



Bebida fermentada elaborada con bacterias ácido lácticas aisladas del pozol tradicional chiapaneco

Fermented drink elaborated with lactic acid bacteria isolated from chiapaneco traditional pozol

Arturo Velázquez-López², David Covatzin-Jirón¹, María Dolores Toledo-Meza¹, Gilber Vela-Gutiérrez^{1*}

RESUMEN

El lactosuero es uno de los principales residuos de la industria quesera, toda vez que contiene nutrientes de alta calidad (lactosa 4.5 %, proteínas solubles 0.7 % y compuestos bioactivos), lo que lo hace una buena fuente para la fermentación por medio de bacterias ácido lácticas (BAL). En Chiapas, existen bebidas fermentadas típicas, una de ellas es el pozol, la cual contiene gran cantidad de microorganismos benéficos. El objetivo de esta investigación fue establecer la capacidad de fermentación de bacterias ácido lácticas, provenientes del pozol chiapaneco fermentado, para elaborar una bebida a base de lactosuero, adicionada con mermelada de sabor a piña-coco, y evaluar su potencial probiótico y su aceptación organoléptica. Se aislaron e identificaron BAL provenientes de pozol, y se seleccionaron las de mayor capacidad fermentativa y potencial probiótico. La evaluación organoléptica se realizó con 20 jueces no entrenados, con edades de entre 14 y 20 años. Las pruebas bioquímicas y el potencial probiótico demostraron que el pozol fermentado contenía bacterias benéficas para el consumo humano, por lo que se consideró una bebida probiótica. La bebida fermentada obtenida con cepa de pozol presentó el mayor nivel de agrado ($P < 0.05$) y 2×10^7 UFC/mL. Los resultados de este estudio abren la posibilidad de la utilización del lactosuero para la elaboración de bebidas fermentadas ricas en probióticos y con buena aceptación organoléptica.

PALABRAS CLAVE: suero lácteo, probióticos, fermentación, bebida.

ABSTRACT

One of the main residues in Chiapas comes from the cheese industry, whey, which contains high quality nutrients (lactose 4.5 %, soluble proteins 0.7 % and bioactive peptides). By containing optimum amounts of sugars, it is a good source for fermentation by means of lactic acid bacteria (LAB). In Chiapas, there are typical fermented beverages, one of which is pozol, which contains many beneficial microorganisms. Therefore, the following research was carried out, which consisted of isolating, identifying and evaluating the fermentation capacity of lactic acid bacteria, as well as the probiotic potential, from the fermented chiapaneco pozol, to make a whey-based beverage added with jam of pineapple-coconut flavor. Firstly, BAL were isolated, and identified through basic biochemical tests. Those with the greatest fermentative capacity and probiotic potential were then selected. The level of enjoyment was evaluated by a group of 20 untrained judges (14 and 20 years). The biochemical tests and probiotic potential showed that the fermented pozol contains bacteria beneficial to human consumption: therefore, it was considered probiotic drink. The fermented beverage with the pozol strain showed the highest level of liking ($P < 0.05$) and 2×10^7 CFU/mL. The results of this study open up the possibility for the use of whey in the preparation of fermented beverages with probiotics and good organoleptic acceptance.

KEYWORDS: whey, probiotics, fermentation, beverage.

*Correspondencia: gilber.vela@unicach.mx/ Fecha de recepción: 21 de octubre de 2016/ Fecha de aceptación: 22 de septiembre de 2017

¹Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos, Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Productos Funcionales, Ciudad Universitaria, Libramiento Norte Poniente núm. 1150, col. Lajas Maciel, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México, C.P. 29000. ²Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz.

INTRODUCCIÓN

En México, las bebidas fermentadas han sido de gran importancia en la vida diaria y ceremonial de numerosos grupos indígenas, desde la época prehispánica hasta la actual. Los lacandones utilizan el pozol no solo en los rituales, sino también mezclado con miel para bajar la fiebre y controlar la diarrea (Vela-Gutiérrez y col., 2012). El pozol es una bebida de maíz que se consume en el sureste de México y en algunos países de Centroamérica. Se puede consumir recién elaborado o fermentado. Tradicionalmente se consume solo (pozol blanco), aunque también es común agregarle cacao o coco (Jiménez y col., 2010).

El pozol, al ser una bebida fermentada no alcohólica, contiene gran cantidad de microorganismos benéficos, como algunas bacterias lácticas, las cuales se desarrollan durante la fermentación. Estas son las responsables de la acidificación de la masa, por la producción de una mezcla de ácidos; y además, imparten un sabor fresco y agradable al producto. También contienen bacterias como *Achromobacter pozolis* o *Agrobacterium azotophilum*, que fijan el nitrógeno atmosférico y que podrían ser las responsables del alto contenido de nitrógeno del pozol (Flores, 2008).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) están presentes en la alimentación del hombre desde hace mucho tiempo y es posible encontrarlas en diferentes productos. Desde años atrás, los microorganismos probióticos se han reconocido como microorganismos benéficos, evitando el desarrollo de microorganismos patógenos (Martin-del-Campo y col., 2008). Entre los efectos del consumo de probióticos, sobre la salud humana, se encuentran la disminución de la intensidad y duración de diarreas virales, asociadas a antibióticos o por hospitalización; además, ayudan a la síntesis y absorción de nutrimentos (vitaminas), inhiben la actividad de enzimas implicadas en la generación de carcinógenos, participan activamente en la movilidad intestinal; esto último se atribuye a la producción de ácido láctico, que estimula los movimientos peristálticos del in-

testino, contribuyendo así a la excreción adecuada, evitando con ello el estreñimiento, ya que se retienen menos tiempo las heces y se contribuye a evitar la formación de sustancias cancerígenas en el intestino grueso (Parra, 2010).

Del total de leche producida en el estado de Chiapas (423.6 millones de L), casi el 39 % se utiliza en la elaboración de quesos (aproximadamente 165.2 millones de L), desechándose alrededor de 147.03 millones de L de lactosuero con alto valor nutricional a los ríos, consecuentemente, causando graves problemas ambientales (Vela-Gutiérrez y col., 2012); considerando que el lactosuero contiene aproximadamente 1 % de proteínas, anualmente se desperdician alrededor de 1.47 millones de kg de proteína de buena calidad en el estado. El principal componente del suero de leche es la lactosa, un azúcar fácilmente asimilable por las BAL. Algunas de las ventajas nutricionales del consumo de suero lácteo, son su alto contenido de aminoácidos ramificados y potenciadores del sistema inmune, que escapan intactos al proceso de digestión, por lo tanto, son capaces de retener sus valores específicos hasta ser absorbidos por la pared intestinal larga (Vela-Gutiérrez y col., 2012). Las propiedades funcionales del lactosuero son brindadas por dos principales proteínas, α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. La α -lactoalbúmina está formada por una sola cadena polipeptídica de 123 aminoácidos, con peso molecular de unos 14 200 Da y tamaño de partículas entre 1 μ m a 2 μ m (Callejas y col., 2012); de ellas, destaca su solubilidad, si no se calientan; sus propiedades emulsionantes, espumantes y su capacidad gelificante.

