



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN DESARROLLO REGIONAL Y
TECNOLÓGICO**

TESIS

**"ANÁLISIS BROMATOLÓGICO Y AISLAMIENTO DE
MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO DEL PULQUE
PROVENIENTE DE LA REGION MIXTECA DEL ESTADO DE OAXACA"**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestra en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico

PRESENTA

Cynthiarel Cerero Calvo

DIRIGIDA POR

Dr. Iván Antonio García Montalvo

CO-DIRIGIDA POR

Dra. Alma Dolores Pérez Santiago

ASESORES

Dr. Marco Antonio Sánchez Medina

Dra. Diana Matías Pérez

Oaxaca de Juárez, Oaxaca, diciembre de 2022

Oaxaca de Juárez, Oax., **10/noviembre/2022**

Oficio No. DEPI/745/2022

Asunto: Autorización de impresión de tesis.

ING. HUITZILÍ DÍAZ JAIMES
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE SERVICIOS ESCOLARES.
P R E S E N T E.

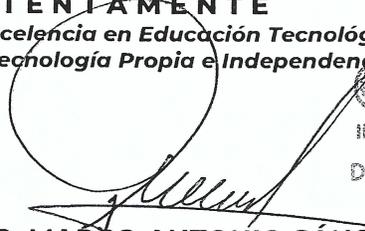
Por este medio comunico a usted, que de acuerdo con las disposiciones establecidas en los Lineamientos para la operación de estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública, la estudiante Cynthiareel Cerero Calvo con número de control M20161903, ha cumplido con todas las recomendaciones que el Comité Revisor hizo respecto a su tesis cuyo título es: "ANÁLISIS BROMATOLÓGICO Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO DEL PULQUE PROVENIENTE DE LA REGIÓN MIXTECA DEL ESTADO DE OAXACA", para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico.

Por lo anterior, la División a mi cargo le concede la autorización para que proceda el trámite correspondiente y la impresión de la misma.

ATENTAMENTE

Excelexencia en Educación Tecnológica®

"Tecnología Propia e Independencia Económica"



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN.

MASM/FFA/*cmh





Oaxaca de Juárez, Oax., **10/noviembre/2022**

Oficio No. DEPI/756/2022

ASUNTO: Autorización de impresión de tesis.

C. CYNTHIAREL CERERO CALVO
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN DESARROLLO REGIONAL Y TECNOLÓGICO
P R E S E N T E.

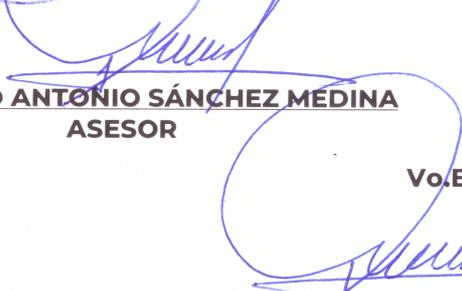
De acuerdo con las disposiciones para la Operación de Estudios de Posgrado e Investigación del Tecnológico Nacional de México, dependiente de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora le hizo con respecto a su Tesis para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, cuyo título es: "ANÁLISIS BROMATOLÓGICO Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO DEL PULQUE PROVENIENTE DE LA REGIÓN MIXTECA DEL ESTADO DE OAXACA", los abajo firmantes, integrantes de la Comisión Revisora le concedemos la autorización para que proceda a la Impresión de la misma.

A T E N T A M E N T E

Excelencia en Educación Tecnológica
"Tecnología Propia e Independencia Económica"


DR. IVÁN ANTONIO GARCÍA MONTALVO
DIRECTOR


DRA. ALMA DOLORES PÉREZ SANTIAGO
CO-DIRECTORA


DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA
ASESOR


DRA. DIANA MATÍAS PÉREZ
ASESORA


DR. MARCO ANTONIO SÁNCHEZ MEDINA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Vo.Bo. EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE OAXACA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

MASM/EPA*cmh





CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS.

En la Ciudad de Oaxaca de Juarez, Oaxaca, el día 09 del mes de Noviembre del año 2022, el(la) que suscribe Cynthiareel Cerero Calvo estudiante del programa de Maestría en Ciencias en Desarrollo Regional y Tecnológico, con número de control M 20161903, manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis, que se desarrolló bajo la dirección de Dr. Ivan Antonio Garcia Montalvo y cede los derechos del trabajo titulado: "ANÁLISIS BROMATOLÓGICO Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL PROBIÓTICO DEL PULQUE PROVENIENTE DE LA REGIÓN MIXTECA DEL ESTADO DE OAXACA."

al TecNM/Instituto Tecnológico de Oaxaca para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información del presente trabajo no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido solicitándolo a la siguiente dirección: cerero.cync@gmail.com

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente


Cynthiareel Cerero Calvo

Nombre y firma

Agradezco:

A mi alma mater, el Instituto Tecnológico de Oaxaca quien me permitió volver a estar en sus aulas y que ha sido un gran apoyo en mi crecimiento profesional y como ser humano.

Al Dr. Iván Antonio García Montalvo por su confianza, infinita paciencia y tolerancia para llevar a cabo este proyecto, del cual obtuve una gran enseñanza y experiencia.

A la Dra. Alma Dolores y a la Dra. Diana quienes dedicaron de su tiempo para brindarme conocimientos en el área de microbiología y biología molecular. Al Dr. Marco Medina por sus consejos, su orientación, su gran apoyo y por hacer del posgrado una experiencia muy grata.

A Gabriel, Cecy, Betty y Edmar por brindarme su apoyo en retomar la practica de laboratorio, en compartir muy buenos momentos, por brindarme también su amistad la cual voy a llevar conmigo siempre en el corazón. A Ale y Auro por sus consejos risas y buena platica, hicieron mi maestría mas bonita.

Dedico este trabajo a:

Querido papá, te quiero con todo mi corazón porque en cada idea, cada paso que doy cada logro que he tenido siempre has estado ahí para apoyarme y en este proyecto todavía más, empezando por ese viaje tan genial que tuvimos para ir por las muestras de pulque. Gracias por siempre estar conmigo, por motivarme, por enseñarme tantas cosas y hacerme ver la vida desde muchas perspectivas.

Mi querida madre, porque de ti he aprendido a ser resiliente, a resistir y tomar la vida como viene, gracias por estar ahí siempre que te he necesitado por darme tanto amor en todas las formas como una mamá lo hace, por escucharme, cuidarme todas las veces que me enferme en estos dos años y sobre todo por comprenderme por como soy, te amo mucho.

A mi hermana, mi química favorita Itzel Cerero. Gracias por todos tus conocimientos, tu cariño y tu paciencia para enseñarme las cosas que mejor sabes hacer “trabajar con bichitos” he aprendido mas de ti que de cualquier persona desde que estabas en tu carrera. Te quiero y extraño verte.

A las químicas Alba Cerero y Dehui Vásquez Cerero, tía y prima, gracias por apoyarme darme sus consejos, sus palabras de aliento, por motivarme y compartir el amor hacia lo que hacemos. Las quiero y admiro muchísimo.

A Jesús, para quien no tengo palabras mas que un enorme agradecimiento porque estuvo desde el proceso antes de entrar a la maestría, por escucharme, quererme y cuidarme hasta el día de hoy.

RESUMEN

El pulque es una bebida de color blanco lechoso, viscosa y ligeramente ácida con un contenido alcohólico, entre los 4 y 7° GL; producido por fermentación de aguamiel proveniente de *Agave Salmiana*. El consumo de pulque proporciona diversos beneficios a la salud, principalmente asociados a enfermedades gastrointestinales, así como un aporte nutricional ya que puede aportar aminoácidos (triptófano, lisina), vitaminas como el ascórbico, el complejo b, así como minerales (hierro, calcio) y folatos. Estos beneficios se han atribuido a las propiedades bromatológicas del pulque y a la variedad de bacterias ácido lácticas presentes en la bebida que pueden tener un potencial probiótico. Los probióticos son microorganismos vivos que confieren una mejora a la salud cuando se los administra en cantidades adecuadas. La dosis recomendada para que una cepa de un producto pueda presentar evidencia que indique la eficacia de la administración oral de este, debe encontrarse entre $10^6 - 10^9$ UFC. En el presente trabajo se realizó el análisis bromatológico de 4 muestras de pulque proveniente de la localidad del Almacén, Municipio de Santa María Apazco, en la región de la mixteca oaxaqueña, las cuales presentaron valores elevados con respecto a normatividad del contenido de alcohol, proteínas, cenizas y acidez expresada como ácido láctico, los valores de pH y grados Brix se mantuvieron dentro de norma. Se realizó también el aislamiento de 9 cepas del pulque con características morfológicas asociadas a las bacterias ácido lácticas (colonias blancas, redondas brillantes y con bordes enteros) tinción de gran Positiva, catalasa negativa y morfología microscópica correspondiente a bacilos cortos, bacilos largos, estreptobacilos y estreptococos. De las 9 cepas aisladas, 7 sobrevivieron a condiciones gástricas simuladas (pH 2 y pepsina) siendo la cepa 7A1T la que mostró mayor porcentaje de sobrevivencia (33.55%). Por último las 9 cepas aisladas presentaron actividad antimicrobiana, siendo las cepas 6A1T y 7A1R las que presentaron un halo de inhibición de 2.5 mm. Los resultados obtenidos indican que el pulque seleccionado podría proveer un buen aporte nutrimental y que posee microorganismos potencialmente probióticos que necesitarían ser evaluados con más pruebas in vitro e in vivo para confirmar sus propiedades y posibles aplicaciones.

ABSTRACT

Pulque is a milky white, viscous, and slightly acidic beverage with an alcoholic content between 4 and 7° GL; produced by fermentation of aguamiel from *Agave Salmiana*. The consumption of pulque provides various health benefits, mainly associated with gastrointestinal diseases, as well as a nutritional contribution as it can provide amino acids (tryptophan, lysine), vitamins such as ascorbic acid, b complex, as well as minerals (iron, calcium) and folates. These benefits have been attributed to the bromatological properties of pulque and to the variety of lactic acid bacteria present in the beverage that may have probiotic potential. Probiotics are live microorganisms that confer health improvement when administered in adequate amounts. The recommended dose for a strain of a product to present evidence that indicates the efficacy of its oral administration should be between 10^6 - 10^9 CFU. In the present study, the bromatological analysis of 4 samples of pulque from the town of El Almacén, Municipality of Santa María Apazco, in the Oaxacan Mixtec region, showed high values of alcohol, protein, ash, and acidity expressed as lactic acid, while pH and Brix values were within the norm. Nine strains were also isolated from pulque with morphological characteristics associated with lactic acid bacteria (white colonies, round, shiny, and with entire edges), positive staining, negative catalase, and microscopic morphology corresponding to short bacilli, long bacilli, streptobacilli, and streptococci. Of the 9 strains isolated, 7 survived under simulated gastric conditions (pH 2 and pepsin) with strain 7A1T showing the highest percentage of survival (33.55%). Finally, the 9 isolated strains showed antimicrobial activity, with strains 6A1T and 7A1R showing an inhibition halo of 2.5 mm. The results obtained indicate that the selected pulque could provide a good nutritional contribution and that it possesses potentially probiotic microorganisms that would need to be evaluated with more *in vitro* and *in vivo* tests to confirm their properties and possible applications.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES.....	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
4. HIPÓTESIS.....	17
5. OBJETIVOS.....	17
i. Objetivo general	17
ii. Objetivos específicos	17
6. JUSTIFICACIÓN.....	18
7. MARCO TEORICO	19
7.1 PULQUE: GENERALIDADES	19
7.1.2 PROCESO DE ELABORACION	20
7.1.3 CLASIFICACION DE PULQUE Y AGUAMIEL: CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS	22
7.1.4 COMPOSICION MICROBIOLOGICA DEL PULQUE	24
7.1.5 PROPIEDADES NUTRICIONALES DEL PULQUE Y AGUAMIEL.....	29
7.2 PROBIÓTICOS	32
7.2.1 DEFINICIÓN	32
7.2.2 CRITERIOS Y CARACTERÍSTICAS	34
7.2.3 TIPOS DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS	37
7.2.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS	38
7.2.5 EFECTOS BENEFICOS EN LA SALUD	41
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
8.1 SELECCIÓN DEL AREA DE MUESTREO.....	44
8.1.2 Selección de la muestra.....	44
8.2 CARACTERIZACION BROMATOLÓGICA	45
8.3 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS DE LA CALIDAD DEL PULQUE	46
8.4 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS MICROBIANAS PRESUNTAMENTE PROBIÓTICAS	46
8.4.1 PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE AZÚCARES	47

8.5 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA RESISTENCIA A LAS CONDICIONES GÁSTRICAS SIMULADAS.....	47
8.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS AISLADAS FRENTE A CEPAS PATÓGENAS.....	48
9. RESULTADOS	50
9.1 RESULTADOS DE PRUEBAS BROMATOLÓGICAS	50
9.1.1 Determinación del porcentaje de alcohol-volumen.....	50
9.1.2 Cenizas.....	51
9.1.3 Porcentaje de proteínas.....	51
9.1.4 Acidez expresada como ácido láctico	52
9.1.5 pH y Grados Brix.....	53
9.2 RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS DE LA CALIDAD DEL PULQUE	53
9.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS COLONIAS AISLADAS.....	54
9.3.1 Resultados prueba de fermentación de azúcares.....	57
9.4 RESULTADOS DE RESISTENCIA A CONDICIONES GÁSTRICAS SIMULADAS	58
9.5 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS AISLADAS FRENTE A CEPAS PATÓGENAS.....	59
10. DISCUSIÓN.....	61
11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	67
REFERENCIAS.....	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 7-1. Especificaciones fisicoquímicas del aguamiel	24
Tabla 7-2. Especificaciones fisicoquímicas del pulque	25
Tabla 7-3. Diversidad microbiológica detectada en aguamiel y durante la fermentación de pulque	28
Tabla 7-4. Bacterias halladas en el pulque durante la fermentación	30
Tabla 7-5. Levaduras presentes en el pulque.....	31
Tabla 7-6. Contenido de vitaminas pulque	33
Tabla 7-7. Contenido de aminoácidos presentes en el pulque.....	33
Tabla 7-8. Algunos de los probióticos principales empleados en productos comerciales	39
Tabla 7-9. Estudios clínicos y el efecto de la administración de probióticos en la salud humana	44
Tabla 9-1 Análisis del porcentaje de alcohol volumen contenido en las muestras de pulque	52
Tabla 9-2 Análisis del contenido de cenizas en las muestras de pulque	53
Tabla 9-3 Análisis del contenido de proteínas	54
Tabla 9-4 Acidez expresada como ácido láctico en muestras de pulque	54
Tabla 9-5 Determinación de pH y grados brix	55
Tabla 9-6 Análisis microbiológico (datos expresados en UFC/ml).....	56
Tabla 9-7 Características morfológicas de las colonias aisladas de las muestras de pulque	57
Tabla 9-8 Resultados de tinción de Gram y prueba de catalasa a cepas aisladas	57
Tabla 9-9 Fermentación de azúcares por parte de las cepas aisladas.....	59
Tabla 9-10 Porcentaje de supervivencia a condiciones gástricas simuladas	60
Tabla 9-11 Actividad antimicrobiana de las cepas de estudio contra microorganismos patógenos mediante halos de inhibición.....	61

Tabla 9-12 Características bromatológicas (valor promedio \pm desviación estándar) de muestras de pulque de la localidad de Almacén Apasco, Oaxaca, en comparativa con características de pulque recopiladas de diferentes estudios.....	63
--	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 7-1 El nuevo concepto de probiótico	35
Figura 7-2. Mecanismos de interacción entre probióticos y huésped.	42
Figura 7-3. Mecanismo de acción de los probióticos	43
Figura 8-1 Ubicación de la localidad de Santa María Apasco, Nochixtlán Oaxaca.....	46
Figura 8-2. Muestreo de pulque (A) características físicas observables (B)	47
Figura 9-2 Prueba de actividad antimicrobiana por la técnica de Kirby- Bauer (fotografías ejemplificativas).....	62

1. INTRODUCCIÓN

Los agaves son uno de los principales recursos naturales que México posee, desde un punto de vista económico, social y agroecológico (Gutiérrez-Urbe et al., 2017). De las más de 285 especies conocidas en el mundo, alrededor de 200 son endémicas de este país; se trata de plantas con roseta y pencas con espinas rectas o curvas en la punta y su importancia radica en que los productos que se obtienen de ellas han estado presentes en la vida cotidiana de las personas desde épocas antiguas (Matías Luis et al., 2019).

Desde la época colonial, el maguey fue nombrado “el árbol de las maravillas” por los múltiples productos que se aprovechaban de la planta (Balladares Gomez, 2015). El territorio novohispano producía gran variedad de magueyes y hubo una gran difusión y utilidad de estos en el mundo indígena (Hernández López & Iwadare, 2015). En relación a las bebidas derivadas del maguey, el Pulque es probablemente la bebida alcohólica tradicional mexicana más antigua, preparada y consumida desde los tiempos prehispánicos (Adelfo Escalante et al., 2012).

El pulque es una bebida fermentada de naturaleza alcohólica, proveniente de la fermentación espontánea del aguamiel que es la savia azucarada extraída de una variedad de agaves como *A. salmiana* var. *Salmiana* (agave verde o manso), *A. atrovirens* (agave blanco), y *A. mapisaga* (agave mexicano) (Adelfo Escalante et al., 2012)

La savia de agave contiene azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa), vitaminas, minerales y aminoácidos, por lo que es una fuente nutricional y tiene una gran diversidad de microorganismos, que determinan los atributos del pulque (Álvarez-Ríos et al., 2020). De acuerdo a la farmacopea tradicional, el consumo de pulque tiene una serie de beneficios para la salud, en su mayoría, relacionados con enfermedades gastrointestinales. Estos beneficios se han atribuido a la gran variedad de bacterias ácido lácticas presentes en la bebida (Ruiz Ramírez, 2017).

INTRODUCCION

Los principales microorganismos presentes en el pulque incluyen géneros como *Lactobacillus*, los cuales incrementan la acidez láctica del pulque y *Leuconostoc (mesenteroides y dextranicum)*, responsables de la viscosidad de la bebida así como cepas de *Saccharomyces carbajail sp.*, el cual es un fermentador alcohólico; *Kluyveromyces*, *Zymomonas* y *Pseudomonas lindneri*, principales productoras de etanol (Mesillas-González et al., 2016). Estos microorganismos hallados en el producto fermentado están asociados con aportes a la salud humana y con tener un potencial probiótico (Cervantes-Elizarrarás et al., 2019)

Los probióticos son microorganismos vivos que confieren una mejora a la salud cuando se los administra en cantidades adecuadas (Guarner et al., 2017). Las investigaciones sugieren que mejoran las propiedades inmunomoduladoras y la tolerancia a la lactosa, disminuyen el colesterol sérico, aumentan la utilización de nutrientes y pueden inactivar o actuar como una barrera natural contra patógenos (Cervantes-Elizarrarás et al., 2019).

