



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO.

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
LICENCIATURA EN QUÍMICA EN ALIMENTOS**

**AISLAMIENTO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
(BAL) DE BEBIDAS FERMENTADAS: PULQUE Y
TEPACHE**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTAN:
VIRIDIANA PÉREZ PÉREZ
LUZ ANGÉLICA RAMÍREZ MARTÍNEZ**

**ASESORAS:
DRA. EVA MARÍA SANTOS LÓPEZ
M. EN C. IRAIS SÁNCHEZ ORTEGA**

MAYO 2011

Dedicatorias

Yo Viridiana Pérez Pérez dedico este trabajo a:

- ② A mis padres por estar a mi lado siempre brindándome su apoyo a cada paso que doy, por el inmenso cariño del que me han llenado desde el día en que vine al mundo y por la confianza que han depositado en mí, ¡Muchas gracias!, sin ustedes esto no sería posible.
- ② A mis hermanos César, Oscar y Carlos+ por toda la paciencia, apoyo y cariño que me han brindado siempre, y por llenar mi vida de momentos maravillosos y divertidos.
- ② A mi abuela Cirila+ por todo el cariño que siempre me ofreció, por todas sus enseñanzas y por todos los ratos de alegría que pasamos juntas.
- ② A mis tías Berta y Mayte, por todo su cariño, apoyo y por estar a mi lado siempre; las quiero mucho.
- ② A mis primos por todo el apoyo que siempre he recibido de parte suya, por todos los ratos amenos que hemos pasado juntos y por estar conmigo siempre.
- ② A mis sobrinos Emanuel y Camila por llenar mi vida de alegría
- ② A mis amigas Erika, Yarazeth, Citlali, Surya y a mi amigo Antonio de Jesús por todo su cariño, paciencia y por compartir conmigo momentos de los que sé con certeza no nos olvidaremos jamás.

Yo Luz Angélica Ramírez Martínez dedico este trabajo a:

- ② A mis padres Francisco y Araceli, por todo su amor, apoyo, confianza y comprensión, por guiarme y hacer de mí una persona de provecho y de bien. Por ser mi motivo de seguir adelante. Gracias a ustedes he llegado hasta donde estoy. Nunca podré pagarles todo su esfuerzo y dedicación. Los Amo.

- ② A mis hermanos Edgar, Berenice y Laura, por todo su amor, por su apoyo, porque nunca me han dejado sola y por sus sabios consejos que siempre me motivaban a seguir adelante y a no dejarme vencer por los obstáculos que se me presentaron en cada etapa de mi vida. Los amo.

- ② A mi novio Mauricio, por todo su amor, comprensión, paciencia, apoyo y espera. Porque siempre estuviste cuando más te necesité y me ayudaste a levantarme en los momentos en que desistía. Te amo y estoy inmensamente agradecida con Dios por permitirnos estar juntos.

- ② A mis abuelitos maternos Eleuterio y Ausencia porque siempre han estado conmigo, y me han brindado todo su cariño y apoyo. Gracias por sus sabios consejos, por sus bendiciones y preocupaciones. Los amo.

- ② A mis abuelitos paternos Miguel[†] y Eulalia[†], por cuidarme e iluminar mi camino. Porque siempre se preocuparon por mi y por mi bienestar. Siempre estarán en mi corazón.

- ② A mí cuñada Celia y a mi sobrina Ángeles, por los momentos que han compartido conmigo, por su apoyo y comprensión brindada desde su presencia en mi vida. Las quiero mucho.

- ② A mis amigas Anay, Sari, Laura, Esther, Gladys, Dulce y Jassibe, por demostrarme el significado de una verdadera amistad. Gracias por toda su ayuda, cariño, por los hermosos momentos que hemos pasado juntas y por estar siempre conmigo en mis buenos y malos tiempos. Nunca las olvidaré. Las quiero mucho.

Agradecimientos

- ② A la Dra. en C. Eva María Santos López por todo el apoyo que nos brindó durante la elaboración de este trabajo de investigación, por su paciencia y por compartir con nosotras sus conocimientos.

- ② A la M. en C. Irais Sánchez por todo el apoyo recibido de su parte durante la elaboración de este trabajo.

- ② A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por permitirnos desarrollar nuestra formación profesional dentro de sus instalaciones y por brindarnos la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de investigación.

- ② A nuestros compañeros de grupo por compartir con nosotras esta etapa universitaria llena de risas, llantos, presiones, cariño y sobre todo mucha diversión.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1. Bebidas tradicionales mexicanas	12
2.1.1 Bebidas destiladas.....	13
2.1.2 Bebidas fermentadas.....	15
2.2. Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	27
2.2.1. Características Generales	28
2.3 Importancia de las BAL en alimentos.....	37
2.3.1 Cultivos iniciadores.....	38
2.3.2 Probióticos.....	40
2.3.3 Efecto antimicrobiano	43
2.3.3.1 Ácidos orgánicos.....	43
2.3.3.2 Bacteriocinas	44
2.3.3.3 Metabolitos secundarios	47
3. JUSTIFICACIÓN	49
4. OBJETIVOS	50
4.1 Objetivo general.....	50
4.2 Objetivos específicos	50
5. MATERIALES Y MÉTODOS	51
5.1. Medios de cultivo	51
5.2. Reactivos	52
5.3. Toma de muestras	52

