

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA**

**“ANTONIO NARRO”**

**DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**TESIS**

**AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS A  
PARTIR DE BEBIDAS FERMENTADAS:**

**(AGUA MIEL, POZOL Y SOTOL)**

**Elaborada por:**

**Dolores García López**

**Presentado como requisito parcial para**

**Obtener el Título de:**

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE  
ALIMENTOS**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México**

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"  
DIVISION DE CIENCIA ANIMAL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS A PARTIR DE  
BEBIDAS FERMENTADAS  
(AGUA MIEL, POZOL Y SOTOL)**

POR

Dolores García López

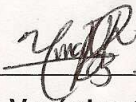
TESIS

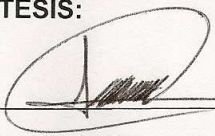
QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR COMO

REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:


INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

APROBADA POR EL COMITÉ DE TESIS:

  
Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez  
PRESIDENTE DEL JURADO

  
Dr. Heliodoro de la Garza Toledo  
SINODAL

  
Dr. Cristóbal Noé Aguilar González  
SINODAL

  
Dr. Raúl Rodríguez Herrera  
SINODAL

  
ING. JOSE RODOLFO PEÑA ORANDAY  
CORDINADOR DEL DEPARTAMENTO ANIMAL

Universidad Autónoma Agraria  
"ANTONIO NARRO"



COORDINACION DE  
CIENCIA ANIMAL

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE

ALIMENTOS

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS A PARTIR DE

BEBIDAS FERMENTADAS

(AGUA MIEL, POZOL Y SOTOL)

POR

Dolores García López

TESIS

QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN EL COMITÉ DE TESIS PARA REQUISITO

PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO EN:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

APROBADA POR:

Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez  
PRESIDENTE DEL JURADO

Dr. Heliodoro de la Garza Toledo  
SINODAL

Dr. Mario Alberto Cruz Hernández  
SINODAL

Dr. Antonio Francisco Aguilera C.  
SINODAL

ING. JOSE RODOLFO PEÑA ORANDAY  
CORDINADOR DEL DEPARTAMENTO ANIMAL



COORDINACION DE  
CIENCIA ANIMAL

DEDICATORIA

A mis padres digno ejemplo de trabajo y persistencia

**Sra. Guadalupe López Ventura**

**y**

**Sr. Miguel García Ramos**

A mis hermanos

**Mateo, Juana y Lupita**

## AGRADECIMIENTOS

DIOS por que ha sido fuente de constante alivio y sabiduría aun en el momento más difícil, darme todo lo que tengo y no dejarme caer nunca.

A mi Alma Terra Mater UAAAN por permitir construirme como profesionista.

Dr. Heliodoro Toledo de la Garza catedrático de la UAAAN por permitirme trabajar con este proyecto.

Dra. Ana Verónica Charles gracias por su confianza y su ayuda, sin la que no hubiera podido llevar a cabo la realización de este proyecto.

Mi mamá y papá por ser los mejores y estar conmigo incondicionalmente, gracias por haber sido mis grandes maestros en la carrera de mi vida, enseñando que lo más importante es conseguir nuestras metas a través de la honestidad, disciplina y responsabilidad en el trabajo.

A mis hermanos, por su apoyo solidario en todos los momentos en que necesite respaldo.



*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

A mis amigas Belén, Mar, Maira, Laura, Wendy, Clelita, esmeralda y a mis amigos Boni, Luis, Juan, Adolfo, Toño, Fredy gracias por permitirme conocerlos y ser parte de su vida. Por ayudarme y estar conmigo a lo largo de la carrera y aun después...

A Gary, por ser quien eres y formar parte de mi te amo.

Al personal del CEMAP, a GBS Global S.A. de C.V., al Dr. Mario cruz, M.C. Catalina, MC. Marcela, MC. Ismael, MC. Diana Morales y QFB. Diana. Por que me permitieron realizar las pruebas de investigación y por compartir tantas horas, por haber estado siempre animándome, enseñándome, aconsejándome en este proyecto.

A mis profesores del departamento de alimentos, M.C. Xochitl, Q.F.B. Oscar Noé, M.C. Laura, Dra. Lourdes, Q.F.B Carmen Julia, M.C Carmen Pérez, por aportar sus conocimientos y exigencias en mi formación profesional.

A todos mis compañeros de la generación CVI mil gracias por los momentos inolvidables que pasamos, por haber formado parte de mis logros, fracasos, alegrías y tristezas.

Al laboratorista Carlitos gracias por tus consejos y tus enseñanzas

También a agradecer al MC Héctor gracias por apoyarme, por tus enseñanzas, tus consejos y por ser un gran amigo.

## **Índice general**

RESUMEN.....	12
1. Introducción .....	13
1.1 Antecedentes .....	13
1.2 Justificación.....	16
1.3 Hipótesis .....	17
1.4 Objetivos .....	18
1.4.1 Objetivo General .....	18
1.4.2 Objetivos específicos .....	18
2. Revisión de literatura .....	19
2.1 Bebidas Fermentadas .....	19
2.1.1 Pozol.....	19
2.1.2 Aguamiel.....	20
2.1.3 Sotol .....	21
2.2 Alimentos Funcionales .....	22
2.3 Probióticos .....	23
2.3.1 Definición.....	23
2.3.2 Diferencias entre prebióticos y probióticos.....	24
2.3.3 Efectos benéficos de los microorganismos probioticos .....	26
2.3.4 Criterios sobre los microorganismos para ser incluidos en Alimentos Probióticos.....	30
2.4 Flora bacteriana del aparato digestivo.....	33
2.5 Bacterias ácido lácticas (BAL) .....	35
2.5.1 Género <i>Lactobacillus</i> .....	37
2.5.2 <i>Lactobacillus casei</i> como probiótico.....	38
2.5.3 Género <i>Streptococcus</i> .....	40
2.6 Género <i>Bifidobacterium</i> .....	41
2.6.1 Antecedentes Históricos .....	41
2.6.2 Taxonomía del género <i>Bifidobacterium</i> .....	43
2.6.3 Características culturales y morfológicas .....	45

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

6.2.4 Características fisiológicas.....	46
2.6.5 Características bioquímicas .....	48
3. Materiales y Métodos.....	50
3.1 Procedencia de la muestra experimental.....	50
3.2 Obtención de la muestra .....	50
3.2.1 Medición de pH de las muestras .....	50
3.2.2 Medición de °Brix.....	51
3.2.3 Adaptación de jarras de anaerobiosis .....	51
3.3 Medios y condiciones de cultivo .....	51
3.3.1 Cultivo en medio líquido .....	51
3.3.2 Cultivo en medio sólido .....	52
3.4 Aislamiento de cepas probióticas .....	54
3.5 Purificación y selección de cepas probióticas.....	55
3.5.1 Caracterización microscópica .....	55
3.6 Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas.....	55
3.6.1 Catalasa .....	56
3.6.2 Identificación bioquímica de microorganismos mediante el sistema API.....	56
3.7 Pruebas de actividad probiótica “ <i>in vitro</i> ” .....	58
3.7.1 Tolerancia de la capacidad de crecimiento a diferentes pH’s.....	58
3.7.2 Tolerancia de la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas .....	58
3.7.3 Capacidad de coagulación de la leche.....	58
3.7.4 Crecimiento en medios hostiles .....	59
3.7.5 Inhibición de microorganismos patógenos por las cepas seleccionadas .....	59
3.7.6 Prueba de sensibilidad de las cepas a los antibióticos.....	60
3.7.7 Estabilidad en el paso por el estómago.....	61
4. Resultados y Discusiones .....	62
4.1 Fermentación de sotol, agua miel y pozol.....	62
4.2 Aislamiento de las cepas probióticas.....	64
4.3 Purificación y selección de cepas.....	65
4.4 Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas.....	67



*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS APARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

4.4.1 Prueba de catalasa .....	67
4.4.2 Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas.....	68
4.5 Pruebas de actividad “ <i>in vitro</i> ” .....	70
4.5.1 Tolerancia de la capacidad de crecimiento a diferentes pH’s.....	70
4.5.2 Tolerancia de la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas .....	71
4.5.3 Crecimiento En Medios Hostiles .....	72
4.5.4 Selección de microorganismos de coagulación de la leche.....	73
4.5.5 Inhibición de Microorganismos Patógenos Sobre las Cepas Aisladas.....	75
4.5.6 Prueba de Sensibilidad de las Cepas Aisladas a los Antibióticos.....	78
4.5.7 Estabilidad en el Paso por el Estomago y Resistencia a Sales Biliares.....	80
5. Conclusiones .....	82
Bibliografía.....	83
Anexos .....	83

## **Índice de cuadros**

Cuadro 1. Principales prebióticos de uso industrial.....	25
Cuadro 2. Criterios de selección para las cepas probióticas .....	31
Cuadro 3. Microorganismos representativos en la vía gastrointestinal humana. ....	34
Cuadro 4. Taxonomía de <i>Lactobacillus casei</i> .....	39
Cuadro 5. Taxonomía del género <i>Bifidobacterium</i> .....	42
Cuadro 6. La lista actual de especies incluidas dentro del género <i>Bifidobacterium</i> .....	43
Cuadro 7. Composición química del medio de cultivo líquido MRS.....	52
Cuadro 8. Composición del medio de cultivo sólido (MRS) .....	53
Cuadro 9. Morfología macroscópica de las cepas aisladas.....	65
Cuadro 10. Código de identificación de las cepas aisladas.....	67
Cuadro 11. Resistencia a pH's .....	70
Cuadro 12. Crecimiento a las diferentes temperaturas .....	71
Cuadro 13. Resistencia a medios hostiles .....	72
Cuadro 14. Coagulación de la leche .....	74
Cuadro 15. Resultados estadísticos de la Inhibición de cepas probióticas contra patógenos.....	75
Cuadro 16. Sensibilidad de cepas a los antibióticos .....	78
Cuadro 17. Estabilidad del estomago y resistencia a sales biliares.....	80

## **Índice de figuras**

Figura 1. Cinética de disminución de pH durante el proceso fermentativo de las materias primas.....	64
Figura 2. Cinética de disminución de °Brix durante el proceso fermentativo de las materias primas .....	64
Figura 3. Morfología microscópica de los microorganismos obtenidos de diferentes bebidas fermentadas. A) pozol blanco, B) sotol filtrado, C) sotol sin filtrar, D) aguamiel y E) pozol negro.....	66
Figura 4. Identificación bioquímica de las cepas aisladas utilizando el sistema API.....	69
Figura 5. Media de halo de inhibición de las cepas probióticas más resistente.....	76
Figura 6. Media de halo de inhibición de las cepas patógenas más sensibles .....	76

## **RESUMEN**

Alrededor del mundo existe una gran variedad de alimentos tradicionales fermentados elaborados con vegetales y cereales que utilizan bacterias lácticas como iniciadores; esto debido a su composición y procesamiento pueden ser una fuente de bacterias ácido lácticas (BAL) que podrían tener actividad probiótica. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue aislar cepas probióticas a partir de las bebidas tradicionales fermentadas como aguamiel, pozol blanco, pozol negro, sotol filtrado y sotol sin filtrar.

Se seleccionaron 5 cepas aisladas de estas bebidas fermentadas, las cuales tienen características, propias de este grupo que presentaron tolerancia al crecimiento en medios hostiles como (pH ácido (2.5), sales biliares (2%) esto pudiera garantizar su supervivencia en las condiciones existentes en el tracto gastrointestinal humano, al igual que presentaron resistencia a temperaturas de 50°C y 60°C. Se detectó actividad antimicrobiana por parte de nuestras cepas (Am, Sf, Ssf, Pb, Pn) contra microorganismos patógenos (*S. aureus*, *Salmonella*, *E. coli* y *E. aerogenes*), aunque a diferentes niveles de inhibición. Se observó resistencia de las cepas (Am, Sf, Ssf, Pb, Pn) a una mezcla de bencilpencilina 600 UL/ ml, ampicilina 0.5 mg/ml, tetraciclina 0.25 mg/ml, trimetroprim – sulfametoxazol 0.16/8 mg/ml. Donde 4 de las cepas fueron sensibles a bencipencilina, la cepa más resistente fue Ssf ya que resistió a los 4 antibióticos probados.

Con estos resultados podemos decir que nuestras cepas podrían ser utilizadas para la elaboración de una leche fermentada o cualquier producto lácteo que probablemente tenga propiedades probióticas.

**Palabras clave:** *Bebidas fermentadas, aislamiento, probiótico.*

## **1. Introducción**

### **1.1 Antecedentes**

En la última década del siglo XX comenzaron a desarrollarse nuevos conceptos en nutrición, como fruto de la preocupación por elevar la calidad de vida de los individuos, así como de diversos estilos de vida.

El concepto de alimento funcional se emplea para describir a aquellos alimentos adicionados con ingredientes de diversas clases y orígenes que pueden ejercer efectos beneficiosos sobre quien los ingiere. Este concepto surgido en Japón ha ido popularizándose y expandiéndose hacia otros continentes como Europa, fundamentalmente debido al interés de la sociedad actual por la nutrición, la dieta y la salud. Los probióticos representan una gran área dentro de los alimentos funcionales y se ha intensificado la investigación para desarrollar productos probióticos y profundizar en el conocimiento de los efectos sobre la salud humana (Palanca, *et al.*, 2009).

Los probióticos se definen como “suplementos alimentarios microbianos vivos que afectan de forma ventajosa al animal huésped mejorando así su equilibrio intestinal microbiano”. Éstos microorganismos estimulan las funciones protectoras del tracto digestivo, y también son conocidos como bioterapéuticos, bioprotectores o bioprofilácticos, ya que se utilizan para prevenir las infecciones entéricas y gastrointestinales (Fuller, 1994).

Un microorganismo probiótico efectivo debe poseer una serie de características, dentro de las que destacan: no ser patógeno ni tóxico, debe ejercer efectos beneficiosos sobre la salud de quien lo ingiere, tener origen humano, ser tecnológicamente utilizable, presentar un elevado porcentaje de

células viables, debe ser capaz de sobrevivir a la flora intestinal, ha de permanecer viable durante su almacenamiento en refrigeración, y tener capacidad de adherirse a la superficie mucosa (Héller, *et al.*, 2001).

El establecimiento de criterios de selección y controles de calidad para productos probióticos se considera una prioridad debido a la rápida incorporación de estos productos en el mercado y su distribución en el ámbito internacional sin la existencia previa de una normativa comúnmente aceptada. En los últimos años ha aumentado el interés por los productos elaborados con microorganismos probióticos, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, esto ha dado lugar a la explotación comercial de algunas de estas bacterias y a la aparición en el mercado de una gran variedad de productos probióticos (Villoslada, *et al.*, 2007).

En la actualidad, todavía se desconocen muchos aspectos relativos a su mecanismo de acción; sin embargo si se reconoce su funcionalidad en diversos aspectos, tales como la prevención y tratamiento de trastornos gastrointestinales de diversas causas, la reducción de la intolerancia a la lactosa, la modulación de la respuesta inmunitaria, la reducción de los niveles de colesterol, la prevención de ciertos tipos de cáncer, la inhibición del desarrollo de la flora competitiva, patógena o alterante. Su actividad antimicrobiana, aunque en gran medida se atribuye a la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico y acético), es mucho más compleja y, también, es fruto de su mayor capacidad para competir por nutrientes, adaptarse al nicho ecológico y síntesis de otros compuestos antimicrobianos como bacteriocinas, compuestos heterocíclicos, diacetilo y otros (Salminen, *et al.*, 1999).

El mercado de los probióticos está en franca expansión. En su versión más conocida, los yogurts y los fermentados lácteos (Yakult®), las bebidas con microorganismos benéficos tienen cada vez más presencia en los anaqueles. Por



ejemplo, el producto Actimel®, de “The Dannon Company” alcanzó ventas aproximadas mundiales de 1.8 billones de dólares en el 2007. Veinticinco millones de personas, en 30 países del mundo, consumen Yakult® diariamente. Actualmente, la gran mayoría de los productos probióticos existentes se comercializan en forma líquida, principalmente como bebida láctea fermentada. La industria de bebidas probióticas ha tenido un crecimiento exponencial, gracias a que la tendencia en estas últimas décadas se ha dirigido hacia la alimentación saludable, por su comprobado efecto positivo en la calidad de vida de las personas que las consumen.