Evidencias de la década pasada han mostrado que la composición de la microbiota intestinal puede estar asociada con el desarrollo de resistencia a la insulina y la diabetes mellitus, por lo que una microbiota del intestino normalmente balanceada podría tener un rol protector contra la diabetes (Kassaian et al., 2018); algunas investigaciones han proporcionado información acerca de que la influencia de la administración de probióticos en la microbiota intestinal pudiera mejorar el metabolismo de la glucosa en los seres humanos, como una medida terapéutica para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (Han & Lin, 2014).

Para que un microorganismo pueda realizar las funciones de un probiótico este debe de: ser un residente normal del intestino, tener un ciclo reproductivo rápido, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable a lo largo de los procesos de producción, comercialización y distribución (León-de la O et al., 2012). La viabilidad de las bacterias probióticas en un producto para consumo humano es una consideración importante para su efectividad, ya que estas tienen que sobrevivir al

INTRODUCCION

transitar a través de las condiciones altamente ácidas del estómago así como a las enzimas y sales biliares en el intestino delgado (Hernández-López et al., 2018).

Sin embargo, se ha indicado que la supervivencia y viabilidad de las bacterias probióticas en los productos alimenticios suele ser baja, lo que da como resultado recuentos inferiores a 10^6 UFC (unidades formadoras de colonias), que es la ingesta mínima diaria recomendada para obtener beneficios para la salud (Da Silva et al., 2019). No obstante, de acuerdo a la recopilación de realizada de la guía de la Organización Mundial de Gastroenterología (WGO) la dosis recomendada para que una cepa de un producto pueda presentar evidencia que indique la eficacia de la administración oral de este, se puede observar que el rango debe encontrarse entre 10^6 - 10^9 UFC, su dosificación dependerá del tipo de cepa y las especificaciones de los ensayos realizados por el fabricante (Guarner et al., 2017). Debido a estas razones, el presente proyecto se enfocó en realizar el análisis bromatológico y el aislamiento de microorganismos que sean potencialmente probióticos provenientes del pulque del estado de Oaxaca, específicamente de la familia de las bacterias ácido lácticas, con la finalidad de conocer la composición química de la bebida y que los microorganismos aislados puedan ser objeto de estudio para el desarrollo de productos enfocados a la mejora y bienestar de los seres humanos.

2. ANTECEDENTES

El primer estudio que directamente reporto los beneficios en el consumo de pulque, fue realizado en el estado de Puebla en el año 1887, como un tratamiento exitoso contra el escorbuto en reos penitenciarios (Adelfo Escalante et al., 2016). En el estudio de F. Bulnes del año 1909, "El pulque, un estudio científico" ya se menciona que se encontraban 5 tipos de microorganismos: una bacteria, un bacilo, una levadura y dos microccus; así como la composición química. También la investigación realizada en el año de 1943 por Richard K. Anderson presento los resultados del estudio nutricional de indígenas otomíes del Valle del Mezquital, México; mostro que el consumo de pulque lograba aportar nutrientes para una dieta suficientemente adecuada (Anderson et al., 2009) .Por lo tanto, se observa que el interés por las propiedades de esta bebida ha ido creciendo paulatinamente a lo largo del tiempo.

En el contexto de esta investigación, en la actualidad, se han realizado diversos trabajos con relación al aislamiento, identificación y potencial probiótico de los microorganismos del pulque y aguamiel; los cuales se mencionan a continuación:

En la investigación realizada por Diana C. Castro y colaboradores, se aisló la cepa *Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides SD23* del aguamiel del Agave Salmiana y evaluó su efecto probiótico al inducir su consumo en ratones obesos; evidenciando que esta cepa podría reducir la deposición de grasa corporal y el tamaño de los adipocitos. También indico una mejora en el metabolismo de la glucosa, reducción en el colesterol sérico, en la esteatosis hepática, la cantidad de adipocitos más grandes en el tejido adiposo y redujo la altura de las vellosidades en el intestino delgado (Castro-Rodríguez et al., 2020). Cervantes-Elizarrarás realizo el aislamiento de cepas de Bacterias Acido Lácticas (BAL) del pulque y aguamiel provenientes del estado de Hidalgo. Como resultado 10 de las cepas aisladas pertenecieron a los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*; el 60 por ciento de las bacterias presentó actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El crecimiento de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 fue suprimido por las BAL,

ANTECEDENTES

junto con la actividad de la ureasa por lo que las BAL podrían ser una opción para establecer una relación inofensiva entre el huésped y *Helicobacter pylori*, ayudando en su terapia de erradicación (Cervantes-Elizarrarás et al., 2019).

En el análisis de Giles-Gómez y colaboradores, fue reportada la evaluación probiótica in vitro e in vivo de la cepa *Leuconostoc mesenteroides P45* aislada del pulque de la región de Huitzilac en el estado de Morelos, de la cual, los resultados de las pruebas in vitro mostraron que la cepa *L. mesenteroides P45* tuvo resistencia a las lisozimas, a un pH de 3.5 y a la acción de sales biliares, a su vez también tuvo actividad antimicrobiana contra los patógenos *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica serovar Typhi* y *S. entérica serovar Typhimurium*. La evaluación de probióticos in vivo mostró una actividad anti infecciosa de *L. mesenteroides P45* contra *S. enterica serovar Typhimurium* en ratones machos y hembras (Giles-Gómez et al., 2016).

En el estudio de González-Vázquez se aisló e identificó la cepa *Lactobacillus casei J57* del pulque proveniente de 3 regiones: Huitzilac en el estado de Morelos, Jocotitlan en el estado de México y Singuilucan en el estado de Hidalgo y evaluó el potencial probiótico de esta cepa al presentar actividad hidrolasa de sal biliar sobre sales biliares primarias y secundarias como sigue: 44.91, 671.72, 45.27 y 61.57 U/mg a glucocolato, taurocolato, glicodesoxicolato y taurodesoxicolato. Relacionando esta actividad con especies de *Lactobacillus* con una posible aplicación probiótica, debido a la asociación de la actividad BSH (hidrolasa sales biliares) con efectos reductores del colesterol sérico (González-Vázquez et al., 2015)

Torres-Maravilla identificó nuevas cepas probióticas antiinflamatorias aisladas de pulque de 3 pueblos del Estado de México (Nanacamilpa, Santiago Villalta, y Milpa Alta). Estas cepas fueron aisladas y evaluadas en: condiciones gastrointestinales simuladas, adhesión a solventes y habilidad de adhesión bacteriana a las células epiteliales; para después ser administradas en ratones inducidos con colitis crónica. Los resultados arrojaron que *Lactobacillus san franciscensis LBH1068*, mejoró la

ANTECEDENTES

salud de los ratones observada por una reducción de la pérdida de peso, una disminución significativa de la permeabilidad intestinal y la modulación de citosinas, por lo que fue considerado como un potencial probiótico para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales (Torres-Maravilla et al., 2016). A partir de este estudio se iniciaron investigaciones relacionadas con las propiedades de las bacterias aisladas del pulque. Bermúdez et al. (2019) reportó la actividad anticancerígena de la bacteria *Lactobacillus brevis LBH1073*, encontrada en Nanacamilpa, Tlaxcala, México, la cual mostro un aumento en la actividad de inhibición de la proliferación de células tumorales HT29, HTC116 y Caco2. La investigación derivó en la aprobación de una patente internacional compartida por el Instituto Politécnico Nacional de México y el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas de Francia bajo el número WO 2019/234076 A1(Huezcas-Garrido et al., 2022) .

Por su parte, Mendoza-Gardeazabal caracterizó y evaluó la capacidad probiótica de la levadura *Kluyveromyces marxianus* la cual mostro ser resistente a concentraciones de sales biliares de 0.05% a 0.30%, sobrevivió a valores de pH ácido desde 1.5 hasta 7.0, y mostró ser tolerante al jugo gástrico hasta por 24 horas y fue capaz de establecerse en el intestino en un modelo de ratones CD.1 y colonizarlo, logrando inhibir el crecimiento de la bacteria patógena *Klebsiella pneumoniae* (Mendoza Gardeazabal, 2013). El Análisis bromatológico y aislamiento de microorganismos con potencial probiótico del pulque llevado a cabo por León de la O y colaboradores en 2012; demostró que el pulque de la zona metropolitana de México posee una concentración de macronutrientes menor que en los productos comerciales con probióticos, por lo que los microorganismos con potencial probiótico obtenidos en el pulque tienen menos requerimientos nutricionales que los utilizados en bebidas comerciales (bajo contenido de carbohidratos, proteínas y alcohol), aisló ocho microorganismos, de estos, seis eran bacterias, cinco eran bacilos, uno era un coco y dos eran levaduras, de los cuales una levadura y un bacilo eran resistentes al pH ácido y al jugo gástrico sintético logrando tener potencial probiótico. (León-de la O et al., 2012).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde tiempos prehispánicos, se le ha atribuido al consumo de pulque efectos benéficos a la salud humana, como auxiliar contra infecciones gastrointestinales, precursor del mejoramiento de la barrera gastrointestinal y agente antimicrobiano; los cuales son adjudicados a la microbiota presente en esta bebida. Los adelantos científicos con respecto a la relación entre la microbiota, el estado de salud del sujeto y el uso de probióticos, muestran la necesidad de la producción e incorporación de los mismos en el consumidor, debido al creciente mercado que promueve la salud de forma natural. Anteriormente se han aislado e identificado, microorganismos provenientes del pulque de la zona centro del país, que han sido puestos a prueba en ensayos in vitro e in vivo reportando evidencia de posible actividad probiótica en sus resultados. Sin embargo, el estado de Oaxaca, perteneciente a región sureste de México, siendo también productor de pulque, tiene pocos registros relacionados a la existencia de microorganismos con potencial probiótico y a su vez poca información acerca de los parámetros bromatológicos que se llegan a presentar en el producto.

Es por estas razones que la presente investigación pretende responder y aportar información a la comunidad académica sobre la siguiente interrogante: ¿Cuáles son los beneficios de analizar bromatológicamente y aislar microorganismos con potencial probiótico del pulque proveniente de la región mixteca del estado de Oaxaca?

Debido a que se desconoce la viabilidad probiótica de los microorganismos del pulque de la zona delimitada del Municipio de Nochixtlán, la importancia de este proyecto radica en que estos podrían ser considerados como una solución terapéutica primaria en una situación de enfermedad específica; o podrían ser relacionados con el mantenimiento de la función normal del organismo y/o la reducción de los riesgos de enfermedad en la población en general.

4. HIPÓTESIS

El pulque de la Mixteca del estado de Oaxaca posee características bromatológicas adecuadas y a su vez contiene cepas de microorganismos con potencial probiótico.

5. OBJETIVOS

i. Objetivo general

Analizar bromatológicamente y aislar microorganismos con potencial probiótico del pulque proveniente de la región mixteca del estado de Oaxaca.

ii. Objetivos específicos

- Realizar el análisis bromatológico de las muestras de pulque colectadas, para determinar sus componentes.
- Aislar y realizar una primera identificación de las colonias de microorganismos de acuerdo a las características propias de las bacterias ácido lácticas.
- Realizar un segundo aislamiento de las bacterias seleccionadas y analizar la resistencia de las cepas aisladas en condiciones gástricas simuladas.
- Analizar la actividad antimicrobiana de las cepas aisladas para su determinación como probiótico potencial.

6. JUSTIFICACIÓN

La bioquímica, en el contexto de la medicina y nutrición, se ha enfocado en aportar y mejorar el conocimiento en el desarrollo de suplementos alimenticios y en la comprensión de sus beneficios a nivel molecular en los procesos del metabolismo humano. Las investigaciones que se han realizado en este campo, han intentado prosperar con la aportación de compuestos que pueden brindar una mejoría en la disminución de los indicadores, por ejemplo, de obesidad y diabetes, que son los principales problemas que en los últimos tiempos han prevalecido a nivel general en la sociedad mexicana del siglo XXI. El pulque es una bebida que en la actualidad ha tenido una creciente atención, como producto alimenticio primario, como recurso turístico-cultural para el desarrollo económico de zonas rurales en el estado de Oaxaca y como objeto de estudio al poseer compuestos de interés biológico que pudieran tener aplicaciones prácticas en las ciencias químicas, de los alimentos y de la salud. Los compuestos que presenta el pulque han sido utilizados como aporte nutrimental en zonas de alta marginación, así también parte de su microbiota ha presentado actividad probiótica. En la actualidad los ensayos relacionados con las bacterias y microorganismos con potencial probiótico del pulque han presentado resultados favorables con respecto a su aplicación en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, además la aceptación de los probióticos por parte de los consumidores ha aumentado rápidamente en los últimos años y para el 2022, se espera que el mercado mundial de probióticos tenga un valor esperado de \$ 64 mil millones de dólares (Tech, 2020). En medio de la crisis pandémica en curso, la mayoría de los alimentos y bebidas probióticos enfocados en la salud digestiva e intestinal están logrando ganancias significativas en el mercado como resultado de la creciente preocupación de los consumidores por la inmunidad. Por lo anterior el presente trabajo se enfoca en la caracterización bromatológica del pulque de una región específica del estado de Oaxaca y el aislamiento de los microorganismos que este contiene, con el objetivo de que los resultados, puedan presentar aportes a la salud de la población en general en futuro.

7. MARCO TEORICO

7.1 PULQUE: GENERALIDADES

El pulque es una bebida de color blanco lechoso, viscosa y ligeramente ácida con un contenido alcohólico que depende de varios factores, pero que se encuentra habitualmente entre los 4 y 7° Gay Lussac; es producido por fermentación espontánea de aguamiel (Adelfo Escalante et al., 2016). Las principales especies de donde se obtiene son: *Agave salmiana var. salmiana Otto ex Salm-Dyck* (maguey manso o maguey verde), *A. mapisaga Trelease* (maguey de mano larga o maguey mexicano), *A. atrovirens Karw* (maguey blanco) *Agave americana* y *Agave ferox*; las cuales se encuentran distribuidas en el Estado de México, Querétaro, Puebla, Tlaxcala e Hidalgo y en menor proporción en los estados de Veracruz, Oaxaca y Zacatecas (Herrera Solórzano, 2008) .

Se considera al pulque como un importante icono cultural y gastronómico mexicano; y como se ha observado en varios vestigios arqueológicos como los hallados en Teotihuacán es considerada como una de las bebidas más antiguas de México (Valadez-Blanco et al., 2012). Diferentes leyendas atribuyen el origen del pulque a la civilización tolteca, asentada en la ciudad de Tula, aunque también es probable que los otomíes fueran los primeros en elaborarlo hacia el año 2000 a. C. y en regiones áridas era utilizado como sustituto de agua (Herrera Solórzano, 2008; Ruiz Ramírez, 2017). Sin embargo fueron los aztecas quienes demostraron un dominio en el cultivo y aprovechamiento del maguey pulquero; ellos conocían al pulque como metoctli (del náhuatl metl = agave o maguey, octli = vino) vino de agave o iztacocitli (de izac = blanco octli = vino) vino blanco o polihquioctli (de polihqui = podrido, estropeado y octli =vino) vino podrido con un desagradable aroma y sabor (Adelfo Escalante et al., 2016).

A la llegada de los españoles, se nombró como pulque a la bebida recién fermentada; sin embargo, también se menciona que tomaron el vocablo de la lengua araucana en que pulcu es el nombre genérico para bebida que embriaga (Hernández López &

MARCO TEORICO

Iwadare, 2015). El pulque en la época colonial, fue perdiendo su motivo ceremonial y se convirtió al consumo popular; a su vez, hubo dos etapas que marcaron su producción: la primera fue a finales del México independiente (1810-1821), donde la industria del pulque creció rápidamente y a finales del siglo XX llegó a su punto máximo, produciendo 500 millones de litros al año. La segunda etapa sucedió después de la revolución mexicana (1910-1920) donde la estructura de producción de las haciendas pulqueras fue destruida, así como el pulque y su actividad económica asociada como propiedad de los hacendados (Adelfo Escalante et al., 2012). Muchas situaciones han ocurrido en torno al pulque, desde su prohibición en los años 30, los rumores de adulteración del producto para aumentar sus volúmenes de venta, el cambio de elección de los consumidores al preferir la cerveza, su vuelta al mercado en los años 60; hasta la revalorización de la bebida; actualmente, las comunidades indígenas lo consumen regularmente y, de forma eventual, la población mestiza e inmigrante lo consume para acompañar las comidas tradicionales. En el mercado urbano solo se vende en las ya casi desaparecidas pulquerías; no obstante, se han realizado esfuerzos para promoverlo (Herrera Solórzano, 2008).

7.1.2 PROCESO DE ELABORACION

Con respecto a la producción tradicional, el proceso principal de la extracción del aguamiel y la fermentación del pulque permanece prácticamente inalterado desde los tiempos prehispánicos. Las plantas de agave son relativamente fáciles de cultivar ya que la propagación es a través de trasplantar hijuelos; que se convertirán en adultos en un periodo de 7 a 25 años (Adelfo Escalante et al., 2016).

El pulque se produce a partir de la savia dulce, amarillenta y ligeramente turbia, que se extrae de los agaves maduros de 6 a 15 años, que están a punto de producir su inflorescencia. García-Mendoza, (1998) señala que el proceso comienza con la selección de estas plantas y la posterior eliminación del botón floral, dejando una cavidad o cajete en el centro del tallo del Agave. A esto le sigue un periodo de envejecimiento que permite la maduración de las hojas centrales y el aumento del

MARCO TEORICO

contenido de azúcar de la savia (7-14% p/v) (Lappe-Oliveras et al., 2008). La superficie de la cavidad se raspa para facilitar la producción de la savia líquida del aguamiel y esta se "sella" con rocas, hojas o bolsas de plástico para brindar cierto grado de protección contra animales, insectos y un ambiente que de otra manera sería séptico (Valadez-Blanco et al., 2012).

El "tlachiquero", quien está a cargo de todo el proceso, recoge el aguamiel dos veces al día. La savia es extraída por succión oral a través de una calabaza seca (*Lagenaria siceraria*) llamada acocote. El tiempo de recolección puede durar de 4 a 6 meses, con una producción aproximada de 200 a 1000 litros de aguamiel (de 4 a 6 litros al día); finalizando este periodo, la planta muere (Arenas Cedillo, 2015; Lappe-Oliveras et al., 2008).

Después de recolectar el aguamiel, este es transportado hasta el tinacal, lugar donde se lleva a cabo la fermentación. El aguamiel se fermenta a pulque en recipientes de madera, arcilla o, más comúnmente, de plástico. La fermentación puede ser iniciada por la microbiota residente, usando un procedimiento similar al de una fermentación por lotes; se agrega aguamiel a la tina de pulque ya preparada para mantener un volumen constante mientras se retira el pulque que está listo para su consumo (Arenas Cedillo, 2015).

