



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y determinación de su probable capacidad probiótica

Tesis
que para obtener el Título de
Licenciada en Química de Alimentos

Presenta
Valeria Abril Escorza Iglesias

Bajo la dirección de
Dr. Luis Guillermo González Olivares
Dra. Judith Jaimez Ordaz

Mineral de la Reforma, Hidalgo, 2016
México

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Institute of Basic Sciences and Engineering
Área Académica de Química
Chemistry Department

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.
Presente:

Por este conducto le comunico que el jurado asignado a la pasante de la Licenciatura de Química en Alimentos **Valeria Abril Escorza Iglesias**, quien presenta el trabajo de investigación "**Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y determinación de su probable capacidad probiótica**", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales, estos han decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

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

Presidente	Dra. Elizabeth Contreras López
Secretario	Dra. Judith Jaimes Ordaz
Primer vocal	Dr. Luis Guillermo González Olivares
Segundo vocal	Dra. Alma Delia Román Gutiérrez
Tercer vocal	M. en Q. Juan Ramírez Godínez
Primer suplente	E. en B. Juan Francisco Gutiérrez Rodríguez
Segundo suplente	L.Q.A. Oswaldo Israel Ocampo Salinas

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"
Mineral de la Reforma, Hidalgo, 20 de Octubre de 2016

Dra. Maria Luísa Soares da Silva
Coordinadora Adjunta
Licenciatura en Química de Alimentos

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

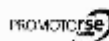


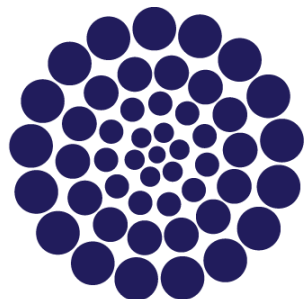
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Química

Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5

Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
Colonia Carboneras
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts. 2200 y 2201. Fax 8602
aaq_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx





CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Este trabajo de investigación fue realizado como parte del proyecto de Ciencia Básica 2014 con clave 241333 intitulado “Estudio del mecanismo bioquímico de la biotransformación de selenio inorgánico en selenoproteínas por bacterias ácido lácticas termófilas”.

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*



Sociedad Mexicana de
Biotecnología y Bioingeniería

Guadalajara



Los resultados de esta investigación se presentaron en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología que se llevó a cabo en la ciudad de Guadalajara, Jalisco del 21 al 26 de Junio de 2015.



Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. otorga la presente

Constancia

**A: Valeria Abril Escorza Iglesias, Araceli Castañeda Ovando,
Judith Jaimez Ordaz, Javier Añorve Morga, Elizabeth
Contreras López, Juan Ramírez Godínez, Luis Guillermo
González Olivares**

Por su participación con la Presentación en Cartel

**"CAMBIOS EN LA VIABILIDAD Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS NATIVAS DURANTE LA
ELABORACIÓN DE UN TEPACHE DE PIÑA"**

en el XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería,
realizado del 21 al 26 de Junio de 2015, en Guadalajara, Jalisco, México.

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Presidente de la SMBB

Dr. Carlos Regalado González
Presidente del Comité Organizador

Dr. José Adolfo Escalante Lozada
Presidente del Comité Científico

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudios otorgada para la realización de esta tesis.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por las facilidades otorgadas para el uso de sus equipos e instalaciones.

Al Doctor Luis Guillermo González Olivares por dirigir y asesorar el presente trabajo de investigación y por orientarme hacia un mejor desarrollo personal y profesional.

A la Doctora Judith Jaimez Ordaz por dedicar su tiempo para la corrección y mejora durante la escritura de esta tesis, por ser guía de mi proceso enseñanza aprendizaje y por ser una amiga.

A todos los catedráticos de la Licenciatura de Química en Alimentos por ser parte de mi formación académica, gracias por compartir sus conocimientos, muchos de los cuales pude aplicar durante la realización de mi trabajo de investigación.

A mis compañeros del laboratorio de biotecnología por compartir experiencias y conocimientos y en especial a la Lic. en Q. A. Xochitl Martínez por orientarme durante las pruebas microbiológicas de mi investigación.

A mis amigos por creer siempre en mí y motivarme a seguir adelante.

A mi familia por llevarme de la mano en cada una de las etapas de mi vida, a mi abuelita por creer en mí y ser ejemplo de superación, a mi hermano por sus consejos y por hacerme ver lo grande que puedo ser, pero en especial a mi mamá por estar siempre al pendiente de mí, por su arduo trabajo en la búsqueda de mejorar mi calidad de vida, por sostener mis estudios y necesidades básicas, por ser mi ejemplo de vida y mi más grande motivación.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	MARCO TEÓRICO	2
2.1	Fermentación y bebidas fermentadas	2
2.1.1	Generalidades del tepache.....	4
2.2	Bacterias ácido lácticas	6
2.2.1	Características y clasificación.....	6
2.2.2	Metabolismo	7
2.2.3	Importancia de las bacterias ácido lácticas en alimentos	11
2.3	Probióticos	12
2.3.1	Origen y definición	12
2.3.2	Características	12
2.3.3	Probióticos en alimentos	14
2.3.4	Ensayos <i>in vitro</i> para evaluar la capacidad probiótica	16
3	OBJETIVOS	19
3.1	Objetivo general.....	19
3.2	Objetivos específicos	19
4	MATEIALES Y MÉTODOS	20
4.1	Elaboración del tepache	20
4.2	Cinética de fermentación	20
4.2.1	Muestreo y preparación de muestras.....	20
4.2.2	Medición de pH.....	21
4.2.3	Determinación de acidez total titulable.....	21
4.2.4	Cuenta viable de bacterias lácticas.....	21
4.3	Aislamiento y caracterización macroscópica de BAL	22
4.4	Caracterización microscópica de BAL mediante tinción de Gram	22
4.5	Pruebas de capacidad probiótica <i>in vitro</i>	22
4.5.1	Tolerancia a sales biliares	23
4.5.2	Resistencia a pH ácido	23
4.5.3	Prueba de resistencia a pH ácido y pepsina	23

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*

4.5.4	Determinación del porcentaje de células viables	24
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
5.1	Cinética de fermentación	25
5.1.1	Medición de pH.....	25
5.1.2	Determinación de acidez total titulable.....	27
5.1.3	Cuenta viable de bacterias lácticas.....	29
5.2	Aislamiento de bacterias lácticas	31
5.3	Caracterización microscópica de BAL mediante tinción de Gram	35
5.4	Pruebas de capacidad probiótica in vitro	39
5.4.1	Tolerancia a sales biliares	39
5.4.2	Resistencia a pH ácido	41
5.4.3	Prueba de resistencia a pH ácido y pepsina	43
5.4.4	Determinación del porcentaje de células viables	45
6	CONCLUSIONES.....	47
7	PERSPECTIVAS	48
8	REFERENCIAS.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vía homofermentativa de la glucosa realizada por bacterias ácido lácticas (Embden Meyerhor-Parnas) (Nelson et al., 2000).....	9
Figura 2. Vía heterofermentativa de la glucosa realizada por bacterias ácido lácticas (vía de las pentosas) (Nelson et al., 2000).....	10
Figura 3. Cambios en el pH del tepache obtenido en dos sistemas de fermentación bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura (22 °C y 54 h).....	25
Figura 4. Cambios en la acidez total titulable (% ácido láctico) del tepache observados en dos sistemas de fermentación bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura (22 °C y 54 h).	28
Figura 5. Cuenta viable de bacterias ácido lácticas de dos sistemas de fermentación de tepache bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura (22°C y 54h).	29
Figura 6. Crecimiento de la cepa 1 aislada de tepache. A en agar M17 y B en agar MRS.....	31
Figura 7. Morfología de las cepas 2 (A) y 3 (B) aisladas de tepache en agar MRS, con notable superficie rizoide debido a la producción de exopolisacáridos.....	32
Figura 8. Colonias en agar MRS correspondientes a la cepa número 4 (A) y 5 (B) aisladas a partir de tepache.....	33
Figura 9. Morfología microscópica de la cepa 1, mostrando estreptococos Gram positivos.....	35
Figura 10. Morfología microscópica de la cepa 2, mostrando bacilos cortos con bordes redondeados Gram positivos.	36
Figura 11. Morfología microscópica de la cepa 3, mostrando bacilos largos con bordes rectos Gram positivos, y agrupación en cadenas.	36

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*

Figura 12. Morfología microscópica de la cepa 4 mostrando bacilos largos con bordes redondeados Gram positivos.....	37
Figura 13. Morfología microscópica de la cepa 5 mostrando bacilos cortos con bordes redondeados Gram positivos y agrupación en binas.....	37
Figura 14. Comparación del crecimiento de las BAL aisladas de tepache y Lctobacillus casei antes y después del tratamiento con sales biliares a una concentración de 0.3% en agar MRS.....	40
Figura 15. Comparación del crecimiento de las BAL aisladas de tepache y Lactobacillus casei en agar MRS acidificado (pH 2).....	41
Figura 16. Comparación del crecimiento de las BAL aisladas de tepache y Lactobacillus casei antes y después del tratamiento en agar MRS acidificado a pH= 2.5 y con pepsina.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales bebidas fermentadas producidas y consumidas en México.....	3
Tabla 2. Características de seguridad, funcionales y tecnológicas de un microorganismo probiótico	13
Tabla 3. Porcentaje de células viables para cada cepa después de las 3 pruebas in vitro a las cuáles fueron sometidas (tolerancia a sales biliares, resistencia a pH ácido y resistencia a pH ácido y pepsina).....	45

Introducción



Introducción

1

1 INTRODUCCIÓN

En México existe una gran variedad de bebidas fermentadas cuyo origen proviene de tradiciones y costumbres prehispánicas, entre ellas se incluyen el tesgüino, pulque, pozol y tepache. Este tipo de bebidas tradicionales se producen a partir de frutas y cereales o a partir de la combinación de ambos. Algunas investigaciones han demostrado que estas bebidas poseen numerosas especies de bacterias lácticas y levaduras como parte de su microbiota nativa. No obstante, los estudios son escasos, lo que aunado a la falta de estandarización en el proceso de elaboración, ha limitado el conocimiento sobre posibles propiedades funcionales de los microorganismos presentes. Considerando que la mayoría de los microorganismos con capacidad probiótica pertenecen al grupo de las bacterias del ácido láctico (Torres, 2002) el estudio de las bebidas fermentadas tradicionales de México como fuentes alternativas de probióticos es indiscutiblemente una importante aportación a la biotecnología. A pesar de lo anterior, los estudios al respecto se han enfocado, generalmente, en matrices lácteas fermentadas ya que suelen ser un medio de nutrientes muy completo para el desarrollo de microorganismos con capacidad de probiosis. Sin embargo, existen sectores de la población con limitaciones para el consumo de estos productos debido, entre otras razones, al contenido de colesterol, la presencia de alérgenos (Farnworth et al., 2007) y al incremento del vegetarianismo. En la actualidad, se ha observado un aumento en la demanda de alimentos no lácteos que representen una alternativa para el consumo de microorganismos que ejercen un efecto benéfico sobre el equilibrio de la microbiota intestinal y la estimulación del sistema inmunitario. Es por ello que el objetivo de esta investigación fue aislar bacterias ácido lácticas de tepache y evaluar su probable capacidad probiótica mediante ensayos *in vitro*. Lo anterior permitirá incrementar las fuentes de probióticos a partir de una matriz vegetal disminuyendo las limitaciones que conlleva el consumo de derivados lácteos fermentados. Además de fomentar el interés en el conocimiento y consumo de una bebida fermentada tradicional en México, el tepache.

Marco Teórico



Marco Teórico

2

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Fermentación y bebidas fermentadas

La fermentación, desde el punto de vista de la microbiología industrial, se define como cualquier proceso utilizado para la generación de productos a partir del cultivo de microorganismos (Shirai y Malpica, 2013). Se ha utilizado durante más de seis mil años en la conservación de alimentos, lo que la convierte en una de las técnicas biotecnológicas más antiguas utilizadas con este propósito (FAO, 1998). Además de incrementar la vida de anaquel, la fermentación también genera cambios en las propiedades físicas de los alimentos como el color y la textura así como la producción de sabores y olores que otorgan un carácter distintivo al producto final (Chinte, 2008).

Un alimento o producto fermentado, puede ser definido como aquel que ha sido sujeto a la acción de microorganismos o enzimas para provocar cambios deseables en el mismo (Campbell-Platt, 1994). Este tipo de productos se han convertido en una parte integral de la dieta en muchas partes del mundo. Los alimentos y bebidas fermentadas representan del 20-40% del suministro global de alimentos. Entre los productos fermentados más comunes se encuentran los derivados lácteos, los cereales y las bebidas (Chinte, 2008).

En México, desde tiempos prehispánicos se fermentaba una gran variedad de plantas nativas para la obtención de bebidas que tenían gran relevancia en la vida diaria de comunidades indígenas ya que en muchas ocasiones estas bebidas eran un componente indispensable en su dieta diaria (Godoy et al., 2003). La producción y consumo de bebidas fermentadas también jugaba un rol muy importante en rituales, medicina y religión (Lappe-Oliveras et al. 2008).

*Atislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*

Nuestro país posee una gran diversidad climática y ambiental, por lo que su flora es muy variada, lo que explica la multiplicidad de bebidas fermentadas que se consumen en diferentes regiones. Algunas de las más conocidas son el pulque que se prepara a partir de la fermentación del aguamiel; el tejuino y el tesgüino que tienen como sustrato maíz nixtamalizado; la tuba, un vino de palma de coco; el colonche preparado con tuna y el tepache elaborado con piloncillo y piña, o con piloncillo y tibicos (Taboada, 2003). En la tabla 1 se presenta un listado de las principales bebidas fermentadas producidas y consumidas en México.

Tabla 1. Principales bebidas fermentadas producidas y consumidas en México

Nombre	Tipo de bebida	Sustrato	Lugar de producción y consumo	Fuente
Atole agrio	Bebida no embriagante	Maíz nixtamalizado	San Luis Potosí, Veracruz, Hidalgo, Puebla, Guerrero, D. F., Tlaxcala, Michoacán, Jalisco y Oaxaca.	Cruz y Ulloa (1973)
Colonche	Bebida embriagante	Tuna	Aguascalientes, Chihuahua, Sonora y Zacatecas	Ulloa et al. (1987)
Pozol	Bebida no embriagante	Cacao y maíz	Tabasco, Chiapas, Yucatán, Oaxaca, Veracruz, Guerrero y el Territorio de Quintana Roo.	Cruz y Ulloa (1973)
Pulque	Bebida embriagante	Aguamiel (obtenida a partir de maguey)	Distrito Federal, el estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y Veracruz.	Godoy et al. (2003)
Tesgüino	Bebida embriagante	Maíz	Sonora, Chihuahua, Nayarit, Zacatecas y Jalisco	Cruz y Ulloa (1973)
Tepache	Bebida no embriagante	Piña, Manzana, Naranja, ciruelas, jobo, entre otras frutas	Centro de México, Veracruz, Guerrero, Chiapas, Sonora y Distrito Federal	Godoy et al. (2003)
Tuba	Bebida no embriagante	Néctar de la flor de palma	Colima, Guerrero y Jalisco	Godoy et al. (2003)

La información presentada en la Tabla 1 deja en claro que la cantidad de bebidas fermentadas existentes en México es significativa, no obstante, para efectos de esta investigación, se hablará exclusivamente del tepache.

