

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**



**DIVISION DE CIENCIA ANIMAL
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**“AISLAMIENTO DE LEVADURAS Y BACTERIAS DE MUESTRAS DE BEBIDAS
FERMENTADAS ELABORADAS TRADICIONALMENTE Y SU
CARACTERIZACION DE POTENCIAL PROBIOTICO”**

POR:

LARISSA SEBASTIANA ARREDONDO VAZQUEZ

T E S I S

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**"AISLAMIENTO DE LEVADURAS Y BACTERIAS DE MUESTRAS DE BEBIDAS
FERMENTADAS ELABORADAS TRADICIONALMENTE Y SU CARACTERIZACION DE
POTENCIAL PROBIOTICO"**

Por:

LARISSA SEBASTIANA ARREDONDO VÁZQUEZ

Presentada como requisito parcial para poder obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada por el comité evaluador

Dr. Mario Alberto Cruz
Presidente

Dra. María Elena Castelo Mejía
Vocal

Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón
Vocal

Dra. Ruth Elizabeth Belmafes Cerda
Vocal

Dr. José Dueñez Atanis
Coordinador de la División de Ciencia Animal



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2019

iii

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**"AISLAMIENTO DE LEVADURAS Y BACTERIAS DE MUESTRAS DE BEBIDAS
FERMENTADAS ELABORADAS TRADICIONALMENTE Y SU CARACTERIZACION DE
POTENCIAL PROBIOTICO"**

Por:

LARISSA SEBASTIANA ARREDONDO VÁZQUEZ

Presentada como requisito parcial para poder obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Aprobada por el comité de asesorías

Dr. Mario Alberto Cruz
Asesor principal

Dra. María Elena Castelo Mejía
Coasesor

Dra. Sonia Noemí Ramírez Barrón
Coasesor

Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda
Asesor externo

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2019

ii

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado principalmente a DIOS por siempre guiar mi camino en todo momento y nunca soltarme de su mano.

A mis padres, por todo el apoyo que me han brindado durante todos estos años, por darme educación y los principios morales que han hecho de mí una mujer de bien. Gracias por sacrificarse tanto por mis hermanas y por mí, este logro es de ustedes, los amo.

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres Arnulfo Arredondo Rosales y María Eugenia Vázquez Montes que han estado conmigo en todo momento apoyando cada una de mis decisiones, por brindarme siempre su amor, cuidado y enseñanzas.
- A mis hermanas Jimena Alexandra y Daria Sofía que han estado para mí en todo momento.
- A mis abuelos por haberme llenado siempre de amor, cuidados y bendiciones. Mis logros también son suyos, y en memoria de los que están cuidándome desde el cielo.
- A mis tíos y tías que siempre han creído en mí y en todo lo que he realizado.
- A mi novio Carlos Nájera Meneses por darme su amor y brindarme su apoyo incondicional.
- Al Dr. Mario Alberto Cruz y la Dra. Ruth Belmares Cerda por guiarme, aconsejarme y compartirme sus conocimientos y experiencias, por creer en mí, impulsándome siempre a mejorar como profesionista y como persona.
- A mis amigas y amigos Casandra, Gisselle, Maryana, Rosy, San Juana, Gilberto, Daniel y Samantha por estar a lo largo de este trayecto.
- A mi Narro querida por darme tanto y haber sido mi segunda casa durante estos años.

INDICE

1. INTRODUCCION.....	10
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Generales	11
2.2 Específicos.....	11
3. JUSTIFICACION	12
4. ANTECEDENTES	13
4.1 Bebidas tradicionales mexicanas fermentas	13
4.1.2 Aguamiel	13
4.1.3 Pulque	15
4.1.4 Tepache	19
4.2 Enfermedades Gastrointestinales	21
4.3 Probióticos	21
4.4 Productos con probióticos enfocados a la salud	23
4.5 Levaduras Probióticas.....	24
4.6 Bacterias probióticas.....	26
5. METODOLOGIA.....	28
5.1 Obtención de las muestras de Agua miel, pulque, tepache, sidra y jugo verde fermentado.....	28
5.1.2 Preparación de los medios.....	28
5.2 Aislamiento de levaduras	28
5.3 Aislamiento de bacterias	29
5.4 Selección de los microorganismos.....	30
5.4.1 Purificación.....	30

5.4.2 Conservación	31
5.5 Identificación microscópica	31
5.6 Caracterización de potencial probiótico	33
5.6.1 Preparación del inóculo.....	33
5.6.2 Tolerancia al ácido estomacal.....	34
5.6.3 Tolerancia a la pepsina	34
5.6.4 Tolerancia a las sales biliares	35
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
6.1 Descripción de las muestras obtenidas.....	36
6.1.1 Aguamiel	36
6.1.2 Pulque	37
6.1.3 Tepache	38
6.1.4 Jugo verde	39
6.1.5 Jugo de manzana.....	40
6.1.6 Nomenclatura de las cepas aisladas.....	41
6.2 Aislamiento de levaduras	42
6.3 Aislamiento de bacterias	43
6.4 Identificación microscópica de levaduras y bacterias.....	44
6.5 Caracterización de potencial probiótico	45
6.5.1 Tolerancia a los ácidos gástricos	46
6.5.2 Prueba de tolerancia a la pepsina.....	47
6.5.3 Prueba a la tolerancia de sales biliares.....	48
7. CONCLUSIONES.....	51
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Caracterización del agua miel	14
Tabla 2 Bacterias ácido lácticas usadas como probióticas	27
Tabla 3. Composición química de diferentes muestras de pulque.	37
Tabla 4. Fuente de obtención de las muestras para la designación de claves.....	41
Tabla 5. Prueba a la tolerancia de los ácidos gástricos.	46
Tabla 6. Prueba de tolerancia a la pepsina	47
Tabla 7. Prueba de la tolerancia a las sales biliares.	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Bebida de pulque	15
Figura 2 Herramientas para la elaboración de pulque: raspador, espumilla	17
Figura 3 El tepache	19
Figura 4 Tepache	20
Figura 5 Técnica de siembra por expansión con varilla de vidrio	29
Figura 6 Técnica de siembra por estría	30
Figura 7 Tinción de Gram.....	32
Figura 8 Pared de las bacterias Gram negativas y Gram positivas.....	32
Figura 9 Preparación de un frotis	33
Figura 10. Muestra de aguamiel.....	36
Figura 11 Muestra de pulque.....	37
Figura 12 Muestra de tepache.....	38
Figura 13 Muestra de jugo verde.....	39
Figura 14 Muestra de jugo de manzana.....	40
Figura 15 Aislamiento de levaduras de las bebidas fermentadas	42
Figura 16. Aislamiento de bacterias de las bebidas fermentadas	43
Figura 17. Caracterización microscópica de las cepas de levaduras	43
Figura 18. Caracterización microscópica de las cepas de bacterias	44

1. INTRODUCCION

La mayoría de las bebidas tradicionales de México son bebidas que se disfrutaban desde la época prehispánica. Su grado de alcohol es mínimo, son refrescantes, y su proceso de elaboración principal es la fermentación. Como su nombre lo indica, las bebidas fermentadas son aquellas que son producidas mediante un proceso de fermentación, ya sea de cereales, frutas y/o vegetales. La fermentación es, entonces, el proceso químico que se presenta al dejar reposar cualquiera de estos ingredientes con un alto contenido de glucosa durante periodos largos y a determinadas temperaturas dependiendo de la bebida de que se trate. Es en este punto que se generan las condiciones propicias para que ciertos microorganismos conviertan la sacarosa en alcohol.

Las levaduras y bacterias tienen un papel importante en nuestros días ya que a las diferentes especies y variedades se les han estado dando usos en las industrias para la elaboración de alimentos y bebidas. El uso de levaduras y bacterias, como probióticos potenciales, ha sido revisado y es bien sabido que juegan un papel importante en algunos quesos y leches fermentadas, tienen la capacidad de disminuir la acidez. Además, generan precursores de compuestos aromáticos, como aminoácidos libres y ácidos grasos libres, que contribuyen significativamente al sabor final. Debido a la interacción microbiana positiva que tienen con otras especies, así como sus efectos inhibidores contra el deterioro de los microorganismos en la leche fermentada, las levaduras y bacterias se han estudiado para su uso como cultivos iniciadores para el desarrollo de nuevos productos proporcionando probióticos como complementos dietéticos y que ayudan a mejorar problemas digestivos.

Por lo tanto, los objetivos de esta investigación fueron aislar e investigar las posibles propiedades probióticas de las cepas provenientes de bebidas fermentadas tradicionalmente para tener un impacto en la salud.

2. OBJETIVOS

2.1 Generales

Aislar levaduras y bacterias de bebidas fermentadas tradicionalmente mexicanas y evaluar su caracterización de potencial probiótico mediante pruebas de tolerancia al ácido estomacal, pepsina y sales biliares.

