



**UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA**
Unidad Xochimilco



CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

**Informe final de Servicio Social:
Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas
autóctonas de la fermentación artesanal de chiles en escabeche**

Presenta:

Sandra García Casiano

Matrícula:

2172032729

Asesor Interno. Dr. Alejandro Alberto Azaola Espinosa. No. Económico: 5616

Asesor Interno. Dra. Martha Adriana Leyte Lugo. No. Económico: 900035

Ciudad de México a 07 de Julio del 2024

INTRODUCCIÓN

Los alimentos fermentados han sido parte fundamental de diversas culturas, debido a su importancia para mejorar el valor nutricional, el sabor, aroma, textura y la vida útil de los alimentos. Cada país tiene sus propios alimentos elaborados mediante diferentes mecanismos de fermentación tradicional.

En el mundo existen más de 3500 alimentos fermentados tradicionales, siendo las bebidas alcohólicas el principal producto elaborado por este proceso, seguido por la elaboración de productos lácteos fermentados (Andreu & Saavedra, 2022). En general los alimentos fermentados contienen moléculas bioactivas, vitaminas y otros componentes con mayor disponibilidad que en el alimento original, debido al proceso de fermentación. Muchos de estos alimentos también contienen microorganismos vivos, principalmente bacterias lácticas y levaduras, que pueden mejorar la salud gastrointestinal y proporcionar otros beneficios para la salud (Puntillo & Vinderola, 2021).

La fermentación fue parte integral de civilizaciones antiguas, por ejemplo; en la elaboración de cerveza en Babilonia, la fermentación de frutas en Grecia, en la elaboración de yogurt en todo Medio Oriente y Europa y en el desarrollo de productos a base de arroz, soja, verduras y pescado en el este de Asia (Mannaa, *et al.*, 2021). Específicamente, en México existen 200 productos fermentados, de los cuales aproximadamente 20 son bebidas (Robledo, *et al.*, 2021).

México ofrece una impresionante variedad de alimentos, la mayoría de los cuales se consideran nativos, como el agave, el cacao, el maíz, los chiles y la tuna, que son utilizados principalmente para la producción de alimentos y/o bebidas fermentadas por las diversas comunidades indígenas mexicanas (Robledo, *et al.*, 2021). Estos alimentos suelen ser caseros y fermentados espontáneamente por diferentes clases de microorganismos, incluidas levaduras, bacterias y hongos (Pérez & Cardoso, 2020).

Las verduras son fuentes ricas en compuestos beneficiosos y se utilizan para producir diversos productos fermentados. Su utilización se remonta a la dinastía Song (960 a 1279 d.C.) en China (Tamang, *et al.*, 2020).

Entre los vegetales utilizados en los procesos de fermentación se encuentran la col, los nabos, los rábanos, las zanahorias, el repollo, los pepinos, las aceitunas, la coliflor, el apio, el quimbombó, las cebollas, los pimientos y los tomates, donde se genera la fermentación espontánea por BAL de origen natural, es decir, propias del vegetal (Gunawardena, *et al.*, 2024)

Así mismo, entre los vegetales utilizados en los procesos de fermentación también se encuentra el chile. El chile, además de ser un alimento muy utilizado y consumido en forma fresca a nivel mundial, también es muy consumido de manera procesada, existiendo una gran gama de productos industriales que se acostumbra en la alimentación humana: congelados, deshidratados, encurtidos, enlatados, así como en pastas y salsas (Lorenzo, *et al.*, 2017). La mayor parte de este vegetal fresco (60%) se encurte y se enlata, y alrededor del 20% se consume crudo (Sandoval, *et al.*, 2017).

Los procesamientos industriales de chile son muy variados, entre los que destacan la elaboración del chile encurtido, en escabeche y fermentado (Zamora, *et al.*, 2017). Los chiles

en escabeche pueden presentar el crecimiento de algunos microorganismos como las bacterias del género *Lactobacteriaceae*, que son las responsables de la producción de ácido láctico (Lorenzo, *et al.*, 2017). Debido a sus diversas propiedades funcionales, como la producción de diversos tipos de metabolitos secundarios y ácidos orgánicos beneficiosos, pueden considerarse como conservantes en las industrias de fermentación (Obinwanne, *et al.*, 2022).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos muy extensos y se encuentran en diversos nichos, como en productos lácteos, cárnicos y vegetales, además en el tracto gastrointestinal y urogenital de humanos y animales, en suelo y en agua. Las cepas más comúnmente utilizadas de diferentes especies de BAL en alimentos, incluyen los géneros de *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* (Liu, *et al.*, 2014).

Por lo anterior, este trabajo se enfocó en el uso de chiles jalapeños para el aislamiento y caracterización de las BAL autóctonas presentes en chiles en escabeche. Además de lo anterior, se evaluó la capacidad de crecimiento de las BAL en diferentes condiciones como respuesta del proceso de fermentación, así como su posible aportación a la salud humana.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.

Más de 3 000 especies bacterianas pueden habitar el tracto intestinal de un individuo, más de 600 en la cavidad oral, 300 en el tracto respiratorio, 100 en la piel, 500 en el tracto urinario y casi 300 en la cavidad vaginal. También la glándula mamaria podría albergar una microbiota propia, incluso en mujeres sin historia de lactancia. Las acciones coordinadas del más del trillón de células microbianas que nos habitan son esenciales para la vida humana. Esta población de bacterias alcanza su máxima densidad, principalmente, en el intestino grueso, donde forman una comunidad denominada microbiota intestinal, compuesta por microorganismos autóctonos o indígenas (heredados) y microorganismos alóctonos o transitorios, consumidos con los alimentos. Es aquí donde entran en juego los alimentos fermentados, los cuales pueden proveer hasta 1 000 veces más microorganismos vivos que una alimentación que no los incluya, además de influir en el establecimiento, la composición y las actividades de la microbiota (Puntillo & Vinderola, 2021).

A menudo es necesario ajustar las condiciones de fermentación de los alimentos; por ejemplo, es necesario crear condiciones anaerobias para la producción de encurtidos; también es posible que sea necesario ajustar la composición de los ingredientes (adición de sal o vinagre durante la fermentación) para así suprimir la microbiota indeseable que compite con los microorganismos benéficos (Mannaa, *et al.*, 2021). Dada la pérdida de diversidad y abundancia de la microbiota intestinal es que surge el interés en los alimentos fermentados como una estrategia para proveer microorganismos, metabolitos y fragmentos celulares al ecosistema intestinal para la promoción de su funcionamiento y la prevención o el manejo de enfermedades crónicas (Puntillo & Vinderola, 2021)

Por otro lado, la fabricación de vegetales encurtidos implica una fermentación espontánea, lo que conduce al predominio de una microbiota principalmente compuesta de BAL. Estas bacterias se caracterizan por presentar propiedades que incluyen las actividades acidificantes, proteolíticas y lipolíticas que contribuyen a la conservación, sabor y calidad nutricional de los productos (Sáez, *et al.*, 2018). Por otro lado, los ácidos y/o compuestos

orgánicos volátiles producidos por estas bacterias eliminan tanto a las bacterias patógenas (principalmente enterobacterias y bacterias esporuladas) así como sus enzimas pectinolíticas responsables de la putrefacción. Cabe destacar que los procesos de elaboración de muchos alimentos fermentados se basan en conocimientos empíricos que se transmiten de generación en generación, sin embargo, poco se sabe de sus posibles efectos sobre la salud.

Lo anterior permitió proponer este trabajo, el cual se enfocó en conocer más acerca de la capacidad de crecimiento de las BAL en chiles en escabeche, y determinar los posibles beneficios nutricionales y para la salud del consumidor, así como para la conservación de alimentos.

OBJETIVOS

Objetivo General

Aislar y caracterizar bacterias ácido lácticas (BAL) autóctonas de un preparado de chiles en escabeche elaborados artesanalmente.

Objetivos Particulares

- Preparar un producto de chiles jalapeños en escabeche con y sin la adición de vinagre.
- Determinar la presencia de bacterias ácido lácticas
- Estudiar la dinámica de producción de biomasa de bacterias en el producto.
- Caracterizar las bacterias aisladas mediante un análisis microscópico y pruebas bioquímicas
- Comparar los resultados de la preparación de chiles en escabeche con y sin la adición de vinagre

MARCO TEÓRICO

Fermentación de alimentos

Los alimentos fermentados son aquellos en los que diferentes microorganismos provocan modificaciones en su composición de manera controlada. El fermento será la mezcla de uno o más microorganismos (bacterias o levaduras) capaces de transformar una matriz (láctea, vegetal, etc.) en otro elemento mediante el proceso de fermentación, durante el cual se multiplican y se generan diversas sustancias. Estos microorganismos, en función de la especie de la que se trate, tienen determinadas características morfológicas y unos requerimientos de nutrientes específicos para su crecimiento y supervivencia como: rangos de temperaturas, elementos básicos como azúcares, fuentes de nitrógeno (N) e hidrógeno (H), entre otros (Andreu, *et al.*, 2022).

Cabe destacar que la fermentación aporta distintos beneficios, como son la preservación de materias primas, conservación de productos finales (seguridad alimentaria y larga vida útil), transformación organoléptica (sabor, aromas, apariencia, texturas), funcionalidad y efectos en la salud (complementar la microbiota, nutrientes y digestibilidad), aumentando el valor del

producto resultante e impulsando su aceptación frente a los consumidores (Andreu, *et al.*, 2022).

Existen varios mecanismos a través de los cuales los alimentos fermentados pueden ejercer efectos beneficiosos para la salud y la enfermedad, esto debido a que contienen microorganismos potencialmente probióticos, como las BAL, así mismo, los metabolitos biológicamente activos derivados de microorganismos. Adicionalmente, los componentes alimentarios que se encuentran en los alimentos fermentados, como los prebióticos y las vitaminas, también pueden ejercer beneficios para la salud. Por otro lado, el proceso de fermentación puede generar otros beneficios en los productos, como reducir las toxinas y los antinutrientes: por ejemplo, la fermentación de la masa madre puede reducir el contenido de carbohidratos fermentables, lo que puede aumentar la tolerancia de estos productos en pacientes con trastornos intestinales funcionales como el síndrome del intestino irritable (Dimidi, *et al.*, 2019).

Clasificación de los principales tipos de alimentos fermentados

Existen más de 500 variedades de alimentos fermentados que se pueden consumir en diversas formas, como alimentos básicos, guisos, guarniciones, fritos, cocidos, en pasta, aderezos, condimentos, encurtidos, confitería, ensaladas, sopas, postres, salados, bebidas, confitados, colorantes, saborizantes, y bebidas alcohólicas y no alcohólicas (Tamang, 2014).