El objetivo de la presente investigación fue determinar la capacidad fermentativa de bacterias ácido lácticas, provenientes de pozol fermentado chiapaneco, así como el potencial probiótico, para su uso en la elaboración de una bebida fermentada a base de lactosuero, adicionada con mermelada de sabor a piña-coco; además de evaluar el nivel de agrado de esta bebida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento, selección y purificación de BAL Muestras

Con el fin de aislar cepas con potencial probiótico, se tomaron muestras de pozol fermentado provenientes de dos zonas del estado de Chiapas, donde aún existen poblaciones indígenas que pertenecen a la cultura zoque (Tuxtla Gutiérrez y Venustiano Carranza). Las cepas se adquirieron en los mercados locales de las ciudades de Tuxtla Gutiérrez (A, C, E y G) y Venustiano Carranza (B, D, F y H), las cuales, se transportaron en bolsas de plástico estériles y refrigeradas, al Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Productos Funcionales (LIDPF), de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas; las muestras se procesaron, tal y como se describe a continuación. Además, se utilizó un cultivo iniciador *Streptococcus thermophilus* (ST), donado por la empresa PRADEL®, y *Lactobacillus casei* (YK), aislado de un producto comercial.

Aislamiento y selección de BAL

Las muestras de pozol se bolearon manualmente en condiciones asépticas. Cada bola, formó una unidad experimental, 8 en total; se envolvieron en hojas de plátano (previamente desinfectadas), y se colocaron dentro de bolsas de plástico; una unidad de cada tipo se incubó para su fermentación en condiciones diferentes (A y B: pozol blanco, se almacenaron a temperatura ambiente; C y D: pozol blanco, a temperatura de refrigeración; E y F: pozol con cacao a temperatura ambiente; G y H: pozol con cacao, a temperatura de refrigeración), durante 5 d, para su posible fermentación. La fermentación a 4 °C se utilizó como control negativo. Se tomaron 10 g del interior de cada unidad experimental y se mezclaron con 90 mL de agua destilada desionizada estéril (dilución 1:10), y se hicieron diluciones seriadas (1:100, 1:1 000, 1:10 000 y 1:100 000); se extrajo 1 mL de cada dilución y se inoculó por vaciado en placa [15 mL a 20 mL de Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) DIFCO®], de acuerdo con la NOM-092-SSA1-1994. Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C durante 24 h; el ensayo se rea-

lizó por triplicado y los resultados se expresaron como Log UFC/g. De cada placa de cultivo que contenían entre 30 UFC a 300 UFC, se seleccionaron las que morfológicamente correspondían a BAL, y se subcultivaron mediante estría cruzada en placas con agar MRS, incubándose después a 37 °C por 48 h. Se realizaron cuatro subcultivos bajo las mismas condiciones, para purificar y seleccionar las cepas. De cada cultivo, se tomaron muestras a las que se les realizó prueba de tinción de Gram, prueba de catalasa y oxidasa para confirmar que correspondían a BAL.

Evaluación de las propiedades probióticas *in vitro* (potencial probiótico)

Tolerancia a cambios de pH

Se prepararon placas con agar MRS, ajustando el pH del medio de cultivo a 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0; se cuantificó la supervivencia y resistencia al cambio de pH de las bacterias posterior a su incubación a 37 °C durante 24 h, se compararon con microorganismos viables del inóculo; el porcentaje de resistencia se calculó de acuerdo a la ecuación publicada de Khagwai y col. (2014):

$$\%R_{pH} = \frac{(UFC / mL)_{MRS\ pH} * 100}{(UFC / mL)_{MRS\ (Inóculo)}} \dots\dots Ec.1$$

Las cepas que resistieron como mínimo el 50 % al cambio de pH (A, B, E y F), fueron a las que se les realizó el resto de las pruebas, y que se describen en seguida, sin embargo, se utilizaron las demás cepas como control negativo (C, D, G y H) a las pruebas realizadas. Las cepas conocidas (ST y YK) (Tabla 1) no se utilizaron en estas pruebas, debido a que ya fueron identificadas previamente (Gutiérrez y col., 2007; Arenas y col., 2012).

Tolerancia a sales biliares

Las cepas se inocularon en agar MRS, adicionado con sales biliares (DIBICO®, México) en concentraciones de 0.05 %, 0.1 %, 0.15 % y 0.3 % (p/v); el pH del medio se ajustó a 7.0. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h, al cabo de este tiempo, se efectuó el conteo de células viables mediante UFC/mL, considerando

■ **Tabla 1. Parámetros cinéticos obtenidos en fermentación de leche y lactosuero.**
Table 1. Kinetic parameters obtained in milk and whey fermentation.

Cepa		Temperatura	Leche		Lactosuero	
			Velocidad de crecimiento μ_{max}/h	Tiempo de duplicación (h)	Velocidad de crecimiento μ_{max}/h	Tiempo de duplicación (h)
A	Pozol blanco	Cepas aisladas a temperatura ambiente	0.052	13.13	0.059	11.65
B			0.044	15.61	0.054	12.77
C		Cepas aisladas en refrigeración	0.031	22.87	---	---
D			0.057	12.13	---	---
E	Pozol con cacao	Cepas aisladas a temperatura ambiente	0.046	14.93	0.069	9.97
F			0.058	11.90	0.036	18.89
G		Cepas aisladas en refrigeración	0.023	29.74	---	---
H			0.081	18.53	---	---

de esa forma la sobrevivencia microbiana y su resistencia a sales biliares (Rubio y col., 2008; Soliman y col., 2015).

Tolerancia a cambios de temperatura

Las cepas aisladas se inocularon en cajas petri con agar MRS, a un pH 6, y se incubaron a diferentes temperaturas (28 °C, 37 °C y 43 °C) durante 24 h; pasado este tiempo, se efectuó el conteo de células viables mediante UFC/mL, considerando de esa forma la sobrevivencia microbiana y su resistencia para crecer a distintas temperaturas (Rubio y col., 2008; Cuento y col., 2012).

Tolerancia a altas concentraciones de NaCl

Las cepas aisladas se inocularon en tres medios distintos de cultivo líquidos (MRS, malta y nutritivo), con un pH de 6, adicionándoles diferentes concentraciones de NaCl (2 %, 4 %, 7 % y 10 %), y se incubaron a 37 °C durante 24 h; transcurrido el tiempo, se determinó la viabilidad y el crecimiento microbiano a altas concentraciones de NaCl, midiendo la densidad óptica (DO) del caldo de cultivo de 0 a 24 h a 600 nm.

Prueba de antagonismo

Se inoculó *Salmonella* sp. mediante estría superficial en agar Müeller-Hinton; se colocaron

tres discos de 2 cm de diámetro impregnados con el cultivo líquido de las bacterias aisladas; se preincubaron a 15 °C durante 30 min; luego a 37 °C por 48 h. La acción antagónica se evidenció por la presencia de halos de inhibición y crecimiento alrededor de los discos (Pérez y col., 2015).

Cinética microbiana en leche y lactosuero

Previo al desarrollo de la cinética microbiana, el suero lácteo fue pasteurizado. Después, se inocularon individualmente las cepas aisladas que presentaron potencial probiótico adecuado (A y F), así como las cepas controles [*Lactobacillus casei* Shirota (YK) y *Streptococcus thermophilus* (ST) - *Lactobacillus bulgaris* (LB)] en matraces que contenían 450 mL de leche pasteurizada (PRADEL®) o suero lácteo; el inóculo se transfirió con un asa calibrada estéril (de 3 a 4 asadas por matraz, aproximadamente 1 % de inóculo). Para el cálculo de los parámetros cinéticos se linealizó la fase exponencial, seguido del cálculo de la ecuación de la recta.

