservación eliminan o reducen compuestos bioactivos, siendo el termoultrasonido un método de extracción y una opción eficaz para la inocuidad del producto. El objetivo del presente estudio fue evaluar las propiedades microbiológicas, fisicoquímicas, contenido y actividad antioxidante de una bebida probiótica de jugo de zarzamora fermentado con BAL. Se verificó la pureza de las BAL mediante pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas, así como una identificación con la galería de carbohidratos (API), además se obtuvieron 5 mezclas diferentes de BAL con mutualismo. A las 24 h de incubación, las 5 mezclas llegaron a la unidad mínima terapéutica (UMT) (8.56 UFC Log/mL, en promedio). En las propiedades fisicoquímicas durante ese tiempo, los valores de pH fueron de 3.30-3.59, el ácido láctico fue de entre 0.97- 1.46% y de sólidos solubles de 9.40- 11.07 °Brix. El porcentaje de estabilidad antes de iniciar la fermentación en promedio fue de 89.04, y al finalizar el proceso este parámetro se vio disminuido (74.72%, en promedio). El contenido en fenoles totales al final de la fermentación en la M14 (233.76±1.25 mg EAG/100 mL) y C+ (255.86±3.91 mg EAG/100 mL) se vio aumentado (p<0.05) con respecto al inicio (206.95±9.66 mg EAG/100 mL y 198.26±8.62 mg EAG/100 mL, respectivamente), en antocianinas se observó una disminución significativa en la M1, M11 y M14. Mientras que al comparar el inicio con el final de la fermentación de cada muestra en la actividad antioxidante por ABTS•+ no hubo diferencias, en DPPH•+ la M6 aumentó (p<0.05) y la M11 disminuyó, en la M1 y C+ se vio disminuida la actividad por FRAP y finalmente en actividad quelante las muestras M1, M6, M11 y M14 aumentaron significativamente. De acuerdo a las propiedades analizadas en el presente trabajo el jugo de zarzamora fermentado con BAL podría coadyuvar en enfermedades gastrointestinales o con estrés oxidativo.

Palabras clave: Zarzamora, bacterias ácido lácticas, fermentación, antioxidantes.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (BAL) are microorganisms that promote the preservation by the process of acidification, extraction of bioactive and synthesis of antimicrobial compounds, by means of fermentation of foods such as blackberry. This fruit is native of America and is consumed fresh, in juices, dyes are obtained, among others. Its nutritional composition varies with the state of maturity, its antioxidant content is considerable therefore has generated importance in the food industry and health, however, common conservation methods eliminate or reduce bioactive compounds, being thermoultrasound an extraction method and an effective option for product safety. The objective of this study was to characterize the microbiological, physicochemical and antioxidants properties of a thermoultrasonicated blackberry drink fermented with BAL from plant sources. The purity of BAL by morphological, biochemical and physiological tests was verified, as well as an identification with the carbohydrate gallery (API), in addition 5 different mixtures of BAL with mutualism were obtained. At 24 hours of incubation the 5 mixtures reached the minimum therapeutic unit (UMT) (8.56 CFU Log/mL, on average). In physico-chemical properties during that time, the pH values were 3.30-3.59, lactic acid was between 0.97- 1.46% and soluble solids of 9.40- 11.07 °Brix. The percentage of stability before starting the fermentation was on average 89.04, and at the end of the process this parameter decreased (74.72%, on average). At the end of the fermentation, the total phenolic increased (p<0.05) in M14 (233.76±1.25 mg AGE/100 mL) and C+ (255.86±3.91 mg AGE/100 mL) in relation to the start of fermentation (206.95±9.66 mg AGE/100 mL and 198.26±8.62 mg AGE/100 mL, respectively), in anthocyanins a significant decrease in M1, M11 and M14 was observed. While when comparing the beginning with the end of the fermentation of each sample, in antioxidant activity by ABTS•+ there were no differences, in DPPH• the M6 increased (p<0.05) and M11 decreased, in M1 and C+ the activity by FRAP decreased, finally in chelating activity the M1, M6, M11 and M14 samples increased significantly. According to the properties analyzed in this study, fermented blackberry juice with BAL could contribute to gastrointestinal diseases or oxidative stress.

Keywords: Blackberry, lactic acid bacteria, fermentation, antioxidants

I INTRODUCCIÓN

Actualmente la industria alimentaria está en la búsqueda de alternativas sobre alimentos más saludables y completos nutricionalmente, que otorguen mayores propiedades benéficas a la salud y que al mismo tiempo coadyuven en el tratamiento de enfermedades no transmisibles.

Otro aspecto que se considera al elaborar un producto es la practicidad y accesibilidad de consumo, por lo cual, uno de los alimentos procesados de mayor adquisición son las bebidas como los refrescos, de los cuales México es el mayor consumidor a nivel mundial con 163 L por persona al año (1), sin embargo, son de los productos que más daño han ocasionado a la salud, aumentando los casos de obesidad y sobrepeso entre la población (2). Es por ello, que las bebidas son una buena alternativa para llegar a la población y mediante ellas promover la salud.

De los alimentos más utilizados por sus propiedades nutricionales que van más allá de su contenido en macronutrientes, como los carbohidratos, proteínas y lípidos, son las frutas y verduras, que destacan por sus compuestos bioactivos con alta actividad antioxidante (3).

Sin embargo, para poder tener una bebida con las mejores características fisicoquímicas y nutricionales de las frutas y verduras en su forma natural y ser presentadas al consumidor, es necesario extender su vida de anaquel, ya que son perecederos y susceptibles a la fermentación espontánea, que sensorialmente afecta al alimento. Sin embargo, la fermentación puede ser un proceso controlado que utiliza cultivos iniciadores, como las bacterias ácido lácticas (4). La fermentación láctica es la más utilizada en frutas y verduras por su inocuidad, por su efecto conservador, los beneficios sensoriales que brinda sobre su sabor y aroma, al mismo tiempo, se busca que la fermentación genere un valor agregado al producto final (5,6), que pueda intervenir sobre la salud humana.

Existen muchos frutos con características nutricionales importantes y que son pocos aprovechados por su temporalidad de cosecha y características perecederas, uno de ellos es la zarzamora, que por su alto contenido en antioxidantes es un protector contra los radicales libres producidos en enfermedades crónicas no transmisibles, igualmente tiene propiedades antimicrobianas, por lo cual podría ser utilizado para la formulación de una bebida fermentada.

Por lo anterior, en el presente proyecto se buscó elaborar una bebida de zarzamora termoultrasonicada y fermentada con distintas combinaciones de bacterias ácido lácticas (BAL), mediante ensayos microbiológicos, fisicoquímicos y antioxidantes.

II ANTECEDENTES

2.1 Generalidades

2.1.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se caracterizan por la producción de ácido láctico como producto final catabólico a partir de la glucosa. Se agrupan en las bacterias Gram positivas que incluyen un bajo contenido de guanina + citosina (7), se dividen en homofermentativas y heterofermentativas, ambas productoras de ácido láctico, además las segundas producen alcohol y otros metabolitos (8). Estas bacterias evitan el deterioro de alimentos y el crecimiento de patógenos debido a su capacidad de fermentación mediante la producción de los metabolitos antes mencionados, esto en alimentos como verduras, frutas, productos lácteos, entre otros (9).

Las BAL crecen en hábitats con un rico suministro de alimento (9) siendo capaces de producir metabolitos con actividad antioxidante (4). La actividad metabólica de las BAL está relacionada con la producción de sustancias benéficas como antibióticos, anticancerígenos (10,11), antimicrobianos (12), ácidos orgánicos, exopolisacáridos, entre otros (9). Forman parte de la microbiota saludable del ser humano, y algunas se emplean como probióticos que administrados en cantidades adecuadas, tiene un beneficio en la salud del huésped (13). Se ha reportado que la unidad mínima terapéutica (UMT) de BAL probióticas es de 7 - 9 UFC Log10/mL (14), con resultados positivos en afecciones que van desde diarrea, colitis por *Clostridium*, infecciones por *Helicobacter pylori*, cáncer, entre otras (15). Por lo que los probióticos son importantes en la prevención y tratamiento de enfermedades.

2.1.1.1 Probióticos

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a los probióticos como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas tienen un efecto benéfico sobre la salud del huésped (16).

Los probióticos tienen mecanismos que son identificados frecuentemente en investigaciones, como la resistencia a la colonización, la producción de ácidos grasos de cadena corta y acidificación del medio, normalización de la microbiota, exclusión competitiva de patógenos, síntesis de vitaminas, actividades enzimáticas, entre otros (17). Actualmente se busca analizar diferentes condiciones de

los probióticos, como su viabilidad durante su procesamiento y almacenamiento, sensibilidad a pH bajos, bilis, líquido gástrico, pancreático e intestinal, adherencia celular e interacciones con microorganismos patógenos (18).

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico, es necesario que sean probados en humanos y demuestren sus efectos concretos a la salud del huésped, algunos ejemplos de probióticos son: *Lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus plantarum, Enterococcus, Bifidobacterium lactis, Lactobacillus casei*, entre otros (17). Estos se consumen comúnmente en preparaciones con mono o cultivo mixto viable y activo de bacterias, afectando al huésped de manera benéfica (19,20), y se ha demostrado que tienen propiedades antidiabéticas (21), antiobesidad (22), antiinflamatorio como en la enfermedad de Crohn (23,24), anticancerígenas (25), antialérgicas (26) y efectos sobre el sistema nervioso central (27).

Por lo anterior, las BAL han generado múltiples investigaciones para conocer sus efectos de manera más específica, por lo cual se realizan aislamientos e identificaciones principalmente de fuentes naturales como frutas, verduras, lácteos, carnes, bebidas, entre otros, los cuales serán explicados a continuación.

2.1.1.2 Aislamiento de BAL

El aislamiento en el área de microbiología, fisiología, bioquímica, genética, medicina y biotecnología, tiene como propósito obtener cultivos puros para su estudio, y tener cepas de referencia para el perfeccionamiento de métodos moleculares (28). El método más común de separación de células es en medio sólido, que consiste en tomar una sola colonia e inocular en una nueva caja, su proceso se define por la etapa de separación (difusión de las células en la placa), la etapa de crecimiento (formación de colonias) y la de aislamiento (colonia por colonia) (29).

La mayoría de las BAL de suplementos comerciales, se aislaron de productos lácteos y del tracto gastrointestinal (30), siendo los cultivos de fuentes vegetales poco utilizados (31). Las bacterias autóctonas de productos alimenticios se encuentran adheridas a su matriz facilitando su sobrevivencia (32) y posteriormente se pueden llevar a una fermentación espontánea con los microorganismo propios del fruto (33), estos productos tienen las condiciones aptas para el crecimiento como acidez, vitaminas, minerales, carbohidratos (34), como es el caso de la zarzamora, pulque y aguamiel. Sin embargo, para su inoculación en productos, es necesaria la

identificación de las BAL, existen diferentes métodos de identificación que se describen en el siguiente tema.

2.1.1.3 Métodos de identificación

La identificación de un microorganismo es de importancia industrial y clínica, ya que da un panorama del organismo que se pretende utilizar o que esté causando daño a su huésped, ya sea a la salud de una persona o aspectos sensoriales de un producto. Este método permite el avance de estudios y análisis más específicos, debido a la caracterización del cultivo.

Para su identificación existen diferentes métodos, empezando por los fenotípicos, los moleculares y los proteómicos. Los fenotípicos son más sencillos de realizar, se basan en las características observables del cultivo, como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas, este método es tradicional y permite identificar el género y especie del microorganismo (35). Son diferentes las pruebas que existen para este tipo de identificación como:

1. Características microscópicas: morfología, medios de cultivo, requisitos de crecimiento en cuanto a temperatura y nutrición.

2. Pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, prueba ureasa, reducción de nitratos, fermentación de azúcares, lipasa, pruebas de resistencia a diferentes sustancias como bilis, entre otros (36,37).

3. Sistemas comerciales: estas permiten realizar simultáneamente entre 10 y 50 pruebas mediante celdillas, que contienen un sustrato que reacciona con el cultivo, un ejemplo de estos sistemas son API (bioMérieux) y Oxi/Ferm Tube (BD) (35).

Los métodos moleculares o genotípicos son el siguiente paso de una identificación fenotípica, se han utilizado genes diana de distintas especies y géneros bacterianos que constituyen al análisis de ARN 16S, un marcador inicial en diversas identificaciones (38). Los genes utilizados con mayor frecuencia son: ARN 16S, 16S-23S ARNr, ARNr 23S, rpoB (subunidad B de la ARN polimerasa), gyrB (subunidad B de la ADN girasa) (38).

Por último, los métodos basados en proteómica, abordan el análisis de un conjunto de proteínas mediante electroforesis y espectrometría de masas (MALDI-TOF) (35). Este método es poco usado, rápido y fiable, se ha comprobado su efectividad sobre la identificación bacteriana y

levaduras (39). Se han aislado e identificado diferentes BAL con los métodos anteriormente descritos, ejemplos específicos de alimentos son la zarzamora, el aguamiel y el pulque, los cuales se detallarán a continuación.

2.1.1.4 Aislamiento e identificación de BAL en aguamiel, pulque y zarzamora

El aguamiel o savia de maguey es una bebida rica en sacarosa, fructosa, glucosa y polifructanos, a partir de esta se obtiene el pulque, en donde el aguamiel se lleva a fermentación por un lapso de 12 a 24 horas. La fermentación se lleva a cabo por microorganismos autóctonos del aguamiel (40), su producción es por *Zymomonas mobilis* y BAL (41).

Del aguamiel se ha reportado la presencia de *L. plantarum* y *P. acidilactic*i (42), en aguamiel de *agave salmiana* y *atrovirens* de diferentes temporadas del año se identificó al *L. casei, L. plantarum, L. lactis* entre otras (43), en muestras de Coahuila México se reportó la identificación de especies como *Leuconostoc, Lactococcus lactis, Pediococcus* (44).

Mientras que del pulque se han aislado diferentes microorganismos entre ellos las BAL como *L. kefiri, L. acidophilus* y *L. hilgardii* en pulque tratado por termoultrasonido (45), se identificó a *Lactobacillus sanfranciscensis, Lactococcus lactis, Lactococcus piscium, Lactococcus plantarum, Leuconostoc citreum* y a *Leuconostoc* gelidum (46), en un pulque del estado de Hidalgo se identificaron diferentes cepas de *L. plantarum* y una de *L. brevis* (42).

Además, de la identificación bacteriana de las bebidas anteriormente mencionadas, son pocos los estudios que han aislado e identificado BAL de la zarzamora como *L. plantarum* (47,48), 10 cepas de *W. cibaria* en frutos conseguidos localmente (49).

De estos aislados se formulan cultivos iniciadores individuales o en consorcios, que en conjunto puedan crecer en el medio de cultivo, además los microorganismos deben tener mutualismo durante su crecimiento mediante sus productos metabólicos y promover efectos benéficos a la salud, por lo que se describe en el siguiente tema la relevancia del mutualismo.

2.1.1.5 Mutualismo

Uno de los conceptos utilizados para evaluar o determinar la convivencia en las bacterias es el mutualismo, un tipo de simbiosis que se define como las interacciones positivas y recíprocas entre especies, beneficiando a todos los participantes. El mutualismo es una interacción indirecta donde se ven afectadas todas las cepas involucradas en el consorcio (50), un ejemplo de este es la

convivencia de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en yogur (51). El mutualismo está presente en todas partes y es un vector importante para la evolución (52), como en la microbiota intestinal que es de gran importancia en la digestión, metabolismo y función inmune, su desequilibrio (disbiosis) se encuentra asociado al desarrollo de patologías, que principalmente incluyen trastornos gastrointestinales, los cuales se pueden reducir y controlar mediante la regulación de patógenos intestinales con el consumo de microorganismos probióticos en cantidades adecuadas (53), sin embargo, la viabilidad y convivencia de las BAL son claves para la estimulación inmune intestinal (54,55). Una de las formas de consumir estos microorganismos es mediante productos fermentados.

2.1.2 Bebidas fermentadas

Las frutas son perecederas, lo cual ha llevado al estudio de su conservación mediante diferentes técnicas como la fermentación, este proceso otorga propiedades nutricionales al producto final debido a la actividad de los microorganismos y enzimas (56). La fermentación se obtiene de la acción de microorganismos propios del alimento, ingredientes alimentarios o del medio ambiente, agregados como cultivo iniciador (57).

Las vías participantes en el desarrollo de sabor en los alimentos fermentados son la glucólisis, lipólisis y proteólisis (58), por lo cual una bebida fermentada debe tener un sustrato adecuado, microorganismos apropiados, en condiciones ambientales ideales (temperatura, pH y humedad) (59), siendo las bacterias ácido lácticas (BAL) las más utilizadas para los procesos de fermentación (60). Entre los sustratos más utilizados para los procesos de fermentación están las frutas como la zarzamora.

2.1.3 Zarzamora

El género *Rubus* comprende casi 740 especies y 12-15 sub-géneros donde se encuentra el *Rubus fruticosus* (61,62). Este es un arbusto con frutos de sabor agradable y agridulce, conocidos como zarzamora perteneciente a la familia de las rosáceas, está formado por frutillos esféricos cada uno con su semilla (62). En sus etapas de maduración cambia de color de verde, rojo hasta negro, llega a medir de 1-3 cm (62,63). Estas frutas se consumen en fresco e industrialmente se elaboran jugos, jaleas, extractos, licores, colorantes entre otros, la zarzamora se encuentra en casi todo el mundo

excepto en zonas desérticas, es originaria de América y crece en climas con temperaturas de 5-22 °C (64), estas características de clima y temperatura influyen en la producción de este fruto.

2.1.3.1 Producción

En 2017, México fue el primer productor internacional de zarzamora con una producción de 270 mil 399 toneladas de las cuales Michoacán aportó el 97.27%, seguido de Jalisco y Baja California (65). Mientras que en Hidalgo, en el año 2018 se produjo un total de 3 toneladas del fruto, las dos terceras partes de la producción estatal proviene de Atotonilco el Grande (66). Este producto tiene un consumo anual per cápita de 1.600 kg, siendo los meses de mayo, junio y noviembre en donde se obtiene el mayor porcentaje de producción nacional (65), con las mejores características con respecto a su composición.

2.1.3.2 Composición química

La composición de la zarzamora varía según su madurez, tipo de cosecha y condiciones de almacenamiento (67), como componente mayoritario tiene 88.15 g/100 g de agua, seguido de los carbohidratos (9.61g/100 g) y proteínas (1.39 g/100 g), además tiene lípidos, vitaminas, minerales de los cuales se observa su proporción en la tabla 1.

Tabla 1. Composición química de la zarzamora.

Nutrimento	Unidad	100 g
Agua	g	88.15
Energía	kcal	43
Proteína	g	1.39
Lípidos totales	g	0.49
Carbohidratos	g	9.61
Fibra dietaría total	g	5.3
Azúcar total	g	4.88
Minerales		
Calcio	mg	29
Hierro	mg	0.62
Magnesio	mg	20
Fósforo	mg	22
Potasio	mg	162
Sodio	mg	1
Zinc	mg	0.53

Fuente: (68)

Las características de este fruto se caracterizan por su cultivo, etapa de maduración, almacenamiento, temporalidad, entre otros, que determinan el contenido de compuestos bioactivos, como los antioxidantes (56).

2.1.3.3 *Antioxidantes de la zarzamora*

Los antioxidantes son sustancias moleculares que neutralizan o inhiben la formación de radicales libres, ayudando a mantener la integridad celular del daño causado por el estrés oxidativo (69), ejercen su función por dos mecanismos principales: la transferencia de nitrógeno y donación de electrones. Estos compuestos son muy característicos de las frutas, como la zarzamora, de la cual destacan los polifenoles como ácidos fenólicos, en mayor proporción las antocianinas, quienes otorgan el color y olor característico del fruto. Estos compuestos son conocidos por su actividad contra los radicales libres otorgando propiedades nutricionales de interés (70–73), los cuales varían de acuerdo a la temporada de cosecha (74). Un estudio realizado en moras silvestres de la especie *Rubus* cuantificó 32 compuestos fenólicos de los cuales 8 fueron antocianinas, 15 flavonoles, 3 ácidos hidroxicinámicos, 6 derivados ácido elágico y 2 flavonas (75), sin embargo, no todos son aprovechados en la digestión ya que permanecen unidos a la fibra y algunas modificaciones estructurales pueden aumentar la absorción de estos compuestos (74,76). Estos compuestos se caracterizan mayormente por sus beneficios impartidos a la salud del huésped.

2.1.3.4 Beneficios a la salud

Los compuestos de la zarzamora han sido utilizados en el ámbito de salud como protectores contra los radicales libres y el estrés oxidativo de patologías (77), como las cardiovasculares (78,79). Además, se han reportado propiedades antiinflamatorias y gastroprotectoras (71) atribuibles por su contenido en polifenoles, teniendo un papel importante en el tratamiento de úlcera gástrica (80) mediante su actividad antioxidante y por la disminución en la expresión de la proteína COX-2, la cual participa en los procesos de inflamación de células normales a células cancerosas (81). Asimismo, se han reportado propiedades antinociceptivas y antibacterianas de la zarzamora contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, relacionado con los efectos inhibitorios sobre las citocinas proinflamatorias (82).

Otro compuesto propio del fruto es su contenido en fibra (83), la cual es importante por sus propiedades que promueven la salud, ejerciendo efecto prebiótico, prevención de cáncer de colon entre otros efectos que están relacionados principalmente con su digestión, mediante el transporte de nutrientes y la cinética de fermentación (84), en la fibra se pueden encontrar compuestos bioactivos atrapados en su estructura como los antioxidantes (72).

Una de las formas en las cuales se puede utilizar la zarzamora para obtener los efectos benéficos anteriormente mencionados es en la presentación de jugo fermentado, sin embargo, para este tipo de proceso es necesario que el producto antes del proceso de fermentación sea inocuo. Existen diferentes formas de lograr esta inocuidad, como la esterilización o pasteurización que causan mayor daño a la matriz del producto, y una de las formas menos agresivas es el ultrasonido.

2.1.4 Ultrasonido

Se define como las ondas acústicas inaudibles u ondas de presión de una frecuencia igual o superior a 20 kHz, se denomina ultrasonido de alta potencia ya que tiene la propiedad de causar cavitación permitiendo la inactivación de microorganismos y eliminación enzimática en el procesamiento de alimentos (85), la atracción de este método es que a corto tiempo y a temperaturas bajas permite una extracción más específica de compuestos nutricionales (86). Además, el ultrasonido es una tecnología emergente que ha demostrado la liberación de compuestos como los antioxidantes de las redes de fibra que no permite que estos sean absorbidos (87).

Durante la cavitación de un líquido la propagación del ultrasonido genera microburbujas dando lugar a su colapso, resultando en puntos calientes de hasta 5,500 °C y una presión de 50 MPa cuando la burbuja colapsa cerca de una superficie incide daño sobre la pared de partículas del líquido, esta es una de las principales razones por las cuales el ultrasonido es efectivo (88). Sin embargo, se ha reportado que el ultrasonido en combinación con temperatura es más efectivo en relación a la inactivación de microorganismos, a esto se le conoce como termoultrasonido.

2.1.4.1 Termoultrasonido

Este es un proceso que combina el poder del ultrasonido con el tratamiento térmico suave (50 - 60 °C) de forma simultánea (73,89). Como se mencionó anteriormente, este método tiene mayores efectos en la inactivación de microorganismos en comparación con alguno de los dos tratamientos

de manera individual (90), al utilizarlos juntos se requiere de tiempos y temperaturas menores que la esterilización y pasteurización. Es por ello, que el termoultrasonido se ha utilizado como método sustituto para la obtención de productos como las bebidas que puedan ser destinadas directamente para su consumo o como materia prima para la manufactura de otro alimento (73,91) como las bebidas fermentadas.

2.2 Antecedentes del problema

2.2.1 Efecto del termoultrasonido en jugos

El termoultrasonido ha demostrado ser una buena alternativa de extracción de compuestos bioactivos y como potenciador de propiedades funcionales de los alimentos (92), así como una alternativa al tratamiento térmico utilizado usualmente en el procesamiento de jugos (93). La utilización del termoultrasonido en jugo de zarzamora llevó a un mayor contenido de fenoles totales, ácido ascórbico y antocianinas, así como su actividad antioxidante (94), además de la inactivación total de la carga microbiana con respecto a mesófilos aerobios y enterobacterias y de actividad enzimática (73). Al igual que en el jugo de tuna combinado se observó disminución de la carga microbiana (95), en ambos estudios se reportó una disminución de la actividad enzimática de pectinmetilesterasa y el mantenimiento de los compuestos antioxidantes al igual que la actividad antioxidante.

Los análisis anteriormente mencionados demostraron que el termoultrasonido puede ser una alternativa a la pasteurización sin modificar las características físicas del producto y puedan ser utilizados en la mejora de sus características sensoriales mediante la fermentación controlada.

2.2.2 Bebidas fermentadas

Estudios realizados sobre bebidas fermentadas de diferentes frutos han encontrado que el contenido de fenoles y la actividad antimicrobiana puede aumentar o disminuir dependiendo del sustrato y del microorganismo, así como de los compuestos agregados intencionalmente (enzimas, carbohidratos, entre otros), los cuales llegan a modificar el proceso de fermentación. Algunos estudios sugieren que algunas bebidas podrían tener efecto protector contra por sus propiedades probióticas (Tabla 2). Las BAL se han utilizado para impulsar la extracción de componentes

bioactivos como los antioxidantes (96), la fermentación mejora el valor nutricional, transformando el sustrato primario en bioactivos funcionales debido a la producción de enzimas como amilasa, peptidasa, proteinasa, deshidrogenasas, descarboxilasa y β-glucosidasa (97).

Tabla 2. Evidencia y efecto de la fermentación en jugos por microorganismos.

Tipo de jugo	Bacterias inoculadas	Resultados	Referencia
Mora (Murus nigra)	*L. paracasei* *L. acidophilus*	Aumento de polifenoles y actividad antioxidante.	(96)
Limón dulce	*L.plantarum*	Disminución de azucares, ácido cítrico y compuestos fenólicos. Propiedades antibacterianas con *E.coli* y *S. typhimurium.*	(98)
Anacardo	L.casei, L.plantarum y *L. acidophilus*	Buen sustrato en el proceso de fermentación.	(99)
Cereza	*L. plantarum* de origen lácteo y de origen vegetal	Mejor modulación del perfil fenólico. Aumentaron los niveles de ácido dihidrocafeico y fenilácticos.	(100)
Piña	*Bifidobacterium lasctis* *L. plantarum* *L. acidophilus*	Buen sustrato para el crecimiento de bacterias probióticas. Fenoles totales de 0.45 mg EAG/mL.	(101)
Tuna verde	*L. plantarum*	Las concentraciones de fenoles y actividad antioxidante se mantuvieron. Reportaron mejoras en leptina, insulina, colesterol, y sobre la pérdida de peso en ratones.	(102)
Espino amarillo Arándano Aronia	4 cepas de *L. platarum* *Oenococcus oeni*	La adición de pectinasa permitió que los azúcares no se afectaran, *L.plantarum* no tuvo efecto en las antocianinas de la aronia y flavonol del espino, Algunas cepas redujeron los fenoles.	(103)

Algunos estudios sugieren una mejor selección de cepas para mantener o aumentar los compuestos fenólicos como el de mora, cereza y tuna verde. Algunas otras bebidas proponen propiedades que coadyuvan en la salud humana, como es el caso de la de limón dulce que presentó actividad antibacteriana y la de tuna verde fermentada con *L.plantarum* que mejoró las concentraciones de componentes lipídicos en la sangre de ratones.