2.1.1 Generalidades del tepache

El tepache es una bebida fermentada elaborada a partir de piña y azúcar (RAE, 2016). En México se consume de manera general como una bebida refrescante y, a pesar de no haber datos fidedignos, se sabe que su origen se remonta a la época prehispánica. Su nombre puede provenir del náhuatl *tepiatzin* que a su vez proviene de *tépitl*, variedad de maíz y *atl*, (agua o bebida) o del náhuatl *tepachoa* que significa “moler o prensar algo con una piedra” (Herrera y Ulloa, 1982).

Esta bebida es muy consumida en gran parte del territorio nacional pero especialmente por indígenas de los estados de Oaxaca y Guerrero, tales como los mixtecos, amuzgos, zapotecos, chinantecos y en el estado de Sonora la beben los pápagos. Debido a lo tradicional de la bebida, algunas comunidades indígenas beben tepache entre comidas, diario o en fiestas religiosas (Cruz y Ulloa, 1973).

El tepache se preparaba originalmente utilizando maíz como materia prima, sin embargo, en la actualidad se elabora a partir de frutas como piña (*Ananas spp.*), manzana (*Malus communis*), naranja (*Citrus aurantium*), entre otras. En el caso del tepache de piña, la corteza de la fruta mezclada con azúcar morena o piloncillo se somete a un proceso de fermentación en barriles de madera llamados “tepacheras”, que se cubren con tela de manta de cielo y se dejan fermentar durante 24 o 48 horas. Transcurrido este tiempo resulta una bebida refrescante, de sabor dulce y agradable (Herrera y Ulloa, 1978). Si la fermentación se prolonga, se obtiene una bebida fermentada alcohólica que posteriormente se convierte en vinagre (Battcock y Azam-Ali, 1998). En algunas regiones como en el estado de Veracruz, para la elaboración del tepache se le añaden tibicos (un consorcio de bacterias acéticas) como inóculo para iniciar la fermentación (Herrera y Ulloa, 1978).

Debido a la naturaleza artesanal del proceso de elaboración de tepache, no hay control; ni sanitario, ni en la cantidad o tipo de materia prima utilizada; tampoco uniformidad en las condiciones de fermentación, lo que ocasiona que las características fisicoquímicas y sensoriales del producto final varíen así como el tipo y cantidad de microorganismos presentes (Taboada, 2003).

Microbiología del tepache

Los microorganismos asociados con la producción del tepache incluyen diversas especies de bacterias lácticas, bacterias acéticas y levaduras, las cuales integran un consorcio microbiano que convierte a esta bebida en un sistema microbiológicamente complejo.

Uno de los primeros estudios microbiológicos realizados al tepache, señala a *Bacillus subtilis*, *B. gravelous* y levaduras como *Torulopsis inconspicua*, *Sacharomyces cerevisiae* y *Candida quetana* como algunos de los principales microorganismos asociados con este producto (Aidoo, 1986). Años después, se documentó que las bacterias que predominan en el sistema de fermentación del tepache son mesófilas, entre las cuales se identificaron especies putativas de bacterias lácticas tales como *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *Lactobacillus lactis ssp. lactis*, *L. salivarius ssp.*; bacterias acéticas como *Acetobacter* y *Gluconobacter* así como levaduras de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apis*, *K. africana* *K. apiculata*, *Candida sorbosa*, *C. pseudointermedia*, *C. sake*, *S. bayanus*, *Candida guilliermondii*, *Candida intermedia*, *K. japónica* y *Rhodotorula* además de especies de la familia Enterobacteriaceae tales como *Aerobacter*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella sp.* y *Escherichia coli*. Posteriormente, a través de la identificación molecular de las cepas presuntivas, se evaluó su potencial probiótico resultando *Lactobacillus plantarum* como una de las cepas putativas de interés (Moreno-Terrazas, 2005; Martínez et al., 2013).

2.2 Bacterias ácido lácticas

2.2.1 Características y clasificación

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos pertenecientes a diversos géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Generalmente son cocos y bacilos Gram positivos, de longitud variable, inmóviles y no esporulados (Carr et al., 2002).

Las BAL están ampliamente distribuidas en el ambiente, han sido aisladas de alimentos, vegetales, tierra, así como del tracto gastrointestinal y vagina de algunos animales. Crecen en medios ricos en aminoácidos, carbohidratos simples (principalmente glucosa y lactosa) y vitaminas, por este motivo la leche es el medio típico y satisfactorio para su proliferación. Sin embargo, otros alimentos como masas de cereales, carne y vegetales también son excelentes medios de producción de metabolitos y crecimiento (Torres, 2002).

Por su capacidad de sobrevivir bajo condiciones poco favorables de oxígeno, las BAL son consideradas como microorganismos anaerobios facultativos; crecen cuando hay oxígeno disponible y si la concentración del mismo en el medio es escasa, también continúan su crecimiento mediante fermentación o respiración anaerobia, aunque su eficiencia en la producción de energía disminuye. Su carencia de actividad respiratoria se debe a la falta de la enzima citocromo catalasa por lo que les es imposible poner en marcha la cadena respiratoria con el oxígeno como aceptor de electrones (Parra, 2010). Durante la fermentación de lactosa y otros carbohidratos, producen ácido láctico como metabolito principal, de ahí que se les nombre bacterias lácticas, ácido lácticas o del ácido láctico. Además del lactato, son capaces de formar productos adicionales como el acetato, etanol, CO₂, formiato o succinato (Parra, 2010). Algunos de estos productos (específicamente los ácidos orgánicos) disminuyen el pH en el medio de fermentación, no obstante las bacterias lácticas son ácido tolerantes, de modo que son capaces de tolerar pHs tan bajos como 3.2 y tan altos como 9.6 aunque la mayoría crece a 4 y 4.5, esta capacidad de tolerancia a la

acidez les permite sobrevivir en medios donde otras bacterias no lo lograrían (Carr et al., 2002).

El grupo de las bacterias lácticas es muy extenso y está integrado por microorganismos de distintos géneros, por lo tanto la clasificación de estas puede realizarse atendiendo a distintos criterios. Uno de ellos es su morfología que permite dividirlos en dos grandes grupos, los cocos y bacilos. En el grupo de los cocos encontramos a los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc* y *Atopobium*. En cambio, el grupo de los bacilos es más corto ya que sólo incluye a *Lactobacillus* y *Carnobacterium* y se hace referencia a especies afines como *Bifidobacterium*, *Micrococcus*, *Brevibacterium* y *Propionibacterium* (García, 1998).

Otros criterios para la clasificación de las BAL, son el tipo de metabolismo de la lactosa y otros carbohidratos hidrosolubles y la temperatura óptima de crecimiento. Con respecto al tipo de metabolismo, las BAL se dividen en dos grupos: las bacterias homofermentativas y las heterofermentativas (Halász, 2009) y de acuerdo a la temperatura ideal de crecimiento, las BAL se clasifican como mesófilas (20-25°C) y termófilas (40-45°C) (Parra, 2010).

2.2.2 Metabolismo

Como se mencionó anteriormente, existen dos grupos de BAL en función del metabolismo que presentan, las homofermentativas y heterofermentativas, de ahí que la cantidad de energía producida por concentración de sustrato varíe de un grupo a otro, así como los metabolitos generados en cada caso.

Las BAL homofermentativas producen 85% de ácido láctico a partir de lactosa (Almanza y Barrera, 1991) o bien, hasta un 97% utilizando la ruta de Embden- Meyerhof Parnas (EMP). En esta ruta, por medio de las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa se generan dos moléculas de lactato por cada molécula de glucosa consumida (Figura 1) y, a partir de

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*

lactosa, 4 moléculas de lactato y 5 moléculas de ATP (Jay, 1992). Al grupo de bacterias ácido lácticas homofermentativas pertenecen los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunos bacilos homofermentativos (Jay, 1992).

Por otro lado, el conjunto de las BAL heterofermentativas, produce únicamente el 50% de ácido láctico a partir de la glucosa además de cantidades equimolares de etanol, CO₂ y algunos aldehídos (Figura 2). Al carecer de las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, en lugar de usar la ruta de EMP, utilizan las vías de la pentosa o la hexosa monofosfato (Parra, 2010). Entre los géneros que integran este grupo se encuentran todas las especies de *Leuconostoc* y algunos lactobacilos (Jay, 1992).

Existen también bacterias ácido lácticas heterofermentativas facultativas, las cuáles utilizan la vía de EMP o la vía de las pentosas para dar como productos mayoritarios ácido láctico, ácido acético y etanol (Sneath et al., 1986).

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*

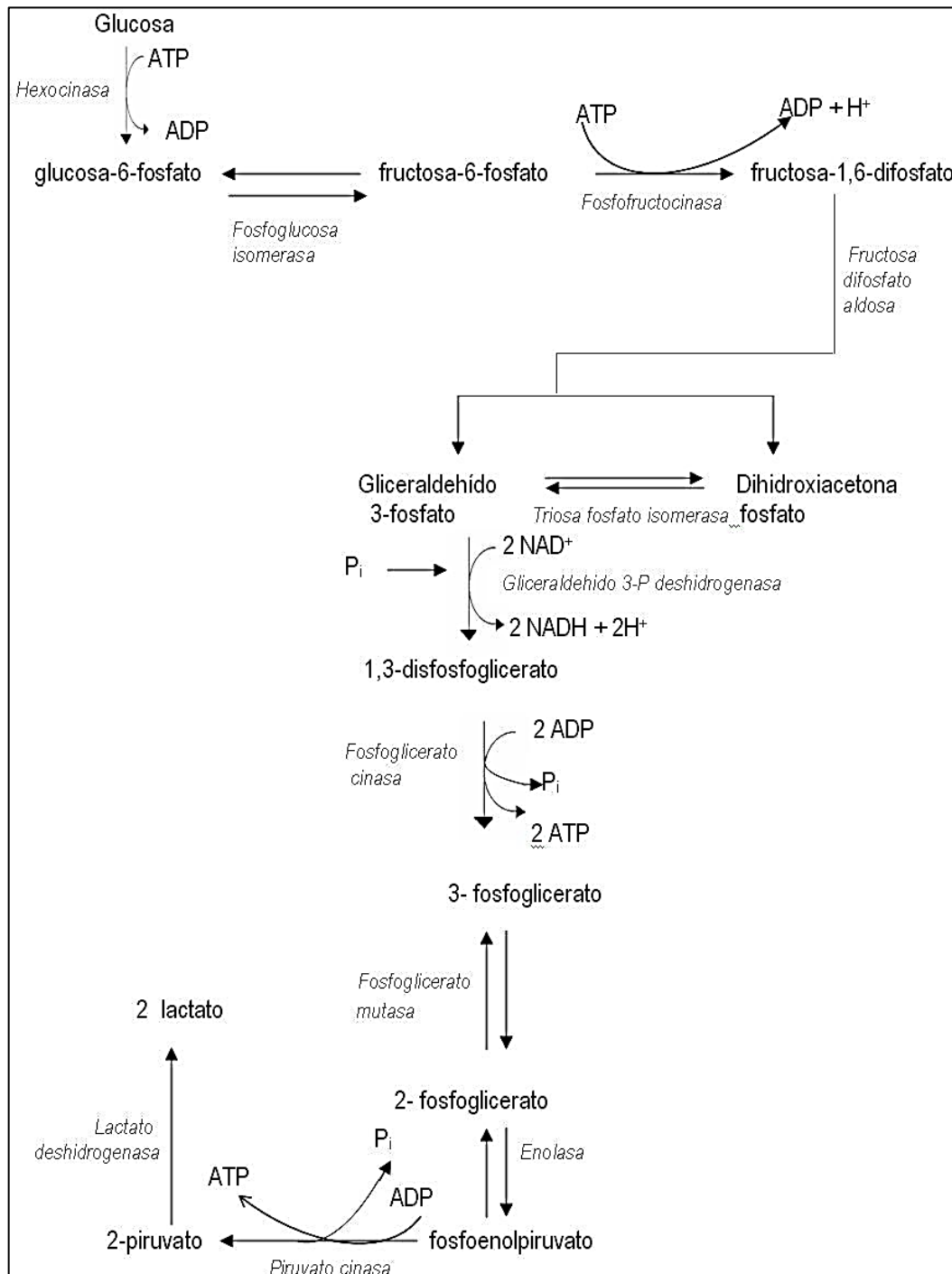


Figura 1. Vía homofermentativa de la glucosa realizada por bacterias ácido lácticas (Embden Meyerhor-Parnas) (Nelson et al., 2000).

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*

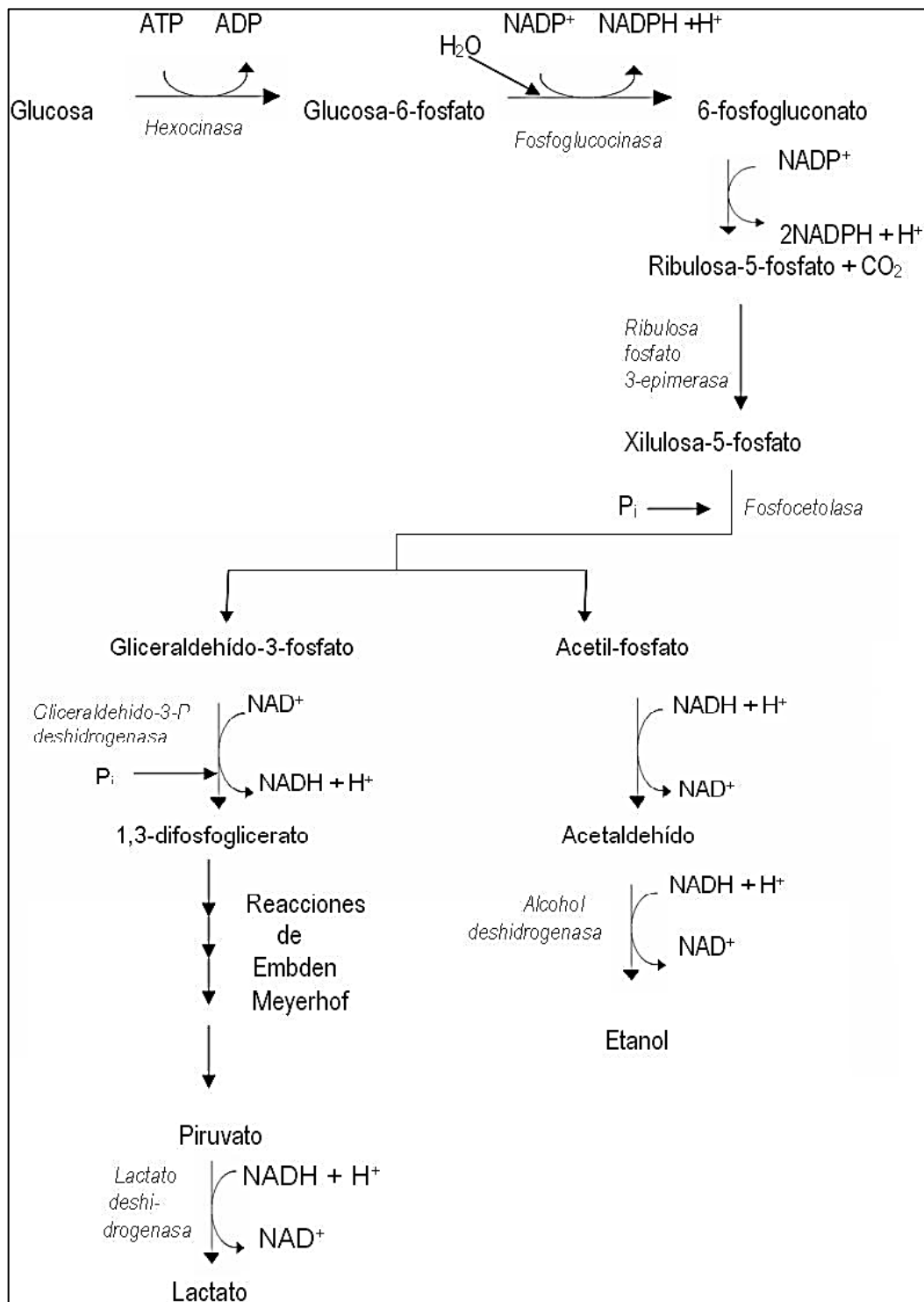


Figura 2. Vía heterofermentativa de la glucosa realizada por bacterias ácido lácticas (vía de las pentosas) (Nelson et al., 2000).

