



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Elaboración de una bebida
funcional a partir de bacterias
ácido lácticas aisladas del
pulque**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

CARLOS EDUARDO RAMÍREZ MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS

M. en B. MARTHA GILES-GÓMEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Gloria Díaz Ruiz
Vocal	M. en B. Martha Giles Gómez
Secretario	Dr. Francisco Ruíz Terán
1er suplente	Q.A. Aleida Mina Cetina
2º suplente	Dr. Hugo Antonio Hernández Pérez

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: Cepario del Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM. Anexo del Laboratorio de Evaluación Sensorial del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, Morelos.

ASESOR DEL TEMA

M. en B. Martha Giles Gómez

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. Patricia Severiano Pérez

SUSTENTANTE

Carlos Eduardo Ramírez Martínez

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de
Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM <IN207917>

<Estudio de la diversidad microbiana, genética y metabólica del pulque por medio
de un enfoque polifásico>

Agradezco a la DGAPA – UNAM la beca otorgada

Índice

1. ÍNDICE DE FIGURAS	12
2. ÍNDICE DE TABLAS	13
3. RESUMEN	1
4. INTRODUCCIÓN	3
5. GENERALIDADES	4
5.1. Género <i>Agave</i>	4
5.1.1. Historia	5
5.2. Aguamiel	6
5.2.1. Proceso de obtención	8
5.3. Pulque	10
5.4. Bacterias ácido lácticas (BAL)	13
5.4.1. Características metabólicas	13
5.4.2. Propiedades	14
5.5. Probióticos	14
5.5.1. Características	14
5.5.2. Requerimientos	15
5.5.3. Mecanismos de acción	15
5.6. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	16
5.6.1. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa P45	17
5.6.2. Bacteriocinas	19
5.6.3. Exopolisacárido (EPS)	20
5.7. Prebióticos	21
5.7.1. Características	22
5.7.2. Mecanismos de asimilación	22
5.7.3. Fructooligosacáridos	23
5.8. Simbióticos	23
5.9. Alimentos funcionales	24
5.9.1. Características	25
5.10. Evaluación Sensorial	25
5.10.1. Pruebas Descriptivas	26
5.10.2. Análisis Descriptivo Cuantitativo	27
5.10.3. Perfil Flash	28

5.10.4. Análisis de procrustes generalizado	28
5.10.5. Análisis de componentes principales	29
6. JUSTIFICACIÓN	31
7. HIPÓTESIS	32
8. OBJETIVOS	33
8.1. Objetivo General	33
8.2. Objetivos Particulares	33
9. MATERIAL Y METODOLOGÍA	34
9.1. Activación	35
9.1.1. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> P45	35
9.1.2. Cepas empleadas en ensayos de antibiosis	35
9.2. Identificación de pureza y tinción de Gram	35
9.3. Conservación de las cepas.	36
9.4. Cuantificación de la cepa probiótica	36
9.5. Cuantificación control de la resistencia a pH ácido y sales biliares a 5 y 24h	36
9.6. Evaluación de la resistencia y susceptibilidad a antibióticos mediante el sistema VITEK.	37
9.7. Evaluación control de la resistencia antimicrobiana contra microorganismos patógenos	38
9.7.1. Reactivación y preparación de la prueba	38
9.7.2. Preparación de microorganismos	38
9.7.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana	39
9.8. Obtención de la muestra de aguamiel	39
9.9. Fermentación del aguamiel con la cepa probiótica	40
9.9.1. Realización del pre-inóculo	40
9.9.2. Volumen y condiciones de fermentación	40
9.9.3. Medición de pH a diferentes tiempos de fermentación	40
9.9.4. Evaluación de la resistencia a condiciones gastrointestinales en aguamiel	40
9.10. Cuantificación de azúcares presentes en aguamiel y productos de fermentación por HPLC	41
9.11. Evaluación sensorial: Perfil Flash	42
9.11.1. Preparación de las muestras	42

9.11.2. Generación de atributos	42
9.11.3. Elaboración de cuestionarios	43
9.11.4. Evaluación sensorial de las muestras	43
9.11.5. Análisis estadístico	44
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
10.1. Recuperación y tinción de Gram de la cepa probiótica	45
10.2. Cuantificación de la cepa probiótica	47
10.3. Obtención del perfil de resistencia y susceptibilidad a antibióticos mediante el sistema VITEK.	47
10.4. Fermentación de aguamiel	50
10.5. Evaluación de la resistencia a pH ácido y sales biliares	54
10.6. Evaluación control de la actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos	65
10.7. Análisis por HPLC de carbohidratos y productos de fermentación	69
10.8. Perfil Flash: generación de atributos	71
10.9. Evaluación sensorial de las muestras	72
10.10. Obtención del perfil sensorial y análisis estadístico	74
11. CONCLUSIONES	78
12. PERSPECTIVAS	79
13. BIBLIOGRAFÍA	80
14. ANEXOS	94

1. ÍNDICE DE FIGURAS

#	Figura	Página
1	Proceso de elaboración tradicional del pulque.	12
2	Mecanismos de acción de probióticos.	16
3	Escala de calificación gráfica (o escala de línea) utilizada para obtener medidas de intensidad relativa de sujetos.	27
4	Metodología de elaboración de la bebida funcional.	34
5	Ejemplo de presentación de muestras para evaluación sensorial.	42
6	Escala utilizada para la descripción de intensidad de atributos.	43
7	Tinción de Gram y morfología de <i>L. mesenteroides</i> P45.	45
8	Determinación de la viabilidad de <i>L. mesenteroides</i> P45 a distintos tiempos de fermentación y registro de la disminución de pH en aguamiel.	51
9	Cuantificación de células viables bajo estrés ambiental pH (3.5) por 5 horas en APT y aguamiel.	55
10	Cuantificación de células viables bajo estrés ambiental pH (3.5) por 24 horas en APT y aguamiel.	58
11	Evaluación de la resistencia a altas concentraciones de sales biliares (1%) por 5 horas en APT y aguamiel.	60
12	Evaluación de la resistencia a altas concentraciones de sales biliares (1%) por 24 horas en APT y aguamiel.	62
13	Perfil de ácidos orgánicos del aguamiel obtenido después de 14 días bajo condiciones de refrigeración (10 °C).	69
14	Perfil de carbohidratos del aguamiel obtenido después de 14 días bajo condiciones de refrigeración (10 °C).	71
15	Análisis de procrustes generalizado para características de sabor y textura.	75
16	Análisis de procrustes generalizado para características de aspecto y olor.	76

2. ÍNDICE DE TABLAS

#	Tema	Página
1	Especificaciones fisicoquímicas de aguamiel.	7
2	Características morfológicas y microscópicas de cepas usadas como patógenos.	46
3	Perfil de resistencia y susceptibilidad a antibióticos obtenidos con el sistema Vitek 2.	49
4	Comparación del efecto antagonista de la cepa probiótica en aguamiel y APT.	68
5	Atributos generados para muestras de aguamiel.	72
6	Escala de intensidad para atributos de olor.	72
7	Escala de intensidad para atributos de aspecto.	73
8	Escala de intensidad para atributos de sabor.	73
9	Escala de intensidad para atributos de textura.	73
10	Escala de intensidad para atributos de resabio.	74

3. RESUMEN

Estudios sobre la microbiología de aguamiel y pulque mostraron la presencia de una diversidad microbiana compleja de bacterias y levaduras, lo que demuestra que las especies de *Leuconostoc* como *L. citreum*, *L. kimchii* y *L. mesenteroides* se encuentran entre las bacterias ácido lácticas más abundantes presentes en la savia fresca y durante el proceso de fermentación.

Según datos de la Secretaría de Salud, en México se estima una cifra de 11 millones de personas con diabetes (en su mayoría del tipo 2) para el año 2025. Una estrategia basada en los alimentos para modular la composición y/o la actividad metabólica de la microbiota intestinal, con el propósito de impartir efectos beneficiosos, es una ruta que aumenta la ingesta dietética de alimentos funcionales que contienen prebióticos, probióticos y/o simbióticos.

Los productos lácteos se han usado convencionalmente como portadores de probióticos. Sin embargo, la intolerancia a la lactosa, el colesterol, la alergia a las proteínas de la leche, el contenido de ácidos grasos saturados y la tendencia al vegetarianismo motivan la búsqueda de alimentos funcionales no lácteos como potenciales probióticos.

Con base en lo propuesto anteriormente y teniendo como evidencia la capacidad probiótica de la cepa P45 de *Leuconostoc mesenteroides*, en el presente trabajo se realizó la producción de una bebida de aguamiel con posibles propiedades simbióticas elaborada a partir de muestras provenientes de la población de Huitzilac (Morelos) y utilizando a este microorganismo como cepa fermentadora. Se determinó por un grupo de jueces en metodología descriptiva, que las características sensoriales relacionadas con el aspecto, sabor, olor, textura y presencia de resabio de la bebida final se presentaban después de 14 días de fermentación de la bebida, iniciando la fermentación durante 24 horas a 28°C y posteriormente llevando a cabo la fermentación bajo condiciones de refrigeración a 10°C durante el período de tiempo restante.

Durante los tiempos de muestreo establecidos como 0h, 24h, 7 y 14 días, se realizaron pruebas de resistencia a pH ácido (3.5) y 1% de sales biliares simulando condiciones del tracto gastrointestinal, determinando a dos tiempos (5 y 24h) la resistencia por parte de la cepa, bajo las condiciones de estrés ambiental. En ambas condiciones (pH ácido y sales biliares) se presentó la disminución de la viabilidad de la cepa en una unidad logarítmica después de 24 horas. Además, bajo los mismos criterios de evaluación se determinó la actividad antagónica de la cepa, teniendo como criterio de actividad antimicrobiana, la presencia de halos de inhibición contra microorganismos patógenos, observando el efecto antagonista *in vitro* después de 14 días de fermentación, contra *Bacillus cereus* (CFQ-B-230), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Listeria monocytogenes* (CFQ-B-103), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028).

Así mismo, mediante el sistema Vitek se determinó el perfil de resistencia y susceptibilidad a antibióticos por parte de la cepa P45, encontrándose resistencia a los antibióticos clindamicina, vancomicina y nitrofurantoína.

Finalmente después de los 14 días de fermentación, se realizó una evaluación sensorial con la que se evaluaron características de la bebida, producto de la fermentación y del metabolismo de la cepa P45, registrando una similitud en características de sabor, textura y presencia de resabio por parte de los lotes A y C, siendo diferente el lote B; mientras que para los grupos de aspecto y color los lotes A y B fueron similares pero el lote C, fue diferente.

El diseño y la producción de la bebida de este trabajo sirven como antecedente para la caracterización y reintroducción al mercado de bebidas tradicionales, así como su estudio y aplicación, además de ser una opción viable para aquella población que resulta ser susceptible a alimentos funcionales de origen lácteo.

4. INTRODUCCIÓN

El pulque es una bebida tradicional mexicana fermentada, de naturaleza alcohólica no destilada. Se elabora con la savia (aguamiel) recién colectada de diversas especies de magueyes pulqueros (*Agave mapisaga*, *A. atrovirens*, *A. americana*), y es utilizada como materia prima para el desarrollo de la fermentación. La fermentación del aguamiel se lleva a cabo de manera espontánea, como resultado de la presencia y crecimiento de microorganismos presentes en el aguamiel o de la adición de la semilla (Ortiz *et al.*, 2008). Debido a estas condiciones de producción, presenta una gran diversidad microbiana, dentro de la cual se presentan bacterias ácido lácticas homo- y heterofermentativas, entre las que destacan la presencia de *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactococcus lactis* en el pulque (Escalante *et al.*, 2008). Campos (2010), a partir de una muestra de pulque proveniente de Hutzilac, Morelos, aisló bacterias ácido lácticas utilizando como criterios de aislamiento, la resistencia a pH ácido y sales biliares, obteniendo 13 cepas con características de resistencia a las condiciones antes mencionadas y permitiendo la identificación de 5 grupos genéticos únicos con capacidad probiótica, que fueron identificados como bacterias del género *Leuconostoc*, entre los cuales se aisló la cepa designada como *Leuconostoc mesenteroides* P45. Posteriormente Matus (2011), destacó que la cepa, presentó las mejores características probióticas al disminuir en al menos un ciclo logarítmico la infección en hígado y bazo de la cepa *Salmonella enterica* serovariedad Typhimurium STR^r en el hígado de ratones, en un período de tres días.

En México, el consumo de probióticos, se encuentra limitado a unos cuantos productos que en su mayoría son lácteos (Gutiérrez, 2015), sin embargo, existe una demanda creciente de productos probióticos no lácteos por parte del consumidor. Esto puede ser por diversas razones, como la inaccesibilidad de productos lácteos, la intolerancia a la lactosa, por el contenido de colesterol presente en estos productos o por otras razones particulares. Las nuevas tecnologías han permitido incorporar a los microorganismos probióticos en diferentes bebidas o algunas formas de preparados (Serrano, 2013).

5. GENERALIDADES

5.1. Género *Agave*

El maguey es una planta monocotiledónea que pertenece al orden de las Amarilidáceas (Escalante *et al.*, 2016); se clasifica dentro de la familia *Agavaceae* y del género *Agave*; la palabra agave debe su origen a la voz griega *agavé* – admirable; se cultivó sobre todo en gran parte del altiplano central y su núcleo central fueron las tierras altas de Mesoamérica y las laderas de los cerros (Manrique, 2013).

El género *Agave* incluye alrededor de 200 especies (Huerta *et al.*, 2018), es endémico del continente americano, y México contiene la mayor cantidad de especies, alrededor del 75%, con un 74% de ellas endémicas (~ 150 especies) que viven principalmente en hábitats áridos y semiáridos (Borbón *et al.*, 2018; Puente *et al.*, 2018), creciendo en regiones poco lluviosas, con temperaturas templadas a cálidas y en suelos delgados, tepetatosos y pobres en materia orgánica (Bonilla *et al.*, 1991).

En adaptación a su entorno árido o semiárido utiliza el metabolismo del ácido crasuláceo para fijar el CO₂ durante la fotosíntesis. Los principales productos fotosintéticos son los fructanos (Gómez *et al.*, 2009). Estos fructanos han sido designados como agavinas, que son inulinas con una mezcla compleja de estructuras y diferente grado de polimerización (GP). Debido al alto contenido de fructanos y fructooligosacáridos (FOS), los extractos de agave, así como la savia (consumida directamente o concentrada) de diferentes especies, se han considerado como una fuente alternativa para los jarabes prebióticos FOS (Escalante *et al.*, 2016).

Un grupo de *Agave* spp. de gran importancia económica incluye *Agave americana*, *Agave atrovirens*, *Agave mapisaga* y *Agave salmiana* que forman conjuntamente el grupo conocido como "magueyes pulqueros" (Puente *et al.*, 2018). El maguey pulquero es la planta de la que se obtiene el aguamiel para la producción del pulque, una de las bebidas alcohólicas más antiguas del continente americano, obtenida por fermentación de aguamiel (savia de maguey-pulquero; Ortiz *et al.*, 2008) que se

cultiva principalmente en los estados de México, Hidalgo, Tlaxcala (NMX-V-022-1972).

El agave florece solo una vez y muere poco tiempo después. La edad en que se inicia la floración depende de diversos factores, tales como la especie, características del terreno, clima y los cuidados agrícolas que se le hayan proporcionado. La floración se presenta entre los 8 y 12 años (Bonilla *et al.*, 1991).

5.1.1. Historia

Se cuenta que los dioses acordaron darles a los hombres algo que les proporcionara placer y alegría; y entre ellos *Quetzalcóatl*, decidieron que una bebida sería la solución. “Los dioses dijeron: he aquí que el hombre estará triste si no le hacemos algo nosotros para regocijarle, nos alabe y cante y dance” (Bonilla *et al.*, 1991; Sierra, 2005).

Quetzalcóatl busca a *Mayahuel*, que vivía en el cielo con su abuela, una terrible *tzitzimítl*; *Mayahuel* estaba dormida, pero el dios la despierta y la convence que baje a la tierra, y así ambos descendieron del cielo y se funden en un árbol. Se convierte cada uno en una frondosa rama, una de las cuales se llamaba “sauce de quetzal”, que era la del dios del viento y la otra “árbol de las flores” que era la de la diosa (Bonilla *et al.*, 1991). Cuando la abuela despierta de su sueño, se da cuenta de que su nieta ha desaparecido y se enfurece; manda llamar a las demás *tzitzimime*, para que la ayuden a encontrarla.

Las *tzitzimime* se precipitan de cabeza desde el cielo y caen directo al árbol, el cual se divide en dos; la abuela encolerizada, arranca la rama de *Mayahuel* y quiebra y descuartiza a su nieta, entregando los trozos de su cuerpo a las *tzitzimime*, para que la devoren. La rama de *Quetzalcóatl* queda intacta, él vuelve a adquirir su forma original de deidad y se pone a recoger los restos de *Mayahuel* y los entierra, naciendo de esta el primer maguey. Los huesos de *Mayahuel* son el objeto sacrificial que provoca en el tejido mítico, la aparición de la planta. El mito justifica la aparición de la bebida. Su origen es divino, porque los dioses provocan su surgimiento (Sierra, 2005).

5.2. Aguamiel

La savia de la planta llamada *Agave* en México, es un líquido compuesto principalmente de azúcares, incluidos los fructooligosacáridos. Este líquido se cosecha exclusivamente de ciertas especies de *Agaves* conocidas como “magueyes pulqueros”, incluidos *A. ferox*, *A. mapisaga* y *A. salmiana* (Leal *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2016).

Se entiende por aguamiel, el jugo que se obtiene mediante el raspado previo del cajete o cavidad central del maguey pulquero. Es un líquido incoloro translúcido, de color ambarino (NMX-V-022-1972), espeso, dulce, de sabor fresco y ligeramente ácido con cierto olor herbáceo (Conca, 2008; Hui *et al.*, 2012). Los principales azúcares encontrados en plantas de 8 años, “magueyes”, son sacarosa, glucosa y pequeñas cantidades de gomas y manitol (Sánchez y Hope, 1953), así como minerales y proteínas (Enríquez *et al.*, 2017).

La NMX-V-022-1972 clasifica el aguamiel en dos tipos, con un solo grado de calidad estableciendo que en ambos tipos, el aguamiel no debe presentar signos de fermentación avanzada. Se muestra en la Tabla 1, las especificaciones fisicoquímicas para cada tipo de aguamiel.

La producción de aguamiel es inducida por los agaves en el momento en que el tallo floral o quiole de la planta se corta (alrededor de 8-12 años) haciendo un hueco en el centro (Santos *et al.*, 2016; Enríquez *et al.*, 2017). La recolección se realiza cada 12 horas después de raspar el tallo del agave, y la producción dura de 4 a 6 meses. El volumen de aguamiel cambia a lo largo del período de cosecha. Al principio se pueden recolectar alrededor de 0.4 L por planta por día, y esta cantidad aumenta a 4 a 6 L por planta por día durante los primeros 2 meses y luego disminuye a 0.4 L por planta por día hacia el final del tiempo de producción (Ortíz *et al.*, 2008; Hui *et al.*, 2012).

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

Especificaciones	Tipo I		Tipo II
	Mínimo	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	0.20
Proteínas mg/100mL	300	600	100
Cenizas mg/100mL	300	430	180
No mayor de:			
Acidez mg/100mL (como ácido láctico)	0.90	1.03	4.00

En lugar de la edad de la planta, la etapa de maduración se considera el factor más relevante que afecta la acumulación de azúcar en el tallo, lo que influye directamente en la dulzura del aguamiel. Para preparar la planta para la extracción

de aguamiel, al inicio de la etapa reproductiva (antes de la generación del tallo floral), el meristemo apical se elimina manualmente. Dentro de la cavidad creada en el tallo, la savia dulce se acumulará y se recogerá dos veces al día durante 2 a 6 meses. El volumen extraído se ve afectado por la especie, la madurez de la planta, los nutrientes del suelo y la disponibilidad de agua (Leal *et al.*, 2015). Si la inflorescencia de la planta crece, el maguey nunca producirá aguamiel, y si la castración se realiza antes de la maduración del agave, el rendimiento en la producción de aguamiel será espantoso (Hui *et al.*, 2012).

5.2.1. Proceso de obtención

El proceso para la obtención de aguamiel es considerado como un proceso rudimentario y realizado en condiciones poco higiénicas (Conca, 2008).

La de extracción de aguamiel comienza con el “capado” o “castrado” del maguey en un momento determinado (Sierra, 2005). Un maguey está maduro cuando la yema central o meyolote se ve delgada en su base, cuando los extremos de las pencas exteriores pierden las púas laterales de sus bordes en la parte inferior, cuando los extremos de las pencas se doblan ligeramente hacia el centro de la planta, y cuando las púas terminales de las pencas y el meyolote se tornan más agudas y oscuras, es decir, cuando la planta “está al hilo” (Bonilla *et al.*, 1991; Sierra, 2005).

Es entonces cuando debe efectuarse la “castración” o “capado” del maguey, consistente en cortar el brote floral, qurote o “huevo” antes de que se efectúe la “floración” (Sierra, 2005) para evitar la pérdida de la savia almacenada (Enríquez *et al.*, 2017). El tlachiquero primero escoge el ángulo por el cual será más fácil llegar al centro del maguey, de tal manera que pueda subir a caparlo sin problemas y succionar el aguamiel. Un segundo paso es eliminar las púas terminales y laterales de las pencas por las que va a introducirse al mismo maguey. El tercer paso sería, cortar las pencas externas del meyolote al nivel más bajo para poder llegar al tallo o mezontete. Después, separa las demás pencas jóvenes del centro sin cortarles, hasta detectar a través de ellas la yema de crecimiento, de donde nacen las pencas y el qurote. El centro es arrancado por el tlachiquero con ayuda de una barreta. Para

finalizar, el tlachiquero protege la herida con las pencas partidas (Bonilla *et al.*, 1991).

A partir de ese día, el maguey se deja descansar por un período de 6 meses a un año, a fin de cumplir su ciclo de añejamiento y pueda seguir produciendo aguamiel de buena calidad en cantidades suficientes (Bonilla *et al.*, 1991).

Cuando se observan manchas en las hojas, el maguey ha llegado a su máximo añejamiento y entonces, se procede a la “picazón” (Sierra, 2005). Ésta debe hacerse dos semanas antes del “raspado” y la extracción de aguamiel, y después de 6 meses o un año de la “capazón” (Bonilla *et al.*, 1991).

La “picazón” consiste en abrir una cavidad redonda en el centro del mezontete (parte superior o cabeza del maguey; Sierra, 2005), se hace con la finalidad de formar en el mezontete una cavidad denominada “cajete”, lugar donde escurrirá la savia de las pencas, es decir el aguamiel (Bonilla *et al.*, 1991).

Una vez hecho el cajete se procede a la “raspa”, misma que dura de tres a cuatro meses. Para empezar es necesario esperar a detectar en el cajete una tonalidad de color entre rojo y amarillo oscuro. A partir de ese momento, el tlachiquero visitará al maguey todos los días de manera constante. Sus herramientas de trabajo se reducen a un “raspador”, con el que quitará la materia gelatinosa del cajete, que se forma del flujo de la savia y del raspado diario (Bonilla *et al.*, 1991). Para extraer o succionar el aguamiel se usa el “acocote” o calabazo, fruto de la planta *Lagenaria siceraria* (Sierra, 2005). Una vez que se llena el acocote, vacía el líquido en pequeños barriles o barricas de madera o plástico llamados “castañas” (Bonilla *et al.*, 1991), que son recipientes en los que se conduce, para su fermentación a los tinacales locales (Sierra, 2005).

Al terminar de vaciar o chupar en el fondo del cajete, el tlachiquero debe volver a cubrirlo con una piedra o una penca (Hui *et al.*, 2012), evitando la entrada de cualquier elemento externo, ya sea agua, lluvia, basura, animales, que en determinado momento puedan contaminar y echar a perder el aguamiel. Si en cada ocasión no se remueve bien toda la pulpa o capa gelatinosa al raspar, los vasos por

los que fluye la savia se tapan. De manera contraria, si se quita una capa demasiado gruesa, los tejidos internos de la piña se endurecen acortando la vida del maguey (Bonilla *et al.*, 1991).

La cantidad y composición de aguamiel durante el período de producción varía según la especie de *Agave*, las condiciones de cultivo de la planta, la estación del año, la humedad relativa del aire y las propiedades del suelo (Hui *et al.*, 2012).

5.3. Pulque

El pulque es una bebida tradicional mexicana que se obtiene por la fermentación de la savia azucarada conocida como aguamiel. Esta bebida es consumida por poblaciones indígenas y mestizas de muchas regiones del país, particularmente en las áreas de la meseta central. Es una bebida alcohólica, blanca y espesa, del altiplano de México (Cervantes y Pedroza, 2008), viscosa y ligeramente ácida con un contenido alcohólico entre 4 y 7 °GL (Guerrero, 2017).

El proceso tradicional de producción de pulque se ha mantenido relativamente sin cambios, el proceso comienza con la recolección diaria de aguamiel y su transferencia inmediata a un contenedor, tradicionalmente una bolsa de piel de cerdo o de cabra llamada cuero o un contenedor de madera conocido como castaña (Hui *et al.*, 2012). El proceso se inicia con la preparación de la “semilla”. Para prepararla, se toma una pequeña cantidad de aguamiel de la más alta calidad y pureza, el cual se deja fermentar en unas tinajas de 25 litros, protegidas con una tela a fin de evitar cualquier contaminación. En esta fermentación intervienen infinidad de agentes químicos que producen que se haga una capa viscosa llamada “zurrón”. Cuando se considera que la semilla está lista, se quita el zurrón y se comprueba que no existan olores extraños a la fermentación normal. Una vez terminada la elaboración de la semilla, se procede a vaciar una cantidad de este líquido a otras tinajas, operación que recibe el nombre de “cortar puntas” (Bonilla *et al.*, 1991).

La fermentación se lleva a cabo con controles de proceso mínimo y a temperaturas ambientales que varían de 25 a 50 °C. Se completa en 12 a 24 horas (Valadez *et al.*, 2012), dependiendo de la calidad del aguamiel, la madurez inicial del pulque, la

savia y la microbiota de la semilla, y la estación (cambios de temperatura ambiental). El grado de fermentación es adecuado cuando se alcanza un grado alcohólico y una viscosidad específicos (Hui *et al.*, 2012). Se muestra en la Figura 1, el proceso tradicional de elaboración del pulque (Modificada de Escalante *et al.*, 2016).



Figura 1. Proceso de elaboración tradicional del pulque. El proceso tradicional comprende cuatro etapas: A) Castración del maguey; B) Raspado y extracción del aguamiel; C) Preparación de la semilla y D) Fermentación. Modificada de Escalante *et al.*, 2016.

5.4. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas son no formadoras de esporas, Gram positivas, catalasa negativas sin citocromos, no aeróbicas o aerotolerantes, fastidiosas, tolerantes a los ácidos y estrictamente fermentativas, con ácido láctico como principal producto final durante la fermentación de azúcar. Los géneros de BAL aislados de diversos alimentos fermentados son *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Weisella* y *Alkalibacterium* (Tamang, 2014).

5.4.1. Características metabólicas

Las BAL poseen requerimientos nutrimentales complejos, dado que no son capaces de sintetizar la mayoría de los compuestos que requieren. Por esta misma razón sólo pueden desarrollarse en medios ricos en carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y sales minerales (Arenas, 2015).

Las BAL son un grupo diverso de organismos con capacidad metabólica diversa (Fraqueza, 2015). El crecimiento de las BAL depende de la presencia de carbohidratos fermentables. Se clasifican como homofermentativos o heterofermentativos en función de los productos finales del metabolismo de la glucosa. Mientras que las BAL homofermentativas convierten la glucosa principalmente en ácido láctico usando la vía de la glucólisis (Embden-Meyerhof-Parnas o Embden-Meyerhof), las BAL heterofermentativas utilizan la vía fosfoacetolasa (6-fosfogluconato) y convierte la glucosa en ácido láctico, dióxido de carbono y etanol o ácido acético (Fraqueza, 2015).

Las BAL con metabolismo homofermentativo y heterofermentativo facultativo son capaces de producir distintos compuestos a partir del piruvato, tales como el acetaldehído, la acetoína, el diacetilo y el 2,3-butanodiol, lo cual representa una característica importante desde el punto de vista tecnológico para la elaboración de algunos alimentos fermentados (Arenas, 2015).

5.4.2. Propiedades

Las BAL se han asociado tradicionalmente con la fermentación de alimentos y piensos, su uso en todo el mundo incluye la mejora de la conservación, las características organolépticas y los valores nutricionales de una gran variedad de productos alimenticios y de bebidas (Zannini *et al.*, 2016).

5.5. Probióticos

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped” (Leal *et al.*, 2016; Valdés *et al.*, 2017; Valdovinos *et al.*, 2017); sin embargo Sarmiento (2006), indica que la denominación “probiótico”, se aplica tanto a los microorganismos como a los productos alimenticios que contienen determinados microorganismos viables, principalmente bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en número suficiente para alterar la microbiota, generando efectos beneficiosos para la salud.

5.5.1. Características

Los probióticos y su consumo están relacionados a algunos beneficios como la producción de lactasa, la modificación del pH intestinal, para una mejor conservación de la microbiota, la producción de sustancias antimicrobianas, la competición con microorganismos patógenos por sustrato, para evitar su proliferación, ayudan a una mejor asimilación de nutrientes, estimulan al sistema inmune y la generación de citocinas (Mata, 2013).

Los factores extrínsecos más importantes que afectan la viabilidad y sobrevivencia de las células probióticas son: pH (derivado del proceso de fermentación), oxígeno disuelto (especialmente para bifidobacterias), interacciones antagónicas entre especies, composición química del medio de cultivo, concentración final de azúcares (aumento de la presión osmótica), prácticas de inoculación (momento adecuado para el agregado del cultivo probiótico), temperatura y duración de la fermentación, condiciones de almacenamiento del producto (Olagnero *et al.*, 2007).