El análisis se realizó cada 2 h, midiendo los parámetros que se describen a continuación:

Determinación de peso seco

Se tomaron 5 mL de cada muestra y se colocaron en tubos de ensayos previamente pesados

y calibrados; se centrifugaron a 4 000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se secó en una estufa (TER-LAB, TE-H450, Nogales, Jalisco) a 105 °C durante 3 h hasta obtener el peso constante. Se registró el peso de cada tubo utilizando una balanza analítica (TE601, Sartorius®, EUA) y se cuantificó la biomasa en g/mL.

Determinación de pH

Se determinó cada 2 h durante la fermentación de acuerdo al método publicado por Pérez y col. (2015), utilizando un potenciómetro (pH 209, HANNA® instruments, Rumania).

Determinación de acidez titulable

Se determinó cada 2 h; se tomaron 10 mL de leche o suero lácteo y se colocaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL; se les adicionó 1 mL de solución fenolftaleína (9 gotas aproximadamente) y se homogeneizó. Se tituló con NaOH 0.1 N. La acidez (°D), se obtuvo a través de la cantidad de hidróxido de sodio gastado (mL) para neutralizar la leche o suero lácteo (1 mL de hidróxido de sodio equivale a 10 ° D).

Elaboración de la bebida fermentada

Una vez aisladas y seleccionadas las cepas que resistieron las pruebas anteriores (A y F), se prosiguió a desarrollar la bebida fermentada. Primero, se inocularon tres matraces con 150 mL, conteniendo suero de leche previamente pasteurizada, con las bacterias *Streptococcus thermophilus-Lactobacillus bulgaris* (cultivo iniciador). Se incubaron a 35 ± 1 °C durante las primeras 24 h. Entonces, se inoculó en cada matraz las cepas aisladas de pozol blanco (A), pozol con cacao (F) y otro con la cepa *Lactobacillus casei* (YK) (control). Todos los tratamientos se incubaron bajo las mismas condiciones del cultivo iniciador. Previo a la fermentación, se seleccionaron las cepas con mayor velocidad de producción de ácido láctico y al tiempo de duplicación. Al término del proceso se determinaron, el pH y el porcentaje de ácido láctico, bajo los métodos descritos anteriormente, así como la biomasa (UFC/mL) en la bebida, empleando la técnica de dilución y vaciado en placa, mediante el

procedimiento establecido en la NOM-092-SSA1-1994, que indica como mínimo una concentración de bacteria probiótica de 1X10⁶ UFC/mL o g. El crecimiento de cada cepa se corroboró por su morfología común, además de observarlas por medio de microscopía. A la bebida fermentada, se le adicionó mermelada de piña con coco (63 °Brix); la mezcla se efectuó en una relación de 70:30 (bebida fermentada: mermelada).

Análisis fisicoquímico

El análisis fisicoquímico (proteína cruda, sólidos totales, lactosa, densidad, pH, acidez y cantidad de grasa) del lactosuero, así como de la bebida elaborada se efectuó de acuerdo a la NOM-155-SCFI-2012. La cantidad de grasa se determinó de acuerdo a lo publicado por Durán (1999), tal y como se describe en la ecuación 2.

$$\%SST = (0.25 * L) + 1.22 * G + 0.55 \dots \dots \dots Ec. 2$$

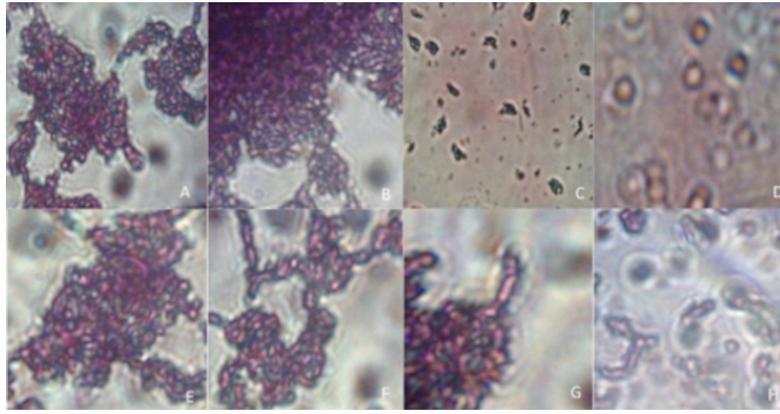
Donde, %SST= % de sólidos totales; L: densidad obtenida con el lactodensímetro; G: porcentaje de grasa

Análisis microbiológicos

A la bebida obtenida se le determinó coliformes totales de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994, mohos y levaduras mediante la NOM-111-SSA1-1994, bacterias coliformes fecales conforme a la técnica del número más probable de acuerdo a la NOM-112-SSA1-1994; y la presencia de *Staphylococcus aureus* con el método marcado en la NOM-115-SSA1-1994.

Análisis sensorial

A cada una de las tres bebidas formuladas (A, F y YK), se les determinó el nivel de agrado o preferencia, evaluándose sensorialmente con un grupo de 20 jueces no entrenados. Los atributos analizados fueron el sabor, aroma y textura. Para esto, se mostraron tres niveles de agrado: “Me agrada, no me agrada ni me desagrada, me desagrada”. La prueba se desarrolló de acuerdo a la metodología publicada por Vela-Gutiérrez y col. (2012).



■ Figura 1. Tinción de Gram de las cepas aisladas. A y B: pozol blanco, almacenado a temperatura ambiente; C y D: Pozol blanco, almacenado a temperatura de refrigeración; E y F: Pozol con cacao, almacenado a temperatura ambiente; G y H: pozol con cacao, almacenado en refrigeración. Tuxtla Gutiérrez (A, C, E y G) y Venustiano Carranza (B, D, F y H).

Figure 1. Tinción de Gram of isolate strain. A and B: white pozol stored to room temperature; C and D: white pozol stored to temperature of refrigeration; E and F: pozol with cacao stored to room temperature; G and H: pozol with cacao stored in refrigeration. Tuxtla Gutiérrez (A, C, E y G) and Venustiano Carranza (B, D, F y H).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento, selección y purificación de BAL

Aislamiento y selección

De las ocho muestras analizadas, solo dos de las cepas aisladas del pozol blanco (A y B) y pozol con cacao (E y F), presentaron características típicas de BAL [macromorfología, tinción Gram (+), catalasa y oxidasa negativa]. Los resultados de las pruebas de tinción de Gram se muestran en la Figura 1, de las cuales, las cepas A, B, E, F resultaron Gram +, presentando también catalasa + y oxidasa +, mientras que las cepas aisladas de la masa fermentada a 4 °C presentaron características no deseadas. Resultados similares fueron reportados por Olagnero y col. (2011), en un estudio de capacidad probiótica de cepas del género *Lactobacillus*, extraídas del tracto intestinal de animales de granja, en el que se seleccionaron e identificaron cuatro cepas de *Lactobacillus* con potencial para ser utilizadas como aditivos probióticos en la alimentación animal. En las placas con agar MRS, las cepas BAL formaron colonias cuyo tamaño fue alrededor de 1 mm a 2 mm, de color blanco cremoso, forma redonda, puntiforme, bordes enteros, consistencia húmeda; características pro-