2.2 Específicos

- Obtener las muestras de Agua miel, pulque, tepache y jugos fermentados elaborados tradicionalmente en México.
- Aislar cepas de levaduras y bacterias de las bebidas fermentadas en los medios de cultivo YPD y MRS y realizar la selección y purificación.
- Realizar identificación microscópica mediante la tinción de Gram y evaluar sus características morfológicas.
- Evaluar su caracterización del potencial probiótico mediante las pruebas de tolerancia al paso del ácido estomacal, pepsina y sales biliares.

3. JUSTIFICACION

Lo que se pretende es obtener microorganismos con potencial probiótico que se puedan encontrar en bebidas fermentadas tradicionales mexicanas que se consumen comúnmente y a las cuales se les atribuyen propiedades que ayudan en el tratamiento de diarrea, mejoramiento de la digestión y a promover la absorción de nutrientes.

En México un 70% por ciento de la población padece algún malestar digestivo que puede ir desde acidez, inflamación, colitis hasta síndrome del intestino irritable, afirmó Guadalupe Herrera, Delegada del Instituto Danone de México. La especialista señaló que los malestares digestivos suelen ser crónicos y muchas veces no se diagnostican adecuadamente, lo que repercute en el estado de ánimo, las emociones y la calidad de vida en general de la persona que los padece. La mala alimentación y el sedentarismo son las principales causas de malestares digestivos. Tener una alimentación balanceada, actividad física moderada, una hidratación adecuada e incluir alimentos lácteos fermentados que te proporcionen probióticos puede ayudar a reducirlos malestares digestivos menores y equilibrar la salud de tu organismo.

Esta investigación relacionada con las bebidas fermentadas tradicionalmente mexicanas, trata de obtener levaduras y bacterias con potencial probiótico para utilizarlos en el desarrollo de nuevos productos y aprovechar los beneficios que aporta a la salud.

4. ANTECEDENTES

4.1 Bebidas tradicionales mexicanas fermentas

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. Las bebidas fermentadas son aquellas 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 y col, 2003).

4.1.2 Aguamiel

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 forman de manera natural parte de los azúcares disponibles, sin embargo el proceso se acelera por la adición de un inóculo iniciador llamado semilla. 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 β -glucanos y dextranos que generan un incremento en la viscosidad (Cervantes y Pedroza, 2007).

Debido a la gran cantidad de nutrientes es un medio de cultivo fácilmente de proliferar por distintos microorganismos. Comúnmente podemos encontrar microorganismos del género *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Sacharomyces*, *Zymomonas mobilis* y *Acetobacter*. El aguamiel es un líquido dulce (7 a 14° Baumé), este puede ser ácido o ligeramente alcalino, incoloro y transparente. Posee un ligero olor herbáceo y contiene diversos minerales, además de ser rico en carbohidratos y proteínas, presenta un pH promedio cercano a la neutralidad (6.8) con un porcentaje de humedad elevado de 86% una proporción de sólidos solubles de 10.85 °Brix (Ramírez y Gentry; 1982).

El aguamiel puede ser una fuente importante de elementos nutricionales para consumo humano cuya composición química se ilustra en el siguiente cuadro:

Tabla 1 Caracterización del agua miel

Componente	Mg/L
Densidad	10.49 0
Acidez	0.680
Glucosa	0.120
Sacarosa	94.50 0
Gomas	6.000
Albuminoides	8.060
Cenizas	4.500

Fuente: (Loyola, 1956; 1953; Ramírez Higuera 2009)

4.1.3 Pulque

De todas las bebidas dentro del país, el pulque es la más conocida y considerada como una de las bebidas tradicionales más importantes dentro de la historia; cuya transición ha dejado huella dentro de la historiografía de las bebidas de México. La bebida del pulque ha trascendido a través del tiempo y en cada una de las etapas importantes del país ha encontrado un desarrollo importante y le ha permitido situarse en la memoria social del acto del beber. Su consumo se encuentra en gran parte del país como el Estado de México, Ciudad de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala y Veracruz. Mucho de ellos no solo consumidores sino como productores oficiales de esta bebida.



Figura 1. Bebida de pulque

Fuente: Omar Barcena, 2013.

La bebida del pulque en épocas antiguas estaba destinada a ser parte de una estratificación social definida. Existen diversas documentaciones en las que se exponen la familiarización de la bebida con el contexto histórico-cultural del país. Esta bebida de acuerdo con el diccionario enciclopédico de medicina tradicional define al pulque como “bebida alcohólica que se obtiene a partir de la fermentación de la savia, extraída de varias especies de magueyes, especialmente del agave atrovirens” (Vargas, 1999).

Su elaboración se basa primordialmente a partir del maguey, su cultivo puede diversificarse en varias maneras. Aproximadamente a la edad de 8 años de sembrado el maguey, se dice que llega a un estado de madurez; es decir que está lista para “caparse”, deben considerarse ciertas características dentro de la planta para dar paso a capar (adelgazamiento del meyolote, la pérdida de espinas de la penca y cambio en su coloración) todas estas actividades a considerar serán realizadas por sujetos denominados “tlachiqueros”. Para llegar al meyolote éste sujeto debe de buscar “el mejor lugar o lado” del maguey, lo cual se logra buscando la cara que mejor apunta la sol cuando se eleva al amanecer. Comienza el corte de pencas que harán más fácil el acceso al centro del maguey. El tlachiquero debe retirar las espinas utilizando un instrumento llamado “espumilla” que ayudara en la extracción del meyolote. Se retiran las pencas para llegar al corazón y se rompe el meyolote con el “quebrantador”.



Figura 2.Herramientas para la elaboración de pulque:
raspador, espumilla y afilador

Fuente: Roberto Mira Tapia, 2009.

Se picará al maguey de acuerdo a las fases de la luna, primordialmente en la luna llena. La picazón se ubica el lugar donde fue capado y se rasga una cruz, con la barreta el meyolote es retirado para ser limpiado y comenzar nuevamente a ser raspado, se limpia el hueco donde brotara el líquido que se dejara reposar de tres a ocho días, dependiendo el lugar y el clima. El tlachiquero deberá regresar dos veces al día, durante ocho o cuatro meses en los cuales el maguey segregara el líquido. Con la ayuda de un “raspador” y con movimientos oscilatorios, cuidando no dañar las paredes, posteriormente el líquido será contenido con ayuda del “acocote” donde será sumergido y se succionará por el tlachiquero sin que llegue a su boca para que sea vertido en otro recipiente, hasta dejar la piña sin rastros de agua miel para ser raspado de nuevo.

La elaboración de pulque variará de acuerdo al lugar y el clima, así como el sujeto que lo prepare. El lugar para la preparación es denominado como “tinacal” donde se llevará a cabo la fermentación y en diferentes recipientes, esto tarda 24 horas aproximadamente por lo cual debe de estarse alimentando constantemente con aguamiel. Pasado las veinticuatro horas se produce el pulque, donde puede ser natural o también en combinación con diversas frutas, dando origen a los conocidos curados. La graduaciones en alcohol que contiene el pulque dependerá de mucho de su elaboración, “primordialmente oscila entre los tres a seis grados, obedeciendo al aguamiel, los cuidados del maguey, clima y región (Erlwein y col, 2009).

Las disciplinas científicas como la biotecnología han estudiado al pulque como un elemento nutricional dentro de la sociedad mexicana “Es un hecho que existe aún un enorme potencial por explotar, derivado del conocimiento de la actividad microbiológica que beneficia la salud y nivel nutricional del consumidor de productos fermentados tradicionales. También es posible pensar en que dichas actividades microbianas podrían promoverse en el mismo alimento, o bien, en el caso de algunos de sus componentes, adicionarlos a otros alimentos” (Lozano, 2000); diversas ferias y congresos nacionales e internacionales han hablado sobre la importancia ancestral del pulque en su producción y uso social.

4.1.4 Tepache

La palabra tepache proviene del náhuatl tepatli “bebida de maíz martajado”, determinar el origen de dicha palabra es tarea de diversos historiadores, por un lado aseguran las investigaciones que el origen de su significado se encuentra en Tepachoa vocablo que significa “moler o prensado con piedra” (Córdoba, 2014).

Teófilo Herrera (2003) ubica al consumo del tepache en las regiones de la Ciudad de México, sin embargo, existen diferentes versiones de ésta bebida en otras zonas del país como lo son: Hidalgo, Puebla, Morelos, San Luis Potosí, Oaxaca, Jalisco y Nayarit. Antiguamente la preparación del tepache se le es atribuida a la época prehispánica, en sus inicios su elaboración constaba básicamente al maíz; 56 en la actualidad (después de la colonia) la preparación fue adicionando otros ingredientes como la piña, manzana y la naranja.