Como alternativa, el pulque de un lote anterior se puede usar como inóculo para un nuevo lote al agregarlo al recipiente de fermentación. Este último procedimiento puede resultar en la selección de la cepa más adecuada para la fermentación (Valadez-Blanco et al., 2012). En este, una tina de 1000 litros se llena con 10 a 15 litros de aguamiel, luego se le agrega un poco de pulque previamente fermentado. La fermentación inicial puede durar desde una semana en el verano hasta cuatro semanas en el invierno antes de que se note la presencia de un sobrenadante blanquecino conocido como "zurrón" y los sabores de alcohol y acético. Luego se agrega aguamiel fresco hasta que la tina esté completamente llena, dejándolo fermentar agitando frecuentemente hasta que aparezca el zurrón el cual se debe

MARCO TEORICO

retirar. Con esto se obtiene el inóculo iniciador y este se vacía en otras tinas para repetir el proceso (Arenas Cedillo, 2015). Es relevante mencionar que la fermentación se realiza con controles de proceso mínimos y a temperatura ambiente donde esta puede oscilar entre los 25 y 50 °C. Al final esta se completa en un tiempo de 12-24 h con una concentración final de alcohol de 3 al 6% (Valadez-Blanco et al., 2012).

7.1.3 CLASIFICACION DE PULQUE Y AGUAMIEL: CARACTERISTICAS FISICOQUIMICAS

Debido a que la fermentación del néctar comienza durante la recolección del aguamiel, la regulación mexicana considera varios parámetros en este sustrato que pueden afectar significativamente la calidad de la bebida fermentada (Gutiérrez-Urbe et al., 2017). De acuerdo a la norma NMX-V-022-1972, el aguamiel debe de cumplir los requerimientos de la tabla 7-1 y se divide en dos tipos:

-Tipo I: Es el producto más fresco, con un grado bajo de fermentación. Es la savia fresca recolectada 15 días después del primer raspado, en un lapso que varíe de 30 a 60 días.

-Tipo II: Tiene un grado más avanzado de fermentación.

Tabla 7-1. Especificaciones fisicoquímicas del aguamiel (NMX-V-022, 1972).

ESPECIFICACIONES	TIPO I		TIPO 2
	MINIMO	MÁXIMO	MENOR DE
pH	6.6	7.5	4.5
Densidad grados Baumé (Bé)	5	7	4.5
Índice de refracción con el refractómetro de inmersión a 20°C.	59	100	27
Sólidos totales g/100 ml.	13	17	7
Azúcares reductores totales (en glucosa) g/100 ml.	8	12	6
Azúcares reductores directos (en glucosa) g/100 ml.	2	3	3
Gomas (en glucosa) g/100 ml.	2	6	0.2
Proteínas mg/100 ml.	300	600	100
Cenizas mg/100 ml.	300	430	180
NO MAYOR DE			
Acidez mg/100 ml (como ácido láctico).	0.9	1.03	4

MARCO TEORICO

Con respecto a sus características organolépticas; el color del aguamiel debe ser ambarino, propio del producto, el olor debe ser característico del producto y el sabor es dulce, suigeneris. Por último, su aspecto en general debe ser translúcido (NMX-V-022, 1972) .

Por otro lado, el pulque se clasifica en dos tipos:

-TIPO I Pulque de semilla y puntas: La semilla de pulque es el producto obtenido del empleo del aguamiel de primer grado de calidad y que se prepara para lograr una biota natural microbiana óptima que determina una correcta fermentación, en la elaboración del pulque, además, se puede agregar con otras sustancias para promover un mejor crecimiento de microorganismos autóctonos. El pulque de punta es el producto que se obtiene de los primeros tanques de producción en el proceso de fermentación, y su elaboración involucra la semilla y el aguamiel tipo I, estableciéndose en estas condiciones en forma óptima el equilibrio bioquímico entre el substrato fermentable y los microorganismos básicos (NMX-V-037, 1978).

-TIPO II Pulque comercial: Se entiende por pulque de producción comercial el que se "alimenta" con la generalidad de los aguamieles, pudiendo utilizarse durante las siguientes etapas de producción, aguamieles enriquecidos con cualquier cantidad de concentrados de aguamiel (NMX-V-037, 1978).

El pulque en sus 2 tipos y un solo grado de calidad debe cumplir con las especificaciones de la tabla 7-2.

Tabla 7-2. Especificaciones fisicoquímicas del pulque (NMX-V-037, 1978).

ESPECIFICACIONES	TIPO I		TIPO II	
	MINIMO	MÁXIMO	MINIMO	MÁXIMO
Grado Refractométrico (Refractómetro de inmersión) a 20°C	32	345	25	-
Índice de refracción (Refractómetro de inmersión) a 20°C	1.339	1.3406	1.3365	1.338
pH	3.7	4.2	3.5	4

MARCO TEORICO

Acidez total (ácido láctico) g/100 ml	0.4	0.75	0.4	0.7
Reductores totales (glucosa) g/100 ml	0.1	0.8	0.2	0.5
Grado Alcohólico % de alcohol por volumen	6	9	4	6

Así también, el producto final debe ser el resultado de una actividad fermentativa equilibrada de la biota microbiana y no presentar cambios en sus propiedades organolépticas que modifiquen su calidad. Por último, con relación a sus propiedades organolépticas, el color del producto debe ser blanco y su sabor y olor deben ser suigéneris y no presentarán sabor y olor diferentes e impropios (NMX-V-037, 1978).

7.1.4 COMPOSICION MICROBIOLOGICA DEL PULQUE

La composición del jugo de agave varía entre regiones, especies de plantas, clima, tiempo de recolección y otros factores que también afectan la microbiota endógena (Gutiérrez-Urbe et al., 2017) . Estos factores, se complementan para realizar una serie de procesos de fermentación que caracterizan al pulque, los cuales son: ácido (láctico y acético), alcohólico (producción de etanol) y viscoso (producción de polisacáridos extracelulares, EPS) (Adelfo Escalante et al., 2012). Las fermentaciones son realizadas por un consorcio microbiano compuesto por levaduras, bacilos Gram positivos y cocobacilos Gram negativos, los cuales están presentes en todas las etapas del proceso (Matías Luis et al., 2019).

Se han realizado muchos estudios sobre la microbiología del pulque, estos han permitido la identificación de una amplia variedad de bacterias y levaduras. Se puede empezar mencionando que de acuerdo a Loyola-Montemayor (1956) los microorganismos presentes en la savia y el pulque se clasifican en dos grupos principales, bacterias y levaduras, aunque los hongos (especies de *Aspergillus*, *Mucor* y *Penicillium*) también pueden estar presentes. Tanto en la savia como en el pulque fresco o joven, predominan las bacterias ($8.0 - 15.0 \times 10^8$ células/ml) sobre las levaduras ($3 - 6 \times 10^6$ células/ml), debido al pH inicial neutro (7 - 7.4) de los sustratos. La población de levaduras aumenta gradualmente durante la fermentación, predominando ($2.5 - 3.0 \times 10^8$ células/ml) sobre las bacterias ($1.0 - 2.0 \times 10^8$ células/ml).

MARCO TEORICO

Esto debido probablemente a la acidez (pH 4,5) durante la fermentación, que favorece el desarrollo de las levaduras (Lappe-Oliveras et al., 2008).

De manera general, la diversidad de los microorganismos ha sido clasificada con respecto a sus principales rasgos metabólicos en la fermentación, de la siguiente manera:

a) Bacterias productoras de ácido láctico en la fermentación, que es realizada principalmente por las bacterias ácido lácticas (BAL) homo y heterofermentativas como los *Lactobacillus* y *Leuconostoc*; como *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc sp.* y *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*, los cuales a través del proceso de glucólisis llevan a cabo la fermentación y su posterior conversión en ácido láctico y otros productos metabólicos como ácido acético, CO₂ y etanol (Adelfo Escalante et al., 2016; Huezcas-Garrido et al., 2022)

b) Microorganismos productores de etanol, donde la fermentación alcohólica es realizada principalmente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la bacteria *Leuconostoc sp.* obteniendo la energía a partir de glucosa y sacarosa, mientras que *Z. mobilis* emplea la ruta de Entner Doudoroff, también se generan aminoácidos, vitaminas y compuestos volátiles que brindan propiedades sensoriales como el sabor y olor de la bebida (Huezcas-Garrido et al., 2022).

c) Bacterias productoras de dextranos; como las especies de *Leuconostoc* incluyendo *L. mesenteroides* y *L. kimchi* que realizan la producción de exopolisacáridos de dextrano y fructano a partir de sacarosa por enzimas como glucosil- y fructosil- transferasas, respectivamente (Adelfo Escalante et al., 2016).

d) Bacterias productoras de ácido acético y microorganismos de putrefacción, donde la fermentación acética es realizada por especies de *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Lappe-Oliveras et al., 2008; Matías Luis et al., 2019) . En la tabla 7-3, se muestra parte de la información reunida por Escalante en el año 2016 de los microorganismos hallados en el pulque durante la fermentación.

MARCO TEORICO

Tabla 7-3. Diversidad microbiológica detectada en aguamiel y durante la fermentación de pulque
(Escalante et al., 2016).

BACTERIAS	LEVADURAS/HONGOS	Rasgos metabólicos notables que definen las propiedades sensoriales del aguamiel o pulque	REFERENCIAS
<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>L.dextranicum</i> <i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Microorganismos esenciales responsables de la producción de ácido (ácido láctico), alcohólico y de exopolisacáridos.	(Alfredo Sánchez-Marroquín & Hope, 1953) (A Sánchez-Marroquín et al., 1957)
	Levaduras aisladas de aguamiel: <i>Candida lusitanae</i> , <i>Klyuveromyces marxianus var bulagricus</i> (+), <i>S. cerevisiae</i> . Levadura aislada del pulque: <i>C.valida</i> (+), <i>S. cerevisiae</i> (<i>chevalieri</i>), <i>S. cerevisiae</i> (<i>capensis</i>), <i>K. marxianus var lactis</i> (+)	Varios aislados de <i>C.valida</i> , <i>S. cerevisiae</i> (<i>chevalier</i>) de pulque resistieron a > 10% de alcohol Potencial relevancia en la producción de etanol durante la fermentación y resistencia a las toxinas asesinas	(Estrada-Godina et al., 2001)
<i>Acetobacter aceti</i> , <i>A.aceti</i> subsp. <i>xylinus</i> , <i>Bacillus simplex</i> , <i>B.subtilis</i> , <i>Cellulomonas</i> sp., <i>Escherichia</i> sp., <i>Kokuriarosea</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. delbrueckii</i> , <i>L.vermiforme</i> , <i>Leuconostoc</i> sp., <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> , <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> , <i>Macrococcus caseolyticus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Sarcina</i> sp., <i>Z. mobilis</i> subsp. <i>Mobilis</i>	<i>Cryptococcus</i> sp., <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Debaryomyces carsonii</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Klyuveromyces lactis</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Pichia</i> sp., <i>P. guilliermondii</i> , <i>P.membranifaciens</i> , <i>Rhodotorula</i> sp., <i>R.mucilaginosa</i> , <i>Saccharomyces bayanus</i> , <i>S.cerevisiae</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i>	Microorganismos esenciales responsables de la fermentación láctica y acética (LAB y bacterias del ácido acético), fermentación alcohólica (<i>Z.mobilis</i> y <i>S. cerevisiae</i>), producción de EPS (<i>Leucocnostonoc sp.</i>) Y bacterias de la putrefacción	(Lappe-Oliveras et al., 2008)

MARCO TEORICO

<p>El análisis de las bibliotecas de clones de 16SrDNA permitió identificar <i>Lactobacillus acidophilus</i>, <i>L. kefir</i>, <i>L. acetotolerans</i>, <i>L. hilgardii</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>, <i>L. pseudomesenteroides</i>, <i>Acetobacter pomorum</i>, <i>Gluconobacter oxydans</i>, <i>Zymomonas mobilis</i>, <i>Flavobacterium jhonsonae</i>, <i>Hafnia alvei</i></p>	<p>El <i>L. acidophilus</i> homofermentativo se identificó como el microorganismo más abundante en tres muestras analizadas de diferente origen geográfico, lo que sugiere un posible papel esencial en la fermentación del ácido láctico. <i>L. mesenteroides</i> estuvo presente en baja proporción respecto a los lactobacilos. <i>Z. mobilis</i> y <i>AAB</i> se detectaron en porcentaje bajo o ausentes. Presencia de posibles bacterias putrefactas o contaminantes</p>	<p>(A. Escalante et al., 2004)</p>	
<p>Un enfoque combinado de bibliotecas dependientes de cultivo y 16SrDNA permitió identificar los microorganismos presentes en aguamiel recién recolectada y durante 6 h de fermentación a α-Proteobacteria: <i>Acetobacter malorum</i>^a, <i>A. orientalis</i>^b, <i>Z. mobilis</i> subsp. <i>Pomaceae</i>^b, γ-Proteobacteria: <i>Citrobacter</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp.^a, <i>E. agglomerans</i>^a, <i>Erwinia rhapontic</i>^a, <i>Kuyvera acorbata</i>^c, <i>K. cochleae</i>^a, <i>Providencia</i> sp.^a, <i>Serratia grimensii</i>^a, <i>Acinetobacter radioresistens</i>^b, <i>Sterotrophomonas</i> sp.^a, <i>Chryseobacterium</i> sp. Firmicutes: <i>Bacillus</i> sp.^a, <i>B. licheniformis</i>^a, <i>Lactobacillus</i> sp.^c, <i>L. acidophilus</i>^b, <i>L. hilgardii</i>^b, <i>L. paracollinoides</i>^b, <i>L. sanfranciscensis</i>^b, <i>Lactococcus</i> sp.^a, <i>L. lactis</i>^a, <i>L. lactis</i> susp. <i>Lactis</i>^a, <i>Leuconostoc kimchi</i>^c, <i>L. citreum</i>^c, <i>L. gasocomitatum</i>^b, <i>L. mesenteroides</i>^c, <i>L. pseudomesenteroides</i>^c, <i>Pediococcus urinaeequi</i>^a, <i>Streptococcus deviese</i>^a</p>	<p><i>S. cerevisiae</i>^b</p>	<p>Las especies de <i>Leuconostoc citreum</i> y <i>L. kimchi</i> fueron identificadas como las LAB más abundantes en <i>aguamiel</i>. Después de mezclar <i>aguamiel</i> fresco con pulque previamente fermentado, <i>L. acidophilus</i>, <i>L. mesenteroides</i> fueron las LAB más abundantes durante 6 horas de fermentación. <i>E. agglomerans</i> fue el microorganismo no - LAB más abundante durante las primeras 3 horas de fermentación. <i>Z. mobilis</i> y <i>AAB</i> estaban ausentes en <i>aguamiel</i>, pero fueron detectados en baja proporción durante el proceso de fermentación.</p>	<p>(Adelfo Escalante et al., 2008)</p>

(+) Indica detección de actividad asesina (eliminación)

^a Identificada de cultivos aislados.

^b Identificada a partir de la biblioteca de clones de ADNr 16S

^c Identificada por enfoques dependientes de cultivos y no-cultivos

MARCO TEORICO

Para tener una mejor comprensión de algunos microorganismos mencionados, en la tabla 7- 4 se muestran parte de las cepas agrupadas por familias:

Tabla 7-4. Bacterias halladas en el pulque durante la fermentación.

(Adelfo Escalante et al., 2008).

LINAJE	IDENTIDAD	
<i>α-Proteobacteria/Rhodospirillales</i>	<i>Acetobacterium malorum</i>	
	<i>Acetobacter orientales</i>	
<i>α-Proteobacteria/Sphingomonadales</i>	<i>Zymomonas mobilis</i> <i>subsp.pomaceae</i>	
<i>γ-Proteobacteria/Enterobacteriales</i>	<i>Citrobacter spp.</i>	
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	
	<i>Enterobacter spp.</i>	
	<i>Erwinia rhapontici</i>	
	<i>Kluyvera ascorbata</i>	
	<i>Kluyvera cochleae</i>	
	<i>Providencia spp.</i>	
	<i>Serratia grimensii</i>	
	<i>γ-Proteobacteria/Pseudomonadales</i>	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
	<i>γ-Proteobacteria/Xanthomonadales</i>	<i>Sterotrophomonas spp.</i>
<i>Flavobacterias</i>	<i>Chryseobacterium spp.</i>	
<i>Firmicutes/Bacillales</i>	<i>Bacillus sp.</i>	
	<i>Bacillus licheniformis</i>	
<i>Firmicutes/Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillus spp. AC07c</i>	
	<i>Lactobacillus spp. ASF360c</i>	
	<i>Lactobacillus spp. Y10c</i>	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	
	<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	
	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	
	<i>Lactococcus spp.</i>	
	<i>Lactococcus lactis</i>	
	<i>Lactococcus lactis subsp. Cremoris</i>	
	<i>Leuconostoc kimchi</i>	
	<i>Leuconostoc citreum</i>	
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>		
<i>Pediococcus urinaeequi</i>		
<i>Streptococcus devriesei</i>		
<i>Eukaryotic</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	

De igual forma en la tabla 7- 5 se muestran las levaduras presentes en las fases de la fermentación del pulque.

Tabla 7-5. Levaduras presentes en el pulque.

(Adelfo Escalante et al., 2008).

ESPECIES	FASE DE LA FERMENTACION
<i>Candida spp</i>	Inicio
<i>C. Parapsilosis</i>	Inicio
<i>C. Lusitaniae</i>	Inicio
<i>Kluyveromices marxianus</i>	Inicio
<i>K. Lactis</i>	Inicio
<i>Haseniaspora uvarum</i>	Inicio
<i>Pichia spp</i>	Inicio
<i>P. Guillermondii</i>	Inicio
<i>Saccharomyces bayanus</i>	Inicio
<i>S. Cerevisiae</i>	Inicio y final
<i>S. Parodoxus</i>	Inicio
<i>Torulaspota deibrueckii</i>	Inicio

7.1.5 PROPIEDADES NUTRICIONALES DEL PULQUE Y AGUAMIEL

El valor nutricional del pulque está relacionado con su contenido de vitaminas (complejo B y vitamina C, sintetizadas principalmente por las levaduras), aminoácidos esenciales (lisina y triptófano) y hierro biodisponible (Lappe-Oliveras et al., 2008).