El proceso de la fermentación es uno de los conocimientos más antiguos de la humanidad. En México, país de grandes contrastes, tradiciones y gran diversidad cultural y biológica, se encuentran alimentos muy variados, entre ellos, los alimentos fermentados tradicionales que se consumen hoy en día y que complementan la dieta de forma importante. Los alimentos o bebidas fermentadas son aquellos en que una etapa esencial de su procesamiento se debe al crecimiento y la actividad de microorganismos (hay fermentaciones lácticas, acéticas, alcohólicas y mixtas, entre otras) (Díaz y Ruíz, *et al.*, 2003)

Existen diversos reportes sobre el estudio de microorganismos probióticos y sus efectos sobre el humano, sin embargo, esta investigación plantea el estudio y aislamiento de cepas probióticas a partir de nuevas fuentes de obtención como lo son las bebidas fermentadas (agua miel, pozol y sotol).

## **1.2 Justificación**

La reciente investigación se realizó con el fin de buscar diferentes alternativas para el aislamiento de microorganismos probióticos ya que en la actualidad estos microorganismos son muy demandados en la industria alimentaria.

Está comprobado que las bacterias probióticas, principalmente *Bifidobacterias* y *Lactobacillus*, ejercen efectos benéficos en la salud, mediante interacciones con el intestino y sus metabolitos. En la actualidad hay un considerable interés por el aumento del número y de la actividad de la flora del intestino grueso tanto de humanos como animales que promueve la salud, en detrimento de las especies con mayor potencial para causar daños.

Existe un amplio interés científico e industrial hacia el desarrollo de bioprocesos novedosos que puedan mejorar el rendimiento y la productividad actuales, así como simplificar el ciclo de producción. Un gran aporte a la industria nacional, sería la producción de los probióticos a partir de un medio no láctico para ampliar sus aplicaciones a otros alimentos, ya sea para consumo humano o animal, con la correspondiente reducción de costos para los consumidores.

Desde hace algún tiempo, la industria alimenticia se ha sumado a la producción de probióticos, lo cual ha permitido disminuir sus costos y facilitar su acceso por parte de los consumidores.

En la actualidad el uso de los microorganismos probióticos en la vida diaria los seres vivos han tomado un papel muy importante, por esa razón la búsqueda de nuevas alternativas de obtención y caracterización de cepas probióticas mexicanas con actividad antimicrobiana para desarrollar productos para la salud humana y animal es un tema innovador.

Tomando en cuenta lo anterior, para la presente investigación se realizó la búsqueda de microorganismos probióticos en bebidas fermentadas de origen mexicano elaboradas de forma artesanal tales como: agua miel, pozol y sotol. Debido a que los métodos de elaboración de estos productos se fundamenta en la fermentación de los cultivos regionales de cada estado de la república.

### **1.3 Hipótesis**

Es posible obtener microorganismos probióticos a partir de bebidas fermentadas (agua miel, pozol y sotol) de origen mexicano elaboradas de una manera artesanal, debido a que los procesos de elaboración para este tipo de bebidas son regionales y por lo tanto no están regulados.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo General**

Obtener microorganismos probióticos a partir de bebidas fermentadas (agua miel, pozol y sotol) de origen mexicano elaboradas en forma artesanal.

### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Aislar, identificar y caracterizar morfológicamente a los microorganismos probióticos de bebidas tradicionales fermentadas (aguamiel, sotol y pozol).
- Evaluar y seleccionar los microorganismos en base a la coagulación de la leche y crecimiento en medios hostiles (pH, temperatura).
- Evaluar el efecto de inhibición de las cepas seleccionadas sobre algunos microorganismos patógenos de interés agroindustrial.
- Evaluar la sensibilidad de las cepas a los antibióticos (bencilpenicilina, ampicilina, tetraciclina y trimetoprin – sulfametoxazol).
- Evaluar la tolerancia de las cepas seleccionadas a las condiciones de pH y sales biliares similares a aquellas en el tracto gastrointestinal.

## **2. Revisión de literatura**

### **2.1 Bebidas Fermentadas**

El proceso de la fermentación es uno de los conocimientos más antiguos de la humanidad. En México, país de grandes contrastes, tradiciones y gran diversidad cultural y biológica, se encuentran alimentos muy variados, entre ellos, los alimentos fermentados tradicionales que se consumen hoy en día y que complementan la dieta de forma importante. Las bebidas y los alimentos indígenas fermentados han sido de gran importancia en la vida diaria y ceremonial de numerosos grupos desde la época prehispánica hasta la actual. Los alimentos o bebidas fermentadas son aquellos en que una etapa esencial de su procesamiento se debe al crecimiento y la actividad de microorganismos (hay fermentaciones lácticas, acéticas, alcohólicas y mixtas, entre otras) (Díaz-Ruíz, *et al.*, 2003).

#### **2.1.1 Pozol**

Entre las bebidas y los alimentos fermentados autóctonos de México no alcohólicos de origen prehispánico el más importante es el pozol. Esta bebida refrescante, acida no alcohólica, obtenida de la fermentación espontánea de masa de maíz nixtamalizado (Ulloa, *et al.*, 1987). El polisacárido más abundante en el maíz es el almidón (75%- 85% de peso en base seca), aunque también están presentes mono y disacáridos en baja concentración (Boyer y Shannon, 1987). Durante la nixtamalización la concentración de mono y disacáridos disminuye considerablemente (Trejo- González *et al.*, 1982), por lo que el almidón debe ser un sustrato esencial para la fermentación (Díaz-Ruíz, *et al.*, 2003).

Los estudios microbiológicos de estas bebidas indican que contienen gran diversos microorganismos benéficos como las bacterias lácticas, que son las primeras en desarrollarse y que están presentes durante todo el proceso. Ellas son las responsables de la acidificación de la masa (llega a tener un valor de pH cercano a 4), ya que producen ácido láctico, el que imparte un sabor fresco y agradable al producto; de ellas destacan las amilolíticas (como *Lactobacillus acidophilus* y *L. crispatus*) (Díaz-Ruíz, *et al.*, 2003).

Estas bacterias convierten el almidón del nixtamal, su principal carbohidrato en ácidos, a diferencia de las que se encuentran en alimentos similares hechos con maíz o productos lácteos fermentados como el yogurt que aprovechan la lactosa (azúcar de la leche). Contiene además bacterias como *Achromobacter pozolis* o *Agrobacterium azotophilum*, y *Aerobacter aerogenes*, que fijan el nitrógeno atmosférico y que podrían ser las responsables del alto contenido de nitrógeno del pozol, comparado con el de la masa del maíz sin fermentar. Se encuentran también bacterias del género *Bacillus* (Ulloa, *et al.*, 1987).

### **2.1.2 Aguamiel**

El pulque es una bebida tradicional Mexicana que se obtiene por la fermentación de la savia azucarada conocida como aguamiel obtenida a partir de diferentes especies de maguey (*Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. salmiana*). Esta bebida es consumida por poblaciones indígenas y mestizas de muchas regiones del país, particularmente en las áreas de la meseta central. Se caracteriza por ser una bebida alcohólica, blanca, con olor fuerte y viscosa (Cervantes y Pedroza, 2007).



El proceso de fermentación inicia en el maguey, donde se encuentran microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de exopolisacáridos. Estos microorganismos transforman de manera natural parte de los azúcares disponibles en aguamiel, sin embargo el proceso se acelera por la adición de un inóculo iniciador llamado semilla (una porción de pulque previamente producido). El tiempo de fermentación puede durar algunos días a 25 °C. A medida que pasa el tiempo se presentan cambios importantes como incremento en el porcentaje de etanol y formación de exopolisacáridos como  $\beta$ -glucanos y dextranos que generan un incremento en la viscosidad transformado el fluido de newtoniano a no newtoniano (Cervantes y Pedroza, 2007).

### **2.1.3 Sotol**

El sotol cuyo nombre científico es *Dasyllirion*, es nativa del desierto Chihuahuense. Esta planta sobrevive tanto a la crudeza de helados inviernos como a los ardientes veranos gracias a su enorme energía latente, la cual da al sotol su peculiar sabor. La severidad del medio desértico es en sí, un medio de selección natural que solo permite sobrevivir a las plantas más sanas y fuertes. Este riguroso control de calidad de la naturaleza se detecta claramente en el sabor suave de sotol (Fisac, 2009).

Se llevan a la fábrica, se cocinan al vapor, se desgarran y se exprimen para extraerles su dulce jugo. Este jugo se deja fermentar por asiento natural, permitiendo se transformen en alcoholes. Durante los procesos de fermentación y destilación del sotol no se utiliza otra materia prima que no sean los extractos obtenidos de la misma planta (Fisac, 2009).

Los consorcios microbianos son frecuentemente encontrados en varias bebidas fermentadas y se considera que esta interacción positiva es un

mecanismo evolutivo que favorece a todas las poblaciones presentes en el consorcio con respecto a la captación de nutrientes, eliminación de ciertos metabolitos que pueden llegar a ser tóxicos si se acumulan en la bebida y control de flora microbiana alterante de la fermentación. La literatura reporta que a partir de bebidas fermentadas se pueden recuperar diversos grupos microbianos clasificados como: subdivisión *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc mesenteroides*, subdivisión proteobacteria que incluye *Acetobacter pomorium*, *Zymomonas mobilis*, y hongos levaduriformes pertenecientes a los géneros *Sacharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.* (Cervantes y Pedroza, 2007).

## **2.2 Alimentos Funcionales**

El creciente número de trabajos científicos publicados en las dos últimas décadas sobre la relación entre la dieta y la incidencia de enfermedades crónicas ha puesto de manifiesto las extraordinarias posibilidades que ofrecen los alimentos para mantener, e incluso mejorar, el estado de salud. Como consecuencia de ello, surgieron en Japón, en la década de los 80's, los denominados "alimentos funcionales". Consiste en la incorporación de ciertos ingredientes bioactivos a alimentos conocidos que no lo contienen de forma natural. Se pretende con ello reforzar la dieta con sustancias de efecto saludable cuya ingestión no se produce de forma suficiente mediante la alimentación habitual (Palanca, *et al.*, 2009).

Es comprensible que la posibilidad de prevenir enfermedades mediante la alimentación sea objeto de gran interés para la población y que la industria alimentaria vea en ello una buena oportunidad de negocio.

Existe la creencia de que los alimentos funcionales “curan” enfermedades, sin embargo la propiedad funcional está relacionada con el papel metabólico estructural o fisiológico sobre el crecimiento, desarrollo, mantenimiento y otras funciones normales de los organismos; y no con la capacidad de tratar una patología. Los alimentos funcionales pueden prevenir enfermedades, pero no curar (Consumer, 2009).

## **2.3 Probióticos**

### **2.3.1 Definición**

La palabra “probiótico” significa “para la vida”, proviene del griego. Una de las primeras definiciones fue “sustancias producidas por un protozoario que estimulaban el crecimiento en otro” (Lilly y Stilwell 1965). Sin embargo, esta definición se ha ido modificando a través de los años. En 1974, Parker definió a los probióticos como organismos y sustancias que tienen un efecto benéfico en el animal huésped contribuyendo al balance en su flora intestinal. Sin embargo, estas definiciones no son muy adecuadas ya que la palabra “sustancia” incluye suplementos químicos, como antibióticos y los probióticos carecen de dichas sustancias.

En 1989, Fuller definió a los probióticos como “suplementos microbianos vivos que influyen de forma benéfica sobre el animal huésped, mejorando su balance microbiano intestinal”, haciendo notar la importancia de las células vivas como componentes esenciales de los probióticos.

Huis Veld y Havenaar (1991), ampliaron la definición al decir que los probióticos son “la mezcla o el microorganismo (s) aplicado al hombre o al animal que afecta benéfica al huésped mejorando las propiedades de la flora intestinal”. Esta definición implica que los probióticos contienen microorganismos vivos.

### **2.3.2 Diferencias entre prebióticos y probióticos**

Los prebióticos son definidos como alimentos no-digeribles, pero sí fermentables, que afectan al huésped por estimulación selectiva del crecimiento y actividad de una especie de bacterias o un número limitado de ellas en el colon. Comparados con probióticos, que introducen bacterias exógenas hacia el lumen, los prebióticos estimulan el crecimiento preferencial de un número limitado de bacterias, especialmente, aunque no exclusivamente, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. El éxito dependerá de la concentración inicial de la especie probiótica y del pH intraluminal. Los oligosacáridos de la leche materna son considerados el prototipo de los prebióticos, ya que estimulan los crecimientos preferencial de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en el colon de neonatos alimentados exclusivamente con leche materna (Schmidt y Labuza, 2000).

De todos los prebióticos disponibles, los únicos que poseen estudios para ser clasificados como ingredientes alimenticios funcionales son los fructanos-tipo inulina, unidos por enlace  $\beta$  para limitar su digestión por las enzimas intestinales; el cuadro 1 presenta los principales prebióticos fructooligosacaridos (Roberfroid., 2000).

**Cuadro 1. Principales prebióticos de uso industrial**

<b>Fructo-oligosacaridos</b>
<b>Galacto-oligosacaridos</b>
<b>Gentio-oligosacaridos</b>
<b>Inulina</b>
<b>Isomalto-oligosacaridos</b>
<b>Lactosa</b>
<b>Lactulosa</b>
<b>Lactosucrosa</b>
<b>Oligosacaridos de soya</b>
<b>Xilo-oligosacaridos</b>

Fuente: Roberfroir, 2000.

Estos prebióticos se encuentran presentes en el trigo, vegetales y frutas (cebolla, achicoria, ajo, puerros, alcachofas y plátanos).

Debido a su estructura, ellos son fermentados en el colon por bacterias endógenas hacia sustratos metabólicos y energéticos. Algunos autores han sugerido una dosis de 4-20 g/día, pero aun no existe una dosis recomendada. Dado su potencial osmótico y excesiva fermentación algunos efectos adversos son las flatulencias, meteorismo, dolor o malestar abdominal, y diarrea (Tuohy, *et al.*, 2003).

La mayoría de los resultados de los prebióticos provienen de estudios experimentales o experiencias con un número reducido de pacientes, por lo que sus conclusiones requieren ser validadas por estudios más amplios. En contraste a los prebióticos, la actividad de los probióticos se cuestionó cuando Metchinikoff

(1908) postuló que las bacterias ácido lácticas proveían beneficios en la salud y la longevidad. Hoy en día se sabe que las bacterias probióticas no se limitan a las ácido lácticas. Existen datos experimentales que sugieren el uso potencial de cepas de hongos como probióticos en situaciones clínicas (Schmidt y Lambuza, 2000).

Dado que la microflora del intestino es un componente constitutivo de las mucosas intestinales, los probióticos dan una oportunidad para reforzar las defensas contra las infecciones del tracto gastrointestinal. La teoría del mejoramiento de las mucosas se puede encontrar en la capacidad directa de combatir patógenos y/o en la capacidad de modular los mecanismos de defensa (Schmidt y Lambuza, 2000).

### **2.3.3 Efectos benéficos de los microorganismos probioticos**

A pesar de que a los probióticos se les ha atribuido una serie de beneficios en la salud, sus acciones anti-carcinogénicas, hipocolestérmicas y su acción en contra de patógenos entéricos y otros microorganismos han recibido gran atención (Mital y Garg, 1995). Algunos de estos beneficios son los siguientes:

Propiedades antimicrobianas: la microflora intestinal ejerce una barrera importante frente a las infecciones. Los mecanismos de acción son muy variados:

- a) Modificando los niveles de adhesión celular,
- b) Produciendo sustancias antimicrobianas o
- c) La estimulación de órganos linfoides asociados al tracto intestinal (Marquina y Santos, 2002),



- d) Colonización competitiva (que priva a los patógenos de nutrientes de nichos de implantación),
- e) Inhibición de adhesión y crecimiento de patógenos, que resulta de la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico y acético), peróxido de hidrogeno, dióxido de carbono y sustancias antimicrobianas conocidas como bacteriocinas (Héller, *et al.*, 2001).