2.2.3 Importancia de las bacterias ácido lácticas en alimentos

En definitiva, las BAL juegan un papel muy importante en la industria alimentaria. Una de sus principales aplicaciones es la fermentación de diversos productos alimenticios como leche, carne y vegetales, para producir yogurt, quesos, encurtidos, ensilados, así como para la elaboración de cerveza y vino (Ramírez et al., 2011). Además de contribuir en la biopreservación de los alimentos, las bacterias ácido lácticas mejoran sus características sensoriales y nutricionales. Los géneros de BAL más comúnmente asociados con alimentos fermentados incluyen a *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Stiles y Holzapfel, 1997).

Las investigaciones sobre las aplicaciones de las BAL aumentan día con día y actualmente, el enfoque más amplio está en el área de los probióticos ya que la mayor parte de estos microorganismos pertenecen a este grupo predominando los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Por lo anterior, su uso potencial en los alimentos como ingrediente o suplemento, aporta múltiples beneficios a la salud del consumidor (Torres, 2002).

2.3 Probióticos

2.3.1 Origen y definición

En el siglo XX, Metchnikoff observó que el consumo de leches fermentadas tenía un efecto positivo sobre la microbiota residente en el tracto gastrointestinal, con un impacto benéfico en la salud humana (Castro y Rovetto, 2006). A partir de ese momento, se originó el término probiótico, que proviene del griego “a favor de la vida”.

Distintas asociaciones y organizaciones han establecido definiciones para el término probiótico, siendo las proporcionadas por la Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos (ISAPP, por sus siglas en inglés) y la OMS, las más aceptadas mundialmente. De acuerdo a la ISAPP, los probióticos son “microorganismos vivos que se administran al hospedador y que ejercen un efecto fisiológico beneficioso sobre su salud” (Ramos et al., 2012). Por otro lado, la OMS se refiere a los probióticos como “cultivos puros, o mezcla de cultivos de microorganismos vivos que aplicados al hombre y animales, en cantidades adecuadas aportan beneficios al huésped mejorando las propiedades de la microflora nativa” (FAO y OMS, 2006).

2.3.2 Características

Las características que un microorganismo debe reunir para considerarse como probiótico (Tabla 2) y ser usado indiscriminadamente en cualquier matriz alimentaria o suplemento incluyen aspectos de seguridad, funcionalidad e incluso tecnológicos que deben ser tomados en cuenta, siendo los referentes a la funcionalidad los más importantes (Saarela, 2000).

Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y determinación de su probable capacidad probiótica

Tabla 2. Características de seguridad, funcionales y tecnológicas de un microorganismo probiótico

Características de seguridad	Características funcionales	Características tecnológicas
Preferentemente de origen humano	Tolerancia a ácidos y jugos gástricos	No aportar propiedades sensoriales malas al producto
Aisladas del tracto gastrointestinal humano cuando	Tolerancia a sales biliares (importante factor de supervivencia en el intestino delgado)	Resistencia a fagos
No tener antecedentes de patogenicidad	Adherencia a células epiteliales y persistencia en el tracto gastrointestinal	Viabilidad durante el procesamiento
No poseer genes transmisibles de resistencia a antibióticos	Inmunoestimulación sin provocar efecto inflamatorio	Estabilidad en el producto y durante el almacenamiento
No desconjugables con sales biliares en intestino delgado	Actividad antagónica contra patógenos	
	Propiedades antimutagénicas	

Fuente: Saarela, 2000

Otra característica de relevancia que los microorganismos probióticos deben reunir es sobrevivir y conservar su funcionalidad durante el almacenamiento sin producir sabores extraños o modificaciones significativas en la matriz alimenticia dónde son contenidos o han sido incorporados (Saarela, 2000).

2.3.3 Probióticos en alimentos

Los consumidores se han vuelto cada más consciente en cuestiones de salud y los efectos que la alimentación tiene sobre ésta. Como resultado, se ha observado un incremento en la producción y consumo de productos más saludables y alimentos funcionales. Los alimentos probióticos son el área de mayor crecimiento en el desarrollo de estos últimos, ya que mediante diversas investigaciones se ha comprobado que su consumo presenta numerosos beneficios a la salud entre los que se incluye alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa (De Vrese et al., 2001), propiedades anti-carcinogénicas (Wollowski et al., 2001), reducción de colesterol en sangre (Jackson et al., 2002), tratamiento contra la diarrea y mejoramiento de la inmunidad (Reid et al., 2003), entre otras. Los microorganismos probióticos se encuentran generalmente en productos fermentados, no obstante, en la actualidad son añadidos también como aditivos (Dharmasena, 2012).

Habitualmente los géneros de microorganismos probióticos que se encuentran en los productos comerciales son *Lactobacillus*, *Streptococcus* o *Bifidobacterium*. Estos géneros pertenecen al grupo de las BAL y otros organismos relacionados ya que tienen la capacidad de producir ácido láctico. Las especies pertenecientes a cada uno de los géneros antes mencionados son numerosas, sin embargo, el género *Lactobacillus* representa el grupo más amplio (Ramos et al., 2012).

Con respecto a microorganismos cuyo potencial probiótico ha sido comprobado y que son usados comercialmente como cultivos iniciadores en la producción de alimentos, destacan *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. lactis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Bifidobacterium lactis*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. brevis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus francium*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Estas especies habitualmente se encuentran colonizando el intestino grueso de animales de sangre caliente. Sin embargo, las bacterias no son las únicas que pueden ejercer un efecto probiótico sobre el hospedero ya que se ha comprobado el potencial de algunas levaduras para realizar la misma función, tal es el caso de

Sacharomyces Boulardii usada comercialmente como cultivo iniciador de la fermentación de diversos productos alimenticios (Dharmasena, 2012).

Los cultivos probióticos mencionados anteriormente han sido aplicados con éxito a diversas matrices alimentarias incluyendo lácteos, cárnicos, bebidas, frutas, vegetales, cereales y productos de panificación (Shori, 2015). No obstante, existen diversos factores que pueden afectar la viabilidad de los probióticos en el alimento incluyendo la cepa utilizada, el pH, la presencia de peróxido de hidrógeno y oxígeno disuelto, la concentración de metabolitos como ácido láctico y acético, la capacidad amortiguadora del medio, la temperatura y naturaleza de los ingredientes añadidos y la matriz alimentaria (Donkor et al., 2006; Fonteles et al., 2011; Pereira et al., 2011; Costa et al., 2013).

Los derivados lácteos han demostrado ser la fuente más completa para las demandas nutricionales de los probióticos, por ello, son las matrices alimenticias utilizadas más comúnmente para mantenerlas viables por un periodo significativo de tiempo. Sin embargo, el aumento de la incidencia de personas con problemas de colesterol, intolerancia a la lactosa y alergias a algunas proteínas lácteas ha demandado la búsqueda de fuentes alternativas de estos microorganismos, por ejemplo, alimentos fermentados provenientes de cereales, frutas y vegetales (Farnworth et al., 2007). Como resultado, se ha observado un incremento en la búsqueda de matrices alternativas de probióticos en alimentos de origen vegetal y de alimentos fermentados que provean de nuevas especies con probable capacidad probiótica cuyo potencial pueda ser demostrado mediante distintas pruebas.

2.3.4 Ensayos *in vitro* para evaluar la capacidad probiótica

La supervivencia en el ecosistema gastrointestinal y la adhesión a la mucosa se consideran requisitos fundamentales para que las bacterias probióticas ejerzan su actividad (Rodríguez, 2006). Por ello, los ensayos *in vitro* utilizados para la evaluación de microorganismos susceptibles a ser caracterizados como probióticos, se basan principalmente en la capacidad de los mismos para llegar vivos al intestino (Ortíz y Reuto, 2007). Estos ensayos evalúan la capacidad de los microorganismos para tolerar las condiciones hostiles impuestas por el tracto gastrointestinal, como pHs ácidos extremos debidos a los ácidos gástricos y la acción detergente de las sales biliares presentes en el intestino así como la capacidad de adherencia a la superficie epitelial, la actividad antagónica contra microorganismos patógenos y el potencial para colonizar temporalmente el intestino (Vallejo et al., 2008). Estas pruebas pueden ser cualitativas o cuantitativas y permitirán correlacionar a las cepas con su capacidad probiótica *in vivo* (Ortíz y Reuto, 2007).

Tolerancia a pH ácido. Antes de alcanzar el tracto intestinal, las bacterias probióticas primero deben sobrevivir al tránsito por el estómago, donde la secreción de ácido gástrico constituye un primer mecanismo de defensa contra microorganismos ingeridos (Dunne et al., 2001). La acidez de la solución gástrica es impuesta por el ácido clorhídrico, el cual disminuye el pH hasta valores menores a 3 (Gianella, 1972), como resultado, cuando esta solución entra en contacto con los microorganismos modifica el intercambio normal de iones H^+ y afecta la estabilidad de la membrana plasmática, debido a la ionización de proteínas provocando así la lisis celular (Barreiro y Sandoval, 2006). De ahí la importancia de evaluar el comportamiento de los microorganismos de interés frente a condiciones similares de pH y tiempo simulando su paso por el estómago, para verificar que éstos sean capaces de resistirlas sin perder su viabilidad (González y González-Martínez, 2006).

Tolerancia a sales biliares. Una vez alcanzado el intestino delgado, las sales biliares son el obstáculo más importante para los microorganismos. Para que los probióticos puedan ejercer sus efectos beneficiosos deberán resistir la acción de este bactericida natural (Rodríguez y Guerrero, 2010).

Las sales biliares son el componente mayoritario de la bilis y básicamente son ácidos que se almacenan en la vesícula biliar pero, debido al pH alcalino de la misma, se encuentran como sales. La bilis es un detergente biológico que emulsiona y solubiliza los ácidos grasos de cadena larga y los mono y diacilglicéridos resultantes de la acción de las lipasas intestinales, formando micelas y por lo tanto, juega un rol esencial en la digestión de las grasas. Esta propiedad de detergente, también le confiere actividad antimicrobiana, al generar la disolución de las membranas bacterianas (Beagley, 2006).

Algunos microorganismos como *Lactobacillus spp.*, poseen enzimas hidrolasas que generan la desconjugación de las sales biliares, hidrolizando el enlace amida y liberando glicina y taurina de la base esteroide, mecanismo por el cual pueden resistir concentraciones de sales biliares en pruebas *in vitro* y durante su paso por el tracto gastrointestinal de animales (Monser, 2001).

Generalmente se prueba la capacidad de los microorganismos para resistir la acción detergente de las sales biliares mediante el enriquecimiento de un medio de cultivo con dichas sales, en concentraciones que varían entre 0.1 %- 3.5% dependiendo la metodología; posteriormente se verifica la viabilidad de las células mediante conteo o turbidimetría (Gilliland et al., 1984).

Resistencia a pH ácido y pepsina. El jugo gástrico es una mezcla de secreciones excretadas por células especializadas localizadas en el estómago. Los jugos gástricos están compuestos por 98% de agua, sales, ácido clorhídrico, proteínas como las mucoproteínas, enzimas proteolíticas, factor intrínseco y algunas inmunoglobulinas. La función principal del jugo gástrico consiste en degradar alimentos, sin embargo, la presencia de HCl contribuye a limitar el paso de microorganismos al intestino, los cuales a su vez, se ven obstaculizados por enzimas proteolíticas como la pepsina (Ortíz y Reuto, 2007).

La evaluación de la resistencia *in vitro* a pH ácido y la presencia de pepsina se realiza a través de la inoculación del microorganismo con potencial probiótico en un medio de cultivo acidificado y suplementado con esta enzima proteolítica. Lo anterior, con la finalidad de determinar la viabilidad del microorganismo tras someterse a estas condiciones hostiles (Spencer et al., 2001).

Objetivos



Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar el potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de tepache a través de pruebas in vitro, para proponer el uso de esta bebida fermentada tradicional como fuente alternativa de microorganismo benéficos para la salud.

3.2 Objetivos específicos

- Elaborar un tepache de piña bajo condiciones controladas, a través de un proceso de fermentación para la obtención de bacterias ácido lácticas nativas
- Determinar, mediante técnicas estandarizadas, el pH y acidez total del tepache para monitorear los cambios fisicoquímicos ocurridos en el sistema durante la fermentación
- Cuantificar bacterias ácido lácticas nativas del tepache a través de su cultivo en medios específicos para establecer la correlación entre la cuenta viable y los cambios en los parámetros fisicoquímicos estudiados
- Aislar bacterias ácido lácticas a través de su cultivo en medios específicos para su diferenciación morfológica e identificación
- Determinar la capacidad probiótica de las bacterias ácido lácticas aisladas del tepache, a través del análisis de su resistencia al crecimiento en sales biliares, pH ácido y a una mezcla ácido-enzimática.

Materiales y Métodos



Materiales y
Métodos

4 MATEIALES Y MÉTODOS

4.1 Elaboración del tepache

La fermentación se llevó a cabo en contenedores de vidrio de 5 L de capacidad. El medio de fermentación se elaboró utilizando cáscaras de piña (sin lavar) en estado sazón y una solución de piloncillo al 13% (p/v) previamente pasteurizada, en una relación piña/piloncillo 1:2 (p/p). El contenedor se tapó y se selló con plástico autoadherible para simular condiciones semi-aeróbicas. La fermentación se llevó a cabo bajo las condiciones reportadas por Corona-González et al., (2013).