La familia de los alimentos fermentados es muy amplia y diversa, e incluye alimentos donde los microorganismos pueden estar vivos (yogur, kimchi, chucrut, kéfir, kombucha, embutidos, encurtidos) o no (pan de masa madre, chocolate, chucrut pasteurizado) o haber sido removidos del medio de fermentación por decantación o filtración (cerveza, vino) (Puntillo & Vinderola, 2021).

Existen varios métodos de clasificación para alimentos y bebidas fermentados, pero principalmente se pueden clasificar según la categoría de sustrato utilizado, como leche fermentada, cereales, legumbres, verduras, frutas, carne, pescado y hierbas (Mannaa, *et al.*, 2021).

Tabla 1. Sustratos de fermentación comunes y alimentos producidos (Mannaa, *et al.*, 2021).

Sustrato	Producto
Leche	Queso, yogur y kéfir
Hierbas	Kombucha y té pu`er
Pescado	Salsa de pescado, jeotgal, fesikh
Cereales	Cerveza, masa fermentada, makgeolli
Legumbres	Pasta de soya, salsa de soya,
Vegetales	Kimchi, pepinillos, chucrut
Frutas	Vino, vinagre, sida
Carne	Salchichas, salami, peperoni

La fermentación de vegetales ha recibido atención por sus beneficios para la salud. Las verduras y frutas tienen una población microbiana que depende de las características de cada matriz vegetal, así como del origen geográfico. Esta microbiota, está compuesta principalmente por microorganismos benéficos, entre los que se incluyen levaduras (géneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Torulaspóra*), hongos (*Rhizopus* spp.), bacterias aeróbicas (*Bacillus* spp. y *Acetobacter* spp.) y anaeróbicas (bacterias ácido lácticas), las cuales suelen ser responsables de la fermentación espontánea de verduras y frutas crudas, contribuyendo a su conservación y estabilidad. La fermentación de verduras y frutas se produce principalmente por la acción de bacterias ácido lácticas con la participación o no de levaduras y *Bacillus* spp (Torres, *et al.*, 2020). Muchos de estos microorganismos autóctonos utilizados como iniciadores en productos fermentados de origen vegetal son probióticos, ya que los productos nutricionales incluyen vitaminas, antioxidantes, proteínas, carbohidratos y exopolisacáridos. Además, exhiben propiedades antiinflamatorias, inmunomoduladoras y promotoras de la salud intestinal, contribuyendo a que los vegetales fermentados tengan beneficios para la salud (Yuan, *et al.*, 2023)

Clasificación según la vía bioquímica

La fermentación también se puede clasificar según su vía bioquímica, estas pueden ser en fermentación láctica, alcohólica, acética y alcalina. La fermentación láctica es un proceso biológico en el que los azúcares presentes en el medio se transforman en ácido láctico y las BAL son las principales responsables de este tipo de fermentación. La presencia de ácido láctico como metabolito en los alimentos provoca la desactivación de los procesos de descomposición, utilizando esta fermentación como un método de conservación de alimentos, como en el caso del yogur, el kimchi y los cereales fermentados. La fermentación alcohólica o etílica es un proceso anaeróbico realizado por las levaduras, mohos y algunas clases de bacterias, y tiene como finalidad proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares en ausencia de oxígeno para metabolizar las moléculas de glucosa y obtener energía, produciendo alcohol y dióxido de carbono (CO₂) como desechos de la fermentación. Ejemplos de la fermentación alcohólica incluyen la producción de pan, cerveza y vino. En la fermentación acética, los compuestos orgánicos como los alcoholes y azúcares del sustrato se convierten en ácido acético mediante bacterias que pertenecen principalmente al género *Acetobacter*, como en el caso de la producción de kéfir, kombucha, cacao, cerveza ácida y vinagre. En la fermentación alcalina, las proteínas del sustrato se hidrolizan en aminoácidos y péptidos, liberando amoníaco, que eleva el pH (8-9), y de esta forma inhiben aquellos microorganismos asociados al deterioro de los alimentos. El amoníaco producido durante la fermentación alcalina, implicada en la preparación de natto japonés y huevos fermentados africanos por mencionar algunos ejemplos, es responsable del fuerte sabor y aroma umami. Los microorganismos responsables de la fermentación alcalina pertenecen principalmente a *Bacillus* spp. y *Staphylococcus* coagulasa negativos, que pueden producir proteinasa extracelular para la hidrólisis de proteínas (Mannaa, 2021., Mosqueda, 2019).

Clasificación por proceso de producción

Los procesos de fermentación se pueden clasificar en dos categorías principales: fermentaciones espontáneas y fermentaciones impulsadas. Las fermentaciones espontáneas, han sido ampliamente utilizadas en el ámbito casero y culinario, resultado de

la competencia entre los microorganismos autóctonos (levaduras, hongos, bacterias aeróbicas y anaeróbicas) presentes en el producto, sin embargo, estas fermentaciones espontáneas pueden fallar fácilmente debido a la contaminación (Toran, *et al.*, 2023). Muchos tipos de alimentos fermentados, como el chucrut y el kimchi, todavía se producen mediante enfoques espontáneos, especialmente en entornos de pequeña escala y en países en desarrollo, ya que el proceso depende completamente de mejorar el crecimiento de los microbios disponibles en las materias primas del sustrato (Mannaa, *et al.*, 2021).

Por otro lado, las fermentaciones impulsadas requieren la adición de un iniciador específico, principalmente, cepas de BAL que incluyen miembros de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Oenococcus* y *Pediococcus*, de las cuales algunas de ellas pueden ejercer efectos beneficiosos directos sobre la salud como probióticos vivos. La función principal de los cultivos iniciadores es acelerar el proceso de fermentación, para garantizar que el proceso esté controlado y que el resultado de la fermentación sea estable en cuanto a calidad y propiedades. El uso de cultivos iniciadores bien definidos se adoptó por primera vez para producir cerveza, alcohol, vinagre y pan, seguidos de productos lácteos y cárnicos (Mannaa, 2021, Toran, 2023).

Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se encuentran presentes en el ambiente y en productos alimenticios como lácteos, frutas y vegetales. Este grupo de bacterias comprenden géneros filogenéticamente diversos, incluidos *Alkalibacterium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Weissella*, *Vagococcus*, *Streptococcus* y *Tetragenococcus* (Obinwanne, *et al.*, 2022).

Estos géneros se caracterizan por ser bacilos o cocos Gram positivos, no esporulados, anaerobios y/o aerotolerantes, que responden a la prueba de catalasa negativamente, ya que carecen de esta enzima. La ausencia de citocromos les brinda la característica de formación de colonias color blanco lechosos, y pueden ser mesófilos o termófilos, según las temperaturas óptimas de desarrollo (Cervantes, 2019; Tamang, 2014; Obinwanne, 2022).

Clasificación según la vía de fermentación

Según sus productos fermentativos beneficiosos, las especies de BAL se clasifican ampliamente en tipos homofermentativos y heterofermentativos. Las BAL homofermentativas, como *Lactococcus* y *Streptococcus*, producen sólo ácido láctico, mientras que las BAL heterofermentativas producen ácido láctico, acetato, etanol, CO₂, formiato o succinato, según las características de su metabolismo. Entre los géneros que forman parte de este último grupo se encuentra *Leuconostoc*, *Weissella* y algunos lactobacilos (Obinwanne, 2022, Parvez, 2006).

Aplicación de las BAL

Muchas especies de BAL están obteniendo reconocimiento en términos de usos novedosos considerando sus atributos útiles en distintas biotecnologías relacionadas con la fermentación, incluido el crecimiento rápido, la tolerancia a los ácidos, la actividad antimicrobiana, la seguridad para el consumo humano y animal, y la fermentación a escala industrial (Obinwanne, *et al.*, 2022). Durante el proceso de fermentación, las BAL producen diversos metabolitos, principalmente ácido láctico, aminoácidos, exopolisacáridos, ornitina,

aldehídos y ésteres. Cuando las BAL se utilizan como cultivos iniciadores para fermentar vegetales, contribuyen a la producción de productos vegetales fermentados beneficiosos (Yuan, et al., 2023). Cabe destacar que una gran variedad de especies de las BAL inhiben la proliferación de bacterias patógenas presentes en los alimentos, ya que producen bacteriocinas como la nisina, pediocina, colicina, lactacina, enterocina, enterolisina, etc., es decir, son excelentes agentes antimicrobianos eficaces. Las BAL y sus metabolitos (bacteriocinas) representan una opción viable con enormes perspectivas para la conservación de alimentos, empleadas para mejorar la seguridad de los alimentos y prolongar la vida útil (Onyeaka, 2022; Bhattacharya, 2022).

Las BAL se consideran un grupo importante de bacterias probióticas; definiendo probiótico como "un suplemento alimenticio microbiano vivo que brinda beneficios al animal huésped mejorando su equilibrio microbiano intestinal" (Bintsis, 2018) La definición de probióticos implica tres aspectos claves: que se trate de un microorganismo o mezcla de microorganismos definida microbiológicamente, que estén viables y que exista al menos un estudio clínico de seguridad y eficacia que demuestre los efectos benéficos (Puntillo & Vinderola, 2021). Los cultivos comerciales utilizados en aplicaciones alimentarias incluyen principalmente cepas de *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* y *Propionibacterium spp.* *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lb. reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lb. plantarum* son las BAL más utilizadas en alimentos funcionales que contienen probióticos (Bintsis, 2018).

El chile como sustrato de fermentación

El chile es un fruto en México indispensable para dar sabor a cualquier platillo, y es el condimento nacional por excelencia utilizándolo en la preparación tanto de salsas y guisos hasta en productos de belleza (FIRCO, 2017). El consumo del mexicano es de alrededor de 17.2 kg de chile al año por persona (SADER, 2021), y la mayor parte de esta materia prima (60%) se encurte y se enlata, y alrededor del 20% se consume crudo (Sandoval, et al., 2017)).

Particularmente el chile jalapeño (*Capsicum annum L.*) es el cultivo con mayor significancia respecto a otros debido a su alta producción, rentabilidad y gran demanda de mano de obra, con el 32% de la producción total (Sánchez, et al., 2020). Dicha popularidad se ha visto valorada por distintas modalidades en las cuales se puede degustar, en las que destaca la opción de chile procesado como la más habitual (58%), seguida por el chile fresco (38.5%) y el seco o ahumado (3.5%). Entre los motivos de consumo, el sabor es el más destacado (87.5%), poco picor (30%), aroma (25.5%) y multifuncionalidad (15%) (Sánchez, 2020; Sánchez, 2023).