Para preparar el tepache; es necesario la cáscara y la pulpa de la fruta elegida (según la región), agregada con un poco de piloncillo y adicionada con otros ingredientes como granos de cebada, canela y clavos de olor, estos ingredientes son puestos a fermentar a temperatura ambiente de una o a tres días. Durante los primeros días el tepache es considerada una bebida dulce y refrescante, posteriormente con el paso del tiempo el proceso de la fermentación hace sus efectos hasta lograr una bebida significativamente embriagante (Romo, 1988).



Figura 3.El tepache

Fuente: Yadin Xolalpa, 2014.

De los utensilios y para elaborar a la bebida destacan grandes barriles de madera, éstos son decorados y adornados comúnmente con imágenes que se asemejan a la fruta con la que se ha elaborado el tepache llamados “tepacheras”, son cubiertos con una manta de cielo para evitar su contaminación (la entrada de insectos), también pueden ser utilizados recipientes de barro que sirven como contenedores (Moreno, 2005).



Figura 4.Tepache

Fuente: Luis de la Borda, 2008.

La gran diversidad de ingredientes que se le han integrado a esta bebida, han originado diferentes versiones del tepache, donde dos regiones del país destacan en su preparación. En el estado de Oaxaca el grupo étnico triqui consume de manera recurrente la bebida refrescante, agregándole chile de árbol, piloncillo y en algunas ocasiones pulque; sin lugar a dudas el tepache que es más conocido se encuentra en Jalisco basado en el fruto de la piña y acompañado con especias como la canela y el clavo de olor.

4.2 Enfermedades Gastrointestinales

Se le llama infecciones gastrointestinales, debido a que afectan el sistema digestivo. Es decir es una condición médica caracterizada por la inflamación del tracto gastrointestinal, que implica el estómago y el intestino delgado, lo que da como resultado una combinación de diarrea, vómitos, y dolor abdominal. Aunque no tiene ninguna relación con la influenza, se le llama incorrectamente gripe estomacal y gripe gástrica. Bajo este término general se engloban diversos tipos de irritación e infección del tracto digestivo. Habitualmente se trata de una infección menor del tracto digestivo, que se produce cuando algunos microorganismos se multiplican con rapidez en el estómago y en el intestino. Aunque por lo general está causada por un virus, puede tener otros orígenes, como las intoxicaciones por alimentos contaminados o por medicamentos (Aguavil, 2012).

4.3 Probióticos

Un probiótico se define como "un suplemento alimenticio microbiano vivo que beneficia al animal huésped mediante el mejoramiento de su equilibrio microbiano intestinal". Los probióticos se pueden usar para modular las bacterias del intestino. Las preparaciones comerciales de probióticos pueden ser de cepa única o múltiple y también como una mezcla de varias especies (multiespecies) de bacterias. Los productos multiespecies pueden tener el beneficio de ser eficaces contra una gama más amplia de condiciones del tubo digestivo (Yegani, 2010).

Los probióticos son capaces de prevenir la proliferación de enfermedades causadas por patógenos como lo son la *Escherichia coli* y *Salmonella*. Esto puede ocurrir de dos formas: Primero incrementando la resistencia a infecciones y enfermedades infecciosas por un antagonismo directo o por estimulación de la inmunidad (incremento de la actividad fagocítica y elevada secreción de Inmunoglobulina).

Los probióticos están propuestos para el uso en animales y establecer la salud de la microflora de los intestinos y prevenir el establecimiento de bacterias patógenas, para restablecer la microflora benéfica agotada por antibióticos y prevenir la reinfección por patógenos y reducir los efectos del estrés (Salvador y Cruz, 2009).

Los probióticos producen ácido láctico y ácido acético los cuales crean una alteración del pH que funcionan como un antiséptico del sistema digestivo y al mismo tiempo minimiza la proliferación de microorganismos patógenos, al competir por nutrientes y alojamiento en las paredes intestinales (Lastras 2009).

Según Nava (2008) un probiótico debe reunir las siguientes características:

- La seguridad biológica, no deben causar infecciones de órganos o de sistemas.
- La capacidad de ser toleradas por el sistema inmunitario del organismo huésped, por lo tanto, deben ser preferiblemente de proveniencia intestinal.
- La capacidad de resistir la acción de los ácidos gástricos y de las sales biliares para llegar vivas en grandes cantidades al intestino.
- La capacidad de adherirse a la superficie de la mucosa intestinal y de colonizar el segmento gastrointestinal.
- La sinergia con la microflora endógena normal del intestino.
- El efecto barrera, este término define la capacidad de producir sustancias que tengan una acción trófica sobre el epitelio de la mucosa intestinal.
- La capacidad de potenciar las defensas inmunitarias del huésped.

Entre los beneficios a la salud que se han reportado se encuentran: a) Equilibrio en la flora intestinal, b) Prevención y tratamiento de la diarrea, efectos sobre el estreñimiento leve, mejorar la digestión de la lactosa en los pacientes con intolerancia a ésta, c) Reducción de actividad de enzimas pro-cancerígenas, Inmunoestimulador, tratamiento de gastritis y úlceras, se han reportado estudios para la prevención y tratamiento de infecciones urinarias, reducción del colesterol, d) Infecciones respiratorias, otitis media y caries entre otros (Amores y col, 2004).

4.4 Productos con probióticos enfocados a la salud

Varios estudios clínicos han demostrado que el consumo regular de yogur, leche o queso que contienen prebióticos, condujeron a una disminución en el número de estreptococos cariogénicos en la saliva y, así como también una reducción en placa dental. Nikawa y col., reportaron que el consumo de yogurt que contiene *Lactobacillus reuteri* durante un período de 2 semanas, redujo la concentración de *S. mutans* en la saliva hasta en un 80%. Se obtuvieron resultados comparables mediante la incorporación de los probióticos en la goma de mascar o pastillas (Bonifait y col, 2009).

Lactobacillus casei Shirota, un microorganismo que se encuentra exclusivamente en la leche fermentada de Yakult, se considera un probiótico. Esto debido a su capacidad para modular la composición y la actividad metabólica de la flora intestinal, así como mejorar el sistema inmunológico humano sano. Este microorganismo es capaz de sobrevivir durante el paso a través del tracto gastrointestinal después de su consumo, debido a sus propiedades acidúricas y acidogénicas (Lima et al., 2005). Cada envase de Yakult contiene un mínimo de 108 UFC/mL de *Lactobacillus casei* Shirota) (Sutula y col, 2012).

4.5 Levaduras Probióticas

La palabra levadura está ligada en la mayoría de los idiomas a un fenómeno externo del proceso fermentativo. La palabra alemana Heffen, señala el fenómeno de que se levanta un líquido en fermentación. La palabra francesa para la levadura, leveru, que se deriva de levar = levantarse, La palabra inglesa yeast (holandés gist) significa espuma y, por lo tanto, indica a otro fenómeno externo de la fermentación.

Meyen propuso en 1938 el nombre de *Saccharomyces* como nombre genérico para las levaduras (jôrgense, 1959).

Las levaduras y organismos afines pertenecen a la subdivisión de las talofitas, designada como *Eumycetos* u hongos verdaderos, porque no poseen clorofila. El conjunto de las levaduras se distribuye en tres familias denominadas *Saccharomycetaceae*, *Sporobolomycetaceae* y *Cryptococcaceae*. Representa un grupo de microorganismos bastante mal definidos, situado entre las bacterias y los hongos superiores, en lo que respecta al tamaño promedio de la célula aislada. (Prescott, 1962. Domínguez, 2006).

Milian (2005), plantea que son muchas las levaduras que se pueden usar de forma beneficiosa para mantener una flora digestiva sana y en equilibrio. Los microorganismos más usados son *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* *Leuconostoc* spp.

Las levaduras tienen un papel importante en nuestros días ya que las diferentes especies y variedades se les han estado dando usos en la industria como a continuación se mencionan, por nombrar algunas:

Saccharomyces cerevisiae: Esta levadura ha sido utilizada en la elaboración de vino, sake, cerveza y, hoy en día, para la producción industrial de alcohol. Como probiótico contra E.coli en cerdos, probióticos en humanos contra la enfermedad de Crohn, y como suplemento alimenticio en el crecimiento de rumiantes.

Saccharomyces carlsbergensis: Se utiliza en la producción de cerveza lager.

Saccharomyces rouxii: En la elaboración de la salsa de soya, la cual se obtiene utilizando a esta levadura.

Kluyveromyces fragilis: Es una especie fermentadora de la lactosa que se explota en pequeña escala para la producción de alcohol a partir del suero de leche.

Candida utilis: Se emplea en la industria alimentaria, puede crecer metabolizando azúcares de cinco átomos de carbono (pentosas).