Se elaboraron dos sistemas de fermentación, cada uno con su respectiva réplica, de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente y bajo las mismas condiciones de temperatura, pH y tiempo (22°C; pH inicial 4-5 y 54 horas). Lo anterior con el objetivo de obtener muestras por duplicado de todos los tiempos de muestreo abarcando la duración de la cinética de fermentación.

4.2 Cinética de fermentación

4.2.1 Muestreo y preparación de muestras

Se tomaron alícuotas de 25 de mL cada sistema de fermentación en intervalos de dos horas desde el tiempo 0 hasta las 54 horas. Para la medición de pH y acidez total titulable, se usó un volumen de 24 mL, el mililitro restante se utilizó para la cuenta viable de bacterias lácticas.

4.2.2 Medición de pH

El pH se midió utilizando un potenciómetro previamente calibrado con soluciones tampón de pH 4 y 7 (Shirai y Malpica, 2013). Para la determinación se introdujo el electrodo directamente en una alícuota de tepache a temperatura ambiente, de tal manera que esta cubriera el electrodo en su totalidad para evitar errores de medición.

4.2.3 Determinación de acidez total titulable

La acidez total del tepache se determinó titulando una alícuota de 10 mL con una solución de NaOH hasta el punto en que una cantidad equivalente de base fuese añadida. Este punto se detectó con fenolftaleína como indicador (Horwitz, 1980). Los resultados obtenidos en la medición de este parámetro se expresan en porcentaje de ácido láctico.

4.2.4 Cuenta viable de bacterias lácticas

Durante la fermentación, la cuenta viable de bacterias lácticas se llevó a cabo en el medio Man, Rogosa y Shape (MRS) (Shirai y Malpica, 2013) mediante la técnica de microgota (Doyle, 2001). La siembra se realizó a partir de diluciones consecutivas de la muestra desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-5} en solución de agua peptonada. Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas.

4.3 Aislamiento y caracterización macroscópica de BAL

La selección de las cepas de BAL más representativas se realizó a partir de las placas empleadas para la cuenta viable. Posteriormente, se llevó a cabo la diferenciación morfológica, basada en criterios tales como color, consistencia, forma, tamaño y tipo de bordea descritos en la literatura (Granados y Villaverde ,2003; Winn, 2006). Las colonias seleccionadas se aislaron en agar MRS mediante la técnica de estría cruzada. Utilizando esta misma técnica, las cepas de BAL desarrolladas se transfirieron al medio M17 para diferenciar bacilos lácticos de lactococos y estreptococos lácticos.

4.4 Caracterización microscópica de BAL mediante tinción de Gram

Para corroborar el carácter Gram positivo de las cepas aisladas, observar su morfología microscópica y comprobar la pureza del cultivo, se realizaron frotis teñidos bajo la técnica de Gram descrita por Rodríguez et al. (2005). Para lo anterior, se tomó una asada de cada colonia aislada y se fijó en un portaobjetos debidamente identificado para cada cepa.

4.5 Pruebas de capacidad probiótica *in vitro*

Se llevaron a cabo tres ensayos *in vitro* (tolerancia a sales biliares, resistencia a pH ácido y resistencia a pH ácido y pepsina) para probar la capacidad de supervivencia de las cepas seleccionadas bajo condiciones impuestas por el tracto gastrointestinal. Una cepa identificada de *Lactobacillus casei* se utilizó como cepa de referencia en dichos ensayos.

4.5.1 Tolerancia a sales biliares

Se realizó un ensayo *in vitro*, enriqueciendo caldo MRS con una concentración de 0.3% de sales biliares y ajustando el pH a 7 con NaOH 0.1N, posteriormente se inocularon 100 μ L del cultivo fresco al medio enriquecido incubándose a 37 °C por 2 horas. Para conocer el recuento inicial, se inocularon 100 μ L de cultivo fresco de cada cepa en caldo MRS sin enriquecer (control) (Cueto et al, 2010). La siembra de ambas muestras se realizó por el método de microgota (Doyle et al., 2001) en agar MRS por un periodo de incubación de 24 h a 37° C; posteriormente se realizó el recuento de cada una de las placas.

4.5.2 Resistencia a pH ácido

La resistencia a pH ácido se realizó de acuerdo a Park et al. (2006) inoculando 100 μ L de cultivo fresco en caldo MRS ajustado a pH 2 con HCl concentrado. Posteriormente, el tubo se incubó a 37°C por 2 horas. Adicionalmente se realizó un recuento inicial del cultivo a partir de un tubo control conteniendo 100 μ L de cultivo fresco en caldo MRS sin acidificar. Para la confirmación de la supervivencia del microorganismo después del periodo de incubación, se realizó un recuento de las células viables mediante la técnica de la microgota (Doyle et al., 2001).

4.5.3 Prueba de resistencia a pH ácido y pepsina

La capacidad de las cepas seleccionadas a resistir simultáneamente el pH y la acción de la pepsina se midió sometiéndolas a condiciones ácido enzimáticas similares a las del jugo gástrico, a las cuales se someten los microorganismos durante su paso por el estómago. Para ello, se utilizó caldo MRS suplementado con 1,000 UI de pepsina y ajustado a pH 2.5 (Sung-Mee y Dong-Soon, 2008) al cual se inocularon 100 μ L de cultivo. Posteriormente, se incubó por un periodo de 2 h a 37°C. Se realizó un recuento inicial a partir de un tubo conteniendo caldo MRS inoculado con 100 μ L de cultivo fresco. El recuento de células viables tras la incubación y el recuento inicial se llevaron a cabo en agar MRS, por la técnica de la microgota (Doyle et al., 2001).

4.5.4 Determinación del porcentaje de células viables

El número de células viables, se determinó mediante el conteo en placa en agar MRS. El porcentaje de supervivencia se calculó mediante la siguiente ecuación (Cueto et al., 2010):

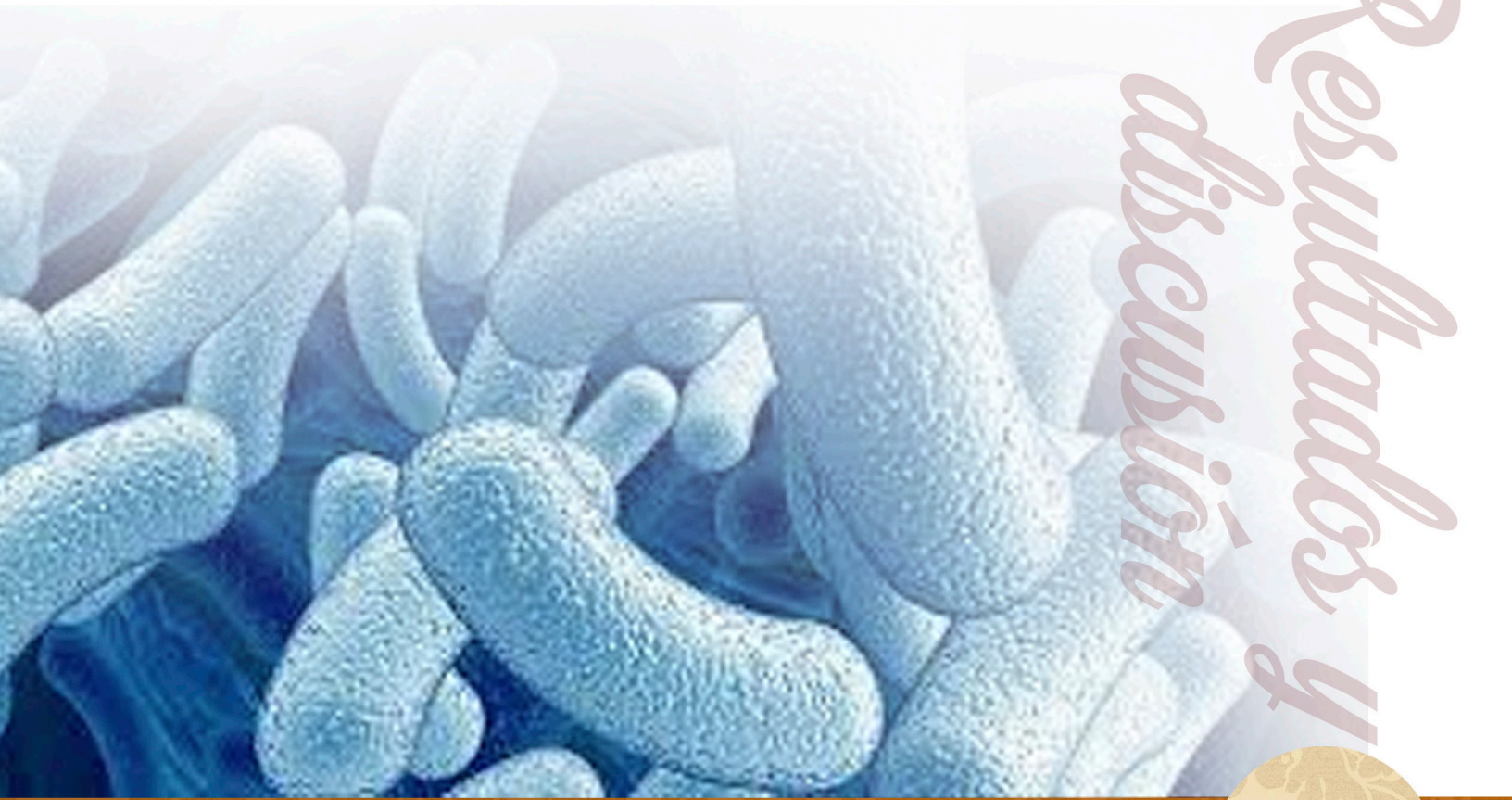
$$\% \text{ supervivencia} = (\log \text{ UFC } N_1 / \log \text{ UFC } N_0) \times 100$$

Donde:

N_1 se refiere al número de células viables después de los tratamientos

N_0 representa el número de inicial de BAL inoculadas

Resultados y discusión



Resultados y
discusión

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Cinética de fermentación

5.1.1 Medición de pH

En la Figura 3 se muestran los resultados obtenidos para la medición del pH del tepache obtenido en los dos sistemas de fermentación analizados (bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura). Se obtuvo un pH inicial de 4.2 y 4.4, estos valores concuerdan con los reportados por Corona-González et al. (2013) como pH inicial óptimo para la fermentación del tepache.

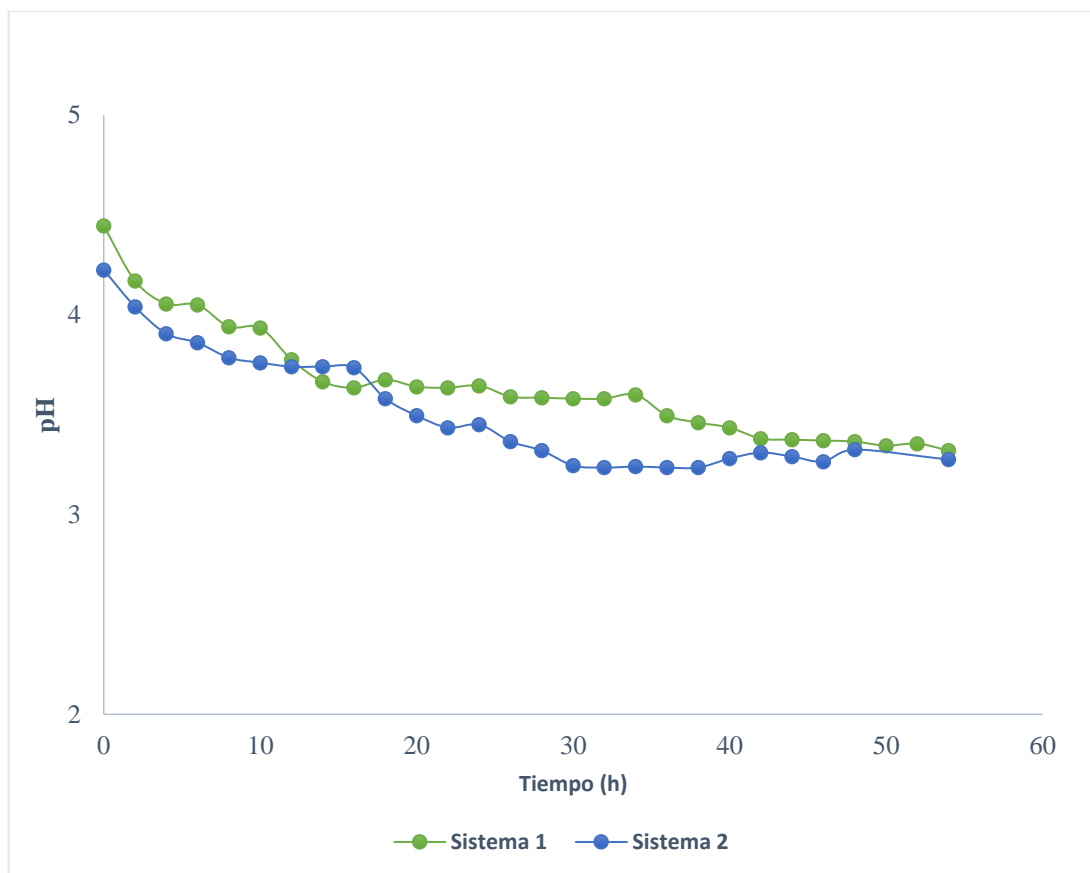


Figura 3. Cambios en el pH del tepache obtenido en dos sistemas de fermentación bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura (22 °C y 54 h).

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*

Ambos sistemas de fermentación mostraron una tendencia de disminución de pH similar en las primeras 18 horas ya que en este periodo de tiempo existe una concentración inicial de sustrato suficiente para ser metabolizada por los microorganismos nativos del tepache. El pH obtenido en ambos sistemas a este tiempo fue de 3.6, observándose diferencias significativas en el pH correspondiente al intervalo entre las 20 y las 40 horas de fermentación. A partir de las 42 horas de fermentación, la disminución del pH fue constante para ambos sistemas, alcanzando un valor final de 3.3. Lo anterior debido a que al incrementarse el número de microorganismos presentes en el tepache, el sustrato comienza a agotarse y la síntesis de ácidos se ve limitada. El valor de pH final alcanzado se encuentra dentro del rango de pH (3.22-3.66) obtenido por Moreno-Terrazas (2005) en la medición de las características fisicoquímicas de cuatro muestras de tepache elaborado en distintos establecimientos de la Ciudad de México.

La disminución del pH durante la fermentación del tepache está directamente relacionada con la producción de diversos ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico y acético, los cuáles son generados por el consorcio microbiano nativo de esta bebida (levaduras, bacterias lácticas y acéticas), a partir de azúcares fermentables disponibles (Moreno-Terrazas, 2005).

5.1.2 Determinación de acidez total titulable

En el tepache, los cambios en el pH y la acidez se deben a la síntesis de ácido láctico principalmente (Moreno-Terrazas, 2005), este ácido es producido a partir de glucosa, por lo tanto, la fermentación de esta bebida es afectada por la concentración de azúcares (Aidoo et al., 2006).