5.5.2. Requerimientos

Para que un probiótico pueda considerarse como tal, es necesario que cumplan una serie de características, entre las que se incluyen: 1) Ser de origen humano, ya que en teoría, las cepas aisladas de seres humanos pueden presentar una mayor facilidad para permanecer en el intestino humano y probablemente no son patógenas; 2) Deben poseer tolerancia a las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal, ya que si los microorganismos probióticos han de llegar viables al intestino, es preciso que resistan el pH gástrico, las enzimas digestivas y la acción detergente e inhibidora de las sales biliares; 3) Han de ser capaces de colonizar el intestino y de adherirse a la mucosa intestinal para que tenga lugar la modulación de la respuesta inmune, así como la exclusión de microorganismos patógenos, si bien en esto último puede deberse también a su capacidad de producir compuestos antimicrobianos (Bolla, 2011).

Se considera que los cultivos probióticos proporcionan beneficios promotores de la salud estabilizando el tracto gastrointestinal, como protección contra diarrea, estimulación del sistema inmune, alivio de los síntomas de intolerancia a la lactosa, reducción del colesterol sérico y prevención contra el cáncer (Tamang, 2014).

5.5.3. Mecanismos de acción

Los mecanismos de acción de los probióticos son múltiples y se han descrito con relación al género, especie y cepa. Se muestra en la Figura 2, los mecanismos de acción generales y comunes en los probióticos, entre los que se encuentran: aumentar la resistencia a la colonización, normalizar la microbiota intestinal alterada, promover la exclusión competitiva por patógenos, aumentar la producción de ácidos grasos de cadena corta, regular el tránsito intestinal e incrementar el recambio de los enterocitos. En general todos los probióticos afectan al ecosistema intestinal estimulando los mecanismos inmunitarios y no inmunitarios de la mucosa a través del antagonismo y competencia con patógenos potenciales (Valdovinos *et al.*, 2017).

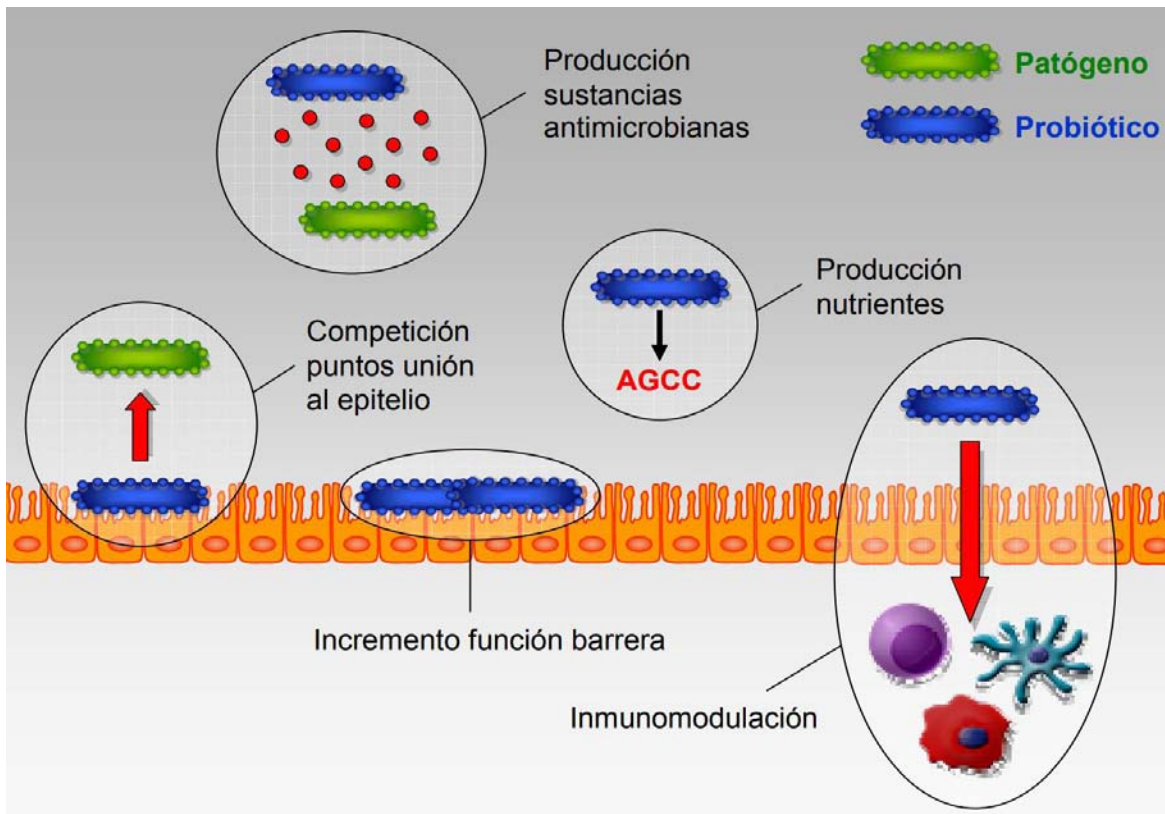


Figura 2.- Mecanismos de acción de probióticos. Tomada de Arribas (2009).

El principal efecto de los probióticos es aumentar las funciones de la inmunidad innata, incluida la fagocitosis y la toxicidad celular mediada por las células asesinas naturales, y regular la síntesis de citocinas en las células T polarizadas. Debido a que las células T reguladoras desempeñan un papel importante en la amortiguación de respuestas inmunes mal dirigidas, los probióticos pueden ejercer efectos antiinflamatorios al influir en esta población de células T (Moreno *et al.*, 2014). Se ha demostrado que las cepas probióticas difieren en su capacidad para inducir la diferenciación de células y la producción de citocinas (Ashraf *et al.*, 2014).

5.6. *Leuconostoc mesenteroides*

El género *Leuconostoc* pertenece al Phylum Firmicutes, que incluye microorganismos Gram-positivos, y presenta una forma cocoide o de tipo varilla, que a menudo forman cadenas durante el crecimiento exponencial (Pujato *et al.*, 2015). Estas bacterias generalmente se presentan en pares o cadenas cortas, son inmóviles, no forman esporas, son catalasas negativas, anaeróbicas facultativas y

mesofílicas y no producen amoníaco a partir de la arginina. Muestran requisitos nutricionales complejos, incluidos diferentes aminoácidos. Además, exhiben ausencia de formación de H₂S, crecimiento en presencia de NaCl al 7% y bajo contenido de guanina-citosina (GC) en la molécula de ADN (31-49%). Estos microorganismos tienen características mesofílicas, con un crecimiento óptimo entre 20 y 30 ° C. Las especies pertenecientes a *Leuconostoc* (*L. argentinum*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. fallax*, *L. ficulneum*, *L. fructosum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. inhae*, *L. kimchii*, *L. lactis*, *L. mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides*) se pueden encontrar principalmente en vegetales, cereales, ensilaje, frutas, vino, pescado, carne y productos lácteos (de Paula *et al.*, 2015)

Las bacterias del género *Leuconostoc* se encuentran clasificadas dentro del grupo de bacterias ácido lácticas heterofermentativas, las cuales producen mayoritariamente ácido láctico a partir de la fermentación de hidratos de carbono simples (de Paula *et al.*, 2014; Serrano, 2017), producen gas (CO₂), compuestos aromáticos (diacetilo, acetoína, acetato, etanol y 2,3-butilenglicol), utilizado en diversos fabricantes de alimentos fermentativos (D'Angelo *et al.*, 2017), además de valiosos polisacáridos (dextrinas) y llevar a cabo la fermentación maloláctica (Shobha y Agrawal, 2008).

Estas bacterias han sido detectadas en procesos fermentativos tradicionales desarrollados desde la antigüedad y actualmente se conoce que tienen un importante papel en la conservación de alimentos (Serrano, 2017).

5.6.1. *Leuconostoc mesenteroides* cepa P45

L. mesenteroides es una BAL previamente reportada en pulque y se ha identificado como el microorganismo responsable del desarrollo de la viscosidad, una de las características distintivas de la bebida (Escalante *et al.*, 2004).

Lozano (2007), caracterizó la diversidad de bacterias lácticas Gram positivas cultivables presentes en aguamiel y al inicio de la fermentación de una muestra de pulque de la localidad de Huitzilac, Morelos. Del aguamiel y del inicio de la fermentación del pulque caracterizó las bacterias lácticas por técnicas de cultivo y

tipificación molecular, encontrando 4 tipos diferentes: *Lactococcus lactis cremoris*, *Leuconostoc kimchii*, *L. citreum*, *L. mesenteroides* y *B. licheniformis*. Posteriormente, Campos (2010), aisló y caracterizó 13 bacterias lácticas del pulque con posible capacidad probiótica, resistentes a condiciones *in vitro* simuladoras del tracto gastrointestinal (pH 3.5 y 0.3% sales biliares), obteniendo grupos genotípicamente distintos identificados como *L. mesenteroides*, *L. durionis* y *L. kimchii*. Observó que para todos los aislados se presentó capacidad antagónica contra bacterias patógenas, detectando que las cepas: P45 (*L. mesenteroides*) y 3h38 (*L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) presentaron una mayor capacidad de inhibición.

En 2011, Matus, de las cepas aisladas por Campos (2010), seleccionó a la cepa P45 para ser probada en modelos animales. Observó que el consumo de la cepa durante siete días disminuyó en uno o dos ciclos logarítmicos el desarrollo de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en hígado y bazo de ratones BALB/c, además de presentar buen crecimiento a 37 °C a pH 3.0 y una concentración de 0.3% de sales biliares. Realizó también la identificación de la cepa seleccionada por secuenciación del operón ribosomal, mostrando un 92% de parecido con la cepa *L. mesenteroides* ATCC 8233, presentando regiones significativamente diferentes, sugiriendo una nueva subespecie.

En un estudio realizado por Cerón (2014), se realizaron ensayos de adhesión celular *in vitro* por parte de la cepa P45, en cuatro líneas celulares (Caco-2, Hep-2, HT-29 y HeLa), presentando adherencia moderada a las primeras dos líneas. De manera paralela al desarrollo del proyecto, se secuenció el genoma de la cepa P45. El borrador del genoma de *L. mesenteroides* cepa P45, que consta de 1, 874,188 pb con un contenido promedio de GC del 37,5%. La anotación automática del genoma predijo un total de 1,800 genes, 1,687 secuencias codificantes, 52 pseudogenes, 9 rRNA (5S, 16S, 23S), 51 tRNAs, 1 RNA no codificante y 44 genes frameshifted (Riveros *et al.*, 2014). Además, se encontró la secuencia de un gen codificante para la GTF (GtFg1:LP45), la enzima responsable de la síntesis de dextrana a partir de la sacarosa. Se encontraron genes codificantes para una prebacteriocina, una

lisozima (1,4-B-N-acetylmuramidasa) y un peptidoglicano amidasa (N-acetylmuramoyl-L-alanina amidasa; murain_hidrolasa). El tamaño del producto de estos genes considerado es de 11, 27 y 32 kDa, respectivamente.

Recientemente, en un estudio realizado por Serrano (2017), se estudió la administración de *L. mesenteroides* P45 sobre rasgos metabólicos en ratones alimentados con una dieta alta en grasa, determinando que la administración de la cepa en cultivo fresco, en conjunto con una dieta alta en grasa no mostró un efecto sobre parámetros metabólicos, por el contrario, aceleró la ganancia de peso y tejido adiposo, llevando a un aumento en los niveles de colesterol sérico y glucosa.

Finalmente Guerrero (2017), realizó el estudio de la diversidad microbiana y genética de bacterias endófitas asociadas a una planta de maguey pulquero, demostrando el origen de bacterias endófitas aisladas de una planta de maguey pulquero (*A. salmiana*), identificándolas como *Pantoea agglomerans*, *Raoultella terrigena*, *Acinetobacter genomus* sp., *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Erwinia billingiae*, *Leuconostoc rapi*, *Pseudomonas rhizosphaerae*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas* sp. y *Pseudomonas fluorescens*.

5.6.2. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son estructuras tipo péptido, ribosomalmente sintetizados con antagonismo contra bacterias estrechamente relacionadas (Messaoudi *et al.*, 2013) y que presentan acción bactericida sobre receptores específicos de las células. Las bacteriocinas han sido estudiadas por su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* spp., entre otras (Flores, 2013).

5.6.2.1. Clasificación

El esquema de clasificación revisado propuesto divide las bacteriocinas en dos categorías distintas: las bacteriocinas que contienen lantionina (Lantibióticos clase I). Las bacteriocinas de amplio espectro, como la nisina (clase I), inhiben los patógenos Gram positivos transmitidos por los alimentos y los microorganismos causantes de la descomposición (O'Shea *et al.*, 2013).

Las bacteriocinas que no contienen lantionina (Clase II), son bacteriocinas pequeñas (<10 kDa), estables al calor, sin modificación postraduccional, con una secuencia consenso (YGNGVXCaaCVaaV; de Paula *et al.*, 2014). Esta clase incluye una gran cantidad de bacteriocinas y se divide en cuatro subclases (IIa, IIb, IIc y IId; Messaoudi *et al.*, 2013).

5.6.3. Exopolisacárido (EPS)

Los exopolisacáridos son polímeros de alto peso molecular (Mahdhi *et al.*, 2017). Ciertas BAL son capaces de producir polisacáridos extracelulares (EPS) que pueden estar estrechamente asociados con la superficie de la célula formando una cápsula, o unidos sueltos a las estructuras celulares externas o secretados al medio ambiente (Bengoa *et al.*, 2018).

Entre las posibles funciones de los EPS, es probable que juegue un papel en el reconocimiento celular, control de detección de quórum, intercambio de información genética y en la protección de la integridad de células microbianas en un ecosistema contra ambientes hostiles (deseccación, estrés osmótico, pH) y factores antimicrobianos (bacteriófagos, fagocitosis, depredación por protozoos, iones metálicos, nisina, lisozima, agentes de limpieza, etanol y antibióticos; Zannini *et al.*, 2016). Además, se ha sugerido que el EPS podría desempeñar un papel en la agregación bacteriana, la formación de biopelículas y la interacción con las células epiteliales intestinales (IEC); siendo el último de gran importancia para mejorar la persistencia del microorganismo en el intestino humano y su interacción con el sistema inmune y la microbiota intestinal (Bengoa *et al.*, 2017)

De acuerdo con la composición química y los mecanismos de biosíntesis, los EPS se clasifican en dos grupos distintos: homopolisacáridos (HoPS) y heteropolisacáridos (HePS; Zannini *et al.*, 2016). *L. mesenteroides* se caracteriza por su capacidad de producir EPS en medios que contienen sacarosa, produciendo una dextrana conformada por unidades de glucosa en α -1,6 con enlaces α -1,3 (Cerón, 2014).

5.6.3.1. Homopolisacáridos (HoPS)

Se sintetizan principalmente extracelularmente a partir de una molécula de sacarosa existente, que actúa como donante del monosacárido correspondiente por acción de enzima extracelular que pertenece a la familia de la glucosil hidrolasa (GH) usando sacarosa como el donante glucosilo (fructosa o glucosa). Las glucansacarosas pueden usar la energía del enlace glucosídico de sacarosa para catalizar la transferencia de un resto glucosilo correspondiente. Dependiendo del tipo de enlace y la posición del carbono involucrado en el enlace, los HoPS puede clasificarse como α -D-glucanos (dextrano, mutan, reuteran y alternano) y β -D-glucanos, mientras que los que contienen fructosa son fructanos (Zannini *et al.*, 2016; López, 2017).

5.7. Prebióticos

Los prebióticos son "componentes/ingredientes/suplementos de alimentos que resultan en la estimulación selectiva de crecimiento y/o actividad (es) de uno o un número limitado de especie (s) microbiana (s) en la microbiota intestinal que confiere (n) beneficios de salud del huésped" (Kothari *et al.*, 2015; Kothari y Goyal, 2015; Koenen *et al.*, 2016; Martínez *et al.*, 2017).

El concepto de prebióticos se ha propuesto cada vez más como moduladores de la ecología microbiana y la fisiología en humanos (Liu *et al.*, 2017); sin embargo recientemente la Organización Mundial de Gastroenterología ha definido los prebióticos como sustancias de la dieta (fundamentalmente polisacáridos no amiláceos y oligosacáridos no digeribles por enzimas humanas) que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino, favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas sobre las nocivas (Valdovinos *et al.*, 2017).

Un prebiótico se convierte en el sustrato trófico del probiótico. Estas son sustancias o componentes que no se digieren y que forman parte de algunos alimentos en mayor o menor cantidad. Estas a su vez estimulan el crecimiento y actividad de las bacterias intestinales. Los principales beneficios de los prebióticos se dan a nivel

gastrointestinal como sustrato de las bacterias benéficas (probióticos), debido a su configuración β en el carbono 2 llegan al colon sin ser digeridas (Mata, 2013).

5.7.1. Características

Para que una sustancia dietética se clasifique como prebiótica, se requieren al menos tres criterios: 1) debe ser resistente a la acidez gástrica, la hidrólisis por enzimas de mamíferos y la absorción gastrointestinal; 2) debe ser fermentado por la microbiota intestinal; y 3) la fermentación del sustrato debería inducir efectos luminales/sistémicos beneficiosos dentro del huésped (Kothari y Goyal, 2015; Valdovinos *et al.*, 2017).

5.7.2. Mecanismos de asimilación

La microbiota intestinal contribuye al metabolismo energético a través de la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que se producen por la fermentación colónica que implica la descomposición anaeróbica de la fibra dietética, las proteínas y los péptidos. Los AGCC son productos bacterianos que son utilizados por las células epiteliales colónicas humanas, estimulando su crecimiento así como la absorción de sal y agua, aumentando así la humedad del bolo fecal a través de la presión osmótica y consecuentemente mejorando la motilidad intestinal. En su conjunto, los AGCC acidifican el pH luminal que suprime el crecimiento de patógenos y también influyen en la motilidad intestinal (Martínez *et al.*, 2017).

Los AGCC se pueden usar como fuente de energía por las células del cuerpo (Koenen *et al.*, 2016). El orden de utilización de los AGCC por el colonocito es butirato > acetato > propionato (Escudero y González, 2006).

El butirato es la principal fuente de energía de los colonocitos, estimula la producción de moco, la absorción de iones y la formación de bicarbonato. El propionato es metabolizado en el hígado actuando de precursor en la gluconeogénesis y la lipogénesis. Una parte del acetato puede ser metabolizado en los tejidos periféricos, esencialmente en el músculo, para obtener energía (Escudero y González, 2006; García *et al.*, 2015). El lactato se considera un

metabolito intermedio en la microbiología intestinal y solo se acumula cuando hay una fermentación rápida de un sustrato (Koenen *et al.*, 2016).

5.7.3. Fructooligosacáridos

En México, los fructanos están aislados de los agaves, como el principal producto fotosintético almacenado en el tallo de estas plantas. Debido a la estructura y el tipo de enlace (β , 2-1 y β , 2-6) de estas moléculas, los fructanos se consideran prebióticos (Franco y López, 2016). Los fructanos no son digeribles a través de las enzimas del tracto intestinal debido a la falta de actividad β -fructosidasa (Valdés *et al.*, 2017), por lo que las moléculas enteras pasan al colon, donde estos polímeros se fermentan a través de la microbiota intestinal beneficiosa, también conocida como probióticos o bacterias del ácido láctico (BAL), favoreciendo el crecimiento de estos microorganismos (Moreno *et al.*, 2014).

El grado de polimerización (GP) puede variar de 3 a 60; si el GP está por debajo de 10, estos polímeros se conocen como fructooligosacáridos (FOS), pero si es mayor que 10, entonces se llaman inulinas. Los fructanos son conocidos como ingredientes alimenticios. Los fructanos encontrados en aguamiel han sido propuestos como prebióticos termoprotectores en el secado por aspersion de *Bifidobacterium bifidum* (Ortiz *et al.*, 2008).

5.8. Simbióticos

Simbióticos hace referencia a aquellos alimentos que contienen una mezcla específica de bacterias probióticas y sustancias prebióticas (Sarmiento, 2006; Olagnero *et al.*, 2007; Valdés *et al.*, 2017).

Los simbióticos constituyen un grupo diferente a los probióticos (Olagnero *et al.*, 2007). El simbiótico al tener en forma combinada probióticos y prebióticos puede actuar modulando la microbiota intestinal. Tiene como objetivo que al llegar al intestino, los probióticos lo hagan acompañados de aquellas sustancias prebióticas, que ayuden a su crecimiento y colonización (Valdovinos *et al.*, 2017), así como beneficiar a las bacterias autóctonas en el tracto gastrointestinal (Valdés *et al.*, 2017).

Esta fusión de ingredientes funcionales produce efectos sinérgicos dentro de un producto, durante y después de haber sido consumidos (Mata, 2013), y el término debe reservarse para los productos que poseen verificación científica de la simbiosis, es decir en los cuales los prebióticos favorecen selectivamente a los probióticos adicionados en este simbiótico en particular (Olagnero *et al.*, 2007).

5.9. Alimentos funcionales

El término “alimento funcional” fue utilizado por primera vez en Japón a principios de los años 80, y desde allí se ha extendido hacia el resto del mundo. Se inicia en Japón la comercialización de alimentos especialmente formulados para cumplir con una función de salud. A estos alimentos se les categorizó como FOSHU (Foods for Specified Health Uses; Leal *et al.*, 2016).

Por otro lado, la nutrición actual se orienta a proveer de alimentos que además de los nutrientes, contienen otros compuestos biológicamente activos que aportan un beneficio adicional. Así nació el concepto de alimentos funcionales, cuya elaboración no solo contempla la calidad nutricional, tecnológica y sensorial, sino que también contienen naturalmente o se han incluido en ellos componentes bioactivos (Leal *et al.*, 2016).

Aunque no se ha logrado una definición del término alimentos funcionales que sea aceptada globalmente, el concepto general es que “son alimentos o componentes alimenticios cuyo consumo además de una nutrición básica, genera beneficios para la salud y/o reduce el riesgo de enfermedad” (Sarmiento, 2006; Valdés *et al.*, 2017; Salmerón, 2017).

Operativamente, un alimento funcional puede ser: un alimento natural en el que uno de sus componentes ha sido mejorado, un alimento al que se ha añadido un componente para que produzca beneficios, un alimento del cual se ha eliminado un componente y producirá menos efectos adversos sobre la salud, un alimento en el cual alguno de sus componentes ha sido modificado químicamente para mejorar la salud, un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más componentes ha sido aumentada, o combinaciones de las anteriores (Olagnero *et al.*, 2007).

5.9.1. Características

Las condiciones requeridas para que un alimento sea considerado funcional son:

1. Ocasione un beneficio a la salud del consumidor
2. Se demuestren los beneficios saludables obtenidos del consumo del alimento funcional.
3. Exista una cantidad mínima definida de ingesta diaria para alcanzar el beneficio esperado.
4. Una ingesta mayor a la necesaria para el efecto beneficioso no ocasione ningún efecto dañino.
5. Se consuma en la dieta habitual como cualquier alimento tradicional.
6. Se indique en su rotulación la presencia del ingrediente bioactivo y la cantidad en la que se encuentra.
7. Exista una metodología analítica que permita identificar y cuantificar el agente bioactivo.
8. Se puedan demostrar las propiedades saludables del alimento funcional luego de su consumo a través de biomarcadores de efecto (Leal *et al.*, 2016).

5.10. Evaluación Sensorial

El instituto de alimentos de EEUU (IFT) define la evaluación sensorial como “la disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído”. También es considerada simplemente como: el análisis de las propiedades sensoriales, se refiere a la medición y cuantificación de los productos alimenticios o materias primas evaluados por medio de los cinco sentidos. La palabra sensorial se deriva del latín *sensus* que significa sentido (Hernández, 2005). El análisis sensorial es considerado una ciencia multidisciplinaria estructurada a partir de principios científicos relacionados con diferentes áreas de conocimiento tales como ciencias de los alimentos, psicología, estadística, sociología, fisiología humana y conocimiento sobre prácticas de preparación de productos, con el propósito de obtener resultados objetivos de la

forma en que los alimentos son percibidos por los seres humanos a través de los sentidos (Iñigo, 2013).

La evaluación sensorial desempeña un papel importante en el desarrollo del producto asegurando el atractivo y la aceptación de nuevos productos y recetas, utilizando las sugerencias e indicaciones de los consumidores, capaces de realizar cambios en las características del producto a través de la receta y / o modificaciones de parámetros del proceso. Por lo tanto, la evaluación sensorial es una parte crítica de las investigaciones sobre el desarrollo de alimentos funcionales (Starowicz *et al.*, 2018).

Las pruebas sensoriales empleadas en la industria de alimentos, se dividen en tres grupos: pruebas discriminativas, pruebas descriptivas y pruebas afectivas (Hernández, 2005).

5.10.1. Pruebas Descriptivas

El análisis descriptivo es una metodología sensorial que proporciona descripciones cuantitativas de los productos, obtenidas de las percepciones de un grupo de sujetos calificados. Es una descripción sensorial completa, teniendo en cuenta todas las sensaciones que se perciben: visual, auditiva, olfativa, cinestésica, etc., cuando se evalúa el producto. La palabra "producto" se usa aquí en sentido figurado; el producto puede ser una idea o un concepto, un ingrediente, un protoconcepto, un prototipo o un producto terminado tal como fue comprado y utilizado por el consumidor. La evaluación se define en parte por las características del producto según lo determinado por los sujetos y en parte por la naturaleza del problema (Stone *et al.*, 2012). Su principal objetivo es la descripción de las características sensoriales de los productos, pruebas de almacenamiento, control de calidad, desarrollo de nuevos productos y sobre lo que se debe cambiar para tener el perfil sensorial deseado por el consumidor, relación de parámetros fisicoquímicos con sensoriales, para acercarse a un punto de referencia y para detectar las diferencias ocasionadas por el cambio de un ingrediente (García, 2016).

5.10.2. Análisis Descriptivo Cuantitativo

Este tipo de prueba consiste en analizar varios atributos sensoriales de un alimento como el sabor, la textura y la apariencia, esto indica que se combinen dos tipos de pruebas: la escala de categorías y la prueba de perfiles. Cada panelista debe asignarle un valor a la intensidad percibida, además de cuantificar, también se puede describir o cualificar sensorialmente el producto. La prueba de análisis cuantitativo se desarrolla en dos momentos. El primero se realiza en grupo en donde se determinan los atributos que se van a evaluar de alimento, además de aclarar todas las dudas que se tengan en cuanto a la terminología empleada (Hernández, 2005).

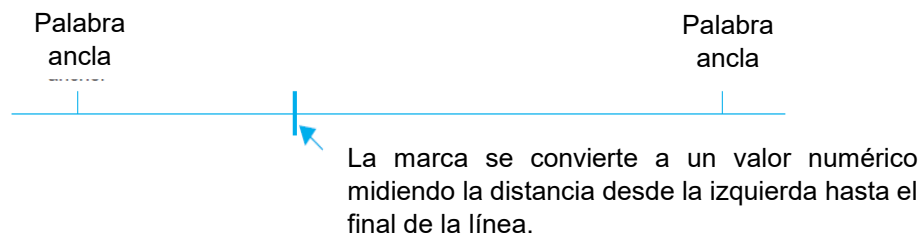


Figura 3.- Ejemplo de una escala de calificación gráfica (o escala de línea) utilizada para obtener medidas de intensidad relativa de los sujetos. Modificada de Stone et al., 2012.

Debido a que las pruebas descriptivas convencionales como el Análisis Descriptivo Cuantitativo, Perfil de Textura, etc., requieren de jueces entrenados y de un largo tiempo para poder realizar las evaluaciones, se han desarrollado otro tipo de pruebas rápidas como el Perfil de Libre Elección, Perfil Flash y Perfil Ultra flash etc., que se diferencian de los convencionales en que no requieren jueces entrenados, pero para su análisis requieren de la transformación de los datos y del uso de metodologías multivariadas como el General Procrustes Analysis.

5.10.3. Perfil Flash

Según Dairou y Sieffermann (2002), el Perfil Flash es una combinación original de selección de términos de libre elección con un método de clasificación basado en la presentación simultánea de todo el conjunto de productos. Un procedimiento de servicio simultáneo permite una discriminación ligeramente mejor al proporcionar una comparación directa de las muestras. El perfil flash no necesita capacitación porque el uso de la escala ordinal es intuitivo. Además, a los sujetos no se les pide que califiquen la intensidad, sino que clasifiquen las muestras para cada atributo. La hipótesis que se prueba es que esta metodología podría proporcionar la misma descripción de un conjunto de productos que el perfil convencional, pero más rápidamente al evitar la fase de capacitación y al reducir los términos en la fase de generación.

En el perfil flash en la primera sesión los evaluadores reciben un conjunto completo de productos y se les pide que generen individualmente descriptores sensoriales que distingan a los productos. En este proceso los evaluadores son instruidos para evitar términos hedónicos. Una vez que se tienen todos los descriptores se realiza una sesión grupal para hacer una lista de atributos y se les pide a los jueces actualizar sus propias listas individuales si lo requieren. En la siguiente sesión, se le da al panelista la totalidad de atributos definidos. En sesiones posteriores se repite el proceso de clasificación de los atributos. El perfil flash también se puede utilizar en la etapa inicial de un proyecto para crear los atributos sensoriales para el análisis descriptivo convencional (Hernández, 2017).

5.10.4. Análisis de procrustes generalizado

El análisis de procrustes generalizado permite el análisis estadístico de los resultados de perfiles de libre elección y perfil flash. Es un método multivariado utilizado ampliamente en evaluación sensorial perteneciente a los métodos de análisis de datos derivados de individuos. Este análisis es un consenso multidimensional que utiliza la rotación, la traslación y el escalamiento para dar cuenta de las diferencias de los panelistas, es decir, que reduce el efecto del uso

de la escala hedónica y analiza la proximidad de los términos que son utilizados por diferentes evaluadores para describir los productos (García, 2016).

El GPA tiene como objetivo tratar de conseguir que los mismos objetos estén tan cerca como sea posible, mediante diferentes transformaciones, obteniéndose una matriz consenso con los datos de cada uno de los panelistas. Una vez que se tiene una matriz consenso, se realiza una gráfica de PCA (Zea, 2016).

5.10.5. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) es un método bien conocido utilizado en numerosas aplicaciones estadísticas. Se puede usar para diferentes métodos y los dos siguientes son muy frecuentes:

1) El PCA a menudo se considera como una herramienta descriptiva para explorar y visualizar conjuntos de datos multivariados. A continuación, se utiliza como una forma de resumir los datos y proporcionar su mejor representación en un espacio de dimensiones inferiores.