Yarrowia lipolítica: Es una fuente industrial de ácido cítrico.

Saccharomyces Boulardii: Se usa con fines profilácticos y terapéuticos, por su capacidad inmunomoduladora, en humanos esta levadura ha sido usada contra el acné.

Saccharomycopsis lipolytica: Puede romper cadenas lineales de hidrocarburos de 10 a 16 átomos de carbono; existe una instalación piloto que ha logrado hacer crecer esta levadura con buenos resultados en presencia de una fracción purificada de petróleo, el cual como se sabe, es un hidrocarburo. Esta levadura al crecer produce ácido cítrico como producto de desecho, el que a su vez es utilizado en otra serie de procesos industriales.

4.6 Bacterias probióticas

Según Jaramillo (2010), los probióticos más empleados son las bacterias capaces de producir ácido láctico, como *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. reuterii*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. animalis*, *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* y *Saccharomyces boulardii*.

El género *Lactobacillus* (lactis-leche; bacillus-pequeños bacilos) se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos, aunque con frecuencia pueden observarse bacilos cortos o coco-bacilos coryneformes. Las colonias de 23 *Lactobacillus* en medios sólidos son pequeñas (2-5 mm), convexas, suaves, con márgenes enteros, opacas y sin pigmentos. Sólo en algunos casos presentan coloración amarillenta o rojiza. Algunas especies forman colonias rugosas. Normalmente no reducen los nitratos, pero esta reacción puede ocurrir en algunos casos, cuando el pH está por encima de 6,0. Los lactobacilos no licúan la gelatina ni digieren la caseína, aunque muchas cepas producen pequeñas cantidades de nitrógeno soluble. Tampoco producen indol ni sulfídrico (H₂S). Son catalasa negativos, pero algunas cepas producen la enzima pseudocatalasa que descompone el peróxido de hidrógeno. Son citocromo negativos, por la ausencia de porfirinas.

Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente ácidos, con pH inicial de 6,4 - 4,5. La mayoría de las cepas de *Lactobacillus* son principalmente aerotolerantes; su crecimiento óptimo se alcanza bajo condiciones microaerofílicas o anaeróbicas. La mayor parte de los lactobacilos son mesófilos (30 - 40°C), con un límite superior de 40°C. Aunque su rango de temperaturas para el crecimiento oscila entre 2 y 53°C.

Los miembros de este género transforman la glucosa y las hexosas aldehídicas similares, los carbohidratos que producen estos azúcares simples y los alcoholes polihidroxílicos en ácido láctico por homofermentación o bien, en ácido láctico y otros productos finales adicionales como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, ácido fórmico y ácido succínico (Samaniego y Sosa, 2002).

Tabla 2 Bacterias ácido lácticas usadas como probióticas

<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>S. cremoris</i>	<i>B. bifidum</i>
<i>L. casei</i>	<i>S. salivarius subsp. thermophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>
<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>S. faecium</i>	<i>B. animalis</i>
<i>L. brevis</i>	<i>S. diacetylactis</i>	<i>B. infantis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>B. longum</i>

Fuente: Samaniego y Sosa (2002).

5. METODOLOGIA

5.1 Obtención de las muestras de Agua miel, pulque, tepache, sidra y jugo verde fermentado.

Las muestras fueron recolectadas de establecimientos ambulantes en la ciudad de Saltillo, Coahuila. Se transportaron al laboratorio en envases cerrados y se mantuvieron en refrigeración hasta realizar las pruebas posteriores.

5.1.2 Preparación de los medios.

Se prepararon los medios de cultivo YPD (formulado con extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2% y agar bacteriológico 1.5%) para levaduras y MRS para bacterias ácido lácticas.

5.2 Aislamiento de levaduras

Las muestras se sembraron directo en la placa por expansión en agar YPD el procedimiento debe ser realizado en condiciones de asepsia como se muestra en la Figura 5.

Se tomaron 100 µl de cultivo diluido con ayuda de una micropipeta después se colocó la muestra en el centro de la placa de agar, posteriormente con una varilla acodada de vidrio previamente esterilizada se extiende la muestra uniformemente por la superficie del agar y se incubo a 35 °C por 24 h.

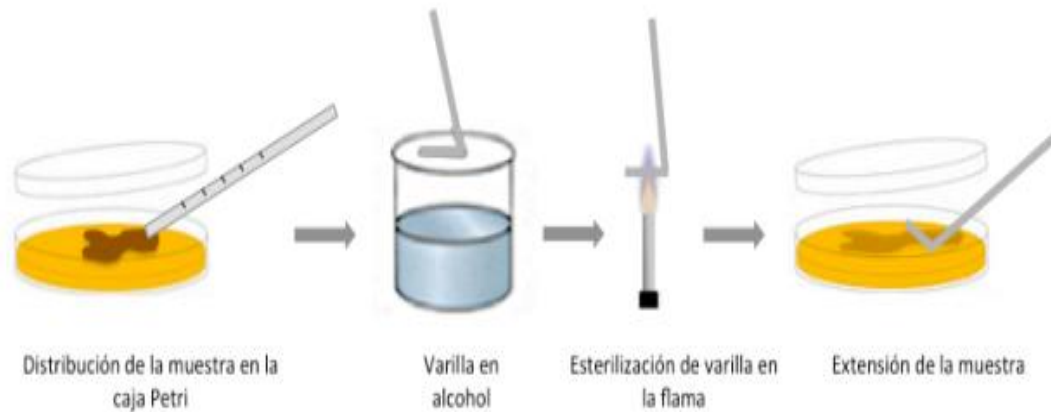


Figura 5.Técnica de siembra por expansión con varilla de vidrio

Fuente: Manual de prácticas de microbiología básica, 2016.

5.3 Aislamiento de bacterias

Se realizó el mismo procedimiento anterior pero se utilizó el agar MRS (compuesto por peptona, extracto de carne, extracto de levadura, glucosa, monoleato de sorbitán, fosfato dipotásico, acetato de sodio, citrato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso y agar) para el crecimiento de bacterias.

5.4 Selección de los microorganismos

5.4.1 Purificación

Se realizaron resiembras sucesivas por estría cruzadas en el agar para seleccionar las cepas de acuerdo a su morfología. Se esterilizó el asa de siembra a través de la flama y se enfrió por unos segundos, después se tomó la muestra del cultivo y con ayuda de una asa bacteriológica se extiende a partir de un punto en la periferia de una placa de medio sólido en tres sectores de la placa formando estrías sobre la superficie, siguiendo un patrón definido como se muestra en la figura 6. Posteriormente las cajas se incubaron a 35 °C durante 24 h.

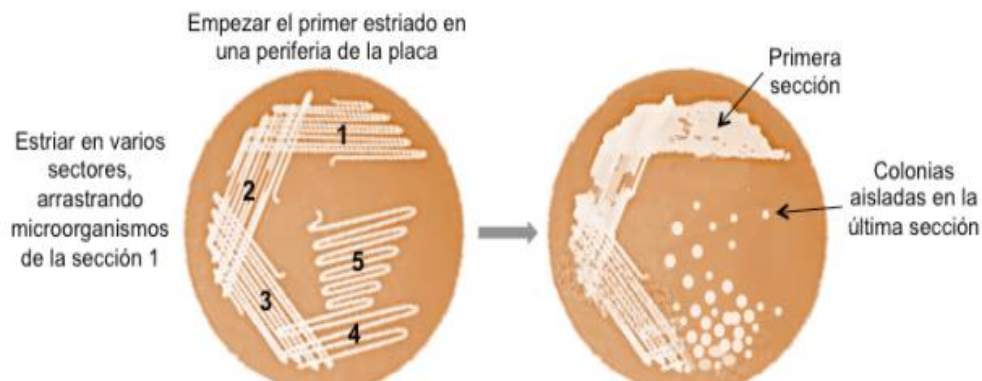


Figura 6.Técnica de siembra por estría

Fuente: Manual de prácticas de microbiología básica, 2016.

Los cultivos puros se mantuvieron y se subcultivaron hasta la caracterización y seguimiento de pruebas probióticas.

5.4.2 Conservación

El duplicado de las cepas puras se resembro en cultivo líquido YPD para levaduras y MRS para bacterias, posteriormente se incubaron a 35 °C durante 24 h.

Se preparó una solución de leche descremada 10% y glicerol 10% para cada cultivo líquido y en condiciones de asepsia con una micropipeta y puntillas esterilizadas se guardaron las cepas en tubos viables.

5.5 Identificación microscópica

Para la identificación microscópica de las cepas se llevó a cabo la tinción de Gram; durante la tinción las bacterias Gram positivas se tiñen de morado, mientras que las bacterias Gram negativas toman una coloración rosa o roja (Fig.7). Esto es debido principalmente a las diferencias estructurales que presentan en su pared (Fig.8). Las bacterias Gram negativas pierden el colorante cristal violeta con mayor facilidad que las Gram positivas.