2.3 Planteamiento del problema

Las infecciones gastrointestinales no han dejado de ser un problema de salud pública a nivel mundial, causan más de la mitad de la carga de enfermedades de transmisión alimentaria. Se estima que 1 de cada 10 personas presenta algún tipo de enfermedad gastrointestinal y 420,000 mueren, siendo el 30% niños menores de 5 años, causadas por la ingesta de alimentos con agentes infecciosos como las bacterias, la OMS pide que los gobiernos y la industria alimentaria hagan más para asegurar la inocuidad alimentaria (104).

La mayoría de los probióticos se encuentran comúnmente en productos lácteos como el yogurt, y a pesar de sus propiedades, estos alimentos son bajos en compuestos bioactivos como los antioxidantes (105), que también tiene propiedades antimicrobianas y protectoras ante el estrés oxidativo. Igualmente, los productos lácteos son poco consumidos por la población vegana (106) con intolerancia a la lactosa o alergias a proteínas de la leche, así como personas con restricciones médicas a estos productos (107).

Se ha demostrado que los probióticos tienen propiedades benéficas a la salud y coadyuvan en el tratamiento de enfermedades, principalmente gástricas como síndrome de Crohn, enfermedad inflamatoria intestinal, cáncer, actividad antimicrobiana contra patógenos, entre otros (98), es por ello la importancia de su consumo.

Por lo cual, se han formulado bebidas fermentadas a partir de frutas o verduras con inóculos de BAL probióticas, de las cuales se ha evaluado el crecimiento bacteriano, propiedades fisicoquímicas, la sobrevivencia en diferentes condiciones del proceso, cambios sobre el perfil antioxidante y actividad antioxidante, propiedades antimicrobianas, entre otros. Sin embargo, poco se conoce de bebidas fermentadas con consorcios o cultivos mixtos de BAL y sus efectos durante la fermentación.

III JUSTIFICACIÓN

Las BAL tienen efectos positivos sobre las terapias a base de microorganismos probióticos en las infecciones gastrointestinales que siguen siendo un problema de salud pública principalmente en países en desarrollo, estas BAL mediante su multiplicación en el tracto gastrointestinal o la síntesis de productos (ácido láctico, ácido acético, bacteriocinas, entre otros) durante la fermentación, ejercen propiedades antimicrobianas. Sin embargo, los probióticos se encuentran en derivados lácteos y existe población con alergia a la proteína láctea o intolerancia a la lactosa. Además, se conoce que existe un bajo consumo de frutas y verduras, y al mismo tiempo de compuestos antioxidantes que coadyuven como protectores del estrés oxidativo. Por lo anterior, en el presente proyecto se propone formular una bebida a base de jugo de zarzamora fermentada con una mezcla de BAL probióticas aisladas de productos vegetales, que pueda ser consumida de manera segura por la población que no consume lácteos o sus derivados. De igual manera, se evaluarán las propiedades fisicoquímicas y antioxidantes de la bebida, pudiendo otorgar un producto que coadyuve como tratamiento o preventivo del estrés oxidativo presente en diversas patologías, así mismo, promover la adquisición y consumo del fruto. Por otro lado, el uso de una tecnología emergente como el termoultrasonido, como método de conservación y extracción, permitirá obtener un jugo inocuo para la preparación de una bebida fermentada y con un mayor aprovechamiento de antioxidantes para el consumo humano.

IV HIPÓTESIS

La bebida con posible efecto probiótico a partir de jugo de zarzamora fermentado con BAL permite buenas propiedades fisicoquímicas y antioxidantes.

V OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar las propiedades microbiológicas, fisicoquímicas, contenido y actividad antioxidante de una bebida probiótica de jugo de zarzamora fermentado con bacterias ácido lácticas.

5.2 Objetivos específicos

1.- Determinar la pureza e identificación de las BAL mediante pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas.

2.- Evaluar el mutualismo de seis BAL aisladas de fuentes vegetales en medio MRS para su incorporación en jugo de zarzamora.

3.- Obtener la unidad mínima terapéutica mediante la cinética de crecimiento de las mezclas de BAL de fuentes vegetales en un medio MRS.

4.- Alcanzar la unidad mínima terapéutica de las mezclas de BAL en las bebidas fermentadas a base de zarzamora.

5.- Analizar las propiedades fisicoquímicas (pH, acidez, sólidos solubles, estabilidad, viscosidad, turbidez y oscurecimiento) de las bebidas fermentadas a base de zarzamora.

6.- Evaluar el contenido de antioxidantes (fenoles totales y antocianinas) y capacidad antioxidante por diferentes métodos (ABTS•+, DPPH•+, FRAP y actividad quelante) de las bebidas fermentadas a base de zarzamora.

VI MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Contexto de la investigación

La presente investigación se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, en los laboratorios de Nutrigenómica, Tecnofuncionalidad de Alimentos y Alimentos Funcionales y Nutraceúticos pertenecientes al Área Académica de Nutrición. Los análisis de la bebida fermentada a base de zarzamora se realizaron en el periodo de julio 2019 – junio 2021.

6.1.1 Tipo de estudio

El presente proyecto es de tipo experimental, prospectivo y longitudinal.

6.2 Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

- Cepas de BAL aisladas de aguamiel, pulque y zarzamora.
- Colonias de BAL con características morfológicas típicas (redondas, opacas de color blanco-beige, aspecto cremoso, de 1-2 mm de diámetro, superficie convexa y márgenes enteros).
- Zarzamoras cosechadas en los meses de abril-mayo 2020.

Criterios de exclusión:

- Cepas que no tengan la morfología característica de las colonias.
- Jugo de zarzamora que presente mesófilos aerobios o enterobacterias después del termoultrasonido.

6.3 Diagramas de diseño experimental

El presente estudio se realizó en tres etapas, en la primera se analizó la pureza y mutualismo de las BAL, la segunda consistió en la formulación de las mezclas, la fermentación de las bebidas de zarzamora, la cinética de crecimiento para obtener la UMT y evaluación de las propiedades

fisicoquímicas, y en la tercera etapa se evaluó el contenido y capacidad antioxidante de las diferentes formulaciones de las bebidas de zarzamora fermentada.

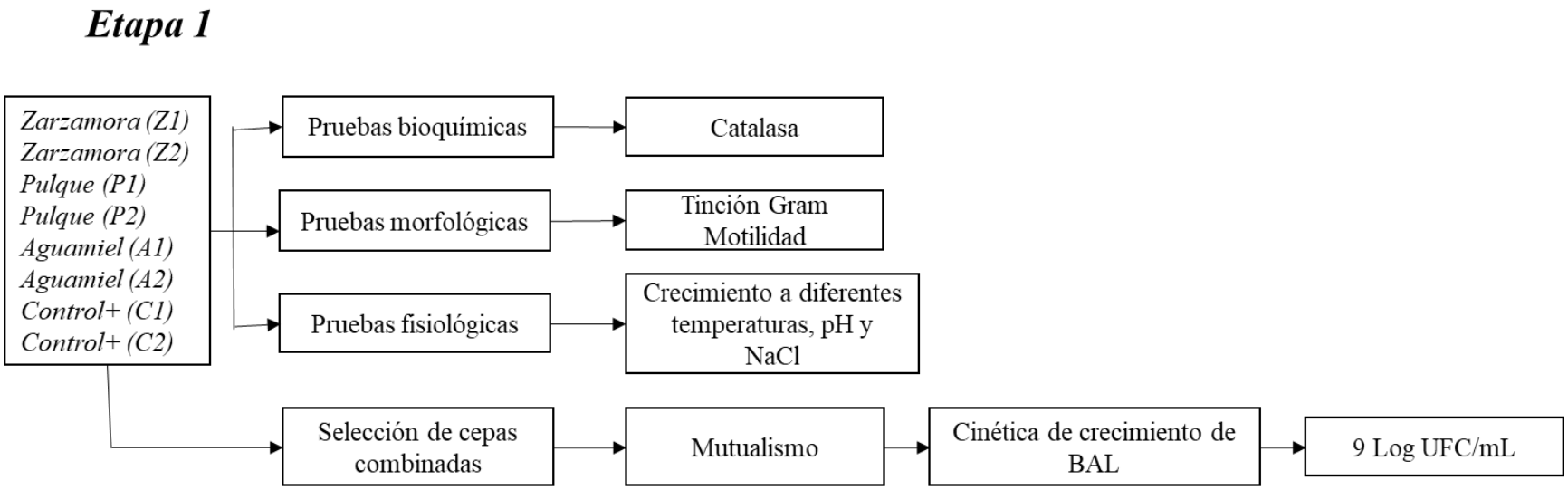

Figura 1. Diagrama metodológico de la primera etapa de estudio.

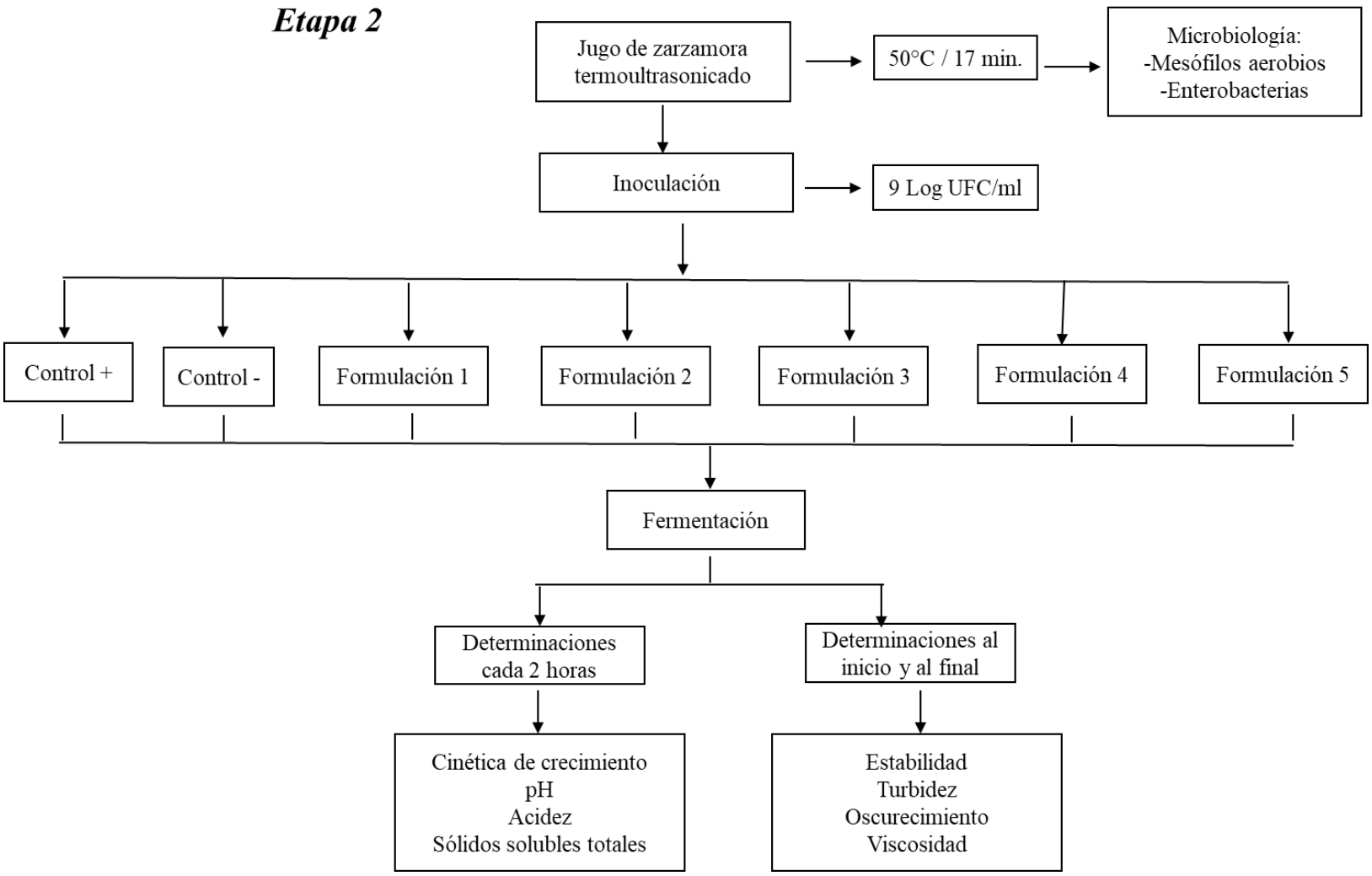

Figura 2. Diagrama metodológico de la segunda etapa de estudio.

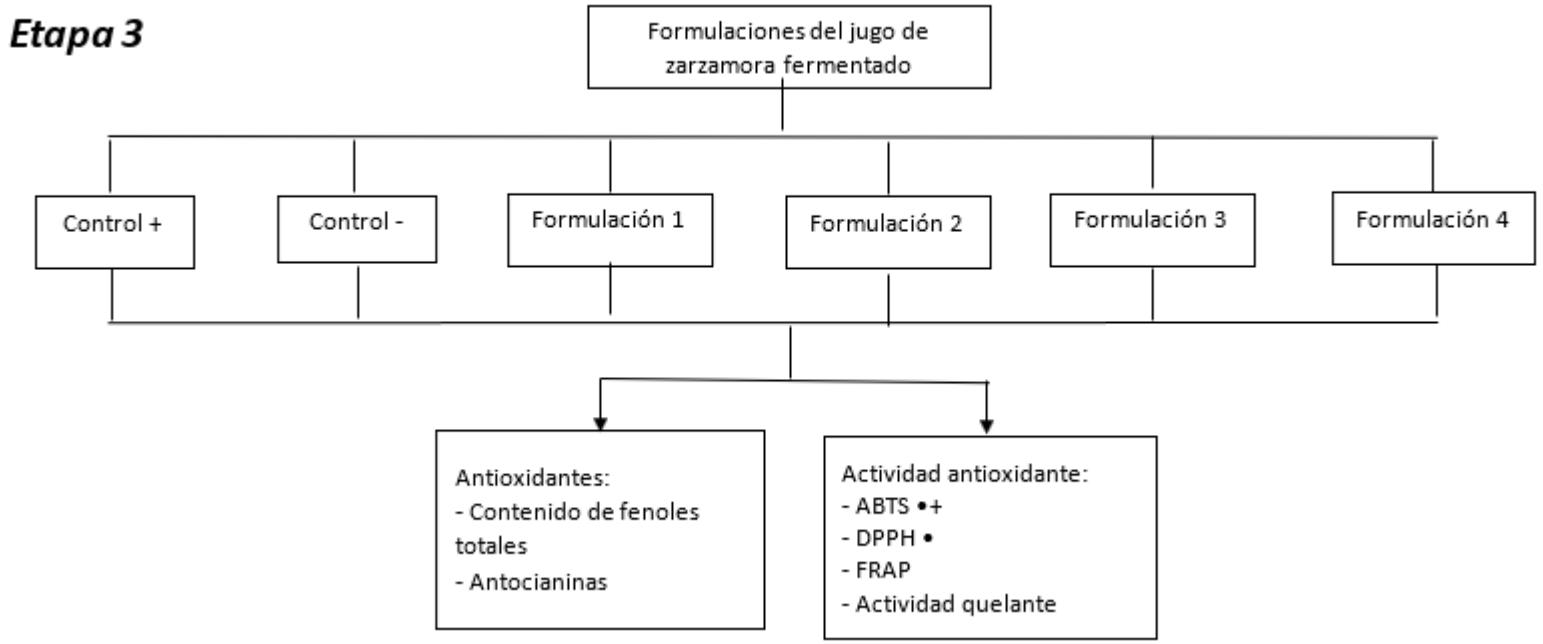

Figura 3. Diagrama metodológico de la tercera etapa de estudio

6.4 Métodos

6.4.1 Material biológico

Se utilizaron cepas aisladas de la zarzamora, pulque y aguamiel obtenidas de un trabajo previo (42,48), del cual se seleccionaron 3 cepas resistentes a un pH de 2 y 3 que hayan tenido alta actividad antimicrobiana y se utilizaron dos cepas de BAL como control aisladas de productos alimenticios (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas de BAL seleccionadas

Origen	**Resistente a pH 2**	**Por inhibición**
Zarzamora	*L. plantarum* (Z24-1)	*L.brevis* (Z24-8)
Pulque	*L. plantarum* (P24-7)	*L. plantarum* (P24-6)
Aguamiel	*P. acidilactici* (A2-1)	*L. plantarum* (A1-2)
Control +	*L. ramnosus*	
	L. casie	

6.4.2 Metodologías de la etapa 1

6.4.2.1 Pruebas morfológicas de las BAL

6.4.2.1.1 Tinción Gram

Principio

Esta técnica diferencia a las bacterias en dos grupos, Gram positivas y negativas, la diferencia de tinciones se debe a la pared celular. Las Gram positivas se tiñen de morado porque tienen una pared gruesa de peptidoglucanos y polímeros, ocasionando no se decoloren y las Gram negativas se tiñen de safranina debido a su capa delgada de peptidoglucanos y una bicapa de lipoproteínas que se deshace con la tinción (108).

Procedimiento

Se utilizó la técnica establecida por la ficha técnica del kit de tinción Gram, que consistió en la fijación de una colonia en un portaobjetos y una primera tinción con violeta genciana dejando reposar por 1 min, posteriormente se cubrió con yodo por 1 min y se enjuaga con alcohol-acetona. Después se realizó una segunda tinción con safranina dejando reposar por 1 min, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar al aire para posteriormente observar en un microscopio óptico (LOMO, BMH4-BF, Rusia) a 100X. Se reportó como Gram positivo a las BAL de color moradas, azuladas o púrpuras y como Gram negativo a las BAL de color rojo.

6.4.2.1.2 Test de motilidad

Principio

Las bacterias tienen motilidad por medio de cilios y flagelos, presentes principalmente en bacilos, esta técnica permite determinar si las BAL presentan motilidad (37).

Procedimiento

Para la realización de este test se preparó agar con 0.003% de agar bacteriológico en caldo MRS como sustituto del agar SMI. Después se hizo una punción a un tercio de profundidad y se dejó incubar (Labtech, LSI-3016A, Corea) por 24 h a 37 °C. Se reportó como positivo al crecimiento de BAL fuera del área de punción y negativo al crecimiento en el área de punción (109).

6.4.2.2 Pruebas fisiológicas

Principio

Estas pruebas determinan la capacidad que tienen las BAL para desarrollarse en medios con diferentes condiciones (110), estos microorganismos se adaptan a ambientes extremos que modifican su velocidad de crecimiento y supervivencia (111).

6.4.2.2.1 Tolerancia de crecimiento a diferentes temperaturas

Procedimiento

Se realizó la técnica según Yelnety (2014) (112) con modificaciones. En caldo MRS estéril (5 mL) se inoculó una colonia de BAL y se dejó incubar (Labtech, LSI-3016A, Corea) por 5 días a diferentes temperaturas: 15 °C, 20 °C, 30 °C, 45 °C y 50 °C. Se reportó la formación de sedimento si creció (+) o no creció (-).

6.4.2.2.2 Tolerancia de crecimiento a diferentes pH

Procedimiento

Se utilizó la técnica establecida por Yelnety (112). Se ajustó el pH del caldo MRS a valores de 3.5, 4.5, 5.5, 8.5 y 9.6, para acidificar se utilizó HCl 6M y para alcalinizar NaOH. Posteriormente se inoculó 1 colonia de BAL y se incubó (Labtech, LSI-3016A, Corea) a 37 °C por 48 h. Se utilizó un control negativo para cada una de las condiciones y se reportó la formación de sedimento si creció (+) o no creció (-).

6.4.2.2.3 Tolerancia de crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl

Procedimiento

Se elaboró mediante la técnica establecida por Ismail (109) con modificaciones. Se formuló caldo MRS a diferentes concentraciones de NaCl (5%, 6.5% y 10%), se inoculó una colonia de BAL y posteriormente se incubó (Labtech, LSI-3016A, Corea) a 37 °C por 48 h. Se reportó la formación de sedimento si creció (+) o no creció (-).

6.4.2.3 Pruebas bioquímicas

Permiten determinar características metabólicas de las bacterias, evalúan la presencia de una enzima, detectan componentes metabólicos o sensibilidad a un compuesto.

6.4.2.3.1 Catalasa

Principio

La enzima catalasa está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que tienen citocromo, las que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso liberando burbujas (110).

Procedimiento

Se utilizó la técnica establecida por Olmos, et al., (110). Se tomó una colonia de BAL y se colocó en un portaobjetos, posteriormente se agregó una gota de H_2O_2 al 3% y se observó la formación o ausencia de burbujas. Se reportó como un resultado positivo la formación de burbujas (+) y como negativo a la ausencia de ellas (-).

6.4.2.4 Identificación del género mediante Kit API

Principio

El sistema API 50 CHL es utilizado para la identificación del género *Lactobacillus* mediante la fermentación de 49 carbohidratos de la galería API 50 CH.

Procedimiento

El procedimiento se realizó de acuerdo a las fichas técnicas de los kit API. Se hizo una suspensión turbia de las colonias de BAL en agua destilada estéril, para posteriormente preparar una suspensión al patrón 2 de McFarland. Después se abrieron las ampolletas y se vertió el doble de cantidad necesaria para preparar la suspensión al patrón 2 de McFarland y se homogeneizó.

Para la preparación de las galerías, se dispersó aproximadamente 10 mL de agua destilada estéril en los pozos del fondo de las galerías para crear una atmósfera húmeda, posteriormente se colocaron las tiras de la galería y se comenzó a distribuir la ampolleta con el inóculo, evitando la formación de burbujas. Después se cubrió con aceite de parafina estéril y se colocó la tapa, se llevó a incubar (Labtech, LSI-3016A, Corea) a 37 °C por 24 y 48 h. Se registró como positivo a la fermentación del carbohidrato el cambio de color morado a amarillo en cada uno de los pocillos para su posterior identificación con las tablas que proporcionó el kit.

6.4.2.5 Mutualismo de las BAL

Principio

El mutualismo es la asociación obligada en donde dos o más microorganismos son beneficiados entre sí y el antagonismo está dado por la inhibición hacia otro microorganismo (113,114).

Procedimiento

Con la finalidad de obtener un buen mutualismo, se procedió a realizar combinaciones de las BAL (Tabla 4), posteriormente se seleccionaron las 5 mejores además de un control positivo, estas se utilizaron en la inoculación del jugo de zarzamora termoultrasonicado, las BAL fueron sembradas con el asa bacteriológica evitando combinarlas entre sí en placa con medio MRS, como se muestra en la figura 4. Posteriormente se llevaron a incubar (Labtech, LSI-3016A, Corea) a 37 °C por 24 horas y la selección se realizó por observación.

Tabla 4. Mutualismo de BAL

Mezcla	BAL 1	BAL 2	BAL 3
M1	*L. plantarum (Z1)*	*L. plantarum (A1)*	*P. acidilactici (A2)*
M2	*L. plantarum (Z1)*	*L. plantarum (A1)*	*L. collinoides (P1)*
M3	*P. acidilactici (Z2)*	*P. acidilactici (A2)*	*L. brevis (P2)*
M4	*L. plantarum (Z1)*	*P. acidilactici (A2)*	*L. collinoides (P1)*
M5	*L. plantarum (A1)*	*L. brevis (P2)*	*P. acidilactici (Z2)*
M6	*L. brevis (P2)*	*P. acidilactici (A2)*	*L. plantarum (A1)*
M7	*L. collinoides (P1)*	*L. plantarum (A1)*	*L. brevis (P2)*
M8	*L. collinoides (P1)*	*P. acidilactici (A2)*	*L. brevis (P2)*
M9	*L. collinoides (P1)*	*L. plantarum (A1)*	*P. acidilactici (A2)*
M10	*L. plantarum (Z1)*	*P. acidilactici (Z2)*	*L. brevis (P2)*
M11	*L. plantarum (Z1)*	*P. acidilactici (A2)*	*L. brevis (P2)*
M12	*L. collinoides (P1)*	*P. acidilactici (Z2)*	*P. acidilactici (A2)*
M13	*L. brevis (P2)*	*L. plantarum (A1)*	*L. collinoides (P1)*
M14	*L. brevis (P2)*	*L. plantarum (A1)*	*L. plantarum (Z1)*
M15	*L. brevis (P2)*	*L. plantarum (Z1)*	*L. collinoides (P1)*
M16	*P. acidilactici (Z2)*	*L. plantarum (A1)*	*L. collinoides (P1)*
M17	*L. plantarum (Z1)*	*P. acidilactici (Z2)*	*L. collinoides (P1)*
C+	*L. rhamnosus (C1)*	*L. casei (C2)*	-

L: *Lactobacillus*; P: *Pediococcus*; C+: Control positivo

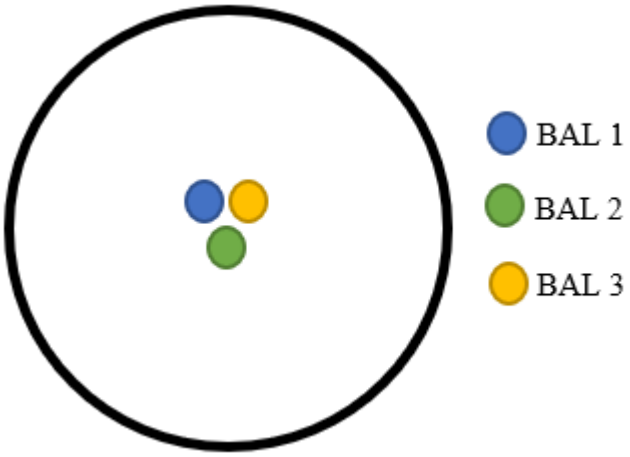

Figura 4. Esquema de mutualismo

6.4.2.6 Cinética de crecimiento

Principio

La cinética de crecimiento microbiano se encarga de entender el: crecimiento, supervivencia, muerte, adaptación, formación de productos, ciclos celulares e interacción con el ambiente. En los procesos fermentativos es de importancia ya que a partir de ella se determina el rendimiento de algunos productos (115).

Procedimiento

La técnica microbiológica se hizo mediante la técnica de microgota descrita por Strahsburger (116). Se procedió a tomar una colonia de cada cepa, se inoculó en 10 mL de caldo MRS estéril y se llevó a incubación a (Labtech, LSI-3016A, Corea) 37 °C por 24 h. Se tomaron alícuotas de 100 µL en diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 h), se hicieron diluciones decimales en agua peptona, y se sembraron en cajas petri con medio MRS y se llevaron a incubación en las condiciones antes mencionadas. Se realizó un conteo en placa y los resultados fueron expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (Log UFC/mL).