2) A menudo es un paso de pre-procesamiento antes de aplicar, por ejemplo, métodos de agrupamiento: el agrupamiento se realiza en los primeros componentes principales. Dado que los componentes principales son variables no correlacionadas ordenadas de modo que las primeras den cuenta de la mayor variabilidad posible en los datos, dicha etapa de procesamiento puede considerarse como eliminación de ruido. De hecho, los primeros componentes se consideran como la estructura, mientras que los últimos se consideran como ruido (Josse y Husson, 2012).

El objetivo principal del PCA es la explicación de gran parte de la variabilidad de los datos originales como sea posible con el menor número de estos componentes como sea posible (aunque es posible obtener muchos de ellos, ya que hay variables originales). El PCA reduce el número de p variables originales en un número menor de variables no observables k que son combinaciones lineales de los originales (Rivas, 2014).

La interpretación del PCA se debe contemplar:

- 1.- La suma de la información del primer y segundo (%) eje, este es llamada representación acumulada; la información faltante, suele ser representada por las demás dimensiones.
- 2.- Las muestras se encuentran cercanas a los vectores de los atributos que las representan.
- 3.- Mientras más cercanos estén los productos entre sí en la proyección, se demuestra semejanza entre sus propiedades sensoriales.
- 4.- Cuando existe referencia, cuanto más se acerque al centro será considerada como mejor referencia puesto que representa al “promedio” de acuerdo con los atributos calificados (Flores, 2017).

6. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años, el consumo de alimentos funcionales, orgánicos y naturales ha ido en aumento, así como el consumo de probióticos. Dado que en México, el consumo de probióticos se encuentra limitado a unos cuantos productos que en su mayoría son lácteos (Gutiérrez, 2015), y que en promedio el 15% de los adultos mexicanos resulta ser intolerante a la lactosa (Rosado, 2016), el desarrollo de una bebida funcional a partir de aguamiel con la cepa P45, con posibles propiedades simbióticas permitirá una alternativa viable, de mayor estudio y aplicación para aquella población representativa que es susceptible al consumo de productos de origen lácteo, así como para personas con problemas diabéticos que requieren una dieta especial.

7. HIPÓTESIS

La cepa de *Leuconostoc mesenteroides* P45 caracterizada por su potencial probiótico *in vitro* e *in vivo*, al ser utilizada como cultivo iniciador en una muestra de aguamiel proveniente de la región de Huitzilac, Morelos será capaz de fermentar la muestra, desarrollarse en el medio y mantener las características de resistencia a pH ácido y sales biliares, así como el efecto antagonista contra microorganismos patógenos, finalmente aportará características sensoriales a la bebida final, para cumplir con las expectativas de los consumidores de este tipo de productos de innovación biotecnológica.

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo General

Elaborar una bebida funcional con posibles propiedades simbióticas, utilizando como medio de desarrollo una muestra de aguamiel proveniente de Huitzilac, Morelos y como cultivo fermentador la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* P45.

8.2. Objetivos Particulares

- Obtener el perfil de resistencia y susceptibilidad a antibióticos de la cepa probiótica.
- Realizar una fermentación de aguamiel, utilizando como cultivo iniciador, la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* P45, aislada del pulque.
- Determinar la resistencia de la cepa probiótica desarrollada en aguamiel, a condiciones de pH ácido y sales biliares, simulando condiciones del tracto gastrointestinal, a distintos tiempos de fermentación.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de la cepa probiótica desarrollada en aguamiel, contra microorganismos patógenos a distintos tiempos de fermentación.
- Evaluar el perfil sensorial de las muestras de aguamiel para conocer sus atributos de aspecto, olor, sabor, textura y resabios para relacionarlos con sus ingredientes y los metabolitos productos de la fermentación.

9. MATERIAL Y METODOLOGÍA

En la Figura 4 se muestra el diagrama general de la metodología empleada para la elaboración de la bebida, así como todas las determinaciones llevadas a cabo durante el estudio

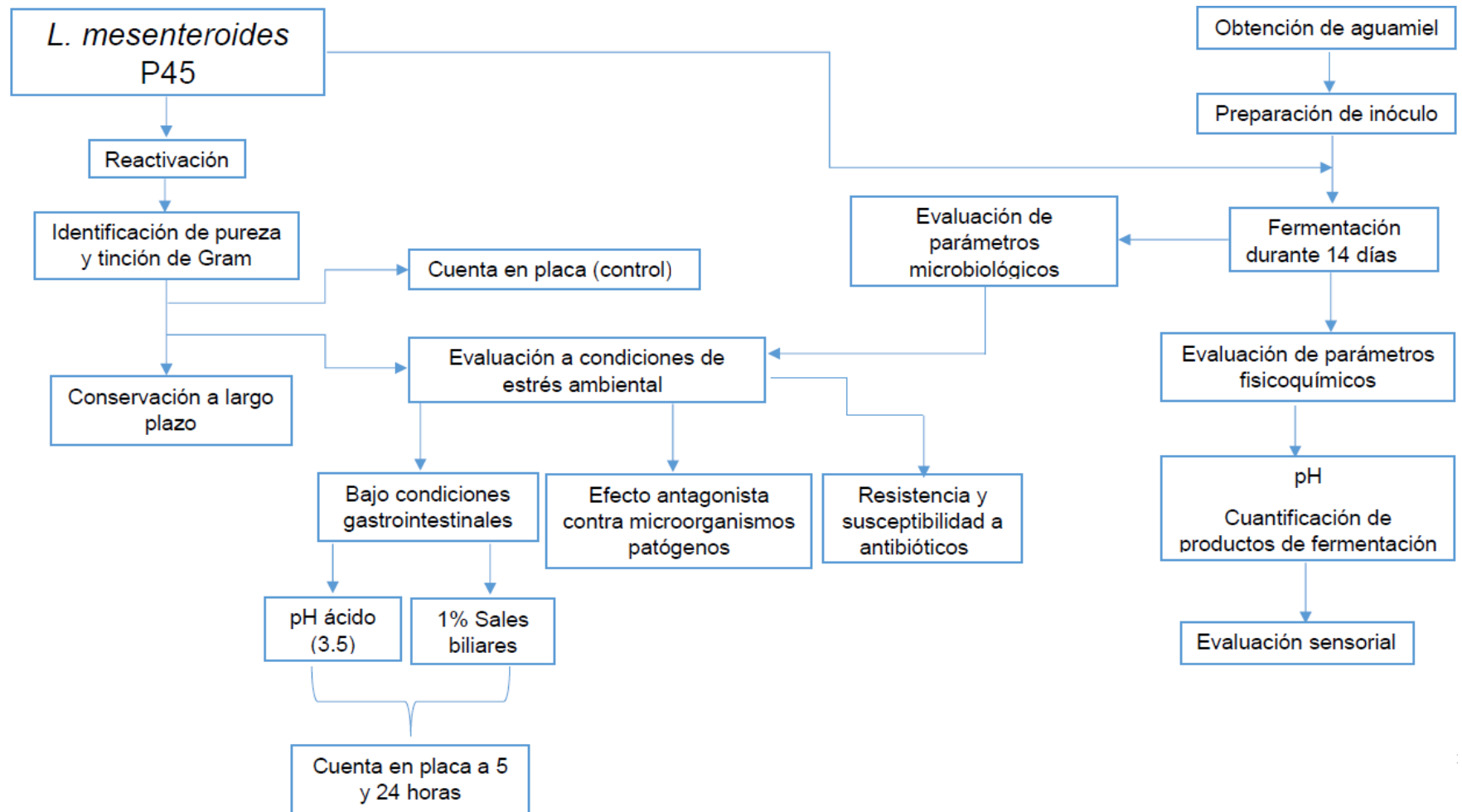


Figura 4. Metodología de elaboración de la bebida a partir de aguamiel y determinaciones llevadas a cabo en el estudio

9.1. Activación

9.1.1. *Leuconostoc mesenteroides* P45

A partir de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* P45 aislada del pulque (Campos, 2010), conservada en crioviales con caldo MRS (Difco) a -70 °C y glicerol al 50% (m/v), se realizó la activación de la cepa en caldo MRS utilizando un palillo estéril, incubando a 28 °C durante un período de 24 horas. Posteriormente se realizó una segunda activación utilizando 100 µL de la cepa previamente activada y colocando el volumen en 4.5 mL de caldo MRS, incubando nuevamente durante 24 horas a 28°C. Ésta etapa se realizó cuando fue necesario emplear la cepa a lo largo del presente trabajo.

9.1.2. Cepas empleadas en ensayos de antibiosis

Para realizar la detección de la actividad antagónica de la cepa probiótica contra microorganismos utilizados como patógenos, el Cepario del Departamento de Biología de la UNAM proporcionó las siguientes cepas: *Bacillus cereus* CFQ-B-230, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Enterococcus faecalis* QB, *Listeria monocytogenes* CFQ-B-103, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus pyogenes* CFQ-B-218 y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. Las cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. enterica* se conservaron en medio Luria (DIBICO), mientras que el resto de las cepas se conservaron en medio BHI (BIOXON). El crecimiento de todas las cepas se llevó a 37 °C durante 24 horas, posteriormente, la conservación de los microorganismos se llevó a cabo de la misma manera que se menciona en el punto 9.3.

9.2. Identificación de pureza y tinción de Gram

Utilizando el caldo MRS con la segunda activación de la cepa, se realizó el inóculo del microorganismo en una placa con agar MRS mediante la técnica de estríado radial, dejando incubar la placa durante 24 horas a 28°C. Después del tiempo de incubación se observó el crecimiento y características morfocoloniales en el agar. Se seleccionó una de las colonias aisladas obtenidas y se realizó una tinción de

Gram para observar y comprobar que las características microscópicas, coincidían con lo reportado en la literatura y en trabajos previos.

9.3. Conservación de las cepas.

Se inoculó cada una de las cepas utilizadas en el trabajo en su medio correspondiente (MRS, luria y BHI; inciso 9.1.2.), por la técnica de estríado masivo con el fin de obtener el mayor crecimiento posible en la placa, dejando incubar durante un período de 24 horas a 28°C para la cepa P45 y a 37°C durante 24 horas para el resto. Posteriormente, se tomó la mayor cantidad posible de colonias de cada una de las placas y se colocaron en tubos con 4.5 mL de caldo MRS, luria y BHI, hasta observar turbidez. Se colocaron 500 µL del cultivo resultante en crioviales, adicionando 500µL de solución de glicerol al 50% (m/v), homogeneizando y conservando por ultracongelación a -70°C. La conservación de cada cepa se realizó por triplicado.

9.4. Cuantificación de la cepa probiótica

De uno de los crioviales mantenidos en ultracongelación se realizó la activación por triplicado de la cepa (inciso 9.1). A partir del crecimiento en el medio MRS se realizaron diluciones decimales seriadas en agua peptonada 0.1% (m/v) hasta 10⁻⁷. Se inoculó 100 µL de las diluciones 10⁻⁴ a 10⁻⁷, plaqueando por extensión superficial con perlas de vidrio en agar MRS. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 28°C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, se realizó el conteo de las placas, tomando como criterio de cuantificación aquellas que contenían entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC). La determinación se llevó a cabo por triplicado.

9.5. Cuantificación control de la resistencia a pH ácido y sales biliares a 5 y 24h

Para realizar la cuantificación de tolerancia a medio ácido y sales biliares, se utilizó un cultivo de la cepa probiótica con crecimiento de 24 horas. Se midió la DO en el espectrofotómetro Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech) y se ajustó la D.O._{600nm} a 0.2 para calcular el volumen a añadir a los medios ajustados a las siguientes

condiciones: a) 4.5 mL de caldo APT (Difco) pH 3.5 y b) 4.5 mL de caldo APT con 1% de sales biliares (OXOID). Después de realizar el inóculo, cada medio se incubó durante 5 horas simulando condiciones que los alimentos tardan en ser digeridos y a 24 horas para determinar el porcentaje de resistencia final. En ambos tiempos se efectuaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-7} , plaqueando únicamente 100 μ L de las diluciones 10^{-4} a 10^{-7} en agar APT e incubando a 28 °C durante 24 horas. Cada una de las determinaciones se realizó por triplicado y para el cálculo final se consideraron las placas que tuvieran entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias. El objetivo de esta determinación fue tener un control sobre el crecimiento de la cepa probiótica en un medio con todos los nutrientes necesarios para su crecimiento y determinar la resistencia y viabilidad de la cepa en la bebida final.

9.6. Evaluación de la resistencia y susceptibilidad a antibióticos mediante el sistema VITEK.

Con el fin de obtener el perfil de sensibilidad antimicrobiana de la cepa probiótica se realizó el ajuste de turbidez con el equipo Densicheck (BioMérieux) en la escala de McFarland entre 0.5 y 0.63 unidades de 3 mL de solución salina estéril en un tubo de ensaye de poliestireno, utilizando una placa con colonias de la cepa *L. mesenteroides* P45 de 24 horas de incubación.

Posteriormente la solución saturada con el microorganismo se colocó en el cassette del equipo así como la tarjeta de sensibilidad AST-GP67 (REF 22 226), registrándola a través del código de barras en el software del equipo y finalmente introduciendo dentro de la solución, el tubo de transferencia.

Una vez dentro del equipo, la tarjeta de sensibilidad fue llenada automáticamente con la solución microbiana, posteriormente sellada y finalmente se introdujo en el equipo VITEK para su lectura e incubación.

Transcurrido el tiempo de identificación del perfil de la cepa, se procedió a desechar tanto la tarjeta como el tubo de poliestireno así como registrar el perfil de resistencia y susceptibilidad a antibióticos, de tal manera que se pudieran interpretar de manera adecuada los resultados, agrupados en tres categorías distintas: perfil susceptible, intermedio o resistente.

La tarjeta utilizada para esta metodología contó con los siguientes antibióticos: Bencilpenicilina, ampicilina, ampicilina/sulfactam, gentamicina de nivel alto, estreptomicina de nivel alto, ciprofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, eritromicina, clindamicina, quinupristina/ dalfopristina, linezolid, vancomicina, tetraciclina y nitrofurantoína.

9.7. Evaluación control de la resistencia antimicrobiana contra microorganismos patógenos

9.7.1. Reactivación y preparación de la prueba

Se realizó la recuperación de la cepa probiótica de manera que se menciona en el punto 9.1. Posteriormente, utilizando el equipo Vortex (Thermolyne) se homogeneizó la muestra durante aproximadamente 15 segundos, procurando que se generara el vórtice al centro del tubo. Posteriormente se transfirieron 4 gotas de 3 μ L cada una de la muestra a zonas diferentes en placas con agar APT, para cada uno de los microorganismos contra los que se determinó la actividad antagónica.

9.7.2. Preparación de microorganismos

Se reactivó cada uno de los microorganismos mencionados en 9.1.2 en sus medios líquidos correspondientes, dejándolos en incubación durante 24 horas a 37 °C. Pasado el tiempo de activación, se recurrió a una segunda reactivación de los microorganismos con el fin de utilizar células completamente viables. El segundo período de activación se llevó a cabo bajo las mismas condiciones.

Pasado el tiempo de la segunda activación, se procedió a medir la turbidez de los medios con cada microorganismo patógeno correspondiente y llevando a cabo el ajuste a $DO_{600nm} = 0.2$, con el fin de obtener el volumen final de patógeno a adicionar en 9 mL de agar suave (caldo BHI o Luria, con 0.5% de agar bacteriológico DIBICO), el cual se encontraba previamente fundido y a una temperatura aproximada de 50 °C. Una vez obtenida la mezcla final de patógeno con medio semisólido, se procedió a homogeneizar la muestra durante 15 segundos, procurando en cada ocasión, generar el vórtice. Se realizó cada mezcla de la misma manera para los 9 microorganismos patógenos utilizados.

9.7.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Una vez realizada la mezcla de patógeno adecuadamente, se procedió a verterla en las placas obtenidas de manera que se menciona en el punto 9.7.1, procurando que el vertido se realizara en la parte media de la placa y generando su extensión hacia los alrededores de la misma, siguiendo el mismo procedimiento para todos los microorganismos. Una vez solidificado el agar, se realizó la incubación de las placas a 37 °C durante 24 horas y posterior al tiempo de incubación, se determinó cuantitativamente el efecto antagonista contra patógenos de la cepa probiótica P45, observando la presencia o ausencia de halos de inhibición, registrando su diámetro en mm.

9.8. Obtención de la muestra de aguamiel

Se trató un lote de aguamiel dividido en 3 lotes de aproximadamente 2L cada muestra, codificadas como A, B y C. Éstos se obtuvieron de la población de Huitzilac en el Estado de Morelos. Cada una de las muestras se colocó en recipientes estériles con un volumen aproximado de 500 mL cada uno y se transportaron al laboratorio 4 del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Posteriormente las muestras fueron filtradas para eliminar cualquier contaminación física que pudiera disminuir la calidad del aguamiel. Se realizó el tratamiento térmico de las muestras en autoclave bajo las siguientes condiciones: 110 °C durante 10 minutos, con el fin de evitar reacciones de Maillard y de reducir la carga microbiana inicial de las muestras que pudiera interferir con el análisis. Una vez listas las muestras, se transportaron en hielo al Cepario de la Facultad de Química, en donde se almacenaron bajo condiciones de refrigeración (10 °C) hasta el momento de su uso. Las muestras se obtuvieron de diferentes magueyes con el fin de homogeneizar todo el lote y eliminar los factores intrínsecos asociados a la planta y establecer como única variable de estudio, el uso de la cepa probiótica.

9.9. Fermentación del aguamiel con la cepa probiótica

9.9.1. Realización del pre-inóculo

Se activó la cepa probiótica de manera mencionada en 9.1.1. Posteriormente se realizó el ajuste de la $DO_{600\text{ nm}}$ a 0.2 y se realizó una cuenta en placa, determinando $\sim 10^8$ UFC/mL como el control inicial para inocular en un volumen total de 10 mL de aguamiel estéril. El ajuste final para realizar el inóculo se determinó al 10% (v/v) del volumen antes mencionado. Se incubó durante 24 h a 28 °C.

9.9.2. Volumen y condiciones de fermentación

De la solución saturada de aguamiel obtenida en el paso anterior, se midió la $DO_{600\text{ nm}}$ para determinar el crecimiento de la cepa. Posteriormente se determinaron 100 mL como volumen final de la bebida a fermentar, por lo que del pre-cultivo se añadió el 1% (v/v) al volumen total a fermentar. Se realizó la incubación de los matraces con aguamiel durante 24 h a 28°C. Al final del periodo de incubación de la bebida, se refrigeraron los matraces durante un período de tiempo de 14 días a una temperatura de 10 °C.

9.9.3. Medición de pH a diferentes tiempos de fermentación

Una vez inoculada la cepa probiótica en los volúmenes finales de aguamiel y finalizado el tiempo de fermentación de 24 horas a 28 °C, se tomaron 10 mL de cada una de las muestras y se midió el pH de la bebida con el uso del potenciómetro AE150 pH (Fisher Scientific). Los tiempos de medición establecidos fueron: 0 y 24 horas después de iniciada la fermentación, 7 y 14 días bajo condiciones de refrigeración, con el fin de determinar el pH final de la bebida. La medición se realizó por triplicado para cada lote y para todos los tiempos de fermentación mencionados anteriormente.

9.9.4. Evaluación de la resistencia a condiciones gastrointestinales en aguamiel

Se realizó la evaluación de la resistencia a pH ácido y sales biliares a diferentes tiempos de fermentación (0h y 24h), y bajo condiciones de refrigeración (7 y 14 días)

con el fin de dar seguimiento a los cambios fisicoquímicos y sensoriales que se presentaban durante la elaboración de la bebida.

De igual manera, se realizaron ensayos de actividad antimicrobiana para cada lote contra microorganismos utilizados como patógenos con el fin de determinar si la cepa mantenía la actividad antagonista. Los tiempos bajo los cuales se realizaron los ensayos se determinaron de la siguiente manera: fermentación durante 24 horas a 28 °C, 7 y 14 días bajo condiciones de refrigeración a 10°C.

Cada una de las determinaciones se llevó a cabo de manera que se menciona en los puntos 9.5 y 9.7 respectivamente, además se realizaron por triplicado para cada lote.

9.10. Cuantificación de azúcares presentes en aguamiel y productos de fermentación por HPLC

Se realizó la centrifugación de las muestras de aguamiel obtenidas después de 14 días de la fermentación, centrifugando 15 mL de cada uno de los lotes durante 5 minutos a 12000 rpm en una centrífuga Eppendorf 5410. Posteriormente, las muestras de aguamiel se filtraron a través de una membrana de 0.45µm y se separaron en una columna de ácidos Aminex C-18 (BioRad®). El análisis de HPLC se realizó en un equipo Waters (Millford, MA), el cual cuenta con una bomba cuaternaria 600E, inyector automático 717, índice de refracción 2410 y detector de arreglo de diodos 996.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando estándares previamente inyectados, de cada metabolito determinado (glucosa, fructosa, sacarosa). Como resultado, se obtuvo la curva patrón de cada estándar [concentración (g/L) vs altura], y utilizando los parámetros de correlación (R^2) se obtuvo la linealidad de los datos. Finalmente, los valores de altura de cada una de las muestras obtenidas de aguamiel, se ajustaron al intervalo de cada curva.

9.11. Evaluación sensorial: Perfil Flash

9.11.1. Preparación de las muestras

Se realizó el Perfil Flash en el día 13 de fermentación, de tres muestras de aguamiel previamente mantenidas durante ese período de tiempo bajo condiciones de refrigeración (10 °C), utilizando como cultivo iniciador de la fermentación la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* P45. Se colocaron 30 mL de cada una de las muestras en vasos de plástico del #0 codificados con 3 dígitos de números aleatorios. Las muestras se conservaron bajo condiciones de refrigeración a 10 °C hasta el momento de la evaluación. Se muestra en la Figura 5 un ejemplo de la presentación de muestras para su evaluación sensorial.

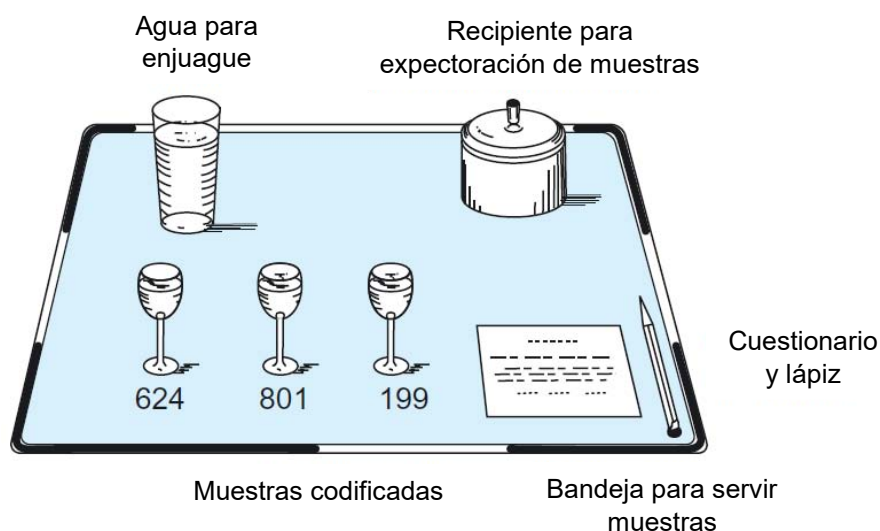


Figura 5.- Ejemplo de presentación de muestras para evaluación sensorial. Tomada de Stone *et al.*, 2012.

9.11.2. Generación de atributos

Se realizó una sesión a la que acudieron jueces entrenados en metodología descriptiva con el fin de generar los atributos de las tres muestras de aguamiel. Durante la sesión, a cada uno de los jueces, se le presentó una charola con las tres muestras de aguamiel, así como un vaso de agua potable, servilletas y una galleta, con el fin de no saturar a los gustos de los jueces. De cada una de las muestras se le pidió a los jueces que señalaran todos los atributos que eran capaces de percibir,

con el fin de agruparlos en las siguientes categorías: aspecto, color, sabor, textura y otras características perceptibles.

Posteriormente en una reunión grupal se revisaron los atributos generados por el grupo de jueces y se seleccionaron aquellos que consideraron importantes de ser evaluados.

9.11.3. Elaboración de cuestionarios

Una vez definidos los atributos a evaluar para las muestras de aguamiel se procedió a realizar el diseño de los cuestionarios mediante el uso del software estadístico FIZZ versión 2.3 por Byosystemes. Se utilizó una escala estructurada de 10 puntos como se muestra en la Figura 6, en la cual, el punto 0 indica la ausencia del atributo y 10 la intensidad más alta.



Figura 6. Escala utilizada para la descripción de la intensidad de atributos

9.11.4. Evaluación sensorial de las muestras

Se evaluó sensorialmente tres muestras de aguamiel con ayuda de un panel conformado por 23 jueces, de los cuales 16 eran mujeres y 7 hombres, con un rango de edad entre 20 y 38 años. Las muestras se prepararon de manera que se menciona en el punto 9.10.1 de este apartado. La evaluación se realizó bajo condiciones controladas de la siguiente manera: bajo luz blanca, en mamparas blancas con una charola que contenía las tres muestras previamente codificadas, servilletas y un vaso con agua purificada, así como computadoras en las que se cargaba automáticamente el cuestionario previamente diseñado, mediante el empleo de la técnica de Perfil Flash. La evaluación sensorial de las muestras se llevó a cabo en el anexo del laboratorio de Evaluación Sensorial del Departamento

de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM en el día 13 de la elaboración de la bebida.

9.11.5. Análisis estadístico

Para el desarrollo de la metodología sensorial final, se utilizó el software electrónico FIZZ (2.3) módulo Acquisition (BYOSISTEMES, 2007, Courtenon, France). El análisis de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante el software estadístico XLSTAT versión 10.0 (2012, Addinsoft) mediante el Análisis de Procrustes Generalizado (PGA por sus siglas en inglés). En este análisis se procesan los datos originales mediante una transformación de la matriz de los resultados de cada juez resolviendo las diferencias producidas por el efecto de escala, el efecto de interpretación y el efecto de magnitud, con la restricción de conservar las proporciones entre los productos para cada juez, es decir el análisis Procrustes fuerza a cada una de las matrices formadas por cada uno de los individuos a formar un solo consenso espacial (Dijksterhuis, 1996; Lawless y Heymann, 1998).

Una vez que se tiene una matriz consenso, los promedios grupales espaciales de todos los jueces por muestras, se les realiza un Análisis de Componentes Principales (ACP), por el cual podemos obtener un porcentaje que expliquen la varianza de estas dimensiones (Dijksterhuis, 1996).

10.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1. Recuperación y tinción de Gram de la cepa probiótica

Para la evaluación de la pureza de cada cepa utilizada, se observó la morfología de las colonias en sus respectivos medios de cultivo y de una colonia aislada de cada placa, se realizó tinción de Gram, observando los resultados en la Figura 7 para la cepa probiótica y en la Tabla 2 para el resto de los microorganismos.

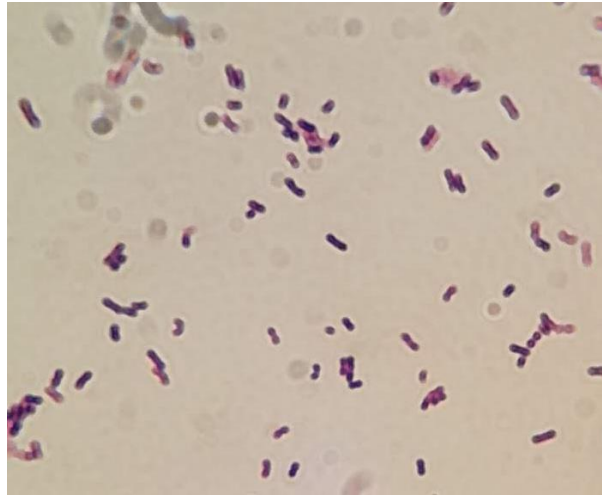


Figura 7.- Morfología y Gram de *L. mesenteroides* P45 desarrollada en caldo APT, incubada a 28 °C por 24 horas. Aumento total: 1000 X (diplococos, Gram positivos).

La observación macroscópica de colonias bacterianas condujo a la selección de colonias grandes y blancas, semitransparentes de 0.5 – 1.5 mm de ancho que tenían una forma lenticular en agar MRS (Cervantes *et al.*, 2008; Benmechernene *et al.*, 2014). Las cepas de *Leuconostoc* son bacterias Gram positivas y las células generalmente son cocos ovoides, que a menudo forman cadenas durante el crecimiento exponencial (Pujato *et al.*, 2015), son inmóviles, no forman esporas, anaerobias facultativas con características mesofílicas, con un crecimiento óptimo entre 20 y 30 °C (de Paula *et al.*, 2014).

Sánchez-Marroquín (1953), caracterizó microbiológicamente muestras de aguamiel, sin embargo, no fue hasta el 2007 cuando Lozano reportó en una muestra de aguamiel y al inicio de la fermentación, la presencia de *L. mesenteroides* como cocos Gram positivos de diferentes tamaños, asociados en cadenas, sin embargo,

las características morfológicas de este estudio concuerdan con lo reportado por Campos (2010), y Arenas (2015), quienes indican que la morfología de la cepa *L. mesenteroides* se presenta microscópicamente como diplococos Gram positivos y macroscópicamente con colonias redondas medianas, brillantes y con borde liso, respectivamente.

Tabla 2. Características morfocoloniales y microscópicas de cepas utilizadas como patógenos.

Cepa	Morfología microscópica	Características morfocoloniales	Cepa	Morfología microscópica	Características morfocoloniales
<i>B. cereus</i> CFQ-B-230	Bacilos Gram +	Colonias grandes, secas, sin bordes definidos.	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Bacilos Gram -	Colonias grandes, redondas, secas.
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Bacilos Gram +	Colonias planas, secas, con bordes irregulares.	<i>S. aureus</i> 6538	Cocos Gram +	Colonias circulares, convexas, blancas.
<i>E. coli</i> 11229	Bacilos Gram -	Colonias pequeñas circulares, redondas y convexas.	<i>S. pyogenes</i> CFQ-B-218	Cocos Gram + en estreptococos	Colonias pequeñas, redondas, de bordes definidos.
<i>E. faecalis</i> QB	Cocos Gram +	Colonias pequeñas puntiformes, redondas.	<i>S. enterica</i> serovar. Typhimurium ATCC 14028	Bacilos Gram -	Colonias medianas, redondas de bordes redondos.
<i>L. monocytogenes</i> CFQ-B-103	Bacilos Gram +	Colonias pequeñas, puntiformes.			