Existe una larga historia que reporta los beneficios nutricionales asociados con el consumo bajo de pulque. Por ejemplo, el pulque es una fuente importante de vitamina C y de ácido ascórbico. Un estudio demostró que para la población otomí del estado de Hidalgo el pulque era el segundo alimento más importante en la dieta después de la tortilla, ya que proporcionaba cantidades sustanciales de calorías, proteína total, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina C, calcio y hierro. Un análisis más reciente respalda la importancia del pulque como fuente dietética de hierro y folatos. La deficiencia de ácido fólico durante el embarazo puede provocar defectos del tubo neural y, lo que es más importante, la ingesta de pulque es un fuerte

MARCO TEORICO

indicador del nivel de folato en las poblaciones rurales del altiplano mexicano (Chacón-Vargas et al., 2020).

Tomado con moderación, el pulque constituye un complemento alimenticio debido a su contenido de proteínas y vitaminas del Complejo B. Por ejemplo, tres porciones diarias en niños podrían llegar a representar un aporte aproximado del 2.2 al 12.4% de calorías y del 0.6 al 3.2% de proteínas requeridas en la dieta cotidiana, a su vez, el consumo de pulque disminuye la deficiencia de hemoglobina y de ferritina, ya que favorece la absorción de hierro en presencia de ácido ascórbico y etanol (Herrera Solórzano, 2008; Matías Luis et al., 2019).

Con respecto al aguamiel, la savia recolectada de *A. salmiana* 'Gentry' contiene cantidades bajas de fibra cruda (0,57%), proteína cruda (0,69%) y un alto nivel de extracto exento de nitrógeno (98,1%, correspondiente a los carbohidratos de alta digestibilidad). El análisis del contenido de minerales mostró (en mg / L de aguamiel) 100 de N, 200 de Ca, 200 de P, 200 de Mg, 21,5 de Fe, 14,1 de Zn, 7,4 de Cu y 19,9 de B. El consumo de 850mL de aguamiel satisface los requisitos humanos diarios de Fe y Zn, de acuerdo con la Dieta Recomendada Permitida o Ingesta Adecuada (Adelfo Escalante et al., 2016). En la tabla 7-6 se muestran los datos obtenidos por diferentes autores acerca del contenido de vitaminas y minerales en el pulque.

Se menciona también en un estudio que el extracto obtenido de *A. mapisaga* 'Blanco' contiene 11,5% en peso en materia seca y está compuesto principalmente por 75% de azúcares (sacarosa, fructosa, glucosa y fructooligosacáridos), 0,3% de aminoácidos libres (aminoácidos esenciales con excepción de metionina), 3% de proteínas y 3% de cenizas. Además del aminoácido esencial se identificaron 26 mg/L de aguamiel del ácido gamma aminobutírico (GABA)(Ortiz-Basurto et al., 2008). El contenido de aminoácidos reportado en aguamiel y pulque se puede observar en la tabla 7-7.

Tabla 7-6. Contenido de vitaminas pulque.

(Modificado de Herrera 2008).

Componentes mg/100 ml	AUTORES		
	Cravioto 1951	Instituto de Nutriología 1952	Sanchez Marroquin 1977
	Pulque Hidalgo	Pulque	Pulque Tradicional
Vitaminas			
Ácido ascórbico	6.2	5.1	-
Biotina	-	-	0.02
Niacina	0.3	0.35	0.28
Piridoxina	-	-	0.02
Riboflavina	0.02	0.03	0.03
Minerales			
Calcio	10	11	-
Fósforo	10	6	-
Hierro	0.7	0.7	-

Tabla 7-7. Contenido de aminoácidos presentes en el pulque.

(Modificado de Herrera 2008).

Aminoácido	% en miligramos	
Esenciales	Aguamiel (Ortiz- Basurto 2008)	Pulque tradicional (Sánchez Marroquín 1977)
Arginina	0.038	0.002-0.003
Lisina	0.025	0.002-0.004
Fenilalanina	0.22	0.002-0.006
Isoleucina	0.014	-
Leucina	0.013	0.005-0.008
Valina	0.012	0.002-0.004
Triptófano	0.01	0.001-0.004
Metiotina	<0.01	0.001-0.002
No Esenciales		
Serina	0.024	-
Prolina	0.02	-
Treonina	0.019	0.003-0.005
Alanina	0.01	-
Tirosina	0.012	0.016-0.034
Histidina	0.01	-

Neurotransmisores		
Glutamina	0.021	0.009-0.023
Aspargina	0.015	0.013-0.017
Glicina	0.001	-
GABA	0.026	-

7.2 PROBIÓTICOS

7.2.1 DEFINICIÓN

La palabra "probiótico" se deriva del griego y significa "pro vida". El primer concepto acerca de los probióticos provino de la teoría propuesta por Elie Metchnikoff a principios del siglo XX; donde indicó que la ingestión de algunas bacterias seleccionadas puede influir de forma benéfica en el tracto gastrointestinal (TGI) de los seres humanos. Sugirió también que, debido a la dependencia de los microbios intestinales de los alimentos, es posible manipular la microbiota en nuestros cuerpos sustituyendo microbios dañinos por útiles (Shokryazdan et al., 2017).

Este concepto se fue desarrollando al paso de las décadas y es entonces, que el término probiótico fue utilizado por primera vez en 1965, por Lily y Stillwell para describir las sustancias secretadas por un organismo que estimulan el crecimiento de otro. Parker (1974) dio una definición temprana como "Organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal" (Sarao & Arora, 2017). Sin embargo, esto fue posteriormente refinado por Fuller (1989) como "un suplemento alimenticio microbiano vivo que afecta beneficiosamente al animal huésped al mejorar su equilibrio microbiano intestinal". Esta última versión es la definición más utilizada y ha ganado una amplia aceptación científica. Por lo tanto, un probiótico incorporaría microorganismos vivos a la dieta, que son beneficiosos para la salud intestinal (Sarao & Arora, 2017).

La OMS y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) definen a los probióticos como "organismos vivos que al ser administrados en raciones adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped" (Márquez-

MARCO TEORICO

Villalobos et al., 2017). Además, los probióticos se pueden caracterizar como suplementos dietéticos que incluyen cepas microbianas vivas que pueden colonizar de forma persistente o transitoria, el tracto gastrointestinal humano y conferir una influencia benéfica sobre la fisiología del huésped, como mejora a la salud. Este proceso es particularmente importante cuando se ha alterado la biota nativa normal: es en ese momento, donde los probióticos suplementados exógenamente de una especie/cepa pueden colonizar temporalmente el tracto intestinal y estabilizar la composición de la microbiota, restaurando así la función fisiológica vital: una biota comensal (Sharifi-Rad et al., 2020). No obstante, muchos estudios científicos clínicos han desencadenado el desarrollo de productos ricos en probióticos en el mercado, y se han reportado apropiaciones indebidas del término "probiótico". Por esa razón, en 2013, la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP en inglés) creó el nuevo concepto de "probiótico", como se muestra en la Figura 7-1 (Sharifi-Rad et al., 2020).

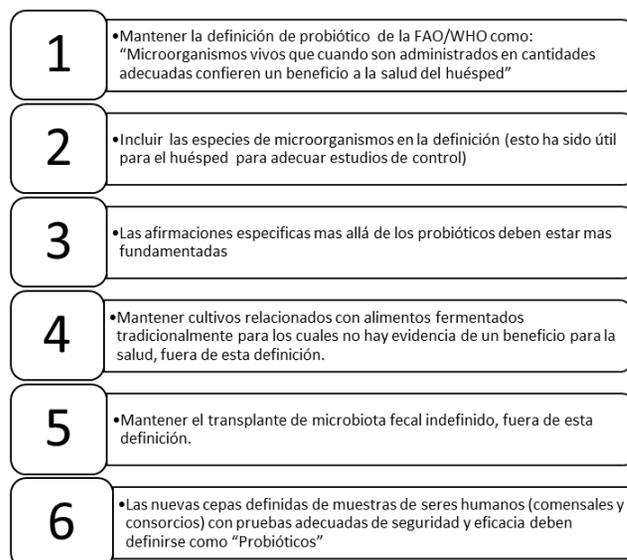


Figura 7-1 El nuevo concepto de probiótico. Abreviaciones: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO) (Sharifi-Rad et al., 2020).

7.2.2 CRITERIOS Y CARACTERÍSTICAS

Como se puede observar, la definición del término probiótico se ha ido especificando con diversas propuestas. La seguridad, la funcionalidad y la utilidad tecnológica representan los criterios cruciales para la selección de probióticos. Esta selección se estableció de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (Kosin & Rakshit, 2006; Zommiti et al., 2020) .Para que un microorganismo pueda ser considerado como probiótico, debe de cumplir los siguientes criterios:

- i. La cepa del microorganismo debe identificarse correctamente.
- ii. Que sea de origen humano (por lo que el organismo lo reconocerá como propio y lo tolerará mejor) aunque se han utilizado otros probióticos de naturaleza no humana.
- iii. No patogénico y ser reconocido como seguro (“*Generally Recognized As Safe*” GRAS).
- iv. Presentar un buen crecimiento hasta altas concentraciones durante la producción de biomasa.
- v. Ser resistente a la acidez gástrica y biliar y a las enzimas proteolíticas.
- vi. Ser capaz de permanecer (al menos temporalmente) en el sistema digestivo.
- vii. Soportar las condiciones de almacenamiento y procesamiento de alimentos.
- viii. Adherirse al tejido epitelial del intestino.
- ix. Producir compuestos antimicrobianos, controlar la respuesta inmune e influir en la actividad metabólica
- x. Verificar esta funcionalidad probiótica en humanos (aunque los estudios de laboratorio *in vitro* y en modelos animales son imprescindibles como una primera aproximación, no se consideran prueba suficiente y deben llevarse a cabo ensayos de intervención en humanos) (Marina Alegre et al., 2021).

MARCO TEORICO

Cada cepa probiótica potencial debe ser correctamente identificada, seguida de varias pruebas in vitro para investigar sus propiedades funcionales. Sus principales características se desglosan a continuación:

I. Resistencia a las sales acidas y biliares:

De acuerdo a Dunne (2001), los probióticos deben de ser capaces de sobrevivir y permanecer activos en el tracto digestivo. La cantidad de tiempo que las cepas pasan en el estómago, la combinación de los alimentos que consumen y el a través del intestino delgado pueden tener un impacto en la adherencia de estas al epitelio intestinal. El principal método de defensa contra la mayoría de los microorganismos ingeridos es la secreción de jugos gástricos (moco, HCl y enzimas proteolíticas) en el estómago. Las porciones acidificadas de la ingesta en el estómago, desembocan en el duodeno, donde se mezclan con la bilis y jugos pancreáticos. Las cepas que son capaces de sobrevivir y llevar a cabo su metabolismo en presencia de niveles fisiológicos de sales biliares, sobrevivirán mejor el tránsito gastrointestinal (Iñiguez-Palomares et al., 2010).

II. Actividad de la hidrolasa de la sal biliar (BSH) y resistencia a la sal biliar:

Algunas cepas de bacterias probióticas tienen la capacidad para producir BSH e hidrolizar sales biliares. Esta capacidad está relacionada con la resistencia de las cepas a la presencia de sales biliares y parece ser un mecanismo defensivo de la cepa bacteriana frente a las sales biliares conjugadas. Las sales biliares desconjugadas tienen menos solubilidad y actividad detergente reducida y pueden ser menos tóxicas para las bacterias. BSH es capaz de hidrolizar las sales biliares conjugadas con glicina y taurina al aminoácido correspondiente y a los ácidos biliares desconjugados libres (Shokryazdan et al., 2017).

La actividad BSH de las bacterias probióticas a menudo se ha incluido en los criterios para la selección de cepas probióticas potenciales porque se ha considerado que participa en la reducción del colesterol plasmático del huésped a través de varios

MARCO TEORICO

mecanismos. Como las sales biliares desconjugadas son menos solubles que las conjugadas, es más probable que se excreten en las heces. Por tanto, la síntesis de nuevas sales biliares a partir del colesterol en el hígado puede, a su vez, reducir el colesterol plasmático del huésped. Además, las sales biliares desconjugadas pueden precipitarse con el colesterol y disminuir su solubilidad, lo que da lugar a una mayor excreción fecal de colesterol (Shokryazdan et al., 2017).

III. Capacidad de adherencia a la mucosa / células epiteliales:

La capacidad de adhesión en el epitelio es un requisito importante para considerar una cepa como probiótico, ya que, de esta manera, podrá brindar al huésped sus beneficios por un periodo de tiempo amplio, además que es el factor importante para la colonización de probióticos en la microbiota intestinal, ejerciendo a su vez un efecto competitivo contra la microbiota patógena (Arenas Cedillo, 2015).

Para este propósito, los componentes con los que cuenta la membrana celular que pueden acoplarse a la superficie del epitelio intestinal son: proteínas similares a lectinas, proteínas de bajo peso molecular capaces de unirse a mucina, proteínas de capa S, proteínas específicas a oligomanosidos, gangliotriosilceramidas y gangliotetraosilceramidas y ácidos lipoteicoicos (Arenas Cedillo, 2015).

IV. Actividad antimicrobiana:

Una gama significativa de sustancias producidas por bacterias probióticas inhibe los microorganismos patógenos. Estas sustancias eliminan a las bacterias no deseadas al producir ácidos grasos de cadena corta, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y piro glutamato. Los ácidos láctico y acético representan más del 90% de los ácidos orgánicos producidos por la mayoría de las cepas probióticas y la reducción de pH en el tracto intestinal, debido a estos ácidos, tiene un efecto bactericida o bacteriostático (Iñiguez-Palomares et al., 2010).

7.2.3 TIPOS DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

La microbiota humana está compuesta por bacterias, levaduras, hongos y virus (cuya composición aún no se ha descrito completamente). Estudios indican que nuestro microbioma puede cambiar rápidamente, en un plazo de tres o cuatro días tras cambiar la alimentación. El consumo de una dieta basada principalmente en plantas, favorece el crecimiento de cepas probióticas específicas, las cuales han demostrado beneficios para la salud (Sen, 2019).

Tradicionalmente se han relacionados como probióticos a las bacterias grampositivas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como otros microorganismos del género *Saccharomyces*. En ensayos recientes se ha determinado que otras bacterias tales como *Roseburia spp.*, *Akkermansia spp.*, *Propionibacterium spp.* y *Faecalibacterium spp.* podrían ser prometedores candidatos a probióticos (Sanders et al., 2019).

La Tabla 7-8 muestra algunos de los probióticos más comunes que se encuentran en los productos comerciales. Como puede verse, la mayoría de ellos son varias especies de lactobacilos y algunas bifidobacterias.

Tabla 7-8. Algunos de los probióticos principales empleados en productos comerciales
Lactobacillus (L.), Bifidobacteria (B.) (Marina Alegre et al., 2021).

Lactobacillus	Bifidobacterium	Otros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faescium</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. buchneri</i>	<i>B. breve</i>	<i>Sacharomyces boulardii</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Escherichia coli Nissle 1917</i>
<i>L. plantarum</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. rhamnosus GG</i>		
<i>L. reuteri</i>		

7.2.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS

Gran parte de nuestros conocimientos sobre los mecanismos probióticos se basan en investigaciones realizadas con modelos in vitro, animales, cultivos celulares o ex vivo (en humanos). La figura 7-2 muestra las interacciones entre probióticos y huésped, distribuidas entre diversas cepas probióticas (Sanders et al., 2019).

Los probióticos afectan el ecosistema intestinal al modificar los mecanismos inmunológicos de la mucosa, interactuando con microorganismos comensales o potencialmente patógenos, generando productos metabólicos, como ácidos grasos de cadena corta, comunicándose con las células del huésped utilizando señales químicas (Figura 7-3). Estos mecanismos pueden dar como resultado una disminución en el número de patógenos potenciales, una mejora en el ambiente intestinal, un fortalecimiento de la barrera intestinal, una reducción de la inflamación y un aumento en la respuesta del sistema inmunológico al desafío antigénico. Se cree que estos fenómenos median la mayoría de los efectos beneficiosos (Guarner et al., 2017).

No todos los mecanismos han sido confirmados en humanos ni existen en todas las cepas probióticas. Aunque es probable que se expresen múltiples mecanismos en un mismo probiótico, la importancia de cualquier mecanismo dependerá de muchos factores. Por ejemplo, en un intestino inflamado, la capacidad de regular a la baja los mediadores inflamatorios y aumentar la función de barrera epitelial podría ser lo más importante mientras que la capacidad de aumentar los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y la hidratación en el colon podría ser más importante para normalizar la motilidad intestinal (Sanders et al., 2019). Se describen a continuación los mecanismos que actúan:

a) Bloqueo de la adhesión de bacterias patógenas al epitelio intestinal al disminuir el pH intestinal, produciendo metabolitos y sustancias inhibitoras como ácidos grasos libres, péptidos antibacterianos, ácido láctico y sustancias oxidantes como el

MARCO TEORICO

peróxido de hidrógeno. b) Supresión del crecimiento de las bacterias patógenas mediante la unión directa a las bacterias gramnegativas inhibiendo la invasión bacteriana y bloqueando la adhesión y translocación de los patógenos al epitelio. c) Mantenimiento de los niveles normales de ácidos grasos de cadena corta (AGCC): Los productos de la actividad metabólica de los probióticos como el etanol, lactato, acetato, ácido fólico, piruvato y succinato, pueden ser metabolizados para producir ácidos grasos de cadena corta (SCFA), que influyen en el metabolismo, proliferación y apoptosis de las células epiteliales (Medina Torres et al., 2014; Reyes Esparza & Rodríguez Fragoso, 2012; Sen, 2019).

d) Reparación de la permeabilidad intestinal: La composición del ecosistema intestinal puede verse alterada por los probióticos ya que poseen la capacidad de adherirse a enterocitos y colonocitos, aumentando el efecto barrera independiente del sistema inmunológico. La modificación en la expresión y la redistribución de las uniones estrechas reduce la permeabilidad intestinal limitando la absorción de moléculas nocivas (Reyes Esparza & Rodríguez Fragoso, 2012; Tormo Carnicé, 2006).

f) Producción de sustancias antimicrobianas: los probióticos pueden segregar antibióticos naturales con amplio espectro de actividad, como las lactocinas, las helveticinas, las curvacinas, las nicinas y las bifidocinas. de esta forma acortan la duración de la diarrea, pero en estudios recientes se ha demostrado que para ser realmente efectivos primero han de haber colonizado, por lo que sus efectos no se notarán hasta 2-3 días después de su administración (Rondon et al., 2015)

g) Regulación del metabolismo de los lípidos: se observa la disminución de los niveles de colesterol y lipoproteínas de baja densidad, así como un aumento en los niveles de lipoproteínas de alta densidad (Manzano A. et al., 2012). Uno de los mecanismos propuestos que puede influir en el descenso del colesterol al ingerir probióticos es la disminución de la actividad de la betahidroximetil glutaril-CoA hepática, lo que disminuye la síntesis del colesterol. (Tormo Carnicé, 2006).