Los ácidos orgánicos disminuyen el pH del contenido intestinal y ejercen una acción tóxica directa sobre la flora patógena. Los ácidos láctico y acético penetran la membrana celular y trastornan su potencial, ocasionando la inhibición del transporte de nutrientes y actividad de ATPasa. El peróxido de hidrogeno inactiva biomoléculas esenciales por reacción en cadena del anión superóxido. El dióxido de carbono, además de hacer el medio más anaerobio, inhibe la descarboxilación enzimática y rompe la membrana celular por acumulación gaseosa (Marquina y Santos, 2002).

Las bacteriocinas, en su mayoría identificadas en cepas de *Lactobacillus*, son un grupo heterogéneo de compuestos proteicos con actividad, modo de acción, peso molecular, origen genético y propiedades bioquímicas variables (Héller, *et al.*, 2001).

La cepa CRL-431 de *Lactobacillus casei* ha mostrado su capacidad para eliminar microorganismos patógenos del intestino, tales como: cepas enterotoxigénicas de *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei* y *Salmonella typhimurium* (Marquina y Santos, 2002). Las bacterias probióticas muestran propiedades contra bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y *Clostridium prefringes* (Shah, 2001).

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

Propiedades anticarcinogénicas. Las bacterias ácido-lácticas y los productos fermentados hechos de ellas tienen una actividad potencial anticarcinogénica como las bacterias *B. longum* y *B. infantis* son agentes efectivos contra tumores. Su mecanismo de acción se debe a la supresión de las enzimas bacterianas, a la activación del sistema inmune del huésped y a la reducción del pH intestinal. Las bacterias probióticas pueden remover las fuentes procarcinogénicas o las enzimas que desarrollan la formación de carcinógenos (Shah, 2001).

Reducción de colesterol: Estudios recientes han mostrado que el consumo de ciertos cultivos de productos lácteos puede reducir el nivel de colesterol en la sangre. El consumo de leches fermentadas conteniendo un gran número de bacterias probióticas ( $10^9$ ) por persona hipercolesterémicas pueden reducir los niveles de colesterol de 3.0 a 1.5 g/ L (Homma, 1998 citado por Shah, 2001). El efecto de las bacterias probióticas sobre la reducción y mecanismo del colesterol sanguíneo son desconocidos. Una hipótesis sugiere que algunas cepas de *L. acidophilus* pueden asimilar la molécula del colesterol, esta actividad ha sido reportada *in vitro* (Gilliland, *et al.*, 1985 citado por Sanders, 1999). La capacidad de ciertos *Lactobacilos* y *Bifidobacterias* probióticas para la desconjugación enzimática de los ácidos biliares se ha sugerido que tiene un papel en la regulación de niveles del colesterol sanguíneo en humanos. Los ácidos biliares desconjugados son más fáciles de excretar (Sanders, 1999).

Salud urogenital: El tracto urogenital de las mujeres está altamente colonizado por bacterias y es altamente susceptible a infecciones. El consumo oral de ciertos probióticos puede disminuir el desarrollo de infecciones provocadas por *Candida* y otras bacterias de la vagina. Diferentes estudios han correlacionado la

salud vaginal con la presencia de *Lactobacilos*, específicamente con *Lactobacilos*, productores de peróxido de hidrogeno (Sanders, 1999).

Alergias: Se han reportado estudios preliminares de la modulación de ciertas reacciones alérgicas debido a los probióticos. El rompimiento de las mucosas intestinales permitiendo el intercambio de antígenos puede ser un factor para desencadenar ciertas reacciones alérgicas. Desde que las bacterias probióticas han mostrado el mejoramiento de las funciones de protección de las mucosas, la hipótesis de que ellas juegan un papel en la moderación de la respuestas alérgicas han sido cuestionada (Sanders, 1999).

Reducción de la intolerancia a la lactosa: La intolerancia a la lactosa es un problema que padece un gran porcentaje de la población (50-70%) y se debe a la ingestión de productos que contienen lactosa y a los bajos niveles de  $\beta$ -D-galactosidasa intestinal. La lactosa es una sustancia osmóticamente muy activa y su presencia en el intestino ocasiona la salida de iones y fluidos de la mucosa intestinal hacia el exterior hasta alcanzar el equilibrio osmótico, provocando diarrea profusa (Marquina y Santos, 2002). Los cultivos microbianos para la elaboración del yogurt, *L. delbrueckii spp.bulgaricus* y *S. thermophilus*, contienen cantidades suficientes de  $\beta$ - D-galactosidasa, la cuales se han visto que puede ayudar a aliviar los síntomas de mala absorción de la lactosa. También su función es debido a que una cierta cantidad de lactosa es hidrolizada por bacterias del yogurt durante la fermentación. Otra razón se le atribuye a que la viscosidad del yogurt es elevada, por la cual, el lento transito por el tracto digestivo ayuda a que la lactosa puede ser digerida (Sanders, 1999).

Estimulación del sistema inmune: se ha observado inmunomodulación por *L. acidophilus* y *Bifidobacterias*, pero el mecanismo no es claramente entendido (Schiffirin, *et al.*, 1995, citado por Shah, 2001). Se ha reportado que ingiriendo los probióticos del yogurt, se estimula la producción de citosina en células sanguíneas y aumento en la actividad de macrófagos (Marteau, *et al.*, 1997, citado por Shah, 2001), incrementan la actividad natural de las células del hígado y los niveles de inmunoglobulinas en especial las secretoras de IgA (Sanders, 1999).

Mejoramiento del valor nutricional de un alimento: Los efectos nutricionales de los probióticos han sido muy estudiados en las leches fermentas con *Lactobacilos*. Estos productos tienen un menor contenido de lactosa y un alto contenido de aminoácidos libres y ciertas vitaminas, que otros productos fermentados. Se ha reportado que los *Lactobacilos* y *Bifidobacterias* producen ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina, pridoxina y vitamina K (O'Sullivan, *et al.*, 1992).

#### **2.3.4 Criterios sobre los microorganismos para ser incluidos en Alimentos Probióticos.**

Para que las bacterias seleccionadas como probióticos puedan proporcionar beneficios saludables y clínicos deben de cumplir una serie de requisitos. Klaenhammer y Kullen (1999) recopilaron y clasificaron los requisitos descritos en la bibliografía científica en cuatro grupos (Cuadro 2).

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS APARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

Cuadro 2. Criterios de selección para las cepas probióticas

<b>Idoneidad</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Identificación taxonómica precisa</li><li>• Habitantes normales de las especies objetivo: de origen humano para los probióticos humanos</li><li>• No tóxicos, ni patógenos y con estatus GRAS (Generally Reconized As Safe, reconocidos generalmente como seguros)</li></ul>
<b>Aplicación tecnológica</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Adecuado en la producción en masa y almacenamiento: buen crecimiento, recuperación, concentración, congelación, deshidratación y distribución.</li><li>• Viabilidad en elevadas poblaciones (preferentemente <math>10^6</math>-<math>10^9</math>)</li><li>• Estabilidad de las características deseadas durante la preparación, almacenamiento y entrega del cultivo.</li><li>• Capacidad de proporcionar cualidades organolépticas deseables cuando se incluyan en los alimentos o procesos de fermentación</li><li>• Genéticamente estable</li><li>• Genéticamente adecuado</li></ul>
<b>Competitividad</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Capaz de sobrevivir, proliferar, y conactividad metabólica en el lugar diana in vivo</li><li>• Resistente a la bilis</li><li>• Resistente a los ácidos</li><li>• Capaz de competir con la microflora normal, incluyendo las mismas especies o las mas cercanamente relacionadas, potencialmente resistente a las bacteriocinas, ácidos y otros antimicrobianos producidos por la</li></ul>

microflora residente. <ul style="list-style-type: none"><li>• Preferentemente con potencial de adherencia y colonización.</li></ul>
<b>Rendimiento y funcionalidad</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Capaz de ejercer uno o más beneficios para la salud clínicamente documentados</li><li>• Antagonistas hacia las bacterias patógenas/ carcinogénicas</li><li>• Producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas, peróxido de hidrogeno, ácidos orgánicos u otros componentes inhibitorios)</li><li>• Inmunoestimulatorios</li><li>• Antimutegenicos</li><li>• Anticarcinógenos</li><li>• Producción de compuestos bioactivos (enzimas, anticuerpos, péptidos)</li></ul>

Fuente: Klaenhammer y Kullen (1999).

Sin embargo, los criterios situados en los apartados competitividad y rendimiento permanecen bajo controversia, ya que los mecanismos subyacentes por los cuales los probióticos ejercen su papel funcional *in vivo* no están descritos totalmente. Tres excelentes ejemplos son:

a) Tolerancia a la bilis y a la actividad hidrolasa de las sales biliares: Los probióticos varían considerablemente sus niveles de tolerancia a la bilis, y el nivel mínimo aceptable para un candidato permanece todavía sin conocerse (Tannock, 1998).

b) Actividad adyuvante e inmunoestimulación: Hay mucha información sobre el incremento de los niveles de los anticuerpos IgA e IgM (Tannock, 1998). No obstante, estas propiedades son muy variables entre las cepas y falta por determinar qué características de la célula o de su superficie es la responsable de ejercer estos efectos.

c) Antimicrobianos: No se ha descrito ningún probiótico de los que han sido propuestos con efectos inhibitorios *in vivo* (Bernet y Camard, *et al.*, 1997). Así, queda por investigar si estos compuestos son producidos en el intestino o tienen propiedad funcional (Klaenhammer y Kullen, 1999).

## **2.4 Flora bacteriana del aparato digestivo**

La composición de la flora bacteriana varía según la región anatómica del tubo digestivo. En la cavidad oral del adulto existen  $10^7$  bacterias por gramo de saliva, predominando especies *Lactobacillus*, *Coliformes*, *Veillonella* y *Enterococcus*. El ácido presente en el estómago reduce la cantidad de estas especies a  $10^2$ - $10^3$  bacterias por gramo de jugo gástrico. En el intestino delgado proximal el número de bacterias varía entre  $10^3$ -  $10^4$  (Heller, *et al.*, 2001).

A lo largo del intestino se encuentran alrededor de 100 trillones de bacterias viables de 100 especies diferentes. La flora predominante principalmente de bacterias ácido lácticas, se ve reflejada por: *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*; bacterias anaerobias: *Bacteroidaceae*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Megasphaera*, *Bacillus*, *Cornebacterium*, *Pseudomonas* y levaduras (Héller, *et al.*, 2001). El cuadro 3 muestra los microorganismos que se encuentran en la vía gastrointestinal humana.

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

Cuadro 3. Microorganismos representativos en la vía gastrointestinal humana.

	<b>Estómago</b>	<b>Yeyuno</b>	<b>Íleon</b>	<b>Materia fecal</b>
Total de bacterias	1-10 <sup>3</sup>	1-10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup>
Aerobias o anaerobias facultativas				
Bacterias entéricas	1-10 <sup>2</sup>	1-10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>10</sup>
<i>Streptococos</i>	1-10 <sup>3</sup>	1-10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>10</sup>
<i>Estafilococos</i>	1-10 <sup>2</sup>	1-10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>7</sup>
<i>Lactobacilos</i>	1-10 <sup>3</sup>	1-10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>10</sup>
Hongos	1-10 <sup>2</sup>	1-10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>6</sup>
Bacterias anaerobias				
Bacteroides	Raras	1-10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>10</sup> -10 <sup>12</sup>
Bacterias bifidas	Raras	1-10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>8</sup> -10 <sup>12</sup>
Cocos Gram-positivos	Raras	1-10 <sup>3</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>8</sup> -10 <sup>11</sup>
<i>Clostridia</i>	Raras	Raras	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup> -10 <sup>11</sup>
<i>Eubacteria</i>	Raras	Raras	Raras	10 <sup>8</sup> -10 <sup>12</sup>

Fuente: de centro de investigación Nestlé I (Suiza)



## **2.5 Bacterias acido lácticas (BAL)**

Uno de los primeros estudios bacteriológicos del yogur fue realizado por Grigoroff en 1905, quien observó la presencia de tres tipos distintos de microorganismos, unos denominados "*Diplostreptococcus*", otros microorganismos de forma cocobacilar y otros de forma bacilar. Esta misma observación fue realizada por Lüerssen y Kühn (1908). No obstante, la popularidad alcanzada por el yogur se atribuye a Metchnikoff (1910), quien postuló la teoría de que la ingestión de una bacteria ácido láctica, denominada *Bulgarian bacillus*, prolongaba la vida. La presencia de este microorganismo en el yogur parecía inhibir el crecimiento en el intestino de los microorganismos responsables de la putrefacción. *Bulgarian bacillus* es en realidad "*Thermobacterium bulgaricum*" (Orla-Jensen, 1931), más tarde denominado *Lactobacillus bulgaricus* (normalmente conocido como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). No obstante, Rettger y Cheplin en 1921 y Rettger, *et al.*, en 1935, encontraron que *Thermobacterium acidophilin* (*Lactobacillus acidophilus*) era la bacteria acidoláctica que podía asentarse en el intestino y, además, las principales propiedades terapéuticas del yogur se ponían de manifiesto cuando *Lactobacillus acidophilus* era una de las bacterias presentes en el cultivo iniciador (Salmine, *et al.*, 1998).

La clasificación de las bacterias acido lácticas de Orla-Jensen aún se acepta como método estándar de diferenciación de estos microorganismos. Los de forma esférica (cocoidea) se conocen como "*Streptococcus*" y los bacilos se clasifican como *Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Betabacterium*. Según el manual de Bergey (1957), todas las bacterias ácido lácticas se incluyen en la familia *Lactobacillaceae*, que a su vez se subdivide en *Streptococcaceae* (de forma esférica u ovoide) y *Lactobacillaceae* (de forma bacilar). Esta clasificación

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

ha sido reorganizada en la octava edición del manual de Bergey (1974), que las considera dos familias separadas: *Streptococcaceae* y *Lactobacillaceae*. En la edición del manual de Bergey de 1986, los anteriores microorganismos están agrupados en diferentes secciones.

Las bacterias ácido lácticas (LAB) son un grupo de bacterias Gram positivas agrupadas por una gran cantidad de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general de este grupo de bacterias se incluye en el grupo de Gram-positivos, no esporulados, cocos o bacilos que producen ácido láctico como producto de la fermentación de carbohidratos.

Los límites de este grupo han sido objeto de controversia pero históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, y *Streptococcus* forman el corazón del grupo. Las revisiones taxonómicas de este género y la descripción de nuevos géneros sugieren que las bacterias ácido lácticas comprendan los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*. El género *Bifidobacterium*, frecuentemente está considerado en el mismo contexto que las bacterias ácido lácticas y posee algunas características comunes (Orla-Jensen, 1931).

La clasificación de las bacterias ácido lácticas en diferentes géneros está basada en la morfología, modo de fermentar la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, la habilidad para crecer a elevadas concentraciones de sales y la tolerancia ácido-base. Las bacterias ácido lácticas obtienen energía metabólica esencialmente mediante la fosforilación

a nivel de sustrato, durante la oxidación de carbohidratos, formando ácido láctico como principal metabolito. Además, poseen actividad proteolítica, lo que les permite la obtención de aminoácidos a partir de proteínas, en medios ricos en dichos constituyentes; aunque ésta es reconocidamente inferior a otros grupos microbianos (*Bacillus*, *Proteus*, *Pseudomonas*) (O'Sullivan *et al.*, 1992).

### **2.5. 1 Género *Lactobacillus***

Los *Lactobacilos* se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, carnes y pescados. Forman parte de la flora normal de la boca, tracto intestinal y aparato reproductor femenino humano y de muchos animales. No son considerados patógenos (excepto algunas especies que parecen intervenir en la caries dental).