De una placa se tomó una colonia y se extendió en un porta objetos, se secó a temperatura ambiente y flameo para su fijación; para la tinción se adiciono: cristal violeta (1 min), lugol (1 min), alcohol (20 seg), y finalmente se empleó la safranina durante 30 segundos. En cada tinción se utilizó agua destilada para enjuagar.

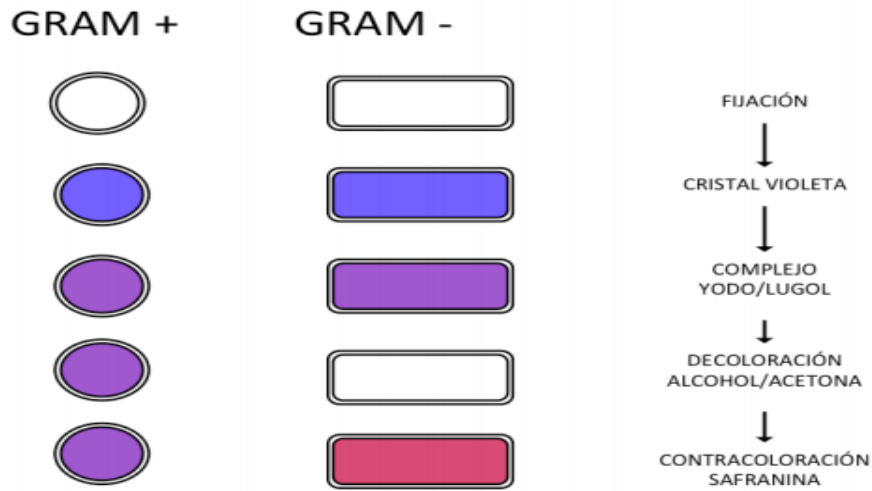


Figura 7. Tinción de Gram

Fuente: Manual de prácticas de microbiología básica, 2016.

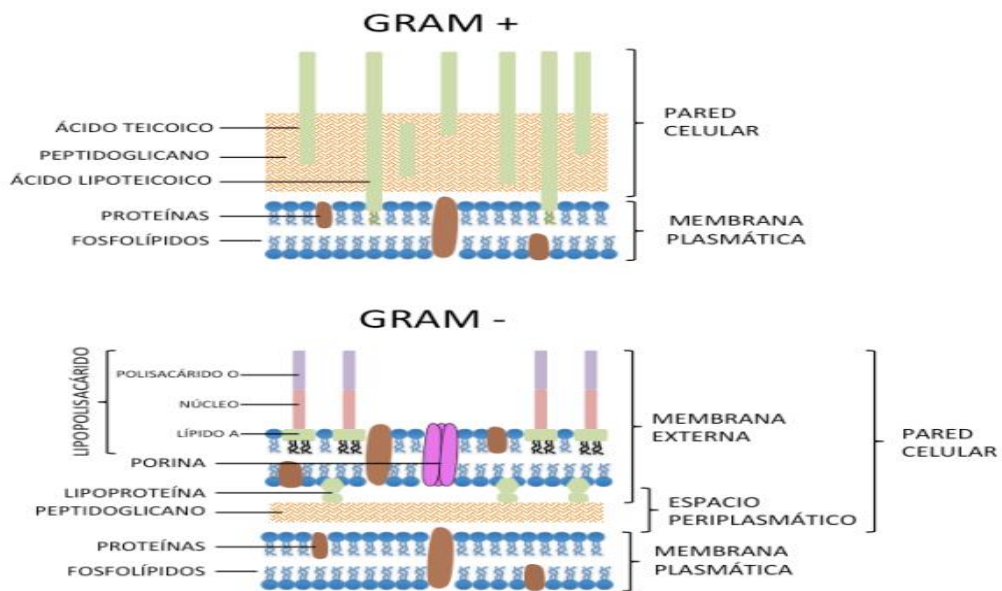


Figura 8. Pared de las bacterias Gram negativas y Gram positivas

Fuente: Manual de prácticas de microbiología básica, 2016.

La primera etapa es la preparación de un frotis bacteriano (Fig.9). Un frotis es la extensión de una muestra o cultivo sobre un portaobjetos para separar lo más posible los microorganismos.

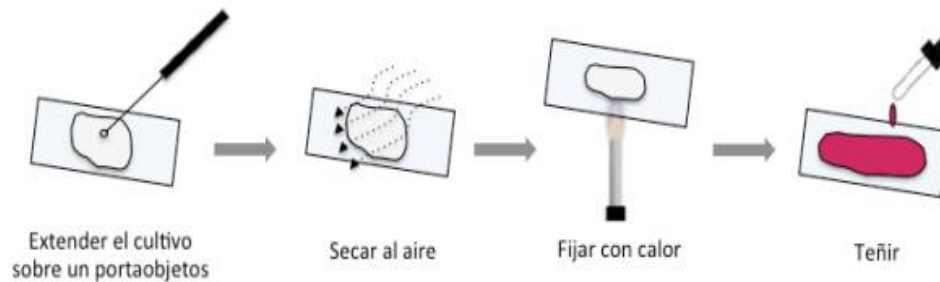


Figura 9. Preparación de un frotis

Fuente: Manual de prácticas de microbiología básica, 2016.

5.6 Caracterización de potencial probiótico

5.6.1 Preparación del inóculo

Cada cepa de levadura se cultivó en caldo YPD (1% de extracto de levadura; 2% de peptona; 2% de glucosa) para levaduras y en caldo MRS para bacterias y se incubaron a 30°C. Después de este período, los contenidos se utilizaron para ejecutar las pruebas descritas a continuación.

5.6.2 Tolerancia al ácido estomacal

Los cultivos estandarizados se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos a 28°C, la biomasa obtenida se lavó dos veces y se suspendió en tampón PBS, pH 7,0 (PBS g / L cloruro de sodio 8.0; cloruro de potasio 0.2; fosfato disódico 1,44; Fosfato de potasio 0.24). El efecto de la exposición a las condiciones ácidas del estómago fue determinado inoculando 1% de cultivos en PBS pH 2.0. Las muestras se recogieron en el momento de la inoculación y después de 4 h de incubación a 37°C. Se realizaron 6 diluciones y Alícuotas (0,1 ml) se colocaron en placas en agar YPD y MRS, se incubaron a 30 ° C durante 24 h.

La tasa de supervivencia fue expresada por la población de células viables cultivadas en los medios. (Pennacchia y col., 2008; Syal; Vohra, 2013).

5.6.3 Tolerancia a la pepsina

Los cultivos estandarizados se expusieron a una solución de PBS con pH 2.0 y 3 g / L pepsina incubada a 37 ° C durante 4 h. Se realizaron 6 diluciones y alícuotas (0.1 mL) se colocaron en YPD y MRS inmediatamente después de la inoculación y se incubó a 30°C durante 24 h. La tasa de supervivencia fue expresado por la población de células viables cultivadas en los medios.(Pennacchia y col., 2008; Rajkowska & Kunicka-Styczyńska, 2010).

5.6.4 Tolerancia a las sales biliares

El efecto de las sales biliares sobre la viabilidad de las levadura y bacterias se evaluó mediante la inoculación del 1% (v / v) de cultivos estandarizados en PBS con 0.1 y 1% de sales biliares, pH 7.0. Los tubos inoculados se incubaron a 37 °C durante 4 h; entonces, el crecimiento de células viables fue realizado por placas YPD y MRS en el momento de la inoculación y después de 24 h de exposición. La tasa de supervivencia fue expresada mediante la viabilidad de la población en presencia de sales biliares. (Rajkowska y Kunicka-Styczyńska, 2010; Syal y Vohra, 2013).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Descripción de las muestras obtenidas

Las muestras obtenidas fueron trasladadas del lugar de origen al laboratorio tomando las precauciones necesarias. Todas las muestras fueron recolectadas en la ciudad de Saltillo y en algunos casos en ejidos pertenecientes a esta cabecera municipal.

6.1.1 Aguamiel

El aguamiel, es la savia que se obtiene después de 6 meses de haber realizado el proceso de castrado del agave, cuyos componentes son: agua, sacarosa, glucosa, arabinosa en proporciones mucho menores que la fructosa y la glucosa y sobre todo se ha caracterizado por su contenido de polifructanos, es decir, inulina. (Ramírez Higuera 2009). La muestra obtenida en el establecimiento ambulante se describe con las siguientes características como se muestra en la figura 10.



Aguamiel: Color café, con sabor dulce y una consistencia melosa.