6.4.3 Metodologías de la etapa 2

6.4.3.1 Obtención del jugo de zarzamora

Las zarzamoras (*Rubus fruticosus*) se obtuvieron de forma local en Atotonilco el Grande, Hidalgo, México, en el mes de abril del 2020, posteriormente fueron lavadas a chorro de agua para eliminar hojas y tierra, después se sumergieron en agua potable con bactericida (microdyn) según las instrucciones del mismo, posteriormente se colocaron en un colador para eliminar el excedente de agua, se vaciaron en bolsas con cierre hermético y se congelaron a -32 °C, para su posterior uso.

Las zarzamoras descongeladas fueron trituradas con una licuadora convencional, después por medio de un colador se separó el jugo de las semillas y se centrifugó (Allegra 25™, Beckman Coulter, USA) a 10,000 rpm durante 20 minutos a 4 °C para clarificar. El jugo clarificado (sobrenadante) se termoultrasonicó (VCX-1500, Sonics and Materials Inc., Newtown, CT, USA) con las siguientes condiciones: 50 °C de salida por 17 minutos (73) y se comprobó su calidad microbiológica (mesófilos aerobios y enterobacterias). El jugo se llevó a congelación a -35 °C en recipientes estériles para su posterior inoculación con los cultivos de BAL

6.4.3.2 Microbiología

Principio

La microbiología tiene como principio determinar la calidad de un producto mediante diferentes técnicas como el recuento en placa, que permite determinar el número de unidades formadoras de colonia inoculadas en una cantidad conocida de alimento específico, posteriormente incubadas en condiciones específicas para promover su crecimiento (117).

Procedimiento

El análisis microbiológico se hizo mediante la técnica de microgota descrita por Strahsburger (116). Para el recuento de microorganismos mesófilos aerobios se usó agar para métodos estándar (PCA) con una incubación (Labtech, LSI-3016A, Corea) por 48 h a 30 °C. El recuento de enterobacterias (EB) fue con agar bilis rojo violeta glucosado (VRBG) con una incubación (Labtech, LSI-3016A, Corea) de 24 h a 37 °C y las BAL en agar MRS con una incubación a 30 °C durante 24 h. Se realizó un conteo en placa y los resultados fueron expresados como logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (Log UFC/mL).

6.4.3.3 Proceso de fermentación del jugo de zarzamora

Principio

La fermentación permite alargar la vida de anaquel debido a la producción de metabolitos (ácidos orgánicos, alcoholes, entre otros), se genera la transformación de materias primas en productos de mejor asimilación y producción de compuestos que mejoran el sabor, aroma y textura, con la finalidad de enriquecer el producto final (118).

Procedimiento

Cada cepa de BAL se incubó (Labtech, LSI-3016A, Corea) por 24 h a 37 °C previas de manera individual, el tiempo de incubación fue determinado de acuerdo a bibliografía (99,119,120). Posteriormente se centrifugó (10 min), eliminando el sobrenadante libre de BAL y se resuspendió en una dilución 1:10 en jugo de zarzamora termoultrasonicado. Las cantidades de caldo MRS con las BAL a centrifugar se determinaron mediante ensayos previos para conocer la densidad de UFC/mL a las 24 horas.

La inoculación inicial de las BAL en el jugo de zarzamora fue a una concentración inicial de 9 log UFC/mL en 10 mL, se utilizó un jugo sin inóculo como control negativo. Posteriormente, para la fermentación del jugo de zarzamora, se llevó a incubación a una temperatura de 37 °C (Labtech, LSI-3016A, Corea), y se tomaron alícuotas de 5 mL cada 2 h por 24 h para determinar las cinéticas de crecimiento de las BAL, pH, acidez titulable y sólidos solubles.

6.4.3.4 Propiedades físico-químicas

6.4.3.4.1 pH

Principio

El pH corresponde al logaritmo negativo (base 10) de la concentración de iones hidronio (H_3O+) presentes en la muestra, la escala de pH varía de 0 a 14 en una disolución acuosa, el potenciómetro es un sensor que utiliza el método electroquímico, se compone de dos electrodos conectados capaces de medir las variaciones de potencial de iones, a través de la membrana de vidrio sensible a los cambios de pH. Mide el potencial generado (milivoltios) por el electrodo sensor de +H, el cual se compara con el electrodo de referencia (cloruro de potasio) y finalmente la concentración del ion hidrógeno se determina por esta diferencia (121).

Procedimiento

Se utilizó un potenciómetro (Hanna Instruments, 210, Romania) previamente calibrado con soluciones buffer de pH 4.0 y 7.0 estandarizados (122). El pH se midió en las cinéticas de crecimiento en jugo como medida comprobatoria en cada una de las etapas de elaboración del jugo.

6.4.3.4.2 Acidez titulable

Principio

La acidez titulable es representada por los ácidos orgánicos libres y se mide con su neutralización a partir de una solución base. A partir de un indicador (fenolftaleína) el cual se adiciona a la muestra y mediante titulación con una solución base (NaOH) usada para neutralizar la sustancia, donde el punto final de la reacción lo indica la aparición de un color rosa pálido (123).

Procedimiento

Se determinó de acuerdo al método de la AOAC (122), utilizando una solución 0.1 N de NaOH, se midió cada 2 h durante la cinética de crecimiento de las BAL en la fermentación del jugo de zarzamora. Se basó en el número de mL de NaOH necesario para neutralizar el ácido láctico y se calculó con la siguiente fórmula:

Ecuación 1: $\%\ ácido\ lactico = V * N * P.eq\ /mL\ de\ muestra * 100$

Donde:

V= mL de NaOH gastados.

N= Normalidad del NaOH (0.1).

Peq= Peso equivalente del ácido láctico (0.09).

6.4.3.4.3 Viscosidad

Principio

La viscosidad es una propiedad que tienen los fluidos al ofrecer resistencia al movimiento y se basa en el principio de la viscosimetría rotacional, la cual se mide captando el par de torsión necesario para hacer girar a velocidad constante un husillo inmerso en la muestra (124).

Procedimiento

Para medir la viscosidad se utilizó el método empleado por Dak, Verma y Jaaffrey (125) con un viscosímetro (Broockfield DV3T, USA) con la aguja LV-1/N° 61 a 60 rpm. En tubos de centrífuga se vertieron 35 mL de jugo de zarzamora y la viscosidad se tomó en dos momentos de la fermentación, al inicio y final. Los valores fueron expresados en centipoises (cP).

6.4.3.4.4 Estabilidad física

Principio

El índice de estabilidad se valorará determinando el porcentaje de partículas sedimentadas (p/p) después de la centrifugación. Un valor alto de este parámetro indica una baja estabilidad como consecuencia de la sedimentación de las partículas (126).

Procedimiento

Se realizó mediante una centrifugación (Hamilton Bell, VanGuard V6500, USA) de 15 mL de muestra, a 3500 rpm por 20 min a temperatura ambiente, se desechó el sobrenadante y se pesó el precipitado. El porcentaje se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Ecuación 2: } \%p/p = (peso\ inicial - peso\ final) * 100$$

Donde:

%p/p: porcentaje de sólidos precipitados

Peso inicial: peso del tubo vacío (g)

Peso final: peso del tubo con residuo (g)

6.4.3.4.5 Índice de turbidez y oscurecimiento

Principio

La turbidez y oscurecimiento son parámetros de importancia en la calidad de los jugos, para que el producto tenga un buen posicionamiento y aceptación en el mercado, este se define como la reducción de la transparencia de un líquido causada por la presencia de partículas o disueltas en el líquido, y está fundamentado cuando el haz de luz atraviesa el fluido sobre los sólidos suspendidos que dispersan la luz en ondas y su reducción indica mayor contenido de sólidos suspendidos (127).

Procedimiento de índice de turbidez

Se centrifugaron (Hamilton Bell, VanGuard V6500, USA) 5 mL de muestra a 3,400 rpm durante 10 min. Posteriormente se leyó la absorbancia del sobrenadante obtenido a 660 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA), utilizando agua desionizada como blanco; de acuerdo con al método establecido por Versteeg (128). Los resultados se expresaron con el valor de la absorbancia el cual se considera como índice de turbidez.

Procedimiento de índice de oscurecimiento

El índice de oscurecimiento se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Meydav (129), la cual consistió en centrifugar (Hamilton Bell, VanGuard V6500, USA) 15 mL de muestra durante 10 min a 3,400 rpm. Posteriormente, en un tubo se agregó 5 mL de sobrenadante y 5 mL de etanol (95%), después se centrifugó en las mismas condiciones. La absorbancia del sobrenadante fue medida a 420 nm en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Los resultados se expresaron con el valor de la absorbancia, la cual es considerada como índice de oscurecimiento.

6.4.4 Metodologías de la etapa 3

6.4.4.1 Antioxidantes

6.4.4.1.1 Contenido de fenoles totales

Principio

El reactivo Folin Ciocalteu, este es reducido a óxidos azules de tungsteno y molibdeno durante la oxidación fenólica, la coloración azul refleja la cantidad total de polifenoles.

Procedimiento

Se realizó según el método establecido por Stintzing (130) iniciando con la preparación de las soluciones necesarias, comenzado por el Folin-Ciocalteu (10 mL en 90 mL de agua destilada), carbonato de sodio (7.5 mg en 100 mL de agua destilada) y ácido gálico (15 mg en 50 mL de agua destilada).

Se hizo una curva estándar de ácido gálico en diferentes concentraciones (0, 100, 200 y 300 mg/L), se leyó en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) a una longitud de onda de 765 nm, utilizando como blanco agua destilada. Se analizó el contenido de fenoles totales al inicio y final de la fermentación en dilución con agua (1:50), a 100 uL de la

dilución se adicionaron 500 µL de folin y 400 µL de carbonato de sodio y se dejó reposar 30 min, posteriormente se realizó la lectura.

Los resultados se expresaron como miligramos equivalentes de ácido gálico por 100 mililitros de muestra (mg EAG/100 mL).

6.4.4.1.2 Antocianinas

Principio

El Cyanidin-3-glucósido es un tipo de antocianina que se encuentra predominantemente en la naturaleza y es utilizado como estándar en el cálculo de antocianinas.

Procedimiento

Se utilizó la metodología descrita por Wallace y Giusti (131), consiste en la elaboración de dos buffers de cloruro de potasio a 0.025 M en un pH de 1 (0.466 g en 250 mL de agua destilada) y acetato de sodio a 0.4 M a un pH 4.5 (8.203 g en 250 mL de agua destilada), los pH se ajustaron con HCl al 6M.

En el siguiente orden en tubos de centrífuga, se agregó 4.5 mL de cloruro de potasio o acetato de sodio, más 0.5 mL de jugo de zarzamora del inicio y final de la fermentación. Se mantuvo 15 min a temperatura ambiente y en completa oscuridad, después se realizó la lectura en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) a longitudes de onda de 510 y 700 nm utilizando como blanco el buffer según corresponda. Los resultados se expresaron como miligramos de Cyanidin-3-glucósido por 100 mililitros de muestra (mg Cy-3-Gl/100 mL).

6.4.4.2 Actividad antioxidante

6.4.4.2.1 Actividad antioxidante por ABTS•+

Principio

El ABTS•+ es un radical de color azul-verde, cuando este catión es reducido por un antioxidante presenta una pérdida de color, este radical reacciona con compuestos hidrófilos y lipófilos (125).

Procedimiento

La determinación se realizó de acuerdo a Kuskoski (132), mediante la elaboración previa de la solución de ABTS•+ a 7 mM (76.8 mg de ABTS•+ en 20 mL de agua destilada + 6.6 mg en 10 mL de agua destilada), se dejó reposar por 16 h. Se hicieron diluciones (1:15, 1:20 y 1:10) y posterior lectura a 754 nm del ABTS•+ para obtener una absorbancia de 0.7±0.1. Se elaboró una curva

estándar en concentraciones 0, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 µmol/l con una solución de ácido ascórbico (3 mg en 10 mL de agua destilada). La lectura se hizo en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) a una longitud de onda de 754 nm utilizando como blanco agua destilada. Se midió la actividad antioxidante por ABTS•+ en el jugo de zarzamora al inicio y final de la fermentación en dilución con agua (1:10), se tomaron 20 µl y adicionó 980 µl del radical dejando reposar por 7 min, después se tomó la lectura. El resultado se expresó como miligramos equivalentes de ácido ascórbico por 100 mililitros de muestra (mg EAA/100 mL).

6.4.4.2.2 Actividad antioxidante por DPPH•+

Principio

El radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil conocido como DPPH•+, es un método caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante, esta técnica principalmente reacciona con antioxidantes liposolubles del fruto. El reactivo DPPH•+ en solución etanólica tiene una coloración violeta y después de su reducción presenta una decoloración que puede terminar en un color amarillo (133).

Procedimiento

Se realizó según la metodología reportada por Morales y Jiménez-Pérez (134). Se formularon las soluciones de DPPH•+ (7.4 mg en 100 mL de etanol) y trolox (3.75 mg en 50 mL de etanol), posteriormente se elaboró una curva estándar con trolox a concentraciones de 0, 50, 100, 200 y 300 µmol ET/L y se hizo la lectura en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) a una longitud de onda de 520 nm. Las muestras a analizar fueron el jugo de zarzamora al inicio y final de la fermentación en dilución con agua (1:50), se tomaron 100 µl más 500 µl de DPPH•+ y se dejó reposar por 60 min, después se tomó la lectura. La actividad antioxidante se expresó en micromoles equivalentes de trolox en 100 mililitros de muestra (µmol ET/100 mL).

6.4.4.2.3 Actividad antioxidantes por FRAP

Principio

El poder antioxidante de reducción férrica (FRAP) mide la habilidad de un compuesto antioxidante para reducir el ion férrico (ferric 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine [Fe (III)-(TPTZ)2]3) a complejo ferroso [Fe (III)-(TPTZ)2]2) a un pH de 3.6, desarrollando un color azul intenso (135).

Procedimiento

Se realizó mediante la metodología descrita por Thaipong (136). Se inició con la preparación de las soluciones FRAP en concentración 10:1:1 con 100 mL de amortiguador (0.3 M a pH 3.6), 10 mL de TPTZ (10 mM en HCl) y 10 mL de FeCl3 (20 mM en agua destilada). Se elaboró una curva estándar de sulfato ferroso con las siguientes concentraciones de Fe (II): 0, 20, 30, 40 y 50 µM Fe (II)/L. La absorbancia se midió en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) a una longitud de onda 593 nm.

Se midió la actividad antioxidante del jugo de zarzamora al inicio y final de la fermentación a una dilución con agua (1:15), se tomó 30 ul de la dilución agregando, 90 uL de agua y 900 uL de FRAP en ese orden, después se realizó la lectura. La actividad antioxidante se expresó en milimoles de Fe (II) equivalentes en 100 mililitros de muestra (mM E Fe (II) /100 mL).

6.4.4.2.4 Actividad quelante

Principio

Característica que se determina a partir de la medición de la capacidad para generar complejos químicos ante un agente quelante, los cuales suelen ser sustancias con la posibilidad de enlazar iones metálicos polivalentes, con lo que se genera una pérdida de la actividad biológica de los compuestos (137).

Procedimiento

Se realizó mediante el método descrito por Gülcin (137), el procedimiento se basó en la preparación de una solución quelante, utilizando como agente de referencia el EDTA a 0.1 M y muestras control con agua desionizada. Se midió la actividad quelante del jugo de zarzamora al inicio y final de la fermentación, se colocaron 100 µL, 50 µL de una solución de cloruro férrico y 450 µL de ferrozina, reposando 10 min se midió la absorbancia en un lector de microplacas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) a una longitud de onda 520 nm. Los resultados fueron expresados en porcentaje, calculado mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 3: %Actividad quelante= ((A0-A1)/A0)*100

Donde:

A0= absorbancia de la muestra control

A1= absorbancia de la muestra

6.4.5 Análisis estadístico

Se realizaron 3 lotes y las determinaciones se hicieron por triplicado (n=9). Los valores de las variables (pH, acidez titulable, viscosidad, estabilidad, análisis microbiológico, antioxidantes y actividad antioxidante) de las muestras se compararon y se estudiaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía con el paquete estadístico SPSS versión 12.0.1, para Windows (SPSS Inc. Chicago, llinois) y se aplicó el test de Tukey con un nivel de significancia de $p<0.05$ para identificar las diferencias significativas entre las variables, además se determinó una *T-student* para comparar el inicio y final de fermentación de cada muestra.

VII RESULTADOS

7.1 Confirmación de pureza de las cepas: etapa 1

Las características microscópicas de las cepas se observan en la Figura 2, las cuales consistieron en cocos (Z2 y A2), bacilos largos (Z1, C1 y la C2) y bacilos cortos (A1, P1 y P2), estas características son de acuerdo a lo esperado.

En la tabla 5, se muestran los resultados de tinción Gram, motilidad, pruebas bioquímicas (catalasa) y fisiológicas mediante tolerancias a diferentes medios (temperatura, pH y NaCl), de las cepas seleccionadas Z1, Z2, A1, A2, P1, P2, C1 y C2. De acuerdo a las pruebas las 8 cepas fueron Gram positivo y sin motilidad y catalasa negativa.

Las cepas fueron cultivadas a diferentes temperaturas, los resultados mostraron que la mayoría de las cepas fueron capaces de crecer en todas las condiciones del tratamiento térmico, a excepción de la cepa Z1 la cual no creció a 15 °C, al igual que las cepas A1 y P2 las cuales no crecieron a 50 °C.

Al evaluar la resistencia de crecimiento de todas las cepas en medios ácidos y básicos, las cepas A1, P1, P2, C1 y C2, crecieron en todos los medios, mientras que las cepas Z1, Z2 y A2 no fueron capaces de crecer a un pH de 3.5.

Por último, la tolerancia de crecimiento en medios con diferentes concentraciones de NaCl, se observó que todas las cepas crecieron al 5 % de NaCl, mientras que a partir de la concentración de 6.5 % la cepa Z1 no mostró crecimiento, y al 10 % de NaCl se inhibió el crecimiento de todas las cepas con excepción de las A2 y C1.

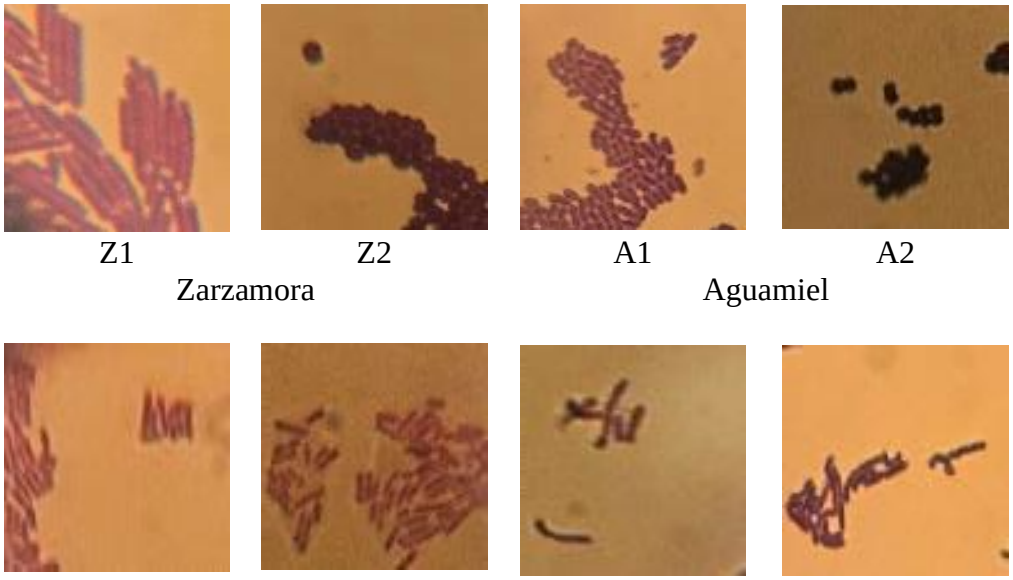

Figura 5. Características morfológicas de las cepas (100 X)

Tabla 5. Pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de cepas aisladas de zarzamora, aguamiel y pulque.

Prueba	Cepas							
	Zarzamora		Aguamiel		Pulque		Controles +	
	Z1	Z2	A1	A2	P1	P2	C1	C2
Tinción Gram	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Catalasa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Motilidad	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Temperatura °C								
15	-	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	-	+	+	-	+	+
pH								
3.5	-	-	+	-	+	+	+	+
4.5	+	+	+	+	+	+	+	+
5.5	+	+	+	+	+	+	+	+
8.5	+	+	+	+	+	+	+	+
9.6	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl %								
5	+	+	+	+	+	+	+	+
6.5	-	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	+	-	-	+	-

(+): positivo; (-): negativo; +: creció; -: no creció

7.1.1 Identificación bioquímica

La identificación bioquímica se realizó de acuerdo a la tabla de identificación de BAL (Figura 14, Anexos) de la ficha técnica, indicando que las cepas Z1 y A1 aisladas de zarzamora y aguamiel, respectivamente, fueron identificadas como *L. plantarum*, las cepas Z2 y A2 como *P. acidilactici*, la *P1* como *L. collinoides*, la cepa P2 como *L. brevis*, la C1 se identificó como *L. rhamnosus* y la cepa C2 como *L. casei* (Tabla 6).

Tabla 6. Identificación bioquímica de las BAL por los Kits API

Carbohidrato	Cepas							
	Zarzamora		Aguamiel		Pulque		Controles +	
	Z1	Z2	A1	A2	P1	P2	C1	C2
Testigo	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	+	-	-	-	-	-
Eritrol	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinosa	-	-	-	-	-	-	+	-
L-arabinosa	+	+	-	+	-	+	-	-
D-ribosa	+	+	+	+	+	+	-	+
D-xilosa	-	+	-	+	+	+	-	-
L-xilosa	-	-	-	-	-	-	-	-
D-adanitol	-	-	-	-	-	-	-	+
Metil-βd-xilopiranosida	-	-	-	-	-	-	-	-
D-galactosa	+	+	+	+	-	-	+	+
D-glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+
D-fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mamnosa	+	+	+	+	-	-	+	+
L-sorbosa	-	-	+	-	-	-	-	+
L-rhamnosa	-	-	+	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	+	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	+	-
D-manitol	+	-	+	-	-	-	+	+
D-sorbitol	-	-	+	-	-	-	+	+
Metil-αD-manopiranosida	-	-	+	-	-	-	-	-
Metil-αD-glucopiranosida	-	-	+	-	-	-	-	-
N-acetilglucosamina	+	+	+	+	+	+	+	+
Amigdalina	-	-	+	-	-	-	+	
Arbutina	+	-	+	-	-	-	+	+
Esculina citrato férrico	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	-	+	-	-	-	+	+
D-celobiosa	+	+	+	+	-	-	+	+
D-maltosa	+	+	+	+	+	+	-	+
D-lactosa (origen bovino)	+	-	+	-	-	-	-	+
D-melibiosa	+	-	+	-	-	+	-	-
D-sacarosa	+	-	+	-	-	-	-	-
D-trehalosa	+	-	+	-	-	-	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-

D-melezitosa	-	-	+	-	-	-	+	-
D-rafinosa	+	-	+	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicógeno	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiosa	+	+	+	+	-	-	+	+
D-turanosa	+	-	+	-	-	-	-	+
D-lixosa	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatosa	-	+	-	+	-	-	+	+
D-fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fucosa	-	-	-	-	-	-	+	-
D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato potásico	-	+	+	+	+	+	+	+
2-Cetogluconato potásico	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Cetogluconato potásico	-	-	-	-	+	+	-	-
Identificación	*Lactobacillus plantarum*	*Pedicocus acidilactici*	*Lactobacillus plantarum*	*Pedicoccus acidilactici*	*Lactobacillus collinoides*	*Lactobacillus brevis*	*Lactobacillus rhamnosus*	*Lactobacillus casei*

7.1.2 Mutualismo

En el ensayo de mutualismo, se hicieron diferentes combinaciones de 3 BAL distintas. Se realizaron 17 diferentes mezclas de las cepas estudiadas y una combinación de los controles positivo (C1 y C2) (Tabla 4).

La selección de las mezclas con mutualismo positivo (+/+) se hizo por observación de las placas de cultivo después de 24 horas de incubación. Se consideró que no hubo asociación entre las BAL cuando el crecimiento no fue homogéneo, como fue el caso de la mezcla M17 (Figura 7), donde una de las cepas utilizadas mostró una restricción en su crecimiento, por lo que esta mezcla fue descartada ya que no había una relación positiva entre las tres cepas.

De las distintas combinaciones, las características que se tomaron en cuenta para la selección es que no existiera inhibición en al menos una de las cepas y que el crecimiento fuera homogéneo. En la figura 6, se observan las mezclas M1, M6, M7, M11, M14 y C+, las cuales presentaron mejores características en mutualismo. En las combinaciones se aprecia un crecimiento homogéneo sin inhibición con un crecimiento similar entre cada cepa, por lo cual las mezclas M1, M6, M7, M11, M14 y C+ fueron las que se utilizaron para los ensayos posteriores.