Para el resto de las cepas utilizadas en el estudio, se muestra en la Tabla 2, las características macroscópicas observadas por la presencia de colonias aisladas en sus respectivos medios de cultivo, así como las características microscópicas

observadas después de haber realizado tinción de Gram y corroborado la pureza de las mismas.

10.2. Cuantificación de la cepa probiótica

La cuenta de las células viables de la cepa P45 cuando se encuentra en medio APT, apropiado y que cumple con todos sus requerimientos nutrimentales, resultó de 28×10^8 UFC/mL (100%) después de haberse incubado por 24 horas a 28 °C. La cuantificación posterior al ajuste de la $DO_{600nm} = 0.2$ mostró el descenso de una unidad logarítmica en la cuenta de células de la cepa P45, obteniendo como resultado 30×10^7 UFC/mL (89.3%), bajo las mismas condiciones de incubación. Las cuentas se realizaron con el fin de tener una referencia sobre el crecimiento del microorganismo y poder realizar la comparación sobre su capacidad de crecimiento, así como la posible viabilidad que pudiera tener la cepa en la bebida final. Para cada valor de cuantificación mostrado, se presenta el resultado promedio de tres determinaciones para cada condición. El porcentaje de recuperación mostrado indica el número de células viables que se encontraron posterior al ajuste de la DO_{600nm} .

10.3. Obtención del perfil de resistencia y susceptibilidad a antibióticos mediante el sistema VITEK.

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en un importante problema de salud pública y atrae el interés de los profesionales de la salud y la investigación de todo el mundo. La principal preocupación es el aumento de la resistencia a los antibióticos y la posible propagación de los genes de resistencia a las bacterias patógenas (Sharma *et al.*, 2014). Los alimentos fermentados actúan como reservorios de numerosas bacterias viables, incluidas las bacterias resistentes a los antibióticos, que pueden transferirse al intestino a través del consumo de alimentos (Jeong y Lee, 2015).

Con base en lo anterior, en este trabajo, la cepa P45 de *Leuconostoc mesenteroides* fue evaluada por primera vez respecto al perfil de resistencia y susceptibilidad a antibióticos. A partir del estudio realizado mediante el sistema VITEK, se muestra

en la Tabla 4 los resultados del perfil obtenido para la cepa probiótica (los resultados completos de la tarjeta de antibióticos utilizada se muestran en el Anexo 4). Se observa, que el microorganismo es resistente a los antibióticos clindamicina, vancomicina y nitrofurantoína. Sharma *et al.* (2014) muestran resultados similares por parte de cepas de *Leuconostoc* sp. y *Pediococcus* sp. las cuales presentaron resistencia intrínseca a la vancomicina.

Se utilizó una tarjeta con pruebas de susceptibilidad antimicrobiana AST-GP67, la cual muestra un perfil fenotípico de sensibilidad o resistencia bacteriana. La cualidad de la tarjeta utilizada es que dentro de la variedad de organismos especificados para su uso se mencionan estreptococos, estafilococos y enterococos. Sin embargo, debido a la falta de adición de nuevos fenotipos a la base de datos AES (sistema Experto Avanzado), permitió únicamente la selección de una cepa de *Enterococcus* spp., por lo que pruebas más específicas para la cepa utilizada son necesarias.

de Paula *et al.* (2014), establecen que la resistencia intrínseca a vancomicina por parte de *Leuconostoc* spp., es debida a las características particulares de su pared celular, que presenta D-lactato en lugar de una D-alanina en la capa de peptidoglicano; sin embargo, la resistencia a los antibióticos de *L. mesenteroides* parece ser dependiente de la cepa y está relacionada con el entorno en el que se aisló la cepa. Por otra parte, la resistencia a la vancomicina es de gran preocupación porque la vancomicina es un antibiótico de amplio espectro contra las infecciones clínicas causadas por patógenos resistentes a múltiples fármacos. Los cultivos que muestran resistencia a este antibiótico generalmente son peligrosas porque pueden causar la propagación de cultivos patógenos resistentes a los medicamentos que causan enfermedades incurables; sin embargo, algunos autores (de Paula *et al.*, 2014) consideran que la resistencia a los antibióticos específicos puede ser deseable, como en los tratamientos que involucran diarrea inducida por antibióticos.

Por otra parte, puede observarse en la Tabla 4, que la cepa resultó ser susceptible a los antibióticos bencilpenicilina, eritromicina, moxifloxacino, levofloxacino, estreptomina y gentamicina de nivel alto (sinergia), ampicilina/ sulfactam y

ampicilina. Una cepa de *L. mesenteroides* probada por Jeong y Lee (2015) arrojó resultados similares en el estudio, indicando que la cepa resultó ser sensible a los antibióticos ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, penicilina G y tetraciclina, pero resistente a la estreptomina.

Para el resto de los antibióticos probados (ciprofloxacino, tetraciclina y linezolid), el resultado mostrado por el sistema VITEK indico una respuesta “intermedia”, lo cual podría significar que una mayor concentración del antibiótico probado es capaz de inhibir completamente su crecimiento.

Tabla 3.- Perfil de resistencia y susceptibilidad a antibióticos obtenidos con el sistema Vitek 2.

Antibiótico	Interpretación	Antibiótico	Interpretación
Bencilpenicilina	S	Eritromicina	S
Ampicilina	S	Clindamicina	R
Ampicilina/Sulfactam	S	Quinupristina/Dalfopristina	S
Gentamicina de nivel alto (sinergia)	S	Linezolid	I
Estreptomina de nivel alto (sinergia)	S	Vancomicina	R
Ciprofloxacino	I	Tetraciclina	I
Levofloxacino	S	Nitrofurantoína	R
Moxifloxacino	S		

*S= respuesta susceptible; *R= respuesta resistente; *I= respuesta intermedia

El fenotipo resistente a la vancomicina de algunos *Lactobacillus* es quizás la resistencia intrínseca mejor caracterizada en las BAL. Varias especies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* son intrínsecamente resistentes a la vancomicina debido a la sustitución del residuo terminal de D-alanina por D-lactato o D-serina en el muramipentapéptido, lo que impide la unión a la vancomicina. Esta

resistencia está codificada cromosómicamente y no es inducible ni transferible (Fraqueza, 2015).

Para evitar la transferencia indeseable de resistencia a bacterias endógenas, el probiótico no debe llevar resistencia distinta a la requerida. Por lo tanto, la resistencia a los antibióticos como tal no es un problema de seguridad; solo se convierte en una amenaza cuando la resistencia es transferible. Sin embargo, siempre existe la posibilidad de que el consumo de probióticos pueda causar infección ante condiciones médicas anormales y/o en personas inmunocomprometidas, además de que las personas pueden responder de diferentes maneras a una cepa específica. Entonces, las industrias alimentarias necesitan evaluar cuidadosamente la seguridad y eficacia de todas las nuevas especies y cepas de probióticos antes de incorporarlas a los productos alimenticios (Sharma *et al.*, 2014).

El papel de MFC (cultivos microbianos de alimentos) en la propagación de la resistencia a los antibióticos se ha evaluado en alimentos fermentados, así como más específicamente para productos alimenticios probióticos. Los resultados de dichos estudios confirman el papel de un reservorio de genes de resistencia a los antibióticos de la microbiota de los alimentos, sin identificar ningún problema de salud importante hasta la fecha (Bourdichon *et al.*, 2012).

10.4. Fermentación de aguamiel

Una vez realizado el inóculo en las muestras de aguamiel, se procedió a determinar los tiempos bajo los cuales se establecería un patrón de crecimiento en la bebida funcional. Los tiempos establecidos fueron: Inicial (0 horas), 24 horas, 7 y 14 días, en los que se realizarían las mediciones de parámetros fisicoquímicos (pH) así como evaluación del crecimiento o viabilidad del probiótico.

En la Figura 8 se muestra la cuenta de células viables (Log_{10} UFC/mL) correspondiente a cada lote, así como la disminución del pH registrada para cada una de las muestras. Para cada determinación se muestra el promedio de tres

determinaciones independientes (Ver Anexo 1) y se presentan los resultados del crecimiento a distintos tiempos de fermentación de la cepa en la bebida.

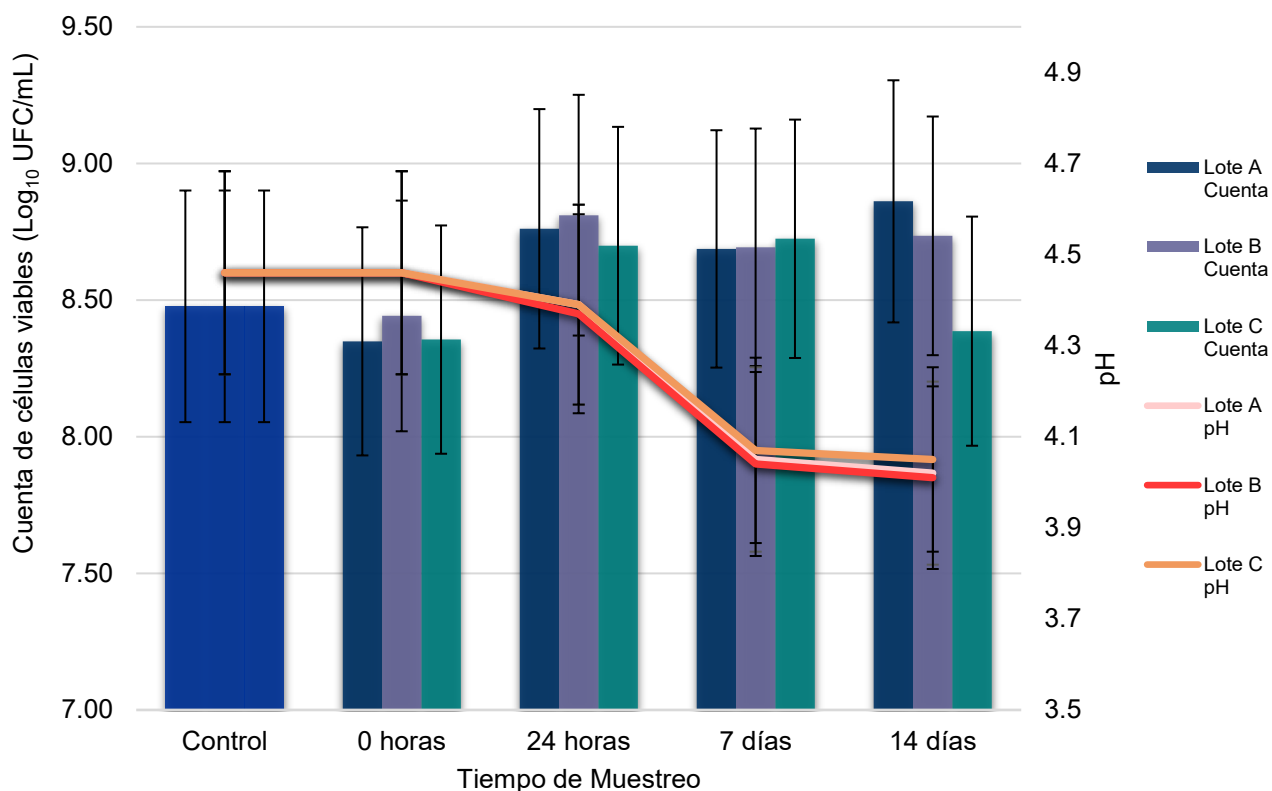


Figura 8. Determinación de la viabilidad de *L. mesenteroides* P45 a distintos tiempos de fermentación y registro de la disminución de pH en aguamiel. Control en medio APT.

De manera que se menciona en el apartado 10.2 de este capítulo, el control que se observa en la Figura 8 corresponde a la cuenta de la cepa probiótica en medio APT. Para el resto de la gráfica se muestra la cuenta de las células (Log₁₀ UFC/mL) después de haber realizado el inóculo para la obtención de un volumen final de 100 mL de aguamiel.

Se observa una disminución en la cuenta correspondiente a los tres lotes posterior a la dilución de la cepa (tiempo de fermentación 0 horas), sin embargo se observa que la cuenta del lote B (8.44 Log₁₀ UFC/mL) no es tan reducida en comparación con los lotes A y C (8.35 y 8.36 Log₁₀ UFC/mL respectivamente), los cuales se ven afectados debido al efecto de la homogeneización y distribución de la cepa en el aguamiel.

Para los tiempos de fermentación 24 horas y 7 días bajo condiciones de refrigeración, se observa un patrón de mantenimiento de la viabilidad de la cepa en los tres lotes con pequeñas variaciones (de 8.70 a 8.81 Log₁₀ UFC/mL) entre ellos al primer tiempo, mientras que para el segundo tiempo (7 días), se observa una ligera disminución en la cuenta de las células (de 8.69 a 8.72 Log₁₀ UFC/mL), probablemente por el efecto de la refrigeración sobre el crecimiento del microorganismo. Cabe destacar que para el lote C, en el tiempo de fermentación de 24 horas, la cuenta de las células viables (Ver Anexo 1) resulta ser menor en comparación con los otros dos lotes. Según VidyaLaxme *et al.* (2014), algunos de los factores que afectan considerablemente el rendimiento general de la fermentación, son la composición del sustrato y los requerimientos nutricionales de la cepa, además el crecimiento microbiano también depende de factores ambientales como el pH, la temperatura y la acumulación de productos metabólicos.

Finalmente, para el último tiempo de estudio establecido (14 días) se registra un aumento en la cuenta de las células viables de la cepa probiótica tanto en los lotes A y B (8.86 y 8.74 Log₁₀ UFC/mL), respecto al tiempo de estudio (7 días) así como con la cuenta control en el medio ideal para el microorganismo, ya que el desarrollo en el aguamiel bajo condiciones de refrigeración, no solo asegura su viabilidad, sino también el crecimiento de la cepa.

Respecto al lote C, se observa una disminución de la cuenta de viables (8.39 Log₁₀ UFC/mL), probablemente por el efecto de la temperatura sobre la cepa P45, ya que se sabe que las bajas temperaturas retrasan el crecimiento de microorganismos (Iglesias *et al.*, 2017). Además Sánchez y Corrales (2005), mencionan que las bajas temperaturas tienen efectos sobre la fluidez de la membrana celular, provocando la detención de procesos de transporte e intercambio de protones.

Con las determinaciones realizadas, uno de los principales objetivos fue determinar el efecto de la refrigeración y posible estabilidad de la cepa P45 en la bebida sobre algunas características sensoriales y fisicoquímicas del aguamiel.

Las BAL utilizadas como cultivos iniciadores están expuestas a muchos factores adversos (factores de estrés) durante su preparación y almacenamiento, así como durante la fabricación del producto fermentado. Los factores de estrés son diversos e incluyen variación de pH (acidez o alcalinidad), temperatura (calor y frío), cambios oxidativos y osmóticos entre otros. Las BAL han desarrollado sofisticados mecanismos de defensa contra los factores de estrés, lo que les permite sobrevivir en condiciones de crecimiento adversas y/o cambios ambientales repentinos. Algunos de los genes inducidos por estrés parecen ser genuinamente específicos, mientras que otros son inducidos por una amplia variedad de factores de estrés y, por lo tanto, se piensa que son genes de respuesta al estrés general (resistencia cruzada; D'Angelo *et al.*, 2017).

Se ha establecido que para algunos efectos positivos sobre la salud humana, una cepa probiótica debe llegar al intestino grueso a una concentración de aproximadamente 10^7 células viables/g. El requisito básico para los probióticos es que los productos deben contener suficientes cantidades de microorganismos hasta la fecha de caducidad (Sharma *et al.*, 2014); sin embargo Iglesias *et al.* (2017), señalan que la concentración mínima de probióticos con efecto en la salud humana tiene un rango que va de 10^6 UFC/mL a 10^9 UFC/mL; asimismo la FAO/OMS ha establecido la concentración de hasta 10^6 UFC/g para ser considerada como probiótico, estableciendo la viabilidad de los mismos en el almacenamiento durante 14 días.

En este sentido, el crecimiento y mantenimiento de la viabilidad de la cepa probiótica durante el tiempo establecido por la FAO/OMS bajo condiciones de refrigeración (10°C), permite la obtención de la bebida a base de aguamiel con propiedades sensoriales y características adecuadas para su estudio, consumo y comercialización, así como el cumplimiento de normas internacionales respecto al estudio y diseño de alimentos funcionales probióticos.

Por otra parte en la Figura 8, se presenta de manera adjunta, el registro del descenso del pH del aguamiel gracias al metabolismo de la cepa P45, respecto al

tiempo de fermentación, observando que desde el inicio del estudio, el valor muestra un pH cercano a 4.40, el cual se muestra bajo desde el inicio posiblemente a actividad microbiana que pudo haberse llevado a cabo durante los tiempos de transporte de las muestras de aguamiel hasta el lugar en donde se llevó a cabo el estudio. Tanto para el tiempo inicial, como para el tiempo 0 horas, se registra el mantenimiento del pH en ambos casos, ya que únicamente se realizó la adición del microorganismo al aguamiel. Sin embargo, para el tiempo 24 horas, se registra un descenso drástico del pH del aguamiel, debido a que las condiciones de incubación permitieron el adecuado desarrollo de la cepa en la bebida, por lo que el pH del medio de cultivo decrece debido a que el microorganismo produce ácido láctico al fermentar la sacarosa presente en el sustrato (Durán, 1990).

Respecto a los dos tiempos siguientes de la determinación del pH (7 y 14 días) se registra una ligera disminución del pH del aguamiel para los tres lotes muestreados. La reducción mínima en los tiempos de fermentación mencionados, de las muestras almacenadas en condiciones de refrigeración se atribuyó a la baja actividad metabólica del probiótico y, por lo tanto, a la baja producción de ácido (Gupta y Bajaj, 2017), ya que la viabilidad de las bacterias probióticas podría verse significativamente influenciada por el pH del medio, los compuestos inhibidores y el tipo de cepa probiótica (Nematollahi *et al.*, 2016).

Aunque el medio de aguamiel tenía un valor inicial bajo de pH 4.40, como resultado del proceso de inoculación y posible actividad microbiana, pues las muestras permanecieron un tiempo a temperatura ambiente, apta para el desarrollo microbiano, *L. mesenteroides* podría crecer bien en el medio, con un aumento en la cuenta de viabilidad de las células (Hans *et al.*, 2014).

10.5. Evaluación de la resistencia a pH ácido y sales biliares

Con el fin de asegurar su potencial benéfico en el huésped, los microorganismos probióticos deben cumplir ciertas características. En este aspecto, son importantes el pH derivado del proceso de fermentación, el oxígeno disuelto, el antagonismo entre especies, la composición química del medio de cultivo, la concentración de

azúcares, las prácticas de inoculación del cultivo probiótico, la temperatura y duración de la fermentación, así como las condiciones de almacenamiento del producto (Bolla, 2011). Para garantizar la sobrevivencia de las bacterias ácido lácticas a las condiciones existentes en el tracto gastrointestinal de los humanos, es necesario probar su estabilidad a pH ácido y sales biliares (García, 2010; Giles *et al.*, 2016).

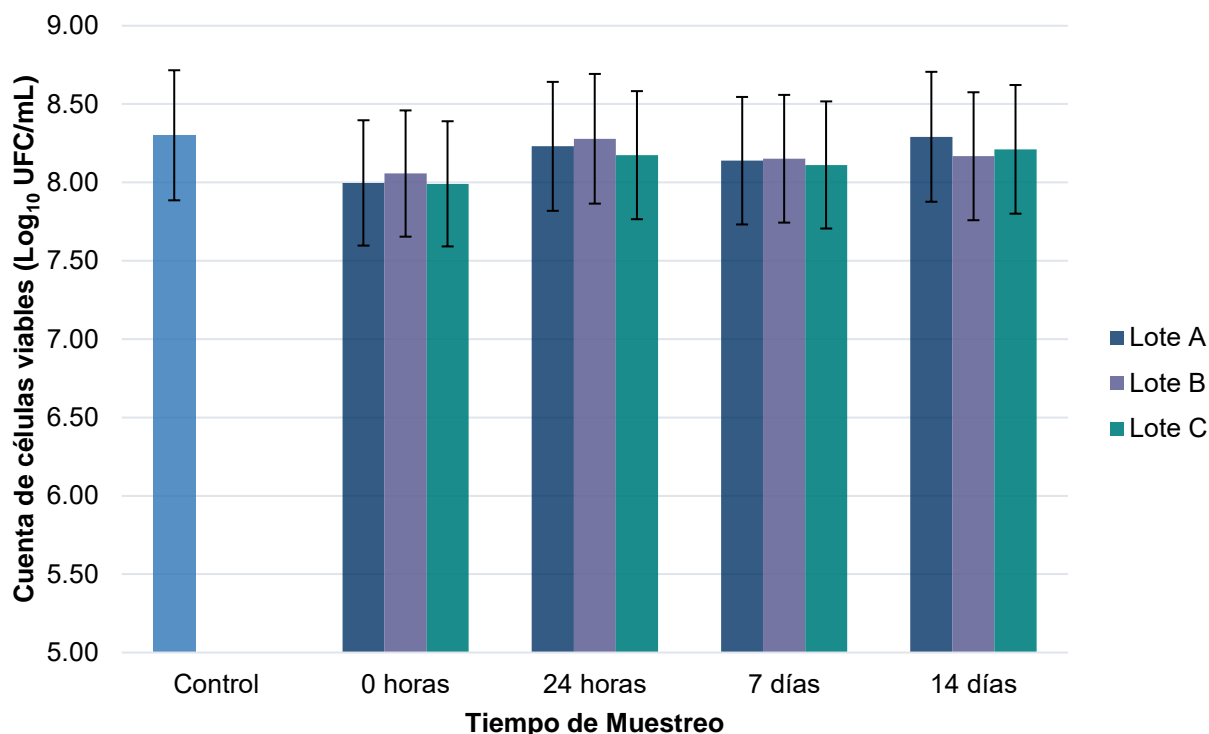


Figura 9. Cuantificación de células viables bajo estrés ambiental (pH 3.5) por 5 horas en APT (control) y Aguamiel (0 y 24 horas, y 7 y 14 días)

En el estudio reportado por Giles *et al.*, (2016), se muestra una ligera disminución de la sobrevivencia de la cepa P45 ante la condición de acidez (pH 2.5), registrando un porcentaje de recuperación de la cepa de 74.98%. Se muestra en la Figura 9 la evaluación cuantitativa realizada para la cepa probiótica ante condiciones de estrés ambiental bajo un pH ácido (3.5), mostrando como cuenta control de supervivencia el reto elaborado en el medio ideal para bacterias ácido lácticas (APT) de 8.30 Log₁₀ UFC/mL, registrando que la viabilidad de la cepa se mantiene aún después de encontrarse ante tales condiciones por un período de tiempo de 5 horas, es decir, el tiempo después del cual ocurre la digestión de los alimentos.

En comparación con estudios previos al realizado, Campos (2010) y Matus (2011), reportan una evaluación cualitativa de la cepa P45 ante dichas condiciones, mostrando que la cepa mantiene su viabilidad aún después de haber sido incubada bajo dicho estrés ambiental, de igual manera, en el presente estudio, se corrobora la presencia de células viables después del tiempo de incubación ante dicha condición gastrointestinal.

Por otra parte, para la evaluación de la resistencia de la cepa P45 inoculada en aguamiel, ante pH ácido (3.5) durante 5 horas, se muestran ligeras diferencias entre lotes para cada uno de los tiempos de evaluación establecidos (0 y 24 horas, y 7 y 14 días; se muestran los datos de las determinaciones en el Anexo 2). Es importante mencionar que antes de llegar al tracto gastrointestinal, las bacterias probióticas deben pasar por el estómago, donde el pH puede ser tan bajo como 1.5 – 2.0 (Patel *et al.*, 2014), además este entorno intestinal, desempeña un papel clave en la determinación del resultado de la competencia interespecie (Markowiak y Slizewska, 2017).

Al realizar la comparación de la cuenta de células viables reportadas en el medio utilizado como control respecto a los distintos tiempos de fermentación, se observa la disminución de la cuenta de las células de cepa probiótica para el tiempo inicial de 0 horas (entre 7.99 y 8.06 Log₁₀ UFC/mL), sin embargo la resistencia de la cepa ante la incubación de dicho reto de acidez (pH 3.5), aumenta respecto al tiempo de fermentación, ya que para la evaluación llevada a las 24 horas, se observa un ligero aumento de la resistencia o viabilidad de la cepa con un rango entre 8.17 y 8.28 Log₁₀ UFC/mL; mientras que para el caso de la evaluación llevada a cabo a los 7 días de la fermentación bajo condiciones de refrigeración, hay de nuevo una ligera disminución de la resistencia de la cepa (8.14, 8.15 y 8.11 Log₁₀ UFC/mL para cada lote respectivamente), ya que además de llevar a cabo la fermentación del aguamiel a una baja temperatura, otro factor importante que afecta la supervivencia de las cepas bacterianas probióticas es el pH; la supervivencia está limitada a valores bajos de pH (Sathyabama *et al.*, 2014).

Cabe destacar que para el último tiempo de la evaluación a la acidez, únicamente se mantiene la viabilidad de la cepa ante tal condición, ya que durante la fermentación del aguamiel se lleva a cabo la producción de ácidos orgánicos que modifican la composición original de la muestra y que, tomando como complemento la Figura 8, el menor pH se registra después de 14 días de fermentación, por lo cual, la cepa se encuentra expuesta a un ambiente ácido en el aguamiel, por lo tanto el microorganismo podría haber modificado su metabolismo de manera que le resulte adecuada la adaptación ante tal descenso de pH.

Para el caso del reto de resistencia a pH ácido durante un prolongado tiempo de exposición, la enumeración microbiana utilizando medios selectivos para BAL mostró una dinámica estable durante todo el período de almacenamiento con pequeñas variaciones entre lotes (Porcellato *et al.*, 2015). Además, al inocular la cepa en agar sin acidez ni sales biliares después de la exposición a estas condiciones, se simula el desarrollo de la cepa en la mucosa intestinal con el fin de colonizarla, además de determinar su nivel de recuperación posterior a la exposición a ambas condiciones (Arenas, 2015).

Se muestra en la Figura 10 el perfil de resistencia en la cuenta de células viables respecto al tiempo de fermentación de aguamiel, así como la cuantificación en medio APT utilizada como control de supervivencia. Los datos de las determinaciones se muestran en el Anexo 2.

Se observa en la Figura 10 la reducción en la viabilidad de la cepa a distintos tiempos de fermentación del aguamiel y bajo condiciones de refrigeración, respecto a la cuenta obtenida en el medio utilizado como control, lo cual podría indicar que la cepa P45 pudo encontrarse en un estado de sensibilidad ante ambas condiciones (baja temperatura y tiempo prolongado de exposición a pH ácido), lo cual, modifica el medio ideal de desarrollo y crecimiento de los microorganismos, bajo el cual las células se encuentran integras.

De manera similar que se presenta en el caso anterior, la diferencia que se observó en la cuenta de las células para cada uno de los lotes es mínima, a los tiempos de

fermentación 0 horas (8.17 Log₁₀ UFC/mL en promedio) y 24 horas (promedio de los tres lotes 8.28 Log₁₀ UFC/mL), así como para la evaluación llevada a cabo a los 7 días (8.26 Log₁₀ UFC/mL en promedio de los tres lotes). Sin embargo, para la determinación llevada a cabo a los 14 días de fermentación del aguamiel, se presenta la mayor disminución (1 unidad logarítmica, 7.26 Log₁₀ UFC/mL en promedio para los tres lotes) respecto a los tiempos antes mencionados, así como para la cuenta de células utilizada como control.

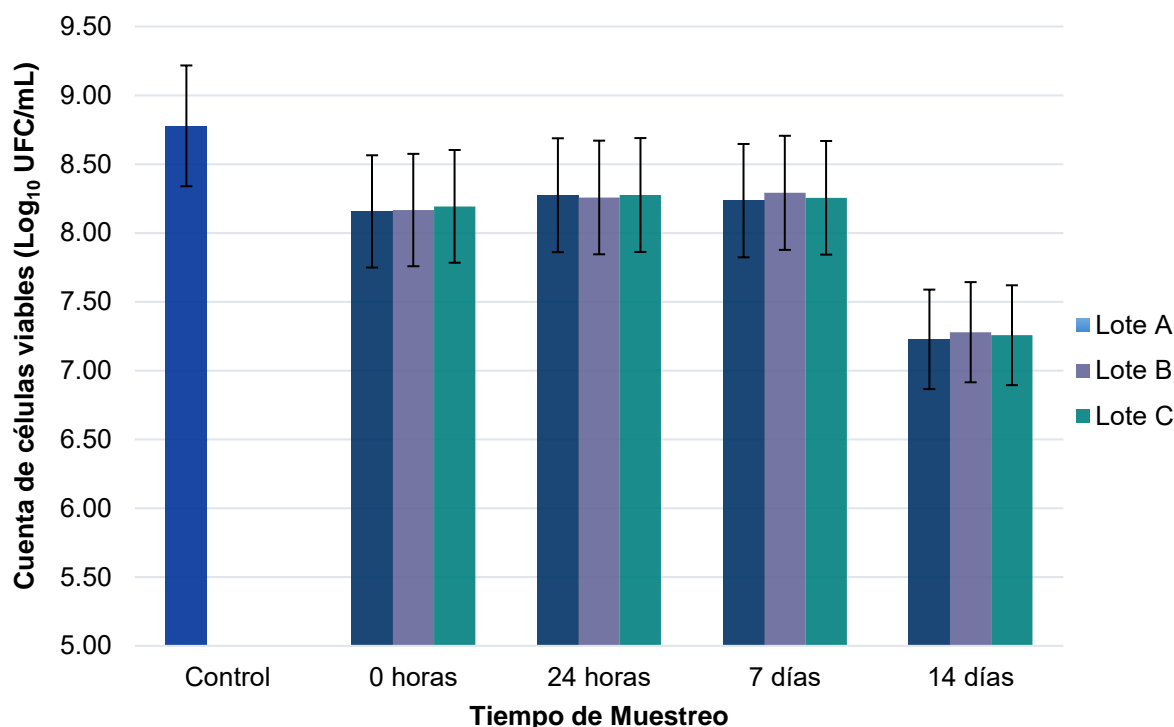


Figura 10.- Cuantificación de células viables bajo estrés ambiental (pH 3.5) durante 24 horas en APT (control) y aguamiel (0 y 24 horas, y 7 y 14 días)

En 2008, Shobha y Agrawal, realizaron un estudio con una cepa de *L. mesenteroides*, que se ocupa de la importancia del papel de los ácidos grasos de la membrana celular en respuesta a la reducción del pH, encontrándose un aumento de ácidos grasos insaturados tales como ácido palmitoléico, oléico, linoico y linolénico a pH 3.0 que fueron mayores en comparación con el mismo cultivo inoculado a pH 6.5. Teniendo como información precedente lo mencionado anteriormente, en este estudio se presentan resultados que podrían implicar un cambio en los ácidos grasos de la membrana celular de la cepa probiótica, lo que

permitiría una mayor resistencia ante condiciones ambientales adversas por parte de la cepa probiótica, manteniendo la integridad de las células durante un mayor período de tiempo de fermentación, así como ante condiciones gastrointestinales ante las que se enfrentan cuando son consumidas.