Figura 10. Muestra de aguamiel

6.1.2 Pulque

El pulque es una bebida alcohólica con 4 a 7° GL, blanca lechosa, viscosa y ligeramente ácida. Varios autores han estudiado la composición química de diferentes tipos pulque (Tabla 3). Los compuestos más importantes de la bebida son: sales minerales, gomas, proteínas, aminoácidos y vitaminas del complejo B y vitamina C.



Pulque: apariencia turbia, color blanco lechoso.

Figura 11. Muestra de pulque

Tabla 3. Composición química de diferentes muestras de pulque.

Características %	Tipos de pulque			
	Pulque ^a	Pulque tradicional ^b	Pulque planta piloto ^c	Pulque industrializado ^d
Densidad	1.0	-	1.01	-
Humedad		98.3	-	97.7
Grado alcohólico	7.9	-	-	6
Acidez total	0.4	-	0.28	-
Acidez volátil	0.12	-	-	-
Sacarosa	0.04	-	-	-
Gomas	0.66	-	0.40	-
Proteínas	0.35	0.37	0.35	0.40
Extracto seco	1.65	-	-	-
Cenizas	0.13	0.24	0.28	0.24

Fuente: Instituto de nutriología (1925)

6.1.3 Tepache

Aunque hay diversas maneras de preparar tepache, la más frecuente es aquella en la que se obtiene no de maíz, como se ha mencionado, sino con frutas como piña, manzana, naranja, guayaba y otras, las cuales son puestas a fermentar, durante un tiempo variable en barriles de madera, llamados tepacheras, en agua endulzada con piloncillo. Las tepacheras son tapadas con tela de manta de cielo u otro dispositivo con el fin de evitar la introducción de moscas del género *Drosophila* o cualquier otro tipo de contaminación. Después de uno o varios días se obtiene una bebida refrescante de sabor dulce y agradable, pero si la fermentación se prolonga demasiado tiempo, se vuelve una bebida embriagante no apta para el consumo, que adquiere posteriormente un sabor agrio acre desagradable, debido a la formación de ácido acético. En raras ocasiones, el tepache también puede ser preparado con el jugo de caña de azúcar o con pulque (Santamaría, 1942, 1959; Ulloa y Herrera, 1982; Ulloa y col., 1987).



Tepache: color café claro, con sabor dulce un toque ligero a alcohol.

Figura 12. Muestra de tepache

6.1.4 Jugo verde

El jugo verde es una bebida que durante los últimos años ha tomado gran importancia entre los consumidores que pretenden cuidar su salud. Se buscan beneficios tales como: el contenido de antioxidantes, ayuda a mejorar el metabolismo y tiene alto contenido de fibra. Dentro de los ingredientes que se utilizan para elaborar esta bebida están, la manzana, espinacas, pepino, apio y limón, además de algunas variaciones que se hacen de acuerdo al gusto de cada persona.

La muestra fue obtenida de un establecimiento ambulante en la ciudad de Saltillo y posteriormente trasladada al laboratorio para iniciar su análisis.



Jugo verde: consistencia viscosa por la pulpa que contiene, de color verde debido a la clorofila de las frutas con las que está elaborado y un sabor poco dulce.

Figura 13. Muestra de jugo verde

6.1.5 Jugo de manzana

El jugo de manzana natural es una bebida muy conocida debido a sus efectos rejuvenecedores por su poder antioxidante, se usa también como depurativo y desintoxicante lo cual lo hace uno de los jugos naturales más utilizados en las dietas para perder peso.

Para la muestra de jugo de manzana fue necesario encontrar un establecimiento que lo realizara en el momento y utilizando manzana para poder guardar las propiedades del jugo natural recién extraído y no usar alguna marca ya establecida con jugo procesado que pudiera interferir en los resultados.



Jugo manzana: color café claro, con un olor y sabor dulce.

Figura 14. Muestra de jugo de manzana

6.1.6 Nomenclatura de las cepas aisladas

De las cinco muestras que se sembraron por el método de estría en placa se logró aislar tres levaduras con las siguientes claves AMR2, JVR2 y JMR1 como se muestra en la Figura 15.

Se logró aislar tres bacterias de las cinco muestras que fueron sembradas y se les asignó la clave siguiente AMR1, JVR1 y PUR1 como se muestra en la Figura 16.

Tabla 4. Fuente de obtención de las muestras para la designación de claves.

Fuente	Clave	Tinción de Gram
Agua miel	AMR 1	Gram +
Agua miel	AMR 2	Levadura
Pulque	PUR1	Gram +
Jugo verde	JVR1	Gram +
Jugo verde	JVR2	Levadura
Juego de manzana	JMR1	Levadura

6.2 Aislamiento de levaduras

De las muestras que se trataron en el laboratorio se obtuvieron 6 cepas con características de probióticas 3 de las cuales fueron aisladas en medio de cultivo YPD que al momento de realizar la tinción de Gram presentaron características morfológicas de levaduras. Posteriormente se realizó la purificación de las cepas por medio de una siembra por estría que consiste en utilizar una asa bacteriológica y extenderla a partir de un punto en la periferia de la placa del medio solido en tres sectores. De esta manera se pudo observar macroscópicamente las cepas aisladas, observando que las tres cepas aisladas presentaban colonias circulares de un color blanco y consistencia cremosa.

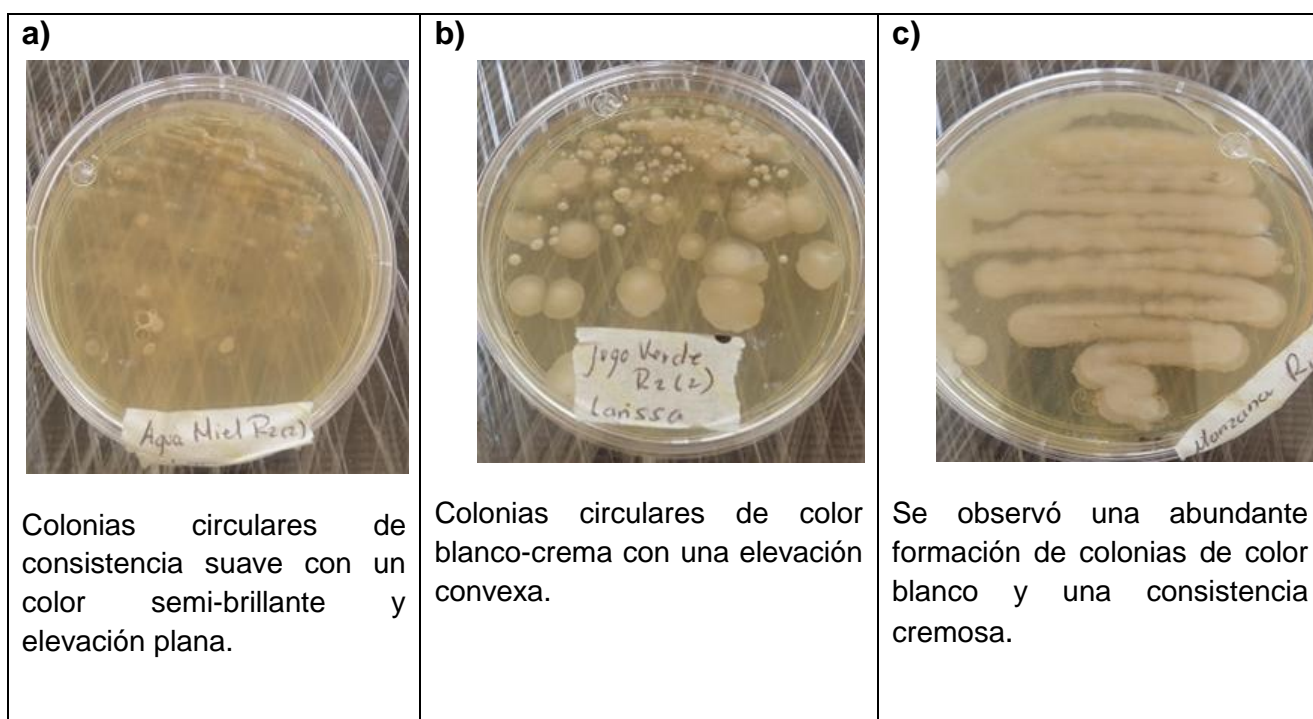


Figura 15. Aislamiento de levaduras de las bebidas fermentadas **a)** AMR2, **b)** JVR2 y **c)** JMR1

6.3 Aislamiento de bacterias

De las muestras que se trataron en el laboratorio se obtuvieron 6 cepas con características de probióticas 3 de las cuales fueron aisladas en medio de cultivo MRS que al momento de realizar la tinción de Gram presentaron características morfológicas de bacterias. Posteriormente se realizó la purificación de las cepas por medio de una siembra por estría que consiste en utilizar un asa bacteriológica y extenderla a partir de un punto en la periferia de la placa del medio solido en tres sectores. De esta manera se pudo observar macroscópicamente las cepas, observando que las tres cepas aisladas presentaban colonias de color blanco poco definidas y con apariencia rugosa.