Además, el chile jalapeño se caracteriza por ser una fuente rica de fitoquímicos, entre los que destacan las vitaminas A y C, compuestos capsaicinoides, compuestos fenólicos, flavonoides, carotenoides, carbohidratos y fibra (Agostini, 2017; Cenicerros, 2022).

Se ha visto que el jugo de chile jalapeño puede ser empleado como un buen coadyuvante en la disminución del deterioro de productos de buena calidad, lo que puede proporcionar una mayor vida de anaquel (Sánchez, et al., 2019).

Los procesamientos industriales de chile son muy variados, entre los que destacan la deshidratación, la elaboración del chile encurtido, en escabeche y fermentado. El encurtido utiliza la sal (NaCl) para su conservación y en cuanto, al escabeche, es una salsa o adobo

que se hace con aceite frito, vino o vinagre, hojas de laurel y otros ingredientes, siendo su presentación más común los chiles enlatados que se encuentran a la venta en el mercado. En cuanto a la fermentación, este proceso se lleva a cabo mediante el uso de BAL que se encuentran naturalmente en el chile, sin embargo, estos chiles fermentados solo se han producido a nivel de pequeñas industrias (Zamora, *et al.*, 2017).

Proceso fermentativo en la elaboración de chiles en escabeche

Los alimentos en escabeche como pepinos, chile, zanahorias y vegetales en general suelen conservarse a concentraciones relativamente bajas de sal (0,6%) y ácido acético (0,6%), conservando gran parte de la frescura y la apariencia característica del producto natural, esta tecnología es aplicada justamente en la conservación de chiles jalapeños. Los alimentos pueden contaminarse por diferentes microorganismos, particularmente con microorganismos patógenos, por lo que la elaboración del chile en escabeche es y ha sido una excelente forma de conservarlos, es el método tradicional más utilizado, permitiendo preservar los alimentos durante largos períodos de tiempo. Anteriormente, los chiles se curaban en salmuera a concentraciones de sal lo suficientemente altas como para evitar la fermentación. Sin embargo, hoy en día se añade vinagre a la salmuera, para reducir así la concentración de sal y para mantener el producto con una mayor vida de anaquel, y también para reducir el pH a menos de 4.6, de acuerdo con las regulaciones de alimentos acidificados. Los chiles en escabeche son un producto alimenticio usado como condimento, elaborado con chiles sanos, limpios y con el grado de madurez adecuado, chiles del género *Capsicum annuum* que son sometidos o no al proceso de encurtido y posteriormente envasados en un medio líquido, formulado con vinagre, aceite vegetal comestible, sal y agua, pudiendo adicionarse o no verduras y especias. Es importante mencionar que los chiles en escabeche pueden presentar el crecimiento de algunos microorganismos como las bacterias del género *Lactobacteriaceae*, que son las responsables de la producción de ácido láctico; del género *Acetobacter* que producen dióxido de carbono (CO₂); y de algunas levaduras que producen alcohol y CO₂. Cabe destacar que el pH más alto que pueden alcanzar estos productos es de 4.3 (Lorenzo, *et al.*, 2017).

Varios estudios han investigado la microflora presente en el chile picado, estos estudios, que utilizaron métodos convencionales dependientes de cultivo, indicaron que las BAL, incluidas *Lactobacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* y *Pediococcus*, fueron los tipos de bacterias más abundantes presentes durante el proceso de fermentación del chile picado (Wang, *et al.*, 2019).

MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación fue realizada en el laboratorio de Biotecnología (N-104), de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.

Se analizaron diferentes preparaciones artesanales de chiles en escabeche y en salmuera, de las cuales se tomaron diferentes muestras y se realizaron diferentes procedimientos para el aislamiento e identificación de BAL.

CHILES EN ESCABECHE (PREPARADO No.1)

El primer estudio se realizó a partir de un preparado artesanal de chiles jalapeños con zanahoria, cebolla y especias en vinagre, y con un tiempo de conservación de 1 año (Figura 1),.



Figura 1. Chiles en escabeche (preparado No.1)

Preparación de medios de cultivo. Para determinar la presencia de enteropatógenos y monitorear la sanidad y/o seguridad del producto a trabajar se emplearon medios de cultivo selectivos. Para la preparación de los medios se siguieron las indicaciones propuestas por el fabricante de cada agar.

- Agar MacConkey (50 g por cada 1000 ml)
- Agar Salmonella y Shigella o agar SS (60 g por cada 1000 ml)
- Agar Estafilococos No. 110 (149 g por cada 1000 ml)
- Agar para selección de Estreptococos (44. 10 g por cada 1000 ml)
- Agar Nutritivo (23 g por cada 1000 ml)
- Man, Rogosa y Sharpe o agar MRS (55 g por cada 1000 ml)
- Agar triptona de soya o TSA (40 g por cada 1000 ml)

Los medios se sometieron a un proceso de esterilización en autoclave a 125 °C durante 15 minutos, a excepción del agar SS y agar para selección de Estreptococos. Posteriormente, 10 ml de cada agar se vació y se distribuyó en cajas Petri; dicho procedimiento se realizó en campana de flujo laminar. Se dejaron solidificar por 10 minutos a temperatura ambiente, bajo condiciones estériles, y posteriormente fueron reservados en refrigeración hasta su uso.

Adicionalmente, se prepararon medios de cultivo líquidos:

- Caldo MRS (55 g por cada 1000 ml de agua destilada)
- Caldo Nutritivo (8 g por cada 1000 ml de agua destilada)
- Caldo Soya Trypticaseína o TSB (30 g por cada 1000 ml de agua destilada)

De manera similar que, con los medios sólidos, cada uno de los medios líquidos se preparó según las indicaciones del fabricante. De cada medio líquido se vaciaron 15 ml en viales de vidrio para después esterilizarlos en autoclave a 125 °C durante 15 minutos.

Preparación de diluciones.

Para la preparación de las diluciones se preparó una solución estéril de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9% (solución salina isotónica, SSI); para ello se pesaron 0.45 g de NaCl y se disolvieron en 50 ml de agua destilada. La solución resultante se llevó a esterilizar en autoclave durante 15 minutos.

Con micropipeta se tomó un inóculo de 1 ml del producto a analizar, y se reservó en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml. A partir de este inóculo se realizaron diluciones decimales, transfiriendo 100 µl de la dilución a otro tubo Eppendorf con 900 µl de SSI, para obtener una primer dilución (10^{-1}). Posteriormente se prepararon las diluciones decimales necesarias, transfiriendo 100 µl de la dilución anterior (10^{-1} - 10^{-6}) a otro tubo Eppendorf con 900 µl de SSI hasta llegar a la dilución deseada.

Siembra de diluciones.

Después de preparar las diluciones, cada una de las cajas Petri con medio de cultivo se dividió en cuadrantes y en cada cuadrante se colocaron 5 µl de las diluciones y de la muestra directa, posteriormente, con asa bacteriológica de acero se realizó siembra por estriado en zigzag. Dicho procedimiento fue realizado para cada uno de los medios de cultivo utilizados. Las cajas Petri fueron etiquetadas y colocadas de manera inversa en estufa de incubación a 37 °C por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se revisaron y seleccionaron aquellas cajas Petri que tuvieran crecimiento de colonias bacteriológicas y se evaluaron sus características macroscópicas.

Determinación de pH. Se evaluó el pH del preparado con un potenciómetro H12210 pH, (Neter®).

Macerado de chile e inoculación en medios líquidos. Para determinar la presencia de microorganismos endófitos del chile, se tomó una muestra directa de materia vegetal (chile) a partir del preparado, el cual se maceró en un mortero con pistilo (macerado de chile). El producto de maceración (0.5 g) se inoculó en los diferentes medios líquidos. Adicionalmente, 2 ml de muestra líquida del preparado fueron también inoculados en los medios líquidos. El ensayo se llevó a cabo por duplicado (tabla 1). Posteriormente, los viales se colocaron en incubadora rotatoria a 37°C por 48 horas.

Tabla 1. Esquema de siembra en medios de cultivo líquidos			
Medio de cultivo líquido	Caldo MRS	Caldo TSB	Caldo Nutritivo
Tipo de muestra			
Con líquido del preparado			
Con chile macerado			

Aislamiento y purificación de cepas. A partir de los medios líquidos inoculados con el macerado se tomó un inóculo de 5 µl y se sembró por estriado masivo en cajas Petri con medios de cultivos sólidos. Las cajas Petri se incubaron a 37°C por 48 horas, y observando el crecimiento de colonias cada 24 horas. De cada una de las colonias observadas se tomó una muestra y se sembró en medios de cultivo sólidos TSA y MRS para la purificación de las cepas de interés.

Evaluación de las características macro y microscópicas.

Características macroscópicas. Pasadas las 48 horas, se llevó a cabo la observación de las características macroscópicas de las colonias obtenidas, considerando morfológicamente su tamaño, forma, textura, elevación, borde, color, olor y comportamiento óptico (Vargas & Kuno, 2014).

Características microscópicas. Para la descripción microscópica, se realizaron frotis de cada cepa seleccionada y se sometieron a tinciones de Gram para determinar la forma de las bacterias (cocos, bacilos, espiroquetas o filamentos) y agrupación celular, así como identificar si eran Gram positivas o Gram negativas.

Tinción de Gram: en un portaobjetos se colocó muestra de una colonia bacteriana con asa bacteriológica y se extendió con ayuda de una gota (~5 µl) de agua destilada, el frotis bacteriano se fijó a flama lenta con mechero bunsen, cuidando que no se quemará el frotis. Para la tinción de Gram, el frotis se cubrió con colorante cristal violeta durante 1 minuto, pasado el tiempo se lavó con agua destilada, después se cubrió con una solución de lugol durante un 1 minuto y nuevamente se lavó con agua destilada, posteriormente se decoloró con alcohol-acetona por 5 segundos e inmediatamente se lavó con agua destilada, finalmente

se cubrió con una gota de colorante de safranina por 1 minuto y se procedió a lavar con agua destilada. Para después dejar secar y observar al microscopio con objetivo de 100x.

Prueba de catalasa. Una vez aisladas y purificadas las cepas se realizó la prueba de catalasa para colonia aislada. Para ello, con la ayuda de un asa bacteriológica, en un portaobjetos se colocó una muestra de la colonia bacteriana y se adiciono una gota de agua oxigenada al 30%, observando si hay formación de burbujas como producto de la liberación de oxígeno.

Tolerancia a condiciones salinas. Adicionalmente, cada una de las colonias aisladas se sometió a diferentes concentraciones de NaCl (3%, 4% y 5%) para determinar su tolerancia. El medio empleado para esta prueba fue caldo MRS adicionado con 150 µl de muestra (1% inóculo). El medio se cultivó en incubadora rotatoria por 24 horas a 37 °C para después evaluar la turbidez de los medios.