Al igual que en el caso del pH, los valores de acidez total titulable obtenidos para ambos sistemas de fermentación estudiados, fueron similares en las primeras 16 horas de fermentación (0.027 y 0.03% de ácido láctico para el sistema 1 y 2, respectivamente). Los cambios más acentuados se manifestaron en un aumento de la acidez titulable (0.034 y 0.048% de ácido láctico), durante el intervalo comprendido entre las 16 y 40 horas, notándose diferencia significativa entre ambos sistemas (Figura 4). Esto parece indicar que la falta de estandarización en la concentración de azúcares totales al inicio de la fermentación como consecuencia del estado de madurez del fruto (Wills et al., 1999), influyó en el comportamiento de los sistemas.

A partir de las 42 horas de fermentación, los cambios en la acidez total fueron constantes, sin embargo, a diferencia del pH, los valores finales obtenidos, fueron diferentes para cada sistema (0.038 para el sistema 1 y 0.051% para el sistema 2). Estos resultados son menores a los obtenidos por otros autores para tepache utilizando tibiócos como cultivo iniciador (Rubio et al., 1993) y tepache fermentado de forma tradicional (Moreno-Terrazas (2005). Estos autores determinaron valores de acidez total titulable entre 0.2 y 0.8%. Cabe mencionar que en los trabajos referidos, el tepache se elaboró bajo condiciones no estandarizadas, mientras que en la presente investigación, la bebida se preparó a partir de un sistema estandarizado propuesto por Corona et al. (2013). Este hecho pudo haber influido en la concentración inicial de azúcares fermentables y muy probablemente en la población nativa de BAL presentes en cada sistema de fermentación.

Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y determinación de su probable capacidad probiótica

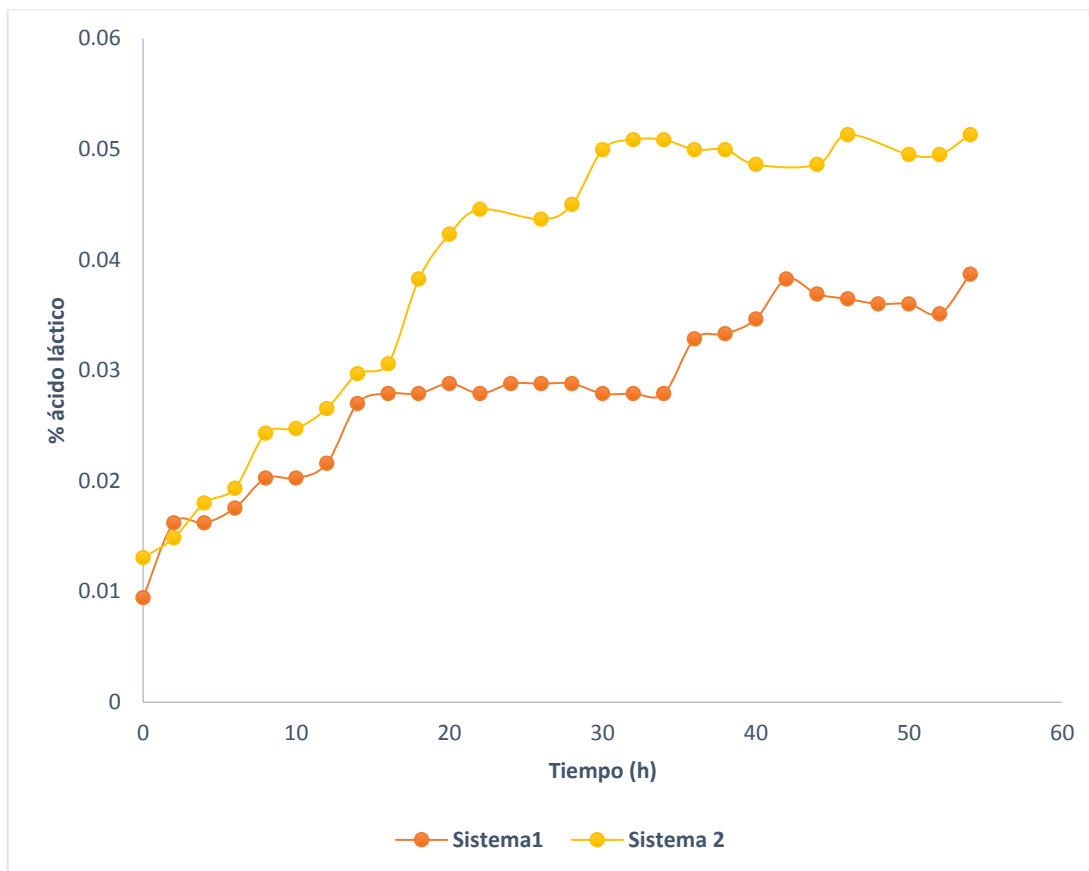


Figura 4. Cambios en la acidez total titulable (% ácido láctico) del tepache observados en dos sistemas de fermentación bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura (22 °C y 54 h).

5.1.3 Cuenta viable de bacterias lácticas

En la Figura 5 se presentan los resultados obtenidos de la cuenta viable de BAL para los dos sistemas analizados a lo largo del tiempo de fermentación. Se observó un comportamiento similar y no existió diferencia significativa entre los dos conjuntos de datos ($P=0.05$). Los resultados obtenidos muestran una curva similar a la curva típica de crecimiento bacteriano. En dicha curva fue posible distinguir tres de las cuatro etapas de crecimiento: la fase de latencia entre el inicio de la fermentación y las 4 horas, la fase exponencial partiendo de las 4 hasta las 16 horas y la fase estacionaria delimitada por el intervalo entre las 18 y 54 horas de fermentación.

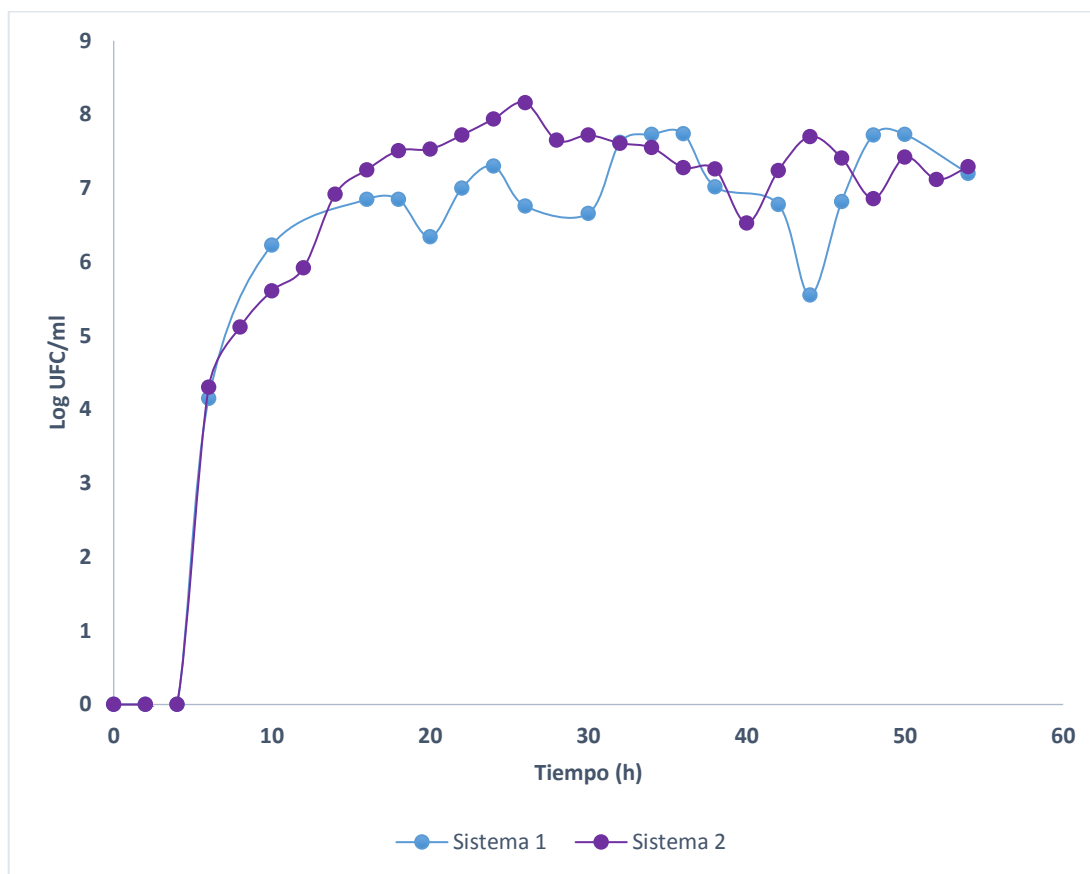


Figura 5. Cuenta viable de bacterias ácido lácticas de dos sistemas de fermentación de tepache bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura (22°C y 54h).

En la fase estacionaria, no se observó una línea recta (lo que respetaría la idealidad de una curva de crecimiento bacteriano típico), por el contrario, los puntos muestran incrementos y disminuciones constantes a lo largo de esta etapa, aproximadamente entre los logaritmos 6 y 8; con una cuenta viable final de 7.29 log UFC/mL. A pesar de las variaciones observadas, tanto los valores obtenidos durante la fase estacionaria como la cuenta viable final, son similares (6.37-8.56 log UFC/mL) a los obtenidos por Moreno-Terrazas (2005) durante la fermentación de cuatro tepaches diferentes provenientes de la ciudad de México a dos tiempos de fermentación (48 y 60 horas).

Como se mencionó anteriormente, el tepache está compuesto por un consorcio microbiano de levaduras, bacterias lácticas y acéticas por lo que las variaciones en la curva de crecimiento microbiano durante la fermentación de esta bebida siempre son notorias. Estas variaciones se deben a la competencia por el sustrato o a un desequilibrio metabólico provocado por el agotamiento de azúcares fermentables, ya que cada reacción metabólica está regulada por la concentración de nutrientes en el medio (Varela y Grotiuz, 2006).

Analizando los resultados obtenidos de pH, acidez total y cuenta viable de BAL, se infiere una relación entre el comportamiento de las bacterias lácticas con la producción de ácido láctico y la disminución del pH a lo largo de la fermentación. En primer lugar, la actividad metabólica de las BAL durante las primeras 16 horas (correspondientes a la fase de adaptación y crecimiento exponencial), provocó una disminución acentuada de pH en ambos sistemas y la producción de ácido láctico se incrementó con cierta linealidad. En segunda instancia, en el intervalo de las 16-54 horas, correspondiente a la fase estacionaria, los aumentos y disminuciones observados en la cuenta viable reflejan la producción anormal de ácido láctico; muy probablemente como consecuencia de la actividad metabólica anormal en condiciones de estrés celular a baja concentración de sustrato y competencia por el mismo. Finalmente, de las 42 a las 54 horas, no hubo cambios significativos en el crecimiento bacteriano; por lo tanto, la síntesis de ácido láctico y el pH tampoco cambiaron considerablemente.

5.2 Aislamiento de bacterias lácticas

Se aislaron cinco cepas de bacterias ácido lácticas del tepache en agar MRS. La selección de las BAL se realizó en base a la morfología colonial observada en las placas de agar MRS, inoculadas para realizar la cuenta viable durante las 54 horas de fermentación.

De las cinco cepas aisladas (cepas 1 a 5), sólo la cepa 1 presentó crecimiento en ambos medios de cultivo (MRS y M17) (Figura 6). La morfología colonial de dicha cepa en medio MRS corresponde a colonias ligeramente blancas, circulares, con borde definido, convexas, de diámetro aproximado de 2 mm y consistencia cremosa. Por otro lado, la morfología observada en medio M17 se diferenció de la anterior por el aumento de tamaño de la colonia (3 mm) y la intensidad del color blanco, mientras que las características restantes permanecieron iguales. La cepa 1 se observó a partir de las 4 horas de fermentación y hasta el término de la misma, con valores predominantes entre las 28 y 36 horas.

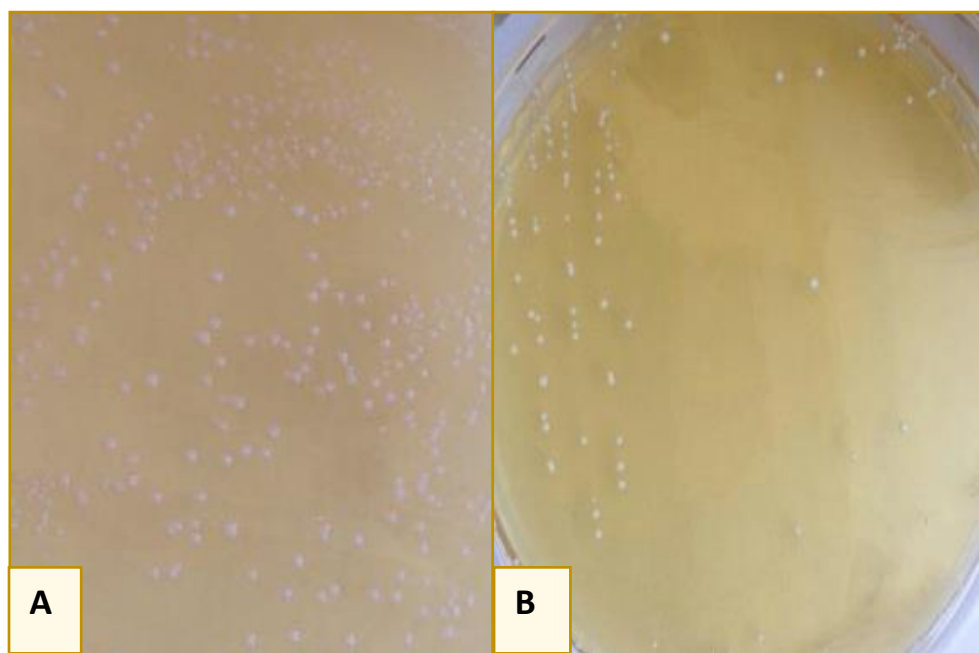


Figura 6. Crecimiento de la cepa 1 aislada de tepache. A en agar M17 y B en agar MRS

Las cepas 2 y 3 únicamente crecieron en agar MRS, mostraron colonias con gran extensión en la superficie de la placa debido a la producción de exopolisacáridos, largas cadenas de azúcares (principalmente glucosa, ramnosa y galactosa) que algunas BAL son capaces de producir a partir de una pequeña porción de azúcares fermentables que desvían para este fin (Rodríguez, 2002). La cepa 2 (Figura 7A), presentó colonias extendidas y filamentosas de color beige y un halo de transparencia alrededor, con aparición prevalente entre las 36 y 46 horas de la fermentación. Por otro lado, la cepa número 3 (Figura 7B) formó colonias acuminadas de forma rizoide, color blanco, consistencia seca y manifestación mínima y constante desde las 4 horas hasta el final del proceso de fermentación. El hallazgo de bacterias productoras de exopolisacáridos ya ha sido reportado en otras bebidas fermentadas como el pulque del que se han aislado cepas como *Leuconostoc mesenteroides*, especie reconocida por su capacidad de producir dextrano a partir de moléculas de sacarosa (Escalante et al., 2004).