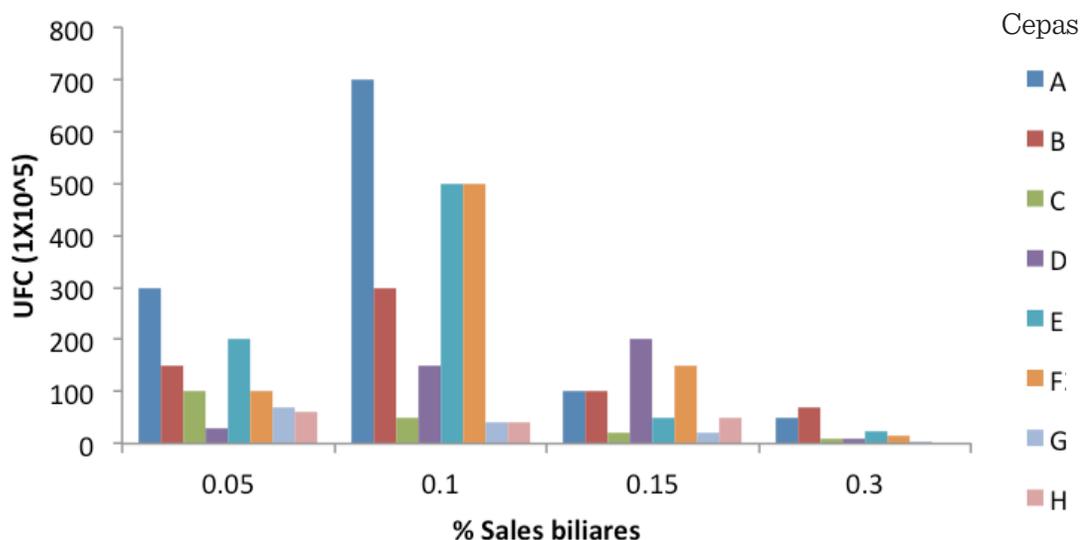
pias de este grupo de bacterias de acuerdo a lo reportado por Sánchez y col. (2016).

Pruebas de probióticos *in vitro* (potencial probiótico)

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), establecieron criterios de selección para microorganismos en el “Informe del grupo de trabajo sobre la redacción de directrices para la evaluación de los probióticos en los alimentos” (FAO, 2015). Uno de los criterios de selección *in vitro* es la resistencia de la acidez estomacal y las sales biliares del intestino delgado (Santillan-Urquiza y col., 2014), por lo que los primeros ensayos realizados en este estudio se fincaron en el desarrollo de estas pruebas, para seleccionar las cepas con potencial probiótico; seguidamente, se eligieron las cepas tolerantes de estas condiciones y se ensayaron las pruebas de antagonismo contra *Salmonella* spp.

Tolerancia a cambios de pH

Las cepas aisladas de muestras de pozol blanco y pozol con cacao (A, B, E y F), almacenadas a temperatura ambiente, resistieron los



■ Figura 2. Tolerancia a sales biliares.
Figure 2. Tolerance to biliary salts.

cambios de pH durante 24 h, mostrando mayor crecimiento a valores cercanos a 4.0, que el resto de las bacterias aisladas, con un crecimiento del 55 %, comparadas con las que se mantuvieron en refrigeración, que alcanzaron un 15 % máximo al mismo pH, evidenciándose de esa manera su supervivencia en condiciones ácidas; características similares fueron obtenidas por Lara y Burgos (2012), quienes indicaron que aquellas bacterias con potencial probiótico deben de sobrevivir y resistir a cambios de pH (neutro a ácido); generalmente los probióticos que resisten pH muy ácido (<4) pertenecen a la familia de *Lactobacillus* (Cueto y col., 2010).

Tolerancia de sales biliares

En la Figura 2, se puede observar que las cepas seleccionadas son capaces de tolerar las sales biliares en un intervalo de 0.05 % a 0.3 % (p/v). De acuerdo con Ruiz y col. (2016) aquellas bacterias que sobreviven a ciertas concentraciones de sales biliares tienen actividad metabólica que permitirá la colonización del intestino, ya que entran en contacto directo con sales biliares en el intestino delgado.

Tolerancia a cambios de temperatura

La mayoría de las cepas seleccionadas (A, B, C, D, F, G y H) crecieron adecuadamente a

las temperaturas de 28 °C y 37 °C; a 43 °C, el crecimiento fue bajo. La temperatura de 37 °C fue la que mejor favoreció el crecimiento de las bacterias. Sin embargo, las cepas provenientes de pozol blanco mostraron un mejor desarrollo y crecimiento a 43 °C; la adaptación y crecimiento de las bacterias a estos intervalos de temperatura, indica la posibilidad de aplicación industrial (Tripathi y Giri, 2014). Resultados similares fueron obtenidos por Lara y Burgos (2012), donde prevalecen los *Lactobacillus*. Son considerados probióticos las bacterias que resisten cambios drásticos de temperatura debido a que durante su transcurso dentro del tracto gastrointestinal existen cambios de temperatura, lo cual permite que las bacterias se propaguen en el intestino delgado (duodeno principalmente). Las bacterias probióticas deben resistir los cambios de temperatura, debido a que, en el transcurso de la vía digestiva, se presentan estas condiciones, por lo que la temperatura de incubación tiene que ser cercana a la del cuerpo humano (González-Montiel y col., 2010).

Tolerancia a altas concentraciones de NaCl

Se observó bajo nivel de tolerancia a la sal (NaCl). Los medios de cultivo adicionados con 2 % y 4 % (p/v) de sal, presentaron mayor crecimiento bacteriano, de las cepas (A,

B, C, D, F, G y H), alcanzándose un máximo de 5.6×10^4 UFC/mL, mientras que en concentraciones de 7 % y 10 % el crecimiento fue limitado (1×10^3 UFC/mL) para las cepas provenientes de pozol blanco (A y B). Esta propiedad es necesaria en aquellas cepas con potencial probiótico, debido a que el jugo gástrico contiene esta sal (2 % a 4 %), la cual es la primera barrera fisiológica del tracto digestivo, que también corresponde a valores bajos de pH, junto con la acción de enzimas proteolíticas (Sánchez y col., 2015).