CHILES EN ESCABECHE (PREPARADO No.2)

Se realizó un nuevo preparado artesanal de chiles jalapeños con zanahoria, col, coliflor, cebolla y especias a una sola concentración de vinagre. Dichos ingredientes fueron adquiridos en un mercado público de la colonia Coyoacán, Ciudad de México.



Figura 2. Chiles en escabeche (Preparado No. 2)

Elaboración de chiles en escabeche (Figura 2). Se utilizaron 500 g de chiles jalapeños, 5 zanahorias medianas, 5 dientes de ajo, 100 g de cebolla, 100 g de coliflor, 100 g de col, 5 pimientas gordas, 5 hojas de laurel, 1 ramita de tomillo, orégano, clavo, 14 g de sal comercial, 14 g de azúcar, 60 ml de aceite de olivo, 500 ml de agua purificada y 500 ml de vinagre blanco. Los chiles jalapeños, zanahorias, cebolla, coliflor y col fueron lavados con agua potable y clorada, para después ser cortados en julianas.

Preparación. Se calentaron 2 litros de agua para escaldar las verduras, en cuanto comenzó a hervir se añadió la verdura y se dejó hervir durante 5 minutos, pasado el tiempo las verduras se colocaron en un colador para eliminar el exceso de agua. Posteriormente, en otra cacerola se calentó el aceite de oliva y se añadió la cebolla picada y los dientes de ajo, así como las

especies de olor (pimienta, laurel, tomillo, orégano y clavo). Se añadió vinagre y agua en una proporción 1:1, además de condimentar con sal y azúcar. El preparado se mezcló y dejó hervir (escabeche) durante 3 minutos. Finalmente, las verduras escurridas se colocaron en un frasco grande y se agregó el escabeche todavía caliente. El frasco se cerró perfectamente y se dejó reposar por 24 horas en un lugar fresco y a temperatura ambiente.

Caracterización microbiológica. Para la caracterización microbiológica se siguió la metodología descrita en el preparado No.1, la cual está esquematizada en la figura 3. Los medios de cultivo utilizados para la caracterización fueron agar Nutritivo, TSA, MRS, selectivo para Estreptococos, SS, MacConkey, y Estafilococos No. 110. La toma de muestra directa del preparado artesanal No. 2 se realizó a las semanas 1, 2 y 3 de conservación.



Figura 3. Esquema de la metodología para el análisis de BAL en chiles en escabeche (preparado No. 2).

CHILES EN ESCABECHE (PREPARADO No.3)

Se realizaron 3 nuevos preparados artesanales de chiles jalapeños con zanahoria, col, coliflor, cebolla y especias, pero variando las concentraciones de vinagre (Figura 4). Dichos ingredientes fueron adquiridos en un mercado de la colonia Coyoacán, Ciudad de México.



Figura 4. Preparado artesanal de chiles en escabeche (preparado No.3). Frasco 1: sin vinagre; frasco 2: 1:1 agua-vinagre; frasco 3: 3:1 agua-vinagre.

Elaboración de chiles en escabeche. Para cada frasco se utilizaron 125 g de chiles jalapeños, 2 zanahorias medianas, 3 dientes de ajo, 50 g de cebolla, 100 g de coliflor, 100 g de col, 4 pimientas gordas, 5 hojas de laurel, 1 ramita de tomillo, orégano, clavo, 14 g de sal comercial, 28 g de azúcar, 20 ml de aceite de olivo. Los chiles jalapeños, zanahorias, cebolla, coliflor y col fueron lavados con agua potable y clorada, para después ser cortados en julianas.

Frasco 1: 500 ml de agua purificada

Frasco 2: 250 ml de vinagre y 250 ml de agua purificada

Frasco 3: 125 ml de vinagre y 375 ml de agua purificada

Preparación. Se calentó 1 litro de agua para escaldar las verduras, en cuanto comenzó a hervir se añadió la verdura y se dejó hervir durante 5 minutos más, pasado el tiempo la verdura se escurrió en colador. Posteriormente, en otra cacerola se calentó el aceite de olivo y se añadió la cebolla picada y los dientes de ajo, así como, las especias de olor (pimienta, laurel, tomillo, orégano y clavo). Se añadió el vinagre, agua, sal, azúcar y se movió y dejó hervir (escabeche) por 3 min. Finalmente, las verduras escurridas se colocaron en los diferentes frascos y se agregó el escabeche aún caliente. Los frascos se cerraron perfectamente y se dejaron reposar por 24 horas en un lugar fresco y a temperatura ambiente.

Caracterización microbiológica. Se realizó la metodología descrita en el preparado No.1, utilizando agar TSA, Nutritivo, PDA, MRS y EMB (Figura 5). Se tomaron muestras individuales de cada uno de los preparados en la semana 1, 2 y 3 para su análisis.



Figura 5. Esquema de la metodología para el análisis de BAL en chiles en escabeche (preparado No.3)

CHILES/COL/COLIFLOR EN SALMUERA (PREPARADO No. 4)

Se realizó el análisis por separado de cada uno de los ingredientes utilizados para la preparación artesanal de chiles en salmuera, así como en mezcla (Figura 6). Dichos ingredientes fueron adquiridos en un mercado de la colonia Coyoacán, Ciudad de México.

Preparados:

- **Muestra 1:** 200 g de chile jalapeño en rodajas
- **Muestra 2:** 180 g de col picada
- **Muestra 3:** 200 g de coliflor picada
- **Muestra 4:** Todos los ingredientes (chile jalapeño, col y coliflor) en proporciones iguales hasta obtener un peso total de 200 g.

A cada uno de los preparados se le adicionó 100 ml de salmuera, la cual se preparó con 10% de sal comercial y 5% de azúcar refinada. Cada muestra se preparó por triplicado (Figura 6).



Figura 6. Preparado artesanal de chile/col/coliflor en salmuera (preparado No. 4)

Preparación. Para la preparación, los chiles jalapeños, la coliflor y la col fueron lavados con agua potable y clorada, para después ser cortados en julianas.

Posteriormente, en frascos individuales de 210 ml se añadió por separado el chile jalapeño, col, coliflor, y en un cuarto frasco todos los ingredientes juntos. A cada frasco se le agregó 100 ml de salmuera, volumen que permitió cubrir por completo cada uno de los ingredientes y la mezcla. Los frascos se taparon y reservaron a temperatura ambiente por 24 horas.

Caracterización microbiológica Se realizó la misma metodología descrita en el preparado No.1 de chiles en escabeche, utilizando agar TSA, PDA, MRS y EMB (Figura 7). La toma de muestra de cada uno de los preparados se realizó en la semana 1, 2 y 3.



Figura 7. Esquema de la metodología para el análisis de BAL en chile/col/coliflor en salmuera (preparado No. 4)

CRECIMIENTO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* EN MEDIO LÍQUIDO ADICIONADO CON MACERADO DE CHILE

Esta nueva metodología implementó el uso de chiles jalapeños como fuente de nutrientes para el crecimiento de una cepa de *Lactobacillus acidophilus*. El medio de cultivo líquido se preparó variando la cantidad de chile jalapeño y de cloruro de sodio (NaCl). Se trabajó por triplicado y con dos controles: uno sin NaCl y otro sin bacteria ni NaCl (Figura 8).

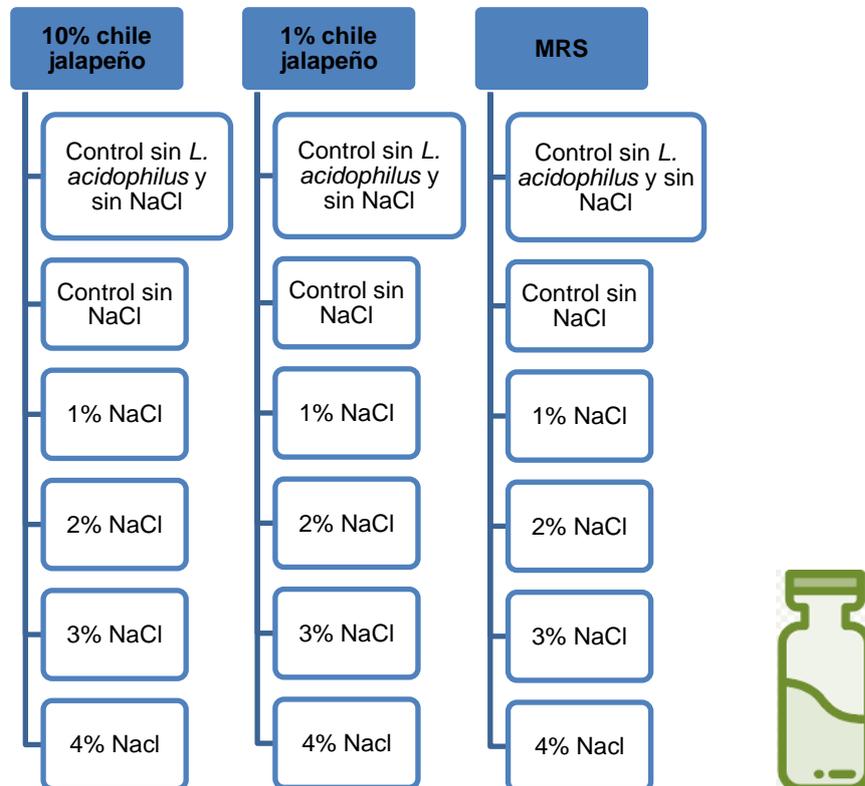


Figura 8. Esquema del análisis de medios líquidos a base de chile jalapeño con diferentes concentraciones de NaCl.

Preparación para medios de cultivo líquidos con chile jalapeño

Los chiles jalapeños fueron lavados con agua potable y clorada, para después ser cortados dependiendo de la cantidad a utilizar.

En un mortero se maceró la cantidad de chile jalapeño a utilizar para 18 viales a preparar. El macerado se pasó por un colador añadiendo de a poco la cantidad de agua necesaria para los 18 viales (7 ml por vial). Así mismo, en cada uno de los viales se vació la cantidad de NaCl correspondiente, es decir, 3 viales con 1%, 2%, 3% y 4% de NaCl, respectivamente. El preparado se agitó suavemente hasta disolver, para después sellar cada uno de los viales. Finalmente, se llevó a esterilización en autoclave a 125 °C durante 15 minutos, y fueron reservados hasta el momento de su uso. Este procedimiento fue realizado por separado para cada una de las concentraciones de chile jalapeño (1 y 10%).

Preparación de medio de cultivo líquido de MRS. Se preparó medio de cultivo líquido MRS para el crecimiento de *L. acidophilus*. Adicionalmente, los medios fueron suplementados con diferentes concentraciones de NaCl.