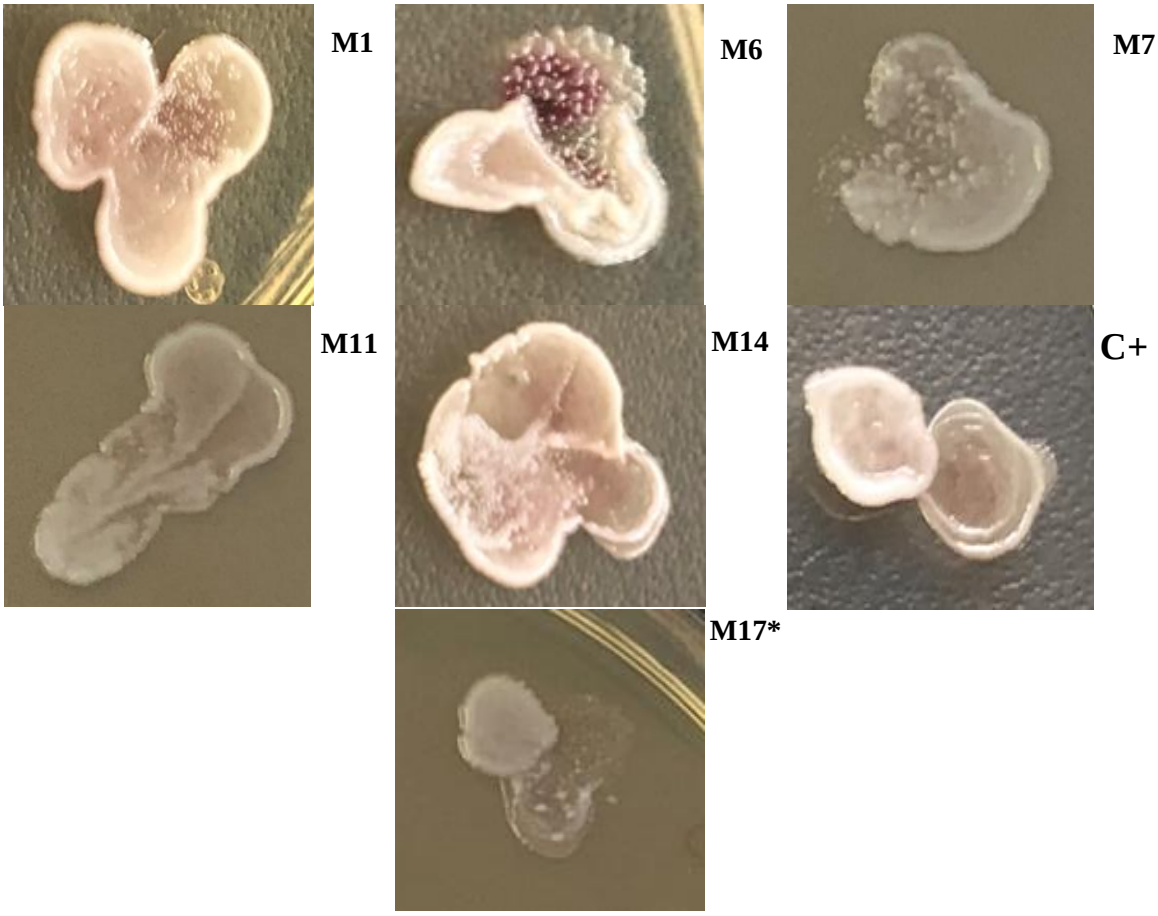

Figura 6. Mutualismo de las mezclas de BAL seleccionadas para la inoculación. M1: mezcla de *L. plantarum, L. plantarum* y *P. acidilactici*; M6: mezcla de *L. brevis, P. acidilactici* y *L. plantarum*; M7: mezcla de *L. collinoides, L. plantarum* y *L. brevis*; M11: mezcla de *L. plantarum, P. acidilactici* y *L. brevis*; M14: mezcla de *L. brevis, L. plantarum* y *L. plantarum.* Las combinaciones indican mutualismo positivo al no observar inibición de alguna de las tres cepas. *Mutualismo negativo: se aprecia una franja de inhibición de crecimiento.

7.1.3 Confirmación de presencia estructural por tinción Gram

Después de un crecimiento de 24 horas en caldo MRS de las mezclas seleccionadas (M1, M6, M7, M11, M14 y C+), se realizó la tinción Gram como método confirmatorio de la presencia de las BAL inoculadas en cada mezcla (Figura 8). En todas las mezclas, se ubica la estructura que concuerda a los bacilos largos y cortos, además de cocos de cada una de las BAL.

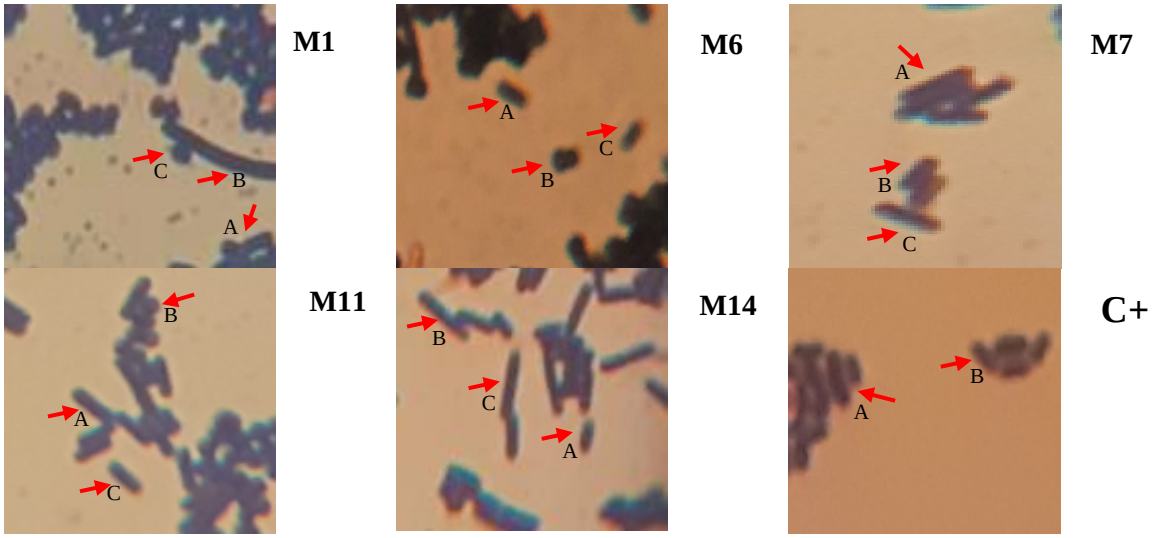

Figura 7. Tinción Gram de las combinaciones de BAL seleccionadas para la inoculación. M1: mezcla de *L. plantarum, L. plantarum* y *P. acidilactici*; M6: mezcla de *L. brevis, P. acidilactici* y *L. plantarum*; M7: mezcla de *L. collinoides, L. plantarum* y *L. brevis*; M11: mezcla de *L. plantarum, P. acidilactici* y *L. brevis*; M14: mezcla de *L. brevis, L. plantarum* y *L. plantarum*. (100 x); las flechas señalan la cepa según corresponda, A: cepa 1; B: cepa 2; C: cepa 3.

7.1.4 Cinética de crecimiento

Medir el crecimiento bacteriano, es una técnica fundamental en microbiología ya que permite valorar sus aplicaciones y tener métodos de control sobre su crecimiento (138). En la figura 8, se observa el crecimiento en caldo MRS de las mezclas de BAL que fueron seleccionadas (M1, M6, M7, M11, M14 y C+). En las primeras dos horas las mezclas de las BAL estuvieron en periodo de adaptación, posteriormente a la hora 8 se vio el máximo crecimiento en las mezclas M6, M7, M11 y M14, mientras que la mezcla M1 fue hasta la hora 10. Después, permanecieron en fase estacionaria hasta terminar el periodo de incubación (24 h). La mezcla C + tuvo un comportamiento diferente en comparación con las demás ya que durante las horas 10 y 12 tuvo un crecimiento estacionario, seguido del exponencial hasta la hora 24 (Figura 9).

Los valores de la cinética de crecimiento de las mezclas de las BAL se ubican en la Tabla 10 (Anexos). Al inicio del crecimiento, se reportaron recuentos de 6.64 UFC Log/mL en promedio, comparando las combinaciones, la mezcla de C+ fue la que obtuvo el menor recuento (6.28±0.07 UFC Log/mL) y la M11 fue significativamente mayor (6.90±0.05 UFC Log/mL). En adaptación (2 h), las mezclas con mayores valores significativamente fueron las M1, M6, M11 y M14 con un recuento en promedio de 6.68 UFC Log/mL, las combinaciones M7 y C+ tuvieron los valores

menores con 6.42±0.02 y 6.35±0.07 UFC Log/mL, respectivamente. Posteriormente a las 8 horas, las mezclas permanecieron en crecimiento exponencial donde la M6 y M14 tuvieron los recuentos más altos con 9.16±0.15 y 9.12±0.01 UFC Log/mL, respectivamente y el C+ fue el de menor cantidad con 7.71±0.05 UFC Log/mL. Finalmente, a las 24 h los recuentos de todas las mezclas alcanzaron la UMT, de las cuales el C+ fue mayor significativamente (12.56±0.02 UFC Log/mL) en comparación con las demás mezclas.

Al comparar cada muestra durante las horas de la cinética de crecimiento, la M14 alcanzó su máximo recuento significativamente a las 8 h, manteniéndose así sin observarse cambios en las horas subsecuentes, mientras que en las muestras M7 y M11 fue a la hora 10, en las mezclas M6 se apreció hasta la hora 12, y la M1 y C+ hasta las 24 horas. Considerando el valor mínimo (7 UFC Log/mL) de la UMT que representa un beneficio a la salud (Neffe-Skocińska, 2018), en las muestras M6, M7, M11 y M14 se alcanzó a la hora 4, mientras que en la M1 fue a la hora 6 y el C+ fue hasta las 8 horas.

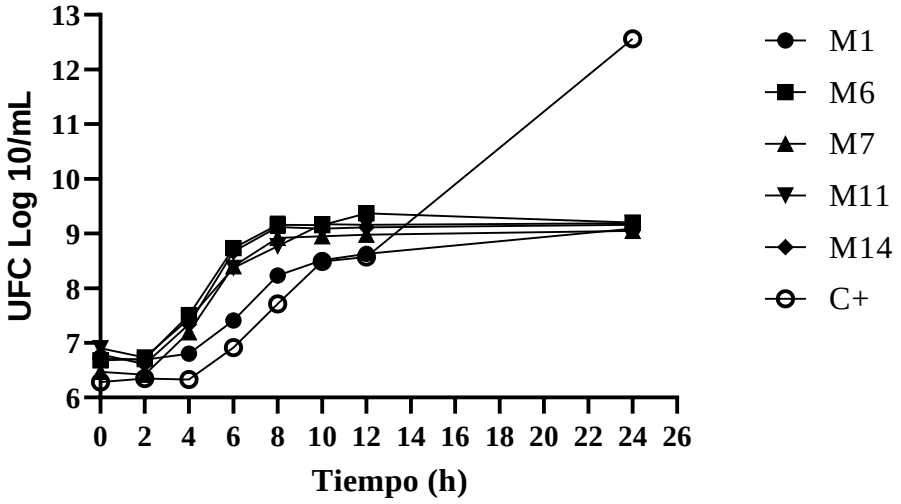

Figura 8. Cinética de crecimiento de diferentes combinaciones de BAL en caldo MRS**.** M1: Mezcla 1; M6: Mezcla 6; M7: Mezcla 7; M11: Mezcla 11; M14: Mezcla 14; C+: Control positivo; UFC: Unidades Formadoras de Colonias. n=3.

7.1.5 Cálculo del inóculo para el inicio de fermentación del jugo de zarzamora termoultrasonicado

La inoculación de las mezclas en el jugo de zarzamora se realizó de acuerdo a el máximo valor de la UMT (9 UFC Log/mL), en concentraciones iguales para cada una de las BAL, por lo cual se

determinó el crecimiento por 24 h (Tabla 7). *L. plantarum* de zarzamora fue menor significativamente con 7.24 UFC Log/mL, mientras que *L. plantarum* de aguamiel, *L. rhamnosus* y *L. casei* alcanzaron un valor de 9.5 UFC Log/mL, lo cual fue significativamente mayor en comparación con las demás BAL.

A partir de estos resultados se hizo el cálculo de inóculo necesario por cada BAL (Tabla 8), el cual debe ser de 3 UFC Log/mL con la finalidad de que entre las 3 cepas cubrieran el valor máximo (9 UFC Log/mL) de la UMT, y fue inoculado de acuerdo al método establecido.

Tabla 7. Recuento de BAL a las 24 horas incubación en caldo MRS

BAL	Zarzamora	Aguamiel		Pulque	C+	
	L. plantarum	*L. plantarum*	*P. acidilactici*	*L. brevis*	*L. rhamnosus*	*L. casei*
UFC Log/mL	7.24 ± 0.09^{c}	9.55 ± 0.09^{a}	9.17 ± 0.08^{b}	9.31 ± 0.03^{b}	9.56 ± 0.02^{a}	9.55 ± 0.12^{a}

C+: Control positivo; UFC: Unidades Formadoras de Colonias; BAL: Bacterias Ácido Lácticas; $^{a-c}$ Diferentes letras indican diferencia significativa ($p<0.05$) entre las muestras.

Tabla 8. Inóculo necesario (mL) de cada BAL* para cubrir la unidad mínima terapéutica para la inoculación en el jugo termoultrasonicado (10 mL)

Mezcla/BAL	Zarzamora	Aguamiel		Pulque	C+	
	L. plantarum	*L. plantarum*	*P. acidilactici*	*L. brevis*	*L. rhamnosus*	*L. casei*
M1	0.414	0.314	0.327	-	-	-
M6	-	0.314	0.327	0.326	-	-
M7	0.414	0.314	-	0.326	-	-
M11	0.414	-	0.327	0.326	-	-
M14	0.414	0.314	-	0.326	-	-
C+	-	-	-	-	0.471	0.471

M1: Mezcla 1; M6: Mezcla 6; M7: Mezcla 7; M11: Mezcla 11; M14: Mezcla 14; C+: Control positivo; - ausencia de inoculo; cada inóculo en mL de cada BAL corresponde a 3 UFC Log.

7.2 Evaluación fisicoquímica durante la fermentación del jugo de zarzamora: Etapa 2

7.2.1 Cinética de crecimiento durante la fermentación del jugo

El tratamiento de termoultrasonido permitió obtener un jugo de zarzamora inocuo, sin crecimiento de mesófilos aerobios y enterobacterias (datos no mostrados), para inocular las mezclas de BAL seleccionadas de acuerdo con la Tabla 11 y dar inicio a la fermentación. Se evaluó la cinética de crecimiento por 24 horas, la cual fue de manera irregular, pero se mantuvo lineal, los recuentos en

promedio al inicio y al final de la fermentación fueron de 8.17 y 8.34 UFC Log/mL, respectivamente (Figura 10).

Al comparar el recuento de las mezclas de las BAL durante sus horas de la cinética de crecimiento, no se mostró diferencia significativa entre las horas de las mezclas M1, M7, M11 y M14. En la muestra M6 se observó un mayor recuento (p<0.05) a las 24 horas con respecto a las horas anteriores y la mezcla C+ se tuvo disminuciones significativas en las horas 4, 8, 12 y 24.

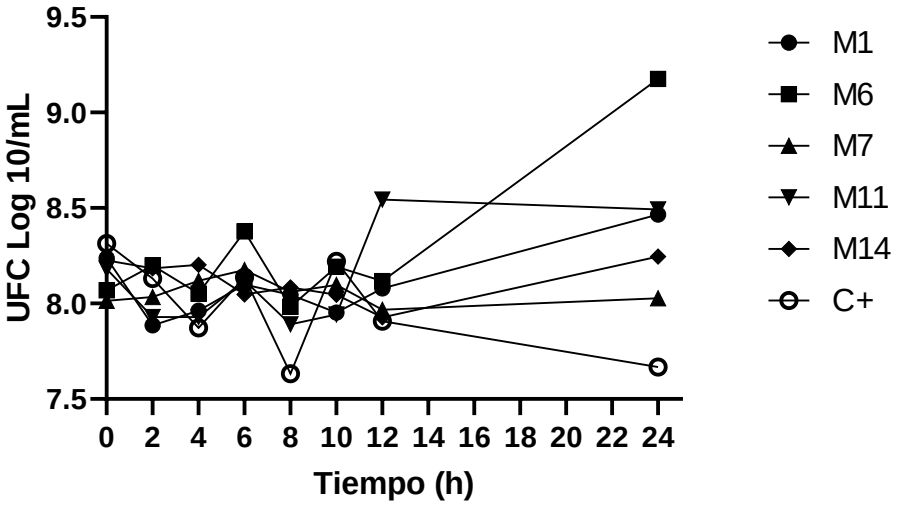

Figura 9. Cinética de crecimiento de diferentes combinaciones de BAL en jugo de zarzamora termoultrasonicado**.** M1: Mezcla 1; M6: Mezcla 6; M7: Mezcla 7; M11: Mezcla 11; M14: Mezcla 14; C+: Control positivo; UFC: Unidades Formadoras de Colonias. n= 3

7.2.2 Cambios de pH, acidez y sólidos solubles totales durante la fermentación del jugo de zarzamora

Durante el proceso fermentativo de 24 horas, se midieron los cambios del pH, porcentaje de ácido láctico y sólidos solubles totales de las 5 diferentes mezclas, así como el C+ y el C- (muestra sin inóculo). Los valores promedio al inicio y al final de pH fueron de entre 3.34-3.45, el porcentaje de ácido láctico permaneció entre 1.19%- 1.21% y de sólidos solubles totales entre 10.61-10.70 ° Brix (Tabla 9).

Al realizar la comparación de las muestras en cada hora, en las horas 0 y 6 no se observaron diferencias significativas entre las muestras. La mezcla M1 fue mayor p<0.05, en la hora 2 en comparación con las demás, así como en la hora 4 con las muestras M6, M7, M14 y C + y en la hora 10 con la M6. Al finalizar la fermentación el C- fue menor significativamente en comparación

con las mezclas M6 y M14. Al comparar cada muestra a través de sus horas de fermentación se analizó un aumento gradual de pH, los valores más altos se presentaron en las últimas horas, como en las muestras M11 y M14 al final de la fermentación, la M1 en las horas 2 y 24, en la M7 a las 12 y 24 horas, mientras que los controles fueron a las 10 horas.

En lo que respecta a el porcentaje de ácido láctico entre las mezclas y entre cada hora, en las horas 6 y 10 no hubo cambios significativos, mientras que el C- obtuvo los mayores valores ($p<0.05$) en la hora 4 con respecto a la M6 y así como con las mezclas M1, M6, M7 y M14 en la hora 12. Al finalizar la fermentación, los valores más altos significativamente fueron de la muestra C+, en comparación con las demás. A través de las horas de fermentación, en cada una de las mezclas se observó variación, en donde los más altos porcentajes de ácido láctico se obtuvieron a las 12 horas en todas las mezclas, a excepción de la mezcla M7 la cual mantuvo sus valores ($p>0.05$) durante todo el proceso fermentativo, así como también la M6 excepto por la hora 2.

Al comparar los sólidos solubles totales en las diferentes mezclas por cada hora, solamente se apreciaron diferencias significativas en las horas 0 y 4. El C- y el M6 fueron mayores con respecto a la M1, M14 y C+ en la hora 0, mientras que en la hora 4, fueron las muestras M1 y M14 en comparación con la M6 y la M7. En relación a las muestras durante sus horas de fermentación, se apreció que la mezcla M1, M14, C+ y C- presentaron valores similares ($p>0.05$) en las diferentes horas, a excepción de la M1 en la hora cero que mostró el menor.

Tabla 9. Cambios durante la fermentación de pH, % ácido láctico y sólidos solubles totales.

Prueba	Jugo	Tiempo (h)							
		0	2	4	6	8	10	12	24
pH	M1	3.33±0.04^{aB}	3.34±0.00^{aA}	3.42±0.02^{aAB}	3.39±0.05^{aAB}	3.41±0.01^{abAB}	3.37±0.02^{bAB}	3.40±0.02^{bcAB}	3.45±0.04^{abcA}
	M6	3.31±0.02^{aB}	3.31±0.02^{bB}	3.30±0.01^{cB}	3.31±0.02^{aB}	3.43±0.02^{abAB}	3.54±0.13^{aA}	3.45±0.03^{abAB}	3.52±0.07^{abA}
	M7	3.40±0.11^{aAB}	3.34±0.01^{bB}	3.32±0.02^{bcB}	3.43±0.04^{aAB}	3.45±0.02^{aAB}	3.43±0.01^{abAB}	3.50±0.03^{aA}	3.50±0.07^{abcA}
	M11	3.35±0.02^{aBC}	3.31±0.03^{bC}	3.37±0.02^{abABC}	3.41±0.06^{aABC}	3.41±0.01^{abABC}	3.43±0.04^{abAB}	3.41±0.02^{bcABC}	3.46±0.04^{abcA}
	M14	3.34±0.03^{aBC}	3.32±0.03^{bC}	3.33±0.01^{bcC}	3.34±0.01^{aC}	3.44±0.04^{aBC}	3.47±0.00^{abAB}	3.44±0.02^{abBC}	3.59±0.11^{aA}
	C+	3.35±0.02^{aB}	3.32±0.03^{bB}	3.33±0.01^{bcB}	3.37±0.02^{aAB}	3.31±0.03^{cB}	3.44±0.03^{abA}	3.37±0.03^{bcAB}	3.37±0.02^{bcAB}
	C-	3.36±0.00^{aAB}	3.34±0.00^{bAB}	3.35±0.04^{abcAB}	3.34±0.03^{aB}	3.36±0.01^{bcAB}	3.43±0.02^{abA}	3.35±0.04^{cAB}	3.32±0.04^{cB}
% Ácido láctico	M1	0.97±0.00^{bD}	1.13±0.00^{bC}	1.27±0.04^{abAB}	1.19±0.04^{aBC}	1.16±0.04^{bBC}	1.22±0.08^{aABC}	1.32±0.04^{bcA}	1.13±0.00^{bC}
	M6	1.27±0.04^{aA}	1.11±0.04^{bB}	1.16±0.04^{bAB}	1.16±0.04^{aAB}	1.16±0.04^{bAB}	1.24±0.09^{aAB}	1.24±0.04^{cdAB}	1.13±0.00^{bAB}
	M7	1.27±0.12^{aA}	1.20±0.02^{abA}	1.22±0.00^{abA}	1.24±0.09^{aA}	1.16±0.04^{bA}	1.27±0.12^{aA}	1.22±0.00^{dA}	1.16±0.04^{bA}
	M11	1.19±0.09^{aB}	1.16±0.04^{bB}	1.27±0.04^{abAB}	1.24±0.04^{aAB}	1.24±0.04^{abAB}	1.32±0.09^{aAB}	1.38±0.00^{abA}	1.24±0.04^{bAB}
	M14	1.30±0.08^{aA}	1.11±0.04^{bC}	1.22±0.00^{abABC}	1.22±0.00^{aABC}	1.24±0.04^{abAB}	1.32±0.04^{aA}	1.32±0.04^{bcA}	1.13±0.00^{bBC}
	C+	1.11±0.04^{abB}	1.27±0.04^{aAB}	1.24±0.04^{abAB}	1.27±0.04^{aAB}	1.35±0.04^{aA}	1.35±0.04^{aA}	1.38±0.00^{abA}	1.27±0.12^{bAB}
	C-	1.22±0.08^{aD}	1.30±0.00^{aBCD}	1.32±0.04^{aABCD}	1.24±0.09^{aBC}	1.35±0.04^{aABCD}	1.38±0.00^{aABC}	1.46±0.00^{aA}	1.43±0.04^{aAB}
Sólidos solubles totales °Brix	M1	9.40±0.17^{dB}	10.97±0.05^{aA}	11.00±0.00^{aA}	10.73±0.20^{aA}	10.83±0.28^{aA}	10.83±0.28^{aA}	11.00±0.00^{aA}	10.87±0.05^{aA}
	M6	10.97±0.05^{aA}	10.17±0.28^{aB}	10.07±0.11^{bcB}	10.40±0.17^{aAB}	10.73±0.11^{aAB}	10.40±0.17^{aAB}	10.43±0.40^{aAB}	10.67±0.40^{aAB}
	M7	10.83±0.05^{abAB}	10.43±0.40^{aBC}	10.00±0.00^{cC}	10.40±0.17^{aBC}	10.10±0.10^{aC}	10.60±0.17^{aAB}	10.93±0.11^{aA}	11.00±0.00^{aA}
	M11	10.90±0.10^{abA}	10.17±0.28^{aC}	10.87±0.05^{abA}	10.03±0.05^{aC}	10.23±0.25^{aBC}	10.73±0.20^{aAB}	10.23±0.25^{aBC}	11.00±0.00^{aA}
	M14	10.60±0.17^{bcA}	10.50±0.30^{aA}	10.93±0.11^{aA}	10.27±0.46^{aA}	10.70±0.17^{aA}	10.40±0.17^{aA}	10.37±0.47^{aA}	10.37±0.23^{aA}
	C+	10.50±0.00^{cA}	10.97±0.05^{aA}	10.27±0.40^{abcA}	10.67±0.57^{aA}	10.60±0.17^{aA}	10.60±0.17^{aA}	10.83±0.28^{aA}	10.03±0.68^{aA}
	C-	11.07±0.11^{aA}	10.53±0.57^{aA}	10.40±0.69^{abcA}	10.97±0.40^{aA}	10.73±0.69^{aA}	10.73±0.40^{aA}	10.93±0.37^{aA}	11.00±0.43^{aA}

M1: Mezcla 1; M6: Mezcla 6; M7: Mezcla 7; M11: Mezcla 11; M14: Mezcla 14; C+: Control positivo; $^{a-d}$ Diferentes letras indican diferencia significativa (p<0.05) entre las muestras. $^{A-D}$ Diferentes letras indican diferencia significativa (p<0.05) entre las horas.

7.2.3 Estabilidad y viscosidad

Los cambios del antes y después de la fermentación (24 h) sobre estabilidad y viscosidad se aprecia en la Figura 11. Antes de la fermentación, se encontraron porcentajes de estabilidad en un rango de 89.54% - 81.41%, las muestras M14 y C- fueron mayores significativamente con 89.54%±0.85 y 89.45%±0.77, respectivamente, en comparación con C+, M1 y C+. Al finalizar la fermentación, la estabilidad tuvo valores de entre 89.38% - 64.01%, las muestras M1 y M6 presentaron similares valores (p>0.05) con alta estabilidad física significativamente (85.44% en promedio) en relación a las demás muestras, mientras que la de menor porcentaje fue la mezcla C+ con 64.01%±1.59. Al comparar cada muestra al inicio y final de la fermentación, se observó un aumento significativo de estabilidad en la M1 y disminución (p<0.05) en las muestras M11, M14, C+ y C-.

En lo que respecta a la viscosidad, antes de la fermentación se reportaron valores de entre 4.13-5.26 cP, la M1 fue significativamente más viscosa (5.26 cP±0.05) en relación a las otras muestras. Al terminar el proceso de fermentación los valores fueron de entre 3.56 cP - 5.46 cP, de los cuales la M14 fue mayor (p<0.05) con respecto a las demás y las de menor viscosidad fueron la M6 y M11 con 3.80 cP±0.26 y 3.56 cP±0.20, respectivamente. De acuerdo al inicio y final de la fermentación de cada muestra, se reportó un aumento (p<0.05) de viscosidad en la muestra M14 y disminución significativa en M1 y M11.

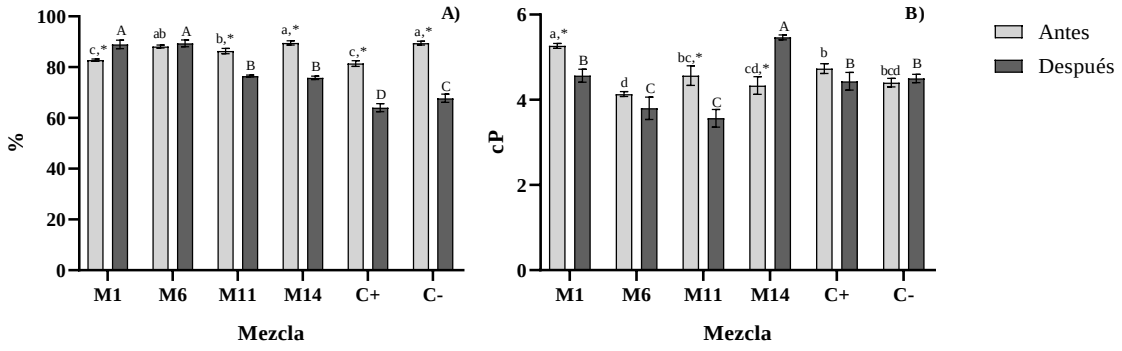

Figura 10. Estabilidad A) y viscosidad B) de las diferentes mezclas de jugo de zarzamora fermentado. [a-c] Diferentes letras indican diferencia significativa (p<0.05) antes de la fermentación; [A-D] Diferentes letras indican diferencia significativa (p<0.05) después de la fermentación; * Indica diferencia significativa (p<0.05) comparando la propia muestra antes y después de la fermentación.