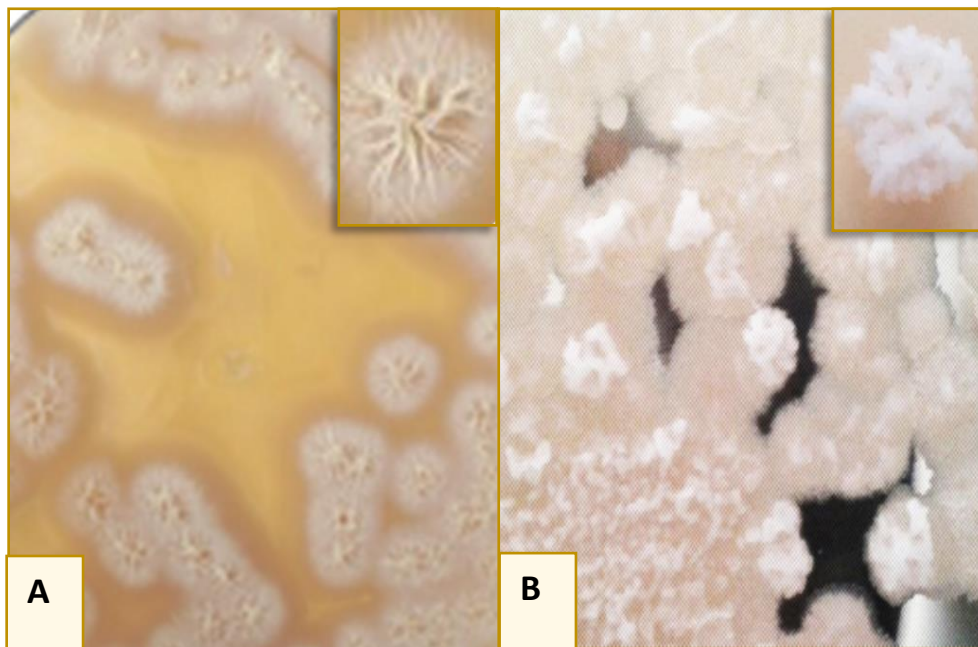


Figura 7. Morfología de las cepas 2 (A) y 3 (B) aisladas de tepache en agar MRS, con notable superficie rizoide debido a la producción de exopolisacáridos

Por último, al igual que las cepas 2 y 3, las cepas identificadas como 4 y 5, solo se desarrollaron en agar MRS, sin embargo, estas últimas no produjeron exopolisacáridos. La cepa 4 (Figura 8A) presentó una morfología macroscópica representada por colonias de aproximadamente 4 mm, forma irregular, planas, de color blanco, con un halo transparente a su alrededor, consistencia cremosa y con desarrollo únicamente en las primeras horas de fermentación. En cuanto a la cepa número 5 (Figura 8B), las colonias presentaron un diámetro aproximado de 4-5 mm, forma circular con borde definido, convexa, color blanco intenso, consistencia cremosa y su desarrollo prevalente ocurrió durante las últimas horas de fermentación.

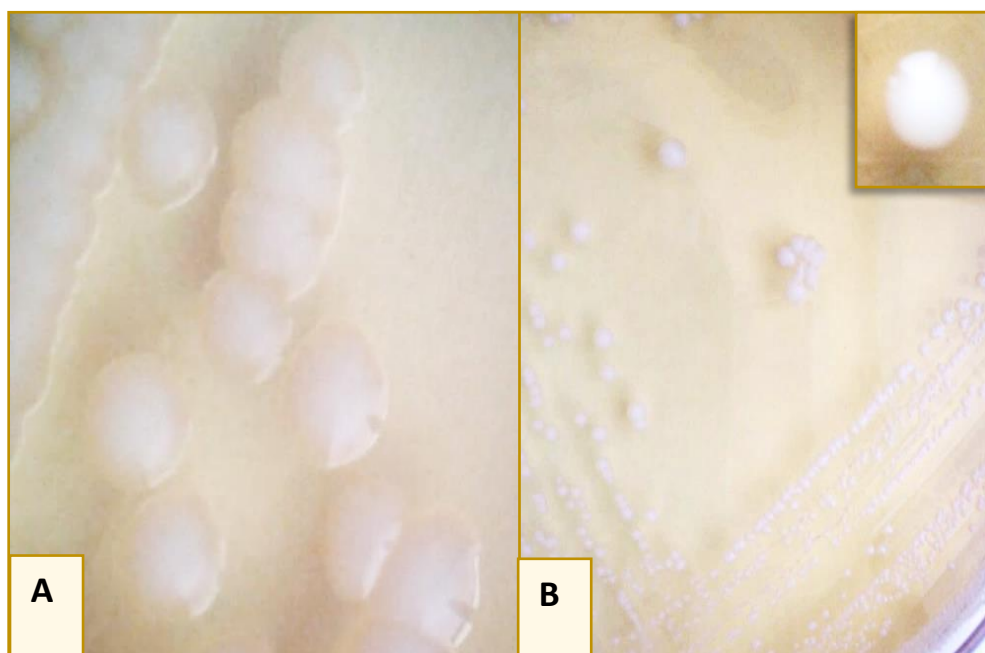


Figura 8. Colonias en agar MRS correspondientes a la cepa número 4 (A) y 5 (B) aisladas a partir de tepache.

Aunque en este trabajo no se realizó la identificación de las cepas aisladas, su morfología colonial se utilizó para relacionarlas con cepas de bacterias ácido lácticas identificadas y descritas previamente (Moreno-Terrazas, 2005; Martínez et al., 2013). Estos autores encontraron en muestras de tepache de piña provenientes de diferentes puntos de la Ciudad

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*

de México y del Municipio de Puebla, especies de bacterias lácticas como *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. curvatus*, *Lactobacillus lactis ssp. lactis*, *L. salivarius ssp.*

La heterogeneidad de los ingredientes y el proceso utilizado para la elaboración de bebidas fermentadas, incluyendo el tepache, limita el estudio microbiológico de estas matrices. Lo anterior debido a que la microbiota nativa depende directamente del origen y condiciones de la materia prima. El metabolismo y la supervivencia de los microorganismos presentes puede verse afectado por factores como el pH, concentración de azúcares y de ácidos orgánicos del sustrato vegetal. Por lo anterior, el tepache representa un sistema conformado por un consorcio microbiano complejo y variable que merece ser estudiado a profundidad debido al potencial de aislamiento de BAL diversas.

5.3 Caracterización microscópica de BAL mediante tinción de Gram

Una vez aisladas en medio MRS, las cinco cepas obtenidas del tepache se analizaron microscópicamente mediante tinción de Gram. Como resultado y utilizando la morfología observada, se identificó una cepa (cepa 1) correspondiente a estreptococos lácticos (Figura 11) y cuatro cepas bacilares (cepa 2 a la 5). La cepa 1 presentó una morfología caracterizada por cocos pequeños agrupados en cadena (estreptococos) y positivos a la tinción de Gram.



Figura 9. Morfología microscópica de la cepa 1, mostrando estreptococos Gram positivos.

En cuanto a las especies bacilares, la cepa 2 (Figura 12), mostró bacilos Gram positivos, cortos y con bordes redondeados. Por su parte, la cepa 3 presentó una morfología microscópica peculiar en la cual es posible observar bacilos Gram positivos muy largos agrupados en cadenas, mismas que se unen de forma lateral con el resto de las cadenas (Figura 13). Además, esta cepa presentó un halo alrededor de las células debido a la producción de exopolisacáridos.

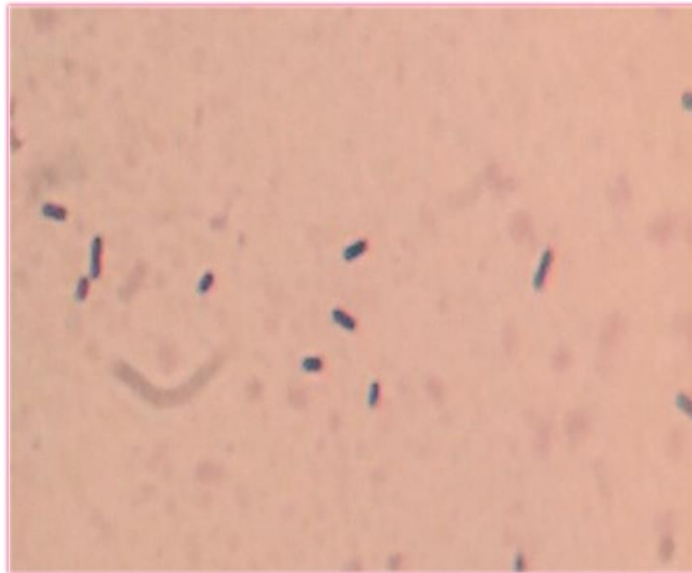


Figura 10. Morfología microscópica de la cepa 2, mostrando bacilos cortos con bordes redondeados Gram positivos.



Figura 11. Morfología microscópica de la cepa 3, mostrando bacilos largos con bordes rectos Gram positivos, y agrupación en cadenas.

En cuanto a la cepa 4, su morfología mostró bacilos largos y positivos a la tinción de Gram (Figura 14), para la cepa 5 los bacilos observados fueron Gram positivos, de tamaño mediano, ligeramente curvos y agrupados en duplas por los extremos. Algunas agrupaciones mostraban bacilos con curvaturas tan pronunciadas que aparentaban unirse para formar un círculo (Figura 15).

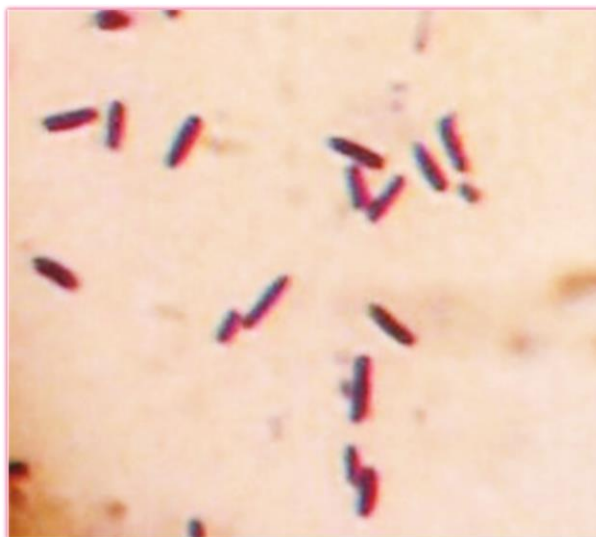


Figura 12. Morfología microscópica de la cepa 4 mostrando bacilos largos con bordes redondeados Gram positivos.

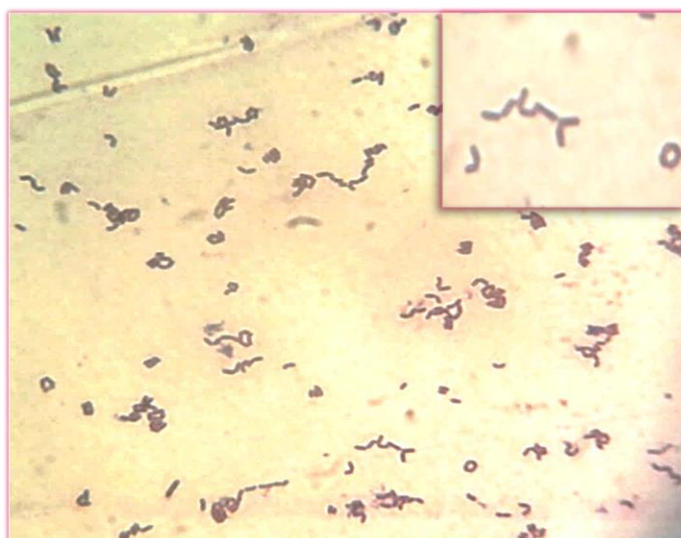


Figura 13. Morfología microscópica de la cepa 5 mostrando bacilos cortos con bordes redondeados Gram positivos y agrupación en binas

Se han realizado investigaciones acerca del aislamiento de microorganismos nativos de bebidas fermentadas tradicionales mexicanas como el tepache, el pulque, pozol, sotol así como en aguamiel. Comparando la morfología descrita por varios autores con la de las cepas aisladas en esta investigación encontramos que las cepas 3 y 5, presentaron similitudes morfológicas con *L. curvatus* y *L. acidophilus*, especies de lactobacilos aisladas previamente en muestras de tepache (Moreno-Terrazas, 2005). Del mismo modo, la cepa 3, también presentó similitudes morfológicas con una especie de *Leuconostoc*, productora de dextrano (exopolisacárido) aislada a partir de muestras de pulque (Cervantes, 2008). Por su parte, las cepas 2 y 4 eran similares a las descritas para 3 especies de bacilos Gram positivos aisladas también de pulque. Finalmente, las cepas 1, 2 y 4 presentaron similitudes morfológicas con los cocos Gram positivos aislados por García (2010) a partir de pozol blanco y con los bacilos Gram positivos aislados a partir de sotol y aguamiel. Aunque las similitudes en la morfología de las cepas aisladas permite relacionarlas con algunos géneros y especies aisladas en tepache y otras bebidas fermentadas, para corroborar su identidad, sería necesario realizar pruebas específicas de identificación.

5.4 Pruebas de capacidad probiótica in vitro

5.4.1 Tolerancia a sales biliares

En la Figura 16, se muestra el crecimiento de cada una de las cinco cepas experimentales de BAL aisladas del tepache antes y después del tratamiento con sales biliares. Las cepas 2 y 3 mostraron mayor sensibilidad al tratamiento con la disminución de aproximadamente 2 y 1 ciclo logarítmico respectivamente, en comparación con el resto de las cepas cuyo crecimiento se redujo en menos de un ciclo logarítmico, siendo la cepa de referencia, *Lactobacillus casei*, la menos afectada.

Estos resultados difieren con los obtenidos por Acuña (2009), bajo las mismas condiciones experimentales aplicadas en muestras de un producto lácteo ya que las cepas de BAL aisladas del tepache mostraron mayor resistencia al tratamiento con sales biliares. En la investigación realizada por Acuña (2009), se reportó la reducción de 4 ciclos logarítmicos en 26 cepas que resistieron el tratamiento *in vitro*, de un total de 53 cepas de BAL aisladas de suero costeño.

Se sabe que la capacidad de resistir a la acción bactericida de las sales biliares está directamente relacionada con la síntesis de hidrolasas que provocan la desconjugación de estas, evitando así la disolución de las membranas celulares (Monser, 2001). No obstante, la resistencia a las sales biliares conjugadas no es un aspecto totalmente deseable ya que la concentración de estas podría verse disminuida a tal punto que se interfiera en la absorción de lípidos (García, 2010).

En relación a las matrices vegetales fermentadas, el tepache no ha sido la única fuente de bacterias lácticas cuya capacidad para crecer y sobrevivir en presencia de sales biliares ha sido probada. García (2010) también reportó la supervivencia de bacterias lácticas aisladas de bebidas fermentadas y tradicionales de México (pozol, sotol y aguamiel) en presencia de este bactericida natural, así como en muestras de vino (García, 2014). Los resultados obtenidos en este estudio, fueron semejantes a los obtenidos con las BAL experimentales aisladas del tepache.

Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y determinación de su probable capacidad probiótica

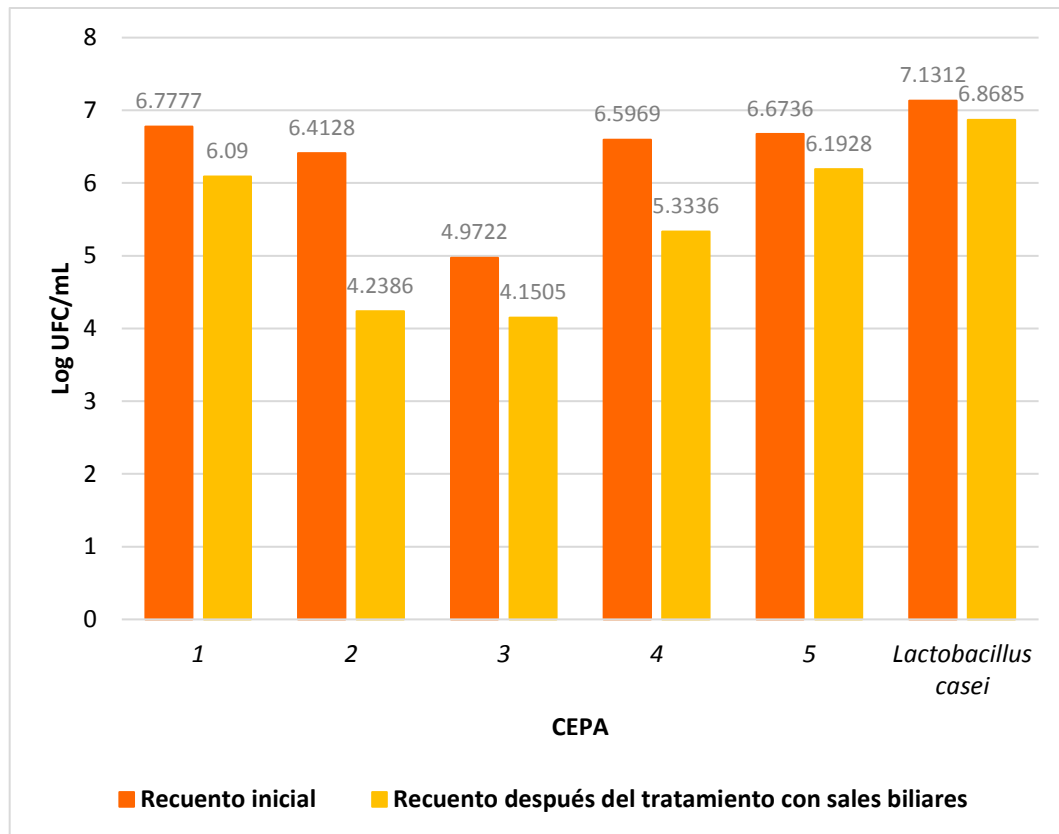


Figura 14. Comparación del crecimiento de las BAL aisladas de tepache y *Lctobacillus casei* antes y después del tratamiento con sales biliares a una concentración de 0.3% en agar MRS.

5.4.2 Resistencia a pH ácido

En comparación con el tratamiento con sales biliares, la exposición a pH 2 limitó de forma evidente el crecimiento de las diferentes cepas aisladas del tepache así como el crecimiento de *Lactobacillus casei*, utilizada como cepa de referencia (Figura 17). El pH ácido ensayado inhibió completamente el crecimiento de las cepas 1 y 4 mientras que las cepas 2 y 3 disminuyeron su cuenta inicial en aproximadamente 1.5 ciclos logarítmicos. En cuanto a la cepa 5, esta presentó menor sensibilidad, ya que su crecimiento disminuyó menos de un ciclo logarítmico. De acuerdo a estos resultados, tres de las cinco cepas aisladas podrían ser capaces de sobrevivir al pH del estómago y llegar vivas hasta el intestino en un número significativo.

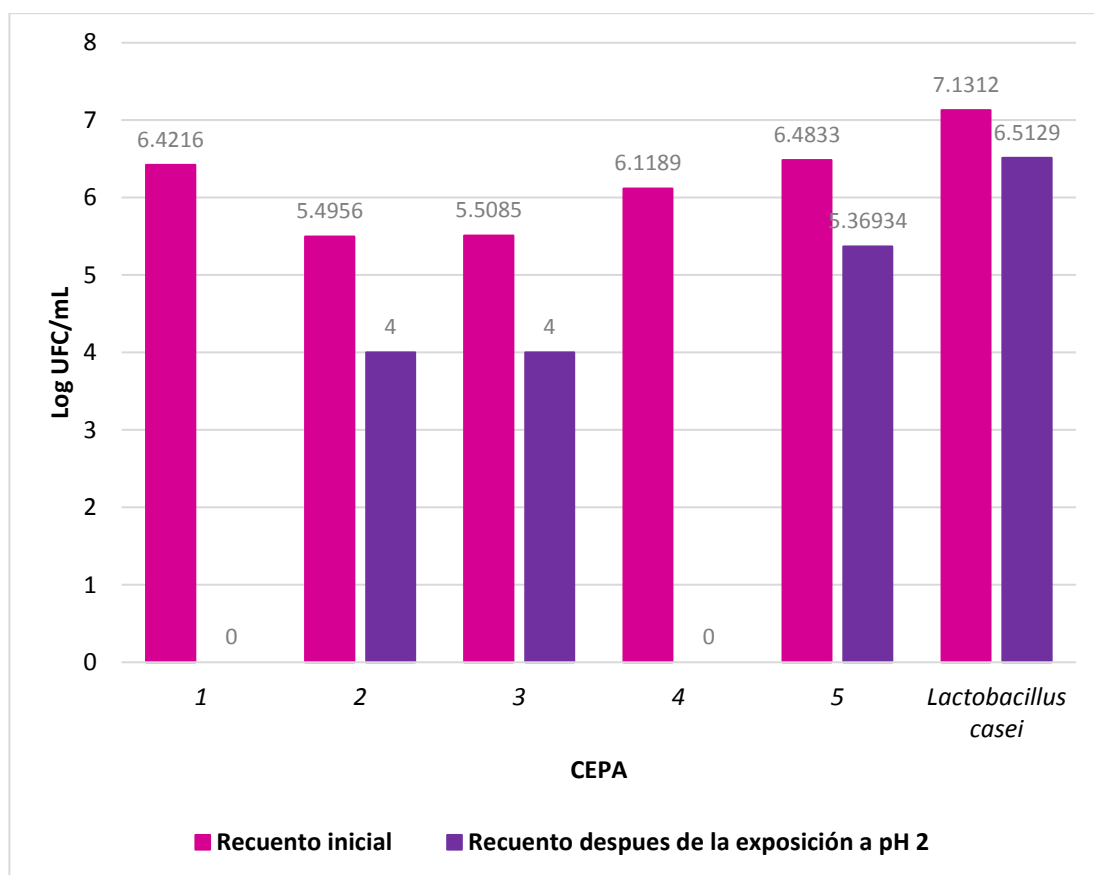


Figura 15. Comparación del crecimiento de las BAL aisladas de tepache y *Lactobacillus casei* en agar MRS acidificado (pH 2).

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*

La resistencia mostrada por las cepas 2, 3 y 5 es mayor que la resistencia observada por Acuña (2009), en un experimento realizado con cepas aisladas de un producto lácteo (suero costeño), bajo las mismas condiciones experimentales. Este autor reportó una disminución promedio del crecimiento, de 3.4 ciclos logarítmicos en 29 cepas que sobrevivieron al tratamiento de un total de 53 cepas evaluadas.

Existe poca información respecto a la supervivencia a pHs ácidos de cepas de BAL aisladas de matrices vegetales. Estudios realizados llevados a cabo con BAL aisladas de bebidas tradicionales mexicanas como el pulque (León et al., 2012), pozol, sotol así como el aguamiel (García, 2010), han demostrado que son capaces de sobrevivir a pH de 2.5, similar al del estómago.

5.4.3 Prueba de resistencia a pH ácido y pepsina

El pH en conjunto con la acción proteolítica de la pepsina fue un factor decisivo en la supervivencia de las bacterias lácticas aisladas de tepache ya que redujo en su totalidad el crecimiento de cuatro de las cinco cepas ensayadas (cepas 1, 2, 3 y 4). La supervivencia de las cepas 5 y de referencia (*Lactobacillus casei*), no se vio afectada de manera significativa (Figura 18). De hecho, la cepa 5 no sólo sobrevivió al tratamiento sino que también mostró una disminución de crecimiento más discreta con respecto a *L. casei*.

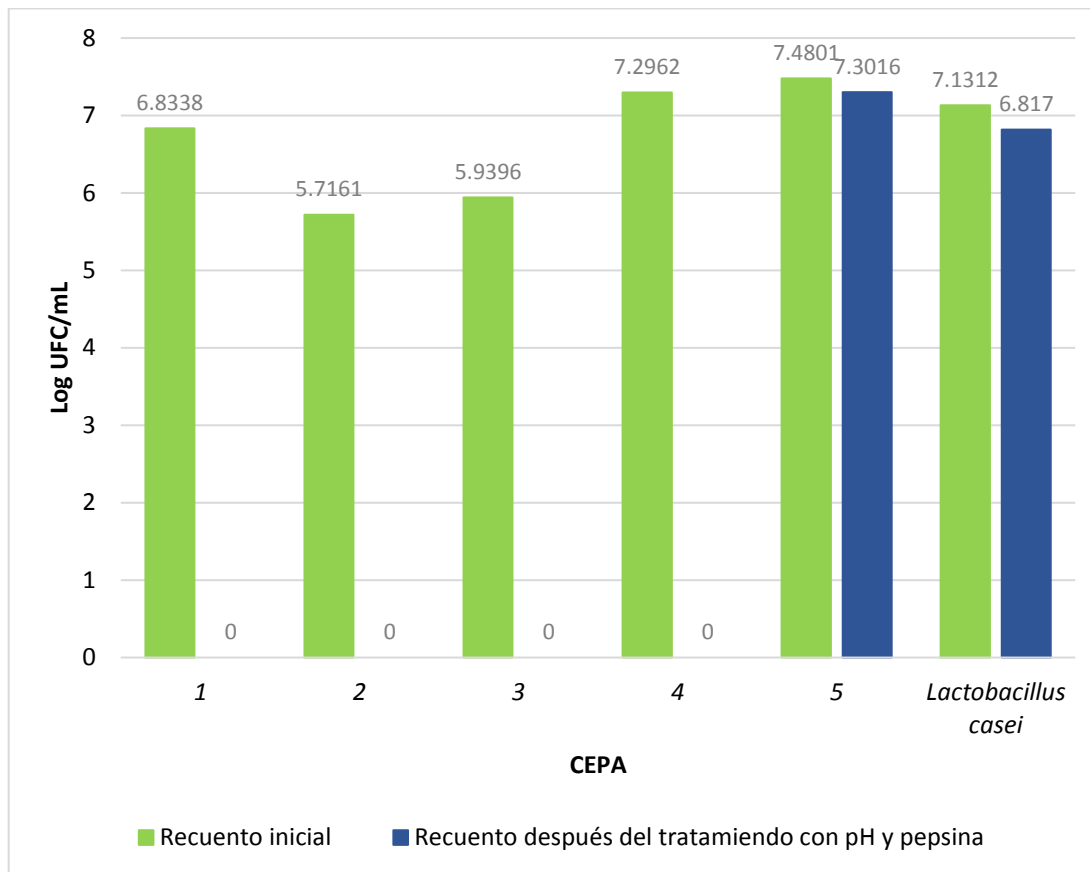


Figura 16. Comparación del crecimiento de las BAL aisladas de tepache y *Lactobacillus casei* antes y después del tratamiento en agar MRS acidificado a pH= 2.5 y con pepsina

En el caso de las cepas 2 y 3, la acción proteolítica de la pepsina fue el factor decisivo en la supervivencia de dichos microorganismos ya que el pH ácido, aunque disminuyó su crecimiento (Figura 17), no lo inhibió, como en el caso de la acción conjunta del pH y la pepsina. Por su parte, la cepa 5 mostró una menor reducción de células viables al final del tratamiento en comparación con la reducción observada durante su exposición a pH 2. Este resultado pudo deberse a que el pH de la mezcla ácido enzimática fue mayor en 0.5 unidades con respecto al pH utilizado para la prueba de resistencia a la acidez (pH 2).

El comportamiento de la cepa 5 coincide con el mostrado por dos cepas aisladas de pulque (León, 2012) y algunas bacterias lácticas del vino (García et al., 2014), las cuáles también han mostrado resistencia a el tratamiento *in vitro* con jugos gástricos artificiales. Además, la capacidad de supervivencia de bacterias lácticas aisladas de alimentos fermentados koreanos a sobrevivir bajo las mismas condiciones ácido-enzimáticas *in vitro* ensayadas, ha sido probada previamente (Sung-Mee y Dong-Soon, 2008).

Se sabe que la capacidad de cualquier microorganismo de sobrevivir a determinado pH depende directamente de la concentración de iones hidronio que sea capaz de tolerar en el medio y de la capacidad de equilibrar dicha concentración con la intracelular y que varía de una especie a otra (Rodríguez et al., 2005). Por otra parte, la acción de la pepsina consiste en la hidrólisis selectiva entre los enlaces de aminoácidos hidrófobos con cierta especificidad para algunos (Fersht, 1980), por lo que la resistencia de cada especie bacteriana a su acción proteolítica está relacionada con el contenido de aminoácidos de sus proteínas de membrana.

5.4.4 Determinación del porcentaje de células viables

En la Tabla 2 se muestran los porcentajes de supervivencia obtenidos para las cinco cepas aisladas del tepache y para *Lactobacillus casei*. Como se puede observar, todas las bacterias lácticas sobrevivieron al tratamiento con sales biliares con porcentajes elevados de supervivencia, a excepción de la cepa 2, la cual se vio más afectada durante el ensayo.

Tabla 3. Porcentaje de células viables para cada cepa después de las 3 pruebas in vitro a las cuáles fueron sometidas (tolerancia a sales biliares, resistencia a pH ácido y resistencia a pH ácido y pepsina).

<i>Cepa</i>	Tolerancia a sales biliares	Resistencia a pH ácido	Resistencia a pH ácido y pepsina
<i>1</i>	89.5%	No sobrevivió	No sobrevivió
<i>2</i>	66.1%	72.79%	No sobrevivió
<i>3</i>	83.47%	72.62%	No sobrevivió
<i>4</i>	80.85% ⁹	No sobrevivió	No sobrevivió
<i>5</i>	92.8%	82.82%	97.6%
<i>Lactobacillus casei</i>	96.316%	91.33%	95.59%

La cepa 1 y 4 sólo mostraron resistencia al tratamiento *in vitro* con sales biliares, ya que el pH y la acción ácido-enzimática del segundo y tercer tratamiento respectivamente, inhibieron por completo su crecimiento. Esto demuestra que no serían capaces de resistir las condiciones extremas de acidez e hidrólisis enzimática del tracto gastrointestinal y por lo tanto, no serían capaces de tener efecto probiótico.