- Caldo MRS (55 g por cada 1000 ml de agua destilada)

Cantidad de cloruro de sodio (NaCl)	
• 1%	0.28 g de NaCl
• 2%	0.21 g de NaCl
• 3%	0.14 g de NaCl
• 4%	0.07 g de NaCl

El medio de cultivo se preparó según las indicaciones del fabricante. Se preparó la cantidad necesaria para tener 18 viales con 7 ml del medio. Cada triplicado fue adicionado con la cantidad de NaCl correspondiente. Los viales se esterilizaron en autoclave a 125 °C durante 15 minutos; los viales fueron reservados hasta su uso. El pH inicial de cada tratamiento se determinó.

Activación y obtención de inóculo

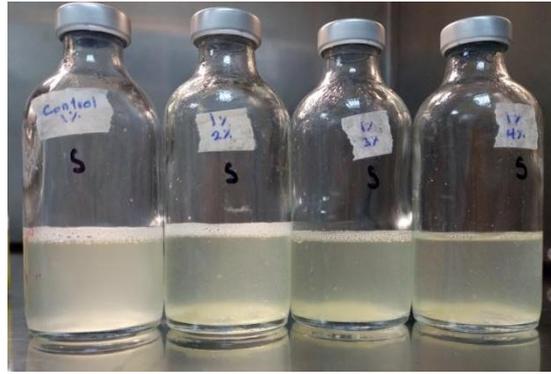
Se utilizó como iniciador de cultivo una cepa de *L. acidophilus*, reconstituida en medio de cultivo sólido MRS, bajo condiciones anaeróbicas, a 37 °C por 24 horas. La biomasa obtenida se centrifugó en un tubo Eppendorf, a 11000 rpm durante 2 minutos, para concentrar las células. Además, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril para eliminar restos de los nutrientes del medio sólido. Para el inóculo, el pellet obtenido se suspendió en 30 ml de agua destilada estéril, que se ajustó a densidad óptica según el estándar de turbidez 0.5 de McFarland, para tener una concentración celular equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml. Del inóculo se tomaron 0.5 ml por vial, los cuales fueron inyectados con jeringas en cada uno de los viales (excepto en controles sin muestra); ya una vez inoculados se llevaron a incubación a 37 °C y 100 rpm, por 24 horas (figura 9).



a)



b)



c)

Figura 9. Medios de cultivo líquidos con *L. acidophilus*.
a) MRS; b) Chile al 10%; c) Chile al 1%.

Caracterización microbiológica. A las 48 horas de crecimiento se tomó una muestra de 30 μ l de cada uno de los caldos, y por goteo se colocó una muestra en medios de cultivo sólidos MRS; lo anterior para llevar un seguimiento del crecimiento de *L. acidophilus*. Los medios se llevaron a incubación por 24 horas a 37 °C, este procedimiento se realizó la semana 1, 2 y 3. Posteriormente, de cada una de las colonias obtenidas se tomó una muestra y observaron las características macroscópicas y microscópicas, para después realizar la prueba de catalasa a cada una de ellas y corroborar la presencia de *L. acidophilus*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fermentación de vegetales ha sido un método tradicional mayormente utilizado para conservar verduras. Algunas de las principales matrices utilizadas para producir vegetales fermentados son el repollo, rábano, chile, jengibre, pepino y aceituna (Xiqian, *et al.* 2023). La producción de vegetales fermentados depende de la fermentación espontánea de bacterias del ácido láctico (BAL) presentes de manera natural en el vegetal (Zhang, *et al.* 2023).

En este trabajo se aislaron bacterias provenientes de 3 diferentes preparados de chiles en escabeche (con vinagre), buscando aislar y caracterizar BAL, así como de un preparado de chile/col/coliflor en salmuera.

Para el primer preparado de chiles en escabeche, después de la inoculación de diluciones en medio MacConkey, SS, Estafilococos No. 110, medio para selección de Estreptococos, nutritivo y MRS, no se logró aislar bacterias, es decir, no hubo crecimiento de BAL en el primer preparado de chiles en vinagre. Cabe destacar que el preparado presentaba un residuo graso y con el objetivo de corroborar si existía interferencia de dicha fase oleosa se tomaron muestras de diferentes profundidades del recipiente (parte oleosa, parte media y fondo del frasco). El resultado del ensayo anterior no mostró crecimiento de bacteria alguna.

Dado los resultados anteriores, se realizó otro ensayo para determinar si los ingredientes presentes en el preparado interferían como agentes externos para el crecimiento de bacterias. Para lo cual se tomó una muestra de chile, el cual se macero y se inoculo en medios de cultivo líquidos (caldo de cultivo MRS, Nutritivo y TSB). A partir de los medios líquidos, se tomaron muestras y se inocularon en medios sólidos, y tras 24 horas de incubación se observó el crecimiento de bacterias a partir sólo de los medios líquidos MRS y TSB. Resultados que indican que las bacterias posiblemente se encuentren dentro las células vegetales del chile jalapeño y no en el medio exterior. Sin embargo, las bacterias aisladas no corresponden a

alguna especie de lactobacilos, ya que, al realizar la prueba de catalasa, esta dio positiva. Cabe destacar que el pH de este preparado fue de 2.62.

Al no obtener un resultado satisfactorio de crecimiento bacteriano con el preparado 1, se realizó un segundo preparado de chiles en escabeche, en este segundo preparado (preparado 2) se realizó un procedimiento similar al primero. Se prepararon diluciones y se inocularon en los medios de cultivo sólidos en una primera toma de muestra (semana 1). Como resultado de este ensayo, no se encontró presencia de BAL ni fue posible su apreciación y conteo de UFC, debido a la contaminación del preparado por parte de otros microorganismos de rápido crecimiento. Sin embargo, en la última toma de inóculo (semana 3) y posterior a la inoculación en medios de cultivo sólidos, ya no se obtuvo desarrollo alguno de microorganismos, tanto enteropatógenos, como propios del preparado. Con relación al pH del preparado, el pH inicial fue de 3.40 y el final de 3.34.

En la preparación de un tercer producto de chiles en escabeche, se evaluó si la proporción de vinagre adicionada a la preparación era un determinante para el desarrollo tanto de BAL como de microorganismos enteropatógenos, posterior a la toma de muestra e inoculación de este preparado (preparado 3) en medios de cultivo sólidos, no se observó crecimiento de ningún microorganismo en aquellos preparados que tenían vinagre (proporción vinagre/agua 1/1 $\text{pH} \cong 3$; vinagre/agua 1/3 $\text{pH} \cong 3.2$) encontrando así, que la adición de vinagre si es un determinante en estas preparaciones para el control del crecimiento de microorganismos. Lo anterior se sustenta con los resultados obtenidos del preparado que no contenía vinagre ($\text{pH} \cong 3.3$), el cual, desde la primera toma de muestra, que fue a los 7 días, mostró crecimiento de microorganismos en los diferentes medios (EMB, TSA, Nutritivo, PDA y MRS). Cabe destacar que en este preparado sin vinagre, y que en la primera inoculación se obtuvo el desarrollo de bacterias, específicamente bacilos, el muestreo posterior mostró un aumento en el desarrollo de cocos y levaduras, originarios de la descomposición del preparado, siendo visible en el frasco. En la figura 10, se puede ver cómo pasadas las semanas hubo una disminución en el número de bacterias en el producto sin vinagre, hasta llegar a la semana 4 donde ya no hubo desarrollo de ningún tipo de bacteria, pero sí de levaduras que no fueron contabilizadas, así mismo, durante estas 4 semanas los valores de pH se mantuvieron constantes en un rango de 3.4 a 3.3.

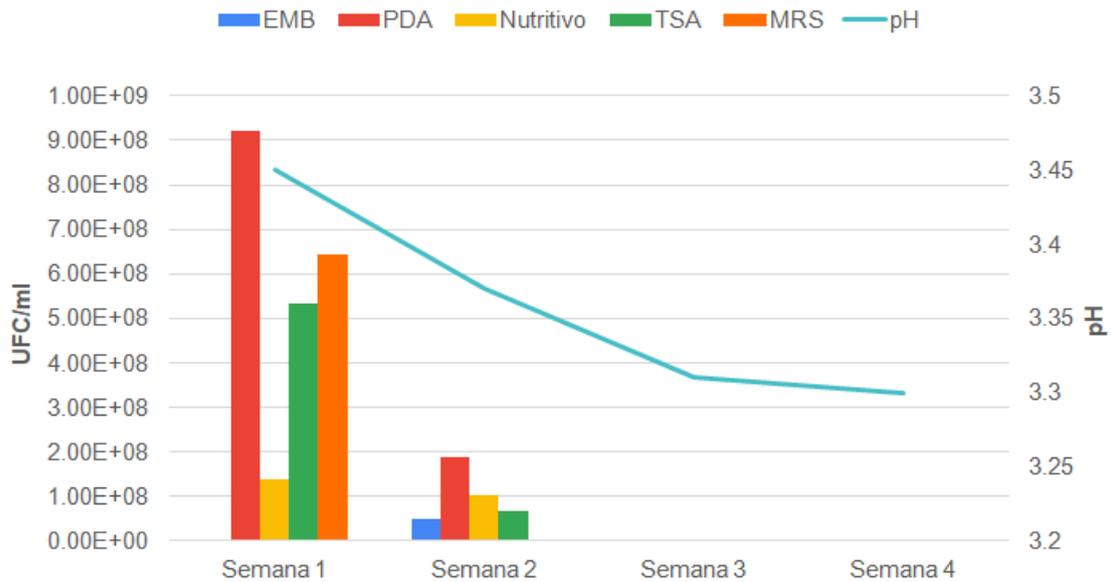


Figura 10. Desarrollo de UFC/ml y acidez del preparado 3 sin vinagre con respecto al tiempo.

Muchas de las características organolépticas de los preparados, sobre todo aquellos que son el resultado de la fermentación puede verse influenciada por la adición de sal, glucosa y algunos ácidos, influyendo en el pH de las preparaciones (Vegas, *et al.* 2018). En los primeros preparados de chiles en escabeche, con la adición de vinagre, se observaron valores de pH por debajo de 3.5, infiriendo que el efecto del pH afectó el crecimiento de BAL y por lo tanto impidiendo la obtención de biomasa. A pesar de que se ha reportado que la mayoría de las especies de BAL pueden tolerar un pH inferior a 5.0, es de gran importancia determinar un pH óptimo, ya que un pH inadecuado puede resultar en un efecto negativo sobre el crecimiento de microorganismos, debido a alteraciones en la estabilidad de sus membranas, dificultando su capacidad de intercambio iónico e inhibiendo su actividad enzimática (Vera, *et al* 2020).