Tienen una gran importancia industrial, pues se utilizan en diversos procesos de fermentación láctica (yogur, quesos, etc.). Intervienen también, en la fabricación de productos derivados de los vegetales (pepinillos, aceitunas). Son bacilos largos con morfología cocobacilar. Es frecuente la formación de cadenas. Son Gram positivos, inmóviles, aunque existen unas pocas especies móviles por flagelos peritricos. No son esporulados. Son sacarolíticos obligados. Su característica principal es la de fermentar azúcares con producción de ácido láctico, pudiendo ser homofermentadores u heterofermentadores. Su crecimiento se ve favorecido por la anaerobiosis o por tensiones de oxígeno reducidas. Crecen entre 2°C y 53°C, aunque su temperatura óptima es de 30-40°C (O'Sullivan, *et al.*, 1992).

Son acidúricos, creciendo óptimamente a pH comprendidos entre 5.5-6.2. Se han descrito siete grupos serológicos (A-G) de *Lactobacilos*, basándose en sus determinantes antigénicos específicos. Se han descrito más de 102 especies y la especie tipo es *Lactobacillus delbrueckii* que pertenece al grupo E.

Requieren medios nutricionales complejos, con aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos y carbohidratos fermentables. El medio de cultivo más empleado es el medio MRS descrito por Man, Rogosa y Sharpe en 1960, este medio contiene además, magnesio, manganeso acetato y polisorbato 80 (Tween 80) que facilitan de gran forma el crecimiento de los bacilos lácticos, incluso de las especies más exigentes, como *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus fermenti*.

El medio MRS está especialmente recomendado para la enumeración y mantenimiento de bacilos lácticos, ya sea por la técnica del número más probable (NMP) en caldo o por siembra en masa. El problema de este medio es que con frecuencia se suelen presentar contaminantes, con lo cual se precisa una mayor selectividad y por ello se desarrolló el medio MRS modificado (mLSM) al que se le adiciona ácido acético como agente selectivo.

### **2.5.2 Lactobacillus casei como probiótico**

*L. casei* son bacterias Gram positivas con forma de bastón. Difiere de otros lactobacilos en muchos aspectos. Su tamaño es más pequeño en comparación con *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* y *L. helveticus*. Son mesófilos heterofermentadores facultativos. Pueden fermentar una mayor variedad de carbohidratos en comparación con la mayoría de los lactobacilos encontrados en las leches fermentadas (Danone World Newsletter, 1995).

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

Las cepas de *L. casei* se encuentran de forma natural en vegetales fermentados, leche, carne así como en el intestino, la boca del ser humano y el ambiente. El nombre de *L. casei* se uso por primera vez en 1919 y se relaciona con queso: casei y caseína (proteína de la leche) provienen de la palabra caseus que significa queso (Danone World Newslettter 1995). *L. casei* se divide en diversas subespecies (Cuadro 4).

Cuadro 4. Taxonomía de *Lactobacillus casei*

Taxonomía anterior	Taxonomía reciente	Propiedades metabólicas	
		Temperatura de crecimiento	Fermentación de azúcares
<b><i>L.casei subsp. casei</i></b>	<i>L. casei</i>	10-40 °C	Ribosa, Sacarosa
<b><i>L. casei Supsp. paracasei</i></b>	<i>L. paracasei Subsp.paracasei</i>	10-40°C	Metaboliza gran variedad de azúcares
<b><i>L. casei subsp. tolerans</i></b>	<i>L. paracasei subsp. Tolerans</i>	10-37°C resiste hasta 72°C, 40minutos	Metaboliza gran variedad de azúcares
<b><i>L. casei subsp ramnosus</i></b>	<i>L. ramnosus</i>	15-45°C	Ramnosa

Fuente: DANONE, 1995

*Lactobacillus casei* es una bacteria ácido láctica que se encuentra en diversos productos distribuidos mundialmente incluyendo las tradicionales leche fermentadas como Yakult, Kefier, Actimel, Gelifilus y Vifit; en quesos como el parmesano y manchego, entre otros (Danone world newstter , 1995).

### **2.5.3 Género *Streptococcus***

Existen más de 66 especies y la especie tipo es *Streptococcus pyogenes*, pero la única especie de estreptococos que está asociada a la tecnología alimentaria es *Streptococcus thermophilus*, que se emplea en la fabricación del yogur (junto con *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* y con otros microorganismos *L. casei*; *L. acidophilus* y *Bifidobacterium*). *Streptococcus thermophilus* fue descrito por primera vez por Orla-Jensen en 1919.

Su nombre procede del término griego “*therme*” que significa calor y del término “*philus*” que significa afinidad. Son células esféricas u ovoides de 0,7-0,9 µm de diámetro, distribuidas en parejas o formando cadenas. Son anaerobios facultativos, quimioorganotrófos con metabolismo fermentativo. Son catalasa negativos. Crece con un 2,5% de cloruro sódico pero no con un 4%. No crece a pH superiores a 9,6 ni en leche que posea un 0,1% de azul de metileno. La temperatura mínima de crecimiento es de 19-21°C. La resistencia al calor, la habilidad para crecer a 52°C y el conjunto de carbohidratos que puede fermentar, distingue a *Streptococcus thermophilus* de otros muchos estreptococos. *S. thermophilus* está incluido dentro del grupo “otros estreptococos” por Schleifer y Kilpper-Bälz (1987), pero se encuentra actualmente dentro del grupo de los estreptococos orales (Hardie y Whiley, 1995).

El medio más empleado para el aislamiento, mantenimiento o cultivo e identificación de estreptococos relacionados con productos lácteos es el agar M-17 que fue desarrollado por Teragazhi y Sandine en 1975, pero posteriormente Shankar y Davies (1977) demostraron su eficacia del medio para el aislamiento selectivo de *Streptococcus thermophilus* del yogur, que se debe a la combinación de un fuerte efecto amortiguador, que facilita el desarrollo de los estreptococos, y una elevada concentración de glicerofosfato, que inhibe el desarrollo de los

lactobacilos. Shankar y Davies (1977) observaron que se suprime el crecimiento de *Lactobacillus* si el pH del medio M-17 es de 6,8.

## **2.6 Género Bifidobacterium**

### **2.6.1 Antecedentes Históricos**

En 1899, en el Instituto Pasteur, Tissier observó y aisló de bebés una bacteria con una morfología inusual y desconocida, en forma de Y., entonces se planteó el problema de la ubicación de esta bacteria en la clasificación contemporánea. A principios de siglo, la taxonomía estaba basada por completo en el criterio morfológico y Tissier (1900) denominó a esta bacteria "*Bacillus bifidus*". En ese mismo tiempo, en Italia, Moro descubrió en condiciones similares una bacteria que reconoció como diferente de la que Tissier había observado, y la identificó como perteneciente al género *Lactobacillus*. A pesar de las diferencias entre esas dos bacterias, Holland en 1920, propuso un nombre común "*Lactobacillus bifidus*", que fue desarrollándose y ganando precisión a lo largo del tiempo en paralelo con el progreso científico.

Orla-Jensen (1924) fue el responsable de la dirección en la historia de la taxonomía de las bifidobacterias y reconoció la existencia del género *Bifidobacterium* como un taxón separado, pero con muchas similitudes al género *Lactobacillus*.

Bergey realizó la clasificación e identificación de los microorganismos cambiando los criterios de morfología por fisiología, requerimientos nutricionales y características metabólicas y enzimáticas como de mayor importancia (Cuadro 5)

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

Cuadro 5. Taxonomía del genero *Bifidobacterium*

<b>Dominio</b>	<b>Bacteria</b>
Linaje	<i>Firmicutes</i>
Clase	<i>Actinobacteria</i>
Subclase	<i>Actinobacteridae</i>
Orfen	<i>Bifidobacteriales</i>
Familia	<i>Bifidocacteraceae</i>
Géneros	<i>Bifidobacterium</i> (28 especies) <i>Gardnerella</i> (1 especie) <i>Aeriscardovia</i> (1 especie) <i>Parascardovia</i> (1 especie) <i>Scardavia</i> (2 especies)

Fuente: Bergey, 1952.

Actualmente la familia *Bifidobacteriaceae* se encuentra formada por los géneros *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Aeriscardovia*, *Parascardovia*, *Scardovia*.

La morfología de la familia consiste en bacilos pleomórficos que se presentan individualmente, en cadenas o en grupos. Las células no tienen cápsula y no forman esporas, no son móviles ni presentan filamentos. Todas las especies son Gram positivos a excepción de *G. vaginalis* que presenta un Gram variable. Son anaerobios, algunas especies de *Bifidobacterium* pueden tolerar el oxígeno únicamente en presencia de CO<sub>2</sub>, y *Gardnerella* es anaerobia facultativa. No utilizan el indol, no hidrolizan la gelatina, y son catalasa y oxidasa negativas. El crecimiento óptimo se sitúa entre 35–39°C (Guarner, 2003; Collins y Gibson, 1999).



*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS APARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

### 2.6.2 Taxonomía del género *Bifidobacterium*

La clasificación de *Bifidobacterias* ha sido modificada a lo largo de la historia desde que se descubrió en 1899 el microorganismo denominado *Bacillus bifidus*; y que en la actualidad representa al género *Bifidobacterium* como especie tipo con el nombre de *Bifidobacterium bifidum*. En los últimos años han aparecido nuevas cepas y se han reclasificado, en la actualidad el género se encuentra formado por un total de 28 especies (Cuadro 6) ([www.bacterio.cict.fr/](http://www.bacterio.cict.fr/)).

Cuadro 6. La lista actual de especies incluidas dentro del género *Bifidobacterium*

Humanos	Animal	Medio ambiental y alimentos
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		<i>Bifidobacterium adolescentis</i> <sup>a</sup>
<i>Bifidobacterium angulatum</i>		<i>Bifidobacterium angulatum</i> <sup>a</sup>
	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i> <sup>b</sup>
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium asteroides</i> <i>Bifidobacterium boum</i>	
<i>Bifidobacterium breve</i>		<i>Bifidobacterium breve</i> <sup>a</sup>
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>		<i>Bifidobacterium catenulatum</i> <sup>a</sup>
	<i>Bifidobacterium choerinum</i>	<i>Bifidobacterium choerinum</i> <sup>b</sup>
	<i>Bifidobacterium coryneforme</i>	
	<i>Bifidobacterium cuniculi</i>	

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

<i>Bifidobacterium dentium</i>		
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	<i>Bifidobacterium gallicum</i>	
	<i>Bifidobacterium gallinarum</i>	
	<i>Bifidobacterium indicum</i>	
<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Bifidobacterium longum<sup>a</sup></i>
	<i>Bifidobacterium magnum</i>	
	<i>Bifidobacterium merycium</i>	
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>		<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum<sup>a</sup></i>
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	<i>Bifidobacterium pseudolongum<sup>b</sup></i>
	<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> <i>Bifidobacterium pullorum</i> <i>Bifidobacterium ruminatium</i> <i>Bifidobacterium saeculare</i>	
<i>Bifidobacterium scardovii</i>		

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

	<i>Bifidobacterium subtile</i>	<i>Bifidobacterium subtile</i> <sup>b</sup>
	<i>Bifidobacterium thermacidophilum</i>	
	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	<i>Bifidobacterium thermophilum</i> <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Origen fecal humano, <sup>b</sup> Origen fecal animal

La flora intestinal beneficiosa, representada principalmente por los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, contribuye de forma significativa al estado de salud del huésped, por sus funciones: (i) metabólicas, interviniendo en la asimilación de nutrientes de la dieta; (ii) protectoras, contribuyendo al efecto barrera y al desplazamiento de microorganismos patógenos, y (iii) tróficas, interviniendo en la modulación del sistema inmune y en el desarrollo y la proliferación celular (Guarner y Malagelada, 2003; Collins y Gibson, 1999).

### **2.6.3 Características culturales y morfológicas**

Son bacilos presentan morfología variada, generalmente de forma bacilar, pueden ser cortos, regulares, con ramificaciones. Son Gram-positivos, inmóviles, no son esporulados y se tiñen irregularmente con azul de metileno. Son anaerobios estrictos, sin embargo el grado de tolerancia al oxígeno depende de la especie y del medio de cultivo (De Vries y Stouthamer, 1969). Esos bacilos, con una pared externa irregular, son usualmente cóncavos y sus extremidades pueden adquirir diversas morfologías con extremos en forma de espátula. En algunos casos incluso pueden presentar morfología cocoidea. Se disponen aislados, en

cadena, en empalizada o en forma de V, Y, T. La morfología es muy variable y depende del medio de cultivo donde se desarrollen.

Su temperatura óptima de crecimiento oscila entre 36-38°C para las especies de origen humano y 41-43°C para las especies de origen animal. No existe crecimiento a temperaturas menores de 20°C y las bacterias pertenecientes a este género no resisten bien a temperaturas mayores de 46°C. Por ejemplo, *Bifidobacterium bifidum* muere a 60°C, (Rasic y Kurmann, 1983).

El pH requerido para su crecimiento oscila entre 6.5-7 y a pH's menores o iguales el crecimiento es muy lento o incluso nulo, por todo ello, es importante controlar el descenso del pH en los productos lácteos que contienen este microorganismo. No existe crecimiento a pH menor de 4.0 o mayor de 8.0 (Scardovi, 1986). La apariencia de las colonias de este género bajo condiciones de anaerobiosis puede variar mucho en función del medio que se emplee. En general, las colonias que se forman son redondeadas, pueden ser brillantes y de diámetro muy variable, pero Scardovi (1986) distinguió dos diferentes tipos de colonias de *B. bifidum*, algunas colonias son muy lisas, convexas, blancas, y brillantes, mientras que otras son rugosas, con bordes desiguales. Por ello, la morfología de colonia no es una buena referencia para la identificación del género.

#### **6.2.4 Características fisiológicas**

Sus exigencias nutritivas y la necesidad de una anaerobiosis estricta hacen que el cultivo de las bifidobacterias sea complicado, por ello en los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de medios de cultivo para la detección y crecimiento. Además las bifidobacterias también han sido encontradas en aguas

fecales e incluso han llegado a multiplicarse en ellas, por ello, se pueden emplear como indicador de contaminación fecal de las aguas (Nebra, *et al.*, 2003; Bonjoch *et al.*, 2004). Las bifidobacterias son anaerobias estrictas, pero la sensibilidad al oxígeno varía entre especies (De Vries y Stouthamer, 1969). Las bifidobacterias excepto algunas especies de origen animal, son capaces de utilizar como única fuente de nitrógeno, las sales de amonio (Scardovi, 1986). Cuando crecen en ausencia de una fuente de nitrógeno orgánica, segregan grandes cantidades de aminoácidos tales como treonina, alanina, valina y ácido aspártico.

En cuanto a los medios de cultivo se distinguen dos tipos para el aislamiento, cultivo y caracterización de las bifidobacterias: medios no selectivos y medios selectivos.

**Medios no selectivos:** Estos medios suelen estar constituidos por diversas sustancias tales como extracto de carne, peptonas, extracto de levadura, zumo de tomate, sangre de caballo, leche, que permiten el crecimiento de muchas especies de bifidobacterias. Estos medios pueden ser adicionados con sustancias con bajo potencial redox, como puede ser la cisteína, cistina, ácido ascórbico, sulfato de sodio, etc. Existe un amplio abanico de medios de cultivo, desarrollados en su mayoría en estos últimos años. Destaca el medio TPY (Tryptona, Peptona y extracto de levadura), el cual fue descrito inicialmente por Scardovi (1986), como el más adecuado para el aislamiento y cultivo de las bifidobacterias de cualquiera que fuese su origen, ya que todas crecen bien en él. Sin embargo, su riqueza y su falta de selectividad hacen que también aparezcan profusamente lactobacilos, estreptococos y otras bacterias afines. Para conseguir un medio más selectivo, Samona y Robinson (1991) propusieron la adición de mezclas inhibitoras como 3 g/l de cloruro de litio con 0,1 g/l de sulfato de neomicina y con 15 mg/l de ácido nalidíxico, que se añaden al medio en forma de solución, esterilizada por filtración.