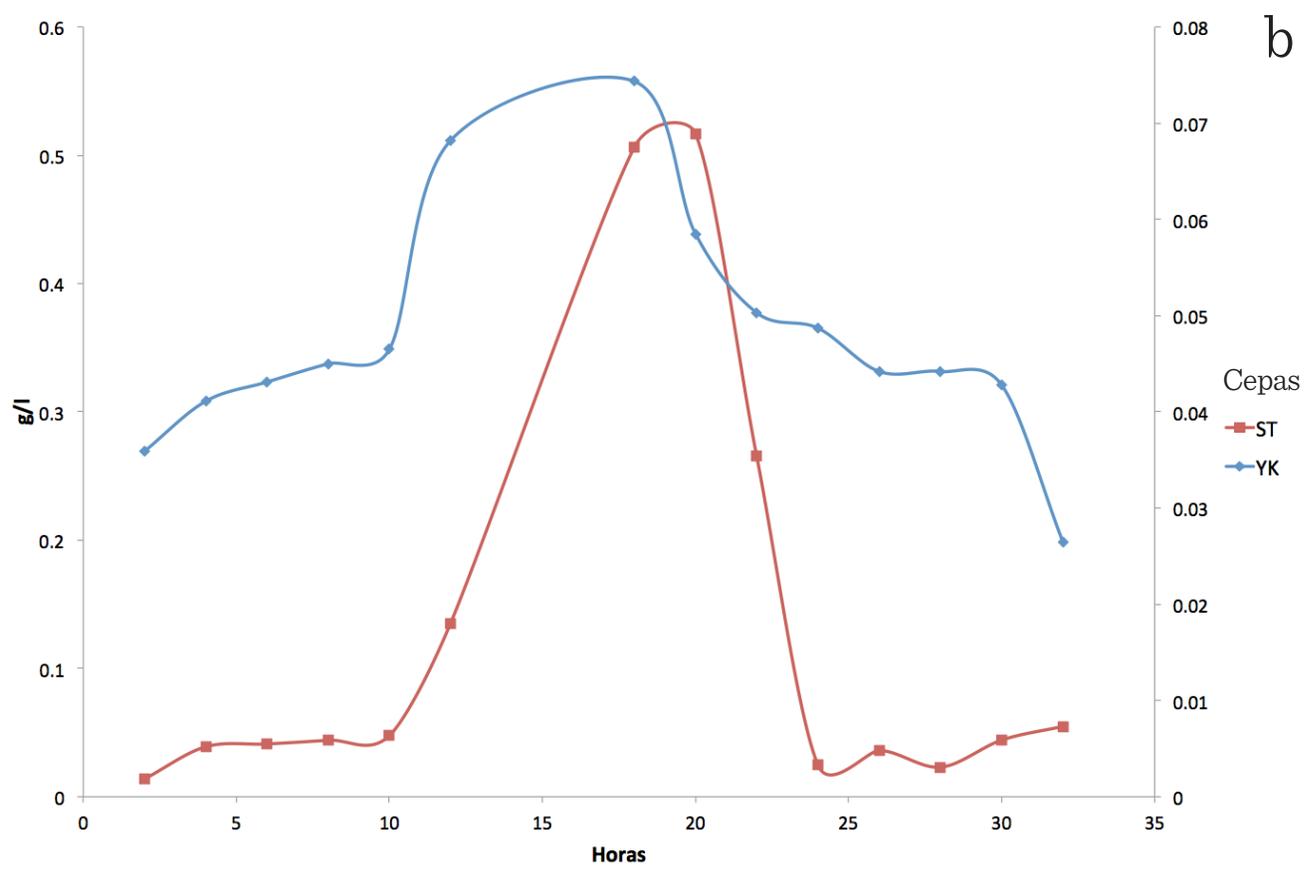
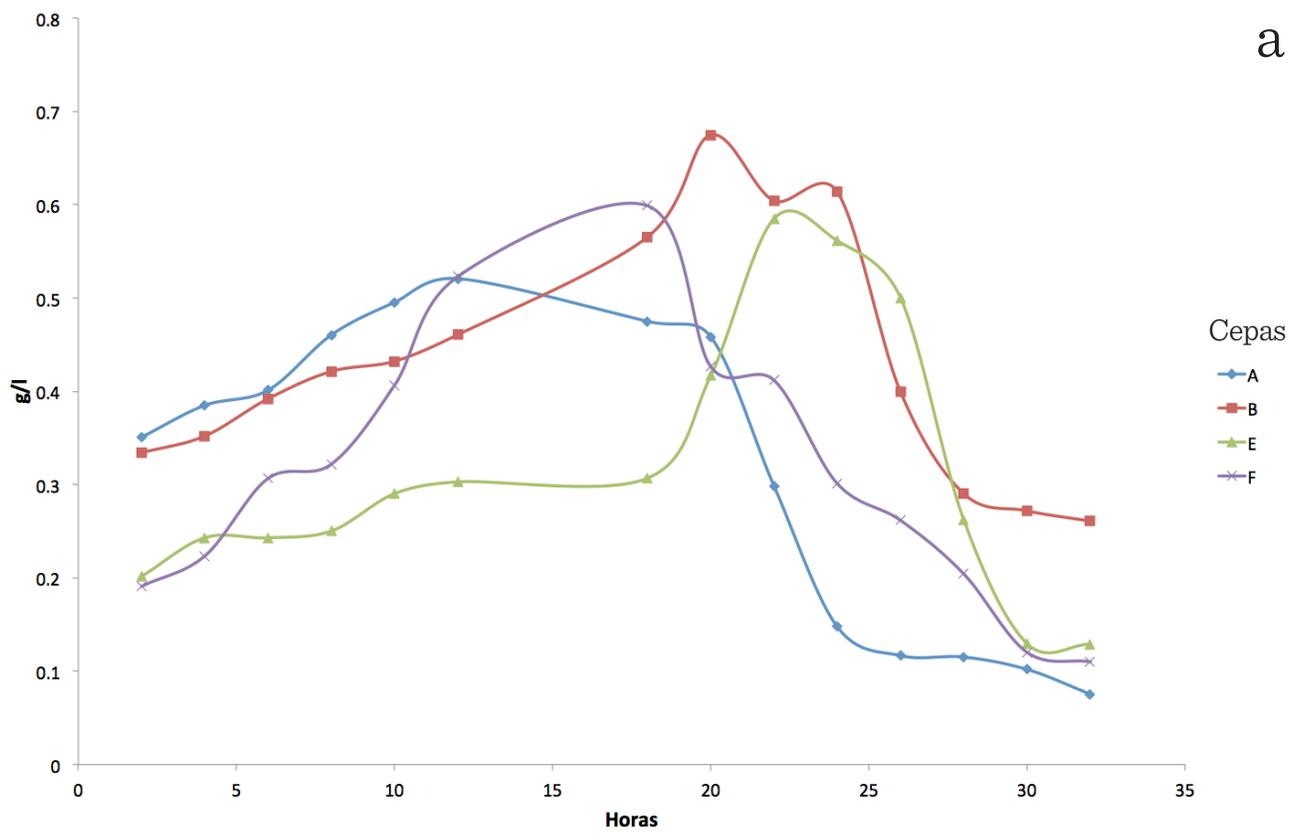
Prueba de antagonismo

Las cepas A, B, E y F, que resistieron la prueba anterior, provenientes de pozol blanco y cacao (fermentados a temperatura ambiente), mostraron halos de inhibición aproximadamente de 1 mm a 2 mm frente al patógeno, lo que indica la producción de sustancias inhibitorias (principalmente ácido láctico), comparadas con las muestras control (4 °C), que no exhibieron halos de inhibición. Otras bacterias aisladas de diferentes medios como la leche (Sánchez y Tromps, 2014) y quesos (Martindel-Campo y col., 2008) han presentado halos de inhibición similares; los autores reportaron que la familia de *Lactobacillus* mostró 1.33 mm, mientras que *Streptococcus* 1.78 mm. La presencia de halos de inhibición en cultivos con bacterias aisladas de muestras de pozol fermentado, en condiciones ambientales, permite considerarlas como cepas probióticas productoras de bacteriocinas; diferentes especies de bacterias probióticas han sido empleadas por mucho tiempo en alimentos fermentados, tal es el caso de *Lactobacillus* sp., y que además son consideradas como microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés: Generally Recognized As Safe). La producción de bacteriocinas se ve afectada por el medio en que se desarrollen. Al respecto, Puniya y col. (2016), encontraron que: “la producción óptima de bacteriocinas es detectada en medios que tienen una concentración limitada de azúcares, fuentes de nitrógenos, vitaminas y fosfatos de potasio, o bajo condiciones reguladas de pH”.