Wang *et al.* (2018), mencionan algunos de los mecanismos de resistencia a ambientes ácidos descritos para BAL, los cuales incluyen el sistema arginina deshidrolasa, a partir del cual, los microorganismos producen sustancias alcalinas tales como la urea, arginina y amoníaco, que neutralizan los ácidos. Además, reportan que una variedad de BAL que incluyen a *Oenococcus oeni* y miembros de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, son capaces de llevar a cabo la fermentación maloláctica, en la cual se lleva a cabo la descarboxilación del L-malato, con la consecuente producción de L-lactato y dióxido de carbono, el cual se libera en el proceso y neutraliza los protones, disminuyendo su concentración en el medio. Otro mecanismo asociado con el agotamiento de protones es la reacción de descarboxilación-antiportador de aminoácidos. Puede mantener la homeostasis del pH intracelular en una reacción de descarboxilación al consumir protones. Por ejemplo, la glutamato descarboxilasa (GAD) puede catalizar la conversión de glutamato en γ -aminobutirato (GABA), y resulta en la elevación del pH intracelular.

Respecto a la determinación de la resistencia a elevadas concentraciones de sales biliares (1%), se observa en la Figura 11 la cuenta de células viables para los tiempos de fermentación establecidos, así como la cuenta control en medio APT. Los datos de tres repeticiones independientes para cada lote a diferente tiempo de fermentación muestreado se muestran en el Anexo 3.

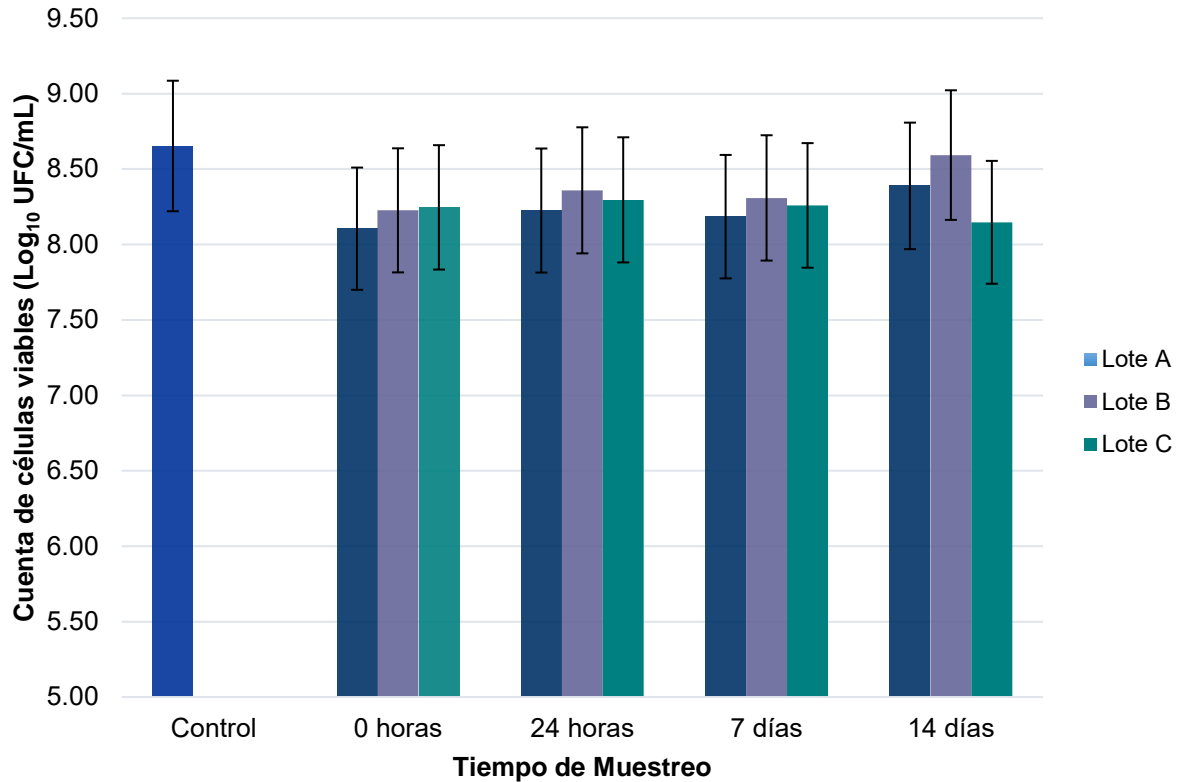


Figura 11. Evaluación de la resistencia a altas concentraciones de sales biliares (1%) por 5 horas en APT (control) y aguamiel.

Se observa en la Figura 11 una disminución en la resistencia de la cepa ante la elevada condición de sales biliares para todos los tiempos de fermentación establecidos, para el tiempo de fermentación 0 horas se registra la viabilidad del microorganismo entre 8.10 y 8.25 Log₁₀ UFC/mL, aunque entre lotes se observan pequeñas diferencias entre la cuenta de células registradas; para el caso del tiempo de fermentación 24 horas se registra un número de células viables con un rango entre 8.23 y 8.36 Log₁₀ UFC/mL. Para los tiempos 7 y 14 días de muestreo, se registraron en promedio 8.25 y 8.38 Log₁₀ UFC/mL respectivamente. En comparación con la cuenta control realizado en medio APT (8.85 Log₁₀ UFC/mL), ésta se muestra un poco más elevada, ya que es el medio ideal para el desarrollo de BAL.

Campos (2010), realizó la evaluación cualitativa de la cepa P45 ante condiciones de estrés ambiental, demostrando la posible capacidad probiótica de la cepa. En el presente estudio, se demuestra cuantitativamente el mantenimiento de la viabilidad

de la cepa P45 ante una elevada concentración de sales biliares durante un período de incubación de 5 horas para los tres lotes de aguamiel muestreados, observando un patrón de resistencia de la viabilidad de la cepa ante tales condiciones a los tiempos establecidos de muestreo.

Es importante recalcar que la resistencia de las cepas a las sales biliares es una característica deseable, ya que la función principal de las sales biliares es actuar como detergentes biológicos que emulsifican y solubilizan grasas. Además de que por su naturaleza también pueden emulsificar y solubilizar los fosfolípidos y algunas proteínas de la membrana celular, desequilibrando la homeostasis celular de las bacterias, confiriéndole así un gran potencial antimicrobiano (Matus, 2011).

Se sabe que la bilis se produce en el hígado, se concentra en la vesícula biliar y se libera en el duodeno, donde ayuda a la digestión de las grasas al emulsionar y solubilizar los lípidos. El nivel de concentración fisiológica de la bilis humana varía y depende de la raza, condiciones fisiológicas y el género. Además la bilis es una sustancia antimicrobiana, que se compone de ácidos biliares, colesterol y fosfolípidos. Las cepas probióticas con alta tolerancia (>0.3%) a la bilis se desarrollan mejor en el intestino delgado superior que se tensan con una baja tolerancia a la bilis. Algunas BAL tienen la capacidad de hidrolizar las sales biliares mediante enzimas. Estas enzimas desintoxican la bilis al descongestionar los ácidos biliares. Este fenómeno promovido por BAL aumenta la demanda de colesterol, que a su vez, provoca la síntesis de más sales biliares en el hígado. Este proceso puede conducir a la reducción de nivel de colesterol sérico (de Paula *et al.*, 2014).

Otro mecanismo descrito es la actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH), encargada de la hidrólisis de enlace peptídico de las sales biliares con el aminoácido al cual están conjugados (taurina o glicina), lo cual deriva en la pérdida de su capacidad emulsificante y antimicrobiana (Arenas, 2015).

Finalmente se presenta en la Figura 12 la evaluación de la resistencia a una elevada concentración de sales biliares (1%) durante un tiempo prolongado de incubación (24 horas). Los resultados promedio de las determinaciones independientes para cada lote se muestran en el Anexo 3.

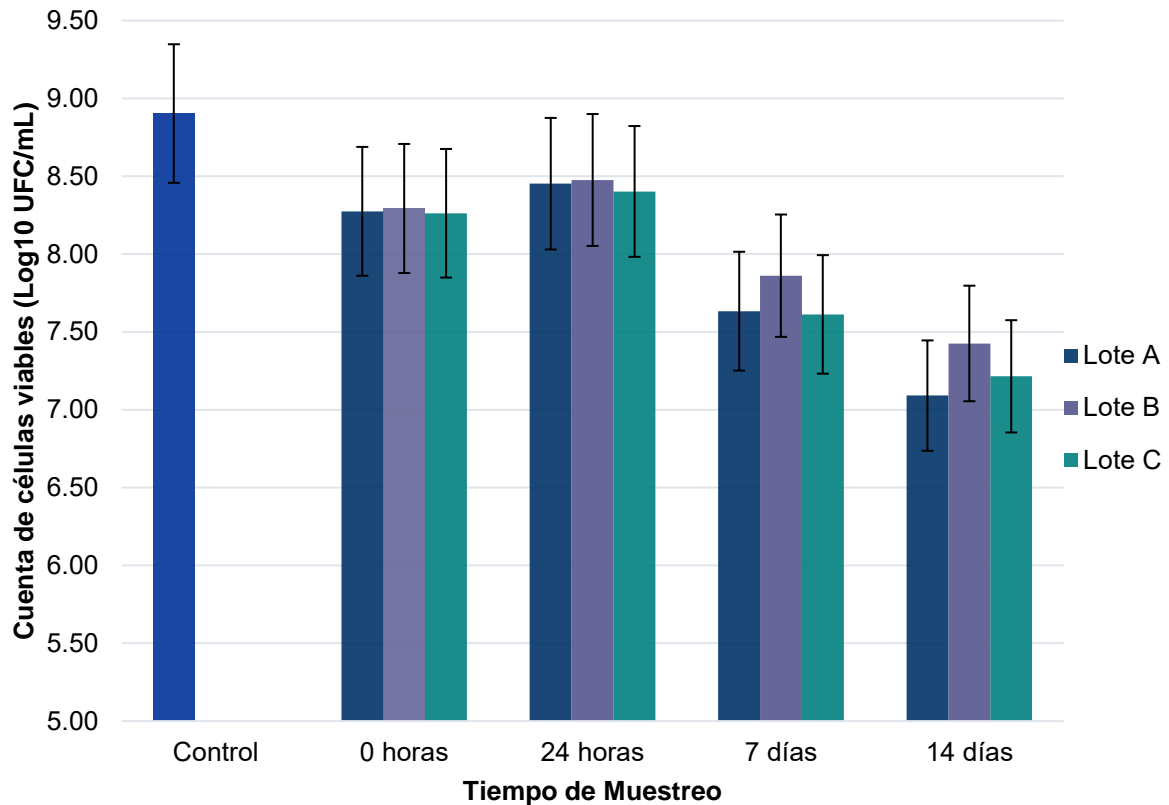


Figura 12.- Evaluación de la resistencia a altas concentraciones de sales biliares (1%) por 24 horas en APT (control) y aguamiel

Para los cuatro tiempos de fermentación a los cuales se realizó la evaluación de la resistencia a sales biliares por parte de la cepa probiótica, se muestra en la Figura 12 el descenso de la cuenta de las células viables ante tal condición durante un prolongado tiempo de incubación a los 14 días (7.24 Log₁₀ UFC/mL en promedio). De manera similar que se presenta en la Figura 10, la reducción de la cuenta de células viables se presenta únicamente cuando la cepa P45 es incubada durante un largo período de tiempo ante dichas condiciones gastrointestinales (pH y sales biliares). De manera que el cultivo es capaz de tolerar un pH bajo y una alta concentración de sal biliar, lo que implica la capacidad de sobrevivir a las duras condiciones del tracto gastrointestinal cuando se administra por vía oral en cualquier formulación alimenticia. Todas estas propiedades lo convierten en un cultivo probiótico potencial (Shobha y Agrawal, 2008).

Por otro lado, cuando una cepa se somete a condiciones de estrés letal durante algún tiempo (adaptación) se produce una inducción transitoria de proteínas de estrés específicas y/o generales. La respuesta adaptativa durante la fase exponencial generalmente implica la inducción de grupos específicos de genes o “regulones” para hacer frente a una condición de estrés específico, mientras que la respuesta al estrés durante la fase estacionaria está mediada por numerosos regulones que hacen frente a numerosas condiciones de estrés. En consecuencia, las células en fase estacionaria son, en general más resistentes a todos los factores de estrés que las células cultivadas en fase exponencial. Con frecuencia, la adaptación de la tensión por exposición a condiciones subletales de diversos factores de estrés conduce al incremento, no solo de la resistencia contra el factor específico, sino también contra otros (resistencia cruzada). Esto se debe al hecho de que la adaptación podría implicar la inducción de varias proteínas de estrés que se observan comúnmente cuando las cepas responden a una variedad de tensiones (D’Angelo *et al.*, 2017).

Dentro de las propiedades nutritivas del aguamiel, Ortíz *et al.* (2008), aclaran parcialmente la composición química del aguamiel de muestras recolectadas de Puebla (México), destacando la importancia del contenido de aminoácidos, así como la presencia de ácido ascórbico y hierro, mostrando que esta cantidad no se ve afectada por la especie de agave o la etapa de maduración en la que se encuentra.

Así mismo, la concentración de proteína encontrada fue de aproximadamente 3% de la materia seca y se mantuvo durante el período de cosecha. Por otra parte el contenido de ceniza disminuyó en los primeros 2 meses de cosecha, debido a la disminución en la concentración de potasio. La cantidad total de aminoácidos libres se estimó en 0.26% de materia seca, correspondiente a 0.3 g/L; cabe señalar que casi todos los aminoácidos esenciales están presentes en todas las muestras de aguamiel, con la excepción de la metionina (Ortíz *et al.*, 2008).

Por otra parte estudios (Leal *et al.*, 2015; Serment *et al.*, 2015; Gutiérrez *et al.*, 2017) demuestra la presencia de fitoquímicos en el aguamiel con alta actividad

antioxidante, que potencialmente tiene un efecto protector contra el cáncer, así como propiedades de mejora de la salud como la hipocolesterolemia y efectos anti-inflamatorios, así como la presencia de saponinas, especialmente los esteroides glicosilados que son componentes importantes del aguamiel; sin embargo, la cantidad y concentración de estos compuestos, depende de la especie de agave y de su etapa de maduración.

Entre los componentes encontrados en menor concentración en muestras de aguamiel, se reportan ácido ascórbico (2.01 mg/100 mL), lo que demuestra que este metabolito es endógeno del agave, de igual manera, se detectó la presencia de trazas de hierro, calcio y magnesio en el aguamiel desde el inicio de la fermentación (Ortíz *et al.*, 2008; Tovar *et al.*, 2008)

Se sugiere que el aguamiel representa una materia prima estable (Ortíz *et al.*, 2008) por su alto contenido nutritivo aunque esta característica lo hace susceptible a la fermentación por la microbiota naturalmente asociada, sin embargo, un tratamiento térmico adecuado de pasteurización podría ayudar a la comercialización del aguamiel (Serment *et al.*, 2015), así como su posterior estandarización y procesamiento industrial (Ortiz *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, el aguamiel se puede utilizar en la industria alimentaria debido a sus perfiles microbiológicos y químicos (Enríquez *et al.*, 2017). Se sabe que la importancia de los alimentos fermentados es aumentar la vida útil de las matrices de alimentos crudos y también se sabe que influyen en la calidad y su funcionalidad, al mejorar el sabor (Behera *et al.*, 2018). La propuesta elaborada en el presente estudio marcará un precedente tecnológico en el desarrollo de bebidas fermentadas alternativas saludables que permiten el mantenimiento y la preservación de tradiciones que son parte del patrimonio mexicano.

10.6. Evaluación control de la actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos

Se realizaron ensayos de antagonismo contra microorganismos patógenos *in vitro* con el fin de evaluar la capacidad antimicrobiana de la cepa probiótica. El efecto del antagonismo según Reig (2002), consiste en la competencia por nutrientes del medio, induciendo un aumento en la producción de factores tóxicos por parte de la cepa probiótica. Asimismo, Rondon *et al.*, (2015), han demostrado que las bacterias probióticas son capaces de prevenir la adherencia, establecimiento, replicación y acción patogénica de enteropatógenos específicos en el intestino y en alimentos, ya sea provocando un descenso en el pH a través de la producción de ácidos orgánicos volátiles de cadena corta, interviniendo en la disponibilidad de nutrientes necesarios para los patógenos, disminuyendo el potencial de óxido reducción del medio, o produciendo compuestos inhibitorios específicos, incluyendo bacteriocinas.

Los mecanismos para la inhibición de patógenos descritos son la producción de sustancias inhibidoras o antimicrobianas, su actuación como antagonistas competitivos, como la competencia por los sitios de adhesión y nutrientes y la estimulación del sistema inmune (Iglesias *et al.*, 2017). Se muestra en la Tabla 4 los resultados obtenidos de los perfiles antimicrobianos contra microorganismos utilizados como patógenos, probados en un medio control (APT) y en aguamiel a distintos tiempos de fermentación (las imágenes de los retos antimicrobianos se muestran en el Anexo 5), así como se destaca la mayor inhibición de la cepa en medio APT, así como a los 14 días de iniciada la fermentación de aguamiel, con el fin de indicar el posible efecto de *L. mesenteroides* P45, contra agentes contaminantes de alimentos, al ser consumida.

Algunos de los mecanismos que menciona la FAO que intervienen en el control de patógenos intestinales son la producción de sustancias antimicrobianas, exclusión competitiva de la fijación de patógenos, competencia por nutrientes, modulación del sistema inmunitario, etc. El poder que ejercen las bacteriocinas sobre otros microorganismos patógenos tendrá distintos comportamientos, es decir, algunos

microorganismos pueden ser sensibles, mientras que otros son resistentes a la acción de estos compuestos, tal parece ser el caso de los microorganismos patógenos en los cuales no se observa un halo definido e inclusive una cepa que parece ser sensible puede tener células que presentan resistencia a la acción de la bacteriocina (Benmechernene *et al.*, 2014).

Se muestran en la Tabla 4 similitudes entre los lotes A, B y C respecto al comportamiento antimicrobiano por parte de la cepa P45, para los microorganismos *B. subtilis* ATCC 6633, en el cual no se observa un halo de inhibición o efecto bactericida, sin embargo al poner en contacto al patógeno con la cepa probiótica, el primero, realizó la pigmentación de toda la placa de color rojo claro tanto en el medio control (APT) como en aguamiel. De igual manera, la misma tendencia de presentar halos de inhibición se observó en los microorganismos *E. coli* 11229, *L. monocytogenes* CFQ-B-103, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 6538.

Para el resto de los microorganismos, se presentan diferencias entre lotes, es decir, *B. cereus* CFQ-B-230, presenta una tendencia similar al lote B y por tanto diferente a la presentada por el lote A, al registrar un efecto bacteriostático a los 7 días. Los resultados que se observan para *E. faecalis* QB y *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 corresponden a los mismos registrados para el lote A, ya que el halo de inhibición generado, es el mismo.

Finalmente, para el caso de *S. pyogenes* CFQ-B-218, se presenta una actividad antimicrobiana diferente a la registrada por los lotes A y B, ya que durante todo el tiempo de fermentación, se registra el mismo patrón de inhibición a los tres tiempos de estudio establecidos.

Aunque hay muchos informes sobre bacteriocinas de LAB, incluido *L. plantarum* y *L. mesenteroides*, se cree que el efecto inhibitor de los aislados contra *L. monocytogenes* es causado por la escasez de nutrientes y/o la disminución del pH debido a la cantidad de células de LAB (Nakamura *et al.*, 2012). Sin embargo, Shi *et al.* (2016), demuestran que la leucocina K7 fue especialmente activa contra las cepas de *L. monocytogenes*, pero fue inactiva contra las bacterias Gram

positivas (*Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*) y bacterias Gram negativas (*Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* y *Escherichia*).

Resultados similares a los obtenidos, los presentan de Paula *et al.* (2014), demostrando que posibles cepas probióticas de *L. mesenteroides* (PL-sr-1 (w), DM1 y PH1) produjeron actividad antimicrobiana contra algunas especies de patógenos (*E. coli* O157:H7 y otros serotipos, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *Y. enterocolitica*, *S. Typhi*, *S. Paratyphi* y *Shigella dysenteriae*), indicando que las superficies mucosas del TGI son particularmente susceptibles a la adherencia y colonización de dichos patógenos transmitidos por los alimentos.

Además, cabe recalcar que el lote que mostró más diferencias respecto a los dos restantes fue el lote C. Debe tomarse en cuenta, que fue el lote que presentó la menor cuenta de células viables en los tres tiempos establecidos de fermentación.

Campos (2010), reporta la actividad antagónica de manera cualitativa de la cepa P45 ante los microorganismos *E. coli* EPEC 2348/69, *L. monocytogenes*, *S. enterica enterica* Typhi ATCC 9992 y *S. enterica enterica* Typhimurium ATCC 14028, mostrando que la cepa tiene un buen efecto inhibitorio al generar halos de inhibición visibles contra los microorganismos antes mencionados, sin embargo, en el estudio actual, el halo de inhibición más pequeño se registró para los tres lotes de aguamiel, contra la cepa de *S. enterica* serovar. Typhimurium, mientras que la inhibición para el resto de los microorganismos se mostró de manera similar, existiendo pequeñas diferencias entre lotes.

Por otro lado, Matus (2011), realizó los ensayos de actividad antimicrobiana del sobrenadante concentrado (pH 7.0) de la cepa P45 contra las mismas cepas probadas por Campos (2010), sin embargo, registró una mayor actividad inhibitoria contra la cepa de *E. coli*, contrario a lo reportado anteriormente el efecto antagonista contra *L. monocytogenes* resultó ser el más bajo.

Tabla 4. Comparación del efecto antagonista de la cepa probiótica en aguamiel y APT

Microorganismo	Halos de inhibición (mm)									
	Control (APT)	Lote A			Lote B			Lote C		
		24 horas	7 días	14 días	24 horas	7 días	14 días	24 horas	7 días	14 días
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230	6	< 1	< 1	2	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
<i>Bacillus subtilis</i> 6633	-	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	7	1	2	4	1	3	5	1	3	5
<i>Enterococcus faecalis</i> QB	7	1	< 1	1	1	2	2	1	2	1
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	8	2	1	8	2	1	7	1	2	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	3	< 1	7	2	< 1	2	< 1	1	2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8	1	2	4	2	2	3	1	2	2
<i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218	7	1	2	2	1	2	2	1	1	1
<i>Salmonella enterica</i> serovar. Typhimurium ATCC 14028	6	1	2	3	2	1	2	1	1	3

(-) Respuesta bajo la que no se observó actividad antimicrobiana contra el microorganismo usado como patógeno.

10.7. Análisis por HPLC de carbohidratos y productos de fermentación

Con el fin de obtener el perfil de metabolitos producidos por la fermentación del aguamiel, utilizando como cultivo iniciador la cepa de *L. mesenteroides* P45, se utilizaron las muestras de los tres lotes de aguamiel después de haberse mantenido por 14 días bajo condiciones de refrigeración. Es importante mencionar que los productos del metabolismo de la bacteria son únicamente una aproximación para obtener un panorama sobre los posibles efectos que se pueden tener al administrar a la cepa P45 como un probiótico, sin embargo debe tomarse en cuenta que la producción de estos metabolitos dependerá de los nutrientes del medio de cultivo (aguamiel en este caso), así como las condiciones de desarrollo del microorganismo.

Se muestra en la Figura 13 el perfil de ácidos orgánicos obtenido para los tres lotes de aguamiel después de la fermentación, así como el producto mayoritario obtenido es el lactato para los tres lotes, sin embargo el lote A presenta la menor producción de los cuatro metabolitos analizados (acetato, lactato, succinato y etanol + CO₂).

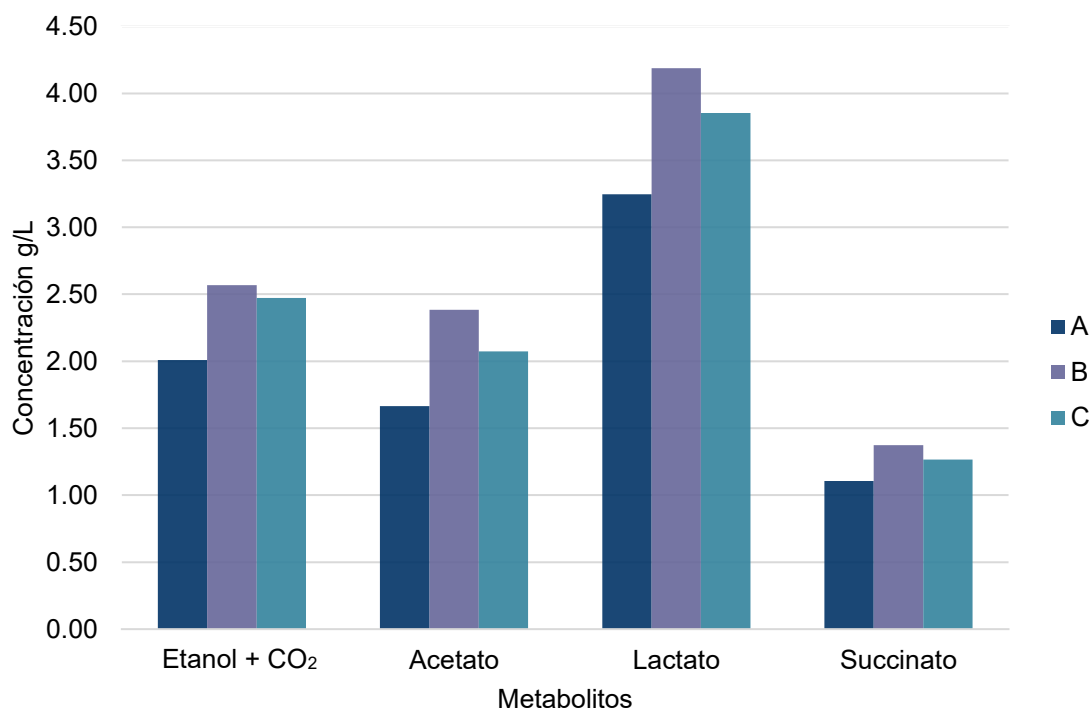


Figura 13. Perfil de ácidos orgánicos del aguamiel obtenido después de 14 días bajo condiciones de refrigeración (10 °C).

La mayor producción de ácido láctico después del tiempo total de la fermentación, indica que este metabolito sigue produciéndose aún en la fase estacionaria de crecimiento bajo condiciones de refrigeración. Lozano (2007), explica en su estudio una mayor producción de ácido láctico (1.2801 g/L), seguido de ácido acético (0.9095 g/L) y etanol (0.1060 g/L) en una muestra de aguamiel fresco. En comparación con los resultados obtenidos, se muestra que el producto mayoritario producido por la fermentación de aguamiel es el ácido láctico para los tres lotes, sin embargo se muestra una diferencia al presentar en este estudio una mayor producción de etanol que de ácido acético, sin embargo la diferencia mostrada para ambos metabolitos es muy poca.

Matus (2011), realizó el análisis por HPLC de sobrenadantes de la cepa P45 incubadas a 37 °C en medio MRS, mostrando al igual que en el presente estudio, una mayor producción de ácido láctico (10.9 g/L), seguido de la producción de ácido acético y etanol, con valores de 4.607 g/L y 3.356 g/L, respectivamente.

Respecto al contenido de azúcares en la muestra, se puede observar en la Figura 14 el perfil de carbohidratos para cada lote. Se puede observar que la mayor concentración de carbohidratos para las tres muestras corresponde a la sacarosa habiendo diferencias entre cada lote. La elevada concentración de este carbohidrato fermentable en la muestra puede ser un indicativo de que la cepa probiótica aún puede llevar a cabo la fermentación de este metabolito. Por otra parte no se observa una diferencia entre la presencia de glucosa y fructosa ya que al parecer, ambos carbohidratos se muestran en concentraciones similares para los tres lotes.

Lozano (2007), reporta una mayor concentración de fructosa (96.1647 g/L), seguido de glucosa (15.0868 g/L) y sacarosa (9.5613 g/L), en la muestra de aguamiel fresco, en comparación con los resultados obtenidos en el presente estudio, la diferencia entre la concentración de glucosa y fructosa no parece ser significativa, sin embargo la diferencia elevada entre la concentración de sacarosa reportada por Lozano (2007), y la obtenida en el presente estudio, podría ser un precedente para la determinación de un exopolisacárido por parte de la cepa probiótica.