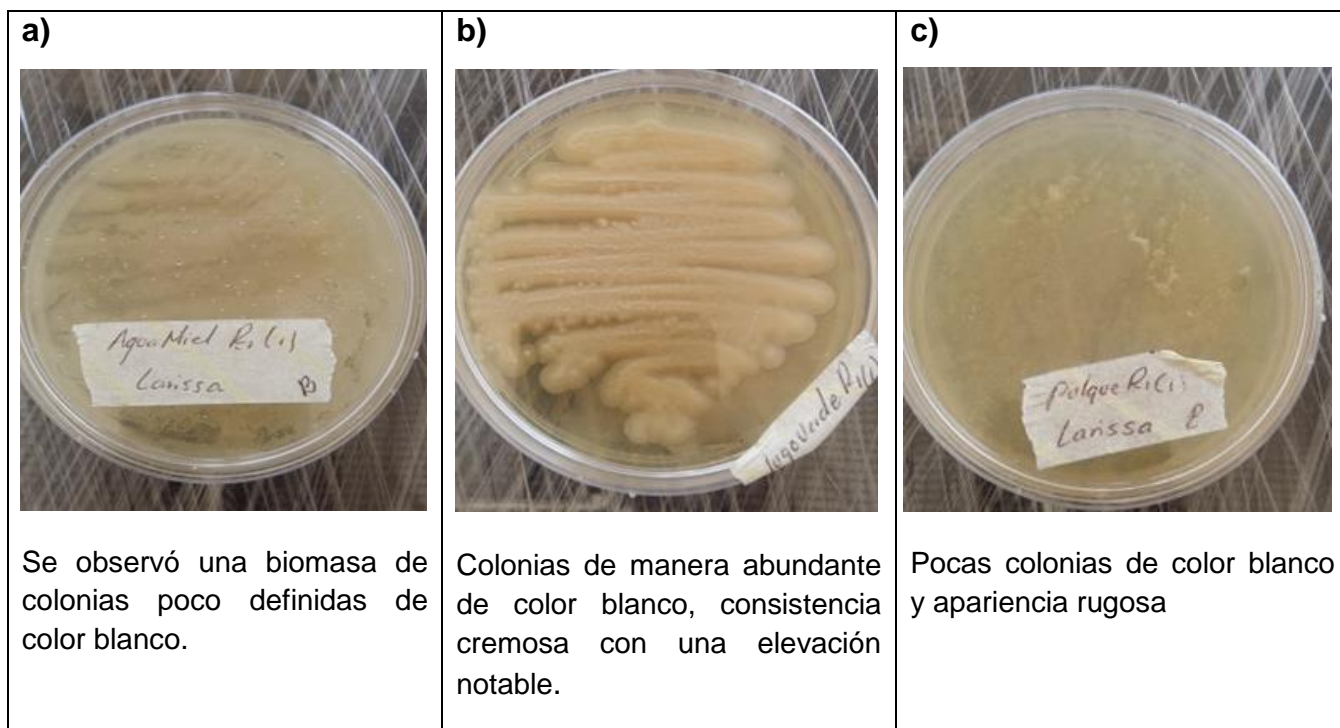


Figura 16. Aislamiento de bacterias de las bebidas fermentadas de a) AMR1, b) JVR1 y c) PUR1.

6.4 Identificación microscópica de levaduras y bacterias

Como se puede observar en la figura 17 los microorganismos aislados presentan diferente morfología la mayoría de las levaduras son ovaladas o cilíndricas que se dividen por gemación, comúnmente no desarrollan micelio, sino que permanecen en estado unicelular durante todo el ciclo de crecimiento, sin embargo algunas pueden presentar pseudomicelio debido a las condiciones en las que se les cultive (Madigan y col, 2004). Al caracterizar microscópicamente las levaduras seleccionadas JVR2, JMR1 y AMR2 se encontraron todas las formas típicas de levaduras: cilíndricas, ovaladas y redondas.

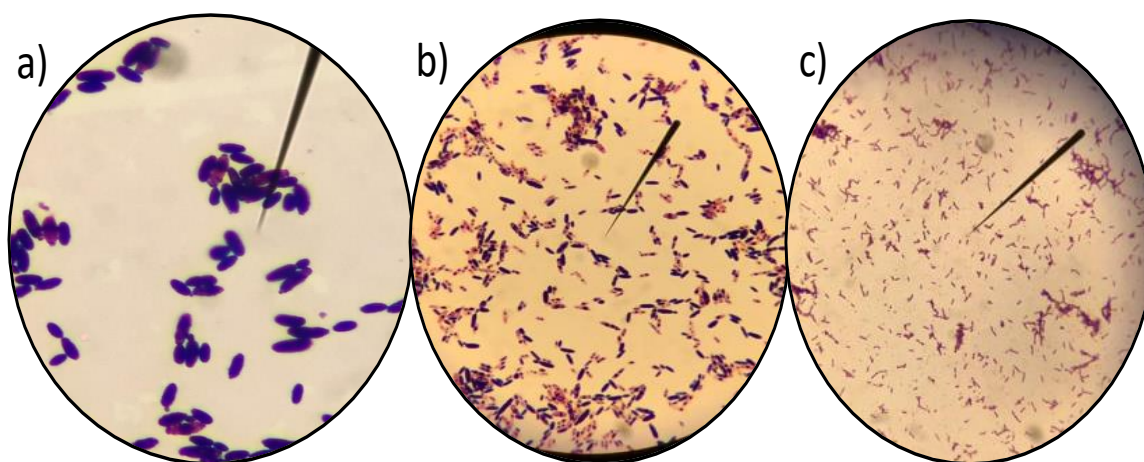


Figura 17. Caracterización microscópica de las cepas de levaduras
a) JVR2, b) JMR1 y c) AMR2

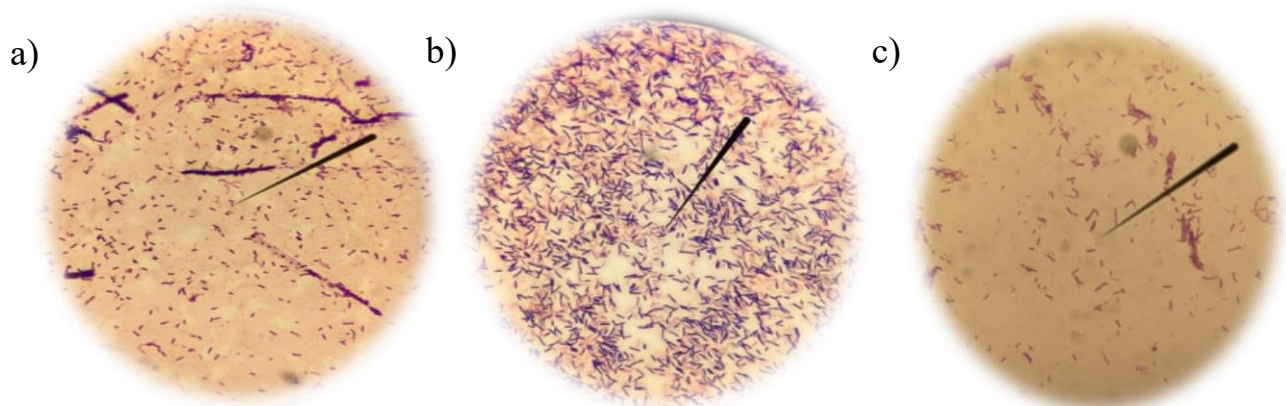


Figura 18. Caracterización microscópica de las cepas de bacterias aisladas a) JVR1, b) AMR1 y c) PUR1

Las cepas AMR1, JVR1 y PUR1 presentan formas esféricas, ovaladas, denominándose cocos, algunas en forma bastones rectos y se mantienen unidas, algunas en cadenas agrupadas en forma de filamentos pequeñas, estas resultaron positivas en la tinción de Gram por lo tanto las descripciones morfológicas indican que son bacterias con propiedades probiótica.

6.5 Caracterización de potencial probiótico

Para realizar las pruebas de caracterización probiótica se cultivaron las levaduras y bacterias en un medio líquido en YPD para levaduras y en MRS para bacterias y se incubaron a 30°C. Después de este período, los contenidos se utilizaron para ejecutar las pruebas de potencial probiótico.