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*

Las cepas 2 y 3, a pesar de resistir la acidez del medio y tolerar la concentración de sales biliares con porcentajes medios de supervivencia comparadas con la cepa control, no fueron capaces de sobrevivir a la acción conjunta del pH y la pepsina. Estos factores en el medio limitaron su crecimiento por lo que estas cepas no resistirían la exposición a los jugos gástricos del estómago.

Finalmente, de todas las cepas ensayadas, únicamente la cepa 5 resistió a todos los ensayos *in vitro* realizados mostrando un comportamiento similar al de *Lactobacillus casei*, con excepción del ensayo de resistencia a pH 2 en el cual obtuvo 82.82% de supervivencia frente a 91.33% de la cepa control, no obstante, este tratamiento afectó la supervivencia de ambas bacterias lácticas. Los resultados indican que la cepa 5, presenta probable capacidad probiótica ya que fue capaz de resistir las condiciones gastrointestinales simuladas en los ensayos realizados. Sin embargo, es necesario realizar pruebas para determinar su capacidad de reaccionar a algunos antibióticos de uso comercial, adhesión a células intestinales así como ensayos *in vivo* para someterla a condiciones reales del tracto gastrointestinal y así afirmar que, efectivamente, se trata de una bacteria con capacidad probiótica.

Conclusiones



Conclusiones

6 CONCLUSIONES

Es posible elaborar tepache a partir de la fermentación de cáscaras de piña bajo condiciones controladas. Sin embargo, aspectos como el origen de la materia prima y las variables del proceso de fermentación influyen significativamente en la cantidad y tipo de microorganismos que conforman la microbiota nativa de este producto.

El pH y la acidez total del tepache dependen de la concentración inicial de azúcares fermentables presentes en el medio, lo que constituye una limitante para el metabolismo bacteriano durante la fermentación.

El monitoreo de los cambios ocurridos en el pH y la acidez durante la fermentación del tepache permite establecer una relación entre ambas variables y correlacionarlas con el crecimiento de las bacterias ácido lácticas y con el comportamiento de su metabolismo durante el proceso.

El tepache es una bebida fermentada con una microbiota muy variable, de la que fue posible aislar una bacteria ácido láctica con potencial probiótico debido a su capacidad de sobrevivir bajo condiciones hostiles (acción detergente de sales biliares, pH ácido y acción proteolítica de una mezcla ácido enzimática) comparable a la mostrada por *Lactobacillus casei*, un probiótico por excelencia.

Perspectivas



Perspectivas

7

7 PERSPECTIVAS

Sería recomendable analizar la microbiota nativa de la bebida a partir de materia prima de origen diverso y bajo diferentes procesos tradicionales de fermentación para analizar la diversidad microbiológica de este complejo consorcio microbiano.

Sería conveniente realizar pruebas específicas para la identificación bioquímica y molecular de las bacterias ácido lácticas aisladas del tepache.

Sería necesario realizar pruebas para determinar la resistencia a antibióticos de uso comercial, la capacidad de adhesión a células intestinales así como ensayos *in vivo* para someter a la bacteria ácido láctica con probable capacidad probiótica aislada a condiciones reales del tracto gastrointestinal y así afirmar que, efectivamente esta es un probiótico.

Referencias



Referencias

8 REFERENCIAS

- Acuña, M. Y. (2009). *Selección e identificación de BAL con potencial probiótico aisladas de suero costeño* (Tesis de maestría). Universidad de La Sabana, Bogotá.
- Aidoo, K. E., (1986). Lesser-known fermented plant foods. *Tropical Science*, 26, 249-258.
- Almanza & Barrera, E. (1991). *Tecnología de leche y derivados*. Bogotá: Unisur
- Barreiro, M. J. A. & Sandoval, B. A. J. (2006). *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas*. Caracas, Venezuela: Equinoccio.
- Batoock, M. & Azam-Ali, S. (1998). *Fermented fruits and vegetables. A global perspective*. Rome: FAO.
- Beagley, M., Hill, C. Cormar, G. y Gaham, M. (2006). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology*, 25, 625-651.
- Campbell-Platt, G. (1994). Fermented foods- a world perspective. *Food Research International*, 27: 253-257.
- Carr, J. F., Chill, D. & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370.
- Castro, L. A., & Rovetto, C. (2006). Probióticos: utilidad clínica. *Colombia Médica*, 37(4), 308-314.
- Cervantes, C. M. (2008). Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopía Raman. *Superficies y vacío*, 20(3), 1-5.
- Chinte, S. P. (2008). *Philippine fermented foods, principles and technology*. Diliman: The University of Philippines Press.
- Corona-González, R. I., Ramos-Ibarra, J. R., Gutiérrez-González, P., Pelayo-Ortíz, C., Guatemala-Morales, G. M., & Arriola-Guevara, E. (2013). El uso de la metodología de superficie de

- respuesta para evaluar las condiciones de fermentación en la producción de tepache. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12 (1), 19-28.
- Costa, M. G. M., Fonteles, T. V., de Jesus, A. L. T., Rodrigues, S. (2013). Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: process optimisation and product stability. *Food Chemical*, 139, 261–266.
- Cruz, S. & Ulloa, M. (1973). Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y otros países latinoamericanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 34, 423-458.
- Cueto, V. M. C., Acuña, M. Y. & Valenzuela, R. J. (2010). Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actualidades Biológicas*, 32 (93), 129-138.
- De Vrese, M., Steglman, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C. & Scherezenmeir, J. (2001). Probiotics compensation for lactase insufficiency. *Clinical Nutrition*, 73, 421–429.
- Dharmasena, M. P. (2012). *Assessment of viability of probiotic bacteria in non dairy food matrices under refrigeration storage*. (Tesis de Maestría). Clemenson University, Estados Unidos.
- Donkor, O. N., Tsangalis, D. & Shah, N. P. (2007). Viability of probiotic bacteria and concentrations of organic acids in commercial yoghurts during refrigerated storage. *Food Australia*, 59(4), 121–126.
- Doyle M. (2001). *Microbiología de los alimentos: Fundamentos y fronteras*. Zaragoza, España: Acribia.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S... Collins, J. K. (2001). In Vitro Selection Criteria for Probiotic Bacteria of Human Origin: Correlation with In Vivo Findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 386-92.

- Escalante, A., Rodriguez, M., Martinez A., López-Munguía, A., Bolivar, F., & Gosset G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235, 273-279.
- Fersht, A. (1980). *Estructura y mecanismo de los enzimas*. España: Editorial Reverté.
- FAO (1998). *La fermentación en pequeña escala*. Recuperado de: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/9812sp3.htm>
- FAO & OMS. *Probióticos en los alimentos: Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación, 2006*. Italia, Roma: FAO Y OMS. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>
- Farnworth, E. R., Mainville, I., Desjardins, M. P., Gardner, N., Fliss, I. & Champagne, C. (2007). Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *International Journal of Food Microbiol.* 116, 174–181.
- Fonteles, T. V., Costa, M. G., de Jesus, A. L. T., y Rodrigues, S. (2011). Optimization of the fermentation of cantaloupe juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. *Food Bioprocess Technology*. 5 (7), 2819–2826.
- García, R. A. (1998). *Estudio estadístico para predecir el tiempo de maduración de queso manchego, e identificación de la microbiota*. (Tesis doctoral). Universidad de Castilla- La Mancha, España.
- García, L. D. (2010). *Aislamiento de microorganismos probióticos a partir de bebidas fermentadas (Agua miel, pozol y sotol)*. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, Coahuila, México.
- García, R. A., González, L. D., Esteban, F. A., Requena, T., Bartolomé, B. & Moreno, A. M. V. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*, 44,220-225.

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*

- Gianella, R. A., Broitman, S. & Zamchech, N. (1972). Gastric acid barrier to ingested microorganisms in man: studies in vivo and in vitro. *Gut*, 13(4), 251-256.
- Gilliland, S. E., Staley, T. E. & Bush, L. J. (1984). Importance of bile tolerance *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67, 3045-3051.
- Godoy, A., Herrera, T. & Ulloa, M. (2003). *Más allá del pulque y el tepache: Las bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México*. México: UNAM.
- González, R. F. & González-Martínez, B. E. (2006). Criterios De calidad de los microorganismos probióticos y evidencia sobre sus efectos hipocolesterolémicos. *Revista salud pública y nutrición*. 7(1): 1-8.
- Granados, P. R. & Villaverde, P. M. C. (2003). *Microbiología*. Madrid, España: Copyright.
- Halász, A. (2009). Lactic Acid Bacteria. En Lasztiy, R. (Eds). *Food Quality and Standards* (pp. 70-83). Oxford: EOLSS. Recuperado de: <http://www.suagm.edu/umet/biblioteca/pdf/GuiaRevMarzo2012APA6taEd.pdf>
- Herrera, T. & Ulloa, M. (1978). Descripción de una especie nueva de levadura, *Candida queretana*, aislada del tepache de Querétaro, México. *Sociedad Mexicana de Micología*, 12, 13-18.
- Herrera, T. & Ulloa, M. (1982). Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache. *Anales, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*, 47(53); 145-163.
- Horwitz, W. (1980). *Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Jay, M. J. (1992). *Microbiología Moderna de los Alimentos* (tercera edición). España: Acribia.

- Jackson, M. S. & Bird, A. R., Mc Orist, A. I. (2002). Comparison of two selective media for the detection and enumeration of lactobacilli in human faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 51, 313–321.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno- Terrazas, R. M., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeast associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *Yeast Research*, 8, 1037-1052.
- León, D. I., Méndez, C. D. S., Rodríguez, P. D. P., Puente, H. L., García, S. I. F. & Salgado, B. R. (2012). Análisis bromatológico y aislamiento de microorganismos con potencial probiótico del pulque. *Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar*, 11, 115-122.
- Martínez, V., Alvarado, G., Borrás, M., Montalvo, C., Soriano, E., & Galindo, S. I. (2013). Análisis de tepache producido en el municipio de Puebla para la identificación y aislamiento de microorganismos de interés biotecnológico en la industria alimentaria. En Ramos, M. & Aguilera, V. (Eds.), *Ciencias Naturales y Exactas, Handbook* (pp 24-26). Valle de Santiago, Guanajuato: ECORFAN.
- Monser, S. A. & Savage, D. C. (2001). Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Applied Environmental Microbiology*, 67, 3476-3480.
- Moreno-Terrazas, C. R. D. (2005). *Determinación de las características microbiológicas, bioquímicas, fisicoquímicas y sensoriales para la estandarización del proceso de elaboración de tepache* (Tesis inédita de Doctorado). Universidad Autónoma Metropolitana, México D. F.
- Nelson L., Michael, M. y Cox. (2000). *Lehninger Principios de Bioquímica*. Barcelona, España: Editorial Omega.

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*

- Ortíz, A. y Reuto, J. (2007). Evaluación de la capacidad probiótica in vitro de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá: Colombia.
- Park, S., Hwang, M., Kim, Y., Kim, J., Song, J., Lee, K... Kim, T. (2006). Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 35-37.
- Parra, H. R. A. (2010). Bacterias Lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8(1). Recuperado de <http://revistabiotechnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotechnologia/article/view/129>
- Pereira, A. L. F., Maciel, T. C. & Rodríguez, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44, 1276–1283.
- Real Academia Española. (2001). Diccionario de la lengua española (22.a ed.). Recuperado de <http://www.rae.es/rae.html>
- Ramírez, R. J. C., Rosas, U. P., Velázquez, G. M. Y., Ulloa, J. A., & Arce, R. F. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente*, 7, 1-16.
- Ramos, C. A., Monteoliva, S. M., & Nader, M. F. E. (2012). *Probióticos y salud*. España: Diaz de Santos.
- Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T., & McCormick, J.K., (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology*, 16, 72–658.
- Rodríguez, C. E., Gamboa, C. M. M., Hernández, C. F. & García, H. J. D. (2005). *Bacteriología General: Principios y prácticas de laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Rodríguez, G. J. M. (2006). *Microorganismos y salud: Bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas*. Madrid, España: Complutense.

- Rodríguez, G. V. & Guerrero, B. J.A. (2010). Probióticos: resistencia gastrointestinal y microencapsulación. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 4 (2): 48-57.
- Rubio, M. T., Lappe, P., Wachter, C., & Ulloa, M. (1993). Estudio microbiano y químico de la fermentación de soluciones de piloncillo inoculadas con tibicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 35: 19-31.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Matto, J. & Mattila-Sandlom, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84 (3), 197-215.
- Shirai, M. K., & Malpica, S. F. (2013). *Manual de prácticas de laboratorio, Tecnología de fermentaciones alimentarias*. México: UAM.
- Shori, A. B. (2015). The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 423–431.
- Sneath, P. H. A., Hair, N. S., Sharpe, M. E., & Holtz, J. G. (1986). *Begey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2.
- Spencer, J. F. & Ragout, A. L. (2001). *Métodos microbiológicos*. New Jersey, Estados Unidos: Humana Press Inc.
- Stiles, M. E. & Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiololy*, 36, 1-29.
- Sung-Mee, L. & Dong-Song, I. (2009). Screening and Characterization of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Korean Fermented Foods. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(2), 178-186. doi: 10.4014/jmb.0804.269
- Taboada, R. J. (2003). Bebidas fermentadas indígenas: Cacao, Pozol, Tepache, Tejuino y Tesgüino. En Long, J. (Eds.), *Conquista y comida: Consecuencia del encuentro de dos mundos* (437-450). México: UNAM

*Aislamiento de bacterias ácido lácticas a partir de una bebida fermentada de piña y
determinación de su probable capacidad probiótica*

- Torres, M. R. (2002). *Flora intestinal, probióticos y salud* (segunda edición). Guadalajara, Jalisco: Formas finas.
- Ulloa, M., Herrera, T., & Lappe, P. (1987). Fermentaciones tradicionales indígenas de México. INI. Serie de investigaciones sociales, *16*, 77.
- Vallejo, M., Marguet, E. R., & Etchehoury, V. E. (2008). Potencial Probiótico de Cepas de *Lactobacillus* aisladas de quesos vvinos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, *9*(4).
- Varela, G. & Grotiuz, G. (2006). Fisiología y metabolismo bacteriano. En Tejeda, G. J. R. (Eds.), *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (pp.43-57). Recuperado de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/cefaed2006.htm>
- Wills, R., McGlasson, B., Graham, D. & Joyce, D. (1999). *Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas, hortalizas y plantas ornamentales*. Zaragoza, España: Acribia.
- Winn, W. C., Allen, S. D., Janda, W. M., Koneman, E. W., Procop, G. W., Schrenkenberger, P. C. & Woods, G. L. (2006). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology* (sexta edición). Estados Unidos: Copyright.
- Wollowski, I., Rechkemmer, G., y Pool-Zobel, B.L., (2001). Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, *73*, 451–455.