7.2.4 Índice de turbidez y oscurecimiento

El índice de turbidez y oscurecimiento se observa en la Figura 12, en la cual se aprecia que al inicio de la fermentación las muestras presentaron valores de entre 0.16-0.20 y al final fueron de 0.19-0.20 para turbidez, al inicio la mezcla C+ fue la que tuvo alta turbidez significativamente (0.20±0.00) con respecto a las demás muestras. Al terminar la fermentación el C+ fue el de mayor valor al comparar todas las mezclas, a excepción de las M11 y M14, las cuales fueron similares. Al relacionar cada una de las muestras al inicio y final de la fermentación la M1, M14 y C- presentaron cambios significativos aumentando su turbidez.

En lo que respecta a oscurecimiento, el rango de valores al inicio de la fermentación fue de 0.98-1.08 y después de 0.91-1.04. La M11 mostró mayor índice de oscurecimiento significativamente con 1.08±0.003 en relación con las demás mezclas, a excepción de la M1, M6 y C- que tuvieron un comportamiento similar. Mientras que, al terminar el proceso de fermentación, la mezcla M1 con 1.03±0.006 tuvo menor índice de oscurecimiento significativamente en relación a todas las mezclas. Al final de la fermentación, se reportó una disminución en el índice de oscurecimiento de las mezclas M1 y M11, con respecto a los valores finales de cada muestra.

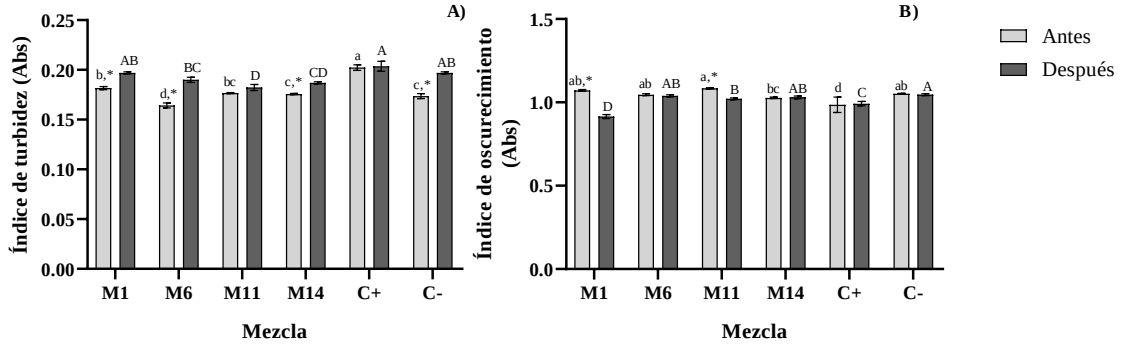

Figura 11. Índice de turbidez A) y oscurecimiento B) de las diferentes mezclas de jugo de zarzamora fermentado. [a-d] Diferentes letras indican diferencia significativa (p<0.05) antes de la fermentación; [A-D] Diferentes letras indican diferencia significativa (p<0.05) después de la fermentación. * Indica diferencia significativa (p<0.05) comparando la propia muestra antes y después de la fermentación.

7.3 Evaluación de las propiedades antioxidantes del jugo de zarzamora fermentado: Etapa 3

7.3.1 Contenido antioxidante

Los resultados de contenido de fenoles totales y antocianinas, determinados al inicio y final de la fermentación del jugo de zarzamora se presentan en la figura 12.

Al iniciar la fermentación, la muestra C- fue la que tuvo mayor contenido de fenoles totales (247.53±8.15 mg EAG/100 mL) significativamente en comparación con todas las demás, a excepción del M11, M14 y C+, no mostrando diferencias (p> 0.05) entre ellas. Al finalizar la fermentación, el C- tuvo altas cantidades de fenoles al resto de las muestras con 259.85±5.13 mg EAG/100 mL. Al comparar el inicio y final de la fermentación de las propias muestras, se observó un aumento (p<0.05) en los jugos M14 y C+.

Por otro lado, el contenido de antocianinas antes de iniciar la fermentación, la muestra M14 presentó los valores más altos (p<0.05) con 44.07±0.43 mg Cy-3-GI/100 mL similar a la M11 con 39.95±2.52 mg Cy-3-GI/100 mL. Después de la fermentación, el mayor significativamente fue la mezcla C+ con 37.01±0.78 mg Cy-3-GI/100 mL y la M1 fue la que tuvo menor contenido con 21.54±1.85 mg Cy-3-GI/100 mL. Se apreció una disminución (p<0.05) en las muestras M1, M11 y M14 entre su contenido inicial y final.

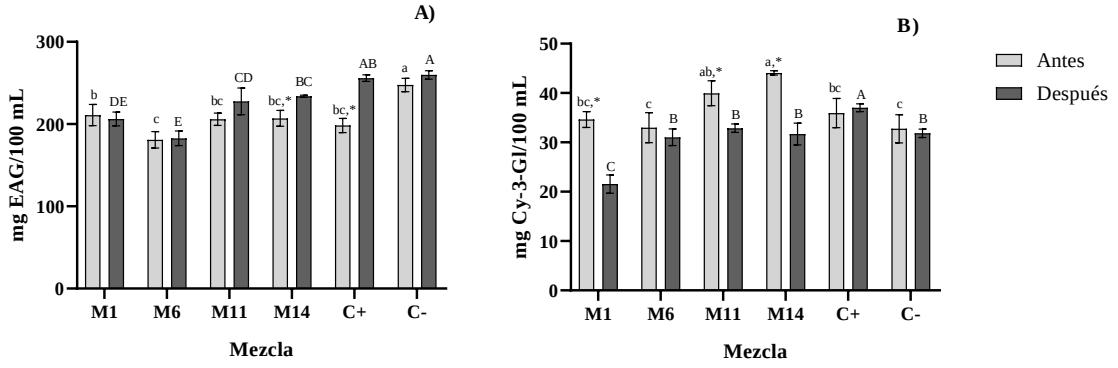

Figura 12. Contenido antioxidante de las diferentes mezclas de jugo de zarzamora fermentado. A) fenoles totales; B) antocianinas. [a-c] Diferentes letras indican diferencia significativa (p<0.05) antes de la fermentación; [A-D] Diferentes letras indican diferencia significativa (p<0.05) después de la fermentación. * Indica diferencia significativa (p<0.05) comparando la propia muestra antes y después de la fermentación.

7.3.2 Actividad antioxidante

La actividad antioxidante medida por ABTS•+, DPPH•+, FRAP y quelante de las diferentes mezclas se observa en la figura 13.

Antes de iniciar la fermentación, en ABTS•+ los valores fueron de entre 31.24 y 38.66 mg EAA/100 mL, los de mayor capacidad fueron las mezclas M1, M6 y M11 (37.98 mg EAA/100 mL, en promedio) en comparación con ambos controles, al terminar la fermentación las muestras fueron similares (p>0.05) con promedio de 35.23 mg EAA/100 mL, el mismo resultado se obtuvo al analizar cada muestra al inicio y final de su fermentación.

En DPPH•+, los resultados fueron de 953.16-1224.83 μmol ET/100 mL antes de la fermentación y después fue de 1102.33-1272.33 μmol ET/100 mL. Todas las mezclas tuvieron altos valores similares (p>0.05) con 1197.75 μmol ET/100 mL en promedio, a excepción de la M1 y M6. Después de la fermentación, la muestra C- presentó mayor capacidad significativamente, actividad similar se observó en las muestras M6 y M14. La mezcla M6 aumentó (p<0.05) su potencial de reducir al DPPH•+ después de la fermentación con respecto al inicio, mientras que la M11 se vio disminuida (p<0.05).

Al inicio de la fermentación en FRAP, se encontraron cantidades de 13.07-14.87 mM E Fe (II)/100 mL y al finalizar fueron de 9.25-14.91 mM E Fe (II)/100 mL. En la primera medición al inicio del proceso fermentativo no se reportaron diferencias significativas entre las muestras. Al final de la fermentación, la de baja capacidad (p<0.05) fue en la mezcla M1 con 9.25±0.15 mM E Fe (II)/100 mL, mientras que las demás tuvieron valores similares (p>0.05). Al inicio y final de la fermentación de cada muestra, las mezclas M1 y C+ disminuyeron significativamente.

Finalmente, el porcentaje de actividad quelante fue de entre 36.86-46.75% antes del proceso fermentativo y después fue 46.09-50.62%. La muestra C+ fue la de mejor actividad 46.75±0.27% significativamente al inicio de la fermentación y la de menor fue la M6 con 36.86±0.92%. Al finalizar el proceso, la M1 tuvo mayor porcentaje significativamente (64.64±2.25%) de actividad quelante. Se observó un aumento (p<0.05) de cada una de las mezclas M1, M6 y M11 al compararlas con el inicio de su fermentación.

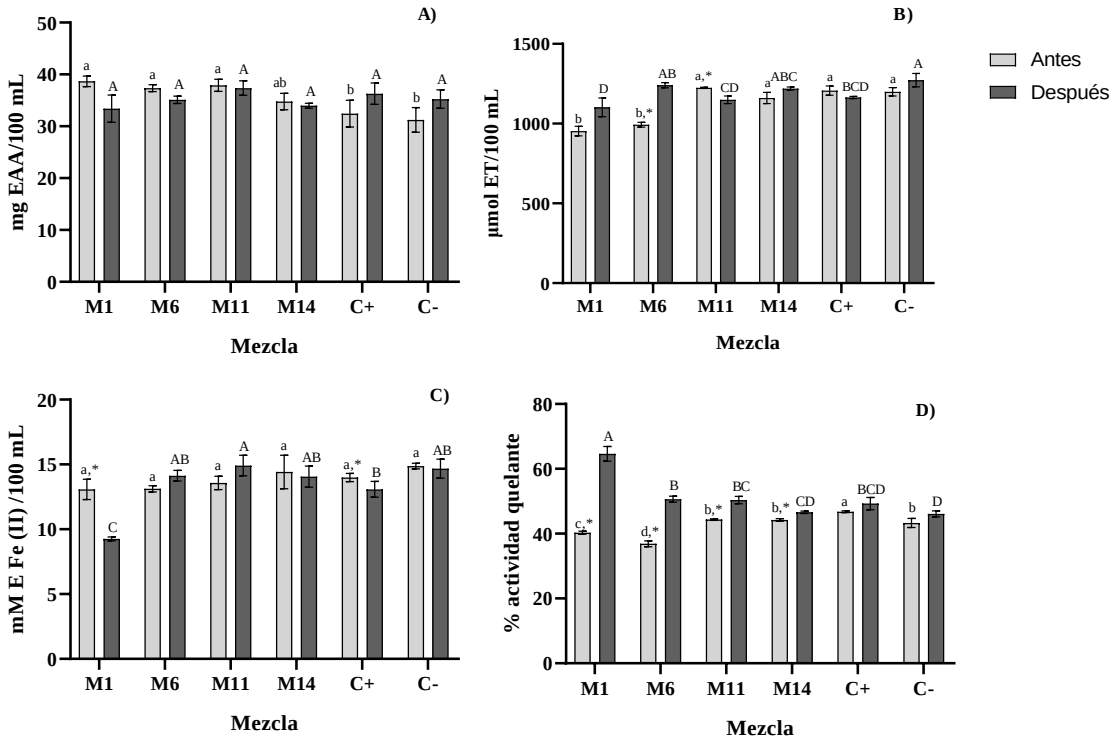

Figura 13. Actividad antioxidante de las diferentes mezclas de jugo de zarzamora fermentado. A) ABTS•+; B) DPPH•+; C) FRAP; D) Quelante. [a-d] Diferentes letras indican diferencia significativa (p<0.05) antes de la fermentación; [A-D] Diferentes letras indican diferencia significativa (p<0.05) después de la fermentación. * Indica diferencia significativa (p<0.05) comparando la propia muestra antes y después de la fermentación.

VIII DISCUSIÓN

8.1 Caracterización de microorganismos aislados de aguamiel, pulque y zarzamora: Etapa 1

Anteriormente, las cepas fueron identificadas por Cervantes-Elizarrarás (42). En el presente trabajo se realizó una segunda verificación mediante una identificación fenotípica con diferentes pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas, así como una identificación fenotípica con una galería de fermentación de carbohidratos (API 50 CH y 50 CHL), esto con la finalidad de confirmar su género láctico

8.1.1 Pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas

En este trabajo se corroboró el género ácido láctico de las cepas que resultaron Gram positivo, motilidad y catalasa negativas, Ringø, et al. y Mohamad, et al. (139,140) indican que estos son aspectos propios de las BAL. Son Gram positivos por las características de su membrana que tiene afinidad al colorante violeta (141), son organismos inmóviles ya que carecen de cilios y flagelos (109) y se caracterizan por ser catalasa negativa (142) lo cual promueve la conservación de alimentos fermentados por las propiedades antimicrobianas del peróxido de hidrógeno secretado por las mismas (143). Estas características se han observado en estudios sobre la identificación de BAL en diferentes fuentes como en un yogurt artesanal (didiah) (144), en queso cheddar, yogurt y leche de vaca (145), en diferentes muestras de lácteos (146) y de aislados del tracto gastrointestinal de pollo (147).

En lo que respecta a el crecimiento de las cepas en diferentes condiciones de temperatura, pH, ósmosis, entre otros se consideran un criterio para seleccionar a las BAL como cultivo iniciador y con características probióticas, ya que durante su proceso y durante la digestión las BAL son sometidas a condiciones extremas (148).

Las cepas Z1 aislada de zarzamora, A2 de aguamiel, P1 de pulque y los controles positivos (C1 y C2) crecieron en un rango de temperatura de 15 a 50 °C. Bintsis (9), indica que las BAL generalmente crecen a temperaturas entre 5 y 45 °C. El crecimiento de las cepas anteriormente mencionadas se debe a el mecanismo de termorresistencia y su variación genética, que consiste en proteínas específicas (149), a temperaturas altas intervienen las proteínas de choque térmico (Hsp), por ejemplo las Hsp40, y enzimas como fosfoenolpiruvato, fosfoenoltransferasa, encargadas de fosforilar a las Hsp presentes para ejercer su función (150,151), y a temperaturas bajas las proteínas

de choque frío (cspC, cspL y cspP), además del aumento de ácidos grasos insaturados y ramificación del metilo de la membrana generando mayor fluidez, estos efectos promueven la supervivencia (152,153). El crecimiento de las BAL prospera cuando superan los efectos como la baja replicación o metabolismo disminuido ocasionado por un medio que causa estrés a microorganismo (153).

Algunas BAL pueden no crecer a temperaturas altas como las cepas A1 aislada de aguamiel y P2 de pulque o a bajas temperaturas como la Z1. Lo cual podría deberse a la lenta respuesta sobre la síntesis de proteínas de choque ante el estrés, ocasionando desnaturalización de las proteínas y posterior agregación, o la desestabilización de macromoléculas como los ribosomas y ARN (154,155). Mientras que el comportamiento de la cepa Z1, se puede atribuir a que el metabolismo de las BAL se ve disminuido, así como la baja fluidez de la membrana, menor traducción, transcripción y replicación del ADN, por lo cual la síntesis de proteínas de choque frío es más baja, en comparación con las demás que pudieron tener un periodo de adaptación más rápido (155). Igualmente se ha reportado que a temperaturas bajas los ácidos grasos de la membrana se cristalizan disminuyendo la fluidez, pero su composición tiene un papel importante sobre ese parámetro en las BAL, se ha indicado que la relación de ácidos grasos insaturados/saturados como mayor insaturaciones o ramificaciones mantienen en buen estado y con fluidez a la membrana, este proceso varía según la composición de la membrana de cada cepa de BAL (156), como en *L. helveticus* y *L. sanfranciscensis* que reportaron mayor resistencia a temperaturas bajas por su composición de ácidos grasos, además se observó diferencia significativa en la proporción de estos compuestos en la membrana de cada cepa (157).

El crecimiento en medios ácidos (3.5, 4.5 y 5.5) y básicos (8.5 y 9.6) se observó en las cepas A1, P1, P2, C1 y C2, mientras que las cepas Z1 y Z2 y A2 se vieron afectadas a pH ácidos. El pH óptimo de crecimiento de las BAL es de 5.5 a 6.5 (9), donde la baja acidez afecta su desarrollo (158) sin embargo es un factor crucial de los probióticos ya que deben sobrevivir el paso por el tracto gastrointestinal (148).

El daño celular ocasionado por un pH bajo por debajo del óptimo, puede disminuir por diferentes mecanismos como la homeostasis, integridad y fluidez de la membrana, su regulación metabólica y reparación de macromoléculas (159). Mantener la homeostasis es el principal mecanismo, en este proceso intervienen sistemas de transporte como las ATPasa de translocación de protones (160) que permite la desviación de protones al exterior (161). Cuando el pH del ambiente es bajo y

constante, las bacterias gastan elevadas cantidades de energía para mantener un pH intracelular neutro restringiendo el crecimiento y metabolismo (162), cuando se llega a un pH extracelular más bajo, el pH intracelular desciende rápidamente resultando en daño a las proteínas y ADN para que finalmente la célula muera (163). Otro de los compuestos que se ven modificados a un pH bajo son los ácidos grasos de la membrana de las BAL, se observa una disminución de ácidos grasos insaturados / ácidos grasos saturados y un aumento de ácidos grasos cíclicos ocasionando rigidez (156). Los mecanismos anteriormente descritos promueven la supervivencia de las cepas en diferentes pH, sin embargo, son diferentes en cada BAL es por ello la variación de resistencia (159).

Posteriormente las cepas se expusieron a concentraciones de 5.0, 6.5 y 10% de NaCl con el propósito de conocer su crecimiento en estrés osmótico. Las cepas de zarzamora (Z1 y Z2), aguamiel (A1 y A2) y pulque (P1 y P2) crecieron a concentraciones de 5 y 6.5% de NaCl, y al aumentar a 10% se vio afectado su desarrollo. Se ha determinado que las BAL logran crecer en medios de hasta 10% de NaCl (164), y puede deberse a mecanismos que las protegen del estrés osmótico, como el ajuste a la osmolalidad intracelular mediante la absorción del soluto compatible o la síntesis del mismo para mantener un equilibrio (148), otro de los mecanismos es la producción de proteínas de la capa superficial (capa S) como SlpA y SlpX de algunas bacterias, esta capa está adherida a la membrana en el péptido glicano es la encargada de la protección a la célula (165), como *L. acidophilus* que en estrés osmótico aumenta hasta en un 40%, y es una forma de contrarrestar la fragilidad por la disminución del espesor y componentes de la membrana de las BAL que no tienen capa superficial (166). La disminución de crecimiento de las cepas es más notorio cuando la concentración de NaCl aumenta, este comportamiento se observó en las cepas del presente estudio, así como en BAL del género *Lactobacillus* y *Pediococcus* aisladas de intestinos de pollo (167). Esto se puede atribuir a que el estrés osmótico disminuye el crecimiento y la supervivencia afectando el metabolismo de las BAL (168), o por la ausencia de la capa S como es el caso de *L. casei* que ocasiona menor resistencia de las cepas (166). Es de conocimiento que el crecimiento en medios de cultivo con diferentes concentraciones de NaCl depende del tipo de cepa (169), como en aislados de papaya, repollo y tomate, donde se reportó el crecimiento de diferentes *Lactobacillus* al 5 y 8 % de NaCl (170).

Cabe destacar que las cepas utilizadas en el presente estudio, anteriormente fueron evaluadas en condiciones gástricas (pH 2 y sales biliares), de las cuales se observó una tasa de sobrevivencia

mayor al 50%, presentaron susceptibilidad a antibióticos como la amoxicilina, amicacina, gentamicina, entre otros y se observó actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y *Helicobacter pylori* (42,48) sin embargo, también el crecimiento y tolerancia a medios extremos como temperatura, pH y NaCl, los cuales fueron realizados en el presente estudio, son algunos de los criterios a evaluar a las BAL para considerarse como probióticos (148). Además, estos dos últimos criterios son usados regularmente como condiciones selectivas de las BAL en el procesamiento industrial (170).

8.1.2 Identificación bioquímica de las cepas: Fermentación con galería de carbohidratos

Las BAL identificadas fenotípicamente fueron *L. plantarum, P. acidilactici, L. collinoides, L. brevis, L. rhamnosus* y *L. casei*, mediante los Kits API, los cuales son una fuente fiable para la identificación bacteriana. Esta identificación coincide con el estudio previamente realizado en PCR de las mismas cepas por Cervantes-Elizarraras et al. (42), excepto las cepas de zarzamora Z24-1 y la de pulque P24-6 identificadas como *L. plantarum*, mientras que en este trabajo fueron identificadas como *P. acidilactici* y *L. collinoides*, respectivamente.

Sin embargo, en otros estudios se realizó este método de identificación bioquímica y una confirmación con métodos moleculares como PCR y secuenciación génica con RNA, por ejemplo, en un aislado de productos fermentados donde encontraron a *L. plantarum, P. acidilactici, L. pentosaceus*, entre otras (171), también se han identificado BAL del género *Pediococcus* de un pescado fermentado (jambal roti) (172) y en aislados de camarón gigante se identificó a *L. plantarum* (140).

8.2 Caracterización del cultivo iniciador para la fermentación del jugo de zarzamora

Posterior a la identificación de las cepas como BAL, se realizaron ensayos de mutualismo, cinéticas de crecimiento por 24 h y recuento en placa. Los ensayos se realizaron para determinar el cálculo del inóculo necesario para iniciar la fermentación del jugo de zarzamora termoultrasonicado.

8.2.1 Mutualismo

En el presente estudio, las mezclas M1 (*L. plantarum, L. plantarum* y *P. acidilactici*), M6 (*L. brevis, P. acidilactici* y *L. plantarum*), M7 (*L. plantarum, L.plantarum* y *L. brevis*), M11 (*L.*

plantarum, *P. acidilactici* y *L. brevis*), M14 (*L. brevis*, *L. plantarum y L.plantarum*) y C+ (*L. rhamnosus y L. casei*), fueron las que cumplieron con una relación positiva. Se sabe que los consorcios de BAL que tienen buena relación, fomentan la conversión de sustratos, mejoran la biotransformación y se aprovechan los productos finales de la fermentación de cada una de las cepas, mediante el intercambio de nutrientes (alimentación cruzada) (173).

El mutualismo indica que todos los microorganismos que estén en contacto se benefician por su mayor resistencia a flora patógena (50), las interacciones entre BAL son poco descritas a excepción del cultivo para yogurt (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) (174), pero se sabe que las BAL forman buenas relaciones como las observadas en el presente estudio.

Las BAL del género *Lactobacillus* son exigentes en medios con aminoácidos, péptidos, nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos (175) y las del género *Pediococcus* utilizan carbohidratos, proteínas, aminoácidos, nucleótidos y vitaminas, exigiendo la mayoría de aminoácidos disponibles del medio donde crecen. Los componentes alimentarios necesarios para las cepas están contenidos en el medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) utilizado en el presente estudio, lo cual permitió que no hubiera competencia por alimento y se observará una relación positiva.

Como se mencionó anteriormente, la biotransformación de compuestos durante la fermentación son aprovechados por otro microorganismo del consorcio, por ejemplo el mutualismo que se observó en la mezcla M1 que está compuesta por *P. acidilactici*, este se caracteriza por presentar una actividad proteolítica liberando aminoácidos (176), los cuales pueden ser utilizados por *L. plantarum*, además de otros compuestos liberados al medio como los carbohidratos y vitaminas (177). Lo anteriormente mencionado pudo haber sucedido en la mezcla M6 y M11, ya que las combinaciones tienen cepas de *P. acidilactici* y 2 del género *Lactobacillus*.

Mientras que en las mezclas que solo están compuestas por BAL del género *Lactobacillus* (M7, M14 y C+), se sabe que utilizan como alimento preferencial a los carbohidratos como las hexosas (generalmente glucosa) principalmente metabolizada por la vía Embden-Meyerhof-Parnas, este proceso tiene como metabolito final el ácido láctico (177), otras de las vías metabólicas principales en la fermentación son la proteólisis y la lipolisis, la vía proteolítica es muy débil en algunas BAL, sin embargo, degrada las proteínas con el objetivo de liberar aminoácidos que intervienen en la

sobrevivencia de los microorganismos (178). Por todo lo anterior, se sugiere que las BAL de las mezclas utilizaron los nutrientes disponibles permitiendo el mutualismo.

En las mezclas M2, M3, M4, M5, M8, entre otras, en las cuales no se observó mutualismo de las BAL, puede deberse a la formación y posterior sensibilidad de compuestos antimicrobianos como el ácido láctico o las bacteriocinas que pueden actuar contra bacterias de su mismo género, y verse obstaculizada la formación de consorcios estables (179). La síntesis de bacteriocinas está regulada por péptidos inductores (180), su expresión está dada por sistemas de dos y tres componentes o por si sola (181), su mecanismo de acción puede requerir de receptores para su acoplamiento en la membrana como el lípido II o manosa permeasa (182), generando la inhibición sobre la síntesis de peptidoglicanos (183) o promoviendo la formación de poros en la membrana que permite la pérdida del citoplasma y por último la muerte celular (184).

Lo descrito anteriormente indica algunos de los mecanismos por los cuales las bacteriocinas pudieron impedir el mutualismo, un ejemplo en el presente estudio podría ser la mezcla M2 que está compuesta por dos cepas de *L. plantarum* y una de *L. collinoides*, la primera durante su crecimiento produce bacteriocinas como la plantaricina y la SLG10 que tiene efectos contra bacterias Gram positivas y negativas (185), mientras que en *L. collinoides* se ha demostrado la síntesis de reuterina, pero en esta cepa la bacteriocina es sensible a la descomposición por oxidoreductasas a 1,3-propanodiol convirtiéndose en agua y dióxido de carbono (186), por lo cual el *L. plantarum* posiblemente tuvo mayores posibilidades de sobrevivencia en esta mezcla.

Por otro lado, los efectos bacteriostáticos o bactericidas de las bacterias se pueden evadir mediante mecanismos de resistencia como la neutralización de la carga negativa de la pared celular por el ácido teicoico (187), su síntesis en bacterias Gram positivas depende de cuatro proteínas del operón Dlt (Dlt A-D) y su inactivación genera sensibilidad a las bacteriocinas (188), este comportamiento se ha observado en *L. rhamnosus* (189), el cual es parte de la mezcla C+. Otro de los mecanismos es la modificación de los fosfolípidos aniónicos con L-lisina para producir lisilfosfatidilglicerol (fosfolípido básico), impartiendo una carga positiva a la membrana, este efecto permite a la bacteria protegerse del efecto de las bacteriocinas (189,190). Estos mecanismos pudieron haber sucedido en las mezclas que presentaron mutualismo (M1, M6, M7, M11, M14 y C+).