6.5.1 Tolerancia a los ácidos gástricos

El efecto de la exposición a las condiciones ácidas del estómago fue determinado inoculando 1% de cultivos en PBS pH 2.0. Las muestras se recogieron en el momento de la inoculación y después de 4 h de incubación a 37°C. Se realizaron 6 diluciones y Alícuotas (0,1 ml) se colocaron en placas en agar YPD y MRS, se incubaron a 30 ° C durante 24 h. La tasa de supervivencia para la tolerancia a los ácidos gástricos tuvo mucha ventaja para la cepa JVR1 y PUR1 en cambio la cepa JMR1 demostró ser poco tolerante para esta prueba.

Tabla 5. Prueba a la tolerancia de los ácidos gástricos.

TOLERANCIA A LOS ÁCIDOS GÁSTRICOS				
JVR2	+	+	+	
JMR1	+			
AMR1	+	+		
JVR1	+	+	+	+
AMR2	+	+		
PUR1	+	+	+	+

6.5.2 Prueba de tolerancia a la pepsina

Los cultivos estandarizados se expusieron a una solución de PBS con pH 2.0 y 3 g / L pepsina incubada a 37 ° C durante 4 h. Se realizaron 6 diluciones y alícuotas (0.1 mL) se colocaron en YPD y MRS inmediatamente después de la inoculación y se incubó a 30°C durante 24 h. En esta prueba se presentó un índice mayor de tolerancia en la mayoría de las cepas, AMR1 fue la que presento mayor tolerancia mientras que AMR2 siendo una levadura presento menor tolerancia a esta prueba.

Tabla 6. Prueba de tolerancia a la pepsina

TOLERANCIA A LA PEPSINA				
JVR2	+	+	+	
JMR1	+	+	+	
AMR1	+	+	+	+
JVR1	+	+	+	
AMR2	+	+		
PUR1	+	+	+	

6.5.3 Prueba a la tolerancia de sales biliares

El efecto de las sales biliares sobre la viabilidad de las levaduras y bacterias se evaluó mediante la inoculación del 1% de cultivos estandarizados en PBS con 1% de sales biliares, pH 7.0. Los tubos inoculados se incubaron a 37 °C durante 4 h; se realizaron 6 diluciones y alícuotas de 1ml se colocaron en placas YPD y MRS en el momento de la inoculación y se incubó a 30 °C durante 24 h. En esta prueba las bacterias tuvieron mayor resistencia, a pesar de que se realizaron 6 diluciones en las cepas AMR1, JVR1 y PUR1 no se pudo realizar un conteo de las colonias ya que se observó mucha población de los microorganismos, en cambio las cepas JMR1 y AMR2 de levaduras resultaron menos resistentes a esta prueba excepto la cepa JVR2.

Tabla 7. Prueba de la tolerancia a las sales biliares.

TOLERANCIA A LAS SALES BILIARES				
JVR2	+	+	+	
JMR1	+			
AMR1	+	+	+	
JVR1	+	+	+	
AMR2	+			
PUR1	+	+	+	

Cada cepa bacteriana debe tener algunas propiedades especiales para ser considerado como un potencial probiótico. De acuerdo con las pautas sugeridas por la FAO / OMS, cada posible probiótico la cepa debe estar correctamente identificada, seguida de varias pruebas in vitro para investigar sus propiedades funcionales. Eso es porque las propiedades probióticas son específicas de la cepa, la condición y la dosis, es poco probable que se encuentre dos cepas individuales pertenecientes a una especie que tengan exactamente las mismas características probióticas. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que para algunas especies bien estudiadas, de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* probablemente imparte algunas propiedades probióticas generales, las afirmaciones no específicas de la cepa podrían considerarse.

Aparte de eso, solo cepas bien definidas deben usarse en productos probióticos, muchos criterios específicos de la cepa se han diseñado como ensayos in vitro para la selección preliminar de cepas probióticas, que debe ser seguido por estudios en vivo de las cepas seleccionadas con potencial probiótico en huéspedes sanos.

En el caso de la identificación, la FAO / OMS sugirió que la metodología más actual y válida y una combinación de métodos fenotípicos y genotípicos deben usarse para especiación de cepas probióticas. Sin embargo, el uso de los métodos de identificación molecular es obligatorio porque las identificaciones fenotípicas por sí solas no son lo suficientemente confiables.

En el caso de los ensayos in vitro, la FAO / OMS ha proporcionado una lista de las pruebas in vitro comúnmente utilizadas para la detección y caracterización posibles de cepas probióticas, incluidas las siguientes:

- Resistencia a la acidez gástrica
- Resistencia a las sales biliares
- Adherencia al moco y / o células epiteliales humanas y líneas celulares
- Actividad antimicrobiana y antagonista contra bacterias potencialmente patógenas.

Además de estos criterios de selección principales que se han considerado relevantes para cualquier posible microorganismo probiótico, un probiótico requerido para un efecto específico puede necesitar propiedades adicionales para ese uso específico. Por ejemplo, una cepa probiotica potencial puede analizarse específicamente para determinar su colesterol capacidad de reducción, actividad antioxidante o citotóxico efecto contra las células cancerosas. En base a estos criterios las cepas aisladas de bacterias y levaduras de bebidas fermentadas tradicionalmente presentan propiedades de potencial probiotico dado que resultaron positivamente a las pruebas in vitro de tolerancia a el paso de los ácidos gástricos, a la pepsina y a las sales biliares.

7. CONCLUSIONES

- Se logró obtener las muestras de aguamiel, pulque, tepache, jugo verde y jugo de manzana.
- Se logró aislar tres cepas de levaduras JVR2, JMR1, AMR2 y tres cepas de bacterias AMR1, JVR1 y PUR1 de las seis muestras que se sembraron.
- La tinción de Gram permitió la identificación microscópica de las levaduras y bacterias basándose en los criterios morfológicos según la literatura
- En base a los criterios en la metodología actual utilizada para identificación y caracterización de potencial probiótico las cepas aisladas de bacterias y levaduras de bebidas fermentadas tradicionalmente presentaron resultados positivos a las pruebas de tolerancia a el paso de los ácidos gástricos, a la pepsina y a las sales biliares, tomando en cuenta que las cepas AMR1, JVR1 y PUR1 de bacterias resultaron ser más resistentes que las cepas de levaduras.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Dante, L. Sedrac, D. Rodriguez, D. Puente, L. García, F. Salgado, R.. (18 Junio 2012.). Análisis bromatológico y aislamiento de microorganismos con potencial probiótico del pulque. Facultad de Ciencia y Tecnología, 4, 115-122.
- Escalante, A. Giles, M. Hernández, G. Córdova, M. López, A. Bolívar, F.(31 de mayo de 2008). Análisis de la comunidad bacteriana durante la fermentación del pulque, una bebida alcohólica tradicional mexicana, utilizando un enfoque polifásico. Revista Internacional de Microbiología de Alimentos, 124, 126-134.
- Taranto, P. Valdez, M. Font, G. (1 Mayo 2005). Alimentos funcionales probióticos. Química Viva, 4, 26-34.
- Coban, D. Kamaci, O. Saka, S. Firat, K. (1 de agosto de 2008). Lactobacillus spp. bacterias como probióticos en larvas de dorada (*Sparus aurata*, L.): efectos sobre el rendimiento del crecimiento y las actividades de las enzimas digestivas. Acuicultura, 280, 140-14.
- Domínguez, M. (Mayo del 2006). Aislar, identificar y clasificar las levaduras de la fermentación alcohólica del sotol (*DASYLIRION SSP.*). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 18-29.
- Echeverría, L. (Abril del 2008). Propiedades funcionales de los microorganismos del kéfir. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 14-45.

- García, D. (2010). Aislamiento de microorganismos probióticos a partir de bebidas fermentadas: Aguamiel, pozol y sotol. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 19-49.
- Bustos, Y. (Julio 2017). Sendejo, Bebida fermentada en San Isidro Labrador, municipio de Villa Victoria del Estado de México. Un estudio antropológico sobre la tradición alimentaria. Facultad de Antropología, 33-79.
- Aguavil, J. (2012). Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a *Lactobacillus acidophilus* y *bacillus subtilis* sobre el sistema gastrointestinal en pollos Broiler Ross-308 en Santo Domingo de los Tsáchilas. Escuela politécnica del ejército, 17-28.
- Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S: Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 11:506–514, 2014
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization: “Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.” London, Ontario, Canada: Author, 2002.
- Morelli L: In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. Curr Issues Intestinal Microbiol 1:59–67, 2000.
- Morelli L, Capurso L: FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. Journal of clinical gastroenterology 46:S1–S2, 2012.

- Pereira DIA, Gibson GR: Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl Environ Microbio* 68:4689–4693, 2002.
- Lin MY, Chang FJ: Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digest Dis Sci* 45:1617–1622, 2000
- Thirabunyanon M, Boonprasom P, Niamsup P: Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol Lett* 31:571–576, 2009.
- Lin MY, Chang FJ: Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digest Dis Sci* 45:1617–1622, 2000.