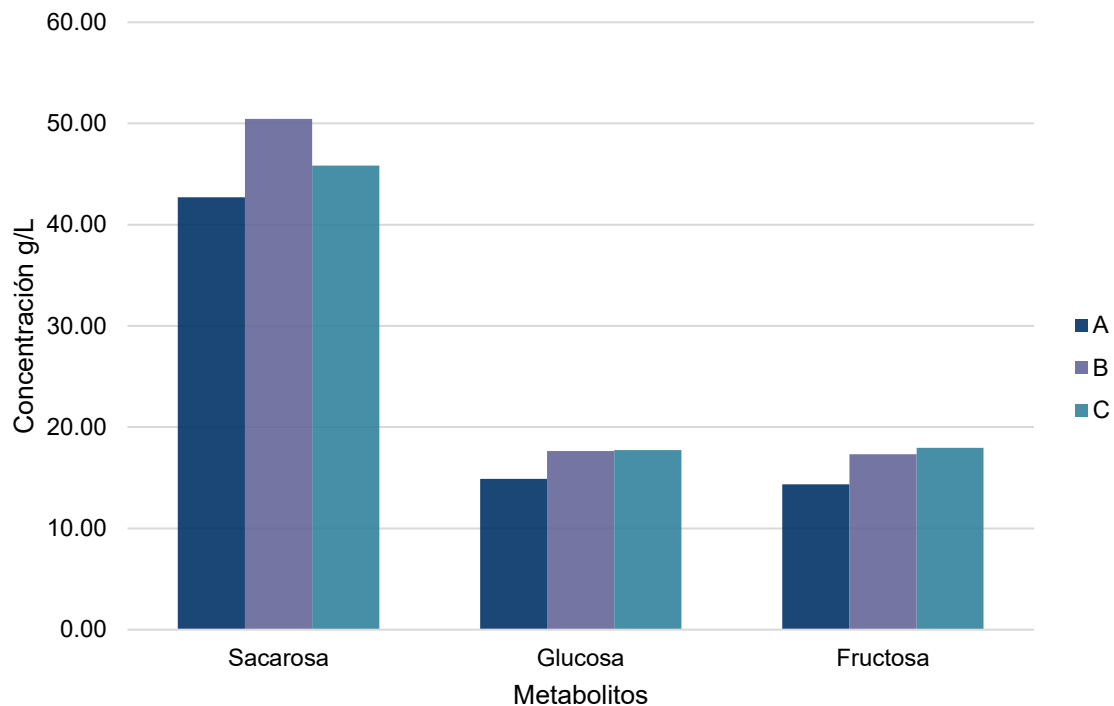


Figura 14. Perfil de carbohidratos para cada lote de aguamiel obtenido después de 14 días bajo condiciones de refrigeración (10 °C).

10.8. Perfil Flash: generación de atributos

Una vez generados los descriptores de las muestras, se analizaron de los atributos para seleccionar los más representativos de las muestras. De un total de 78 atributos generados para las tres muestras de aguamiel, se eliminaron aquellos atributos que resultaron ambiguos y que no correspondían a características propias de la muestra, por ejemplo la percepción de un olor salado o de limón y la agrupación de aquellos descriptores que resultaron ser sinónimos, por ejemplo sedimento y precipitado. Se obtuvo un total de 20 atributos finales en común para las tres muestras de aguamiel, agrupándose en las cinco categorías principales, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Atributos generados para las muestras de aguamiel

Grupo de atributo					
Atributos	Olor	Aspecto	Sabor	Textura	Otros
	Fermentado	Color	Intenso	Viscosa	Resabio amargo
	Pulque	Brillo	Fermentado	Fresca	Resabio astringente
	Alcohólico	Turbidez	Ácido	Burbujeante	
	Agave	Sedimentación	Dulce		
	Agrio	Burbujas			
	Dulce				

10.9. Evaluación sensorial de las muestras

Al haber obtenido los principales descriptores característicos de la muestra de aguamiel y una vez generados los cuestionarios, se procedió a definir las escalas a utilizar en la evaluación sensorial final, las cuales se muestran en las Tablas 6 a 10.

Tabla 6. Escala definida para atributos pertenecientes a olor

	Atributo	Escala de intensidad
Olor	Fermentado	Suave a intenso
	Pulque	Suave a intenso
	Alcohólico	Suave a intenso
	Agave	Suave a intenso
	Agrio	Suave a intenso
	Dulce	Suave a intenso

Tabla 7. Escala definida para atributos de aspecto

Aspecto	Atributo	Escala de intensidad
	Color	Blanco a beige
	Brillo	Opaco a brillante
	Turbidez	Traslúcido a turbio
	Sedimentación	Poco a mucho
	Burbujas	Poco a mucho

Tabla 8. Escala de intensidad para atributos de sabor

Sabor	Atributo	Escala de intensidad
	Intensidad de sabor	Suave a intensa
	Fermentado	Poco a mucho
	Ácido	Poco a mucho
	Dulce	Poco a mucho

Tabla 9. Escala de intensidad para atributos de textura

Textura	Atributo	Escala de intensidad
	Viscosa	Líquida a viscosa
	Fresca	Poco a mucho
	Burbujeante	Poco a mucho

Tabla 10. Escala de intensidad para características de resabio

Otras características	Atributo	Escala de intensidad
	Resabio amargo	Poco a mucho
	Resabio astringente	Poco a mucho

10.10. Obtención del perfil sensorial y análisis estadístico

Ya obtenidos todos los atributos para los tres lotes de la muestra, se procedió a realizar la evaluación sensorial de las muestras elaboradas a partir de aguamiel, y después de 14 días bajo condiciones de refrigeración, colocando las tres muestras correspondientes a cada lote, así como una galleta y un vaso con agua potable, en caso de que ocurriera la saturación de los gustos de los jueces.

En la Figura 15 se muestran los resultados del análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés) provenientes de un análisis de procrustes generalizado (GPA por sus siglas en inglés) para los atributos sensoriales de sabor y textura, en ella se muestra que el componente o eje 1 explica el 57.49% de la variabilidad de los datos y el 2 el 42.51%. Correlacionados positivamente el componente 1 se encuentran los lotes de aguamiel A y C mostrando similitud entre los atributos de textura de resabio amargo, sabor dulce y ácido, así como una textura fresca; el sabor dulce podría provenir de la sacarosa presente en el aguamiel que no se agotó en la fermentación, mostrando que fue el azúcar encontrado en mayor concentración a los 14 días bajo condiciones de refrigeración para las tres muestras, mientras que el sabor ácido se debe a que las muestras tuvieron un pH cercano a 4 al final de la fermentación. Por otro lado, el lote B presenta correlación con los atributos de sabor intenso, fermentado, textura viscosa y burbujeante y resabio astringente. En general los lotes A y C son similares en sabor, textura y resabios pero el lote B es diferente. Considerando los resultados por análisis de HPLC de los tres lotes de aguamiel, el lote B registró la mayor concentración de etanol después de 14 días bajo condiciones de refrigeración, la sensación

pseudotérmica del etanol puede provocar que los atributos fermentado y astringente se perciban con mayor intensidad.

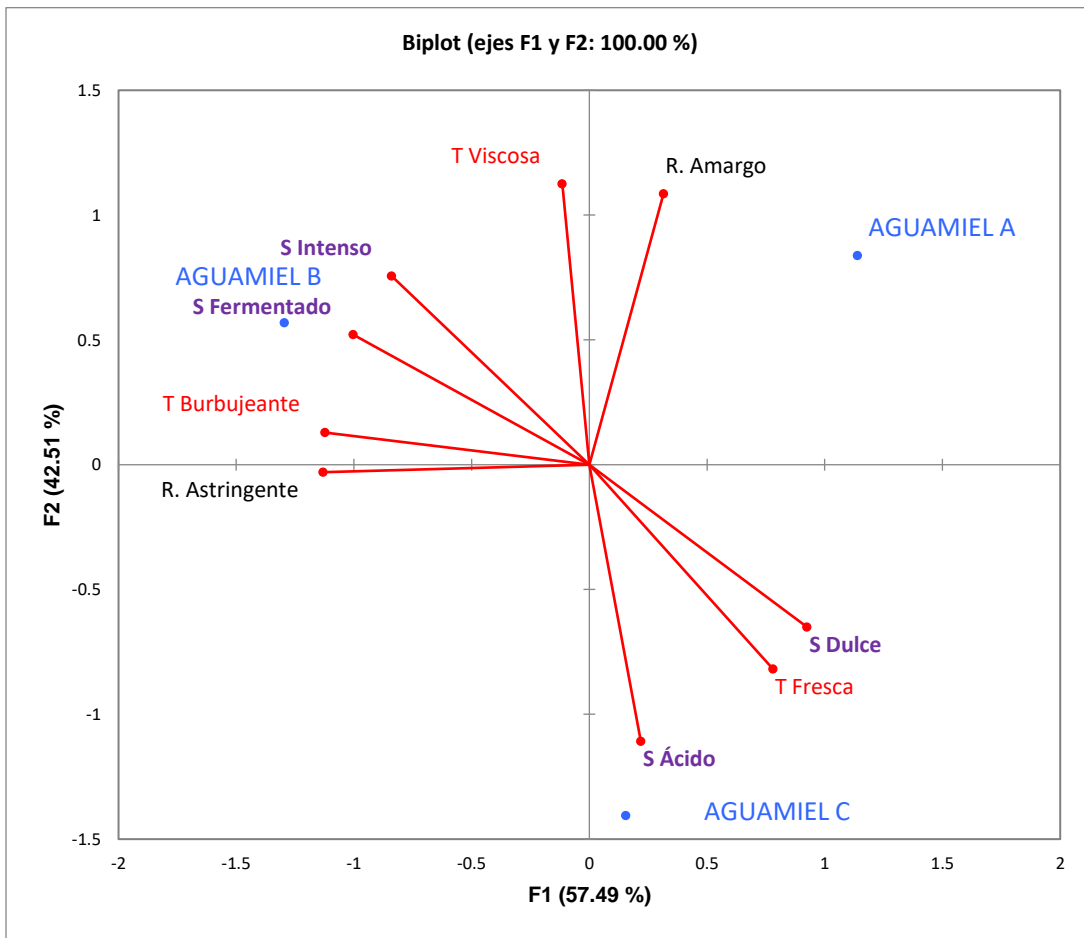


Figura 15. Análisis de PCA proveniente del GPA para los atributos sensoriales de sabor y textura de las muestras de aguamiel.

En el PCA representado en la Figura 16 para los atributos sensoriales de aspecto y olor, se observa que el 53.09% de la variabilidad de las muestras se encuentra representado por el primer componente F1, mientras que el segundo componente F2, está representado por el 46.91% de la variabilidad de los datos. Se observa que se encuentran correlacionados positivamente, las características del lote C de aguamiel correspondientes al aspecto como, turbidez, sedimentación, presencia de burbujas y color, así como el olor dulce. Por otro lado, correlacionados negativamente los lotes A y B de aguamiel, están las características de olor alcohólico, fermentado, pulque, olor agrio y de agave así como el brillo. Se observa

que los lotes A y B son similares en características de olor, mientras que el lote C, es diferente.

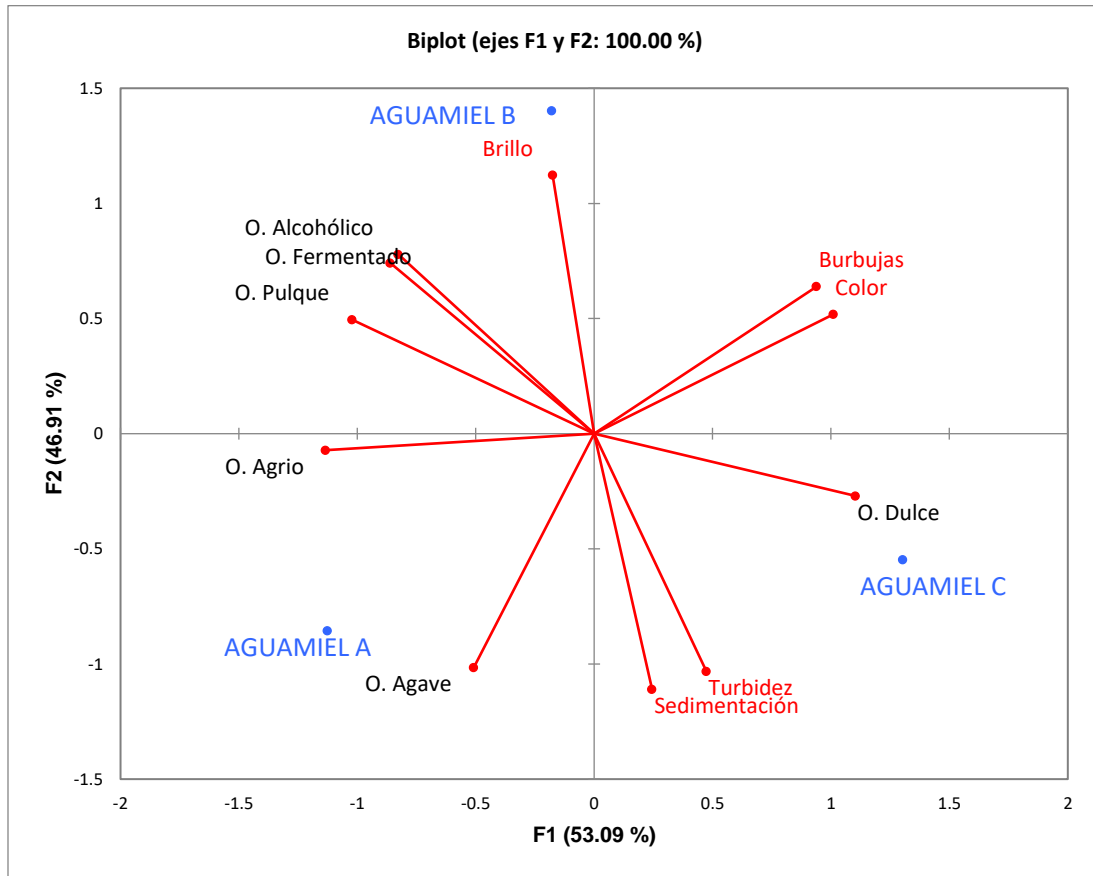


Figura 16. Análisis de PCA proveniente del GPA para los atributos sensoriales de aspecto y olor de las tres muestras de aguamiel.

De igual manera, considerando los resultados de la sección anterior en los cuales se muestran los principales componentes del aguamiel fermentado durante 14 días, se observa que la presencia de burbujas en la muestra, fue percibida por los jueces, debido a que es el producto que se genera al formarse el etanol como uno de los principales productos de la fermentación, además la presencia de olores tal como el alcohólico, fermentado y de pulque, pueden explicarse ya que el etanol fue el segundo producto con mayor concentración en las tres muestras de aguamiel.

La presencia de los atributos de sabor y olor ácido, agrio y fermentado también fueron percibidos en bebidas lácteas fermentadas y en bebidas comerciales con

prebióticos que se venden en el mercado mexicano, siendo notas esperadas por el consumidor pero con una intensidad baja, mientras que el olor y sabor dulce es un atributo que gusta al consumidor mexicano (Iñigo, 2013).

11. CONCLUSIONES

Se realizó la formulación de una bebida a base de aguamiel con posibles propiedades simbióticas, utilizando como cultivo iniciador la cepa P45 de *Leuconostoc mesenteroides*. Se observaron cambios en las cuentas de microorganismos viables, presentando la menor cuenta el lote C. A través de la evaluación de la resistencia a pH ácido y altas concentraciones de sales biliares, se demostró que la cepa conserva su viabilidad ante dichas condiciones por un período de incubación de 5 horas, mientras que bajo un período de incubación de 24 horas, se generó la reducción de células en una unidad logarítmica.

Además, por primera vez se obtuvo el perfil de susceptibilidad y resistencia a antimicrobianos, obteniendo resistencia por parte de la cepa probiótica a los antibióticos tetraciclina, nitrofurantoína y vancomicina.

La cepa P45 presentó actividad antagonista cuando se encuentra en presencia de aguamiel contra los microorganismos probados; sin embargo al efectuar los retos de actividad antimicrobiana, no se observaron diferencias entre lotes para la inhibición de *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* DH5 α , *L. monocytogenes* CFQ-B-103, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 6538. Para el caso de *B. cereus* CFQ-B-230 los lotes A y B resultaron presentar el mismo comportamiento, mientras que para *E. faecalis* QB y *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 los lotes A y C fueron iguales. Las diferencias entre lotes para el efecto antagonista se presentaron únicamente contra *S. pyogenes* CFQ-B-218.

En cuanto al perfil sensorial de las muestras de aguamiel, se obtuvo que para las características de sabor y textura, el lote A y C, presentaron un perfil similar para descriptores de sabor, textura y presencia de resabios, mientras que para descriptores de aspecto y olor los lotes A y B, resultaron ser iguales. Las muestras presentaron atributos esperados en las bebidas con probióticos como el sabor y olor ácido, agrio y fermentado, así como la nota dulce, sin embargo, debe evaluarse el gusto del consumidor.

12. PERSPECTIVAS

- Realizar la evaluación *in vivo* de la bebida funcional contra microorganismos patógenos.
- Elaborar el análisis químico proximal de la bebida funcional.
- Evaluar el efecto de la adición de edulcorantes o saborizantes a la bebida y los efectos de los mismos sobre la cepa probiótica.
- Evaluar las características de la cepa probiótica utilizando un producto lácteo.
- Evaluar la estabilidad de la bebida durante más tiempo para determinar el período de vida de anaquel.
- Evaluar el nivel de agrado de las muestras con consumidores tipo.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, B., Brockhoff, P., Hyldig, G. (2019). The importance of liking of appearance, - odour, -taste and -texture in the evaluation of overall liking. A comparison with the evaluation of sensory satisfaction. *Food Quality and Preference*, 71, 228-232 <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.07.005>
- Arakawa, K., Yoshida, S., Aikawa, H., Hano, C., Bolormaa, T., Burenjargal, S., Miyamoto, T. (2016). Production of a bacteriocin-like inhibitory substance by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. dextranicum 213M0 isolated from mongolian fermented mare milk, airag. *Animal Science Journal*, 87 (3), 449-456 <https://doi.org/10.1111/asj.12445>
- Arenas, L. (2015). Caracterización de cepas de bacterias lácticas con actividad probiótica de pulque de la región mixteca. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de Tesiunam: <http://132.248.9.195/ptd2015/mayo/0729053/Index.html> [Fecha de consulta: 24 de Julio de 2018]
- Arribas, M. (2009). Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune. Tesis de Doctorado. Granada: Universidad de Granada. Recuperado de: <http://0-hera.ugr.es/adrastea.ugr.es/tesisugr/17820467.pdf> [Fecha de consulta: 21 de Julio de 2018]
- Ashraf, R., Vasiljevic, T., Day, S.L., Smith, S.C., Donkor, O.N. (2014). Lactic acid bacteria and probiotic organisms induce different cytokine profile and regulatory T cells mechanisms. *Journal of Functional Foods*, 6, 395-409. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.11.006>
- Bajpai, V., Rather, I., Majumder, R., Shukla, S., Aeron, A., Kim, K., Kang, S., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., Lim, J., and Park, Y. (2016). Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. *Journal of the Bangladesh Pharmacological Society*, 11, 1-23.
- Behera, S., Ray, R., Zdolec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed Research International*, 9361614, 1 – 19. <https://doi.org/10.1155/2018/9361614>
- Bengoa, A., Goretti, M., Iraporda, C., Dueñas, M.T., Abraham, A.G., Garrote, G.L. (2018). Impact of growth temperature on exopolysaccharide production and probiotic properties of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir grains. *Food Microbiology*, 69, 212-218 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.012>.
- Benmechernene, Z., Fernández, I., Quintela-Baluja, M., Böhme, K., Kihal, M., Calo-Mata, P., and Barros-Velázquez, J. (2014). Genomic and proteomic characterization of bacteriocin-producing *Leuconostoc mesenteroides* strains isolated from raw camel milk in two southwest algerian arid zones. *BioMed Research International*, 2014, 1-10 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/853238>

Bolla, A. (2011). Desarrollo de un alimento funcional deshidratado constituido por microorganismos aislados de kéfir. Tesis Doctoral. Argentina. Universidad Nacional de la Plata. Recuperado de: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2661> [Fecha de consulta: 27 de Julio de 2018]

Bonilla, F., Flores, V., Mendiola, T., Picasso, G. (1991). El maguey pulquero. Dos programas de televisión: "las puntas de la vida", "mírame bien". Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/pmig2016/0147526/Index.html> [Fecha de consulta: 28 de Julio de 2018]

Borbón-Palomares, D., Laborin-Sivirian, F., Tinoco-Ojanguren, C., Peñalba, M.C., Reyes-Ortega, I. Molina-Freaner, F. (2018). Reproductive ecology of *Agave colorata*: the importance of nectar-feeding bats and the germination consequences of self-pollination. *Plant Ecology*, 219 (8), 927-939. <https://doi.org/10.1007/s11258-018-0847-x>

Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J., Gerds, M., Hammes, W., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I., Prajapati, B., Seto, Y., Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijtelaars, S., Hansen, E. (2012). Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 87-97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030

Campos, I. (2010). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas del pulque con capacidad probiótica. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en Tesiunam: <http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F?RN=891777900>

Cano, A. (2016). Perfil sensorial de bebidas a base de lactosuero. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptb2010/junio/0658491/Index.html> [Fecha de consulta: 25 de Julio de 2018]

Castro-Rodríguez, D., Hernández-Sánchez, H., Yáñez-Fernández, J. (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>.

Cerón, I. (2014). Estudio de la capacidad probiótica *in vitro* de la cepa de *Leuconostoc* P45 aislada del pulque. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2014/octubre/0721038/Index.html> [Fecha de consulta: 3 de Agosto de 2018]

Cervantes, M., Pedroza, A. (2008). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *NOVA Publicación científica en ciencias biomédicas*, 5 (8), 135-146.

Chang, C., Wang, S., Chiu, C., Chen, S., Chen, Z., Duh, P. (2015). Effect of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on immunopotentiating activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5 (4), 281-286.

Conca, R. (2008). Aislamiento e identificación de cepas de bacterias lácticas productoras de nuevos polisacáridos extracelulares del pulque. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2008/junio/0628576/Index.html> [Fecha de consulta: 25 de Julio de 2018]

Dairou, V., Sieffermann, J.M. (2002). A Comparison of 14 jams characterized by conventional profile and a quick original method, the flash profile. *Journal of Food Science*, 67 (2), 826-834 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10685.x>

D'Angelo, L., Cicotello, J., Zago, M., Guglielmotti, D., Quiberoni, A., Suárez, V. (2017). *Leuconostoc* strains isolated from dairy products: Response against food stress conditions. *Food Microbiology*, 66, 28-39 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.001>

David, C., Jacobs, D.J. (2014). Principal component analysis: a method for determining the essential dynamics of proteins. *Methods in Molecular Biology*, 1084, 193-226. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-658-0_11.

de Paula, A., Jeronymo-Ceneviva, A.B., Todorov, S.D. & Penna, A.L. (2015) The two faces of *Leuconostoc mesenteroides* in food systems, *Food Reviews International*, 31:2, 147-171, <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.981825>

de Paula, A.T., Jeronymo-Ceneviva, A.B., Silva, L.F., Todorov, S.D., Franco, B.D., Choiset, Y., Haertlé, T., Chobert, J.M., Dousset, X., Penna, A.L. (2014). *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: A bacteriocinogenic strain isolated from brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6 (4), 186-197 <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9163-5>.

Dijksterhuis, G. (1996) Procrustes analysis in sensory research. Elsevier, Netherlands, 185-219.

Duncan, S., Flint, H. (2013). Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. *Maturitas*, 73 (1), 44-50 <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.02.004>

Dündar, H., Salih, B. & Bozoğlu, F. (2016) Purification and characterization of a bacteriocin from an oenological strain of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46:4, 354-359, <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1031395>

Durán, E. (1990). Producción y caracterización de glucosiltransferasas de *Leuconostoc mesenteroides*. Tesis de Maestría. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/pmig2017/0142245/Index.html> [Fecha de consulta: 2 de Agosto de 2018]

Enríquez-Salazar, M.I., Veana, F., Aguilar, C.N., De la Garza-Rodríguez, I., López, M.G., Rutiaga-Quiñones, O.M., Morlett-Chávez, J.A., Rodríguez-Herrera, R. (2017). Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from *Agave salmiana* and *A. atrovirens* during different seasons of year. *Food Science and Biotechnology*, 26 (4), 1003-1011. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0141-z>

Escalante, A., 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>.

Escalante, A., López, D., Velázquez, J.E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., and López-Munguía, A. (2016). Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-18 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>

Escalante, A., Rodríguez, M.E., 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>

Escudero, E. y González, P. (2006). La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*, 21, 61-72.

Flores, G. (2013). Caracterización de bacterias ácido lácticas aisladas de una bebida fermentada de origen Maya, para su posible empleo como probiótico. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2013/febrero/0689287/Index.html> [Fecha de consulta: 5 de Agosto de 2018]

Flores, M. (2017). Características sensoriales, de textura y color de salchichas comercializadas en la CDMX. Tesis de Licenciatura. CDMX. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2017/octubre/0765973/Index.html> [Fecha de consulta: 6 de Agosto de 2018]

Franco-Robles E. and G. López M. (2016). Agavins increase neurotrophic factors and decrease oxidative stress in the brains of high-fat diet-induced obese mice. *Molecules*, 21 (8), 998-1013. <https://doi.org/10.3390/molecules21080998>

Fraqueza, M. (2015). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 76-88 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.035>

García, D. (2010). Aislamiento de microorganismos probióticos a partir de bebidas fermentadas: aguamiel, pozol y sotol. Tesis de Licenciatura. Coahuila, México. Universidad Autónoma Agraria. Recuperado de:

<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/424/61074s.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [Fecha de consulta: 29 de Julio de 2018]

García, J. (2016). Caracterización sensorial (perfil flash) y afectiva (internal preference mapping) de alimentos de la milpa de la Sierra Madre Tarahumara. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2016/mayo/0744929/Index.html> [Fecha de consulta: 23 de Julio de 2018]

García-Curbelo, Y., Bocourt, R., Savón, L.L., García-Vieyrab, M.I., and López, M.G. (2015). Prebiotic effect of *Agave fourcroydes* fructans: an animal model. *Food & Function*, 6 (9), 3177-3182 <https://doi.org/10.1039/c5fo00653h>

Giles-Gómez, M., Sandoval, J.G., Matus, V., Campos, I., Bolívar, F., and Escalante, A. (2016). In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *SpringerPlus*, 5, 1-10 <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2370-7>

Godínez-Hernández, C. I., Aguirre-Rivera, J. R., Juárez-Flores, B. I., Ortiz-Pérez, M. D., & Becerra-Jiménez, J. (2016). Extraction and characterization of *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck fructans. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 22(1), 59–72. <https://doi: 10.5154/r.rchscfa.2015.02.007>

Gómez, E., Tuohy, K.M., Gibson, G.R., Klinder, A., Costabile, A. (2009). In vitro evaluation of the fermentation properties and potential prebiotic activity of *Agave* fructans. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 2114-2121 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04617.x>

Grant, M.C. & Baker, J.S. (2017). An overview of the effect of probiotics and exercise on mood and associated health conditions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57:18, 3887-3893, <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1189872>

Guerrero, D. (2017). Estudio de la diversidad de bacterias endófitas del maguey pulquero. Tesis de Licenciatura. CDMX. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2017/marzo/0756927/Index.html> [Fecha de consulta: 2 de Agosto de 2018]

Gupta, M., Bajaj, B.K. (2017). Functional Characterization of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Kalarei and Development of Probiotic Fermented Oat Flour. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-8 <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9306-6>.

Gutiérrez, E. (2015). Detección de lactobacilos aislados del pulque con capacidad probiótica. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2015/marzo/0726837/Index.html> [Fecha de consulta: 21 de Julio de 2018]

Gutiérrez, J., Figueroa, L., Martín del Campo, S., Escalante, A. (2017). Chapter 23. Pulque. *Fermented foods in health and disease prevention*. 543 – 556. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00023-6>

Han, J., Hang, F., Guo, B., Liu, Z., You, C., Wu, Z. (2014). Dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose. *Carbohydrate Polymers*, 112, 556-562 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.035>

Hernández, E. (2005). Evaluación Sensorial. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). 1ª ed. Bogotá.

Hernández, J. (2017). Bebidas modificadas con almidón pregelatinizado para tratamiento de disfgaia. Tesis de Licenciatura. CDMX. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2017/junio/0760579/Index.html> [Fecha de consulta: 29 de Julio de 2018]

Huerta-Lovera, M., Peña-Valdivia, C.B., García-Esteva, A., Kohashi-Shibata, J., Campos-García, H., Aguirre-Rivera, J. (2018). Maguey (*Agave salmiana*) infructescence morphology and its relationship to yield components. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65 (6), 1649-1661. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0641-6>

Hui, Y. and Evranuz, E. (2012). Handbook of fermented food and beverage technology. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press.

Iglesias, M.B., Abadias, M., Anguera, M., Viñasa, J. (2017). Antagonistic effect of probiotic bacteria against foodborne pathogens on fresh-cut pear. *LWT - Food Science and Technology*, 81, 243-249 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.057>.

Iliev, I., Vassileva, T., Ignatova, C., Ivanova, I., Haertlé, T., Monsan, P., Chobert, J.M. (2007). Gluco-oligosaccharides synthesized by glucosyltransferases from constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain Lm 28. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 243-250 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03555.x>

Iñigo, N. (2013). Evaluación del perfil sensorial de bebidas lácteas fermentadas. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2013/febrero/0689668/Index.html> [Fecha de consulta: 2 de Agosto de 2018]

Jeong, D., Lee, J. (2015). Antibiotic resistance, hemolysis and biogenic amine production assessments of *Leuconostoc* and *Weissella* isolates for kimchi starter development. *LWT - Food Science and Technology*, 64 (2), 1078-1084 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.031>

Jeong, D., Lee, J. (2015). *Food Science and Technology*, 64, 1078-1084 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.031>.

Josse, J., Husson, F. (2012). Selecting the number of components in principal component analysis using cross-validation approximations. *Computational Statistics & Data Analysis*, 56 (6), 1869-1879 <https://doi.org/10.1016/j.csda.2011.11.012>.

Koenen, M.E., Cruz Rubio, J.M., Mueller, M., Venema, K. (2016). The effect of agave fructan products on the activity and composition of the microbiota determined in a dynamic in vitro model of the human proximal large intestine. *Journal of Functional Foods*, 22, 201-210. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.018>

Kothari, D., Rao, J.M., Goyal, A. (2015). In vitro analysis of dextran from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 for functional food application. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 6 (2), 55-61 <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2015.08.001>

Kothari, D., and Goyal, A. (2015). Gentio-oligosaccharides from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 dextransucrase as prebiotics and as a supplement for functional foods with anti-cancer properties. *Journal Food and Function*, 6 (2), 604-611 <https://doi.org/10.1039/c4fo00802b>

Lawless, H. T., Heymann H. (1998). *Sensory Evaluation of Food, Principles and Practices*. Ed. Springer, United States, 1-12, 341-371.