La tolerancia a cambios de temperatura y pH son uno de los factores más importantes que afectan la viabilidad y sobrevivencia de las células probióticas (Lesbros y col., 2016). La respuesta obtenida de las cepas seleccionadas por la simulación del tránsito gástrico se observa en las Figuras 2 y 3, donde los resultados del porcentaje de supervivencia muestran que las sales biliares tienen mayor efecto que el pH ácido sobre la inhibición del crecimiento de las cepas, aunque presentan alta tolerancia a una concentración de 0.1 % de sales biliares (cepas de pozol blanco y cacao). Resultados similares fueron reportados por Sánchez y col. (2016), en un estudio donde desarrollaron la caracterización probiótica de una cepa nativa de quesos artesanales típicos de Perú, presentando resistencia a 0.1 % de sales biliares y sin crecimiento a 0.25 %. Conforme el pH disminuye, la viabilidad de los microorganismos se reduce, un efecto similar que se presenta con el cambio de concentración de sales, al aumentar el porcentaje de NaCl disminuye el crecimiento (Rubio y col., 2008). González-Montiel y col. (2010), reportaron que la adaptación de las células al ácido provoca cambios en la composición de lípidos de la membrana, mostrando un incremento de ácidos grasos saturados.

Cinética microbiana en leche y suero lácteo

Los resultados de la cinética microbiana en lactosuero mostraron en la Figura 3a, que 4 de las cepas aisladas presentaron potencial probiótico de acuerdo con las pruebas *in vitro*. Se puede observar que la cepa A alcanzó mayor concentración de biomasa (0.041 g/L), seguido de la cepa B con 0.038 g/L. La fase de crecimiento exponencial en leche ocurrió en un tiempo de 8 h a 12 h (datos no mostrados), mientras en suero lácteo fue de 10 h a 20 h (datos no mostrados). Al compararse las cinéticas microbianas de los microorganismos control *Streptococcus thermophilus* (ST) y *Lactobacillus casei* (YK) se observó una marcada diferencia en la fase estacionaria, puesto que estas últimas lo presentaron de 20 h a 25 h (Figura 3b), y la fase de muerte después de las 25 h. La cantidad de ácido láctico producido



■ Figura 3. Cinética microbiana en suero lácteo: 3a. cepas aisladas y 3b. cepas control.
 Figure 3. Kinetic microbial in whey: 3a. Isolate strain and 3b. Stocks control.

durante el crecimiento de las BAL es concomitante al pH determinado, ya que los ácidos orgánicos resultantes se acumulan y producen, consecuentemente ocurre un gradual descenso del pH. La mezcla de cepas control, *Streptococcus thermophilus* - *Lactobacillus bulgaris*, presentaron una producción óptima al transcurrir un lapso de 30 h, alcanzando 0.77 % de ácido láctico. En cuanto a las cepas aisladas, la que mostró mayor producción de ácido láctico fue la cepa A (proveniente de pozol blanco de la ciudad de Tuxtla Gutiérrez) y la cepa F (pozol con cacao de la ciudad de Venustiano Carranza), con una producción de 0.28 % y 0.32 %, respectivamente; de acuerdo con estos datos, ambas cepas son las más aptas para la elaboración de la bebida. La producción de ácido láctico favorece el desarrollo de la textura en los productos lácteos, debido a que, la disminución de pH provoca la desestabilización de las micelas de caseína, principalmente solubilizarían el fosfato de calcio, al igual que confiere el sabor ácido y fresco de los productos lácteos fermentados (Parra, 2010). Durante el desarrollo de la cinética se observó la disminución de pH. Este cambio se encuentra directamente relacionado con la conversión de lactosa en ácido láctico. Diversos estudios (Astashkina y col., 2014; Newaj y col., 2014; Tripathi y Giri, 2014), indicaron que bajos niveles de pH inhiben la proliferación de las bacterias patógenas, debido a que no son resistentes a los cambios de pH; considerando lo anterior, las cepas (A y F), causarían este efecto, al disminuir más rápidamente los valores de pH en la bebida. El pH sugerido para una bebida fermentada es 4, una bebida a base de suero lácteo presenta alto contenido de calcio, el ácido láctico interacciona con el calcio presente en la red de paracaseinato, disolviéndolo como lactato de calcio, provocando una mejor absorción de calcio en el intestino delgado (Hemaiswarya y col., 2013).

La mayoría de las cepas estudiadas presentaron una fase estacionaria de poco tiempo, excepto las cepas control; este comportamiento puede deberse a la producción de ácidos

orgánicos por parte de los cultivos iniciadores utilizados, así como al efecto de las cepas iniciadoras al producir bactericinas para su propia adaptación al medio. Los valores más bajos de pH son concordantes con la mayor cantidad de BAL. Según Khagwai y col. (2014), indicaron que el pH, unido a las altas concentraciones de ácido láctico y ácidos grasos volátiles, producidos por estos microorganismos, disminuyen el pH de los productos fermentados, tal y como ocurrió en este estudio. Con los resultados obtenidos en las cinéticas microbianas, se pudieron comparar los parámetros cinéticos: velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación entre las cepas, encontrándose que las cepas (A, B, E y F), provenientes de la masa de pozol fermentado a temperatura ambiente (blanco A y B y pozol con cacao: E y F) crecieron y fermentaron favorablemente el suero lácteo. El lactosuero y la leche en promedio contienen alrededor de 4.7 g de lactosa (Parra, 2008). Cueto y col. (2012), reportaron mejor crecimiento de bacterias lácticas al combinar carbohidratos como fuente de carbono en el medio de cultivo, comparado con aquellas fermentaciones donde solo se utiliza lactosa. El uso de un medio de cultivo pobre en monosacáridos confiere un metabolismo altamente adaptable para la utilización de oligos o polisacáridos, lo que da ventaja competitiva a cierto tipo de bacterias, afectando fuertemente los productos de la fermentación, sobre todo en la producción de ácidos grasos de cadena corta (Rubio y col., 2008).

Los resultados mostrados permitieron determinar u_{max}/h y tiempo de duplicación (Tabla 1); puede observarse que el mejor comportamiento se obtuvo con las cepas aisladas del pozol blanco y pozol con cacao, ambas almacenadas a temperatura ambiente (A y F); estos resultados permitieron ensayar la cinética microbiana utilizando leche y suero lácteo como sustrato. Se realizó la cinética microbiana de las cepas conocidas (Tabla 2), observándose un comportamiento similar a las cepas aisladas a temperatura ambiente (A y F).

■ **Tabla 2. Parámetros cinéticos obtenidos de las cepas control en fermentación de leche y lactosuero.**
 Table 2. Kinetic parameters obtained from control strains in milk and whey fermentation.