Las relaciones positivas de los consorcios estables en los alimentos fermentados tienen mayor importancia al ser consumidos por el ser humano por sus efectos benéficos en la salud (propiedades antimicrobianas, control de diarrea, reducción de colesterol, estimulación del sistema inmune, entre

otras), ya que una relación negativa puede llegar a generar disbiosis en la microbiota intestinal, que puede resultar en procesos patológicos como diabetes y obesidad (191), uno de los mecanismos por los cuales se ven fortalecidos los consorcios microbianos son la alimentación cruzada (173,192), es por ello que el mutualismo influye en la dinámica de ecosistemas microbianos como el del intestino (193). En un estudio evaluaron la alimentación cruzada de *Acetobacter fabarum* y *Lactobacillus brevis* aisladas del intestino de Drosophila (moscas de fruta), observando que el *L. brevis* codifica a piruvato fosfato dikinasa, enzima que cataliza piruvato en fosfoenolpiruvato, esta enzima es necesaria para la *A. fabarum* ya que se alimenta de una fuente diferente a glucosa, posteriormente las bacterias fueron reinoculadas en cocultivo y monocultivo, observando que las moscas con ambas bacterias tuvieron un aumento en la densidad bacteriana y menor almacén de triglicéridos (192).

8.2.2 Cinética de crecimiento

El crecimiento de las mezclas de BAL fue de manera similar, permanecieron las dos primeras horas en periodo de latencia, posterior a un crecimiento exponencial hasta la hora 8 y permaneciendo en crecimiento estacionario hasta la hora 24, presentaron recuentos de inicio a final de la incubación de 6.64 y 9.70 UFC Log10/mL, respectivamente (Figura 8). No hay estudios que reporten el crecimiento de mezclas de BAL en medio MRS, sin embargo, en este estudio se utilizó con el objetivo de conocer su comportamiento de las mezclas en este medio, además de obtener la Unidad Mínima Terapéutica (UMT).

En el crecimiento de 12 cepas diferentes de BAL entre ellas *P. pentosaceus, L. lactis, L. plantarum*, se reportó que en las primeras dos horas los microorganismos permanecieron en fase de latencia, mientras que la fase exponencial fue hasta la hora 8 (194), esto mismo se observó en el presente trabajo. Mientras que otros estudios difieren, como en *L. paracasei* y *S. thermophillus,* donde el crecimiento en latencia se extendió a 7.39 y 5.50 horas, respectivamente (195) y *L. plantarum* permaneció 5 h en latencia, hasta las 22 horas se detuvo el crecimiento exponencial e inició la fase estacionaria (196).

En lo que respecta al crecimiento alcanzado (24 h) de las mezclas de BAL, valores similares se observaron en *P. pentosaceus* y en *L. lactis* en su forma individual, con un recuento máximo de 9.4 UFC Log10/mL y en *W. cibaria* de 9.8 UFC Log10/mL (194). Mientras que menores valores se observaron en *L. plantarum, L. brevis, L. paracasei, L. fermentum* y *L. pentosus,* en su forma

individual ya que su carga final fue alrededor de 8.4 UFC Log/mL (197). Un recuento máximo de 9 UFC Log/mL en *P. pentosaceus* aislado de palma datilera se reportó en mayor tiempo de incubación (29 h), mientras que en *Leuconostoc citreum, Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc pseudo-mesenteroides*, aisladas de salchichas de carne bovina y pavo, y leche de vaca, respectivamente, fue hasta las 34 h (198). La carga final observada en el presente estudio promueve un ecosistema equilibrado en la microbiota con respecto a los microorganismos patógenos (199).

8.2.3 Cultivo iniciador para la fermentación del jugo de zarzamora termoultrasonicado

Estudios utilizaron la misma concentración de inóculo inicial referente a la UMT (9 UFC Log/mL) utilizada en el presente estudio (Tabla 10 y 11). Como en jugo de manzana fermentado con una mezcla de *L. acidophilus, L. plantarum, L. rhamnosus* y *L. casei* (200), en un jugo elaborado con diferentes clases de manzana inoculado con una mezcla que consistía en *L. acidophilus, L. plantarum* y *L. fermentum* (201) y en un jugo de mora fermentado con *L. plantarum* (202).

Las BAL tienen interacciones seguras con el organismo humano, promueve la restauración de la microbiota, control metabólico, entre otros (203). La inoculación de acuerdo a la UMT (9 UFC Log/mL) ha demostrado tener efectos benéficos al huésped, en enfermedades como diarrea, colitis, cáncer, entre otras (14), como es el caso de la suplementación de *L. rhamnosus* en ratones con diabetes mellitus y con obesidad, se reportaron efectos hipoglucémicos y se regularon los niveles de lípidos en sangre, estos efectos se atribuyen a la producción de ácidos grasos de cadena corta por las BAL (204).

8.3 Evaluación del jugo fermentado: Etapa 2

Después del cálculo del inóculo necesario para iniciar la fermentación, se procedió a medir la cinética de crecimiento de las mezclas de BAL en el jugo de zarzamora, además de diferentes parámetros físicos y antioxidantes durante la fermentación, para conocer los cambios ocurridos durante el proceso por las BAL.

8.3.1 Cinética de crecimiento en el jugo

El crecimiento de las mezclas de BAL durante la fermentación en el jugo de zarzamora termoultrasonicado tuvieron un comportamiento lineal, excepto por la M6 y C+. En un jugo de

higo, el crecimiento de *L. casei, L. delbrueckii y L. plantarum* inoculadas de manera individual, se mantuvo o disminuyó su crecimiento durante las primeras 24 horas (205), al igual que las mezclas M1, M7, M11 y M14 que se estudiaron en el presente trabajo. Lo analizado en la muestra C + difiere con lo reportado en jugo de betabel fermentado con *L. casei*, ya que tuvieron un aumento sobre el conteo bacteriano a las 24 horas (119).

Mientras que el recuento final de todas las mezclas a excepción del C+, se mantuvieron en el valor medio de la UMT (8 UFC Log10/mL), observando un aumento de 1 UFC en la mezcla M6. Un estudio reportó valores similares a la muestra M6 de este estudio, con una mezcla de *L. plantarum, L. spicheri* y *L. reuteri* inoculada en jugos de cereza y brócoli, en donde hubo un aumento de 1 y 1.5 UFC Log/mL, respectivamente, con respecto al recuento inicial (206), mientras que en jugo de manzana con *L. acidophilus, L. plantarum, L. rhamnosus* y *L. casei*, mostraron un recuento final menor de 6.5-7.8 UFC Log/mL (200).

Algunos de los factores por los cuales el crecimiento de las BAL se puede ver afectado durante la fermentación, puede ser el tamaño del inóculo, ya que regularmente estos microorganismos crecen a un máximo de 8 a 9 UFC Log/g (199), igualmente la producción de ácido láctico durante la fermentación, ya que cuando llega a un límite soportable, el cual depende de cada cepa, este se disocia en el citoplasma, iniciando la fase de crecimiento estacionario (207,208). Otro factor limitante es el pH ácido inicial del medio de fermentación, como en un jugo de anacardo que inició con un pH menor a 4 (99), esta misma característica se observó en el jugo de zarzamora (pH: 3.0-3.33) utilizado en el presente trabajo.

Algunos productos fermentados, independientemente de su origen vegetal o animal, son alimentos que pueden tener BAL nativas o inoculadas, que al ser consumidos tienen influencia positiva en el huésped (199), al estar relacionadas con el microbioma intestinal (209), sus efectos son mayores cuando son consumidas vivas (210), por ello la importancia de mantener un recuento alto de BAL.

8.3.2 pH, porcentaje de ácido láctico y sólidos solubles totales

Los valores iniciales de pH aumentaron y el porcentaje de ácido láctico se mantuvo con respecto a la hora cero, y en sólidos solubles totales no hubo cambios significativos en todas las mezclas a excepción de la M1, M7 y M11 que presentaron variaciones durante las horas de análisis.

Usualmente durante la fermentación, el pH disminuye y el ácido láctico aumenta, comportamientos diferentes se apreciaron en este trabajo en relación a otras matrices, como en jugos de azafrán,

manzana y de uva (200,211,212), lo cual podría deberse al pH inicial ácido del jugo de zarzamora, ya que el crecimiento de las BAL en medios ácidos se ve obstaculizado, es decir el microorganismo restringe, su crecimiento y metabolismo dando prioridad a mantener la homeostasis mediante un pH intracelular neutro(159,162).

En lo que respecta a los sólidos solubles las muestras M1, M7 y M11 tuvieron mínimos cambios, esto mismo se estudios se reporta en jugo de manzana fermentado con *L. plantarum* el cual disminuyó 1° Brix a las 24 horas (213), al igual que en otro jugo de piña fermentado con *L. fermentum* y *L. plantarum* (214), mientras que en jugo de granada fermentado con *L. plantarum*, después de 15 días se observó una disminución de 0.25° Brix iniciando con 12.22°Brix (215). Estos mínimos cambios, pueden deberse a un equilibrio entre el consumo de azúcares fermentables y la producción de ácidos como el láctico (216).

8.3.3 Estabilidad y viscosidad

Durante la fermentación del jugo de zarzamora se evaluaron los cambios de estabilidad y viscosidad al inicio y final. La estabilidad se vio disminuida en las muestras M11, M14, C+ y C-, la M1 aumentó y la M6 se mantuvo. Mientras que la viscosidad de los jugos M1 y M11 se vio disminuida y aumentó en la M14.

Al inicio de la fermentación en viscosidad, la M1 fue más alta significativamente en comparación con el jugo C-, así como a las demás muestras, esto pudo deberse al mayor contenido de sólidos, como lo reportado en jugo de mango fermentado con una combinación de *L. bulgaricus, S. thermophilus* y *L. plantarum* en relación a su control (217). Por otro lado, al final de la fermentación se observó un comportamiento similar en las muestras M1 y C+ en comparación con el C-, esto mismo sucedió en jugo de azafrán con *Lactococcus lactis, L. plantarum* y *L. brevis* inoculadas de forma individual (211). El aumento o disminución de la estabilidad y viscosidad en los jugos se define por el tamaño de partícula y contenido de sólidos (218). Así como la síntesis de exopolisacáridos (219,220), que depende de las fuentes de nitrógeno, fósforo o azufre y carbohidratos como la sacarosa o fructosa (221), al igual que el tiempo, la temperatura, y el tipo de cepa (222). Como *L. brevis* que sintetiza el homopolisacárido ∝-D-glucano por medio de glucosa (223), mientras que *L. plantarum* produce el heteropolisacárido compuesto a partir de manosa, galactosa y glucosa (224).

La síntesis de exopolisacáridos por BAL ha demostrado que en los jugos modifica la viscosidad y algunos otros parámetros relacionados como la estabilidad (225), como en jugo de tomate fermentado con *W. cibaria/confusa,* el cual aumentó su viscosidad (49), en jugo de litchi con *L. casei*, aumenta la viscosidad a consecuencia del contenido de fructosa (226), al igual que en jugo de azafrán fermentado con *Lactococcus lactis* (211), este comportamiento pudo haber ocurrido en la muestra M14 con el aumento de viscosidad y disminución de estabilidad.

8.3.4 Turbidez y oscurecimiento

El índice de turbidez después de la fermentación se vio aumentado significativamente con respecto a antes de la fermentación en las muestras M1, M6, M14, y C-.

Son pocos los estudios que determinan el índice de turbidez en jugos fermentados, sin embargo en un estudio sobre un modelo de jugo frutal fermentado con *L. rhamnosus, B. lactis* y *L. paracasei* en su forma individual, mostraron valores en promedio de 0.06, indicando que su turbidez aumentó con respecto al valor inicial lo que puede estar relacionado con los productos de la lisis o el crecimiento bacteriano (227), estos valores difieren con las muestras evaluadas en el presente estudio, ya que en promedio obtuvieron una turbidez de 0.19, lo cual puede deberse a un mayor contenido de partículas, ya que la turbidez está definida por la reducción de la transparencia por la presencia de partículas disueltas en el líquido (127), como células, proteínas y polifenoles, o la unión de los dos últimos por puentes de hidrógeno (228).

Mientras que en un estudio con jugo de tomate fermentado con *Saccharomyces cerevisiae*, tuvo una disminución de turbidez a las 24 h, sugiriendo un cambio en el estado de agregación de las partículas pequeñas que forman partículas más grandes (229), este comportamiento difiere con las muestras M1, M6 y M14 ya que su turbidez se vio aumentada con respecto al inicio de la fermentación, esto puede deberse a una mayor fracción de partículas disueltas en el medio no precipitan durante la centrifugación, generando el aumento de la turbidez (230).

En lo que respecta a el índice de oscurecimiento, las muestras M6, M14, C+ y C- mantuvieron sus valores, al compararlas con el inicio de la fermentación y las mezclas M1 y M11 presentaron una disminución. Se apreciaron valores en promedio de 1.007 en todas las muestras analizadas después de la fermentación, esto no coincide con lo reportado en vino de naranja obtenido de una fermentación espontánea que obtuvo un valor de 0.19, además observaron que este índice se ve

aumentado por el contenido de ácido ascórbico, la temperatura de almacenamiento y el tiempo (231).

El comportamiento de las muestras M1 y M11 sobre la disminución significativa del índice de oscurecimiento después de la fermentación con respecto a los valores iniciales, también fue reportado en jugo de pera tostada fermentada con *L. acidophillus* indicando que la mejora del pardeamiento puede deberse a la producción y liberación de metabolitos con alta actividad antioxidante o a la degradación de compuestos que producen pardeamiento como la polifenol oxidasa (232).

8.3.5 Contenido antioxidante: Etapa 3

Las muestras M14 y C+ presentaron un aumento sobre el contenido de fenoles totales con respecto al inicio de la fermentación. Las mezclas que tuvieron mayor concentración de antocianinas antes de la fermentación fueron M11 y M14 y después fue la muestra C+.

Estudios han reportado un aumento de compuestos fenólicos después del proceso de fermentación como en jugos de hetian y azufaifa fermentados con *L. acidophilus, L. casei, L. helveticus* y *L. paracasei*, en su forma individual (233), así como en jugo de arándano fermentado con *L. plantarum* y *L fermentum* en su forma individual (234) y en jugo de mango fermentado con mezcla de *L. bulgaricus, S. thermophillus* y *L. plantarum* (217), este comportamiento se reportó en el presente estudio en las muestras M14 y C+. Esto se puede atribuir a las enzimas α-D-galactosidasa y β-D-glucosidasa de las cepas que hidrolizan compuestos fenólicos en formas más simples (235,236), como es el caso de *L. plantarum* que fue utilizado en las mezclas M14, esta cepa tiene la capacidad de desglicosilar fenólicos glicosilados y liberar fenoles solubles ligados o insolubles de la pared celular vegetal (237). Por otro lado, en jugo de saúco fermentado con *L. rhamnosus* se indujo un aumento de compuestos fenólicos (100), como en la muestra C+, que fue inoculada con *L. casei* y *L. rhamnosus*, en donde se observó mayor concentración de fenoles en relación con las demás muestras. Mientras que en las muestras M1, M6 y M11, se pudo apreciar que no hubo un aumento de fenoles, este se mantuvo estable, posiblemente durante la fermentación los microorganismos liberan los fenoles, sin embargo los mismos generan su descarboxilación como es el caso de los ácidos cafeico, p-cumárico y ferúlico en vinilcatecol, p-vinilfenol y vinilguayacol, respectivamente, o su reducción en ácidos dihidrocafeico, floreético y dihidroferúlico, respectivamente (238), así como la despolimerización de estos compuestos macromoleculares o su

conversión a compuestos individuales (96), como el aumento de taninos condensados y disminución de taninos hidrolizables (ácido gálico) reportado en jugo de anacardo fermentado con *L. plantarum, L. casei* y *L. acidophilus* (99), igualmente se sabe que en ausencia de aceptores de electrones en el medio de fermentación, las BAL reducen a los fenoles para obtener NAD otorgando una ventaja energética (239).

Después de la fermentación, la muestra C- tuvo mayor concentración de fenoles totales en comparación con todas las mezclas, excepto el C+, esto difiere con lo reportado en jugo de saúco fermentado con *L. plantarum, L. casei* y *L. rhamnosus*, en su forma individual, los cuales tuvieron mayor contenido de fenoles que el jugo sin inóculo (100).

En lo que respecta al contenido de antocianinas, este se vio disminuido después de la fermentación en las muestras M1, M11 y M14, en relación al inicio de la fermentación. Esto también se observó en jugo de arándano fermentado con diferentes cepas de *L. fermentum* y *L. plantarum,* en su forma individual y en jugo de azafrán fermentado con *L. casei, L. plantarum* y *L. brevis*, inoculados individualmente (211), este efecto se debe a la participación de la β-glucosidasa que degrada a los β-glucósidos de las antocianinas vegetales por los microorganismos (239,240) como lo reportado por D´Incecco (241) en jugo de uva fermentado con *Oenococcus oeni*. La disminución de antocianinas glicosiladas resulta en un aumento de agliconas (antocianidina), la cual está libre de carbohidratos por haber sido utilizada como sustrato por las BAL (242).

La mezcla C +, conservó su contenido en antocianinas con respecto al inicio de la fermentación, esto se puede atribuir al pH ligeramente más bajo obtenido, ya que Kwaw et al., (96) en jugo de mora fermentado con *L. plantarum, L acidophilus* y *L. paracasei* indicó que un pH ácido tiene un efecto protector hacia las antocianinas. Igualmente pudo deberse a la baja actividad enzimática, como lo reportado por Ávila, et al., (240) en *L. casei* indicando que la actividad de β-glucosidasa es mayor después de las 24 h, por lo cual en este tiempo no hubo una degradación significativa de glucósidos de malvidina y delfinidina.

8.3.6 Actividad antioxidante

Al comparar la actividad antioxidante, en ABTS•+ no se observaron diferencias significativas al final de la fermentación con respecto al inicio, mientras que en DPPH•+ la muestra M6 presentó un aumento (p<0.05) y la M11 disminuyó. Estudios reportan un aumento de eliminación de los radicales ABTS•+ y DPPH•+, como en jugo de manzana fermentado con *L. plantarum,* atribuido

a la actividad de la cepa sobre los cambios inducidos en el perfil fenólico (243), mientras que Ayed. Abid y Hamdi (244) lo atribuyen al tiempo de fermentación, a los sustratos utilizados, la microbiota y los metabolitos producidos en jugo de uva roja fermentado con el consorcio de kombucha (*L. plantarum, L. lactis, Saccharomyces, Acetobacter xylinus*, entre otras). Estos resultados no coinciden con lo observado en las muestras del presente estudio a excepción de la M6 en el método de DPPH•+, donde se reportó un aumento significativo después de la fermentación.

En la actividad antioxidante medida por FRAP, la M1 y C + disminuyeron y las muestras M6, M11 y M14 mantuvieron sus valores, esto difiere con el aumento reportado en un jugo de piña fermentado con *L. acidophillus* y *L. plantarum* (245) y en jugos de arándano inoculado con 4 cepas de *L. plantarum* y 5 de *L. fermentum* de manera individual, este efecto se justifica por el aumento de compuestos antioxidantes como los fenoles que de igual manera se vieron aumentados (234). En un jugo de albaricoque fermentado con monocultivos de *B. lactis, L. casei* y *L. acidophillus* y cocultivos (*B. lactis* y *L. casei; B. lactis* y *L. acidophilus*) se demostró que la actividad antioxidante por FRAP, depende mayormente del tipo de cepa que se utiliza para la fermentación y no se ve afectada ya sea por monocultivos o cocultivos (4).

Por otro lado, la actividad quelante en las muestras M1, M6, M11 y M14 se observó un aumento (p<0.05) de 53.06% en promedio, estos valores fueron mayores a los reportados en jugo de granada fermentado con granos de kéfir con 50.76% (246).

En general, la actividad antioxidante en productos fermentados puede deberse a los diferentes cambios ocurridos durante el proceso como, el aumento de compuestos antioxidantes como el contenido de fenoles totales (247) o antocianinas (248), la producción de metabolitos con actividad antioxidante como glutatión, butirato, folato, entre otros (249), o al tiempo de fermentación (244), al efecto sinérgico de varios compuestos como la unión de la fracción flavonoide y ácidos fenólicos (250).

IX CONCLUSIONES

- Las pruebas morfológicas y de tolerancia a diferentes medios (temperatura, pH y concentraciones de NaCl) demostraron que las cepas son BAL.
- La galería de fermentación de carbohidratos API 50 CH y API 50 CH identificó fenotípicamente a *L. plantarum, P. acidilactici, L. collinoides, L. brevis, L. rhamnosus* y *L. casei*.
- De 17 mezclas con BAL, 5 presentaron mejores características de mutualismo y fueron utilizadas como inóculo en el jugo de zarzamora termoultrasonicado.
- A las 24 horas de fermentación, se logró el crecimiento requerido de acuerdo a la Unidad Mínima Terapéutica (UMT) en las 5 combinaciones de BAL y en el C+, en medio MRS y en el jugo de zarzamora termoultrasonicado.
- Durante la fermentación del jugo de zarzamora, las características fisicoquímicas (pH, porcentaje de ácido láctico, sólidos solubles totales, estabilidad, viscosidad, turbidez y oscurecimiento) presentaron cambios mínimos manteniendo las características propias del jugo.
- Al término de la fermentación, el contenido de fenoles totales aumentó significativamente en las muestras M14 y C+, mientras que en contenido de antocianinas se vio disminuido en las mezclas M1, M11 y M14.
- Con respecto a actividad antioxidante, no se presentaron modificaciones en todas las muestras medida por ABTS•+. En DPPH•+, la mezcla M6 aumentó y la M11 disminuyó, mientras que en la actividad antioxidante por FRAP, la mayoría de las muestras permanecieron estables, excepto por M1 y C+, los cuales disminuyeron. Finalmente, en actividad quelante, aumentó en todas las muestras excepto por el C+ y C-.
- De las mezclas analizadas, la M6 tuvo las de mejores características ya que cumplio con el maximo crecimiento de UFC de acuerdo a la UMT, además se ubicó en las bebidas con mejor estabilidad, mayor contenido de antocianinas y capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP).

X RECOMENDACIONES

- La bebida de zarzamora elaborada en el presente proyecto deberá ser probada en cepas patógenas, para que permitan comprobar su efecto antimicrobiano.
- Comprobar la síntesis de bacteriocinas por electroforesis.
- Realizar la identificación de compuestos bioactivos mediante HPLC, así como ácidos grasos de cadena corta que se producen o liberan durante la fermentación, por el método de cromatografía de gases.
- La bebida fermentada de zarzamora que se formuló en esta investigación, podría ayudar a futuras investigaciones sobre el tratamiento de enfermedades ocasionadas por microorganismos patógenos en un modelo experimental en ratas infectadas con diferentes cepas patógenas.

XI REFERENCIAS

1. Singh GM, Micha R, Khatibzadeh S, Shi P, Lim S, Andrews KG, et al. Global, regional, and national consumption of sugar-sweetened beverages, fruit juices, and milk: A systematic assessment of beverage intake in 187 countries. PLoS One. 2015 Aug 5;10(8).

2. Instituto Nacional de Salud Pública. Bebidas azucaradas y muertes en México [Internet]. Gobierno de México. 2020 [cited 2021 Feb 7]. Available from: https://www.insp.mx/avisos/bebidas-azucaradas-y-muertes-en-mexico

3. Płonka J, Toczek A, Tomczyk V. Multivitamin Analysis of Fruits, Fruit-Vegetable Juices, and Diet Supplements. Food Anal Methods. 2012;5(5):1167–76.

4. Bujna E, Farkas NA, Tran AM, Dam MS, Nguyen QD. Lactic acid fermentation of apricot juice by mono- and mixed cultures of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains. Food Sci Biotechnol. 2018;27(2):547–54.

5. Chwastek A, Klewicka E, Klewicki R, Sójka M. Lactic Acid Fermentation of Red Beet Juice Supplemented with Waste Highbush Blueberry-Sucrose Osmotic Syrup as a Method of Probiotic Beverage Production. J Food Process Preserv. 2016;40(4):780–9.

6. Costa MGM, Fonteles TV, De Jesus ALT, Rodrigues S. Sonicated pineapple juice as substrate for L. casei cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. Food Chem. 2013 Aug 15;139(1–4):261–6.

7. Picon A. Cheese microbial ecology and safety. In: Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics. Wiley-IEEE Press; 2017. p. 71–99.

8. König H, Fröhlich J. Lactic acid bacteria. In: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer International Publishing; 2017. p. 3–41.

9. Bintsis T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. AIMS Microbiol. 2018;4(4):665–84.

10. Tarrah A, De Castilhos J, Rossi RC, Da Silva Duarte V, Ziegler DR, Corich V, et al. In vitro probiotic potential and anti-cancer activity of newly isolated folate-producing streptococcus thermophilus strains. Front Microbiol. 2018;9.

11. Bautista-Gallego J, Ferrocino I, Botta C, Ercolini D, Cocolin L, Rantsiou K. Probiotic potential of a Lactobacillus rhamnosus cheese isolate and its effect on the fecal microbiota of healthy volunteers. Food Res Int. 2019;119:305–14.

12. Pessione E, Cirrincione S. Bioactive molecules released in food by lactic acid bacteria: Encrypted peptides and biogenic amines. Front Microbiol. 2016;7.

13. Hayek SA, Ibrahim SA. Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. Food Nutr Sci. 2013;4:73–87.

14. Neffe-Skocińska K, Rzepkowska A, Szydłowska A, Kołozyn-Krajewska D. Trends and Possibilities of the Use of Probiotics in Food Production. Altern Replace Foods. 2018;17:65–94.

15. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. Clin Microbiol Rev. 2003 Oct;16(4):658–72.

16. FAO. Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation FAO Food and nutrition paper. 2001.

17. Olveira G, González-Molero I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. Endocrinol y Nutr. 2016;63(9):482–94.

18. George Kerry R, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin HS, Das G. Benefaction of probiotics for human health: A review. J Food Drug Anal. 2018;26(3):927–39.

19. Bongaerts GPA, Severijnen RSVM. A reassessment of the propatria study and its implications for probiotic therapy. Nat Biotechnol. 2016;34(1):55–63.

20. Havenaar R, Huis In't Veld JHJ. Probiotics: A General View. Lact Acid Bact Vol 1. 1992;151–70.

21. Grover S, Rashmi HM, Srivastava AK, Batish VK. Probiotics for human health -new innovations and emerging trends. Gut Pathog. 2012;4(1):1–14.

22. Karimi G, Sabran MR, Jamaluddin R, Parvaneh K, Mohtarrudin N, Ahmad Z, et al. The anti-obesity effects of Lactobacillus casei strain Shirota versus Orlistat on high fat diet-induced obese rats. Food Nutr Res. 2015;59(1).

23. Cammarota G, Ianiro G, Cianci R, Bibbò S, Gasbarrini A, Currò D. The involvement of gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: Potential for therapy. Pharmacol Ther. 2015;149:191–212.

24. Cammarota G, Pecere S, Ianiro G, Masucci L, Currò D. Principles of DNA-Based Gut Microbiota Assessment and Therapeutic Efficacy of Fecal Microbiota Transplantation in Gastrointestinal Diseases. Dig Dis. 2016;34(3):279–85.