MARCO TEORICO

h) Acción en el sistema inmunitario: las bacterias probióticas productoras de ácido pueden influir y modular las respuestas inmunitarias, en parte a través del tejido linfoide asociado a mucosa. Se ha demostrado con el uso de probióticos: Por parte de los linfocitos, la producción de gama inter-ferón gamma (IFN). Por parte de los macrófagos peritoneales, la producción de IFN- α . se ha podido demostrar un estímulo de las células t helper (th) 1, productoras de citocinas y causantes de la inmunidad celular. Pueden modificar las relaciones entre las th1 y las th2 y así influir en el pronóstico y la evolución de las alergias (Rondon et al., 2015).

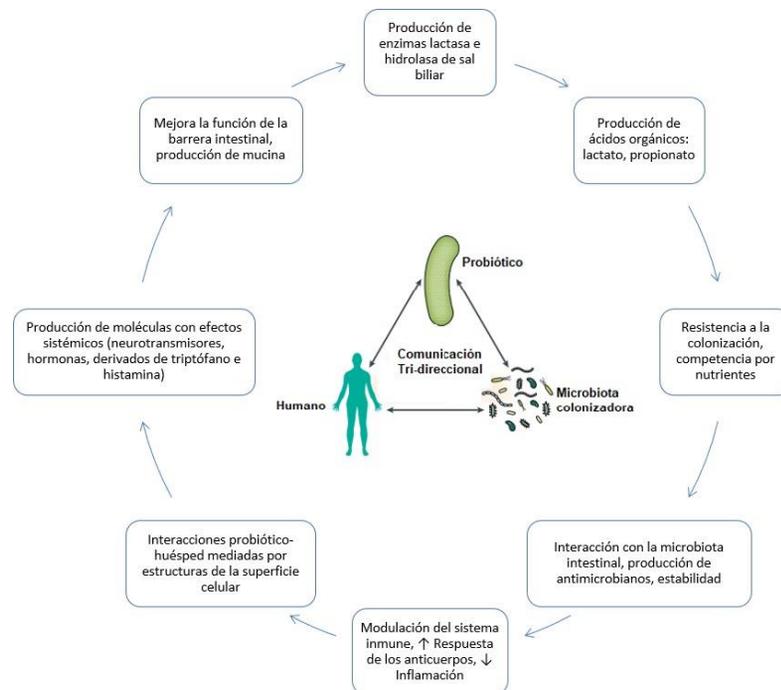


Figura 7-2. Mecanismos de interacción entre probióticos y huésped. En general, los beneficios clínicos aportados por los probióticos podrían ser el resultado de la acción combinada de varios mecanismos. (Modificado de Sanders et al., 2019).

A su vez, los mecanismos de acción dependen de varios factores, como su resistencia a la colonización, la estimulación de la fagocitosis, la producción de compuestos antimicrobianos, los efectos antimutagénicos, la producción de quimiocinas y el impacto en la actividad enzimática y el suministro de enzimas (Zommiti et al., 2020).

MARCO TEORICO

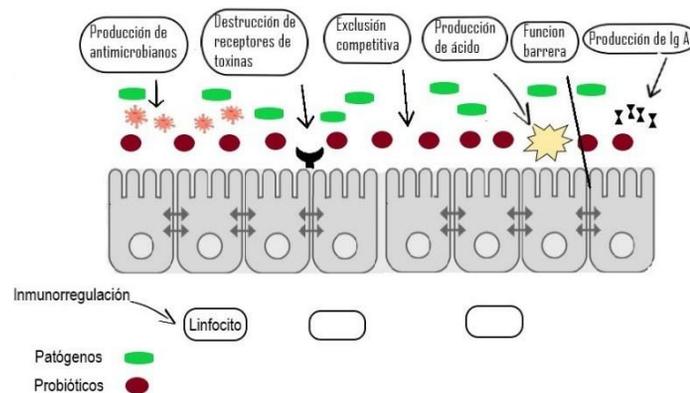


Figura 7-3. Mecanismo de acción de los probióticos. (Modificado de Olveira & González-Molero, 2016).

7.2.5 EFECTOS BENEFICOS EN LA SALUD

Recientemente, ha habido un aumento en la literatura científica directamente relacionada con los efectos benéficos de los microorganismos probióticos sobre la salud y las enfermedades humanas. Estos estudios clínicos cubren ciertas categorías de pacientes que padecen enfermedades específicas como los trastornos metabólicos (diabetes, obesidad, dislipidemia, hipertensión), disbiosis y trastornos gastrointestinales (diarrea asociada a antibióticos, enfermedad inflamatoria intestinal, estreñimiento, síndrome del intestino irritable, diarrea secundaria al tratamiento de enfermedades atópicas (síndrome atópico e hipersensibilidad alimentaria), rinitis alérgica), vaginosis bacteriana, infecciones del tracto respiratorio y urinario, ansiedad y trastornos depresivos (Zommiti et al., 2020). Como parte de la orientación de esta investigación, a continuación, se muestra en la tabla 7-9 algunos ensayos clínicos realizados con respecto a la evaluación de la efectividad de la ingesta de probióticos relacionados a los trastornos metabólicos: sobrepeso, obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y dislipidemias.

Tabla 7-9. Estudios clínicos y el efecto de la administración de probióticos en la salud humana.

(Modificado de Zommiti et al., 2020).

MICROORGANISMOS PROBIOTICOS	BENEFICIOS ESPECIFICOS REPORTADOS EN REFERENCIAS INDICADAS	REFERENCIAS
SOBREPESO Y OBESIDAD		
<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Reducción del peso corporal, presión arterial sistólica LDL-C (colesterol de lipoproteínas de baja densidad) y aumento de los niveles de fibrinógeno.	(Agerholm-Larsen et al., 2000)
<i>Lactobacillus gasseri SBT2055</i>	Disminución significativa del índice de masa corporal (IMC), cintura, área de grasa visceral abdominal (VFA) y circunferencia de la cadera.	(Kadooka et al., 2010)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Reducción del IMC y de los niveles de presión arterial.	(Sharafedtinov et al., 2013)
<i>Lactobacillus acidophilus La5</i> , <i>Bifidobacterium lactis Bb12</i> , <i>Lactobacillus casei DN001</i>	Modificaciones drásticas en la expresión génica en PBMC, así como en el IMC, el porcentaje de grasa y los valores de leptina.	(Zarrati et al., 2013, 2014)
<i>Bifidobacterium</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Mejora del perfil lipídico, sensibilidad a la insulina y disminución de la PCR (proteína C reactiva)	(Rajkumar et al., 2014)
DIABETES TIPO 2 Y DISLIPIDEMIAS		
<i>Lactobacillus acidophilus La-5</i> , <i>Bifidobacterium animalis BB-12</i>	Niveles de HDL-C mejorados y relación LDL-C / HDL-C reducida	(Mohamadshahi et al., 2014)
<i>Lactobacillus plantarum A7</i>	Disminución del proceso de metilación, SOD (superóxido dismutasa)	(Hariri et al., 2015)
<i>Lactobacillus acidophilus La-5</i> , <i>Lactobacillus animalis BB-12</i>	Diferencia significativa entre los grupos con respecto a los cambios medios de HbA1c, TC y LDL-C	(Tonucci et al., 2017)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus reuteri NCIMB</i>	Niveles reducidos de LDL-C (colesterol de lipoproteínas de baja densidad)	(Shimizu et al., 2015)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Se encontró una reducción significativa en LDL.	(Sun & Buys, 2015)
<i>Lactobacillus reuteri NCIMB 30242</i>	Reducción del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad en un 11,64% y del colesterol total en un 9,14% en adultos hipercolesterolémicos	(Jones et al., 2012)
<i>Weissella koreensis</i>	Efecto significativo contra la obesidad	(Le, 2018)

MARCO TEORICO

Como se puede apreciar, los microorganismos probióticos que tienen una presencia predominante con relación a los efectos benéficos de los desórdenes metabólicos mencionados fueron bacterias del ácido láctico (LAB) pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Estos a su vez son los de mayor uso en las industrias alimenticias y farmacéuticas, sobre todo en el área de los alimentos funcionales.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 SELECCIÓN DEL AREA DE MUESTREO

La localidad del Almacén en el municipio de Santa María Apasco perteneciente al distrito de Nochixtlán, Oaxaca (Coordenadas 17°38'0" N, 97°00' W) fue seleccionada como sitio de investigación, debido a que en la actualidad es identificada como una de las áreas de mayor producción de pulque en el estado, además de que promueve el rescate y acciones de conservación del maguey pulquero nativo de la región Mixteca para la producción de pulque y aguamiel. Su importancia radica en el hecho de que esta región se encuentra localizada dentro de la zona de la biosfera de Tehuacán – Cuicatlán la cual se caracteriza por una amplia distribución y variedad de magueyes.

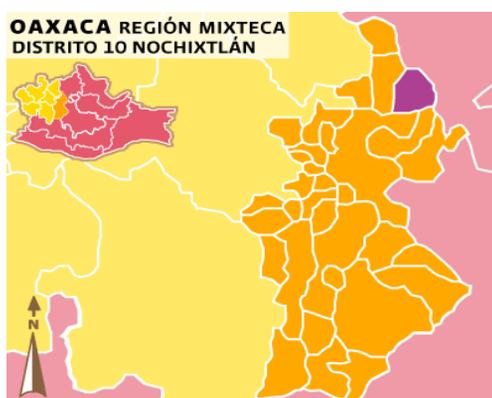


Figura 8-3 Ubicación de la localidad de Santa María Apasco, Nochixtlán Oaxaca. Se observa la región en color púrpura (INAFED Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal, 2010).

8.1.2 Selección de la muestra

Se tomaron cuatro muestras de pulque las cuales fueron recolectadas durante los meses de octubre, noviembre 2021 y febrero de 2022, de acuerdo a la disponibilidad del productor. Cada muestra fue tomada por lote de producción semanal, bajo los puntos establecidos en la Norma oficial Mexicana NOM-SSA1-109. El criterio de selección para el pulque muestreado fue decidido de acuerdo al estándar, en el cual el producto debería tener una consistencia lechosa y ligeramente espesa sin

METODOLOGÍA

sensación pegajosa, presentar un color blanco “lechoso”, sabor fresco y agradable y un olor Sui-generis; características relacionadas al pulque de tipo 1 pulque de semilla y alta calidad las cuales se pueden observar en la Figura 8-2 (NMX-V-037, 1978; NOM-109-SSA1-1994).

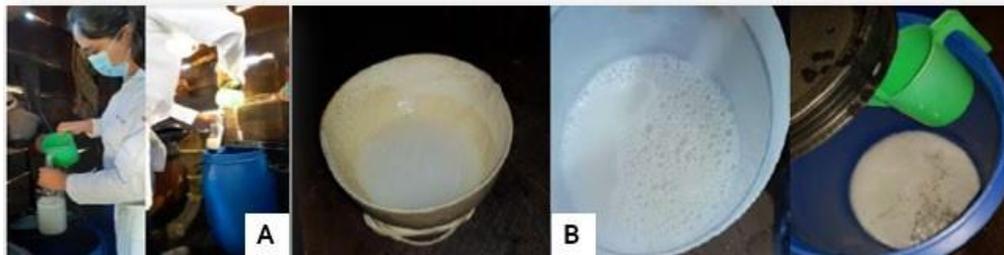


Figura 8-2. Muestreo de pulque (A) características físicas observables (B).

8.2 CARACTERIZACION BROMATOLÓGICA

El análisis bromatológico se realizó bajo la normativa aplicable para cada uno de los criterios establecidos, que son los siguientes:

Determinación del porcentaje de alcohol-volumen en la escala de Gay-Lussac: La fracción de etanol de cada muestra se obtuvo por destilación simple, colocando 300 ml de la muestra de pulque en el matraz de destilación junto con 10 perlas de ebullición; a 65 °C. Se determinó la temperatura del destilado obtenido después de 4 horas y se midió con el alcoholímetro. Los datos obtenidos se verificaron en la tabla de corrección del grado alcohólico para estandarizar a 20 °C (NMX-V-013-S-1980).

Determinación del porcentaje de cenizas: Se colocaron 3 g de pulque en un crisol a peso constante; se colocó el crisol en una parrilla y se incineró el material hasta que dejó de desprender humos. La muestra se llevó a la mufla para su calcinación a 400°C durante 2 horas, luego, antes de enfriar, se determinó peso del crisol con las cenizas (NMX-F-066-S-1978).

Determinación del porcentaje de proteínas: La determinación se realizó por el método Kjeldahl - Gunning. El matraz para la digestión se preparó utilizando 1 g de

METODOLOGÍA

muestra de pulque, 1,5 g de mezcla digestora de sulfato de sodio y sulfato de cobre 1:1, añadiendo 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente para la recepción del destilado se colocó un vaso de precipitados con 6 ml de solución de ácido bórico y 6 gotas de indicador Shiro-Toshiro. Finalmente, el destilado se valoró con ácido clorhídrico 0,099 N (NOM-F-68-S, 1980) .

Acidez expresada como ácido láctico: se colocaron 100 ml de agua destilada libre de CO₂ en un matraz Erlenmeyer, se añadieron 25 ml de pulque y 0,5 ml de fenolftaleína. La muestra se valoró con una solución de NaOH 0,1066 N (NOM-F-420-S, 1982)

Grados Brix y pH: Las muestras se midieron directamente con un potenciómetro HANNA previamente calibrado para la determinación del pH y con un refractómetro Abbe para la medición de grados Brix.

8.3 EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS DE LA CALIDAD DEL PULQUE.

Las muestras se prepararon de acuerdo al procedimiento de la Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994 para su posterior análisis. Los indicadores evaluados fueron: organismos mesófilos aerobios, mohos y levaduras, coliformes, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* de acuerdo a las Normas Oficiales Mexicanas correspondientes para cada uno de ellos (NOM-092-SSA1-1994, NOM-111-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994, NOM-115-SSA1-1994 y NOM-114-SSA1-1994, respectivamente).

8.4 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS MICROBIANAS PRESUNTAMENTE PROBIÓTICAS.

Inicialmente, las muestras de pulque fueron homogeneizadas y se empezó tomando 10 ml de cada muestra, añadiéndolos a un matraz Erlenmeyer previamente esterilizado que contenía 90 ml de agua peptonada al 0,1 p/v, realizando diluciones en serie hasta 10⁻⁹. Se sembraron 0,1 ml de las diluciones 10⁻⁶, 10⁻⁷ y 10⁻⁸ mediante la técnica de placa extendida en agar MRS (Man Rogosa Sharp). Se incubó a 37°C

METODOLOGÍA

durante 48 horas en condiciones anaeróbicas siendo estas generadas utilizando un frasco de vidrio hermético y colocando una vela encendida para el consumo del oxígeno. Al final del periodo de incubación, se contaron las células viables considerando la caja estadísticamente representativa (Campos Quintana, 2010; León-de la O et al., 2012). Las colonias fueron seleccionadas para su aislamiento de acuerdo a la forma, borde, elevación, textura, pigmentación, consistencia del olor y las características coloniales descritas para las bacterias del género *Lactobacillus spp.* (Carrasco Torres, 2019). Se utilizó como control positivo la cepa *Lactobacillus Casei* L-431 aislada del producto comercial Lalacult®. Se realizaron las pruebas bioquímicas de tinción de Gram y Catalasa; conservando las cepas puras aisladas a medio plazo, incubándolas en caldo MRS durante 24 horas inoculándolas posteriormente al medio semisólido Agar MRS + 0,5% de agar bacteriológico por picadura.

8.4.1 PRUEBA DE FERMENTACIÓN DE AZÚCARES

Con esta prueba se determinó la capacidad de fermentación de un azúcar en particular a partir de la producción de ácidos acompañados o no de gases mediante un indicador. Para la realización de la prueba se prepararon tubos con solución de 10 ml que contenía Caldo Rojo Fenol al 1% y el azúcar a fermentar al 0.5%. los azúcares utilizados fueron dextrosa, sacarosa, fructosa y lactosa. A cada tubo se le inoculó una colonia de la cepa a analizar y se incubaron a 35°C durante 24 horas. La fermentación del azúcar se evidenció al viraje del color de indicador, de un rojo a amarillo (Condalab, 2019).

8.5 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LA RESISTENCIA A LAS CONDICIONES GÁSTRICAS SIMULADAS

Para los jugos gástricos simulados, se ajustó una solución salina a pH 2,0 con HCl 1 N y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min, suspendiendo pepsina en la solución hasta una concentración final de 3 g/L. De cada cepa aislada, se inocularon 100 µl de la suspensión bacteriana con una densidad bacteriana de 1×10^8 que corresponde al tubo 0.5 en la escala de Mc Farland, en 9.9 ml de la solución,

METODOLOGÍA

incubando a 37°C durante 2 horas. Como comprobación de la supervivencia de los microorganismos, se inoculó la suspensión tomando 100 µl en agar APT y se incubó a 37°C durante 24 horas (Mahmoud et al., 2020). Se utilizó la siguiente ecuación para determinar el recuento de células viables:

$$\% \text{ supervivencia} = (\log \text{ UFC N1} / \log \text{ UFC N0}) \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

N1 se refiere al número de células viables después de los tratamientos.

N0 representa el número inicial de bacterias inoculadas.

8.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS AISLADAS FRENTE A CEPAS PATÓGENAS

El análisis se realizó de acuerdo a la técnica de Kirby-Bauer o de difusión en placa con modificaciones (Tovar Oviedo & Martínez Gutiérrez, 2018). Las cepas aisladas de la muestra se inocularon en caldo MRS y se incubaron durante 24 horas a 37°C. Las cepas patógenas *Escherichia coli sp.* y *Salmonella spp.* se activaron en Agar Cromogénico E. Coli-Coliformes (CCA) y Agar XLD (Xilosa, Lisina y Desoxicolato, respectivamente) en las mismas condiciones. Las colonias de las cepas patógenas activadas se seleccionaron inoculándolas en tubos con 10 ml de solución salina e incubándolas durante una hora antes de la prueba. Tras la incubación, se comparó la turbidez de los tubos utilizando la escala McFarland, siendo similar a la del tubo estándar 0,5 de esta escala (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades-CDC & Organización Mundial de la Salud-OMS, 2009).

Se inocularon 50 microlitros de cada cepa patógena en placas de Petri con agar soja Trypticaseina, extendiendo el inóculo con un hisopo cubriendo toda la superficie del agar. A continuación, se colocaron tres discos de papel de filtro en cada placa inoculada. En cada prueba, dos de los discos se inocularon con 20 microlitros de las cepas de prueba y el restante se inoculó con agua estéril. Las placas se incubaron a

METODOLOGÍA

37°C durante 24 horas sin ser invertidas (Cervantes-Elizarrarás et al., 2019; Ruiz Ramírez, 2017; Tovar Oviedo & Martínez Gutiérrez, 2018). La actividad antimicrobiana se determinó midiendo los halos de inhibición con la fórmula:

$$H_i = (D_T - D_D)/2$$

Ecuación 2

H_i = halo de inhibición en mm.