Cepa	Temperatura	Leche		Lactosuero	
		Velocidad de crecimiento μ_{max}/h	Tiempo de duplicación (h)	Velocidad de crecimiento μ_{max}/h	Tiempo de duplicación (h)
ST	Cultivo iniciador a temperatura ambiente	0.041	16.54	0.058	11.87
YK	Cepa control a temperatura ambiente	0.062	11.12	0.09	7.70

Determinaciones realizadas a la bebida fermentada

Análisis fisicoquímicos

Los resultados evidenciaron que la bebida elaborada con la cepa control (YK) presentó un valor de acidez del 0.060, al igual que la bebida elaborada con la cepa F, un contenido de proteínas superior al del lactosuero, probablemente debido a la presencia de microorganismos, ya que estos aportan suficiente cantidad de proteínas, además de la conferida por la mermelada de piña y coco (Tabla 3). El pH de la bebida elaborada con las cepas A y F fue de 4 a 5, lo que limita el crecimiento de bacterias patógenas; esta reducción es consecuente de un incremento del ácido láctico, proveniente de la degradación de la lactosa por las BAL. Se observó que en 24 h la lactosa se había consumido casi en su totalidad, coincidente con el momento de mayor crecimiento bacteriano (10^6 UFC/mL), y con la mayor concentración de mezcla de ácidos, predominando el ácido láctico en la bebida (Parra, 2010). En base a los parámetros obtenidos (μ_{max}/h) en la fermentación del suero lácteo, que se muestran en la Tabla 1, aquellas cepas que presentaron mejor fermentación (μ_{max}/h) fueron las utilizadas para realizar las bebidas probióticas. La cantidad de proteína que presenta la leche es superior que la del lactosuero, el contenido de grasa en las bebidas fermentadas con las cepas A y F (Tabla 3) es mayor que, el presente en leche bronca (3.0 % a 3.3 %), esto debido a que las bebidas fueron elaborados con mermelada de pi-

ña, la cual aumentó los sólidos totales, permitiendo obtener una bebida reducida en grasas, favoreciendo a la salud del consumidor.

El suero lácteo y las bebidas fermentadas presentaron una densidad de 1.032 g/L, sin diferencia significativa entre el contenido de caseína, reduciendo su cantidad en el suero lácteo; la cantidad de lactosa fue de 4.70 %. Estos resultados son similares a los de Vela-Gutiérrez y col. (2012), quienes determinaron que el lactosuero contenía 5 % de lactosa y una densidad de 1.03. Las bebidas desarrolladas con las cepas A y F presentaron una acidez de 0.60 % (60 °D) y un pH menor a 5. Diversos estudios han reportado el beneficio del ácido láctico presente en las bebidas lácteas (Ortiz-Valderas, 2006); dentro de los efectos positivos se encuentra que, promueve la absorción de minerales a nivel de las células epiteliales y mejora el movimiento peristáltico. El uso de cultivos iniciadores (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaris*) permitió acondicionar el pH inicial de la bebida. Hernández y Romagosa (2014), documentaron que el empleo de este tipo de microorganismos permite aumentar la vida de anaquel de los productos inoculados. Es importante resaltar que en todas las bebidas desarrolladas se aumentó la cantidad de proteínas totales (de 14.60 g/L a 15.90 g/L), esto debido a la presencia de células bacterianas; sin embargo, casi en su totalidad provienen del lactosuero; desde el punto de vista digestivo, las proteínas del suero permanecen solubles al pH ácido, en base al pH del jugo

■ **Tabla 3. Análisis fisicoquímico de las bebidas obtenidas con diferentes cepas y del lactosuero.**
Table 3. Physico-chemical analysis of drinks obtained with different strain and from the whey.

Parámetro (%)	Suero de queso	Bebida 1	Bebida 2	Bebida 3
Acidez	0.18	0.57	0.60	0.60
pH	6.00	4.80	4.50	4.30
Lactosa	4.70	1.38	1.12	1.22
Sólidos totales	6.40	17.81	12.73	17.98
Proteína	14.60	15.90	15.50	15.10
Grasa	2.00	3.00	3.30	2.80
Densidad	1.032	1.032	1.032	1.032

*Bebida 1: elaborada con la cepa aislada del pozol blanco (Cepa A); Bebida 2: elaborada con la cepa aislada del pozol con cacao (Cepa F); y la bebida 3: elaborada con la cepa control *Lactobacillus casei* (YK).

gástrico (pH 4); la solubilidad de las proteínas conlleva una ventaja para su absorción durante su recorrido en el tracto digestivo (Rubio y col., 2008). El control del crecimiento de las cepas aisladas se observó a través de la cinética microbiana de la cepa control, así como de la cepa iniciadora.

Análisis microbiológico

La cantidad de *Lactobacillus casei* presentes en las tres bebidas (2×10^7 UFC/mL) fue superior a lo establecido por la NOM-181-SCFI-2010 (1×10^6 UFC/mL), para ser considerada como una bebida probiótica. Además, la bebida es apta para el consumo humano, debido a que no se encontraron bacterias patógenas (*Staphylococcus* y coliformes totales), aunque se observaron mohos y levaduras (< 10 UFC). Los resultados de este estudio mostraron una inhibición fuerte contra coliformes fecales (0 UFC/mL). León y col. (2011), registraron que los microorganismos probióticos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, debido a la síntesis de bacteriocinas o a la misma producción de ácido láctico. En las tres bebidas desarrolladas se obtuvieron una cantidad menor a 10 UFC/mL respecto a hongos y levaduras, por lo que la cantidad de estos microorganismos presentes en las bebidas se encuentra dentro de lo permitido por la NOM-111-SSA1-1994.

Análisis sensorial

El 60 % de los panelistas prefirieron la bebida 2 (“Me agrada”), elaborada con la cepa F de pozol con cacao fermentada a 28 °C, seguido de la bebida 3 (35 %), que se elaboró con la cepa control (*Lactobacillus casei*). La bebida 2 tuvo mejores resultados de aceptabilidad, superiores a la bebida 3 (cepa YK). Los resultados de nivel de agrado de acuerdo a la prueba hedónica efectuada a las tres bebidas, respecto al nivel “Me agrada” fueron los siguientes: las bebidas 2 y 3 fueron superiores y estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) a la bebida 1 (cepa A), pero no existió diferencia estadística entre ellas. En cuanto al nivel “Me desagrada” la bebida 1, obtuvo el mayor número, seguido de la bebida 3. La bebida 2 a ningún juez le desagradó. Las tres muestras presentaron diferencia estadísticas ($P < 0.05$) para este atributo. Considerando los tres niveles evaluados, la bebida 2 presentó el mayor nivel de agrado para los jueces; la bebida elaborada con la cepa control (*Lactobacillus casei*) mostró diferencia significativa ($P < 0.05$) con el resto; ésta diferencia fue corroborada mediante un análisis de ji-cuadrado. Vela-Gutiérrez y col. (2012), desarrollaron bebidas fermentadas, utilizando las mismas cepas control que las usadas en este estudio, y reportaron que no existe preferencia por alguna de las bebidas elaboradas, debido a que el cultivo

iniciador les confiere un sabor y olor similar a todas, ya que los microorganismos utilizados son homofermentativos.

CONCLUSIONES

El pozol, bebida no alcohólica tradicional de Chiapas, perteneciente a la cultura zoque chiapaneca, contiene una gran cantidad de bacterias, algunas de ellas con potencial probiótico, y cuyo consumo es beneficioso para la salud humana. Del total de bacterias aisladas del pozol fermentado blanco y con cacao, en este estudio, dos cumplieron con dichas características; las bebidas fermentadas elabo-

radas con estas dos cepas cumplen con lo establecido por la normativa federal vigente para ser considerada como una bebida probiótica (pH y ácido láctico); estas bacterias analizadas pueden servir para uso industrial, debido a la sobrevivencia a condiciones casi extremas. La presencia de bacterias probióticas, aisladas de las muestras de pozol, ácido láctico, proteínas y péptidos bioactivos provenientes del lactosuero, a los que se le atribuye funciones especiales y un efecto positivo en el organismo, hacen que sea considerada como una “bebida funcional”.