25. Malhotra M, Tomaro C, Stemonix D, Prakash S, Bioanal Biomed J. Identification of Lactobacillus Fermentum Strains with Potential against Colorectal Cancer by Characterizing Short Chain Fatty Acids Production, Anti-Proliferative Activity and Bioanalysis & Biomedicine. Artic J Bioanal Biomed. 2015;7(4):4.

26. Song S, Lee SJ, Park DJ, Oh S, Lim KT. The anti-allergic activity of Lactobacillus plantarum L67 and its application to yogurt. J Dairy Sci. 2016;99(12):9372–82.

27. Umbrello G, Esposito S. Microbiota and neurologic diseases: Potential effects of probiotics. J Transl Med. 2016;14(1):298.

28. Heylen K, Hoefman S, Vekeman B, Peiren J, De Vos P. Safeguarding bacterial resources promotes biotechnological innovation. Appl Microbiol Biotechnol. 2012;94(3):565–74.

29. Gallut P. Aislamiento y cultivo de microorganismos asociados a oncoides de mamantiales hidrotermales de Santispac, Bahía Concepción, B.C.S. México. [La Paz, Baja California Sur]: Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S. C.; 2016.

30. García-Ruiz A, González de Llano D, Esteban-Fernández A, Requena T, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. Food Microbiol. 2014;44:220–5.

31. Soccol CR, Porto De Souza Vandenberghe L, Spier MR, Bianchi A, Medeiros P, Yamaguishi CT, et al. The Potential of Probiotics: A Review. Food Technol Biotechnol. 2010;48(4):413–34.

32. Vitali B, Minervini G, Rizzello CG, Spisni E, Maccaferri S, Brigidi P, et al. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. Food Microbiol. 2012;31(1):116–25.

33. Ray RC. Microbial Biotechnology in Horticulture. CRC Press; 2006.

34. Ranjan Swain M, Anandharaj M, Chandra Ray R, Parveen Rani R. Fermented Fruits and Vegetables of Asia: A Potential Source of Probiotics. 2014;

35. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(8):601–8.

36. Garcia L. Clinical Microbiology Procedures Handbook . Vol. 3. 2010.

37. MacFaddin JF. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3rd ed. 2003. 309–310 p.

38. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 2004;17(4):840–62.

39. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, Scola B La, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis. 2009;49(4):543–51.

40. Escalante A, Martha G-G, Guadalupe E, Violeta M, Rubén M, Agustín L-M, et al. Pulque fermentation. In: Erten H, Tanguler H, editors. Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology, Second Edition. 2nd ed. CRC Press; 2012. p. 657–64.

41. Valadez-Blanco R, Bravo-Villa G, Santos-Sánchez NF, Velasco-Almendarez SI, Montville TJ. The Artisanal Production of Pulque, a Traditional Beverage of the Mexican Highlands. Probiotics Antimicrob Proteins. 2012;4(2):140–4.

42. Cervantes-Elizarrarás A, Cruz-Cansino N del S, Ramírez-Moreno E, Vega-Sánchez V, Velázquez-Guadarrama N, Zafra-Rojas QY, et al. In vitro probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from aguamiel and pulque and antibacterial activity against pathogens. Appl Sci. 2019 Feb;9(3).

43. Isabel Enríquez-Salazar M, Veana F, Aguilar CN, De la Garza-Rodríguez IM, López MG, Rutiaga-Quiñones OM, et al. Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from Agave salmiana and A. atrovirens during different seasons of year. Food Sci

Biotechnol. 2017;26(4):1003–11.

44. Villarreal Morales SL, Enríquez Salazar MI, Michel Michel MR, Flores Gallegos AC, Montañez-Saens J, Aguilar CN, et al. Metagenomic Microbial Diversity in Aguamiel from Two Agave Species During 4-Year Seasons. Food Biotechnol. 2019;33(1):1–16.

45. Alcántara-Zavala AE, Figueroa-Cárdenas J de D, Pérez-Robles JF, Arámbula-Villa G, Miranda-Castilleja DE. Thermosonication as an alternative method for processing, extending the shelf life, and conserving the quality of pulque: A non-dairy Mexican fermented beverage. Ultrason Sonochem. 2021;70:105290.

46. Chacón-Vargas K, Torres J, Giles-Gómez M, Escalante A, Gibbons JG. Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. Sci Reports 2020 101. 2020;10(1):1–13.

47. Barache N, Ladjouzi R, Belguesmia Y, Bendali F, Drider D. Abundance of Lactobacillus plantarum Strains with Beneficial Attributes in Blackberries (Rubus sp.), Fresh Figs (Ficus carica), and Prickly Pears (Opuntia ficus-indica) Grown and Harvested in Algeria. Probiotics Antimicrob Proteins. 2020;12(4):1514–23.

48. Cervantes-Elizarrarás A. Bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales: capacidad probiótica y de inhibición del desarrollo de Helicobacter pylori. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2019.

49. Di Cagno R, Surico RF, Paradiso A, De Angelis M, Salmon JC, Buchin S, et al. Effect of autochthonous lactic acid bacteria starters on health-promoting and sensory properties of tomato juices. Int J Food Microbiol. 2009;128(3):473–83.

50. García C, Rendueles M, Díaz M. Liquid-phase food fermentations with microbial consortia involving lactic acid bacteria: A review. Food Res Int. 2019;119:207–20.

51. Bronstein JL. The evolution of facilitation and mutualism. J Ecol. 2009;97(6):1160–70.

52. Takimoto G, Suzuki K. Global stability of obligate mutualism in community modules with facultative mutualists. Oikos. 2016;125(4):535–40.

53. Arqués JL, Rodríguez E, Langa S, Landete JM, Medina M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: Effect on pathogens. Biomed Res Int. 2015;2015.

54. Terpou A, Papadaki A, Lappa IK, Kachrimanidou V, Bosnea LA, Kopsahelis N. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. Nutrients. 2019;11(7):1591.

55. Adams CA. The probiotic paradox: Live and dead cells are biological response modifiers. Nutr Res Rev. 2010;23(1):37–46.

56. Melini F, Melini V, Luziatelli F, Ficca AG, Ruzzi M. Health-Promoting Components in Fermented Foods: An Up-to-Date Systematic Review. Nutrients. 2019;11(5):1189.

57. Frias J, Martinez-Villaluenga C, Peñas E. Fermented foods in health and disease prevention. Elsevier; 2017.

58. Smit G, Smit BA, Engels WJM. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FEMS Microbiol Rev. 2005;29(3):591–610.

59. Kabak B, Dobson ADW. An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. Crit Rev Food Sci Nutr. 2011;51(3):248–60.

60. Wu C, Huang J, Zhou R. Genomics of lactic acid bacteria: Current status and potential applications. Vol. 43, Critical Reviews in Microbiology. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 393–404.

61. Hummer KE. Rubus Pharmacology: Antiquity to the Present. Am Soc Hortic Sci. 2010;45(11):1587–91.

62. Verma R, Gangrade T, Ghulaxe C, Punasiya R. Rubus fruticosus (blackberry) use as an herbal medicine. Pharmacogn Rev. 2014 Jun;8(16):101.

63. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. Frutas del bosque arándano, frambuesa, zarzamora. Mexicanas planeación agrícola nacional. 2017.

64. Ávila E. Programa De Apoyo Agrícola Y Agroindustrial Vicepresidencia De Fortalecimiento Empresarial Cámara De Comercio De Bogotá. Cámara de Comercio de Bogotá. 2015.

65. Food Agriculture and Fisheries Information Service. 2012-2018 Food and agricultural atlas. 2018;126–7.

66. Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. Resumen Nacional Intención de cosecha 2018 CULTIVO : Agave Intención de cosecha 2018. 2018.

67. Zhao Y, editor. Berry Fruit. CRC Press; 2007.

68. National Nutrient Database for Standard Reference. National Nutrient Database for Standard Reference Release 1 April , 2018 Basic Report 02004 , Spices , bay leaf. 2019;2018–9.

69. Zamora S. JD. Antioxidants: Micronutrients fighting for health. Rev Chil Nutr. 2007;34(1).

70. Kaume L, Howard LR, Devareddy L. The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. J Agric Food Chem. 2012;60(23):5716–27.

71. Monforte MT, Smeriglio A, Germanò MP, Pergolizzi S, Circosta C, Galati EM. Evaluation of antioxidant, antiinflammatory, and gastroprotective properties of Rubus fruticosus L. fruit juice. Phyther Res. 2018;32:1404–14.

72. Zafra-Rojas Q, Cruz-Cansino N, Delgadillo-Ramírez A, Alanís-García E, Añorve-Morga J, Quintero-Lira A, et al. Organic Acids, Antioxidants, and Dietary Fiber of Mexican Blackberry (Rubus fruticosus) Residues cv. Tupy. J Food Qual. 2018;2018:1–10.

73. Cervantes-Elizarrarás A, Piloni-Martini J, Ramírez-Moreno E, Alanís-García E, Güemes-Vera N, Gómez-Aldapa CA, et al. Enzymatic inactivation and antioxidant properties of blackberry juice after thermoultrasound: Optimization using response surface methodology. Ultrason Sonochem. 2017;34:371–9.

74. Koczka N, Stefanovits-Bányai É, Prokaj E. Element composition, total phenolics and antioxidant activity of wild and cultivated blackberry (Rubus fruticosus L.) fruits and leaves during the harvest time. Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca. 2018;46(2):563–9.

75. Oszmiański J, Nowicka P, Teleszko M, Wojdyło A, Cebulak T, Oklejewicz K. Analysis of phenolic compounds and antioxidant activity in wild blackberry fruits. Int J Mol Sci. 2015;16(7):14540–53.

76. Domínguez-Avila JA, Wall-Medrano A, Velderrain-Rodríguez GR, Chen CYO, Salazar-López NJ, Robles-Sánchez M, et al. Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. Food Funct. 2017;8(1):15–38.

77. Zia-Ul-Haq M, Riaz M, De Feo V, Jaafar HZE, Moga M. Rubus fruticosus L.: Constituents, biological activities and health related uses. Molecules. 2014;19(8):10998–1029.

78. Baby B, Antony P, Vijayan R. Antioxidant and anticancer properties of berries. Crit Rev Food Sci Nutr. 2018;58(15):2491–507.

79. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, Lleonart ME. Article in press. Oxidative stress and cancer : An overview. Ageing Res Rev. 2012;

80. Farzaei MH, Abdollahi M, Rahimi R. Role of dietary polyphenols in the management of peptic ulcer. World J Gastroenterol. 2015;21(21):6499–517.

81. Smeriglio A, Barreca D, Bellocco E, Trombetta D. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. Phyther Res. 2016;30(8):1265–86.

82. Chen H, Yu W, Chen G, Meng S, Xiang Z, He N. Antinociceptive and antibacterial properties of anthocyanins and flavonols from fruits of black and non-black mulberries. Molecules. 2018;23(1).

83. O'Shea N, Arendt EK, Gallagher E. Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. Vol. 16, Innovative Food Science and Emerging Technologies. Elsevier Ltd; 2012. p. 1–10.

84. Gidley MJ, Yakubov GE. Functional categorisation of dietary fibre in foods: Beyond 'soluble' vs 'insoluble.' Trends Food Sci Technol. 2019;86(4):563–8.

85. Hoover DG. Ultrasound. J food Saf. 2000;65(8):93–5.

86. Mason TJ, Vinatoru M. Ultrasonically Assisted Extraction in Food Processing and the Challenges of Integrating Ultrasound into the Food Industry. Ultrasound Food Process. 2017 Mar 24;329–53.

87. Zafra-Rojas QY, González-Martínez BE, Cruz-Cansino N del S, López-Cabanillas M, Suárez-Jacobo Á, Cervantes-Elizarrarás A, et al. Effect of Ultrasound on In Vitro Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Blackberry (Rubus fruticosus) Residues cv. Tupy. Plant Foods Hum Nutr. 2020;75(4):608–13.

88. Yasui K. Fundamentals of acoustic cavitation and sonochemistry. In: Theoretical and Experimental Sonochemistry Involving Inorganic Systems. Springer Netherlands; 2011. p. 1–29.

89. Dolatowski ZJ, Stadnik J, Stasiak D. Corresponding author-Adres do korespondencji: Prof. dr hab. in aplicattions of ultrasound in food technology. Vol. 6, ACTA Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 2007.

90. Ercan SŞ, Soysal Ç. Use of ultrasound in food preservation. Nat Sci. 2013;05(08):5–13.

91. Ramírez-Melo, L. M., Hernández-Traspeña, J. L., Cruz-Cansino, N. del S., Delgado-Olivares, L., Ramírez-Moreno, E., Ariza-Ortega, J. A., & Alanís-García E. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del jugo de betabel (Beta vulgaris L.) termoultrasonicado. Educ Y Salud Boletín Científico Inst Ciencias La Salud Univ Autónoma Del Estado Hidalgo. 2019;7(14):60–4.

92. Fonteles TV, Costa MGM, de Jesus ALT, de Miranda MRA, Fernandes FAN, Rodrigues S. Power ultrasound processing of cantaloupe melon juice: Effects on quality parameters. Food Res Int. 2012;48(1):41–8.

93. Anaya-Esparza LM, Velázquez-Estrada RM, Roig AX, García-Galindo HS, Sayago-Ayerdi SG, Montalvo-González E. Thermosonication: An alternative processing for fruit and vegetable juices. Trends Food Sci Technol. 2017;61:26–37.

94. De Jesus Manriquez-Torres J, Sánchez-Franco JA, Ramírez-Moreno E, Del Socorro Cruz-Cansino N, Ariza-Ortega JA, Torres-Valencia JM. Effect of thermoultrasound on the antioxidant compounds and fatty acid profile of Blackberry (Rubus fruticosus spp.) juice. Molecules. 2016;21(12).

95. Cruz-Cansino NDS, Montiel-Columna NI, Bautista-Velueta PG, Pérez-Tinoco MR, Alanís-García E, Ramírez-Moreno E. Optimization of Thermoultrasound Conditions for the

Processing of A Prickly Pear Juice Blend (Opuntia Ficus Indica) Using Response Surface Methodology. J Food Qual. 2016;39(6):780–91.

96. Kwaw E, Ma Y, Tchabo W, Apaliya MT, Wu M, Sackey AS, et al. Effect of lactobacillus strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. Food Chem. 2018;250:148–54.

97. Hur SJ, Lee SY, Kim YC, Choi I, Kim GB. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. Food Chem. 2014;160:346–56.

98. Hashemi SMB, Mousavi Khaneghah A, Barba FJ, Nemati Z, Sohrabi Shokofti S, Alizadeh F. Fermented sweet lemon juice (Citrus limetta) using Lactobacillus plantarum LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. J Funct Foods. 2017;38:409–14.

99. Kaprasob R, Kerdchoechuen O, Laohakunjit N, Sarkar D, Shetty K. Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. Process Biochem. 2017 Aug 1;59:141–9.

100. Ricci A, Cirlini M, Calani L, Bernini V, Neviani E, Del Rio D, et al. In vitro metabolism of elderberry juice polyphenols by lactic acid bacteria. Food Chem. 2019 Mar 15;276:692–9.

101. Nguyen BT, Bujna E, Fekete N, Tran ATM, Rezessy-Szabo JM, Prasad R, et al. Probiotic Beverage From Pineapple Juice Fermented With Lactobacillus and Bifidobacterium Strains. Front Nutr. 2019;6.

102. Verón HE, Gauffin Cano P, Fabersani E, Sanz Y, Isla MI, Fernández Espinar MT, et al. Cactus pear (Opuntia ficus-indica) juice fermented with autochthonous Lactobacillus plantarum S-811. Food Funct. 2019;10(2):1085–97.

103. Markkinen N, Laaksonen O, Nahku R, Kuldjärv R, Yang B. Impact of lactic acid fermentation on acids, sugars, and phenolic compounds in black chokeberry and sea buckthorn juices. Food Chem. 2019;286:204–15.

104. Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria [Internet]. [cited 2020 Sep 5]. Available from: https://www.who.int/es/news-room/detail/03-12-2015-who-s-first-ever-

global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths

105. Lugo ZL. Propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y antioxidantes de un yogurt liquido adicionado con un liofilizado de jugo de tuna (Opuntia ficus-indica) ultrasonicado. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2018.

106. Fuentes Cuiñas AA, Vailati PA, Lazzatti GL. Vegetarianismo y veganismo: percepciones en el consumo de bebidas de origen vegetal en el Área Metropolitana de Buenos Aires. RIVAR (Santiago). 2020;7(21):124–35.

107. Uscanga-Domínguez LF, Orozco-García IJ, Vázquez-Frias R, Aceves-Tavares GR, Albrecht-Junnghans RE, Amieva-Balmori M, et al. Posición técnica sobre la leche y derivados lácteos en la salud y en la enfermedad del adulto de la Asociación Mexicana de Gastroenterología y la Asociación Mexicana de Gerontología y Geriatría. Rev Gastroenterol México. 2019;84(3):357–71.

108. Rodríguez PA, Arenas R. Hans Christian Gram y su tinción Hans Christian Gram and His Staining. 2018.

109. Ismail YS, Yulvizar C, Mazhitov B. Characterization of lactic acid bacteria from local cows milk kefir. IOP Conf Ser Earth Environ Sci. 2018;130(1):012019.

110. Olmos AF, de la Fuente CG, Nieto JAS, Ramos S V. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. 2010.

111. Iañez. Agentes físicos [Internet]. 2005 [cited 2021 Feb 14]. Available from: https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm

112. Yelnetty A, Purnomo H, Purwadi, Mirah A. Biochemical characteristics of lactic acid bacteria with proteolytic activity and capability as starter culture isolated from spontaneous fermented local goat milk. J Nat Sci Res. 2014;4(10):137–46.

113. México UNA de. Protocolo de prácticas, Microbiología experimental. 2012.

114. Atlas RM. BR. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4th ed. Madrid, España: Pearson-Addison Wesley; 2002.

115. Sepúlveda-Torre L, Aguilar CN. Cinética microbiana de microorganismos biofertilizantes. In: Flores Gallegos AC, González V, Aguilar CN, Rodríguez HR, editors. Biofertilizantes microbianos. 1st ed. México ; 2014. p. 343–63.

116. Strahsburger, E., Retamales, P., Estrada, J., y Seeger M. Método de la microgota: usado con agar cromogénico es un procedimiento útil para el monitoreo sanitario en acuicultura. Lat Am J Aquat Res. 2016;44(4):742–9.

117. Rugama FA, Castillo Y. Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. 2010.

118. Shirai Matsumoto Keiko, Frida MS. Manuel de prácticas de laboratorio. Tecnología de Fermentaciones Alimentarias. México; 2013.

119. Kyung YY, Woodams EE, Hang YD. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. LWT - Food Sci Technol. 2005;38(1):73–5.

120. Cai W, Tang F, Zhao X, Guo Z, Zhang Z, Dong Y, et al. Different lactic acid bacteria strains affecting the flavor profile of fermented jujube juice. J Food Process Preserv. 2019;43(9).

121. Álzate Rodríguez, Edwin Jhovany; Montes Ocampo, José William; Escobar Escobar RM. Acondicionamiento del sensor de pH y temperatura para realizar titulaciones potenciométricas. Sci Tech. 2012;17(51):188–96.

122. Official Methods of Analysis. Acidity (Titratable) of Fruit Products (942.15). 1999.

123. Torres De Freitas, Ameysa Durán Z, Rodríguez C. Acidez Tiulable como control de calidad para la leche humana. Arch Venez Pueric Pediatr. 2009;72(2):92–6.

124. Pérez-Trejo, L., Sánchez, A. F. M., y Mercado AP. Determinación de la viscosidad de fluidos newtonianos y no newtonianos (una revisión del viscosímetro de Couette). Latin-American J Phys Educ. 2010;4(1):36.

125. Dak M, Verma RC, Jaaffrey SNA. Effect of temperature and concentration on Rheological properties of “Kesar” mango juice. J Food Eng. 2007;80(4):1011–5.

126. Cruz, N., Capellas, M., Hernández, M., Trujillo, A. J., Guamis, B., & Ferragut V. Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. Food Res Int. 2007;40(6):725–723.

127. Acebo-González D, Hernández-García AT. Los métodos turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. Vol. 44, Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2013.

128. Versteeg, C., Rombouts, F. M., Spaansen, C. H., Pilnik W. Thermostability and orange juice cloud destabilizing properties of multiple pestinesterases from orange. Food Sci. 1980;45:969–72.

129. Meydav, S., Saguy, I., Kopelman IJ. Browning determination in citrus products. J Agric Food Chem. 1977;25:602–4.

130. Stintzing FC, Herbach KM, Mosshammer MR, Carle R, Yi W, Sellappan S, et al. Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (Opuntia spp.) clones. J Agric Food Chem. 2005 Jan 26;53(2):442–51.

131. Wallace TC, Giusti MM. Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from Berberis boliviana L. as compared to other natural/synthetic colorants. J Food Sci. 2008;73(4).

132. Kuskoski, E., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. y Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Cienc e Tecnol Aliment. 2005;25:726–32.

133. Londoño LJ. Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. In: Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia. Corporación Universitaria Lasallista; 2012. p. 130–62.

134. Morales, F. J. and Jiménez- Pérez S. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to color and fluorescence. J Agric Food Chem. 2001;71:19–125.

135. García, J. R., De la Rosa, L. A., Herrera, D. G., González, B. A. G., López, D. J. A., González, A. G. A., Ruiz, C. S. y Álvarez PE. Cuantificación de polifenoles y capacidad antioxidante en duraznos comercializados en la ciudad de Juárez, México. Tecnociencia. 2011;5(2):67–75.

136. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., and Byrne DH. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. J Food Compos Anal. 2006;19(6):669–75.

137. Gulcin I, Buyukokuroglu ME, Kufrevioglu OI. Metal chelating and hydrogen peroxide scavenging effects of melatonin. J Pineal Res. 2003;34(4):278–81.

138. Junco Díaz Raquel, Rodríguez Pérez Carlos. Cultivo y crecimiento de los microorganismos. In: Llop A, Váldes M, Zuazo J, editors. Microbiología y parasitología médicas. 1st ed. Ciencias Médicas; 201AD. p. 45–54.

139. Ringø E, Hoseinifar SH, Ghosh K, Doan H Van, Beck BR, Song SK. Lactic acid bacteria in finfish-An update. Front Microbiol. 2018;9:1818.

140. Mohamad N, Manan H, Sallehhuddin M, Musa N, Ikhwanuddin M. Screening of Lactic Acid Bacteria isolated from giant freshwater prawn (Macrobrachium rosenbergii) as potential probiotics. Aquac Reports. 2020;18:100523.

141. Esaú López-Jácome L, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Ortega-Peña S, Cerón-González G, Franco-Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Mediagraphic. 2014;3(1):10–8.

142. Latorre D. I. Caracterización bioquímica y tecnológica de cepas acido lácticas aisladas de leche cruda de oveja en el proceso de elaboración de queso artesano de teruel. 2011.

143. Özogul F, Hamed I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017;58(10):1660–70.

144. Rinita A, Koshy P, Yudha Endra P, Endang P. Characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from dadiah sampled in West Sumatra. Food Sci Technol. 2020;(AHEAD).

145. Vanniyasingam J, Kapilan R, Vasantharuba S. Isolation and characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from cow milk and milk products. 2019;13(1).

146. Al-Hulu SM. Antibacterial activity for bacteriocin produced by lactic acid bacteria against clinical bacterial isolates. Res J Pharm Technol. 2019;12(9):4205–8.

147. Hidayat MN, Hidayat MN, Malaka R, Agustina L, Pakiding W. Characteristics Isolate Bacteria Lactic Acid of Origin Digestive Tract of Broiler as Probiotic Candidate for Poultry

. Int J Sci Eng Res. 2018;9(2).

148. Mbye M, Baig MA, AbuQamar SF, El-Tarabily KA, Obaid RS, Osaili TM, et al. Updates on understanding of probiotic lactic acid bacteria responses to environmental stresses and highlights on proteomic analyses. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2020;19(3):1110–24.

149. Chen MJ, Tang HY, Chiang ML. Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic Lactobacillus kefiranofaciens M1. Food Microbiol. 2017;66:20–7.

150. Hernández-Alcántara AM, Wacher C, Llamas MG, López P, Pérez-Chabela ML. Probiotic properties and stress response of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked meat products. LWT - Food Sci Technol. 2018;91:249–57.

151. Guzzo J. Biotechnical applications of small heat shock proteins from bacteria. Int J Biochem Cell Biol. 2012;44(10):1698–705.

152. Song S, Bae DW, Lim K, Griffiths MW, Oh S. Cold stress improves the ability of Lactobacillus plantarum L67 to survive freezing. Int J Food Microbiol. 2014;191:135–43.

153. Louesdon S, Charlot-Rougé S, Tourdot-Maréchal R, Bouix M, Béal C. Membrane fatty acid composition and fluidity are involved in the resistance to freezing of Lactobacillus buchneri R1102 and Bifidobacterium longum R0175. Microb Biotechnol. 2015;8(2):311–8.

154. Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula-Lopes FF, Al-Katanani YM, Krininger CE, et al. Adverse impact of heat stress on embryo production: Causes and strategies for mitigation. Theriogenology. 2001;55(1):91–103.

155. I. D, Gottardi D, Montanari C, Gianotti A. Dynamic Stresses of Lactic Acid Bacteria Associated to Fermentation Processes. In: Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes. InTech; 2013.

156. Fonseca F, Pénicaud C, Tymczyszyn EE, Gómez-Zavaglia A, Passot S. Factors influencing the membrane fluidity and the impact on production of lactic acid bacteria starters. Appl Microbiol Biotechnol. 2019;103(17):6867–83.

157. Montanari C, Sado Kamdem SL, Serrazanetti DI, Etoa FX, Guerzoni ME. Synthesis of

cyclopropane fatty acids in Lactobacillus helveticus and Lactobacillus sanfranciscensis and their cellular fatty acids changes following short term acid and cold stresses. Food Microbiol. 2010;27(4):493–502.

158. Mulaw G, Sisay Tessema T, Muleta D, Tesfaye A. Vitro Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Some Traditionally Fermented Ethiopian Food Products. Int J Microbiol. 2019;

159. Guan N, Liu L. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2020;104(1):51–65.

160. Pérez Montoro B, Benomar N, Caballero Gómez N, Ennahar S, Horvatovich P, Knapp CW, et al. Proteomic analysis of Lactobacillus pentosus for the identification of potential markers involved in acid resistance and their influence on other probiotic features. Food Microbiol. 2018;72:31–8.

161. Călinescu O, Paulino C, Kühlbrandt W, Fendler K. Keeping it simple, transport mechanism and pH regulation in Na +/H+ exchangers. J Biol Chem. 2014;289(19):13168–76.

162. Sun Y. F1F0-ATPase Functions Under Markedly Acidic Conditions in Bacteria. In: Regulation of Ca2+-ATPases,V-ATPases and F-ATPases. Springer International Publishing; 2016. p. 459–68.