Leal, M., Guagliano, M., Sánchez, A. (2016). Estudio panorámico de vigilancia tecnológica e inteligencia competitiva: alimentos funcionales. 1ª ed. Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación productiva.

Leal-Díaz, A.M., Santos-Zea, L., Martínez-Escobedo, H.C., Guajardo-Flores, D., Gutiérrez-Urbe, J.A., and Serna-Saldivar, S.O. (2015). Effect of *Agave americana* and *Agave salmiana* ripeness on saponin content from aguamiel (agave sap). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (15), 3924-3930. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00883>

Lee, Y. (2014). What could probiotic do for us? *Food Science and Human Wellness*, 3 (2), 47-50 <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2014.06.001>

Lestringant, P., Delarue, J., Heymann, H. (2019). 2010–2015: How have conventional descriptive analysis methods really been used? A systematic review of publications. *Food Quality and Preference*, 71, 1-7 <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.05.011>.

Li Q.P., Wang, C., Zhang, H.B., Hu, X.Q., Li, R.H., Hua, J.H. (2017). Designing of a novel dextransucrase efficient in synthesizing oligosaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95, 696-703 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.114>

Likotrafiti, E., Tuohy, K.M., Gibson, G.R. & Rastall, R.A. (2016) Antimicrobial activity of selected synbiotics targeted for the elderly against pathogenic *Escherichia coli* strains, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 67:2, 83-91, <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1134444>

Liu, F., Li, P., Chen, M., Luo, Y., Prabhakar, M., Zheng, H., He, Y., Qi, Q., Long, H., Zhang, Y., Sheng, H. & Zhou, H. (2017). Fructooligosaccharide (FOS) and galactooligosaccharide (GOS) increase *Bifidobacterium* but reduce butyrate producing bacteria with adverse glycemic metabolism in healthy young population. *Nature*, 7, 1-12. <https://doi:10.1038/s41598-017-10722-2>

Liu, J., Wang, X., Pu, H., Liu, S., Kan, J., Jin, C. (2017). Recent advances in endophytic exopolysaccharides: Production, structural characterization, physiological role and biological activity. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1113-1124 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.084>.

Ljungh A., Wadström T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 7 (2), 73-89.

López, D. (2017). Identificación de la diversidad de bacterias lácticas productoras de polisacáridos extracelulares y la caracterización estructural de los polímeros producidos en una muestra de aguamiel y pulque. Tesis de Maestría. Cuernavaca, Morelos. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2017/enero/0754221/Index.html> [Fecha de consulta: 5 de Agosto de 2018]

Lozano, M. (2007). Análisis de la diversidad de bacterias Gram positivas presentes en aguamiel y en el inicio de la fermentación del pulque, por técnicas microbiológicas y moleculares. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/pd2007/0615112/Index.html> [Fecha de consulta: 30 de Julio de 2018]

Mahdhi, A., Leban, N., Chakroun, I., Chaouch, M., Hafsa, J., Fdhilaa, K., Mahdouani, K., Majdoub, H. (2017). Extracellular polysaccharide derived from potential probiotic strain with antioxidant and antibacterial activities as a prebiotic agent to control pathogenic bacterial biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, 109, 214-220.

Majumder, A., Goyal, A. (2009). Rheological and gelling properties of a novel glucan from *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146. *Food Research International*, 42 (4), 525-528 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.01.003>

Manrique, R. (2013). Caracterización y conservación de inóculos tradicionales para la producción del pulque. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en Tesiunam: <http://oreon.dgbiblio.unam.mx/F?RN=891777900>

Markowiak, P., and Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9 (9), 1-30 <https://doi.org/10.3390/nu9091021>

Martínez, M. (1999). Determinación, cuantificación e hidrólisis de inulina en el aguamiel de agave pulquero, *Agave atrovirens*. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/pd1999/271600/Index.html> [Fecha de consulta: 1 de Agosto de 2018]

Martínez-Gutierrez, F., Ratering, S., Juárez-Flores, B., Godínez-Hernández, C., Geissler-Plaumb, R., Prell, F., Zorn, H., Czermak, P., Schnellb, S. (2017). Potential use of *Agave salmiana* as a prebiotic that stimulates the growth of probiotic bacteria. *LWT*, 84, 151-159 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.044>

Mata, J. (2013). Análisis de las tendencias actuales de alimentos funcionales (Health and wellness) y la disponibilidad de los mismos en los principales supermercados de la ciudad de Cuenca. Tesis de Licenciatura. Cuenca, Ecuador. Universidad del Azuay. Recuperado de <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/3268> [Fecha de consulta: 30 de Julio de 2018]

Matsuzaki, C., Hayakawa, A., Matsumoto, K., Katoh, T., Yamamoto, K., and Hisa, K. (2015). Exopolysaccharides produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 as an

immunostimulant to enhance the mucosal barrier and influence the systemic immune response. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 63 (31), 7009-7015 <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01960>

Matsuzaki, C., Kamishima, K., Matsumoto, K., Koga, H., Katayama, T., Yamamoto, K., Hisa, K. (2014). Immunomodulating activity of exopolysaccharide-producing *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 from green peas. *Journal of Applied Microbiology*, 116 (4), 980-989 <https://doi.org/10.1111/jam.12411>

Matsuzaki, C., Takagakia, C., Tomabechei, Y., Forsberg, L.S., Heiss, C., Azadi, P., Matsumoto, K., Katoh, T., Hosomi, K., Kunisawa, J., Yamamotoa, K., Hisaf, K. (2017). Structural characterization of the immunostimulatory exopolysaccharide produced by *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048. *Carbohydrate Research*, 448, 95-102 <https://doi.org/10.1016/j.carres.2017.06.004>

Matus, V. (2011). Caracterización de la capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas del pulque. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptb2011/agosto/0671480/Index.html> [Fecha de consulta: 3 de Agosto de 2018]

Messaoudi, S., Manai, M., Kergourlay, G., Prévost, H., Connil, N., Chobert, J.M., Dousset, X. (2013). *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. *Food Microbiology*, 36 (2), 296-304 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.010>

Miremadia, F., Ayyashb, M., Sherkatc, F., Stojanovskaa, L. (2014). Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Journal of Functional Foods*, 9, 295-305 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.002>

Montanuci, F.D., Marques, D.R., and Giriboni, A.R. (2015). Flash profile for rapid descriptive analysis in sensory characterization of passion fruit juice. *Acta Scientatum Technology*, 37 (3), 337-344 <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v37i3.26238>.

Moreno-Vileta, L., García-Hernández, M.H., Delgado-Portales, R.E., Corral-Fernández, N.E., Cortez-Espinosa, N., Ruiz-Cabrera, M.A., Portales-Pereza, D.P. (2014). In vitro assessment of agave fructans (*Agave salmiana*) as prebiotics and immune system activators. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 181-187. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.039>

Mueller, M., Reiner, J., Fleischhacker, L., Viernstein, H., Loeppert, R., Praznik, W. (2016). Growth of selected probiotic strains with fructans from different sources relating to degree of polymerization and structure. *Journal of Functional Foods*, 24, 264-275 <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.04.010>

Nakamura, S., Kuda, T., An, C., Kanno, T., Takahashi, H., Kimura, B. (2012). Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from narezushi, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco-2 cells and A/J mice. *Anaerobe*, 18 (1), 19-24 <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.11.006>

Nematollahi, A., Sohrabvandi, S., Mohammad, A., (2016). Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 49-53 <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.03.001>

Norma Mexicana NMX-V-022-1972. Aguamiel. Hydromiel. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas. México, 26 de Septiembre de 1972.

O' Shea, E., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2013). Strategies to improve the bacteriocin protection provided by lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 24 (2), 130-134 <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.12.003>.

O'Connor, P., Ross, R.P., Hill, C., DCotter, P. (2015). Antimicrobial antagonists against food pathogens: a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Food Science*, 2, 51-57 <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.01.004>

Olagnero G., Genevois C., Irei V., Marcenado J., Bendersky S. (2007). Alimentos funcionales: Conceptos, Definiciones y Marco Legal Global. *DIAETA*, 25 (119), 31-39.

Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *DIAETA*, 25 (121), 20-33.

Ortíz-Basurto, R.I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M., and Belleville, M.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>

Palczak, J., Blumenthal, D., Rogeaux, M., Delarue, J. (2019). Sensory complexity and its influence on hedonic responses: A systematic review of applications in food and beverages. *Food Quality and Preference*, 71, 66-75 <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2018.06.002>.

Patel, A.R., Shah, N.B., Prajapati, J.B. (2014). Immunomodulatory effects of probiotics in the treatment of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4 (1), 81-84 <https://doi.org/10.1016/j.bionut.2013.04.003>

Patel, R., DuPont, H.L. (2015). New approaches for bacteriotherapy: prebiotics, new-generation probiotics, and synbiotics. *Current Infectious Diseases*, 60, 108-121 <https://doi.org/10.1093/cid/civ177>

Patel, A., Prajapatia, J.B., Holst, B., Ljungh, A. (2014). Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products. *Food Bioscience*, 5, 27-33 <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.10.002>.

Porcellato, D., Magri, M., Narvhus, J. (2015). Viable cells differentiation improves microbial dynamics study of fermented milks. *International Dairy Journal*. 47, 136 – 142. <http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.03.006>

Pranckutė, R., Kaunietis, A., Kuisienė, N., Čitavičius, D.J. (2016). Combining prebiotics with probiotic bacteria can enhance bacterial growth and secretion of bacteriocins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 89, 669-676 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.041>

Puente-Garza, C., Espinosa-Leal, C., García-Lara, S. (2018). Steroidal saponin and flavonol content and antioxidant activity during sporophyte development of maguey (*Agave salmiana*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 1 – 8 <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0684-z>

Pujato, S., Mercanti, D., Guglielmotti, D., Rousseau, G., Moineau, S., Reinheimer, J., Quiberonia, A. (2015). Phages of dairy *Leuconostoc mesenteroides*: Genomics and factors influencing their adsorption. *International Journal of Food Microbiology*, 201, 58-65 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.016>

Rafii, F., Khare, S. (2014). Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). Reference Module in Food Science, 1, 658-665 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00212-3>

Ramírez, M. (2005). Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis de Licenciatura. Pachuca de Soto, Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Recuperado de: <https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10600/Actividad%20inhibitoria%20de%20cepas%20de%20bacterias.pdf;sequence=1> [Fecha de consulta: 23 de Julio de 2018]

Ranawana, V., (2010). Inulin: A review of its functional properties in relation to calcium absorption in humans. *Journal of Food and Agriculture*. 1(1), pp.26–35 <http://doi.org/10.4038/jfa.v1i1.1837>

Rivas, C. (2014). Desarrollo del perfil sensorial de pulque. Muestras: tradicionales y experimentales. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2014/enero/0707278/Index.html> [Fecha de consulta: 2 de Agosto de 2018]

Rivera-Lugo, M., García-Mendoza, A., Simpson, J., Solano, E., Gil-Vega, K. (2018). Taxonomic implications of the morphological and genetic variation of cultivated and domesticated populations of the *Agave angustifolia* complex (Agavoideae, Asparagaceae) in Oaxaca, Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s00606-018-1525-0>

Riveros-Mckay, F., Campos, I., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., Escalante, A. (2014). Draft genome sequence of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage. *American Society for Microbiology*, 2 (6), 1-2 DOI: 10.1128/genomeA.01130-14

Rondon, L., Añez, R., Salvatierra, A., Meneses, R., Heredia, M. (2015). Probióticos: generalidades. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría*, 78 (4), 123 – 128.

- Rosado, J. L. (2016). Intolerancia a la lactosa. *Gaceta Médica de México*, 152 (1), 67 – 73.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M. Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, 50 (1), 1-16 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.014>
- Salmerón I. (2017). Fermented cereal beverages: from probiotic, prebiotic and synbiotic towards Nanoscience designed healthy drinks. *Letters in Applied Microbiology*, 65 (2), 114-124. <https://doi.org/10.1111/lam.12740>.
- Sánchez Leal, L., Corrales Ramírez, L. (2005). Congelación bacteriana: factores que intervienen en el proceso. *Nova. Publicación científica*. 3 (3), 109 – 113. ISSN: 1794-2470.
- Sánchez-Marroquín, A., and 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:10.1021/jf60003a007>
- Santos-Zea, L., Leal-Díaz A.M., Jacobo-Velázquez, D.A., Rodríguez-Rodríguez, J., García-Lara, S., Gutiérrez-Urbe, J.A. (2016). Characterization of concentrated agave saps and storage effects on browning, antioxidant capacity and amino acid content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 45, 113-120 <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.10.005>
- Sarmiento, L.A. (2006). Alimentos funcionales, una nueva alternativa de alimentación. *Revista ORINOQUIA*, 10 (1), 16-23.
- Sathyabama, S., Ranjith, M., Bruntha, P., Vijayabharathi, R., Brindha, V. (2014). Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *LWT - Food Science and Technology*, 57 (1), 49-425 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.024>
- Serment, V., Franco, A., Escobedo, Z., Fuentes, C., Torres, J., Dibildox, E., Welti, J. (2017). The logistic-exponential Weibull model as a tool to predict natural microflora inactivation of *Agave mapisaga* aguamiel (agave sap) by high pressure treatments. *Journal of food processing and preservation*, 41, 1 – 9. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12816>
- Serrano, C. (2013). Probióticos, prebióticos y sinbióticos. Efectos sobre la salud y regulación. Tesis de Licenciatura. CDMX. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2013/junio/0708541/Index.html> [Fecha de consulta: 20 de Julio de 2018]
- Serrano, E. (2017). Efecto de la administración de *Leuconostoc mesenteroides* P45 aislada del pulque, como modulador de alteraciones metabólicas en ratones alimentados con una dieta alta en grasa. Tesis de Licenciatura. CDMX. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2017/mayo/0758795/Index.html> [Fecha de consulta: 20 de Julio de 2018]

Sharma, P., Kumar, S., Pawas, T., Vikas, G., Rameshwar, S. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, 57, 176-195 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.025>.

Shi, F., Wang, Y., Li, Y., Wang, X. (2016). Mode of action of leucocin K7 produced by *Leuconostoc mesenteroides* K7 against *Listeria monocytogenes* and its potential in milk preservation. *Biotechnology Letters*, 38 (9), 1551-1557 doi: 10.1007/s10529-016-2127-y

Shobha, P., and Agrawal, R. (2008). Effect on cellular membrane fatty acids in the stressed cells of *Leuconostoc Mesenteroides*: A native probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Food Biotechnology*, 22 (1), 47-63 <https://doi.org/10.1080/08905430701863977>

Sidana, J., Singh, B., Sharma, O.P. (2016). Saponins of *Agave*: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, 130, 22-46 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.06.010>

Sierra, P. (2005). El maguey, el pulque y sus deidades. Tesis de Maestría. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2005/01042/0349732/Index.html> [Fecha de consulta: 23 de Julio de 2018]

Starowicz, M., Koutsidis, G., & Zieliński, H. (2018). Sensory analysis and aroma compounds of buckwheat containing products—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58:11, 1767-1779, <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1284742>

Stone, H., Bleibaum, R., Thomas, H. (2012). *Sensory Evaluation Practices*. 4th ed. pp. 167 – 325. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-63404-8>

Tamang, J.P. (2014). Biochemical and modern identification techniques: Microfloras of fermented foods. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd ed. 250-258 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00038-0>

Torres, I. (2010). Caracterización de polisacáridos de tipo glucana producidos por dos cepas de *Leuconostoc citreum* aisladas del pulque. Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptb2011/enero/0666170/Index.html> [Fecha de consulta 7 de Agosto de 2018]

Torres, I., Rodríguez, M.E., Miranda, A., Giles, M., Conca, R., López, A., Bolívar, F. and Escalante, A. (2014). Screening and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchii* isolated from traditional fermented pulque beverage. *SpringerPlus*, 3, 1-14 <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-583>.

Tovar, L., Olivos, M., Gutiérrez, M. (2008). Pulque, an alcoholic drink from rural Mexico, contains phytase. Its *in vitro* effects on corn tortilla. *Plant Foods Hum Nutr.* 63. 189 – 194. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0089-5>

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

Valdés-Varela, L., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M. (2017). In vitro fermentation of different fructo-oligosaccharides by *Bifidobacterium* strains for the selection of synbiotic combinations. *International Journal of Food Microbiology*, 242, 19-23
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.011>

Valdovinos, M.A., Montijo, E., Abreu, A.T., Hellerd, S., González-Garay, A., Bacarreza, D., Bielsa-Fernández, M., Bojórquez-Ramos, M.C., Bosques-Padilla, F., Burguete-García, A.I., Carmona-Sánchez, R., Consuelo-Sánchez, A., Coss-Adamea, E., Chávez-Barrera, J.A., Ariñon, de M., Flores-Calderón, J., Gómez-Escudero, O., González-Huezo, M.S...Guarner, F. (2017). Consenso mexicano sobre probióticos en gastroenterología. *Revista de Gastroenterología de México*, 82, 156-178 <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2016.08.004>

Van den Nieuwboer, M., Brummer, R.J., Guarner, F., Morelli, L., Cabana, M., Claasen, E6. (2015). The administration of probiotics and synbiotics in immune compromised adults: is it safe? *Beneficial Microbes*, 6 (1), 3-17 <https://doi.org/10.3920/BM2014.0079>.

Vasileva, T., Iliiev, I., Amari, M., Bivolarski, V., Bounaix, M.S., Robert, H., Morel, S., Rabier, P., Ivanova, I., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C., Gabriel, V. (2012). Characterization of glycosyltransferase activity of wild-type *Leuconostoc mesenteroides* strains from Bulgarian fermented vegetables. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168 (3), 718-730
<https://doi.org/10.1007/s12010-012-9812-7>

VidyaLaxme, B., Rovetto, A., Grau, R., Agrawal, R. (2014). Synergistic effects of probiotic *Leuconostoc mesenteroides* and *Bacillus subtilis* in malted ragi (*Eleusine corocana*) food for antagonistic activity against *V. cholerae* and other beneficial properties. *Journal of Food Science and Technology*, 51 (11), 3072-3082 <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0834-5>

Wang, C., Cui, Y., Qu, X. (2018). Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Archives of Microbiology*, 200 (2), 195-201 <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1446-2>.

Wang, C., Zhang, H., Li, M., Hu, X., Li, Y. (2017). Functional analysis of truncated and site-directed mutagenesis dextransucrases to produce different type dextrans. *Enzyme and Microbial Technology*, 102, 26-34 <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.03.011>

Zannini, E., Waters, D.M., Coffey, A., Arendt, E.K. (2016). Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (3), 1121-1135 <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7172-2>.

Zea, A. (2016). Caracterización sensorial (Perfil Flash) y nivel de agrado (Internal Preference Mapping) de los quintoniles de las especies *Amaranthus cruentus* L., *Amaranthus hypochondriacus* L. (Sierra Norte de Puebla) y *Amaranthus hybridus* L. (Ciudad de México). Tesis de Licenciatura. México, D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Recuperado de: <http://132.248.9.195/ptd2016/mayo/0744674/Index.html>

14. ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de células viables a distintos tiempos de fermentación de aguamiel.

Tabla 1. Cuenta de células viables de la cepa probiótica

Tiempo de Fermentación			CONTROL					
Lote			CONTROL					
Cuantificación (UFC/mL)			300 x 10 ⁶	300 x 10 ⁶	300 x 10 ⁶	300 x 10 ⁶	300 x 10 ⁶	300 x 10 ⁶
Log (UFC/mL)			8.48	8.48	8.48	8.48	8.48	8.48
Desviación Estándar			0.0000					
Promedio (UFC/mL)			300 x 10 ⁶					
Log (Promedio UFC/mL)			8.48					
0 HORAS								
A			B			C		
320x 10 ⁶	350 x 10 ⁶	300 x 10 ⁶	250 x 10 ⁶	280 x 10 ⁶	300 x 10 ⁶	260 x 10 ⁶	220 x 10 ⁶	200 x 10 ⁶
8.51	8.54	8.48	8.40	8.45	8.48	8.41	8.34	8.30
4.0689			0.0400			0.0577		
223.3 x 10 ⁶			276.7 x 10 ⁶			226.7 x 10 ⁶		
8.35			8.44			8.36		
24 HORAS								
A			B			C		
600 x 10 ⁶	500 x 10 ⁶	630 x 10 ⁶	620 x 10 ⁶	700 x 10 ⁶	620 x 10 ⁶	420 x 10 ⁶	450 x 10 ⁶	630 x 10 ⁶
8.78	8.70	8.80	8.79	8.85	8.79	8.62	8.65	8.80
0.0529			0.0304			0.0942		
576.7 x 10 ⁶			646.7 x 10 ⁶			500 x 10 ⁶		
8.76			8.81			8.70		
7 DÍAS								
A			B			C		
550 x 10 ⁶	420 x 10 ⁶	490 x 10 ⁶	490 x 10 ⁶	570 x 10 ⁶	420 x 10 ⁶	490 x 10 ⁶	600 x 10 ⁶	500 x 10 ⁶
8.74	8.62	8.69	8.69	8.76	8.62	8.69	8.78	8.70
0.0588			0.0663			0.0484		
486.7 x 10 ⁶			493.3 x 10 ⁶			530 x 10 ⁶		
8.69			8.69			8.72		
14 DÍAS								
A			B			C		
520 x 10 ⁶	850 x 10 ⁶	810 x 10 ⁶	610 x 10 ⁶	480 x 10 ⁶	540 x 10 ⁶	160 x 10 ⁶	300 x 10 ⁶	270 x 10 ⁶
8.72	8.93	8.91	8.79	8.68	8.73	8.20	8.48	8.43
0.1176			0.0520			0.1462		
726.7 x 10 ⁶			543.3 x 10 ⁶			243.3 x 10 ⁶		
8.86			8.74			8.39		

* UFC= Unidades formadoras de colonias

Anexo 2. Cuenta de células viables de la cepa probiótica incubada durante 5 y 24 horas a pH ácido (3.5)

Tabla 2. Resistencia de la cepa probiótica a pH ácido (3.5) por 5 horas

Tiempo de Fermentación	CONTROL									
Lote	CONTROL									
Cuantificación (UFC/mL)	200 x 10 ⁶	200 x 10 ⁶	200 x 10 ⁶	200 x 10 ⁶	200 x 10 ⁶	200 x 10 ⁶	200 x 10 ⁶	200 x 10 ⁶	200 x 10 ⁶	200 x 10 ⁶
Log (UFC/mL)	8.30	8.30	8.30	8.30	8.30	8.30	8.30	8.30	8.30	8.30
Desviación Estándar	0.0000									
Promedio (UFC/ mL)	200 x 10 ⁶									
Log (Promedio UFC/mL)	8.30									
0 HORAS										
A			B			C				
100 x 10 ⁶	101 x 10 ⁶	97 x 10 ⁶	118 x 10 ⁶	113 x 10 ⁶	111 x 10 ⁶	99 x 10 ⁶	92 x 10 ⁶	103 x 10 ⁶		
8.00	8.00	7.99	8.07	8.05	8.05	8.00	7.96	8.01		
0.0091			0.0137			0.0249				
99.3 x 10 ⁶			114 x 10 ⁶			98 x 10 ⁶				
8.00			8.06			7.99				
24 HORAS										
A			B			C				
170 x 10 ⁶	190 x 10 ⁶	150 x 10 ⁶	194 x 10 ⁶	187 x 10 ⁶	189 x 10 ⁶	150 x 10 ⁶	141 x 10 ⁶	157 x 10 ⁶		
8.23	8.28	8.18	8.29	8.27	8.28	8.18	8.15	8.20		
0.0514			0.0082			0.0234				
170 x 10 ⁶			190 x 10 ⁶			149.3 x 10 ⁶				
8.23			8.28			8.17				
7 DÍAS										
A			B			C				
146 x 10 ⁶	127 x 10 ⁶	140 x 10 ⁶	155 x 10 ⁶	130 x 10 ⁶	140 x 10 ⁶	137 x 10 ⁶	121 x 10 ⁶	130 x 10 ⁶		
8.16	8.10	8.15	8.19	8.11	8.15	8.14	8.08	8.11		
0.0311			0.0384			0.0271				
137.7 x 10 ⁶			141.7 x 10 ⁶			129.3 x 10 ⁶				
8.14			8.15			8.11				
14 DÍAS										
A			B			C				
188 x 10 ⁶	204 x 10 ⁶	195 x 10 ⁶	133 x 10 ⁶	156 x 10 ⁶	152 x 10 ⁶	156 x 10 ⁶	169 x 10 ⁶	163 x 10 ⁶		
8.27	8.31	8.29	8.12	8.19	8.18	8.19	8.23	8.21		
0.0178			0.0372			0.0174				
195.7 x 10 ⁶			147 x 10 ⁶			162.7 x 10 ⁶				
8.29			8.17			8.21				

* UFC= Unidades formadoras de colonias

Tabla 3. Resistencia de la cepa probiótica a pH ácido (3.5) por 24 horas

Tiempo de Fermentación	CONTROL								
Lote	CONTROL								
Cuantificación (UFC/mL)	600 x 10 ⁶			600 x 10 ⁶			600 x 10 ⁶		
Log (UFC/mL)	8.78			8.78			8.78		
Desviación Estándar	0.0000								
Promedio (UFC/mL)	600 x 10 ⁶								
Log (Promedio UFC/ mL)	8.78								
0 HORAS									
A			B			C			
157 x 10 ⁶	140 x 10 ⁶	133 x 10 ⁶	140 x 10 ⁶	152 x 10 ⁶	148 x 10 ⁶	144 x 10 ⁶	151 x 10 ⁶	173 x 10 ⁶	
8.20	8.15	8.12	8.15	8.18	8.17	8.16	8.18	8.24	
0.0369			0.0182			0.0414			
143.3 x 10 ⁶			146.7 x 10 ⁶			156 x 10 ⁶			
8.16			8.17			8.19			
24 HORAS									
A			B			C			
187 x 10 ⁶	194 x 10 ⁶	183 x 10 ⁶	179 x 10 ⁶	177 x 10 ⁶	187 x 10 ⁶	197 x 10 ⁶	188 x 10 ⁶	181 x 10 ⁶	
8.27	8.29	8.26	8.25	8.25	8.27	8.29	8.27	8.26	
0.0128			0.0126			0.0184			
188 x 10 ⁶			181 x 10 ⁶			188.7 x 10 ⁶			
8.27			8.26			8.28			
7 DÍAS									
A			B			C			
176 x 10 ⁶	176 x 10 ⁶	163 x 10 ⁶	191 x 10 ⁶	199 x 10 ⁶	197 x 10 ⁶	173 x 10 ⁶	181 x 10 ⁶	186 x 10 ⁶	
8.25	8.25	8.21	8.28	8.30	8.29	8.24	8.26	8.27	
0.0192			0.0093			0.0159			
171.7 x 10 ⁶			195.7 x 10 ⁶			180 x 10 ⁶			
8.23			8.29			8.26			
14 DÍAS									
A			B			C			
162 x 10 ⁵	176 x 10 ⁵	168 x 10 ⁵	187 x 10 ⁵	190 x 10 ⁵	193 x 10 ⁵	180 x 10 ⁵	179 x 10 ⁵	183 x 10 ⁵	
7.21	7.25	7.23	7.27	7.28	7.29	7.26	7.25	7.26	
0.0180			0.0069			0.0050			
16.9 x 10 ⁶			19 x 10 ⁶			18.1 x 10 ⁶			
7.23			7.28			7.26			

* UFC= Unidades formadoras de colonias

Anexo 3. Resistencia de la cepa probiótica a altas concentraciones de sales biliares (1%) por 5 horas.

Tabla 4. Resistencia de la cepa probiótica a sales biliares (1%) por 5 horas.

Tiempo de Fermentación	CONTROL								
Lote	CONTROL								
Cuantificación (UFC/mL)	450x 10 ⁶	450 x 10 ⁶	450 x 10 ⁶						
Log (UFC/ mL)	8.65	8.65	8.65						
Desviación Estándar	0.0000								
Promedio (UFC/ mL)	450 x 10 ⁶								
Log (Promedio UFC/ mL)	8.65								
0 HORAS									
A			B			C			
133 x 10 ⁶	128 x 10 ⁶	121 x 10 ⁶	172 x 10 ⁶	164 x 10 ⁶	169 x 10 ⁶	189 x 10 ⁶	171 x 10 ⁶	169 x 10 ⁶	
8.12	8.11	8.08	8.24	8.21	8.23	8.28	8.23	8.23	
0.0207			0.0105			0.0267			
127.3 x 10 ⁶			168.4 x 10 ⁶			176.3 x 10 ⁶			
8.10			8.23			8.25			
24 HORAS									
A			B			C			
174 x 10 ⁶	166 x 10 ⁶	164 x 10 ⁶	237 x 10 ⁶	219 x 10 ⁶	230 x 10 ⁶	193 x 10 ⁶	215 x 10 ⁶	185 x 10 ⁶	
8.24	8.22	8.21	8.37	8.34	8.36	8.29	8.33	8.27	
0.0136			0.0173			0.0337			
168 x 10 ⁶			228.7 x 10 ⁶			197.7 x 10 ⁶			
8.23			8.36			8.30			
7 DÍAS									
A			B			C			
122 x 10 ⁶	114 x 10 ⁶	223 x 10 ⁶	219 x 10 ⁶	191 x 10 ⁶	201 x 10 ⁶	176 x 10 ⁶	185 x 10 ⁶	184 x 10 ⁶	
8.09	8.06	8.35	8.34	8.28	8.30	8.25	8.27	8.26	
0.1604			0.0300			0.0119			
153 x 10 ⁶			203.7 x 10 ⁶			181.7 x 10 ⁶			
8.18			8.31			8.26			
14 DÍAS									
A			B			C			
480 x 10 ⁶	120 x 10 ⁶	134 x 10 ⁶	870 x 10 ⁶	144 x 10 ⁶	161 x 10 ⁶	135 x 10 ⁶	152 x 10 ⁶	134 x 10 ⁶	
8.68	8.08	8.13	8.94	8.16	8.21	8.13	8.18	8.13	
0.3346			0.4377			0.0307			
244.7 x 10 ⁶			391.7 x 10 ⁶			140.3 x 10 ⁶			
8.39			8.59			8.15			

* UFC= Unidades formadoras de colonias

Tabla 5. Resistencia de la cepa probiótica a sales biliares (1%) por 24 horas.