Existen variaciones en los procedimientos de producción utilizados para diferentes verduras fermentadas. Una de las técnicas de fermentación predominantes es el encurtido en salmuera, y para esta técnica se aplican comúnmente dos tipos de procedimientos: el primero es usando salmuera completamente fresca como se hizo en esta investigación, y el segundo es usando salmuera fresca mezclada con salmuera reutilizada en una cierta proporción, lo que contribuye en la aromatización de las verduras encurtidas (Zhang, *et al.*, 2023).

Es así como debido al poco crecimiento de BAL en productos con vinagre, se realizó un cuarto producto a base de chiles/col/coliflor en salmuera con 10% de sal, siendo esta la concentración más baja de sal que se puede utilizar sin efectos perjudiciales. Ya que una concentración elevada de sal para una salmuera, como por ejemplo 17%, inhibe por completo el crecimiento de BAL (López, 2010).

Para la preparación con chiles y en base en el conteo del número de colonias obtenidas, se calculó el número de UFC/ml en los medios de cultivo MRS, EMB, TSA y PDA; los valores obtenidos fueron del orden de 10^4 UFC/ml para la semana 1 en todos los medios, y un promedio del orden de 10^5 en medio TSA y PDA y de 10^6 en medio MRS a la semana 3 (Figura 11). Así mismo, para el preparado con col, se obtuvo un valor promedio del orden de 10^4 en medios MRS, TSA y PDA a la semana 1 y un promedio del orden de 10^5 a la semana

3 (Figura 12). En ambos preparados (chile y col) se observó un incremento en el crecimiento de bacterias con respecto al tiempo y un decremento en el pH de los productos.

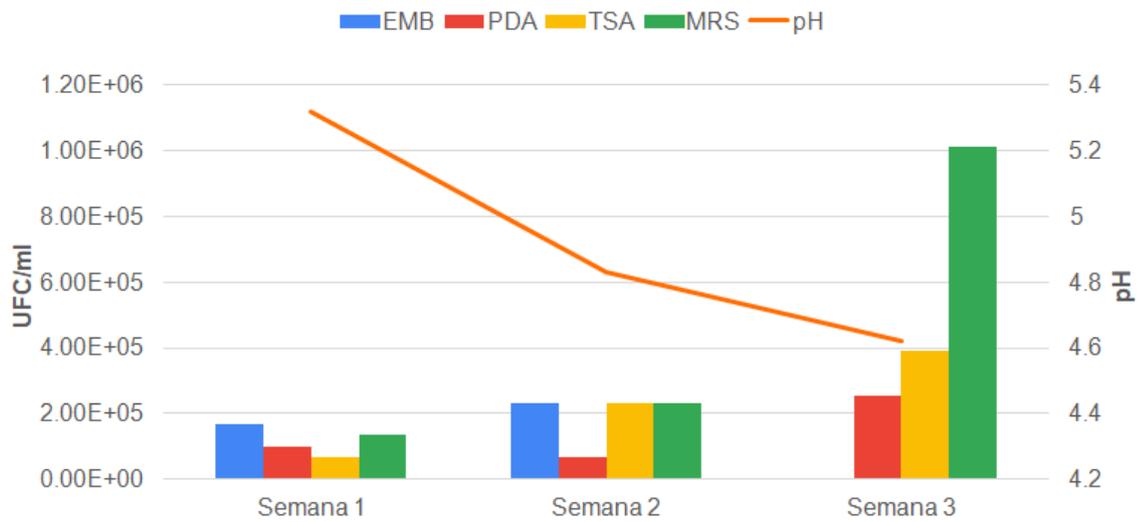


Figura 11. Desarrollo de UFC/ml y acidez en Chile con respecto al tiempo en medios de cultivo.

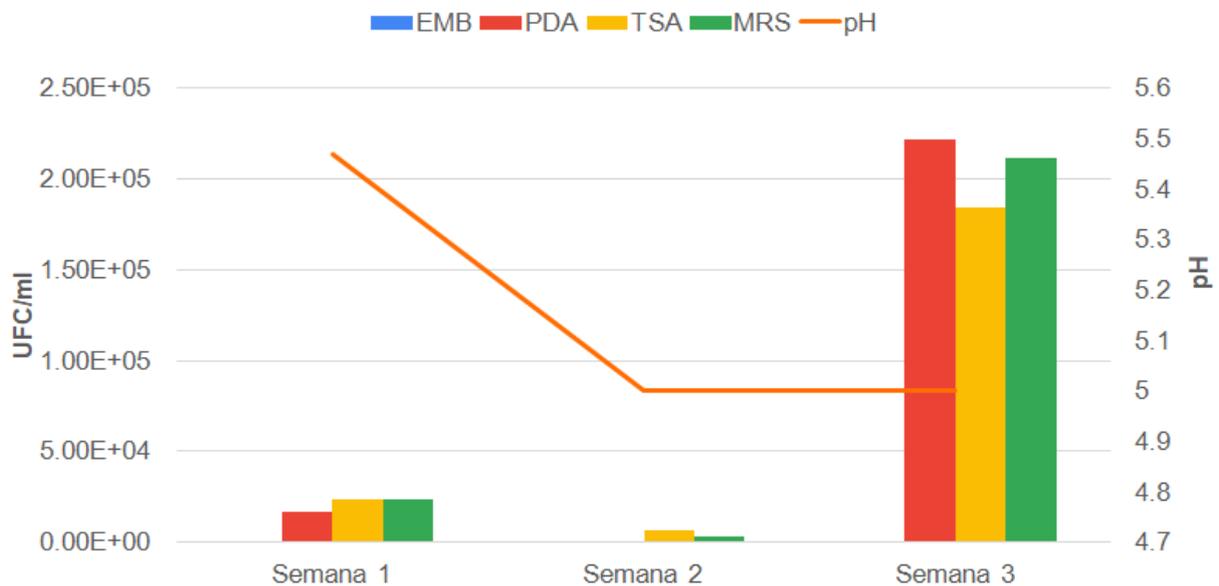


Figura 12. Desarrollo de UFC/ml y acidez en col con respecto al tiempo en medios de cultivo.

Por otro lado, para los preparados con coliflor y la mezcla de vegetales se obtuvieron valores en un orden de 10^7 en los medios MRS, EMB, TSA y PDA a la semana 1 y de 10^6 en la semana 3 (Figura 13), valores en el orden de 10^6 en la semana 1 y de 10^5 en la semana 3, respectivamente (Figura 14).

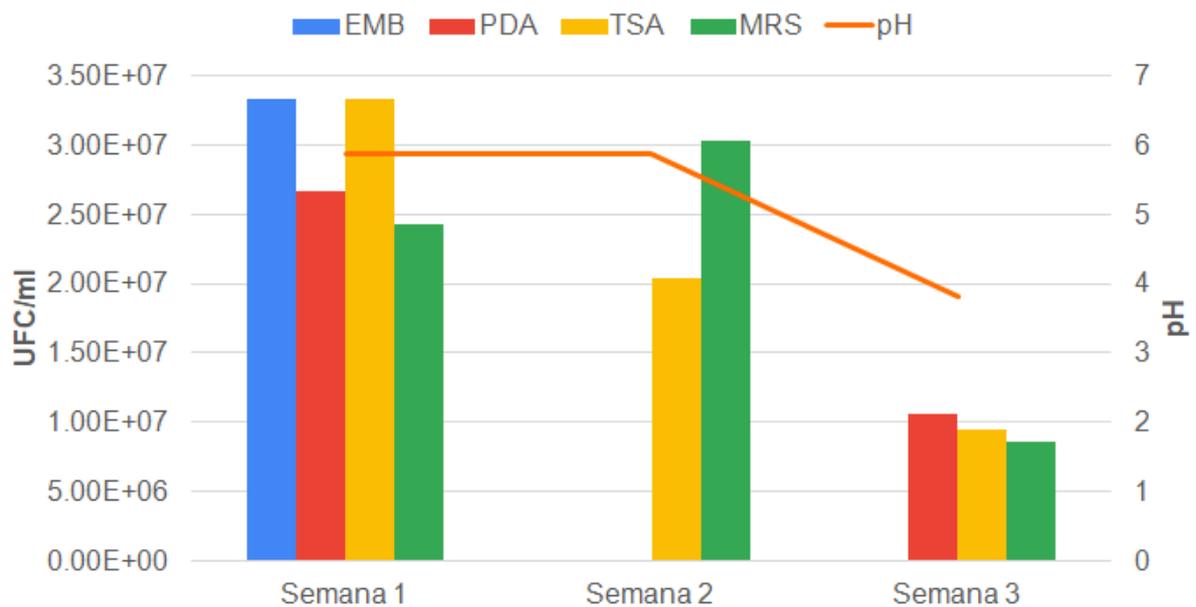


Figura 13. Desarrollo de UFC/ml y acidez en coliflor con respecto al tiempo en medios de cultivo.

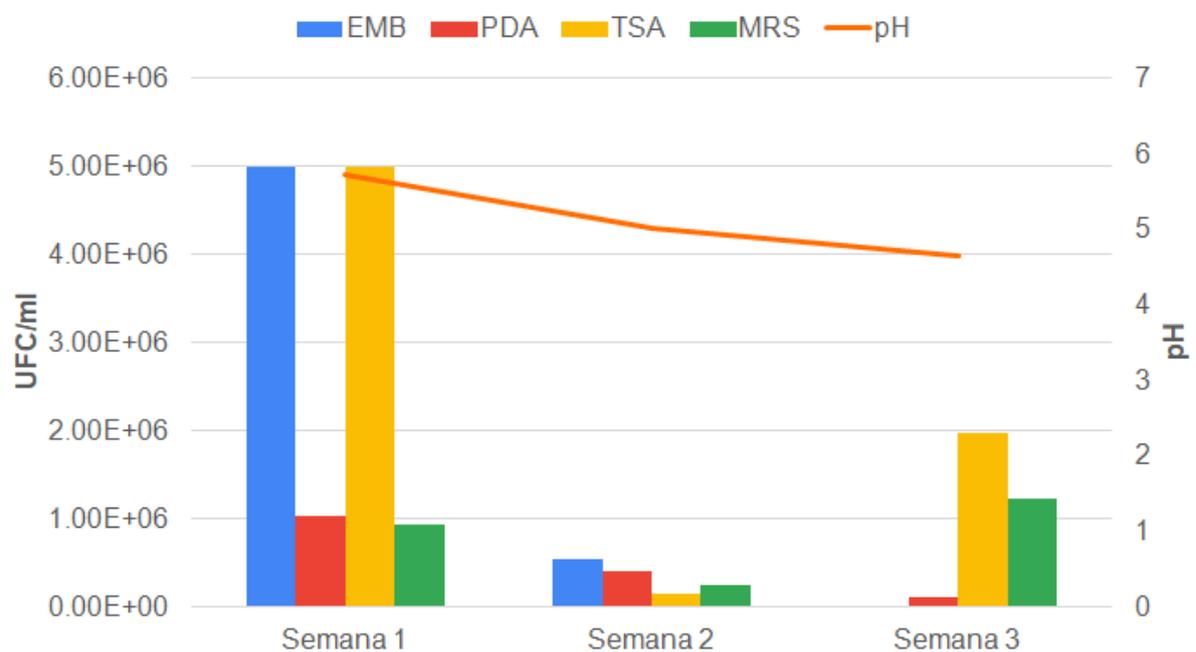


Figura 14. Desarrollo de UFC/ml y acidez en chile/col/coliflor con respecto al tiempo en medios de cultivo