D_T = Diámetro Total (diámetro del disco + halo de inhibición en mm)

D_D = Diámetro del disco.

RESULTADOS

9. RESULTADOS

9.1 RESULTADOS DE PRUEBAS BROMATOLÓGICAS

9.1.1 Determinación del porcentaje de alcohol-volumen

Los resultados obtenidos de la medición del porcentaje de alcohol volumen en la escala de Gay Lussac se presentan en la tabla 9-1. De acuerdo al análisis de varianza realizado, existe una diferencia altamente significativa en el contenido del porcentaje de alcohol volumen en todas las muestras de pulque.

Se observó que la muestra 2 es la que mayor contenido de alcohol tiene con un 16% Alc. Vol. Por lo tanto, aunque todas las muestras provienen del mismo productor, existe una variación importante en el contenido de alcohol entre cada una de ellas.

Tabla 9-1 Análisis del porcentaje de alcohol volumen contenido en las muestras de pulque.

Muestra	% Alcohol Vol. a 20°C	Media	Desviación estándar
Muestra 1	7.7	7.733	0.0577
	7.8		
	7.7		
Muestra 2	16	16.1	0.1
	16.2		
	16.1		
Muestra 3	10.8	10.933	0.1155
	11		
	11		
Muestra 4	14.1	14.1	0.1
	14		
	14.2		

RESULTADOS

9.1.2 Cenizas

La tabla 9-2 muestra los datos que se obtuvieron en el análisis de cenizas de las cuatro muestras. Se puede apreciar que la muestra 1 fue la que presente mayor contenido de cenizas siendo 0.511631 g/100 ml lo obtenido.

Con respecto al análisis estadístico, no existe una diferencia significativa en el contenido de cenizas entre las diferentes muestras de pulque, aunque el valor de las medias sea en apariencia diferente.

Tabla 9-2 Análisis del contenido de cenizas en las muestras de pulque.

Muestra	Cenizas g/100 ml	Media	Desviación estándar
Muestra 1	0.38816	0.511631	0.13238
	0.65254		
	0.50821		
Muestra 2	0.41727	0.45159	0.03382
	0.45261		
	0.48489		
Muestra 3	0.39548	0.33862	0.05356
	0.33127		
	0.28911		
Muestra 4	0.40984	0.29279	0.12622
	0.15905		
	0.30949		

9.1.3 Porcentaje de proteínas

La cuantificación del porcentaje de proteínas de cada muestra analizada se encuentra en la tabla 9-3. Se determinó que existe una diferencia altamente significativa en el contenido de proteínas analizado en las muestras de pulque. De acuerdo al análisis de medias, las muestras 1 y 4 son las que mayor porcentaje de proteínas tienen y no existe una diferencia significativa entre ellas.

RESULTADOS

Tabla 9-3 Análisis del contenido de proteínas.

Muestra	Proteínas g/100 ml	Media	Desviación estándar
Muestra 1	0.97006	0.92955	0.06311
	0.96174		
	0.85684		
Muestra 2	0.56324	0.60019	0.03476
	0.63224		
	0.60508		
Muestra 3	0.57953	0.50799	0.06199
	0.47420		
	0.47024		
Muestra 4	0.83090	0.90296	0.06260
	0.94387		
	0.93411		

9.1.4 Acidez expresada como ácido láctico

Los resultados de las muestras de pulque las cuales fueron tituladas para obtener los ácidos orgánicos presentes expresados como ácido láctico son mostrados en la tabla 9-4. Se indica que el contenido de acidez expresada como láctico es diferente de manera altamente significativa en las muestras de pulque analizadas, siendo la muestra 3 la que mayor acidez presentó.

Tabla 9-4 Acidez expresada como ácido láctico en muestras de pulque.

Muestra	Acidez (g/100 ml)	Media	Desviación estándar
Muestra 1	0.998	0.99300	0.00700
	0.985		
	0.996		
Muestra 2	0.7773	0.78743	0.01154
	0.785		
	0.8		
Muestra 3	1.3993	1.43977	0.03505
	1.46		

RESULTADOS

	1.46		
Muestra 4	0.36	0.37567	0.02714
	0.407		
	0.36		

9.1.5 pH y Grados Brix

Para la evaluación de los parámetros de pH y de grados Brix se realizó la lectura de las muestras por triplicado, como en los anteriores análisis, no obstante, no hubo cambios en las lecturas de los mismos, por lo que en la tabla 9-5 se expresan los resultados obtenidos.

Tabla 9-5 Determinación de pH y grados brix.

Muestra	pH	Grados Brix
Muestra 1	3.72	3.26
Muestra 2	3.81	3.19
Muestra 3	3.44	2.69
Muestra 4	4.2	3.63

9.2 RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS DE LA CALIDAD DEL PULQUE.

Se realizó el análisis microbiológico a cada muestra en un lapso no mayor a 3 horas después de haber sido recolectada, esto debido a la naturaleza de la misma ya que tiende a degradarse rápidamente.

En la tabla 9-6 aparecen los resultados obtenidos de estos análisis, no obstante, la norma (NMX-V-037, 1978), no tiene un apartado para establecer los límites máximos permitidos de estos microorganismos. Como se puede observar, todas las muestras estuvieron libres de dos principales microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Salmonella* los cuales son causantes de enfermedades gastrointestinales.

RESULTADOS

Tabla 9-6 Análisis microbiológico (datos expresados en UFC/ml).

Parámetro evaluado	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
Coliformes	1150	610	55	25
<i>Escherichia coli</i>	--	--	--	--
<i>Staphylococcus aureus</i>	80	4000	63	50
Mesófilos aerobios	2.4E+06	4.36E+06	1.94E+06	1.86E+06
Mohos y Levaduras	1.4E+06	7.64E+06	3.65E+07	5.02E+06
<i>Salmonella</i>	--	--	--	--

9.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS COLONIAS AISLADAS

Se obtuvieron colonias UFC representativas de las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} las cuales fueron resembradas para su aislamiento. No se obtuvieron colonias UFC de la dilución 10^{-8} . Aunque el tiempo estándar de incubación es de 48 horas, se lograron ver los resultados a las 84 horas de incubación, en las condiciones de temperatura y anaerobiosis descritas en la metodología.

Se aislaron 9 cepas tomando como control el aspecto de las colonias de *Lactobacillus Casei* L-431 sembradas con el mismo medio. Se observaron 3 distintos tipos de colonias aisladas descritas de la siguiente forma (las características de cada cepa se encuentran en la tabla 9-7):

- Colonias puntiformes, de consistencia butirácea, bordes enteros, de color crema, elevadas, brillantes y ligeramente transparentes.
- Colonias medianas, blancas, redondas, con elevación convexa y de bordes enteros, brillantes, textura lisa y consistencia suave.
- Colonias pequeñas, blancas, redondas, elevadas, consistencia suave, bordes enteros, textura lisa y brillantes

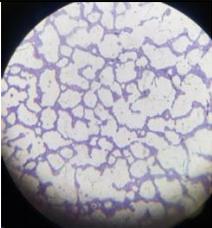
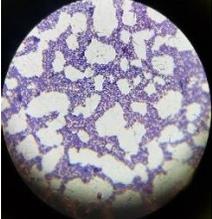
RESULTADOS

Tabla 9-7 Características morfológicas de las colonias aisladas de las muestras de pulque.

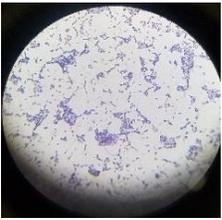
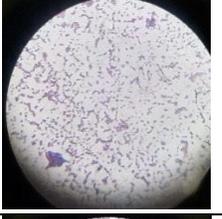
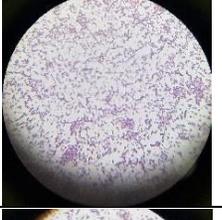
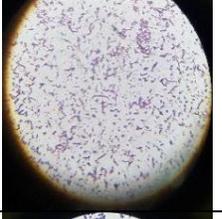
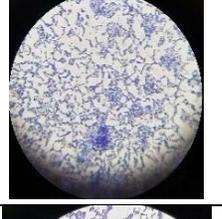
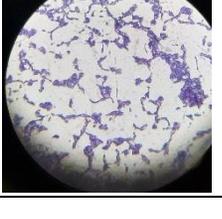
CEPA	TAMAÑO	COLOR	FORMA	ELEVACION	SUPERFICIE	BORDES	CONSISTENCIA
6A1C	puntiforme	crema	redonda	plana	brillante	irregular	butirácea
6A1R	mediana	blanca	redonda	convexa	brillante	entero	suave
6A1T	mediana	blanca	redonda	convexa	brillante	entero	suave
7A1C	puntiforme	blanca	redonda	elevada	brillante	entero	suave
7A1R	puntiforme	blanca	redonda	elevada	brillante	entero	suave
7A1T	pequeña	blanca	redonda	elevada	brillante	entero	suave
BT17	mediana	blanca	redonda	convexa	brillante	entero	suave
BT27	puntiforme	blanca	redonda	elevada	brillante	entero	suave
BT37	pequeña	blanca	redonda	elevada	brillante	entero	suave

Para la prueba de tinción de Gram, todas las cepas fueron positivas. Con respecto a la morfología microscópica, las colonias presentaron formas de bacilo, estreptobacilo y estreptococos. Para la prueba de la catalasa, todas las cepas dieron negativo, utilizando como controles *Escherichia coli* como control positivo y *Lactobacillus Cassei L-431* (tabla 9-8).

Tabla 9-8 Resultados de tinción de Gram y prueba de catalasa a cepas aisladas.

CEPA	TINCIÓN GRAM	CATALASA	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA	IMAGEN
6A1C	positivo	negativo	estreptococos	
6A1R	positivo	negativo	bacilos cortos	

RESULTADOS

6A1T	positivo	negativo	estreptococos	
7A1C	positivo	negativo	estreptococos	
7A1R	positivo	negativo	estreptobacilos cortos	
7A1T	positivo	negativo	estreptobacilos	
BT17	positivo	negativo	bacilos largos	
BT27	positivo	negativo	estreptobacilos	
BT37	positivo	negativo	estreptobacilos largos	

RESULTADOS

9.3.1 Resultados prueba de fermentación de azúcares

Esta prueba determinó la capacidad de los microorganismos aislados de fermentar azúcares. Los resultados variaron entre cepas, teniendo como un común denominador la fermentación de la fructosa. Las cepas 6A1C y 6A1T no fermentaron dextrosa ni sacarosa, 6 cepas no fermentaron la lactosa y solo 3 cepas fermentaron los 4 azúcares puestos a prueba.

Tabla 9-9 Fermentación de azúcares por parte de las cepas aisladas

CEPAS	DEXTROSA	LACTOSA	FRUCTOSA	SACAROSA
6A1C	-	-	+	-
6A1R	++	-	++	++
6A1T	-	-	++	-
7A1C	++	-	++	+
7A1R	++	-	++	++
7A1T	++	-	++	++
BT17	++	++	++	++
BT27	++	++	++	++
BT37	++	++	++	++

+ positivo viro a amarillo-oscuro.

++ altamente positivo viro a amarillo brillante.

- Negativo no hubo cambio de color, permaneció rojo.

RESULTADOS

9.4 RESULTADOS DE RESISTENCIA A CONDICIONES GÁSTRICAS SIMULADAS

Se realizó la cuantificación del porcentaje de resistencia a condiciones gástricas simuladas (pH 2.0 y resistencia a la enzima pepsina) de cada cepa. Los resultados de la comparación del porcentaje se encuentran en la tabla 9-10. El mayor porcentaje de supervivencia de los microorganismos es de 33.5% para la cepa 7A1T. Por su parte las cepas 6A1C y BT27 no lograron sobrevivir a las pruebas.

De acuerdo a los datos obtenidos del análisis estadístico realizado, se mostró que existe una diferencia altamente significativa entre los resultados de resistencia a condiciones gástricas simuladas de cada cepa.

Tabla 9-10 Porcentaje de supervivencia a condiciones gástricas simuladas.

CEPA	Promedio del % de supervivencia ± desviación estándar
6A1C	0
6A1R	26.47 ± 1.102
6A1T	15.733 ± 0.643
7A1C	27.4767 ± 0.1537
7A1R	13.90 ± 2.01
7A1T	33.550 ± 0.638
BT17	11.833 ± 0.764
BT27	0
BT37	11.167 ± 1.258

Desv.Est. agrupada = 0.9757

RESULTADOS

9.5 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS CEPAS AISLADAS FRENTE A CEPAS PATÓGENAS.

Se realizó el ensayo de actividad antimicrobiana, utilizando las cepas patógenas de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* mediante la técnica de Kirby-Bauer. Los resultados del diámetro de inhibición de cada prueba se encuentran reportados en la tabla 9-11, cabe resaltar que todas las cepas tienen actividad antimicrobiana, presentada a través de los halos de inhibición.

Tabla 9-11 Actividad antimicrobiana de las cepas de estudio contra microorganismos patógenos mediante halos de inhibición.

CEPA	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella spp.</i>
6A1C	0.5 ± 0	0.333 ± 0.289
6A1R	1.433 ± 0.981	2.33 ± 2.08
6A1T	2.333 ± 1.155	2.333 ± 1.155
7A1C	0.667 ± 0.577	1.5 ± 0.5
7A1R	2.5 ± 0.5	1.5 ± 0
7A1T	0.5 ± 0.5	0.667 ± 0.577
BT17	1.5 ± 0.866	1 ± 1
BT27	0.333 ± 0.289	0.333 ± 0.577
BT37	1.5 ± 0.5	0.667 ± 0.289
<i>Lactobacillus casei</i> L-431	2.66 ± 0.32	3.4 ± 0.67

Resultados expresados en milímetros, se presenta en la tabla la media ± la desviación estándar.

En la figura 9-1 se muestran imágenes del ejemplo del ensayo de inhibición de 2 cepas puestas a prueba contra las bacterias patógenas inoculadas en el agar, se puede observar un halo blanco alrededor de 2 círculos de papel filtro inoculados con la cepa analizada. De acuerdo al análisis estadístico realizado, los resultados de actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* son diferentes de manera altamente significativa entre las cepas probadas. A su vez, se realizó un análisis de comparación de medias, obteniendo como resultado dos grupos. En el grupo A se encontraron las cepas 7A1R y 6A1T las cuales obtuvieron los resultados de diámetro

RESULTADOS

de inhibición más altos, de 2.5 y 2.33 mm. En el segundo grupo se encontraron las 6 cepas restantes con resultados que van de 0.33 a 1.5 mm, sin embargo, no hay diferencia significativa entre los resultados de inhibición de las cepas de este grupo.

Para el análisis estadístico de la actividad antimicrobiana contra *Salmonella spp.* los resultados indican que, aunque la inhibición se manifiesta entre los 0.33 y 2.33 mm de diámetro, no existe una diferencia significativa en el efecto de inhibición entre las cepas puestas a prueba, no obstante, cabe mencionar que las cepas 6A1R y 6A1T presentaron los diámetros de inhibición más altos.

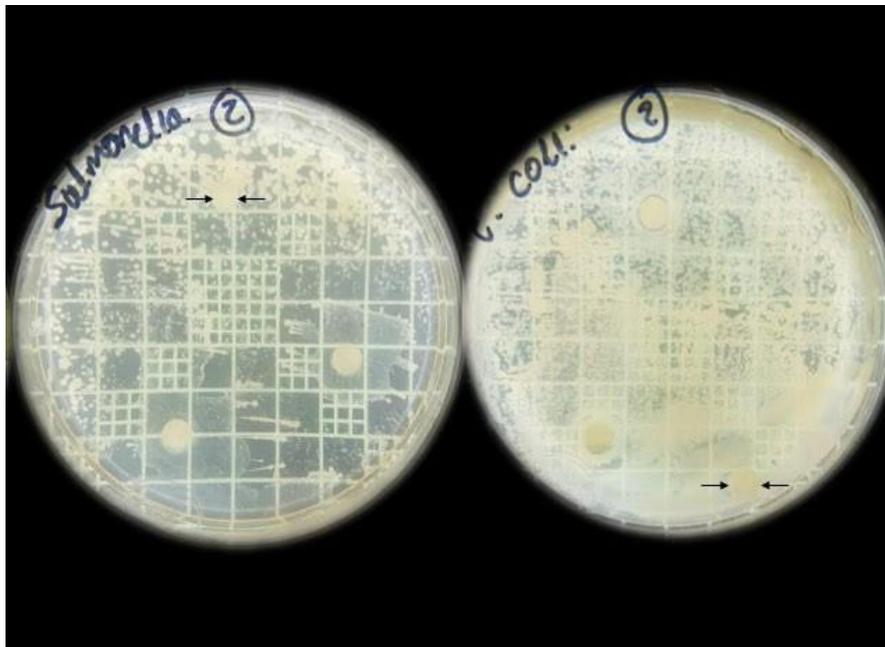


Figura 9-4 Prueba de actividad antimicrobiana por la técnica de Kirby- Bauer (fotografías ejemplificativas) Las flechas en color negro indican el blanco, que fue inoculado solo con agua destilada.

10. DISCUSIÓN

De acuerdo a los datos recabados con respecto a las propiedades bromatológicas del pulque, la tabla 9-12 concentra los parámetros evaluados en las muestras de pulque, siendo comparados con resultados de investigaciones recientes, no obstante, las fuentes de información son limitadas. De forma similar, se toman en cuenta los límites establecidos por la norma (NMX-V-037, 1978) , sin embargo, es importante señalar que la información que nos presenta no ha sido actualizada hasta el momento siendo una norma que tiene alrededor de 45 años

Tabla 9-12 Características bromatológicas (valor promedio \pm desviación estándar) de muestras de pulque de la localidad de Almacén Apasco, Oaxaca, en comparativa con características de pulque recopiladas de diferentes estudios.

Test	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	(Álvarez-Ríos et al., 2020)	(Sepúlveda Sáenz, 2020)	(León-de la O et al., 2012)	(NMX-V-037, 1978)
% Alc. Vol 20°C	7.733 \pm 0.0577	16.1 \pm 0.1	10.933 \pm 0.1155	14.1 \pm 0.1	4.92	Nr	6	6 – 9
% Cenizas (g/100 ml)	0.51631 \pm 0.13238	0.45159 \pm 0.03382	0.33862 \pm 0.05356	0.29279 \pm 0.12622	Nr	Nr	0.5	Nr
% Proteínas (g/100 ml)	0.92955 \pm 0.06311	0.600019 \pm 0.03476	0.50799 \pm 0.06199	0.90296 \pm 0.0626	Nr	0.07	0.31	Nr
pH	3.72	3.81	3.44	4.2	3.94	4.22	Nr	3.7 – 4.2
Grados Brix 20°C	3.26	3.19	2.69	3.63	7.48	Nr	Nr	Nr
Acidez expresada como ácido láctico g/ml (g/100 ml)	0.993 \pm 0.007	0.78743 \pm 0.1154	1.43977 \pm 0.03505	0.37567 \pm 0.02714	0.67	0.468	nr	0.40 – 0.75

El contenido de alcohol evaluado en el total de las muestras, es relativamente alto, ya que se encuentra entre el 7 y el 16% Alc. Vol., en comparación con los análisis realizados por Álvarez-Ríos et al.,(2020) y León-de la O et al (2012) quienes obtuvieron un valor de 4.92 y 6 respectivamente. De acuerdo a lo reportado por Sánchez Marroquín (1957) se han encontrado valores del contenido de alcohol entre un 5 y 10% (Adelfo Escalante et al., 2008). A su vez se puede observar que las muestras rebasan los límites establecidos por norma, lo que podría deberse a la

DISCUSIÓN

cantidad de microorganismos productores de etanol que contiene o a la cantidad de carbohidratos totales disponibles; pero estos no fueron evaluados.