163. Wu C, Zhang J, Chen W, Wang M, Du G, Chen J. A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acid-induced alterations in Lactobacillus casei Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance. Appl Microbiol Biotechnol. 2012;93(2):707–22.

164. Yalçınkaya S, Kılıç GB. Isolation, identification and determination of technological properties of the halophilic lactic acid bacteria isolated from table olives. J Food Sci Technol. 2019;56(4):2027–37.

165. Åvall-Jääskeläinen S, Palva A. Lactobacillus surface layers and their applications. FEMS Microbiol Rev. 2005;29(3):511–29.

166. Palomino MM, Waehner PM, Fina Martin J, Ojeda P, Malone L, Sánchez Rivas C, et al. Influence of osmotic stress on the profile and gene expression of surface layer proteins in Lactobacillus acidophilus ATCC 4356. Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100(19):8475–84.

167. Reuben RC, Roy PC, Sarkar SL, Alam RU, Jahid IK. Isolation, characterization, and assessment of lactic acid bacteria toward their selection as poultry probiotics. BMC Microbiol. 2019;19(1):1–20.

168. Metris A, George SM, Mulholland F, Carter AT, Baranyi J. Metabolic shift of Escherichia coli under salt stress in the presence of glycine betaine. Appl Environ Microbiol. 2014;80(15):4745–56.

169. Benavides AB, Ulcuango M, Yépez L, Tenea GN. Assessment of the in vitro bioactive properties of lactic acid bacteria isolated from native ecological niches of Ecuador. Rev Argent Microbiol. 2016;48(3):236–44.

170. Fessard A, Remize F. Genetic and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from tropically grown fruits and vegetables. Int J Food Microbiol. 2019 Jul 16;301:61–72.

171. Yazgan H, Kuley E, Güven Gökmen T, Regenstein JM, Özogul F. The antimicrobial properties and biogenic amine production of lactic acid bacteria isolated from various fermented food products. J Food Process Preserv. 2021;45(1).

172. Karyantina M, Anggrahini S, Utami T, Rahayu ES. Moderate Halophilic Lactic Acid Bacteria from Jambal roti: A Traditional Fermented Fish of Central Java, Indonesia. J Aquat Food Prod Technol. 2020;29(10):990–1000.

173. Canon F, Nidelet T, Guédon E, Thierry A, Gagnaire V. Understanding the Mechanisms of Positive Microbial Interactions That Benefit Lactic Acid Bacteria Co-cultures. Front Microbiol. 2020 Sep;11.

174. Sieuwerts S, De Bok FAM, Hugenholtz J, Van Hylckama Vlieg JET. Unraveling microbial interactions in food fermentations: From classical to genomics approaches. Appl Environ Microbiol. 2008;74(16):4997–5007.

175. Jurado-Gámez H, Ramírez C, Aguirre D. Cinética de fermentación de Lactobacillus plantarum en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico. Vet y Zootec. 2013;7(2):31–53.

176. Toe CJ, Foo HL, Loh TC, Mohamad R, Abdul Rahim R, Idrus Z. Extracellular Proteolytic

Activity and Amino Acid Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Malaysian Foods. Int J Mol Sci. 2019;20(7):1777.

177. Zotta T, Parente E, Ricciardi A. Aerobic metabolism in the genus Lactobacillus: impact on stress response and potential applications in the food industry. J Appl Microbiol. 2017;122(4):857–69.

178. Bruno P, Effie T. Taxonomy and metabolism of Lactobacillus Streptococcus macedonicus genomics View project MIRRI-Microbial Resource Research Infrastructure (Preparatory Phase) View project. 2009.

179. García C, Rendueles M, Díaz M. Microbial amensalism in Lactobacillus casei and Pseudomonas taetrolens mixed culture. Bioprocess Biosyst Eng. 2017;40(7):1111–22.

180. Uzelac G, Miljkovic M, Lozo J, Radulovic Z, Tosic N, Kojic M. Expression of bacteriocin LsbB is dependent on a transcription terminator. Microbiol Res. 2015;179:45–53.

181. Eijsink VGH, Axelsson L, Diep DB, Håvarstein LS, Holo H, Nes IF. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2002;81(1–4):639–54.

182. Héchard Y, Sahl HG. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. Biochimie. 2002;84(5–6):545–57.

183. Breukink E, de Kruijff B. Lipid II as a target for antibiotics. Nat Rev Drug Discov. 2006;5(4):321–3.

184. Machaidze G, Seelig J. Specific Binding of Cinnamycin (Ro 09-0198) to Phosphatidylethanolamine. Comparison between Micellar and Membrane Environments. Biochemistry. 2003;42(43):12570–6.

185. Pei J, Jin W, Abd El-Aty AM, Baranenko DA, Gou X, Zhang H, et al. Isolation, purification, and structural identification of a new bacteriocin made by Lactobacillus plantarum found in conventional kombucha. Food Control. 2020;110:106923.

186. Begunova A V., Rozhkova I V., Shirshova TI, Glazunova OA, Fedorova T V. Optimization of Cultivation Conditions for the Lactobacillus reuteri LR1 Strain to Improve the

Biosynthesis of Bacteriocin-Like Substances. Appl Biochem Microbiol. 2020;56(9):920–9.

187. Debabov D V., Kiriukhin MY, Neuhaus FC. Biosynthesis of lipoteichoic acid in Lactobacillus rhamnosus: Role of DltD in D-alanylation. J Bacteriol. 2000;182(10):2855–64.

188. Nakao A, Imai S ichiro, Takano T. Transposon-mediated insertional mutagenesis of the D-alanyl-lipoteichoic acid (dlt) operon raises methicillin resistance in Staphylococcus aureus. Res Microbiol. 2000;151(10):823–9.

189. Kumariya R, Garsa AK, Rajput YS, Sood SK, Akhtar N, Patel S. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. Microb Pathog. 2019;128:171–7.

190. Khatib TO, Stevenson H, Yeaman MR, Bayer AS, Pokorny A. Binding of daptomycin to anionic lipid vesicles is reduced in the presence of lysyl-phosphatidylglycerol. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60(8):5051–3.

191. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. Microb Ecol Heal Dis. 2015;26(0).

192. Sommer AJ, Newell PD. Metabolic basis for mutualism between gut bacteria and its impact on the drosophila melanogaster host. Appl Environ Microbiol. 2019;85(2).

193. Amor DR, Bello MD. Bottom-up approaches to synthetic cooperation in microbial communities. Life. 2019;9(1):22.

194. Pellegrino MS, Frola ID, Natanael B, Gobelli D, Nader-Macias MEF, Bogni CI. In Vitro Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Milk as Potential Probiotic Strains to Prevent Bovine Mastitis. Probiotics Antimicrob Proteins. 2019;11(1):74–84.

195. Yang E, Fan L, Yan J, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S, et al. Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. AMB Express. 2018;8(1).

196. Xu Y, Zhou T, Tang H, Li X, Chen Y, Zhang L, et al. Probiotic potential and amylolytic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese fermented cereal foods. Food

Control. 2020;111.

197. Garcia EF, Luciano WA, Xavier DE, da Costa WCA, Oliveira K de S, Franco OL, et al. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected Lactobacillus strains. Front Microbiol. 2016;7:1371.

198. Abid Y, Casillo A, Gharsallah H, Joulak I, Lanzetta R, Corsaro MM, et al. Production and structural characterization of exopolysaccharides from newly isolated probiotic lactic acid bacteria. Int J Biol Macromol. 2018;108:719–28.

199. George F, Daniel C, Thomas M, Singer E, Guilbaud A, Tessier FJ, et al. Occurrence and dynamism of lactic acid bacteria in distinct ecological niches: A multifaceted functional health perspective. Front Microbiol. 2018;9(NOV):2899.

200. Chen C, Lu Y, Yu H, Chen Z, Tian H. Influence of 4 lactic acid bacteria on the flavor profile of fermented apple juiceInfluence of 4 lactic acid bacteria. Food Biosci. 2019 Feb 1;27:30–6.

201. Peng W, Meng D, Yue T, Wang Z, Gao Z. Effect of the apple cultivar on cloudy apple juice fermented by a mixture of Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum, and Lactobacillus fermentum. Food Chem. 2021;340:127922.

202. Kwaw E, Ma Y, Tchabo W, Apaliya MT, Xiao L, Li X, et al. Effect of fermentation parameters and their optimization on the phytochemical properties of lactic-acid-fermented mulberry juice. J Food Meas Charact. 2017;11(3):1462–73.

203. Mays ZJ, Nair NU. Synthetic biology in probiotic lactic acid bacteria: At the frontier of living therapeutics. Curr Opin Biotechnol. 2018;53:224–31.

204. Wang G, Si Q, Yang S, Jiao T, Zhu H, Tian P, et al. Lactic acid bacteria reduce diabetes symptoms in mice by alleviating gut microbiota dysbiosis and inflammation in different manners. Food Funct. 2020;11(7):5898–914.

205. Khezri S, Dehghan P, Mahmoudi R, Jafarlou M. Fig juice fermented with lactic acid bacteria as a nutraceutical product. Pharm Sci. 2016;22(4):260–6.

206. Filannino P, Bai Y, Di Cagno R, Gobbetti M, Gänzle MG. Metabolism of phenolic

compounds by Lactobacillus spp. during fermentation of cherry juice and broccoli puree. Food Microbiol. 2015;46:272–9.

207. Koponen J, Laakso K, Koskenniemi K, Kankainen M, Savijoki K, Nyman TA, et al. Effect of acid stress on protein expression and phosphorylation in Lactobacillus rhamnosus GG. J Proteomics. 2012;75(4):1357–74.

208. Othman M, Ariff AB, Rios-Solis L, Halim M. Extractive fermentation of lactic acid in lactic acid bacteria cultivation: A review. Front Microbiol. 2017;8:2285.

209. Pasolli E, De Filippis F, Mauriello IE, Cumbo F, Walsh AM, Leech J, et al. Large-scale genome-wide analysis links lactic acid bacteria from food with the gut microbiome. Nat Commun. 2020;11(1):1–12.

210. Mora-Villalobos JA, Montero-Zamora J, Barboza N, Rojas-Garbanzo C, Usaga J, Redondo-Solano M, et al. Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. Fermentation. 2020;6(1):23.

211. Dabbagh Moghaddam A, Garavand F, Razavi SH, Dini Talatappe H. Production of saffron-based probiotic beverage by lactic acid bacteria. J Food Meas Charact. 2018;12(4):2708–17.

212. Dias JF, Simbras BD, Beres C, dos Santos KO, Cabral LMC, Miguel MAL. Acid Lactic Bacteria as a Bio-Preservant for Grape Pomace Beverage. Front Sustain Food Syst. 2018;2:58.

213. Wu C, Li T, Qi J, Jiang T, Xu H, Lei H. Effects of lactic acid fermentation-based biotransformation on phenolic profiles, antioxidant capacity and flavor volatiles of apple juice. LWT- Food Sci Technol. 2020;122.

214. Hossain MA, Hoque MM, Hossain MM, Kabir MH, Yasin M, Islam MA. Biochemical, Microbiological and Organoleptic Properties of Probiotic Pineapple Juice Developed by Lactic Acid Bacteria. J Sci Res. 2020;12(4):743–50.

215. Shubhada N, Rudresh DL, Jagadeesh SL, Prakash DP, Raghavendra S. Fermentation of Pomegranate Juice by Lactic Acid Bacteria. Artic Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2018;7(8):4160–73.

216. Maldonado RR, Araújo L da C, Dariva LC da S, Rebac KN, Pinto IA de S, Prado JPR, et al. Potential application of four types of tropical fruits in lactic fermentation. LWT - Food Sci Technol. 2017;86:254–60.

217. Wang J, Xie B, Sun Z. Quality parameters and bioactive compound bioaccessibility changes in probiotics fermented mango juice using ultraviolet-assisted ultrasonic pre-treatment during cold storage. LWT. 2021;137:110438.

218. Wan YJ, Xu MM, Gilbert RG, Yin JY, Huang XJ, Xiong T, et al. Colloid chemistry approach to understand the storage stability of fermented carrot juice. Food Hydrocoll. 2019;89:623–30.

219. Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Int Dairy J. 2002;12(2–3):163–71.

220. Zhou Y, Cui Y, Qu X. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. Carbohydr Polym. 2019;207:317–32.

221. Guérin M, Silva CR-D, Garcia C, Remize F. Lactic Acid Bacterial Production of Exopolysaccharides from Fruit and Vegetables and Associated Benefits. Fermentation. 2020;6(4):115.

222. Mıdık F, Tokatlı M, Bağder Elmacı S, Özçelik F. Influence of different culture conditions on exopolysaccharide production by indigenous lactic acid bacteria isolated from pickles. Arch Microbiol. 2020;202(4):875–85.

223. Dertli E, Colquhoun IJ, Côté GL, Le Gall G, Narbad A. Structural analysis of the α-D-glucan produced by the sourdough isolate Lactobacillus brevis E25. Food Chem. 2018;242:45–52.

224. Zhou K, Zeng Y, Yang M, Chen S, He L, Ao X, et al. Production, purification and structural study of an exopolysaccharide from Lactobacillus plantarum BC-25. Carbohydr Polym. 2016;144:205–14.

225. Szutowska J. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: a systematic literature review. Eur Food Res Technol. 2020;246(3):357–72.

226. Zheng X, Yu Y, Xiao G, Xu Y, Wu J, Tang D, et al. Comparing product stability of probiotic

beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates. Innov Food Sci Emerg Technol. 2014;23:61–7.

227. Shah NP, Ding WK, Fallourd MJ, Leyer G. Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants. J Food Sci. 2010;75(5).

228. Picón MS. Análisis fisicoquímicos para el control de calidad en la producción de cerveza. [Sevilla]: Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Universidad de Sevilla; 2020.

229. Lu Y, Mu K, McClements DJ, Liang X, Liu X, Liu F. Fermentation of tomato juice improves in vitro bioaccessibility of lycopene. J Funct Foods. 2020;71:104020.

230. Campoli SS, Rojas ML, do Amaral JEPG, Canniatti-Brazaca SG, Augusto PED. Ultrasound processing of guava juice: Effect on structure, physical properties and lycopene in vitro accessibility. Food Chem. 2018;268:594–601.

231. Selli S, Canbas A, Ünal Ü. Effect of bottle colour and storage conditions on browning of orange wine . Food/Nahurung. 2002;(2):64–7.

232. Li X, Gao J, Simal-Gandara J, Wang X, Caprioli G, Mi S, et al. Effect of fermentation by Lactobacillus acidophilus CH-2 on the enzymatic browning of pear juice. LWT. 2021;147:111489.

233. Li T, Jiang T, Liu N, Wu C, Xu H, Lei H. Biotransformation of phenolic profiles and improvement of antioxidant capacities in jujube juice by select lactic acid bacteria. Food Chem. 2021;339.

234. Li S, Tao Y, Li D, Wen G, Zhou J, Manickam S, et al. Fermentation of blueberry juices using autochthonous lactic acid bacteria isolated from fruit environment: Fermentation characteristics and evolution of phenolic profiles. Chemosphere. 2021;

235. Vivek K, Mishra S, Pradhan RC, Jayabalan R. Effect of probiotification with Lactobacillus plantarum MCC 2974 on quality of Sohiong juice. LWT. 2019;108:55–60.

236. Keppler K, Humpf HU. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. Bioorganic Med Chem. 2005;13(17):5195–205.

237. Benincasa C, Muccilli S, Amenta M, Perri E, Romeo F V. Phenolic trend and hygienic

quality of green table olives fermented with Lactobacillus plantarum starter culture. Food Chem. 2015;186:271–6.

238. Filannino P, Gobbetti M, De Angelis M, Di Cagno R. Hydroxycinnamic acids used as external acceptors of electrons: An energetic advantage for strictly heterofermentative lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol. 2014;80(24):7574–82.

239. Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, de las Rivas B, de Felipe FL, Gómez-Cordovés C, et al. Food phenolics and lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol [Internet]. 2009 Jun [cited 2019 Jun 7];132(2–3):79–90. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160509001925

240. Ávila M, Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, Pelaez C, Requena T, De Pascual-Teresa S. Bioconversion of anthocyanin glycosides by Bifidobacteria and Lactobacillus. Food Res Int. 2009;1453–61.

241. D'Incecco N, Bartowsky E, Kassara S, Lante A, Spettoli P, Henschke P. Release of glycosidically bound flavour compounds of Chardonnay by Oenococcus oeni during malolactic fermentation. Food Microbiol. 2004;21(3):257–65.

242. Mousavi ZE, Mousavi SM, Razavi SH, Hadinejad M, Emam-Djomeh Z, Mirzapour M. Effect of Fermentation of Pomegranate Juice by Lactobacillus plantarum and Lactobacillus acidophilus on the Antioxidant Activity and Metabolism of Sugars, Organic Acids and Phenolic Compounds. Food Biotechnol. 2013;27(1):1–13.

243. Li Z, Teng J, Lyu Y, Hu X, Zhao Y, Wang M. Enhanced antioxidant activity for apple juice fermented with lactobacillus plantarum ATCC14917. Molecules. 2019;24(1).

244. Ayed L, Ben Abid S, Hamdi M. Development of a beverage from red grape juice fermented with the Kombucha consortium. Ann Microbiol. 2017;67(1):111–21.

245. Durazzo A, Lucia A, Pereira F, Arul V, Cristian Vodnar D, Prasad R, et al. Probiotic Beverage From Pineapple Juice Fermented With Lactobacillus and Bifidobacterium Strains. Front Nutr | www.frontiersin.org. 2019;1:54.

246. Sabokbar N, Khodaiyan F. Total phenolic content and antioxidant activities of pomegranate juice and whey based novel beverage fermented by kefir grains. J Food Sci Technol.

2016;53(1):739–47.

247. Arnous A, Makris DP, Kefalas P. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. J Food Compos Anal. 2002;15(6):655–65.

248. Singletary KW, Jung KJ, Giusti M. Anthocyanin-rich grape extract blocks breast cell DNA damage. J Med Food. 2007;10(2):244–51.

249. Wang Y, Wu Y, Wang Y, Xu H, Mei X, Yu D, et al. Antioxidant properties of probiotic bacteria. Nutrients. 2017;9(5):521.

250. Maier T, Schieber A, Kammerer DR, Carle R. Residues of grape (Vitis vinifera L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. Food Chem. 2009;112(3):551–9.

XII ANEXOS

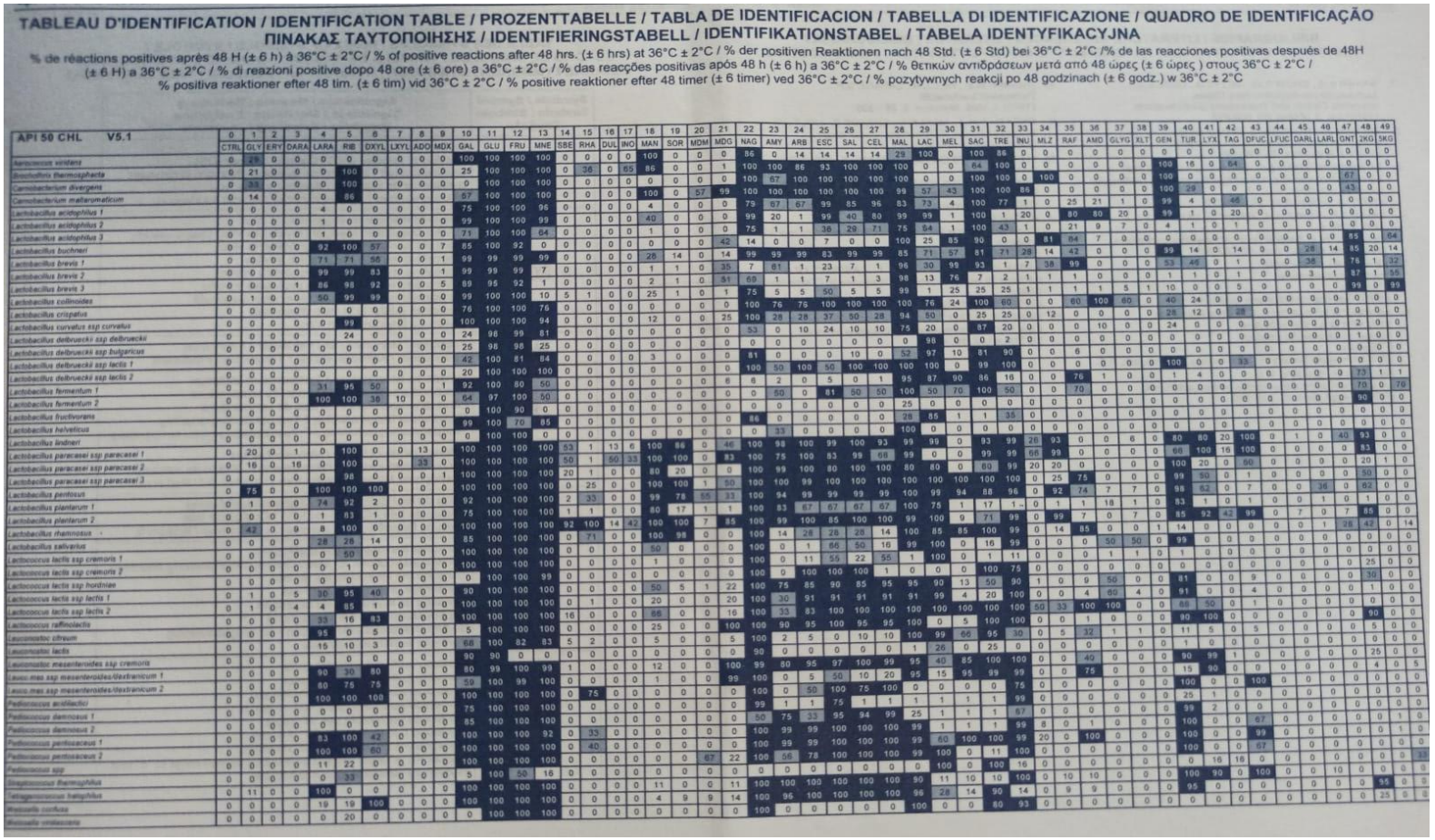

Figura 14. Tabla de identificación fenotípica

Tabla 10. Cinética de crecimiento (UFC Log/mL) de diferentes combinaciones de BAL en caldo MRS

Mezcla	Tiempo (h)							
	0	2	4	6	8	10	12	24
M1	6.72 ± 0.02^{bFG}	6.69 ± 0.04^{aG}	6.80 ± 0.02^{cF}	7.41 ± 0.05^{cE}	8.23 ± 0.04^{cD}	8.51 ± 0.01^{dC}	8.63 ± 0.04^{dB}	9.06 ± 0.01^{cA}
M6	6.68 ± 0.02^{bD}	6.70 ± 0.05^{aD}	7.51 ± 0.05^{aD}	8.73 ± 0.05^{aC}	9.16 ± 0.15^{aB}	9.15 ± 0.02^{abB}	9.37 ± 0.06^{aA}	9.20 ± 0.03^{bAB}
M7	6.47 ± 0.01^{cE}	6.42 ± 0.02^{bE}	7.19 ± 0.04^{bD}	8.40 ± 0.09^{bC}	8.92 ± 0.04^{bB}	8.95 ± 0.02^{cAB}	8.98 ± 0.02^{cAB}	9.05 ± 0.02^{cA}
M11	6.90 ± 0.05^{aE}	6.73 ± 0.06^{aF}	7.44 ± 0.06^{aD}	8.37 ± 0.04^{bC}	8.77 ± 0.01^{bB}	9.17 ± 0.01^{aA}	9.16 ± 0.00^{bA}	9.19 ± 0.02^{bA}
M14	6.79 ± 0.04^{bD}	6.61 ± 0.03^{aD}	7.34 ± 0.13^{abC}	8.67 ± 0.10^{aB}	9.12 ± 0.01^{aA}	9.09 ± 0.03^{bA}	9.11 ± 0.00^{bA}	9.16 ± 0.01^{bA}
C+	6.28 ± 0.07^{dE}	6.35 ± 0.07^{bE}	6.33 ± 0.06^{dE}	6.91 ± 0.04^{dD}	7.71 ± 0.05^{dC}	8.49 ± 0.04^{dB}	8.57 ± 0.03^{dB}	12.56 ± 0.02^{aA}

M1: Mezcla 1; M6: Mezcla 6; M7: Mezcla 7; M11: Mezcla 11; M14: Mezcla 14; C+: Control positivo; $^{a-e}$ Diferentes letras indican diferencia significativa ($p<0.05$) entre muestras. $^{A-G}$ Diferentes letras indican diferencia significativa ($p<0.05$) entre horas.

Tabla 11. Cinética de crecimiento (UFC Log/mL) de diferentes combinaciones de BAL en jugo de zarzamora

Mezcla	Tiempo (h)							
	0	2	4	6	8	10	12	24
M1	8.24 ± 0.09^{abA}	7.89 ± 0.01^{dA}	7.96 ± 0.01^{cdA}	8.10 ± 0.11^{aA}	8.05 ± 0.04^{aA}	7.95 ± 0.04^{aA}	8.08 ± 0.02^{abA}	8.47 ± 0.60^{abA}
M6	8.07 ± 0.09^{abC}	8.20 ± 0.04^{aBC}	8.05 ± 0.05^{bcC}	8.38 ± 0.07^{bB}	7.98 ± 0.06^{abC}	8.19 ± 0.09^{aBC}	8.12 ± 0.05^{abC}	9.18 ± 0.14^{aA}
M7	8.01 ± 0.03^{bA}	8.03 ± 0.02^{bcA}	8.12 ± 0.02^{abA}	8.18 ± 0.03^{bA}	8.06 ± 0.02^{aA}	8.10 ± 0.09^{aA}	7.97 ± 0.06^{bA}	8.03 ± 0.80^{abA}
M11	8.18 ± 0.02^{abA}	7.93 ± 0.03^{cdA}	7.93 ± 0.03^{cdA}	8.12 ± 0.07^{bA}	7.89 ± 0.06^{bA}	7.94 ± 0.06^{aA}	8.54 ± 0.44^{aA}	8.49 ± 0.54^{abA}
M14	8.23 ± 0.01^{abA}	8.18 ± 0.04^{aA}	8.20 ± 0.05^{aA}	8.05 ± 0.01^{bA}	8.08 ± 0.04^{aA}	8.05 ± 0.05^{aA}	7.93 ± 0.15^{bA}	8.25 ± 0.56^{abA}
C+	8.31 ± 0.23^{aA}	8.13 ± 0.11^{abAB}	7.87 ± 0.09^{eBC}	8.14 ± 0.07^{bAB}	7.63 ± 0.06^{cC}	8.22 ± 0.19^{aAB}	7.91 ± 0.05^{bBC}	7.67 ± 0.13^{bC}

M1: Mezcla 1; M6: Mezcla 6; M7: Mezcla 7; M11: Mezcla 11; M14: Mezcla 14; C+: Control positivo; $^{a-e}$ Diferentes letras indican diferencia significativa ($p<0.05$) entre muestras. $^{A-C}$ Diferentes letras indican diferencia significativa ($p<0.05$) entre horas.