**Medios Selectivos:** Los requerimientos físicos de las bifidobacterias son extremadamente variados, es difícil definir un medio selectivo apropiado para todas las especies. El reciente entusiasmo de la incorporación de las bifidobacterias a los productos lácteos fermentados ha favorecido la propuesta de medios selectivos para diferenciar el género *Bifidobacterium* de otros géneros que están relacionados con los productos lácteos y además para aislar las bifidobacterias del resto de flora intestinal. Inicialmente el ácido ascórbico y el sodio son empleados como sustancias selectivas.

### **2.6.5 Características bioquímicas**

Las bifidobacterias difieren del resto de bacterias ácido lácticas en que no solamente producen ácido láctico sino también ácido acético, como uno de sus principales productos de fermentación. No producen CO<sub>2</sub> ni los ácidos butíricos y propiónico. En el género *Bifidobacterium*, las hexosas son degradadas exclusiva y específicamente por la ruta de la fructosa-6-fosfato descrita por Scardovi y Trovatelli (1965). Las enzimas aldolasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa están ausentes mientras que la fructosa-6-fosfato es la enzima característica del metabolismo de azúcares del género *Bifidobacterium*. (De Vries y Stouthamer, 1967). Generalmente son microorganismos catalasa negativos, no reducen los nitratos y emplean amonio como fuente de nitrógeno. No licuan la gelatina, no fermentan el glicerol, no atacan las proteínas coaguladas y no forman indol.

Producen la rápida y completa coagulación de la leche sin formación de gas. La fermentación de la glucosa, lactosa, levulosa, fructosa y galactosa está marcada por la acidificación de la leche. No producen ácidos a partir de ramnosa, glicerol, eritriol, adonitol. (Deguchi, *et al.*, 1985) se interesaron en la síntesis de vitaminas por las bifidobacterias de origen humano: tiamina (B<sub>1</sub>), riboflavina (B<sub>2</sub>),

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

B<sub>6</sub>, ácido fólico (B<sub>9</sub>), B<sub>12</sub> y ácido nicotínico. Cinco de esas vitaminas (con la excepción de la riboflavina) son sintetizadas por muchas especies y en gran cantidad, sobre todo B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> y B<sub>12</sub>. Algunos autores sostienen que *B. bifidum* y *B. infantis* son muy buenos productores de vitaminas, mientras que *B. breve* y *B. longum* sintetizan pequeñas cantidades y *B. adolescentis* no sintetiza ninguna de esas vitaminas (B<sub>6</sub>, B<sub>9</sub> y B<sub>12</sub>).

La producción de vitaminas B<sub>2</sub> y B<sub>6</sub> por *B. longum* es elevada. *B. breve* y *B. infantis* se caracterizan por su elevado nivel de producción de ácido nicotínico y biotina, respectivamente.

## **3. Materiales y Métodos**

### **3.1 Procedencia de la muestra experimental**

Las muestras fueron recolectadas en diferentes ciudades, debido a que cada una de las bebidas seleccionadas para este estudio se elabora de manera diferente en cada región. El aguamiel se obtuvo del Ejido la Leona que pertenece al municipio de Ramos Arizpe Coahuila, el pozol blanco fue elaborado artesanalmente en el laboratorio de Alimentos de la UAAAN, el pozol negro recolectado en la ciudad de Villahermosa Tabasco, las muestras de sotol fueron proporcionadas por el Departamento de Investigación en Alimentos de la UA de C.

### **3.2 Obtención de la muestra**

Un total de 5 muestras de bebidas fermentadas fueron sometidas a estudio. Los tipos de productos analizados fueron, agua miel, pozol blanco, pozol negro, sotol filtrado y sotol sin filtrar.

Estas muestras se dejaron fermentar a temperatura ambiente, tomando medidas de pH y °Brix.

#### **3.2.1 Medición de pH de las muestras**

A cada una de las materias primas se les determinó el pH mediante una tira reactiva (HACH) y mediante un pH-metro (Hanna Instruments, H1233), el cual fue calibrado con soluciones buffer pH 4, 7 y 10 (AOAC, 1980).



### **3.2.2 Medición de °Brix**

Los grados Brix, se obtuvieron mediante el empleo de un refractómetro de mano (ATAGO), colocando directamente una gota de muestra en el prisma y visualizando el valor de la medición a través del ocular.

### **3.2.3 Adaptación de jarras de anaerobiosis**

Se emplearon reactores anaeróbicos de capacidades de 275 mL y de 3 L. Para lograr un estado anaeróbico se le introdujo nitrógeno para poder desplazar el oxígeno, el tiempo dependió del tamaño de los reactores.

## **3.3 Medios y condiciones de cultivo**

### **3.3.1 Cultivo en medio líquido**

Todos los microorganismos aislados en este estudio fueron directamente propagados en medios MRS cuya composición por litro se presenta en el cuadro 7 (Demman, Rogosa y Sharpe 1960):

Cuadro 7. Composición química del medio de cultivo líquido MRS

<b>Componente</b>	<b>g/L</b>
Proteosa peptona	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Tween 80	1 ml
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotasico	2

El medio de cultivo se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 51 g en 1 litro de agua destilada y añadió 1 ml de Tween 80 (Fluka ). Posteriormente se esterilizó en una autoclave a 121 ° C/15 Lb durante 15 minutos.

### **3.3.2 Cultivo en medio sólido**

El Agar MRS fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de *Lactobacilos* y otras bacterias ácido lácticas.

### 3.3.2.1 Fundamento

El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de *Lactobacilos*. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. (Deman, Rogosa y Sharpe 1960): El Cuadro 8 presenta la composición del agar MRS empleado en el estudio.

Cuadro 8: Composición del medio de cultivo sólido (MRS)

Componente	g/L
Proteosa peptona	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Tween 80	1 ml
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotasico	2
Agar	13

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

Este agar se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 61 g en 1 litro de agua destilada y se añadió 1 ml de Tween 80 (Fluka). Posteriormente se esterilizó en una autoclave (AES) 121°C/15 Lb, durante 15 minutos (Deman, Rogosa y Sharpe 1960).

Las cepas aisladas se cultivaron en caldo y/o agar MRS las cuales fueron incubadas a 37 °C por un tiempo de 18-24 h bajo una atmósfera anaeróbica. Para la conservación a largo plazo, se liofilizaron.

La liofilización es el proceso que consiste en congelar rápidamente una suspensión de microorganismos y eliminar el agua como vapor de agua directamente del hielo sin pasar por el estado intermedio líquido. Consta de tres fases: sobre-congelación, desecación primaria y desecación secundaria. El sistema requiere tres componentes: mecanismo de congelación, bomba de vacío y una trampa de agua.

### **3.4 Aislamiento de cepas probióticas**

Las cepas fueron aisladas en caldo MRS a partir del agua miel, pozol blanco, pozol negro, sotol filtrado y sotol sin filtrar e incubada a 37°C durante 24 horas en condiciones de anaerobiosis. Después se tomó 1 mL de caldo MRS. Trascurrido el tiempo se inoculó 0.1 mL en placas de Petri con agar MRS y fueron incubadas a 37°C durante 24 hrs en condiciones anaeróbicas.

Posteriormente se tomó una colonia de cada muestra y se inoculó en cajas petri con agar MRS por la técnica de estría por agotamiento, con la finalidad de obtener colonias aisladas.

### **3.5 Purificación y selección de cepas probióticas**

Las colonias obtenidas de cada una de las muestras se sembraron en agar MRS. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, respectivamente, en una atmosfera anaeróbica. Esta transferencia se realizó por duplicado. Se seleccionaron 2 colonias de cada muestra del agar MRS y se propagaron dos veces más para asegurar la pureza del cultivo. Las colonias purificadas se resembraron en agar MRS y se les realizó la tinción de Gram y la prueba de catalasa (Murray, *et al.*, 1994). Las bacterias que presentaron la morfología microscópica y metabolismo bioquímico de una bacteria BAL fueron liofilizadas.

#### **3.5.1 Caracterización microscópica**

Las cepas aisladas fueron microscópicamente caracterizadas a través de la tinción de Gram.

Esta coloración permite la clasificación de las bacterias en Gram positivas y Gram negativas según la composición de su pared celular. Por esto el complejo de color formado con la pared de las bacterias Gram positivas no puede ser removido con el agente decolorante que es el alcohol acetona. La célula permanece de color azul violeta, en cambio las bacterias Gram negativas, al decolorarse con el alcohol acetona, se dejan colorear con la fuscina ó safranina, quedando de color rosado. La metodología se presenta en el Anexo A (Merck, 2005).

### **3.6 Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas**

### **3.6.1 Catalasa**

Esta prueba bioquímica se utiliza para comprobar la presencia del enzima catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo. Entre estas bacterias se encuentran una parte considerable de las alterantes de los alimentos frescos almacenados en aerobiosis en refrigeración. La metodología se presenta en el Anexo B (Fung, 1997).

### **3.6.2 Identificación bioquímica de microorganismos mediante el sistema API**

El sistema API 20 A permitió estudiar rápida y fácilmente 20 caracteres destinados a la identificación bioquímica de las bacterias anaerobias. Otros caracteres, tales como el crecimiento en agar en profundidad, aspecto de las colonias, morfología celular y coloración Gram, deben ser determinados e integrados en la metodología que se emplea para una completa identificación.

La galería API 20 A incluye 20 microtubos que contienen substratos deshidratados. Los microtubos se inocularon con una suspensión bacteriana que reconstituyen los medios.

Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos. La interpretación de estas reacciones se realiza con la ayuda de la tabla de identificación, y el reconocimiento se consigue mediante un software de identificación (Anexo C).

### **3.6.2.1 Preparación del inóculo**

Con la ayuda de un asa se extrajeron todas las colonias obtenidas sobre el MRS. Se utilizaron cultivos puros y jóvenes de (18-24 horas) y posteriormente se emulsificó las bacterias frotando el asa estéril mediante rotaciones contra la pared de la ampolla hasta ver turbidez de la suspensión.

### **3.6.2.2 Preparación de la galería**

Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación y repartir aproximadamente 5 ml de agua destilada o desmineralizada (agua sin aditivos ni derivados susceptibles a liberar gases ej. Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) en los alveolos para crear una atmósfera húmeda. Inscribir la referencia de las cepas en la lengüeta lateral de la cámara. Posteriormente se saca la galería API 20 A de su envase y se deposita en la cámara de incubación.

Con la ayuda de una pipeta estéril, inocular la galería con la suspensión API 20 A Medium preparada, evitando la formación de burbujas al inclinar ligeramente la galería.

- Para el test GEL, llenar el tubo y la cúpula
- Para el test IND, llenar solamente el tubo con API 20 A Medium y llenar la cúpula con aceite de parafina, para evitar la evaporación del índol formado.

Cerrar la cámara de incubación y cultivar durante 24 horas a 36 ° C en condiciones anaerobias, en tarro o en bolsa individual.

### **3.7 Pruebas de actividad probiótica “*in vitro*”**

Las pruebas de actividad probiótica *in vitro* que se realizaron a las bacterias seleccionadas fueron las siguientes:

#### **3.7.1 Tolerancia de la capacidad de crecimiento a diferentes pH's**

Las cepas seleccionadas fueron cultivadas en cada reactor el cual contenía 10 ml de caldo MRS a pH 6,5 e incubados a 37 °C durante 24 h. Posteriormente éste cultivo se empleó como iniciador (0.1 mL) en un medio MRS ajustando el pH a 2.5, 3.0 y 4.0 con HCl 2.2 N. La sobrevivencia a las diferentes condiciones se midió a las 24 h de incubación a 37 °C, en condiciones anaeróbicas. Posteriormente se realizó la siembra en las placas con agar MRS.

#### **3.7.2 Tolerancia de la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas**

La prueba de tolerancia de las cepas a las diferentes temperaturas se realizó de la siguiente manera: se inocularon 0.1mL de un cultivo de 24 h de las bacterias a probar en 20 ml de caldo MRS en cada una de las cepas aisladas. La sobrevivencia a las diferentes condiciones se midió a las 24 y 48 hrs de incubación a temperaturas de 40°C, 50°C y 60 °C, en condiciones anaeróbicas. Posteriormente se observó crecimiento en las placas de agar MRS donde fueron sembradas.

#### **3.7.3 Capacidad de coagulación de la leche**

Para la selección de los microorganismos con capacidad de coagulación de la leche se tomaron 10 ml de leche estéril (Lala) con un pH 6.5, fueron inoculados con 1mL cultivo de cada una de las cepas a ensayar provenientes de un cultivo



de 24 h se incubaron a 37 °C, sin agitación durante 3 días; pasado el tiempo de incubación se observara la formación o no de un coagulo uniforme.

### **3.7.4 Crecimiento en medios hostiles**

Los ensayos se realizaron modificando el método propuesto por Suscovic (1999). Para ello las cepas se cultivaron en caldo MRS, y también se preparó caldo verde brillante ajustando el pH a 3 (HCl 2.2N), con una concentración de 2 % de bilis de buey.

Todos los ensayos se realizaron a 37 °C, sin agitación durante 24 horas, el crecimiento se observó sembrando en placas con agar MRS.

### **3.7.5 Inhibición de microorganismos patógenos por las cepas seleccionadas**

Las muestras que presentaron alta tolerancia a pH ácido se seleccionaron para determinar su capacidad inhibitoria contra patógenos. La prueba de inhibición se realizó con los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *E aerogenes*.

El ensayo se realizó modificando el método propuesto por Suscovic *et al.*, (1999). Para ello cada una de las cepas seleccionadas se cultivaron en caldo MRS sin agitación durante 24 horas en condiciones anaeróbicas.

Las bacterias patógenas se sembraron en agar nutritivo utilizando el método de estría entrecruzada para obtener mayor crecimiento en toda la caja, la actividad antimicrobiana se determino mediante la técnica de difusión en agar

utilizando discos impregnados con las cepas aisladas. Las cajas se incubaron bajo condiciones aerobias a 37 °C durante 24 y 48 h.

### **3.7.6 Prueba de sensibilidad de las cepas a los antibióticos**

Se utilizó el método de difusión en agar con discos, para ello se sembró cada una de las cepas seleccionadas en caldo MRS sin agitación a 37 °C durante 24 horas.

Los antibióticos fueron evaluados utilizando discos de papel filtro con un diámetro de 5 mm, previamente esterilizados. Estos discos fueron colocados utilizando una pinza estéril para su manipulación, sobre las placas inoculadas. Las placas fueron incubadas en jarras de anaerobiosis a 37 °C durante 24-48 h, después se determinó la presencia o ausencia de halos de inhibición.

Un total de 4 antibióticos se utilizaron para testar la susceptibilidad a antibióticos:

- Bencipenicilina ( 600000 ul/mL)
- Ampicilina (500 mg/mL)
- Tetraciclina (250 mg/mL)
- Trimetoprim-sulfametoxazol (160mg/ml y 800 mg/ml respectivamente).

### **3.7.7 Estabilidad en el paso por el estómago**

Como el pH del estomago humano es de 2.5 y el tiempo medio desde que un alimento entra hasta que sale del estomago son 90 minutos, se evaluó la capacidad de los microorganismos aislados a sobrevivir en medio ácido. Para evaluar la capacidad del microorganismo de sobrevivir en este medio se ajustó el pH a 2.5, con acido acético, sometiendo la cepa aislada a esta acidez durante cuatro horas. De la misma manera que se evaluó la tolerancia de microorganismo a la acción del pH, se evaluó la resistencia a las sales biliares a una concentración de 2 % de bilis de durante 4 horas.

## **4. Resultados y Discusiones**

### **4.1 Fermentación de sotol, agua miel y pozol**

Durante el periodo de la fermentación se monitoreó el pH y grados Brix con la finalidad de observar el comportamiento de los posibles microorganismos que se presentaron en las muestras, por lo tanto, en cada muestreo se esperaba la disminución de los azúcares.