Para el contenido de cenizas se encontró que este parámetro no es evaluado en la norma, siendo lo expresado por León-de la O (2012) con un valor de 0.5 g/100 y el valor de 0.3424 g/100 ml del pulque proveniente de Tlaxcala, evaluado por Núñez Galindo (2016) valores de referencia, debido a que el contenido de cenizas es bastante similar. La importancia de la evaluación de este parámetro radica en que la cantidad de cenizas puede representar el contenido total de minerales en el pulque y desde el punto de vista analítico, el conocer el valor del material inorgánico total es útil en la investigación cuantitativa de algunos oligoelementos importantes (Márquez Siguas, 2014).

Con respecto al contenido de proteínas, las cuatro muestras evaluadas presentaron un porcentaje mayor equiparado con los resultados de Sepúlveda Sáenz (2020) y León-de la O (2012), de la misma manera el resultado de 0.2560 g/100 ml obtenido por Núñez Galindo (2016) también se encuentra por debajo de lo obtenido en esta investigación.

El pH obtenido de los análisis de las muestras en conjunto con los datos plasmados en la Tabla 9-13 se encuentran dentro de los rangos establecidos por la norma del pulque, lo que indica que esta es una bebida con alta acidez, siendo esta una característica intrínseca del producto que puede ayudar a prevenir la proliferación de esporas de algunos microorganismos patógenos.

La acidez calculada como ácido láctico presentó resultados diferentes entre sí de manera significativa ya que 3 muestras se encontraron por encima del límite máximo que es 0.7 5g/100 ml y una muestra se encontró por debajo del límite inferior de 0.4 g/100 ml. La importancia particular de la medición de la acidez es la de determinar la frescura y el estado de conservación, la alteración del producto través del tiempo es detectada por la acidificación debido a la formación de ácido láctico a expensas de la lactosa, lo cual da lugar a las condiciones favorables para el crecimiento bacteriano,

DISCUSIÓN

por lo que cuando la acidez se incrementa o es más alta de lo normal, es una indicación de una población bacteriana mayor (HANNA® instruments México, 2017). Los resultados de la medición de grados brix obtenidos de las muestras se encuentran por debajo del valor indicado por Álvarez-Ríos (2020) de 7.48, el cual podría considerarse como el doble de lo obtenido en este trabajo, ya que los datos obtenidos se encuentran entre 2.6 y 3.6.

Los resultados del análisis microbiológico de la calidad del pulque mostraron que el producto está libre de *Escherichia coli* y *Salmonella*. Este resultado es satisfactorio ya que puede inferir que estas bacterias podrían estar siendo inhibidas a través de la microbiota del pulque, siendo un hallazgo previo a los análisis de pruebas realizados para determinar cepas con potencial probiótico en el producto.

Por otro lado, la aparición de coliformes totales y *Staphylococcus aureus* en las cuatro muestras hace referencia a la existencia de contaminación ya sea por una mala manipulación humana, contaminación previa de la materia prima o contaminación ambiental en el sitio de elaboración debido a que el lugar donde se realiza la fermentación del pulque no es un sitio cerrado (López-Ibarra et al., 2009). La presencia de bacterias coliformes no significa necesariamente que hubo una contaminación fecal o que hay patógenos entéricos presentes. Algunos coliformes (*E. coli*) son comunes en las heces del hombre y otros animales, pero otros (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Erwinia*) comúnmente se encuentran en el suelo, agua y semillas, además en alimentos crudos se encuentran recuentos bajos de bacterias coliformes naturalmente por lo que presentan poco o ningún valor para el monitoreo de los mismos (ANMAT et al., 2008). La existencia de estafilococos indica que hubo manipulación excesiva en la preparación del producto, estos microorganismos se encuentran en las fosas nasales, la piel y las lesiones de humanos y otros mamíferos. La presencia de *S. aureus* puede ser un riesgo potencial para la salud debido a que un número elevado puede indicar la presencia de toxinas termoestables, no obstante, un recuento bajo no significa ausencia de las mismas, ya que una población numerosa pudo haberse reducido a un número más

DISCUSIÓN

pequeño debido a una etapa del proceso, por ej., calentamiento en alimentos como carnes o fermentación en el caso del pulque (ANMAT et al., 2008).

Por último, con respecto a los resultados obtenidos de la cuenta de Mesófilos aerobios, Mohos y Levaduras, se puede observar que existe una alta carga microbiana en general y no se especifica el género del microorganismo evaluado. Sin embargo, gran parte de la microbiota benéfica del pulque reportada pertenece a estos parámetros. Ahora bien, en cuestiones de la evaluación de la calidad de los alimentos, los microorganismos analizados se pueden agrupar como microorganismos indicadores de alteración, asociados con la vida útil y alteración del producto tales como microorganismos aerobios mesófilos, aerobios mesófilos esporulados, Mohos y Levaduras, *Lactobacillus*, microorganismos lipolíticos. Es por esta razón que el tiempo de vida útil del pulque está relacionado intrínsecamente a la microbiota presente debido a la fermentación que ocurre en su proceso (Soto Villegas, 2014).

En la caracterización de las cepas aisladas las cualidades encontradas en este estudio concuerdan con lo informado por Escalante et al (2016) para las bacterias ácido lácticas: colonias blancas, cremosas, redondas brillantes y con bordes regulares. A su vez, como se encontraron cepas representativas en las diluciones del pulque de 10^{-6} y 10^{-7} , se puede decir que este contiene la carga bacteriana necesaria para cualquier alimento con probióticos de acuerdo a lo referido por Da Silva (2019) que señala como el mínimo los recuentos a 10^6 UFC para la ingesta diaria recomendada, no obstante, al ser una bebida alcohólica se debe moderar su consumo.

En lo que respecta a la prueba de fermentación de azúcares, este análisis nos brinda la posibilidad de identificación del género de las cepas, sin embargo, con los azúcares evaluados no fue posible dar un resultado proximal, debido a que, era necesario evaluar con azúcares más específicos como: Trealosa, Melobiosa, Rhamnosa, Xilosa, etc. Por ejemplo, retomando a Muñoz Ramirez (2010) las cepas

DISCUSIÓN

que dieron positivo solo a lactosa pueden ser representantes de los género *Lactobacillus delbrueckii sub especie bulgaricus* o de *Lactobacillus acidophilus*.

De manera similar de acuerdo al manual de Bergey, las bacterias que fermentaron fructosa y no fermentaron lactosa podrían ser halladas con el género de *Leuconostoc*, como *Leuconostoc citreum*, de ejemplo (B. Whitman, 2009). Sin embargo, también la información dada por Ruíz (2013) muestra que uno de sus conglomerados de bacterias ácido lácticas dio positivo a Glucosa, Fructosa y Sacarosa y que al ser evaluado mediante el sistema de galerías bioquímicas miniaturizadas API 50CHL este daba un resultado del 98.1% de probabilidad que la cepa fuera *Lactobacillus delbrueckii ssp. Delbrueckii*.

La resistencia de las cepas a condiciones de pH ácido se ha atribuido a los diferentes mecanismos de regulación del pH intracelular y alcalinización del medio externo a través de reacciones de descarboxilación y desaminación (Valencia-Franco et al., 2022). De acuerdo a lo analizado por Cervantes-Elizarrarás (2019) quien evaluó bajo las mismas condiciones gástricas de pH y pepsina, obtuvo una viabilidad entre 63.2 y 96.3%. Por su parte, Valencia-Franco (2022) reportó que de las 6 cepas que analizó, solo una resistió un 84.65% a las condiciones de acidez con un pH de 3. Ruiz Ramírez (2017) mostró que todas sus cepas tuvieron un porcentaje de sobrevivencia del 60% al 80% en condiciones de pH 2. Giles-Gómez (2016) reportó que su cepa *Leuconostoc mesenteroides* P45 mostró un porcentaje de resistencia del 74.98% a un pH de 2, en comparación al probiótico de referencia *Lactobacillus Casei* que resistió sólo un 48.33%. Por último, la evaluación de la exposición al pH ácido en cuatro aislados de *Leuconostoc mesenteroides* procedentes aguamiel mostró un 40,9-49,12 % de resistencia al pH 2 durante 3 h a 37 °C (Castro Rodríguez et al., 2015)

Por lo tanto, aunque nuestras cepas presentan una resistencia a un pH más bajo y a la acción de la enzima pepsina, nuestro porcentaje de supervivencia evaluado es menor a lo reportado en artículos recientes.

DISCUSIÓN

La actividad antagónica de las bacterias probióticas contra las bacterias patógenas es el mecanismo más importante por el cual los probióticos producen sus efectos fisiológicos benéficos y protectores. Este efecto antimicrobiano puede estar mediado por la capacidad de las cepas para disminuir el pH del medio al fermentar y producir ácidos orgánicos (especialmente ácido láctico y acético), que tienen efectos bactericidas o bacteriostáticos (Castro Rodríguez et al., 2015; Ripamonti et al., 2011; Tejero-Sariñena et al., 2012).

Giles-Gómez et al., (2016) en sus ensayos de actividad antimicrobiana mostró que su cepa aislada *L. mesenteroides P45* puede inhibir el crecimiento de *E. coli* enteropatógena (EPEC), *L. monocytogenes* y *S. enterica serovar Typhi* y *Typhimurium*. Los ensayos antimicrobianos in vitro incluyeron sobrenadantes con zonas de inhibición que oscilaban entre 6,5 y 8,5 milímetros. Castro Rodríguez et al., (2015) obtuvo como resultado de su estudio que el sobrenadante de sus cepas aisladas de pulque mostró inhibición a tres cepas enteropatógenas: *E. coli* ATCC43895 (EC), *S. enterica* ATCC 14028 (ST) y *L. monocytogenes* ATCC 19115 (LM), así como a dos cepas enterotoxigénicas: *S. aureus* [ATCC 25923 (SA) y FRI 184 (SAI)].), mostrando halos de inhibición de 7 y 11 mm. Por último, Ruiz Ramírez (2017) tuvo resultados de inhibición entre 2 y 4 mm similares a los reportados en nuestro estudio.

Aunque efectivamente las cepas aisladas de este estudio mostraron halos de inhibición contra las dos bacterias patógenas puestas a prueba, los resultados son bajos comparados con los realizados por los autores mencionados anteriormente, no obstante, esto podría deberse a las técnicas utilizadas por cada uno de ellos, ya que en nuestro caso, no se utilizó sobrenadantes con alta concentración de la cepa a probar, por otra parte, es probable que la concentración de microorganismos patógenos inoculados en nuestra ensayo haya sido mayor.

11. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se realizó el análisis bromatológico del pulque proveniente de la región mixteca, donde se identificó que este posee un contenido alcohólico inusualmente alto, un porcentaje de cenizas, proteínas y acidez elevado con respecto a lo reportado en la norma y en ensayos similares lo que podría sugerir un contenido nutricional alto, sin embargo, sería necesario realizar un análisis más profundo para conocer la clase de proteínas, carbohidratos y minerales que esta bebida en particular aporta a la alimentación de la población en donde se produce y consume.
- De acuerdo al análisis de la calidad microbiológica realizado, es acertado recomendar un mayor cuidado al momento de la elaboración del pulque debido a que, aunque no se reportó la presencia de patógenos infecciosos, si se reportó la existencia de microorganismos relacionados a la contaminación por manipulación inadecuada del producto.
- Se aislaron 9 cepas que cumplieron con las características definidas y propuestas, para bacterias ácido lácticas, por algunos autores. La prueba de azúcares fermentables tuvo resultados destacables, sin embargo, debería ser ampliada para tener una mejor aproximación del género de las bacterias evaluadas.
- 7 cepas fueron resistentes a las condiciones gástricas simuladas, esto es significativo ya que cumplen con una de las condiciones para ser referidas como probióticos, siendo la cepa 7A1T la que mostró mayor resistencia.
- Aunque las 9 cepas aisladas presentaron actividad antimicrobiana, las cepas 6A1T y 7A1R fueron las que tuvieron halos de inhibición mayores, lo que cumple con otra de las condiciones necesarias para ser probióticos potenciales.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

Agerholm-Larsen, L., Raben, A., Haulrik, N., Hansen, A. S., Manders, M., & Astrup, A. (2000). Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *European Journal of Clinical Nutrition* 2000 54:4, 54(4), 288–297. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600937>

Álvarez-Ríos, G. D., Figueredo-Urbina, C. J., & Casas, A. (2020). Physical, Chemical, and Microbiological Characteristics of Pulque: Management of a Fermented Beverage in Michoacán, Mexico. *Foods* 2020, Vol. 9, Page 361, 9(3), 361. <https://doi.org/10.3390/FOODS9030361>

Anderson, R. K., Calvo, J., Serrano, G., & Payne, G. C. (2009). Estudio del estado de nutrición y los hábitos alimentarios de comunidades otomíes en el valle del mezquital de México. *Salud Publica de Mexico*, 51(SUPPL.4), 657–674. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009001000021>

ANMAT, Administracion Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, & Instituto Nacional de Alimentos. (2008). *Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos* (p. 21). http://www.anmat.gov.ar/alimentos/guia_de_interpretacion_resultados_microbiologicos.pdf

Arenas Cedillo, L. F. (2015). *Caracterización de cepas de bacterias ácido lácticas con actividad probiótica del pulque de la región Mixteca* [Universidad Nacional Autónoma de México]. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/299611>

B. Whitman, W. (2009). *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology* (Vol. 3, Issue 2). Springer Science+Business Media. <https://doi.org/10.1007/b92997>

Balladares Gomez, E. (2015). *Develando los secretos del árbol de las maravillas. El análisis químico del pulque en el siglo XIX* [Universidad Autónoma Metropolitana]. <http://ilitia.cua.uam.mx:8080/jspui/handle/123456789/194>

REFERENCIAS

- Campos Quintana, I. (2010). *Aislamiento e identificación de bacterias ácido láctica del pulque con potencial probiótico*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Carrasco Torres, R. (2019). *Identificación Fenotípica y Genotípica de Bacterias Ácido Lácticas aisladas de Aguamiel y Pulque con Actividad Antimicrobiana frente a Bacterias asociadas a Enfermedades Transmitidas por Alimentos*. (Issue 2) [Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://hdl.handle.net/20.500.12371/4769>
- Castro-Rodríguez, D. C., Reyes-Castro, L. A., Vega, C. C., Rodríguez-González, G. L., Yáñez-Fernández, J., & Zambrano, E. (2020). Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides SD23 Prevents Metabolic Dysfunction Associated with High-Fat Diet–Induced Obesity in Male Mice. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(2), 505–516. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09556-3>
- Castro Rodríguez, D., Hernández Sánchez, H., & Yáñez Fernández, Jorge. (2015). Probiotic Properties of Leuconostoc mesenteroides Isolated from Aguamiel of Agave salmiana. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(2), 107–117. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9187-5>
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades-CDC, & Organización Mundial de la Salud-OMS. (2009). *Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo | Medicina y Laboratorio*. <https://medicinaylaboratorio.com/index.php/myl/article/view/414>
- Cervantes-Elizarrarás, A., Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., Vega-Sánchez, V., Velázquez-Guadarrama, N., Zafra-Rojas, Q., & Piloni-Martini, J. (2019). In Vitro Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Aguamiel and Pulque and Antibacterial Activity Against Pathogens. *Applied Sciences*, 9(3), 601. <https://doi.org/10.3390/app9030601>

REFERENCIAS

- Chacón-Vargas, K., Torres, J., Giles-Gómez, M., Escalante, A., & Gibbons, J. G. (2020). Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71864-4>
- Condalab. (2019). *Base de Caldo Rojo Fenol: Vol. Cat. 1115* (pp. 1–2). <https://www.condalab.com/int/es/medios-de-cultivo-deshidratados/168-15123-base-de-caldo-rojo-fenol.html>
- Da Silva, T. M., Barin, J. S., Lopes, E. J., Cichoski, A. J., De Moraes Flores, E. M., De Bona Da Silva, C., & De Menezes, C. R. (2019). Development, characterization and viability study of probiotic microcapsules produced by complex coacervation followed by freeze-drying. *Ciencia Rural*, *49*(7). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180775>
- Escalante, A., Rodríguez, M., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, *235*(2), 273–279. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.045>
- Escalante, Adelfo, Giles-Gómez, M., Esquivel Flores, Guadalupe Matus Acuña, V., & Moreno-Terrazas, Rubén López-Munguía, Agustín Lappe-Oliveras, P. (2012). Pulque Fermentation. In *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology, Second Edition* (pp. 691–704). <https://doi.org/10.1201/b12055-47>
- Escalante, Adelfo, Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, *124*(2), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>

REFERENCIAS

- Escalante, Adelfo, López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7(JUN), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>
- Estrada-Godina, A., Cruz-Guerrero, A., & Lappe, P. (2001). Isolation and identification of killer yeasts from Agave sap (aguamiel) and pulque. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 557–560. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1012210106203>
- Giles-Gómez, M., Sandoval García, J. G., Matus, V., Campos Quintana, I., Bolívar, F., & Escalante, A. (2016). In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2370-7>
- González-Vázquez, R., Azaola-Espinosa, A., Mayorga-Reyes, L., Reyes-Nava, L. A., Shah, N. P., & Rivera-Espinoza, Y. (2015). Isolation, Identification and Partial Characterization of a *Lactobacillus casei* Strain with Bile Salt Hydrolase Activity from Pulque. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(4), 242–248. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9202-x>
- Guarner, F., Sanders, M. E., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J., Kaufmann, P., Karakan, T., Khan, A., Kim, N., De Paula, J. A., Ramakrishna, B., Shanahan, F., Szajewska, H., Thomson, A., & Le Mair, A. (2017). Guías mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos. *World Gastroenterology Organisation*, 1–35. <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2017.pdf>
- Gutiérrez-Urbe, J. A., Figueroa, L. M., Martín-del-Campo, S. T., & Escalante, A.