REFERENCIAS

- Arenas, C., Zapata, R., Gutiérrez, C. (2012). Evaluación de la fermentación láctica de leche con adición de Quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Vitae*. 19(1): S276- S278.
- Astashkina, A., Khudyakova, L., and Kolbysheva, Y. V. (2014). Microbiological quality control of probiotics products. *Procedia Chemistry*. 10: 74-79.
- Callejas, H. J., Prieto, G. F., Reyes, C. V., Marmolejo, S. Y. y Méndez, M. M. A. (2012). Caracterización fisicoquímica de un lactosuero: potencialidad de recuperación de fósforo. *Acta Universitaria*. 22(1): 11-18.
- Cueto, M., Yudtanduly, M. y Valenzuela, J. (2010). Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actualidades biológicas*. 32(93): 129-138.
- Cueto, M., Yudtanduly, M. y Valenzuela, J. (2012). Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actualidades biológicas*. 32(93): 129-138.
- Durán, P. (1999). *Análisis en alimentaria*. Argentina: Centre Telemàtic Editorial. 35-37 Pp.
- FAO, Food and Group Administration (2015). Probióticos en los alimentos. [En línea]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a0512s.pdf>. Fecha de consulta: 5 de noviembre de 2016.
- Flores, E. (2008). Pozol: Una bebida tradicional de México. [En línea]. Disponible en: http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/177_cienciorama.pdf. Fecha de consulta: 12 de octubre de 2017.
- Gutiérrez, L. A., Gómez, A. J., Arias, L. y Tangarife, B. (2007). Evaluación de la viabilidad de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema. *Revista Lasallista de Investigación*. 4(2): 37-42.
- González-Montiel, L., Delgado-Bravo, C. H., Pimentel-González, D. J. y Campos-Montiel, R. J. (2010). Viabilidad de cepas probióticas en leche fermentada almacenada en refrigeración. Universidad de Guanajuato, XII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de alimentos, México. [En línea]. Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:2x-QrF9zwHWwJ:respy2.uanl.mx/especiales/2010/ee092010/documentos/lacteos/LA8.pdf+&cd=2&hl=es&ct=clnk&gl=mx>. Fecha de consulta: 28 de julio de 2016.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R., and Carvalho, I. (2013). Mechanism of Action of Probiotic. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 56(1): 113-119.
- Hernández, A. y Romagosa, S. (2014). Desarrollo de una leche fermentada probiótica con jugo de Aloe vera. *Tecnología química*. 35(1): 81-97.
- Khagwai, N., Sharma, P., and Chand, D. (2014). Screening and evaluation of *Lactobacillus* spp. for the development of potential probiotics. *African Journal of Microbiology Research*. 8(15): 1573-1579.
- Jiménez, R., Gonzalez, N., Magaña, A. y Corona, A. (2010). Evaluación microbiológica y sensorial de fermentados de pozol blanco, con cacao (*Theobroma cacao*) y coco (*Cocos nucifera*). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 1(1): 070-080.
- Lara, C. y Burgos, A. (2012). Potencial probiótico de cepas nativas para su uso como aditivos en la alimentación avícola. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14(1): 31-40.
- Lesbros, D., Theulaz, I., and Blum, A. (2016). Helicobacter pylori and Probiotics. *The journal of nutrition*. 8(2): 812S-818S.
- León, J., Aponte, J., Rojas, R., Cuadra, L., Ayala N., Tomás, G. y Guerrero, M. (2011). Estudio de Actinomicetos marinos aislados de la costa central de Perú y su actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes y *Enterococcus faecalis* vancomicina resistentes. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 28(2): 237-246.

- Martin-del-Campo, M., Gómez, H. y Alaniz, R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *e-Gnosis*. 6(5): 1-17.
- Newaj, A., Harbi, A., and Austin, B. (2014). Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*. 431: 1-11.
- NOM-092-SSA1-1994 (1994). Productos y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. México. [En línea]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>. Fecha de consulta: 15 de abril de 2016.
- NOM-111-SSA1-1994 (1994). Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. México. [En línea]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/111ssa14.html>. Fecha de consulta: 23 de abril de 2016.
- NOM-112-SSA1-1994 (1994). Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. México. [En línea]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/112ssa14.html>. Fecha de consulta: 23 agosto de 2016.
- NOM-115-SSA1-1994 (1994). Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. México. [En línea]. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/115ssa14.html>. Fecha de consulta: 18 de julio de 2016.
- NOM-155-SCFI-2012 (2012). Leche-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. México. [En línea]. Disponible en: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4692/seeco/seeco.htm>. Fecha de consulta: 28 de julio de 2016.
- NOM-181-SCFI-2010 (2010). Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba. México. [En línea]. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5167303&fecha=16/11/2010. Fecha de consulta: 15 de junio de 2016.
- Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L. y Montonati, M. (2011). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *DIAETA*. 25(121): 20-33.
- Ortiz-Valderas, M. (2006). Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas aisladas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. *Química en Alimento*. 13(43): 6-60.
- Parra, R. (2008). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía*. 62(1): 4967- 4982.
- Parra, A. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 8(1): 94-105.
- Pérez, J., Rocha, E., Uzcategui, D., Aranguren, Y. y Machado, E. (2015). Aislamiento, selección y caracterización de *Lactobacillus* genus aisladas del líquido ruminal vacuno en la zona sur del lago, Venezuela. *Revista colombiana de ciencia animal*. 7(2): 165- 170.
- Puniya, M., Ravinder M., Panwar H., Kumae, N., and Kumar, P. (2016). Screening of Lactic Acid Bacteria of Different Origin for Probiotic Potential. *Food Process Technol*. 7(1): 1-9.
- Rubio, M. A., Hernández, E. M., Aguirre, R. A. y Poutou, P. R. (2008). Identificación preliminar in vitro de propiedades probióticas en cepas de *S. cerevisiae*. *Revista MVZ Córdoba*. 13(1): 1157-1169.
- Ruiz, K., Ortega, P., Hoyos, J. y Andrés, G. (2016). Selección de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico de interés en el sector piscícola. *Agronomía Colombiana*. 94 (1Supl): S1009-S1012.
- Sánchez, B., Delgado, S., Blanco, A., Lourenco, A., Gueimonde, M., and Margolles, A. (2016). Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Molecular Nutriology Food Research*. 61(1): 1-15.
- Sánchez, L., Omura, M., Adam, L., Pérez, T., Llanes, M. y Ferreira C., (2015). Cepas de *Lactobacillus* spp. con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. *Revista de Salud Animal*. 37(2): 94-104.
- Sánchez, L. y Tromps, J. (2014). Caracterización *in vitro* de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Revista de Salud Animal*. 36(2): 124-129.
- Santillan-Urquiza, E., Mendez-Rojas, M. A. y Vélez-Ruiz J. F. (2014). Productos lácteos funcionales, fortificados y sus beneficios en la salud humana. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. 8(1): 5-14.
- Soliman, A., Sharoba, A., Bahlol, H., and Radi, O. (2015). Evaluation of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* for probiotics characteristics. *Middle East Journal Applied*. 5(1): 94-101.
- Tripathi, M. and Giri, S. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of functional food*. 9: 225-241.
- Vela-Gutiérrez, G., Castro-Mundo, M., Caballero-Roque, A. y Ballinas-Díaz, E. J. (2012). Bebida probiótica de lactosuero adicionada con pulpa de mango y almendras sensorialmente aceptable en adultos mayores. *ReCiTeIA*. 11(2): 10-20.