La figura 1 muestra los resultados obtenidos de pH, donde se puede observar que en cada una de las muestras este parámetro fue disminuyendo hasta llegar a un valor de pH 3 esto nos indica que en cada una de las muestras existe actividad microbiana, que dado a que contienen diferentes tipos de azúcares fermentables. Por lo cual coinciden los resultados con algunos reportes en la literatura donde nos indican que las bebidas fermentadas contienen microorganismos benéficos como las bacterias lácticas, que son las primeras en desarrollarse y que están presentes durante todo el proceso fermentativo. Se trata de una población mixta, con diferentes capacidades fermentativas y de asimilación de azúcares. Ellas son las responsables de la acidificación (llega a tener un valor de pH cercano a 3-4), ya que producen ácido láctico, el que imparte un sabor fresco y agradable al producto; de ellas destacan las amilolíticas como *Lactobacillus acidophilus* y *L. crispatus* (Díaz-Ruíz, *et al.*, 2003).

También se observó el consumo de azúcares fermentables a través de la determinación de sólidos solubles totales (°Brix) de cada muestra analizada durante la fermentación. El valor de °Brix dependió del tipo de materia prima empleada. La figura 2 muestra la disminución de los °Brix para cada muestra esto nos indica que contienen diferentes concentraciones de azúcares, esta disminución se debe a que existen microorganismos que degradan los azúcares como su principal fuente de carbono son los azúcares amilolíticas. Para las

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS APARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

muestras de de sotol sin filtrar y pozol blanco los azucares fueron bajos debido a que estas no contenían un alto nivel de azucares. Para las muestras de pozol negro, aguamiel, sotol filtrado su cantidad de sólidos solubles fue de (10-13 Brix) por lo cual en el proceso de la fermentación llegaron a un nivel de 6 Brix .

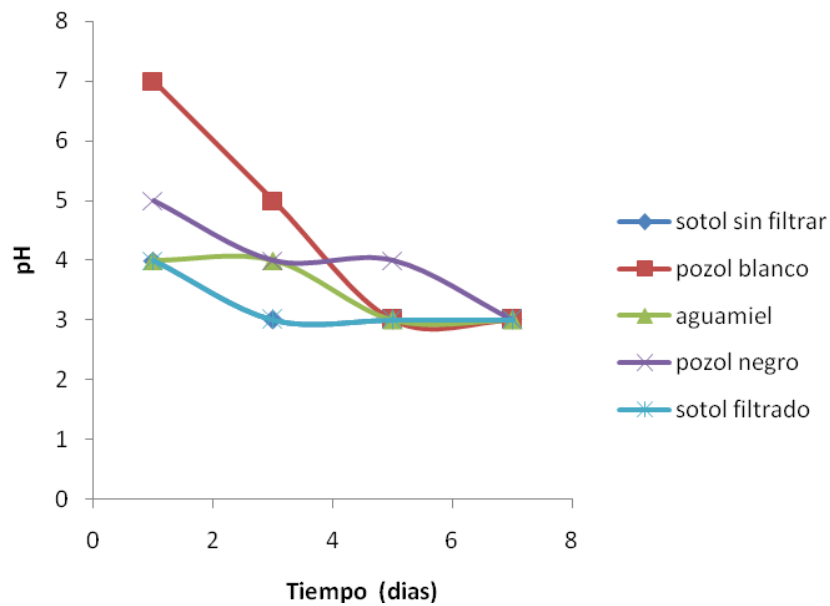


Figura 1. Cinetica de disminuci3n de pH durante el proceso fermentativo de las materias primas

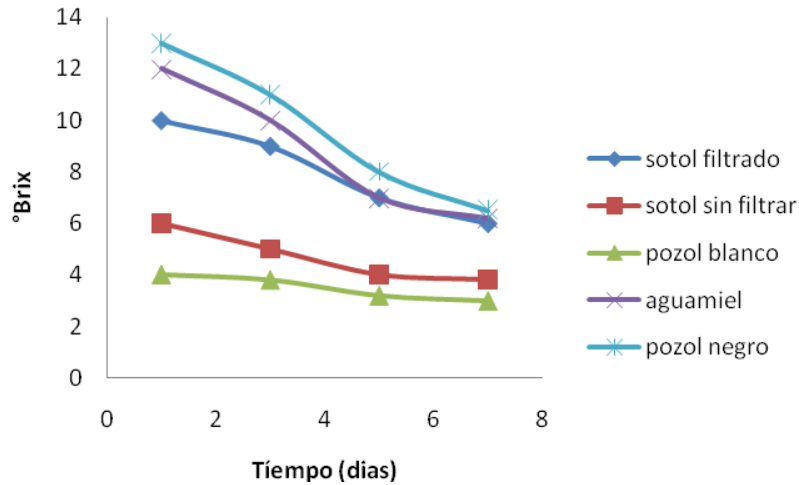


Figura 2. Cinetica de disminuci3n de °Brix durante el proceso fermentativo de las materias primas

## 4.2 Aislamiento de las cepas probióticas

La inoculaci3n en las placas de agar MRS produjo crecimiento microbiano con la morfología macrosc3pica que se presenta en el cuadro 9; en el cual podemos observar que la mayoría de las cepas obtenidas presentaron una forma circular, borde redondo, color blanco y tamaíno grande, medianas y chicas y con una elevaci3n convexa y plano. Stanier (1988) reporta que las bacterias BAL deben presentar un borde redondo, tamaíno pequeíno y sin coloraci3n, por lo que se obtuvieron una de cada bebida fermentada analizada coincidi3 con estas característicás; estas fueron seleccionadas para su posterior purificaci3n.

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

Cuadro 9. Morfología macroscópica de las cepas aisladas

<b>Muestras</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Forma</b>	<b>Borde</b>	<b>Elevación</b>	<b>Olor</b>	<b>Color</b>
Aguamiel	Medianas	Circular	Redondo	Convexa	Acido	Blanco
Pozol blanco	Chicas	Circular	Redondo	Plano	Acido	Blanco
Pozol negro	Chicas	Circular	Redondo	Plano	Acido	Blanco
Sotol filtrado	Medianas	Circular	Redondo	Convexa	Acido	Blanco
Sotol sin filtrar	Grandes	Circular	Redondo	Convexa	Acido	Blanco

### 4.3 Purificación y selección de cepas

De cada una de las cajas Petri inoculadas con las muestras de las bebidas fermentadas se aislo 1 colonias bacteriana para su purificación, obteniéndose en total 5 colonias puras con las características morfológicas deseadas.

Para su purificación se sembraron mediante la técnica de estriado por agotamiento por el cual fueron incubados en anaerobiosis a 37°C por 24 hrs. Las colonias purificadas se identificaron preliminarmente como bacterias ácido láctico (BAL) considerando los criterios que las identifican como Gram positivas, catalasa negativas y con forma bacilar o esférica (Stanier *et al.*, 1997).

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

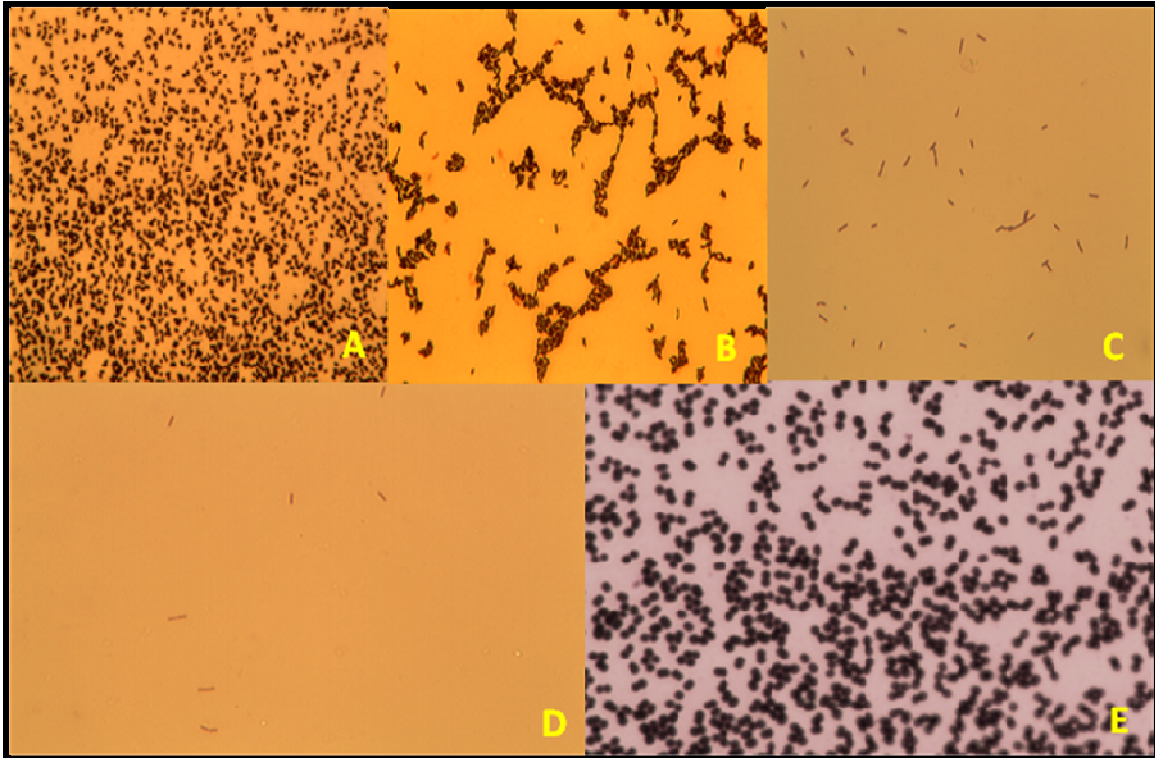


Figura 3. Morfología microscópica de los microorganismos obtenidos de diferentes bebidas fermentadas. A) pozol blanco, B) sotol filtrado, C) sotol sin filtrar, D) aguamiel y E) pozol negro

En la figura 3 A se observa la cepa obtenida de la muestra de pozol blanco, la cual presentó una morfología de cocos y Gram +. En la figura 3B se observa la cepa de la muestra de Sotol filtrado la cual presentó una morfología de bacilos pequeños y Gram +, la figura 3C presenta la cepa obtenida de la muestra de Sotol sin filtrar con una morfología de bacilos largos y Gram +, en la figura 3D se observa la cepa de la muestra de Aguamiel que presentó una morfología de bacilos cortos y Gram +, en la figura 3E se observa la cepa de la muestra de pozol negro presentó una morfología de cocos y Gram +.



*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

Este tipo de morfología coincide con el de las cepas reportadas en las investigaciones de Suarez *et al.*, 2008., quienes trabajaron con bacterias ácido lácticas y mencionaron que las cepas presentaron una morfología de bacilos y cocos Gram positivos.

De las cepas obtenidas, Se realizó una selección de las cepas que cumplieran con las características reportadas por Suarez *et al.*, (2008). Las cepas seleccionadas se codificaron según su procedencia (cuadro 10).

Cuadro 10. Código de identificación de las cepas aisladas

<b>Muestra</b>	<b>Código de identificación de las cepas</b>
Aguamiel	Am
Sotol filtrado	Sf
Sotol sin filtrar	Ssf
Pozol blanco	Pb
Pozol negro	Pn

#### **4.4 Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas**

##### **4.4.1 Prueba de catalasa**

Todas las cepas de (Am, Sf, Ssf, Pn y Pb) resultaron negativa para la prueba de catalasa, similares resultados con las investigaciones de Carlos *et al.*, (2008), quienes trabajaron con bacterias ácido lácticas presentaron resultados catalasa negativa. Debido a que las bacterias ácido lácticas carecen de citocromos que son compuestos porfirínicos, que al no sintetizarlos, estas bacterias forman colonias de color blanco-lechoso. La catalasa (enzima que destruye el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

necesita un grupo porfirínico y, por tanto, este tipo de bacterias no tiene este enzima, lo que permite la identificación del grupo.

#### **4.4.2 Identificación de los microorganismos mediante pruebas bioquímicas**

El sistema API 20 A se emplea galerías que contienen 20 medios de cultivo con diferentes carbohidratos, la identificación se basa en la habilidad de la cepas bacteriana para fermentar algunos de los diferentes carbohidratos. Durante la fermentación, el catabolismo de los glúcidos produce ácidos orgánicos que hacen virar el indicador del pH, pasando el medio de color violeta a color amarillo (prueba positiva). La identificación de los microorganismos aislados en este estudio, el sistema API 20 A, bioMérieux® permite la identificación de bacterias lácticas mediante la determinación del perfil de fermentación de carbohidratos característico para cada bacteria

Los resultados obtenidos constituyen el perfil bioquímico de la cepa los cuales fueron empleados para su identificación (figura 4).

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---



Figura 4. Identificación bioquímica de las cepas aisladas utilizando el sistema API

La los cepas bacterianas seleccionadas fueron identificados a nivel de género significativo: *Bifidobacterium spp 2* con un porcentaje del 99.5% para las cepas de Am, Sf, para la cepa de Pn con un porcentaje 99.0% y la cepa de Pb con un porcentaje de 40% y la cepa de Ssf teniendo un porcentaje menor a 30%.

Estas diferencias pueden ser debidas en su mayoría a la falta de reproducibilidad de las tiras API, ya que el considerar una prueba como negativa y/o positiva provoca grandes variaciones en la identificación del microorganismo ensayado (Collado, 2004). También se sugiere que las diferencias se deben a que la base de datos del método o sistema API no esté actualizada con respecto a la taxonomía mas reciente lo que conducirá a una errónea identificación o a resultados confusos (Nigatu y Boyd, 2000).

## 4.5 Pruebas de actividad “*in vitro*”

### 4.5.1 Tolerancia de la capacidad de crecimiento a diferentes pH’s

Para garantizar la sobrevivencia de las bacterias ácido lácticas a las condiciones existentes en el tracto gastrointestinal de los humanos es necesario probar su estabilidad a pH ácido y sales biliares (Fuller, 1992).

En esta etapa los microorganismos analizados sobrevivieron a los pH’s ensayados ver (cuadro 11). Se observo que a los tres pH’s hubo crecimiento en las cepas aisladas, esto nos indica que pueden sobrevivir al tracto gastrointestinal ya que el pH promedio del acido del estomago es de 2.5.

Cuadro 11. Resistencia a pH’s

<b>pH’s</b> <b>cepas</b>	<b>2.5 pH</b>	<b>3 pH</b>	<b>4pH</b>
Am	+	+	+
Ssf	+	+	+
Sf	+	+	+
Pb	+	+	+
Pn	+	+	+

- No hay crecimiento
- + Hay crecimiento

Estos resultados coinciden con la literatura, ya que nos indica que en el estomago es posible encontrar cantidades importantes de *Lactobacillus* spp (Suarez *et al.*, 1991). Las cepas aisladas, pudieron crecer en pH 2.5, ya que existen reportes que indican que otras cepas *Lactobacilos* como la M92 de *Lactobacillus acidophilus* solo pueden sobrevivir durante 3 hrs a un pH de 3, produciendo luego la lisis del 60% de la población inicial (Suskovic *et al.*, 1997).

#### 4.5.2 Tolerancia de la capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas

La tolerancia de sobrevivencia de microorganismos a diferentes temperaturas puede ser utilizada para elaborar alimentos fermentados, (Héller y Knut, 2008), se deben considerar varios factores que pueden influir en la capacidad de los probióticos para sobrevivir en el producto y volverse activos cuando entran al tracto gastrointestinal del consumidor.

Las cepas aisladas resistieron a temperatura de 40, 50 y 60 °C (cuadro 12).

Cuadro 12. Crecimiento a las diferentes temperaturas

Cepas Temperatura	P b	Pn	Am	Sf	Ssf
40°C	+	+	+	+	+
50°C	+	+	+	+	+
60°C	-	-	+	+	+

- No hay crecimiento  
+ Hay crecimiento

El cuadro 12 muestra como las 5 cepas aisladas se desarrollan a las temperaturas elevadas, se pudo observar que hubo crecimiento a la temperatura de 40°C a las 24h y después de las 48 h se observa crecimiento a la temperatura de 50°C en las cinco cepas, las cepas que resistieron a la temperatura de 60°C en un periodo de incubación de 48h fueron las aisladas de aguamiel, sotol filtrado y sotol sin filtrar. Las cepas de probióticos no solo deben cumplir con el criterio de supervivencia, sino también con el criterio de fermentación y de tener una interacción armoniosa con la cepa bacteriana utilizada como cultivo iniciador.