REFERENCIAS

- (2017). Pulque. In *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00023-6>
- Han, J. L., & Lin, H. L. (2014). Intestinal microbiota and type 2 diabetes: From mechanism insights to therapeutic perspective. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(47), 17737–17745. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i47.17737>
- HANNA® instruments México. (2017, October 20). *La alta acidez en la leche es muy mala* . Blog. <https://hannainst.com.mx/blog/la-alta-acidez-en-la-leche-es-muy-mala/>
- Hariri, M., Salehi, R., Feizi, A., Mirlohi, M., Ghiasvand, R., & Habibi, N. (2015). A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial on probiotic soy milk and soy milk: effects on epigenetics and oxidative stress in patients with type II diabetes. *Genes and Nutrition*, *10*(6), 1–8. <https://doi.org/10.1007/S12263-015-0503-1/FIGURES/3>
- Hernández-López, Z., Rangel-Vargas, E., Castro-Rosas, J., Gómez-Aldapa, C. A., Cadena-Ramírez, A., Acevedo-Sandoval, O. A., Gordillo-Martínez, A. J., & Falfán-Cortés, R. N. (2018). Optimization of a spray-drying process for the production of maximally viable microencapsulated *Lactobacillus pentosus* using a mixture of starch-pulque as wall material. *Lwt*, *95*(December 2017), 216–222. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.075>
- Hernández López, J. de J., & Iwadare, M. Á. (2015). *EN TORNO A LAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS MEXICANAS: PODER , PRÁCTICAS CULTURALES Y CONFIGURACIONES REGIONALES* (Primera). Centro Universitario de Los Altos de la Universidad de Guadalajara. http://repositorio.cualtos.udg.mx:8080/jspui/bitstream/123456789/855/1/En_torno_a_las_bebidas_alcoholicas_mexic.pdf

REFERENCIAS

- Herrera Solórzano, M. C. (2008). *Identificación polifásica de levaduras y bacterias ácido lácticas aisladas de aguamiel, pulque y semilla* [Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)]. <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/1160>
- Huezcas-Garrido, L., Alanís-García, E., Ariza-Ortega, J. A., Zafra-Rojas, Q. Y., Huezcas-Garrido, L., Alanís-García, E., Ariza-Ortega, J. A., & Zafra-Rojas, Q. Y. (2022). Subproductos de interés nutricional y funcional de Agave salmiana. *Revista Chilena de Nutrición*, 49(2), 250–262. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182022000200250>
- INAFED Instituto Nacional para el Federalismo y Desarrollo Municipal. (2010). *Sistema Nacional de Información Municipal (municipio Santa María Apazco, Oaxaca)*. <http://www.snim.rami.gob.mx/>
- Iñiguez-Palomares, C. M., Bolado-Martínez, E., & Acedo-Félix, E. (2010). Probióticos: Principios y aplicaciones prácticas. In *Los alimentos Funcionales- Un nuevo reto para la industria de alimentos* (pp. 251–292). https://www.researchgate.net/publication/263846732_Probioticos_Principios_y_aPLICACIONES_practicas_Capitulo_10_En_Los_alimentos_Funcionales-_Un_nuevo_reto_para_la_industria_de_alimentos
- Jones, M. L., Martoni, C. J., & Prakash, S. (2012). Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition* 2012 66:11, 66(11), 1234–1241. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.126>
- Kadooka, Y., Sato, M., Imaizumi, K., Ogawa, A., Ikuyama, K., Akai, Y., Okano, M., Kagoshima, M., & Tsuchida, T. (2010). Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition* 2010 64:6, 64(6), 636–643. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2010.19>

REFERENCIAS

- Kassaian, N., Feizi, A., Aminorroaya, A., Jafari, P., Ebrahimi, M. T., & Amini, M. (2018). The effects of probiotics and synbiotic supplementation on glucose and insulin metabolism in adults with prediabetes: a double-blind randomized clinical trial. *Acta Diabetologica*, *55*(10), 1019–1028. <https://doi.org/10.1007/s00592-018-1175-2>
- Kosin, B., & Rakshit, S. K. (2006). Criteria for production of probiotics. *Food Technol. Biotechnol.*, *44*, 371–379.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A., & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, *8*(7), 1037–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>
- Le, B. (2018). Isolation of Weissella strains as potent probiotics to improve antioxidant activity of salted squid by fermentation. *J Appl Biol Chem*, *61*, 93–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.3839/jabc.2018.014>
- León-de la O, D. I., Méndez-colín, D. S., Rodríguez-padilla, D. P., Puente-hurle, L., García-Sorrondegui, F. I., & Salgado-Brito, R. (2012). Análisis bromatológico y aislamiento de microorganismos con potencial probiótico del pulque. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*, *11*, 115–122. https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwicouzo6o7SAhXI7YMKHfn-DGgQFggiMAE&url=https%3A%2F%2F Dialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F4281138.pdf&usg=AFQjCNFn_TxCdImMTvxsw06T6SnOUj-IDg&sig2=D-3qcLOZVV
- López-Ibarra, J., Orozco-Estrada, E., Elton-Puente, J., & Ibarra-Valdovinos, I. (2009). CALIDAD SANITARIA DE BEBIDAS PREPARADAS QUE SE OFRECEN AL PÚBLICO EN UNA INSTITUCIÓN DE EDUCACIÓN SUPERIOR EN

REFERENCIAS

- QUERÉTARO. In *Memoria de veranos UAQ*.
https://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2009/11VCRC_46/E5_Lopez_IbarrayOrozco_Estrada.pdf
- Loyola-Montemayor, E. (1956). *La industria del pulque*. Departamento de Investigaciones Industriales. Banco de México SA.
- Mahmoud, M., Abdallah, N. A., El-Shafei, K., Tawfik, N. F., & El-Sayed, H. S. (2020). Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. *Heliyon*, 6(3).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03541>
- Manzano A., C., G.; Diana, E., & Poveda E., E. (2012). EFECTOS CLÍNICOS DE LOS PROBIÓTICOS: QUÉ DICE LA EVIDENCIA. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(1), 98–110. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000100010>
- Marina Alegre, M. L., Castro Puyana, M., & Plaza del Moral, M. (2021). *Estrategias avanzadas para la mejora de la calidad, la seguridad y la funcionalidad de los alimentos* (Universidad de Alcalá (ed.); 1st ed.). Editorial Universidad de Alcalá.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=794929>
- Márquez-Villalobos, A.-F., López-Lemus, H. L., Reyes-Escogido, M. de L., & Ramírez-Emiliano, J. (2017). Uso de Probióticos para el Control de la Hipercolesterolemia. *ARCHIVOS DE MEDICINA*, 13(2), 1–5.
<https://doi.org/10.3823/1371>
- Márquez Sigvas, B. M. (2014). “CENIZAS Y GRASAS” “TEORÍA DEL MUESTREO” “REFRIGERACIÓN Y CONGELACIÓN DE ALIMENTOS: TERMINOLOGÍA, DEFINICIONES Y EXPLICACIONES.”
<http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/4188/IAmasibm024.pdf?sequence=1&isA#:~:text=La cantidad de cenizas representa,próximo para la evaluación nutricional.>

REFERENCIAS

- Matías Luis, G., Peña Caballero, V., Reyna González, W., Domínguez Díaz, R., & Martínez Hernández, J. J. (2019). Valor nutricional y medicinal del pulque. Nutritional and medicinal value of pulque. *Jonnpr*, 4, 1291–1303. <https://doi.org/10.19230/jonnpr.3148>
- Medina Torres, E. A., Espinosa Padilla, S. E., Camacho Castillo, L. del C., & Carvajal Aguilera, K. G. (2014). El uso de probióticos y los beneficios sobre el sistema inmune. *Revista de Educación Bioquímica (REB)*, 33(3), 77–85.
- Mendoza Gardeazabal, A. S. (2013). *CARACTERIZACIÓN DE LA LEVADURA KLUYVEROMYCES MARXIANUS COMO MICROORGANISMO PROBIÓTICO* [Universidad Autónoma del estado de Hidalgo]. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/1862>
- Mesillas-González, F., Castro-Vázquez, P., Ordaz-Jaimez, J., & Zúñiga-Juárez, M. . (2016). Potencial Probiótico de Bacterias Aisladas del Pulque: Una Revisión. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 924–930. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/1/10/159.pdf>
- Mohamadshahi, M., Veissi, M., Haidari, F., Javid, A., Mohammadi, F., & Shirbeigi, E. (2014). Effects of probiotic yogurt consumption on lipid profile in type 2 diabetic patients: A randomized controlled clinical trial. *J Res Med Sci.*, 19.
- Muñoz Ramirez, A. F. (2010). *AISLAMIENTO DE BACTERIAS Lactobacillus s.p y LEVADURAS A PARTIR DE PRODUCTOS LACTEOS ARTESANALES Y EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTAGONICA IN VITRO.* <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8624/tesis584.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- NMX-F-066-S. (1978). Determinación De Cenizas En Alimentos. In *Colpos.Mx* (pp. 3–6). <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>
- NMX-V-013-S. (1980). Bebidas Alcohólicas Destiladas. Determinación Del Por Ciento

REFERENCIAS

- De Alcohol En Volumen En La Escala Gay-Lussac. In *Colpos.Mx* (pp. 3–6). <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>
- NMX-V-022. (1972). *Aguamiel, hidromiel*. (p. 5). <https://studylib.es/doc/5872991/nmx-v-022-1972.-aguamiel.-hydromel.-normas>
- NMX-V-037. (1978). Pulque manejado a granel. Pulque handled in bulk. In *Colpos.Mx* (pp. 3–6). <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>
- NOM-109-SSA1-1994. (n.d.). *Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico*. Retrieved August 21, 2022, from <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/ssa1/ssa1109p.pdf>
- NOM-F-42O-S. (1982). *Determinación de acidez en leche fluida*. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4761014&fecha=02/09/1982#gsc.tab=0
- NOM-F-68-S. (1980, August 4). *Alimentos Determinación de Proteínas*. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4858024&fecha=04/08/1980#gsc.tab=0
- Núñez Galindo, Y. (2016). *Proceso de secado por aspersion de pulque proveniente de Agave Salmiana* [Tecnológico Nacional de México- Instituto Tecnológico de Orizaba]. http://repositorios.orizaba.tecnm.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/323/Yesenia_Núñez_Galindo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Olveira, G., & González-Molero, I. (2016). An update on probiotics, prebiotics and symbiotics in clinical nutrition. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)*, 63(9), 482–494. <https://doi.org/10.1016/j.endoen.2016.10.011>
- Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dormer, M., & Belleville, M.

REFERENCIAS

- P. (2008). Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3682–3687. <https://doi.org/10.1021/jf072767h>
- Rajkumar, H., Mahmood, N., Kumar, M., Varikuti, S. R., Challa, H. R., & Myakala, S. P. (2014). Effect of probiotic (VSL#3) and omega-3 on lipid profile, insulin sensitivity, inflammatory markers, and gut colonization in overweight adults: A randomized, controlled trial. *Mediators of Inflammation*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/348959>
- Reyes Esparza, J. A., & Rodríguez Fragoso, L. (2012). Los probióticos: ¿cómo una mezcla de microorganismos hacen un gran trabajo? *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(1), 7–17. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000100002
- Ripamonti, B., Agazzi, A., Bersani, C., De Dea, P., Pecorini, C., Pirani, S., Rebucci, R., Savoini, G., Stella, S., Stenico, A., Tirloni, E., & Domeneghini, C. (2011). Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. *Anaerobe*, 17(3), 97–105. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2011.05.001>
- Rondon, L., Añez Zavala, M. R., Salvatierra Hidalgo, A., Meneses Barrios, R. T., & Heredia Rodriguez, M. T. (2015). Probióticos: Generalidades. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 78(4), 123–128. <https://www.redalyc.org/pdf/3679/367945817006.pdf>
- Ruíz, C. (2013). ACTIVACIÓN E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE LOS CONGLOMERADOS DE BACTERIAS PROBIÓTICAS ABT-5, ABY-3 Y BC-7 UTILIZANDO EL KIT RÁPIDO API 50 CH. *Revista Desarrollo Local Sostenible*, 5, 12. www.eumed.net/rev/delos/13

REFERENCIAS

- Ruiz Ramírez, Y. (2017). *Potencial probiótico y producción de péptidos antimicrobianos in vitro de bacterias ácido lácticas del pulque* [Universidad Tecnológica de la Mixteca]. <http://repositorio.utm.mx:8080/jspui/handle/123456789/82>
- Sánchez-Marroquín, A, Terán, J., & Piso, J. (1957). Estudios sobre la microbiología del pulque. -XVIII.- Datos químicos de la fermentación de aguamiel con cultivos puros. *Rev. Soc. Quím. México*, 1, 167–174.
- Sánchez-Marroquín, Alfredo, & Hope, P. H. (1953). Agave juice, fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(3), 246–249. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf60003a007>
- Sanders, M. E., Merenstein, D. J., Reid, G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2019). Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 16(10), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
- Sarao, L. K., & Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(2), 344–371. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887055>
- Sen, M. (2019). Role of probiotics in health and disease: A review. In *Journal of the Pakistan Medical Association* (Vol. 63, Issue 2, pp. 253–257). <https://doi.org/10.31632/ijalsr.2019v02i02.001>
- Sepúlveda Sáenz, L. F. (2020). *Evaluación del efecto estacional sobre el microbioma involucrado en la fermentación del aguamiel y su influencia en las propiedades químicas del pulque* [Universidad Autónoma de Chihuahua]. [http://repositorio.uach.mx/395/1/Efecto estacional sobre el microbioma del pulque.pdf](http://repositorio.uach.mx/395/1/Efecto%20estacional%20sobre%20el%20microbioma%20del%20pulque.pdf)
- Sharafedinov, K. K., Plotnikova, O. A., Alexeeva, R. I., Sentsova, T. B., Songisepp,

REFERENCIAS

- E., Stsepetova, J., Smidt, I., & Mikelsaar, M. (2013). Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients - A randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Nutrition Journal*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-12-138/FIGURES/2>
- Sharifi-Rad, J., Rodrigues, C. F., Stojanović-Radić, Z., Dimitrijević, M., Aleksić, A., Neffe-Skocińska, K., Zielińska, D., Kołożyn-Krajewska, D., Salehi, B., Prabu, S. M., Schutz, F., Docea, A. O., Martins, N., & Calina, D. (2020). Probiotics: Versatile bioactive components in promoting human health. *Medicina (Lithuania)*, 56(9), 1–30. <https://doi.org/10.3390/medicina56090433>
- Shimizu, M., Hashiguchi, M., Shiga, T., Tamura, H. O., & Mochizuki, M. (2015). Meta-Analysis: Effects of Probiotic Supplementation on Lipid Profiles in Normal to Mildly Hypercholesterolemic Individuals. *PLOS ONE*, 10(10), e0139795. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0139795>
- Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., & Ho, Y. W. (2017). Probiotics: From Isolation to Application. *Journal of the American College of Nutrition*, 36(8), 666–676. <https://doi.org/10.1080/07315724.2017.1337529>
- Soto Villegas, D. J. (2014). “PRESENCIA DE *ESCHERICHIA COLI* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN LA OFERTA DE ALIMENTOS DE LOCALES INFORMALES DE COMIDA RÁPIDA UBICADOS EN LA AVENIDA DE LAS AMÉRICAS DE LA CIUDAD CUENCA”. [Universidad del Azuay]. <https://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/3344/1/10110.pdf>
- Sun, J., & Buys, N. (2015). Effects of probiotics consumption on lowering lipids and CVD risk factors: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of Medicine*, 47(6), 430–440. https://doi.org/10.3109/07853890.2015.1071872/SUPPL_FILE/IANN_A_1071872_SM5213.PDF

REFERENCIAS

- Tech, T. F. (2020). *Probióticos: grandes posibilidades en el mercado - The Food Tech*. <https://thefoodtech.com/ingredientes-y-aditivos-alimentarios/probioticos-grandes-posibilidades-en-el-mercado/>
- Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. R., & Rowland, I. (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18(5), 530–538. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2012.08.004>
- Tonucci, L. B., Olbrich dos Santos, K. M., Licursi de Oliveira, L., Rocha Ribeiro, S. M., & Duarte Martino, H. S. (2017). Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clinical Nutrition*, 36(1), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.11.011>
- Tormo Carnicé, R. (2006). Probióticos. Concepto y mecanismos de acción. *Anales de Pediatría Monografías*, 4(1), 30–41. <https://www.analesdepediatría.org/es-probioticos-concepto-mecanismos-accion-articulo-13092364>
- Torres-Maravilla, E., Lenoir, M., Mayorga-Reyes, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., Sánchez-Pardo, M. E., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2016). Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(1), 385–396. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7049-4>
- Tovar Oviedo, J., & Martínez Gutiérrez, F. (2018). *Microbiología general: Manual de Laboratorio* (pp. 41–43). [https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/4397/Manual Microbiología General.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/4397/Manual%20Microbiología%20General.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Valadez-Blanco, R., Bravo-Villa, G., Santos-Sánchez, N. F., Velasco-Almendarez, S. I., & Montville, T. J. (2012). The Artisanal Production of Pulque, a Traditional Beverage of the Mexican Highlands. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(2),

REFERENCIAS

140–144. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9096-9>

Valencia-Franco, E., Crosby-Galván, M. M., Galicia-Juárez, L., Hernández-Sánchez, D., Pérez-Sato, M., García y González, E. C., & Ponce Covarrubias, J. L. (2022). Isolation of bacteria from pulque with probiotic potential. *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v15i5.2181>

Zarrati, M., Salehi, E., Nourijelyani, K., Mofid, V., Zadeh, M. J. H., Najafi, F., Ghafleti, Z., Bidad, K., Chamari, M., Karimi, M., & Shidfar, F. (2014). Effects of Probiotic Yogurt on Fat Distribution and Gene Expression of Proinflammatory Factors in Peripheral Blood Mononuclear Cells in Overweight and Obese People with or without Weight-Loss Diet. *Http://Dx.Doı.Org/10.1080/07315724.2013.874937*, 33(6), 417–425. <https://doi.org/10.1080/07315724.2013.874937>

Zarrati, M., Shidfar, F., Nourijelyani, K., Mofid, V., Hossein zadeh-Attar, M. J., Bidad, K., Najafi, F., Gheflati, Z., Chamari, M., & Salehi, E. (2013). Lactobacillus acidophilus La5, Bifidobacterium BB12, and Lactobacillus casei DN001 modulate gene expression of subset specific transcription factors and cytokines in peripheral blood mononuclear cells of obese and overweight people. *BioFactors*, 39(6), 633–643. <https://doi.org/10.1002/BIOF.1128>

Zommiti, M., Feuilleley, M. G. J., & Connil, N. (2020). Update of probiotics in human world: A nonstop source of benefactions till the end of time. *Microorganisms*, 8(12), 1–33. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121907>