Tiempo de Fermentación	CONTROL								
Lote	CONTROL								
Cuantificación (UFC/ mL)	800 x 10 ⁶			800 x 10 ⁶			800 x 10 ⁶		
Log (UFC/ mL)	8.90			8.90			8.90		
Desviación Estándar	0.0000								
Promedio (UFC/ mL)	800 x 10 ⁶								
Log (Promedio UFC/mL)	8.90								
0 HORAS									
A			B			C			
191 x 10 ⁶	197 x 10 ⁶	177 x 10 ⁶	196 x 10 ⁶	188 x 10 ⁶	205 x 10 ⁶	195 x 10 ⁶	184 x 10 ⁶	170 x 10 ⁶	
8.28	8.29	8.25	8.29	8.27	8.31	8.29	8.26	8.23	
0.0239			0.0188			0.0299			
188.3 x 10 ⁶			196.3 x 10 ⁶			183 x 10 ⁶			
8.27			8.29			8.26			
24 HORAS									
A			B			C			
287 x 10 ⁶	279 x 10 ⁶	284 x 10 ⁶	307 x 10 ⁶	290 x 10 ⁶	301 x 10 ⁶	238 x 10 ⁶	250 x 10 ⁶	270 x 10 ⁶	
8.46	8.45	8.45	8.49	8.46	8.48	8.38	8.40	8.43	
0.0062			0.0126			0.0276			
283.3 x 10 ⁶			299.3 x 10 ⁶			252.7 x 10 ⁶			
8.45			8.48			8.40			
7 DÍAS									
A			B			C			
46 x 10 ⁶	38 x 10 ⁶	45 x 10 ⁶	46 x 10 ⁶	90 x 10 ⁶	82 x 10 ⁶	40 x 10 ⁶	38 x 10 ⁶	45 x 10 ⁶	
7.66	7.58	7.65	7.66	7.95	7.91	7.60	7.58	7.65	
0.0454			0.1579			0.0376			
43 x 10 ⁶			72.7 x 10 ⁶			41 x 10 ⁶			
7.63			7.86			7.61			
14 DÍAS									
A			B			C			
120 x 10 ⁵	130 x 10 ⁵	120 x 10 ⁵	260 x 10 ⁵	271 x 10 ⁵	269 x 10 ⁵	167 x 10 ⁵	165 x 10 ⁵	160 x 10 ⁵	
7.08	7.11	7.08	7.41	7.43	7.43	7.22	7.22	7.20	
0.0201			0.0096			0.0096			
12.3 x 10 ⁶			26.7 x 10 ⁶			16.4 x 10 ⁶			
7.09			7.43			7.21			

* UFC = Unidades formadoras de colonias

Anexo 4. Evaluación de la resistencia y susceptibilidad a antibióticos.

Tabla 6. Composición de la tarjeta utilizada para obtener el perfil de resistencia y susceptibilidad a antibióticos.

Antibiótico	CMI	Interpretación
Bencilpenicilina	0.25	S
Ampicilina	< = 2	S
Ampicilina/Sulfactam	-	S
Gentamicina de nivel alto (sinergia)	SYN-S	S
Estreptomicina de nivel alto (sinergia)	SYN-S	S
Ciprofloxacino	2	I
Levofloxacino	2	S
Moxifloxacino	0.5	S
Eritromicina	< = 0.25	S
Clindamicina	< = 0.25	R
Quinupristina/Dalfo pristina	0.5	S
Linezolid	4	I
Vancomicina	> = 0.32	R
Tetraciclina	8	I
Nitrofurantoína	256	R

*S = Susceptible; *R= Resistente; *I= Intermedia

Antibiótico anulado: Tigeciclina. Insuficiente crecimiento en el pocillo de control positivo.

No se requieren los siguientes antibióticos: detección de cefoxitina, oxacilina, gentamicina, resistencia inducible a clindamicina, rifampicina, trimetoprima/sulfametoxazol.

Anexo 5. Perfil antimicrobiano de la cepa P45.

Tabla 7. Efecto antagonista de la cepa probiótica en medio APT.

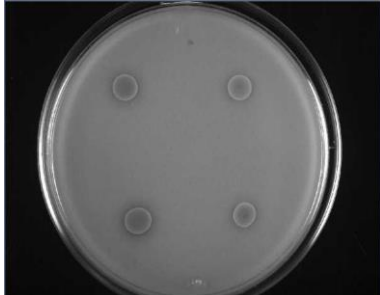
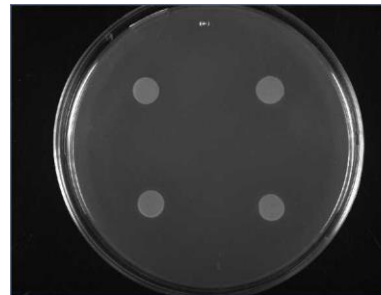
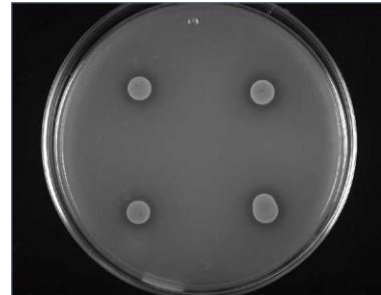
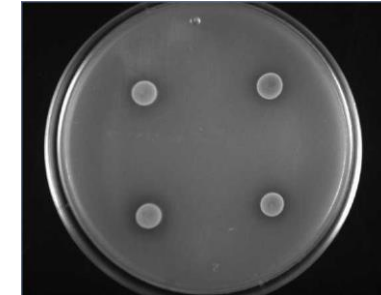

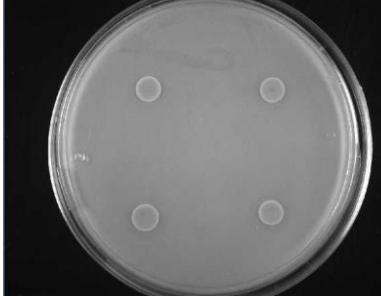
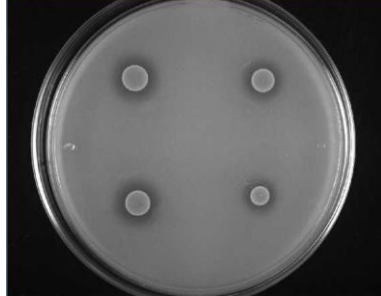

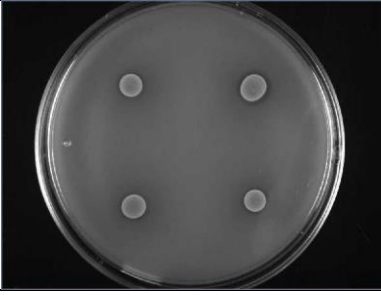

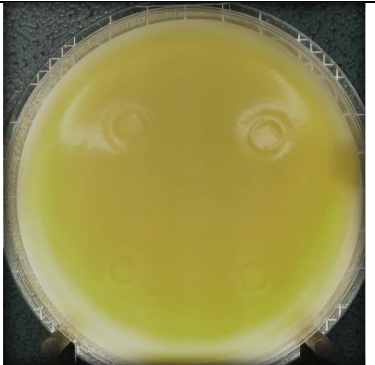
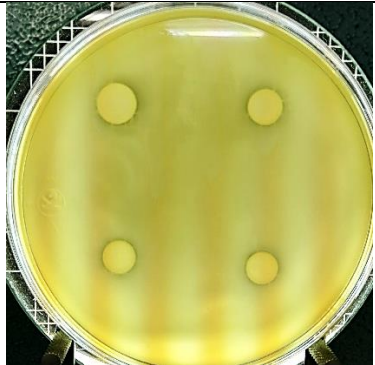



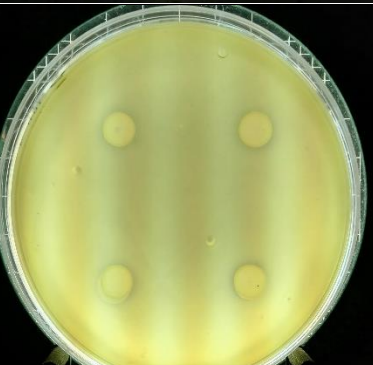
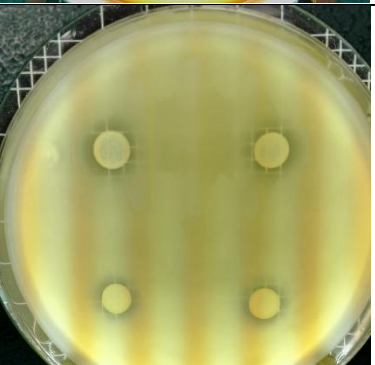
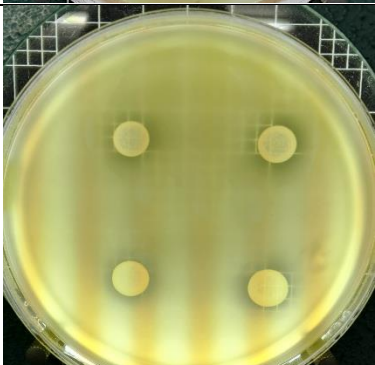

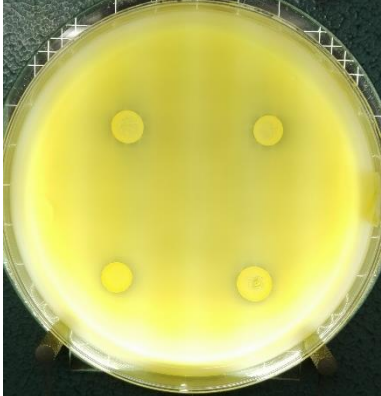
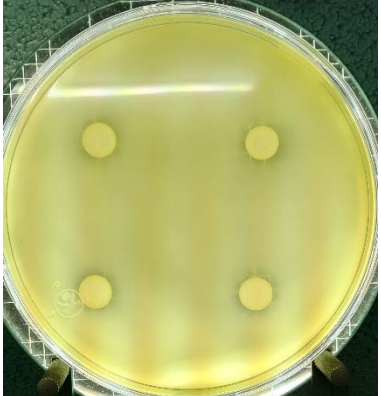
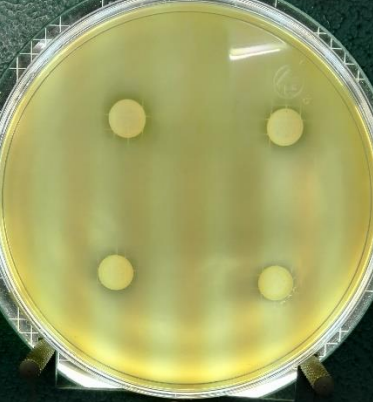

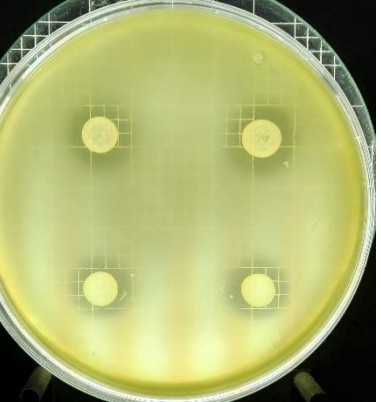
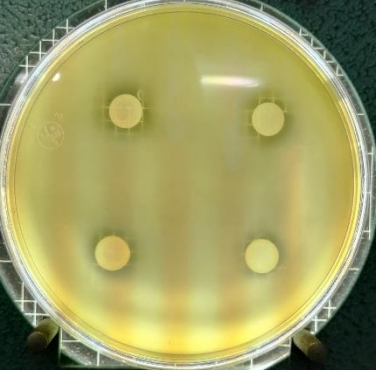

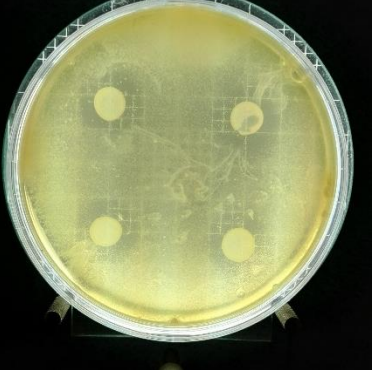
Microorganismo de prueba			
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	<i>Enterococcus faecalis</i> QB
			
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218
			
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC14028			
			

Tabla 8.- Efecto antagonista del Lote A, a distintos tiempos de muestreo.

Microorganismo patógeno	Condiciones de fermentación		
	24 horas / 28 °C	7 días / 4 °C	14 días / 4 °C
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230			
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229			

<p><i>Enterococcus faecalis</i> QB</p>			
<p><i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103</p>			
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p>			

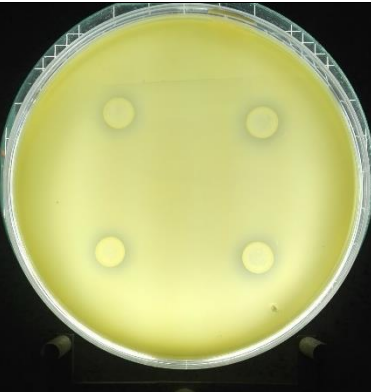
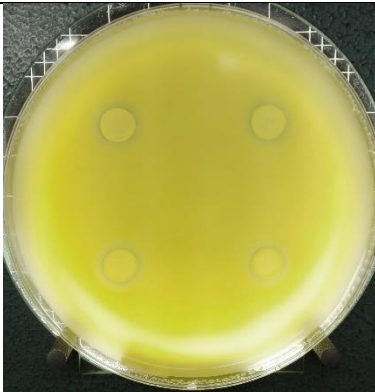
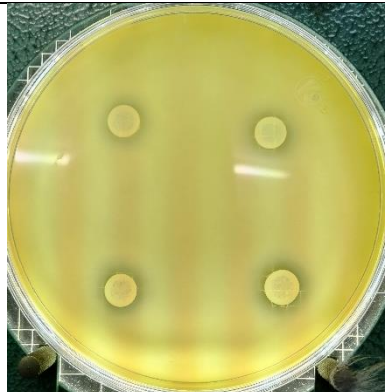

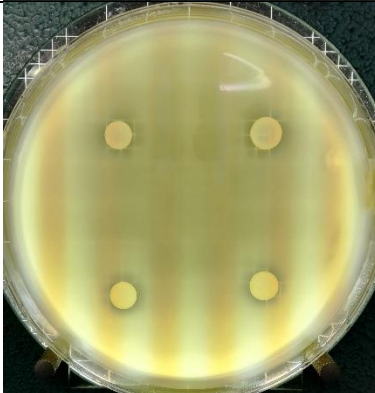
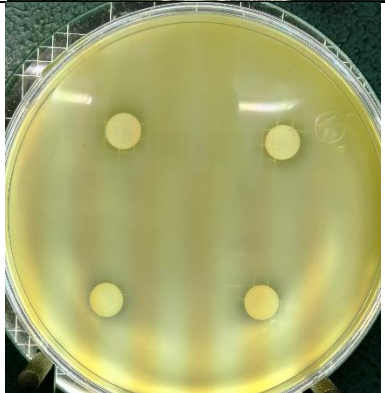
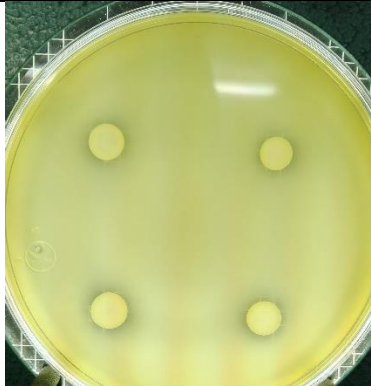
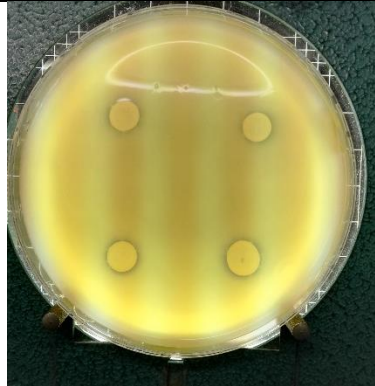


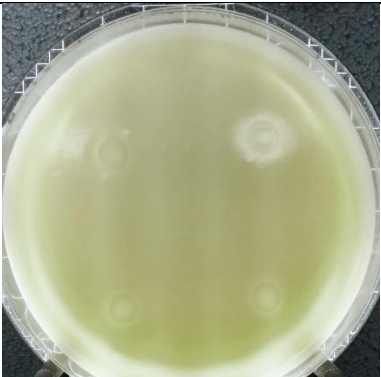
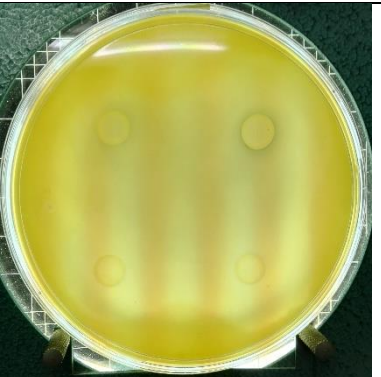



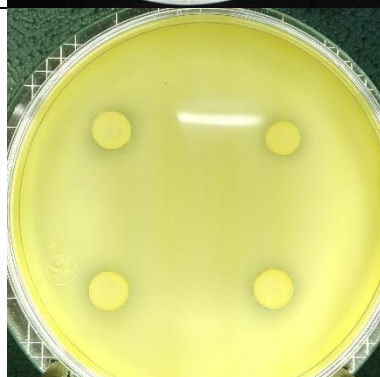


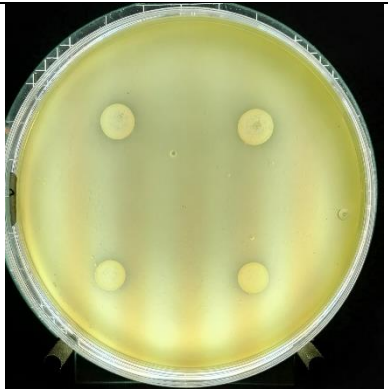
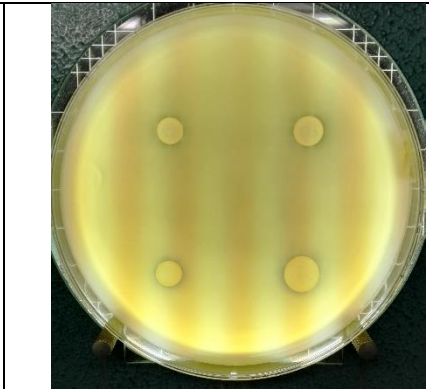


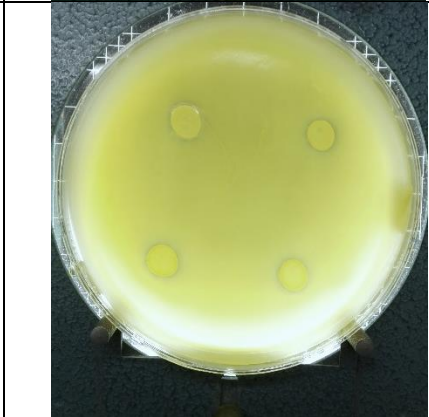
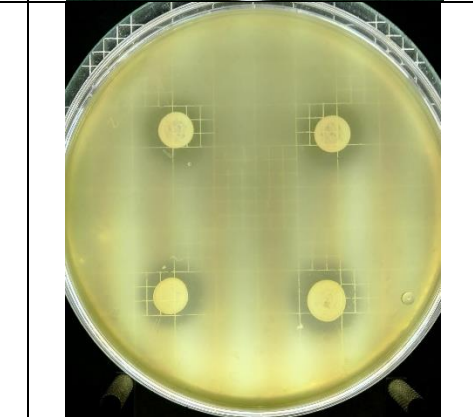
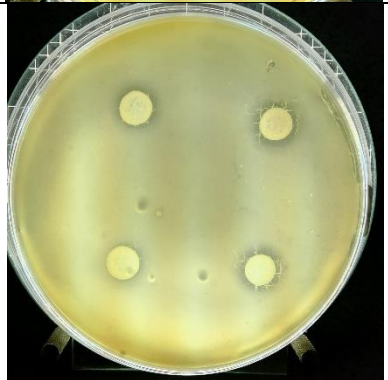
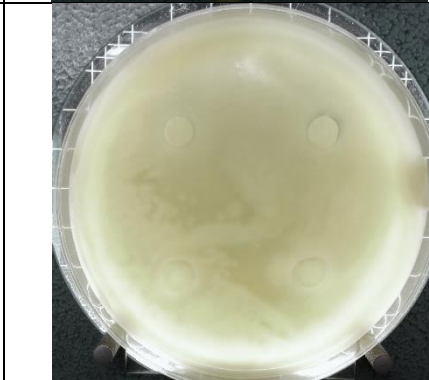
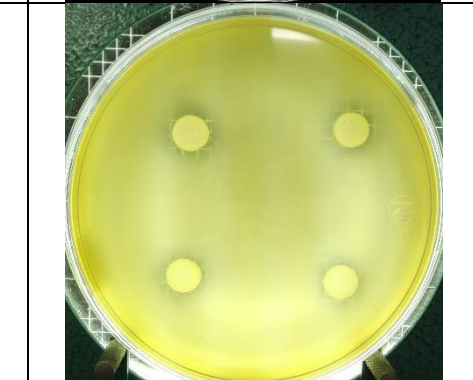
<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538</p>			
<p><i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218</p>			
<p><i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028</p>			

Tabla 9.- Efecto antagonista del Lote B, a distintos tiempos de muestreo.

Microorganismo patógeno	Condiciones de fermentación		
	24 horas / 28 °C	7 días / 4 °C	14 días / 4 °C
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230			
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633			
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229			

<p><i>Enterococcus faecalis</i> QB</p>			
<p><i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103</p>			
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p>			

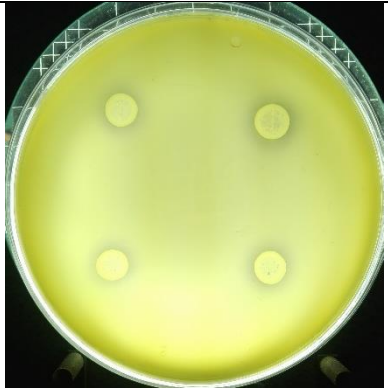
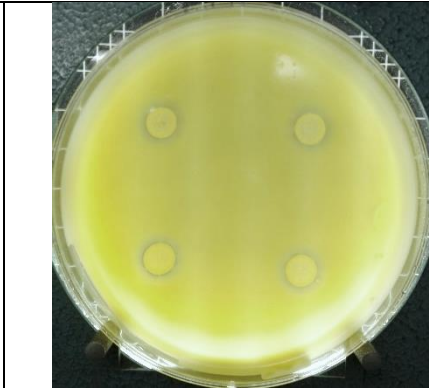
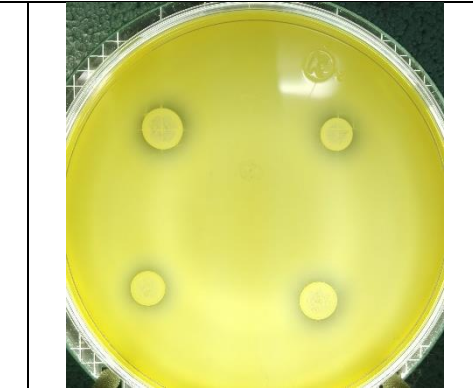

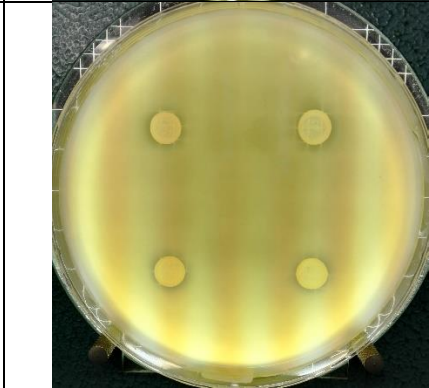

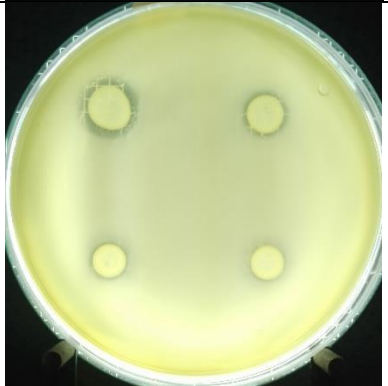

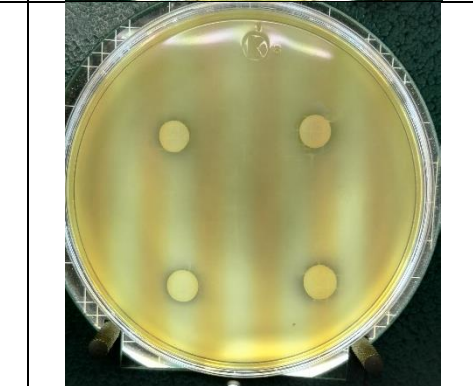
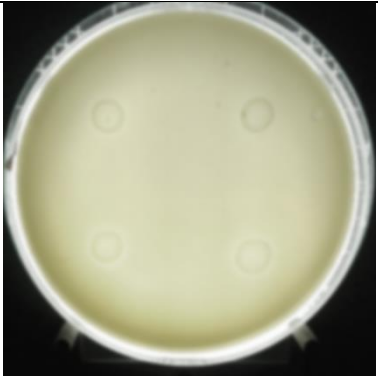





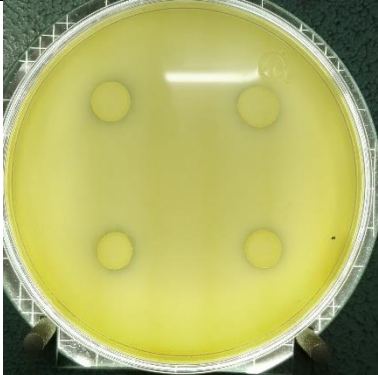
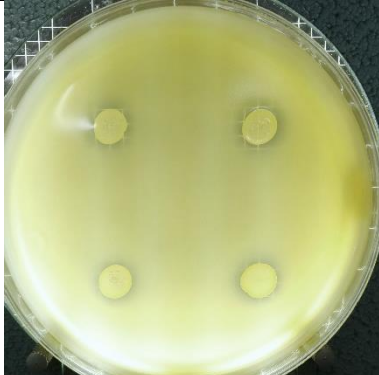


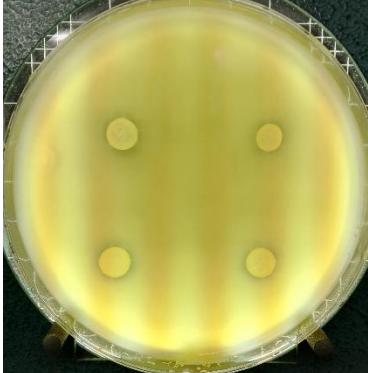
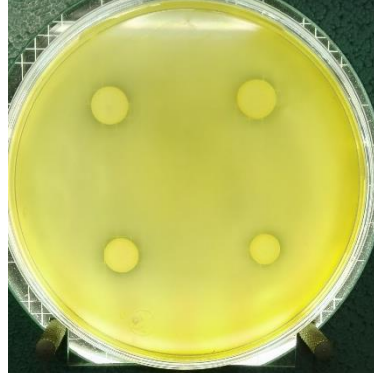
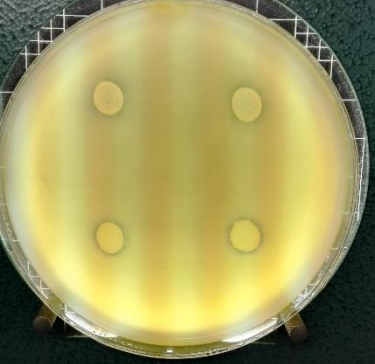

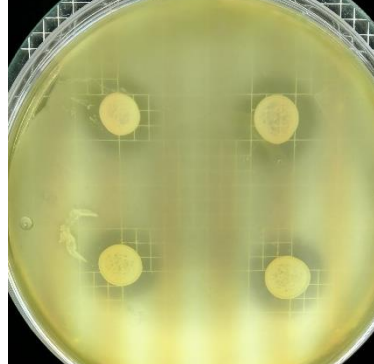


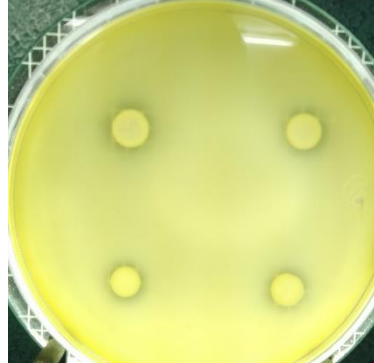


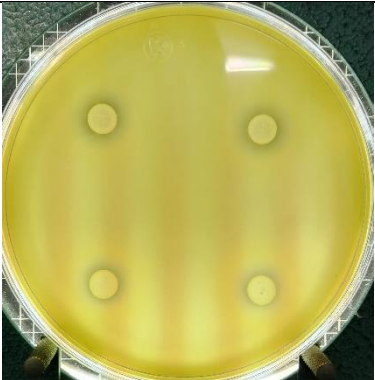

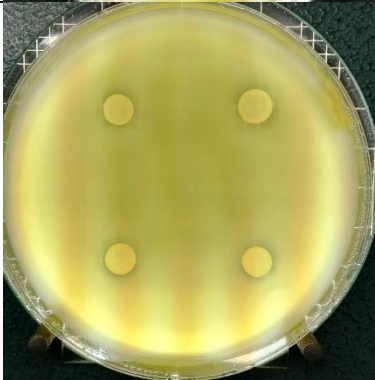

<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538</p>			
<p><i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218</p>			
<p><i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028</p>			

Tabla 10.- Efecto antagonista del Lote C. a distintos tiempos de muestreo.

Microorganismo patógeno	Condiciones de fermentación		
	24 horas / 28 °C	7 días / 4 °C	14 días / 4 °C
<i>Bacillus cereus</i> CFQ-B-230			
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633			
<i>Escherichia coli</i> 11229			

<p><i>Enterococcus faecalis</i> QB</p>			
<p><i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-B-103</p>			
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p>			

<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538</p>			
<p><i>Streptococcus pyogenes</i> CFQ-B-218</p>			
<p><i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC14028</p>	