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS APARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

León *et al.*,( 2006) observo crecimiento microbiano a temperaturas de 50°C, 60°C y 70°C con bacterias acido lácticas do nde tuvo supervivencia adecuada a los tratamientos térmicos. *L. alimentarius*, *L. lactis* y *Enterococcua sp* tuvieron conteos mayores a 300 UFC después de ser sometidas a las temperaturas.

La termoresistencia de algunas cepas de bacterias acido lácticas que les permite sobrevivir al tratamiento térmico es importante ya que estas puede ser utilizadas como cultivos inhibidores de microorganismos patógenos.

#### 4.5.3 Crecimiento En Medios Hostiles

Con respeto a las sales biliares, algunas cepas de *Lactobacillus* no crecen en presencia de sales conjugadas de la bilis, pero si en presencia de sales deconjugadas (Suskovic *et. al*, 1997).

En las cepas aisladas en este trabajo pareciera que la situación es diferente, ya que la que utilizamos fue del caldo verde brillante la cual contiene un porcentaje de 2%, (cuadro 13).

Cuadro 13. Resistencia a medios hostiles

<b>Bilis Cepas</b>	<b>2%</b>
Am	+
Ssf	+
Sf	+
Pb	+
Pn	+

- No hay crecimiento

+ Hay crecimiento

En el cuadro 13 se muestran los resultados obtenidos; se puede observar crecimiento de todas las cepas después de 24 h de incubación a condiciones anaeróbicas. Este resultado podría implicar que las cepas examinadas poseen actividad hidrolítica para las sales biliares; en relación a este punto las opiniones son contradictorias: hay autores que opinan que la presencia de la actividad hidrolítica para las sales biliares no es deseable en una bacteria probiótica ya que podría disminuirse la concentración de sales conjugadas a niveles por debajo de los necesarios para la óptima digestión y absorción de los lípidos. Además las formas deconjugadas pueden sufrir una modificación posterior y se suponen participan en procesos responsables en el desarrollo de cáncer de colon (Suskovic *et. al*, 1997). Sin embargo, en ensayos *in-vitro* Jacobsen *et al.*, (1999) reportan que los *Lactobacilos* analizados tienen buena tolerancia a sales biliares al 0.3%.

A pesar de que la inhibición es importante en la totalidad de las cepas ensayadas en medios hostiles, es importante destacar que en este caso se probó la habilidad de las cepas a crecer en dichos medios hostiles más que su resistencia a esas condiciones adversas.

#### **4.5.4 Selección de microorganismos de coagulación de la leche**

Pensando que las cepas aisladas podrían a futuro emplearse en elaboración de leches fermentadas con probióticos, se evaluó si las cepas podían coagular la leche (cuadro 14).

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

Cuadro 14. Coagulación de la leche

<b>Coagulación</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>
<b>Cepas</b>			
Am	+	+	+
Ssf	+	+	+
Sf	+	+	+
Pb	+	+	+
Pn	+	+	+

- Sin coagulación
- + Con coagulación

En el cuadro anterior se observó que las 5 cepas analizadas coagularon la leche en 24 h presentando un coágulo liso, homogéneo y con un poco de suero, estos valores de tiempo de coagulación son parámetros útiles a nivel tecnológico.

La capacidad acidificadora de las cepas en leche, es la habilidad de producir ácido láctico a partir de la lactosa de la leche. Esta característica es una de las principales funciones de un cultivo iniciador, ya que participa en la coagulación, en las características organolépticas y también en la inhibición de microorganismos indeseables (Kashet, 1987).

Las cepas de bacterias ácido lácticas pueden ser clasificadas en lentas o rápidas según su capacidad de crecer en leche a la temperatura de fabricación (21-30°C) (Reinheimer, 1997). Las cepas rápidas son capaces de coagular la leche en 24 horas y las cepas lentas en más de 48 horas. Otro criterio usado comercialmente indica que las cepas rápidas disminuyen el pH de la leche fresca a 5,8 durante un lapso menor a ocho horas. Observando el patrón de coagulación de las cepas probadas se puede decir que son rápidas ya que coagularon la leche en 24 horas.



#### 4.5.5 Inhibición de Microorganismos Patógenos Sobre las Cepas Aisladas

Otro de los requisitos básicos de las bacterias con potencial probiótico es que presenten antagonismo contra bacterias patógenas.

El experimento de inhibición de microorganismos patógenos por cepas probióticas se estudio un diseño de bloques completo con 8 repeticiones, se utilizo un arreglo factorial donde los factores fueron: cepa probiótica 5 niveles (Am, Sf, Ssf, Pb, Pn), microorganismos patógenos con 4 niveles (*E. coli*, *E. aerogenes*, *S. aureus* y *Salmonella*). Se realizo ANOVA y donde fue necesario se realizo la prueba de comparación de medias de Tukey resultados se muestran en el cuadro 15 y en el anexo E.

Cuadro 15. Resultados estadísticos de la Inhibición de cepas probióticas contra patógenos

<b>F.V</b>	<b>G. L</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>FC</b>	<b>Probabilidad</b>
Repetición	7	131.6	18.8	5.17	<0.0001
Cepa. Probiótica	4	471.4	117.85	32.42	<0.0001
Patógeno	3	37.4	12.467	3.43	0.019
C. probiótica* Patógeno	12	304.6	25.383	6.98	<0.0001
Error	133	483.4	3.6345	-----	-----
Total	159	1428.4	-----	-----	-----

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS APARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

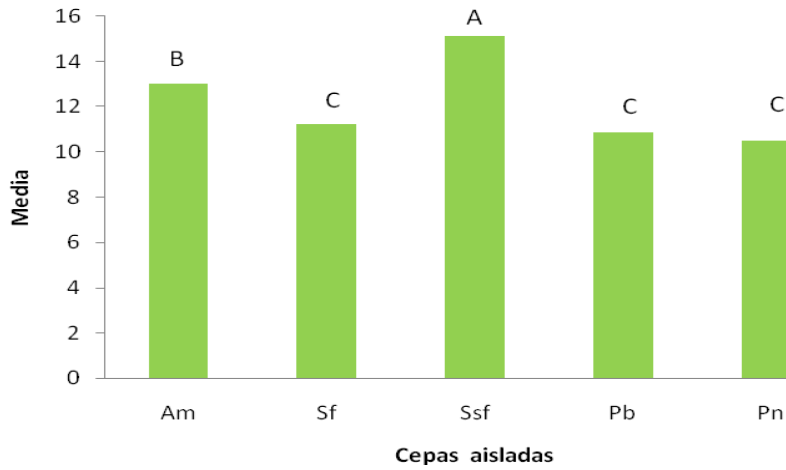


Figura 5. Media de halo de inhibición de las cepas probióticas más resistente.

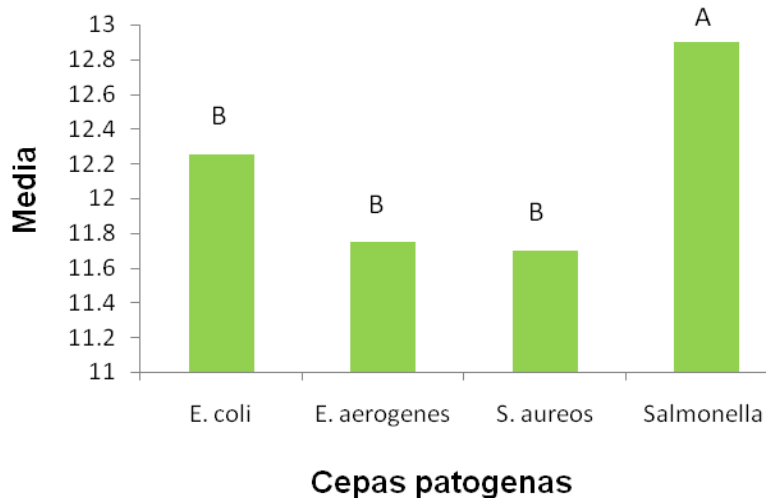


Figura 6. Media de halo de inhibición de las cepas patógenas más sensibles

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS APARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

En la figura 5 se observo que las cepas más resistentes fueron las Ssf y AM, la cepa con las mismas letras que en este caso son Sf, Pb y Pn no son significativamente diferentes entre ellas mismas pero si significativamente diferentes a las cepas de Ssf y Am

En la grafica 6 se observo que la cepa más sensible fue la *Salmonella* y *E. coli*, los demás microorganismos patógenos *S. aureus* y *E. aerogenes* no fueron significativamente diferentes, pero si hubo diferencia significativa contra las *Salmonella* y *E. coli*.

En los últimos años en diversas investigaciones se ha demostrado el efecto antagónico que poseen varias especies de probióticos sobre microorganismos de deterioro de alimentos y de patógenos intestinales. Describen resultados similares, ellos detallan que algunas cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, inhiben ampliamente a las bacterias *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri* (Calderón *et al.*, 2007).

Esta diferencia de comportamiento puede ser debida al efecto de las diversas sustancias producidas por bacterias ácido láctico además de las bacteriocinas, como ácidos orgánicos (ácido láctico y ácido acético), peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono; así como la producción de otros compuestos antimicrobianos como el diacetilo, el ácido piroglutámico, etc. Se ha comprobado que el diacetaldehido es más efectivo contra bacterias Gram negativas, levaduras y hongos que contra bacterias Gram positivas (Calderón *et al.*, 2007)

#### 4.5.6 Prueba de Sensibilidad de las Cepas Aisladas a los Antibióticos

Con frecuencia las personas afectadas por diarrea de origen microbiano, son tratadas con antibióticos, que no solo pueden afectar a los patógenos sino también a microorganismos normales del huésped. Entre estos últimos podrían estar los probióticos es por ello que otra propiedad deseable hasta cierto punto es que sean resistentes a antibióticos. Por esta causa se probó la sensibilidad de las cepas frente a cuatro antibióticos normalmente usados.

Ellos fueron bencilpenicilina, ampicilina, tetraciclina y trimetroprin - Sulfametoxazol (Cuadro 16).

Cuadro 16. Sensibilidad de cepas a los antibióticos

<b>Antibióticos</b> <b>Cepas</b>	<b>Bencilpenicilina</b> <b>600ul / mL</b>	<b>Ampicilina</b> <b>0.5 mg/mL</b>	<b>Tetraciclina</b> <b>0.25 mg/ mL</b>	<b>Trimetropim y</b> <b>Sulfametoxazol</b> <b>0.16/0.8 mg/ mL</b>
Am	-	-	+	+
Pb	-	+	+	+
Pn	-	+	+	+
Sf	-	-	+	+
Ssf	+	+	+	+

- Sin crecimiento
- + Con crecimiento

En el cuadro anterior se observó que las cepas resistieron a 3 antibióticos de 4 que se probaron. Solo la cepa de Ssf resistió a la bencilpenicilina, las cepas de Am y Sf fueron las más sensibles a bencilpenicilina y ampicilina. Para el caso de la tetraciclina todas las cepas resistieron a una concentración de 0.25 mg/ mL y en el antibiótico de trimetropim y sulfametaxazol resistieron a concentraciones de 0.16/0.8 mg/ml.

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

Resultados similares han sido reportados por otros autores (Suskovic *et al.*, 1997). Quienes probaron la resistencia de la cepa *Lactobacillus acidophilus* M92 encontrando que fue resistente contra trimetoprim - sulfametoxazol en cantidades de 25 µg, sin embargo, para el caso de la Ampicilina su cepa fue sensible a concentraciones tan pequeñas como 0,5 µg.

No se encontró, resistencia a bencipenicilina, sin embargo para el caso de tetraciclina hubo resistencia a partir de concentración de 0.25 mg/ mL. No obstante, algunos estudios reportan cepas de *L. acidophilus* y *L. casei* resistentes a bencipenicilina y tetraciclina. (Córdoba, 2009)

La *L. casei* cepa Shirota también presenta resistencia algunos antibióticos como son: bencipencilina a concentraciones de 0.34 µg/ mL, a la tetraciclina a una concentración de 1.56 µg/ mL (Yakult, 2000)

Basados en estos descubrimientos, la administración oral de *L. casei* Shirota no contribuye al desarrollo de resistencias a antibióticos en bacterias que potencialmente pueden contribuir al desarrollo de infecciones intestinales (Yakult, 2002)

El empleo de estas bacterias, resistentes a algunos antibióticos es interesante en la manufactura de productos lácteos como por ejemplo las leches fermentadas sobre todo si hay residuo de antibióticos como consecuencia de terapias en los animales, ya que pueden afectar el desarrollo de las bacterias ácido lácticas que se emplean como iniciadoras lo que podría permitir el desarrollo de bacterias indeseables como *Staphilococcus aureus* o *Salmonella* (Mejía Rodríguez, 2007 y Suskovic *et al.*, 1997).

Por otro lado es importante señalar, que hay autores que consideran que la resistencia a los antibióticos no es una propiedad deseable en probióticos, ya

que por intermedio de plásmidos podrían transferirse a bacterias patógenas presentes en el intestino del huésped creando situaciones no deseables para la salud.

#### **4.5.7 Estabilidad en el Paso por el Estomago y Resistencia a Sales Biliares**

Cada una de las cepas aisladas resistió en las condiciones de pH 2.5 por 90 minutos que es el pH del estomago humano y el tiempo medio desde que un alimento entra hasta que sale del estomago (O 'Sullivan, *et al.*, 1992). Los resultados obtenidos fueron positivos ya que hubo crecimiento para las cinco cepas aisladas, a las cuatro horas de haberlas expuestas esas condiciones, (cuadro 17).

Cuadro 17. Estabilidad del estomago y resistencia a sales biliares

<b>pH y Bilis</b> <b>Cepas</b>	<b>2.5 pH</b>	<b>2% de bilis</b>
Am	+	+
Ssf	+	+
Sf	+	+
Pb	+	+
Pn	+	+

- Sin crecimiento  
+ Con crecimiento

En el cuadro 17 se observo el crecimiento en el pH 2.5 y a una concentración de 2 % de bilis de todas las cepas (Am, Sf, Ssf, Pb y Pn), estos fueron a través de la siembra en cajas de agar MRS. Con este experimento podemos deducir que las cepas aisladas pueden ser utilizadas para elaborar producir un alimento adicionado estas bacterias ya que podrian transitar en el aparato digestivo y facilitando de este modo la colonizacion del tracto gastrintestinal .

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

De la misma manera estos microorganismos resistieron en sales biliares evaluadas con el caldo verde brillante durante 4 horas lo cual coincide en las investigaciones de (Mejía Rodríguez, 2007).

## **5. Conclusiones**

En el presente trabajo se lograron obtener 5 cepas aisladas de bebidas fermentadas elaboradas artesanalmente (aguamiel, pozol negro, pozol blanco, sotol filtrado y sotol sin filtrar).

Se ha demostrado la posibilidad de utilizar a las cepas aisladas como probióticos, basados en la realización de algunos experimentos *in vitro* tales como:

Resistencia a pH 2.5 y 3 durante 4 h y a elevadas concentraciones de sales biliares de 2%. Esto indica que las cepas aisladas podrían llegar viables a su sitio de acción el colon, después de ser ingerida y pasar a través del tracto gastrointestinal.

Resistencia de temperaturas de 40 ,50 y 60 °C durante 24 y 48 h, estas cepas fueron capaces de coagular la leche a 24 h.

Las cepas aisladas presentan acción antimicrobiana contra microorganismos patógenos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Enterobacter aerogenes*). También presentaron resistencia a antibióticos ensayados bencilpenicilina, ampicilina, tetraciclina y trimetoprin – sulfametoxazol, la única cepa que resistió a las cuatro antibióticos fue el Ssf. Las cepas de Sf, Am, fueron sensibles a ampicilina y bencilpenicilina.