Los resultados indican una disminución en el número de microorganismos en ambos casos (coliflor y mezcla de vegetales). Se sabe que una solución de salmuera con una alta concentración de sales extrae azúcar y agua de las verduras, ya que la sal penetra en el vegetal a través de los poros formados en la superficie en respuesta al cambio de presión externa, considerándose como el paso primario y significativo en la fermentación. Para la piel de superficie rígida o lisa de algunas verduras que carecen de poros, la difusión de la sal se retrasa, lo que puede resultar en un período de fermentación más prolongado, lo que ocasiona

que puede requerir varios meses para obtener los resultados esperados de los encurtidos (Xiqian, et al. 2023). Lo anterior deriva en la razón por la que puede existir un decremento en el número de UFC en coliflor a comparación con el chile y la col, ya que no se permitía tener los azúcares necesarios por parte del vegetal para la supervivencia de las bacterias.

Respecto al pH, al inicio permaneció constante en cada uno de los preparados (chile/col/coliflor), en un rango de 5.4, pero al final del ensayo, el pH decreció a 4.62 para chile; 5.0 Col; 3.81 Coliflor y 4.64 para la mezcla de vegetales. Existe la posibilidad de que los cambios de pH continúen al aumentar el tiempo de fermentación, ya que dicho proceso puede durar desde varios días y hasta meses (Xiqian, et al. 2023).

Es importante mencionar que, al finalizar el tratamiento de los preparados, estos comenzaron a presentar en la superficie contaminación y una aparente descomposición de los vegetales. Además, se observó la presencia de levaduras, siendo importante la calidad de las verduras que puede verse afectada por el metabolismo de la población microbiana durante el proceso de fermentación, que incluye microorganismos complejos, especialmente la comunidad microbiana autóctona, la actividad de las enzimas, las variedades de los condimentos y las condiciones de fermentación (Xiqian, et al. 2023).

Algunas de las bacterias que se lograron aislar de los tres preparados de chiles en escabeche y de los preparados de chiles/col/coliflor en salmuera, se sometieron a un proceso de caracterización macroscópica de las colonias, seleccionando aquellas que tenían una forma redonda, tamaño pequeño, con bordes enteros, convexa, cremosa y de color blanquecina. Posteriormente, fueron evaluadas mediante frotis teñidos con tinción de Gram, obteniendo 11 aislados Gram positivos, de los cuales 4 fueron cocos y 7 bacilos. Cabe destacar que se ha reportado que las bacterias Gram positivas son los principales organismos responsables del proceso de fermentación en las etapas iniciales (Vegas, et al. 2018). En cuanto a morfología, los resultados obtenidos se pueden relacionar con los géneros ya reportados de *Lactobacillus* y *Carnobacterium*, ya que estos son bastones o bacilos, mientras que los demás géneros tienen forma de cocos, con excepción del género *Weissella* que pueden tener forma tanto de bastones como de cocos (Bar Zakas et al. 2017). En cuanto a la caracterizaron mediante prueba de catalasa, todos los aislados no fueron capaces de producir burbujeo cuando se mezclaron con peróxido de hidrogeno (H_2O_2), mostrando ausencia de la enzima catalasa, característica de las especies de *Lactobacillus* (Goyal, et al. 2012). Por último, se evaluó el efecto del NaCl sobre los aislados, utilizando concentraciones de 3%, 4% y 5%; los resultados se obtuvieron visualmente y en función de la intensidad de la turbidez, obteniendo resultados positivos, es decir, microorganismos con la capacidad de crecimiento en las diferentes concentración de NaCl. De acuerdo con Tegenaw y colaboradores (2023), *Lactobacillus* puede sobrevivir a concentraciones de 1.5% – 6% de NaCl y para evitar una reducción excesiva del pH por el ácido láctico, las bacterias bombean álcali al exterior y convierten el ácido libre en su forma de sal, elevando la presión osmótica sobre las células bacterias, siendo así que el aislamiento de posibles cepas de bacterias lácticas depende de las características de alta osmotolerancia (tabla 2 y tabla 3).

Tabla 2. Características y número de aislamientos por experimento en preparados de chile jalapeño en escabeche.

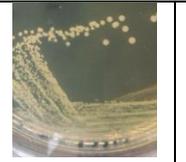
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3				
Tiempo de conservación	1 año	19 días	24 días				
Muestra	Macerado	Líquido	Líquido (sin vinagre)				
#de cepas	1	1	5				
Morfología colonial							
Morfología celular	Coco	Bacilo	Bacilo		Coco		
	1	1	2		3		
Tinción de Gram	+	+	+		+		
Catalasa	-	-	-		-		
3% NaCl	+	+	+		+		
4% NaCl	+	+	+		+		
5% NaCl	+	+	+		+		

Tabla 3. Características y número de aislamientos en preparados de chile jalapeño, col, coliflor y mezclado en salmuera.

	Chile	Col	Coliflor	Chile/Col/Coliflor
Tiempo de conservación	20 días	20 días	20 días	20 días
Muestra	Líquido	Líquido	Líquido	Líquido
# de cepas	1	1	1	1
Morfología colonial				
Morfología celular	Bacilo	Bacilo	Coco	Bacilo
Tinción de Gram	+	+	+	+
Catalasa	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+
4% NaCl	+	+	+	+
5% NaCl	+	+	+	+

Múltiples comunidades microbianas interactúan dentro del complejo microambiente microbiano de las verduras fermentadas. Estudios han demostrado que las especies de *Lactobacillus* y *Candida*, específicamente, *Lactobacillus brevis* y *Candida* sp. F15, son los que dominan en la fermentación de chiles (Ye, et al., 2022)

Como resultado de la evaluación del crecimiento de *L. acidophilus* en un medio de cultivo líquido utilizando como única fuente de nutriente el chile jalapeño, después de la semana 1 de inoculación se demostró la supervivencia de la cepa en los medios con 1% y 10% de chile y en los medios de MRS, sin embargo, en la semana 2 ya no había crecimiento en los medios MRS, pero si en los medios a base de chile (Tabla 4). Además, se realizó la caracterización de las colonias aisladas y mediante tinción de Gram se verificó el crecimiento de *L. acidophilus*, observando así un crecimiento positivo de BAL con este tipo de alimentos. Se ha reportado que las BAL adicionadas a este tipo de alimentos aprovechan como fuente de

carbono adicional la pectina presente en los chiles, que debido a la acción de enzimas específicas (pectinasas) generan sacáridos (Martínez, *et al.* 2006), haciendo factible utilizar las matrices vegetales como sustrato para microorganismos probióticos.

Tabla 4. Desarrollo de *L. acidophilus* en medios de cultivo líquidos con 1% chile, 10% chile y MRS

	Semana 1	Semana 2	Semana 3
	Morfología colonial		
MRS			
Control sin bacteria	Nulo	Nulo	Nulo
Control sin NaCl	Bacilos	Nulo	Nulo
1% NaCl	Bacilos	Nulo	Nulo
2% NaCl	Bacilos	Nulo	Nulo
3% NaCl	Bacilos Cocos	Nulo	Nulo
4% NaCl	Cocos	Nulo	Nulo
Chile al 1%			
Control sin bacteria	Nulo	Nulo	Nulo
Control sin NaCl	Bacilos	Bacilos	Nulo
1% NaCl	Bacilos	Bacilos	Nulo
2% NaCl	Bacilos	Bacilos	Nulo
3% NaCl	Bacilos	Nulo	Nulo
4% NaCl	Nulo	Cocos	Cocos
Chile al 10%			
Control sin bacteria	Nulo	Nulo	Nulo
Control sin NaCl	Bacilos	Bacilos	Nulo
1% NaCl	Bacilos	Bacilos	Nulo
2% NaCl	Bacilos	Bacilos	Nulo
3% NaCl	Bacilos	Bacilos	Nulo
4% NaCl	Nulo	Cocos	Cocos

CONCLUSIÓN

De los 3 preparados de chiles en escabeche y uno de chiles en salmuera, se logró aislar un total 11 cepas de bacterias. Todas fueron caracterizadas en base a la morfología macroscópica y microscópica de sus colonias, entre otras características. El aislamiento permitió la obtención de colonias redondas, de tamaño pequeño, con bordes enteros, convexa, cremosa y de color blanquecina. Todas las cepas fueron bacterias Gram positivas, de las cuales 7 fueron bacilos y 4 fueron cocos. No se obtuvieron microorganismos catalasa positiva y fueron resistentes a concentraciones de hasta 5% en NaCl.

En conjunto, los resultados mostraron posibles aislamientos de BAL. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que en las fermentaciones vegetales existen muchos microorganismos que pueden afectar la calidad y la seguridad de los productos, siendo importante tomar en cuenta factores como el pH, la disponibilidad de oxígeno, la temperatura, los nutrientes, la concentración de sal que pueden influir en la optimización del proceso de fermentación, afectando el crecimiento de las BAL. Así mismo, el uso de vegetales como ingrediente principal para la supervivencia óptima de cepas probióticas es una iniciativa factible, que permite darle un valor adicional a ciertos vegetales y/o productos, por lo que sería importante seguir con la investigación de este tipo de matrices vegetales, aprovechando también las propiedades bioactivas únicas de los vegetales y sus posibles efectos terapéuticos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agostini, T., da Silva, I., Martins, L., Becker, F., & da Costa, C. (2017). Carotenoid and total vitamin C content of peppers from selected Brazilian cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 57, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.020>.
2. Andreu, M, & Saavedra, C. (2022). El rol de los fermentos en la sostenibilidad alimentaria. *Nutrición Hospitalaria*, 39(spe3), 56-59. <https://doi.org/10.20960/nh.04313>
3. Bhattacharya, D., Kumar, P., Pateiro, M., Lorenzo, J., Dhar, P & Das, A. (2022). Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins: Novel Biotechnological Approach for Biopreservation of Meat and Meat Products. *Microorganisms*, 10(10), 2058. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102058>
4. Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria: their applications in foods. *Journal of Bacteriology & Mycology*, 6(2), 89-94. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00182>.
5. Ceniceros, J. (2022). *Rendimiento, Calidad e Inocuidad de Chile Jalapeño (Capsicum annuum) con Fertilización Orgánica*. UJED. (Citado 27/11/2023). Disponible en: <http://repositorio.ujed.mx/jspui/handle/123456789/194>
6. Cervantes, A. (2019). Bacterias ácido lácticas aisladas de fuentes vegetales: capacidad probiótica y de inhibición del desarrollo de *Helicobacter pylori*.

Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. Disponible en:
<http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/jspui/handle/231104/2618>

7. Dimidi, E., Cox, R., Rossi, M. & Whelan, K. (2019). Fermented Foods: Definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. *Nutrients*, 11(8): 1806. <https://doi.org/10.3390/nu11081806>
8. FIRCO. (2017). *Chile, producto tradicional de la gastronomía mexicana*. Gobierno de la Ciudad de México (Citado 27/11/023). Disponible en: <https://www.gob.mx/firco/articulos/chile-producto-tradicional-de-la-gastronomia-mexicana?idiom=es>
9. Gunawardena, S., Nadeeshani, H., Amarasinghe, V. & Liyanage, R. (2024). Bioactive properties and therapeutic aspects of fermented vegetables: a review. *Food Prod Process and Nutr*, 6(31). <https://doi.org/10.1186/s43014-023-00176-7>
10. Goyal, R., Dhingra, H., Bajpai, P. & Joshi, N. (2012). Characterization of the *Lactobacillus* isolated from different curd samples. *African Journal of biotechnology*, 11(79). 14448-14452. <https://doi.org/10.5897/AJB11.310>
11. Liu, W., Pang, H., Zhang, H & Cai, Y. (2014). Biodiversity of lactic acid bacteria. In *lactic acid bacteria*; Zhang, H., Cai, Y., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands. pp.103–203. https://doi.org/10.1007/978-94-017-8841-0_2
12. Lopez, C. (2020): Salmuera en alimentos. Universidad Nacional Autónoma de Honduras. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/344591760_Salmuera_en_alimentos_TECNOLOGIA_DE_ALIMENTOS_UNIVERSIDAD_NACIONAL_AUTONOMA_DE_HONDURAS
13. López, H. (2010). Desarrollo y evaluación de un chile jalapeño (*Capsicum annuum*) en salmuera y su diseño de planta. Zamorano. Disponible en: AGI-2010-T023.pdf
14. Lorenzo, A., Ríos, G., Dávila, M., & Vélez, J. (2017). Chiles en escabeche. *ReCiTeIA*, 15(2), 30-54.
15. Manna, M., Han, G., Seo, Y., & Park, I. (2021). Evolution of Food Fermentation Processes and the Use of Multi-Omics in Deciphering the Roles of the Microbiota. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(11), 2861. <https://doi.org/10.3390/foods10112861>
16. Martínez, I., Miranda, N., González, L. & Nieto, F. (2006). Estudios preliminares de la fermentación de chile jalapeño (*Capsicum annuum* L.). *Investigación universitaria multidisciplinaria*. 5(1). 36-42.
17. Mosqueda, M., Ortiz, M., González, N., Ceballos, É., & Jiménez, R. (2019). Conservación artesanal de chiles jalapeños mediante procesos sustentables. *Cien. Tecn. Agrollania*, 18(1), 1-10.

18. Obinwanne, C., Dong, K., Wang, Y., Gao, L., Li, X., Wu, Y., & Jiang, J. (2022). Comparative genomics reveals the organic acid biosynthesis metabolic pathways among five lactic acid bacterial species isolated from fermented vegetables. *New biotechnology*, 70, 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.05.001>
19. Onyeaka, H & Nwabor, O. (2022). Chapter 11 - Lactic acid bacteria and bacteriocins as biopreservatives. *Food preservation and safety of natural products*. 147-162. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85700-0.00012-5>
20. Parvez, S., Malik, A., Ah Kang, S., Kim, Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1171–1185.
21. Pérez, B., & Cardoso, G. (2020). Traditional fermented beverages in Mexico: Biotechnological, nutritional, and functional approaches. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 136, 109307. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109307>
22. Puntillo, M. & Vinderola, G. (2021). Impacto de los alimentos fermentados en la microbiota intestinal. *An Microbiota Probioticos Prebioticos*, 2(1), 109-112. https://siampyp.org/wp-content/uploads/2021/06/vol2_num1.pdf
23. Robledo, K., Ramírez, V., González, A., Ramírez, Y., García, L., & Trujillo, J. (2021). Research opportunities: Traditional fermented beverages in Mexico. Cultural, microbiological, chemical, and functional aspects. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 147, 110482. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110482>
24. SADER. (2021). *Creció 2.7 por ciento la producción de chile verde en México en 2020 y registra mayor demanda en los mercados internacionales*. Gobierno de la Ciudad de México. (Citado 27/11/2023). Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/crecio-2-7-por-ciento-la-produccion-de-chile-verde-en-mexico-en-2020-y-registra-mayor-demanda-en-los-mercados-internacionales?idiom=es#:~:text=y%20Desarrollo%20Rural,-,El%20chile%20se%20produce%20en%20pr%C3%A1cticament>
25. Sáez, D., Flomenbaum, L., & Zárate, G. (2018). Lactic Acid Bacteria from Argentinean Fermented Foods: Isolation and Characterization for their Potential Use as Starters for Fermentation of Vegetables. *Food technology and Biotechnology*, 56(3), 398–410. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.03.18.5631>
26. Sandoval, J., Valdez, M., Oomah, D., Gutiérrez, R., Medina, S., & Espinosa, G. (2017). Bioactive compounds and antioxidant activity in scalded Jalapeño pepper industrial byproduct (*Capsicum annum*). *Journal of food science and technology*, 54(7), <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2636-2>
27. Sánchez, B., Cuevas, V., Góngora, R., & De la Torre, J. (2020). Caracterización del consumidor de chile jalapeño en Quintana Roo. *Memoria de XXXII Semana Internacional de Agronomía, s.n.*, 160-165.

28. Sánchez, B., Camarena, D., López, A., & Cuevas, V. (2023). Consumer Preferences of Jalapeño Pepper in the Mexican Market. *Horticulturae*, 9(6), 1-15.
29. Sánchez, P., Rodríguez, F., González, N., Luna, A., & Jiménez, R. (2019). Efecto antimicrobiano del jugo de chile jalapeño (*Capsicum annum* var. *annuum*) en queso sopero. *European Scientific Journal*, 15(33), 238-253. <https://doi.org/10.19044/esj.2019.v15n33p238>
30. Tamang, J. P. (2014). *Biochemical and modern identification techniques. Microfloras of Fermented Foods. Encyclopedia of Food Microbiology*, 250–258. doi:10.1016/b978-0-12-384730-0.00038-0
31. Torán, P., Deba, S., Estrada, O., Pardo, G., & Vázquez, L. (2023). Physicochemical and Sensory Evaluation Data to Drive the Development of a Green Chili Pepper Hot Sauce from Unexploited Raw Materials. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(19), 3536. <https://doi.org/10.3390/foods12193536>
32. Tamang, P., Cotter, D., Endo, A., Han, S., Kort, R., Liu, Q & Hutkins, R. (2020). Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. doi:10.1111/1541-4337.12520
33. Torres, S., Verón, H., Contreras, L., & Isla, M. (2020). An overview of plant-autochthonous microorganisms and fermented vegetable foods. *Food Science and Human Wellness*, 9(2), 112-123. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2020.02.006>.
34. Vargas, T. & Kuno, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de actualización clínica*, 49(2). 2594-2598.
35. Varzakas, T., Zakyntinos, G., Proestos C. & Radwanska M. (2017). Fermented vegetables. In: *Minim Process Refrig Fruits Veg*. 537-584. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7018-6_15.
36. Vegas, C., Zavaleta, A. & Zarzoso, B. (2018). Optimization of fermentation process conditions for chili pepper (*Capsicum frutescens*) fruit using Response Surface Methodology. *Agronomía colombiana*, 36(1), 89-97. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v36n1.69164>
37. Vera, M & Rodriguez, W. (2020). Effect of pH on the growth of three lactic acid bacteria strains isolated from sour cream. *Universitas Scientiarum*, 25(2), 341-358. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.SC25-2.eopo>
38. Wang, J., Wang, R., Xiao, Q., Liu, C., Jiang, L., Deng, F., & Zhou, H. (2019). Analysis of bacterial diversity during fermentation of Chinese traditional fermented chopped pepper. *Letters in applied microbiology*, 69(5), 346–352. <https://doi.org/10.1111/lam.13212>
39. Tan X, Cui F, Wang D, Lv X, Li X, Li J. (2024). Fermented vegetables: Health benefits, defects, and current technological solutions. *Foods*, 13(1), 38. <https://doi.org/10.3390/foods13010038>

40. Tegenaw, K., Maina, K. & Birhan, N. (2023). Characterization of potential probiotics Lactobacillus species isolated from the gastrointestinal tract of Rhode Island Red (RIR) chicken in Ethiopia. *Heliyon*, 9(1). E17453. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17453>
41. Ye, Z., Shang, Z., Zhang, S., Li, M., Zhang, X., Rend, H., Hu, X. & Yi, J. (2022) Dynamic analysis of flavor properties and microbial communities in Chinese pickled chili pepper (*Capsicum frutescens* L.): A typical industrial-scale natural fermentation process. *Food research international*, 153(1). 100952. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.110952>
42. Yuan Y, Yang Y, Xiao L, Qu L, Zhang X, Wei Y. (2023) Advancing insights into probiotics during vegetable fermentation. *Foods*, 12(20), 3789. <https://doi.org/10.3390/foods12203789>
43. Zamora, E., García, I., & González, R. (2017). Usos Industriales del Chile (*Capsicum* sp.). *TecnoCultura*, 42. Disponible en: <https://tecnocultura.org/index.php/Tecnocultura/article/view/86>
44. Zhang, S., Xiao, Y., Jiang, Y., Wang, T., Cai, S., Hu, X., & Yi, J. (2022). Effects of brines and containers on flavor production of chinese pickled chili pepper (*Capsicum frutescens* L.) during natural fermentation. *Foods (Basel, Switzerland)*, 12(1), 101. <https://doi.org/10.3390/foods12010101>