## **Bibliografía**

- Anónimo 1 bebidas regionales: el 22 de enero 2010. Disponible en:  
<http://www.alcoholinformate.org.mx/saberdelmundo.cfm?articulo=186>.
- Bernet, M.F., Brassart, D., Nesser, J.R., Servin, A.L. 1993. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* pp. 4121-4128.
- Boyer C.D. and Shanon J.C. 1987. Corn: chemistry and technology. S.A. Watson and P.E. Ramstad: St Paul Minnesota. pp 227-253.
- Calderon *et al.*, 2007. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*. Vol. 57 N° 1, pp 52-56
- Cervantes Mario, Pedroza Rodríguez marina, 2007. El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia raman. *Revista Nova*. pp. 135- 146.
- Collado, M.C., Hernández, M., Sanz, Y. 2005. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human faecal Bifidobacterium strains. *J. Food Prot.* Aceptado. pp. 34- 45
- Collins, M.D., Rodriguez, U., Aguirre, M., Farrow, J.A.E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B.A., Williams, A.M., Wallbanks, S. 1991. Phylogenetic analysis of genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77 ,pp. 5-12.

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

Consumer, Revista., Alimentos funcionales o enriquecidos. Obtenido agosto 2009.  
 Disponible en <http://revista.consumer.es/web/es/20020101/alimentacion/>

Cordoba M. Chaves Carolina María Laura Arias. 2009  
 Identificación, cuantificación y determinación del perfil de sensibilidad a  
 antibióticos de bacterias prebióticas adicionadas a productos de consumo  
 frecuente. Publicación oficial de la sociedad latinoamericana de nutrición.  
 <http://www.alanrevista.org/ediciones/2009-2/art10.asp>

De Vries, W., Stouthamer, A.H. 1969. Factors determinig the degree of  
 anaerobiosis of Bifidobacterium strains. Arch. Microbiol. 65, pp 275-287.

Diaz Gloria, Ruiz Francisco, Morlon-Ouyot Juliette, Wacher Carmen. 1999  
 Diversidad de bacterias amilolíticas del Pozol. Memorias del VIII Congreso  
 Nacional de Biotecnología y Bioingeniería/ IV Congreso Latinoamericano de  
 Biotecnología y Bioingeniería.

Fuller, R. 1999. Probiotics for farm animals. In Probiotics: A Critical Review, G.W.  
 Tannock, ed. Wyomndham, UK: Horizon Scientific Press. pp. 15-22.

Fuller, R. 1993. Probiotics foods. Current use and future developments. Int. Food  
 Ingrid. 3, pp 23-26.

Franco P. Rivas, Garro, Oscar. 2006. Preparación de cultivos iniciadores  
 Optimizacion de Sustratos de Crecimiento. Facultad de Agroindustria, UNNE.  
 Resumen: E-060.

Farrés, A. Ampé, G.I., Escalante, A., Flores, M.T., 1999. Determinación de la  
 diversidad bacteria del pozol: un enfoque polifásico. Congreso latino americano  
 de biotecnología y bioingeniería. pp 112

Gill, H.S. 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal  
 tract. Best Pract.Res. Clin. Gastroenterol. 17, pp. 755-773.

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

- Gilliland, S.E., Staley, T.E., Bush, L.J. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* pp. 3045–3051.
- Héller, S., Solórzano, F., Pérez, R., Blasco y González, J.M., Vargas, F. 2001. Probióticos. Una alternativa eficaz en el tratamiento de la diarrea y otros trastornos del tubo digestivo. Byk Gulden. México.
- Héller Knut 2008. Bacterias Probioticas en Alimentos Fermentados. Características de los Probioticos y microorganismos iniciadores. Mundo lactico y cárnico. [info@mundolacteoycarnico.com](mailto:info@mundolacteoycarnico.com)
- Kullen, M.J., Amann, M.M., O’Shaughnessy, M.J., O’Sullivan, D.J., Busta, F.F., Brady, L.J. 1997. Differentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by DNA fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. *J.Nutr.* pp. 89-94.
- Kurmann, J.A., Rasic, J.L., 1991. The health potential of products containing bifidobacteria. In: *Therapeutic properties of fermented milks*. R.K. Robinson (Eds.), Elsevier Applied Food Sciences, London, pp. 117-158
- Klaenhammer, T.R. 1984. A general method for plasmid isolation in *Lactobacilli*. *Curr. Microbiol.* 10, pp. 23-28.
- Leon Victoria *et al.*, 2006. Efecto de Bacterias ácido lácticas termoresistentes en salchichas cocidas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Julio, año/vol.5 numero 002 Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos Reynosa, México. pp 135-141
- Man, Rogosa, Sharpe. 1960. *J. Appl. Bact.* pp. 130
- McFarland, L.V., Surawicz, C.M., Greenberg, R.N., Fekety, R., Elmer, G.W., Moyer, K.A. 1994. A randomised placebo-controlled trial of *Saccharomyces boulardii* in combination with standard antibiotics for *Clostridium difficile* disease. *J. Am. Medical Ass.* , pp 1913-1918.

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

- Margolles, A., Garcia, L., Sanchez, B., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilan, C.G. 2003. Characterisation of a Bifidobacterium strain with acquired resistance to cholerae a preliminary study. *Int J Food Microbiol.*, pp. 191-198.
- Mateos González Pedro F. Mantenimiento y Conservación de Microorganismos Industriales 30 Enero 2010. <http://nostoc.usal.es/sefin/MI/tema04MI.html>
- Marquina, D. y Santos, A. Probióticos, prebióticos y salud. 30 de Agosto 2009 : [http://www.cib.csic.es/sem/Actualidad/SEM32\\_24.pdf](http://www.cib.csic.es/sem/Actualidad/SEM32_24.pdf)
- Miller, R.S., Hoskins, L.C. 1981. Mucus degradation in human colon ecosystems. Faecal population densities of mucus degrading bacteria estimated by a 'most probable number' method. *Gastroenterology.*, pp. 759-765.
- Orla-Jensen, S. 1924. La classification des bactéries lactiques. *Le Lait.*, pp. 468-480.
- Orla-Jensen, S., Olsen, E. Geill, T. 1945. Senility and intestinal flora. A reexamination of Metchnikoff's hypothesis.
- O'Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.* pp. 593-604.
- O'Sullivan, M.G., Thorton, G., O'Sullivan, G.C., Collins, J.K. 1992. Probiotic bacteria: myth or reality. *Trends Food Sci. Technol.*, pp.309-314.
- Palanca V. E. Rodriguez, J. Señoráns y G. Reglero. Bases científicas para el desarrollo de productos cárnicos funcionales con actividad biológica combinada. Junio 2009 .*Carnilac industrial.* pp. 30 – 33.
- Reinheimer, J.A.; Quiberoni, A.; Taille, P.; Binetti, A.G.; Suárez, V.B. 1996. The lactic acid microflora of natural whey starters used in Argentina for hard cheese production. *Int. Dairy J.* 6: pp 869-879.
- Roberfroid M. B, 2000, Conceptos y la estrategia de la ciencia de los alimentos funcionales: la perspectiva europea, Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Universidad Católica de Lovaina, Bruselas, *Am J Clin Nutr.*

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

- Sanders, M.E., and Huis in't Veld. 1999. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labelling issues. Anton. Leeuw. Int. J. G., pp. 293-315.
- Sanders, M.E. 1993. Effect of consumption of lactic cultures on human health. In: J. Kinsella (Eds.). Advances in food and nutrition research. Academic Press. San Diego, California. pp. 67-130.
- Saavedra, J.M., Bauman, N.A., Oung, I., Perman, J.A., Yolken, R.H. 1994. Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. Lancet. pp.1046-1049.
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, Y.K. 1999. Probiotics: how should they be defined? Trends in Food Sci. Technol. 10, pp. 1-4.
- Sharpe, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, Md. Scardovi, V. Trovatielli, L.D. 1969. The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus Bifidobacterium. Ann. Microbiol. pp 19-29.
- Shah, N.P. 1997. Isolation and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products: A review. Milchwiss, pp 72-75.
- Shah, N.P. 2000. Probiotic bacteria: Enumeration and survival in dairy foods. J. Dairy Sci. pp 894-907.
- Shankar, P.A., Davies, F.L. 1977. Selective technique for yogurt bacteria enumeration. J. Soc. Dairy Technol. pp 28-29
- Sharpe, and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.
- Sullivan, A., Nord, C.E. 2002. Probiotics in human infections. J. Antimicrob. Chemother. 50, 625-627.
- Suarez, E.; Alvarez, 1991 R. yogurt y leches fermentadas. Aspectos generales. Alimentación Equipos y tecnología. Editorial Alicon, S.A. España. pp 119-126

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS APARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

- Suskovic, J., Brkic, B., Matosic, S. and Maric, V. (1997) *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain. *Milchwissenschaft*, 430–435.
- Tuohy K, Probert H, Smejkal C, Gibsib G. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov Today* 2003; pp 692-700
- Trejo- Gonzalez A. 1982. The role of lime in the alkaline treatment of corn for tortilla preparation, advances in chemical series modification of proteins American chemical society. pp 245-263
- Ulloa, M., Herrera, T. and Lappe. 1987. Fermentaciones tradicionales indigenas de México, serie de investigaciones sociales. pp 13-20.
- Wacher, C. 1993. Sources of microorganisms in pozol, traditional Mexican fermented Maize dough, *world journal of microbiology and biotechnology*. pp 269-279.
- Yakult, 2000 Boletin yakult. Consultada 15 de enero 2010. <http://www.yakultpuebla.com.mx/documents/queesyakult.pdf>
- List of Bacterial names with Standing in Nomenclature. Noviembre 2009. [www.bacterio.cict.fr/](http://www.bacterio.cict.fr/).

# **ANEXOS**

## **ANEXO A**

### **TINCIÓN DE GRAM**

#### **Protocolo**

- Recoger muestra estéril
- Hacer el extendido en espiral
- Dejar secar a temperatura ambiente
- Fijar la muestra al calor (flameando 3 veces aprox.)
- Agregar azul violeta (cristal violeta) y esperar 1 minuto. Este tinte dejara de color morado las bacterias Gram positivas.
- Enjuagar con agua
- Agregar lugol y esperar 1 minuto
- Enjuagar con agua
- Agregar safranina y esperar 30 segundos. Este tinte dejara de color rosado las bacterias Gram negativas.
- Enjuagar con agua



## **ANEXO B**

Una prueba de rutina de la catalasa a temperatura ambiente puede hacerse siguiendo dos técnicas:

### **1. Método del portaobjetos (recomendado):**

- Con el asa de siembra recoger el centro de una colonia pura de 18-24 horas y colocar sobre un portaobjetos limpio de vidrio.
- Agregar con gotero o pipeta Pasteur una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% sobre el microorganismo sin mezclarlo con el cultivo.
- Observa la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).
- Desechar el portaobjetos en un recipiente con desinfectante.
- Si se invierte el orden del método (extender la colonia sobre el agua oxigenada) pueden producir falsos positivos.

### **2. Método del tubo de ensayo:**

- Agregar 1ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 % directamente a un cultivo puro de agar en slant densamente inoculado.
- Observar la formación inmediata de burbujas (resultado positivo).

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

## ANEXO C

### SISTEMA API 20 A

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	QTE (mg/cúp.)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
<u>IND</u>	L-triptofano	0,98	formación de INDole	<u>XYL - mezclar / 2-3 min + EHR / 5 min</u>	
URE	urea	0,648	UREasa	amarillo-anaranjado	rojo
GLU MAN LAC	D-glucosa D-manitol D-lactosa (origen bovino)	1,96 1,96 1,96	acidificación (GLUcosa) acidificación (MANitol) acidificación (LACTosa)	BCP	
SAC MAL SAL XYL ARA	D-sacarosa D-maltosa salicina D-xilosa L-arabinosa	1,86 1,96 1,64 1,64 1,64	acidificación (SACarosa) acidificación (MALtosa) acidificación (SALicina) acidificación (XYLosa) acidificación (ARAbinosa)	púrpura	amarillo / verde- amarillento
<u>GEL</u>	gelatina (origen bovino)	0.6	hidrólisis (proteasa) (GELatina)	sin difusión del pigmento (1)	Difusión del pigmento negro (1)
ESC	esculina citrato férrico	0,36 0,11	hidrólisis (β-glucosidasa) (ESCulina)	amarillo (2)	marrón-negro (2)
GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE	glicerol D-celobiosa D-manosa D-meilectosa D-rafinosa D-sorbitol L-rhamnosa D-trehalosa	1,82 1,86 1,96 1,96 2,18 2,18 1,96 1,96	acidificación (GLYcerol) acidificación (CELobiosa) acidificación (MaNosE) acidificación (MeLeZitosa) acidificación (RAFinosa) acidificación (SORbitol) acidificación (RHAmnosa) acidificación (TREhalosa)	BCP	
CAT		-	CATalasa	Después de 30 min al aire libre <u>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un tubo positivo</u>	
SPOR		-	esporas	ausencia de burbujas	presencia de burbujas
GRAM		-	coloración de Gram	rosa	violeta
COCC		-	morfología	bacilo	coccus

## **ANEXO D**

### **Composición de API 20 Médium**

<b>API 20 A</b> médium 4 ml	Tripticasa	5 g
	Extracto de levadura	5 g
	Cloruro sódico	2.5 g
	L- triptófano	0,2 g
	L- cistina	0,4 g
	Hemina (origen porcino)	0,005 g
	Vitamina K1	0,01 g
	Sulfito sódico	0,1 g
	Agua desmineralizada pH 6,9-7,3 ml	csp 1000

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

**ANEXO E**

SISTEMA SAS			CODIGO CEPAS	
PRCEDIMIENTO ANOVA			PROBIOTICAS	
			Am	1
			Sf	2
clase	niveles	valores	Ssf	3
c	5	1,2,3,4,5	Pb	4
p	4	1,2,3,4	Pn	5
z	2	12		
			CODIGO DE CEPAS	
r	8	1,2,3,4,5,6,7,8	PATOGENAS	
			<i>E. coli</i>	1
Números de observaciones	160		<i>E. aerogenes</i>	2
Sistema SAS			<i>S. aureus</i>	3
Variable dependiente : h			<i>Salmonella</i>	4

Fuente	DF	suma de cuadrados	cuadrado de media	F- Valor	Pr> F
Modelo		26	945	36.346154	10 <.0001
Error		133	483.4	3.634586	
Total correcto		159	1428.4		

R-  
cuadrado Coef var Raiz MSE h Media  
0.661579 15.69102 1.906459 12.15

Fuente	DF	ANOVA	cuadrado de media	F- Valor	Pr> F
R		7	131.6	18.8	5.17 <0.0001
C		4	471.4	117.85	32.42 <0.0001
P		3	37.4	12.4666667	3.43 0.019
c*p		12	304.6	25.383333	6.98 <0.0001

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

Procedimiento ANOVA

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para h

Alfa	0.05	
Error de grados de libertad		133
Error del cuadrado medio		3.634586
Valor critico del rango estudentizado		3.91109
Diferencia significativa mínima		1.3181

Medias con la misma letra no son significativa diferentes  
Tukey

agrupamiento	media	N	P
A	15.125	32	3
B	13	32	1
C	11.25	32	2
C	10.875	32	4
C	10.5	32	5

Prueba del rango estudentizado de tukey (HSD) para h

Alfa	0.05	
Error de grados de libertad		133
Error del cuadarodo medio		3.634586
Valor critico del rango estudentizado		3.679553
Diferencia significativa minima		1.1091

*AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS PROBIOTICOS A PARTIR DE  
 BEBIDAS FERMENTADAS (AGUAMIEL, SOTOL Y POZOL)*

---

Medias con la misma letra no son significativa diferentes

Tukey

agrupamiento	media	N	P
A	12.9	40	4
A	12.25	40	1
B	11.75	40	2
B	11.7	40	3