5.4. Determinación de pH	54
5.5. Análisis Microbiológico	54
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
7. CONCLUSIONES	73
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lugar de origen de las muestras y códigos de las mismas	53
Tabla 2. Valores promedio del pH de las bebidas analizadas	62
Tabla 3. Resultados microbiológicos de las muestras de pulque analizadas, medias y desviaciones estándar expresadas en Log UFC/mL.....	63
Tabla 4. Resultados microbiológicos de las muestras de tepache analizadas, medias y desviaciones estándar expresadas en Log UFC/mL.....	64
Tabla 5 Resultados microbiológicos de la muestra de tesgüino analizada, media y desviación estándar expresadas en Log UFC/mL.....	64
Tabla 6. Nutrientes necesarios para el crecimiento de las BAL presentes en los sustratos.....	65
Tabla 7. Morfología y número de BAL aisladas.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de elaboración del pulque.	19
Figura 2 Proceso de elaboración del tepache.	24
Figura 3. Proceso de elaboración del tesgüino	27
Figura 4. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.	32
Figura 5. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas	34
Figura 6. Análisis microbiológico de las bebidas	56
Figura 7. Procedimiento para verificar la pureza de las BAL.....	59
Figura 8. Procedimiento para la conservación de las cepas de BAL.....	61
Figura 9. Recuentos microbiológicos de las muestras de pulque.....	67
Figura 10. Recuentos microbiológicos de las muestras de tepache.....	68
Figura 11. Recuento microbiológico de la muestra de tesgüino	69
Figura 12. Morfología de las BAL aisladas	71

1. INTRODUCCIÓN

En México existe una gran variedad de alimentos y bebidas que son producidos y consumidos en los diferentes estados de la República Mexicana. Estos alimentos por lo general solo son producidos en una región o estado en particular, por lo que son considerados como “típicos”. Algunos otros alimentos son producidos en varios estados y se han vuelto representativos de toda una región. Sin embargo, independientemente del origen o características de este tipo de alimentos, no existe prácticamente información relacionada con sus características microbiológicas, ni su comportamiento y cómo los microorganismos presentes en ellas interfieren en las características de las mismas.

Respecto a las bebidas fermentadas en la región central del país se consumen principalmente el pulque y el tepache, mientras que en los estados del norte y noroeste del país el tesgüino es la bebida más común.

La bebida típica que más se produce en el estado de Hidalgo es el pulque. Este es elaborado mediante procedimientos artesanales, a partir del aguamiel. No obstante, a pesar de la historia del pulque en México y del potencial económico que representó para los estados del centro del país a mediados del siglo pasado, poco se sabe de su contenido microbiano.

El tepache es otra de las bebidas de importancia en el estado, sin embargo, poco se conoce acerca de sus características microbiológicas. El tesgüino por su parte es una bebida que se consume principalmente en las ceremonias religiosas de las comunidades indígenas del norte y noroeste del país, y hasta la fecha no se conoce a profundidad el contenido de microorganismos presentes en él.

El aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) en estas bebidas, cobra importancia si se considera que estos microorganismos pueden aportar un gran número de beneficios a la salud de quienes las consumen, además de que su uso en la industria alimentaria es amplio y cada vez cobra más auge.

Debido a ello en este trabajo se aislaron BAL de bebidas fermentadas (pulque, tepache y tesgüino) para posteriormente ser conservadas y a futuro probar su potencial como microorganismos con efecto inhibidor sobre patógenos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Bebidas tradicionales mexicanas

La producción de bebidas alcohólicas ha sido una actividad ligada a la mayoría de las culturas. En forma empírica los humanos aprendimos a encauzar las fermentaciones alcohólicas de diversos sustratos, pero especialmente a partir de cereales, frutas y productos azucarados. La elaboración de bebidas alcohólicas es tan antigua que no se puede establecer con precisión el origen de ésta práctica. Durante milenios el hombre aprendió a fermentar mostos que contenían carbohidratos mediante técnicas depuradas e incluso aprendió a destilar el alcohol para aumentar su concentración en las bebidas, todo sin tener idea de la existencia e importancia de los microorganismos (Ward, 1997).

Por mucho tiempo la fermentación fue el método por el cual se lograba obtener un mayor grado alcohólico, hasta que en el siglo XV se empezó a popularizar el arte de la destilación, generando bebidas con mayor contenido alcohólico (Pearl-Solomon *et al.*, 1998).

Las bebidas alcohólicas pueden clasificarse con base en diferentes criterios: en función del sustrato del que proceden, si son o no son destiladas, o si son simples o compuestas. Con respecto al sustrato, las bebidas alcohólicas se pueden elaborar a partir de sustratos azucarados como los jugos de frutas, de sustratos amiláceos como los cereales y de algunas plantas como el maguey. Éstas son destiladas; en el proceso de destilación se separan los materiales volátiles a diferentes temperaturas y se consideran como no destiladas cuando se elaboran por fermentación. Se les denomina simples si la bebida consta exclusivamente del producto obtenido mediante la fermentación y en su caso la destilación; son complejas si además se le adicionan algunos otros componentes que contribuyan al sabor. Además de las bebidas destiladas y no destiladas se hace una distinción intermedia, está es la de las bebidas fortificadas, cuyo grado alcohólico ha sido

incrementado mediante la mezcla de una bebida alcohólica no destilada con una bebida destilada o con alcohol (García-Garibay *et al.*, 2000).

En las bebidas no destiladas, el contenido de alcohol oscila entre 3.5 y 14% (v/v), mientras que en bebidas destiladas se encuentra entre 35 y 55% (v/v) y en bebidas fortificadas alrededor del 20% (v/v) (Ward, 1997).

Algunas bebidas alcohólicas tienen denominación de origen, esto significa que ninguna bebida puede ostentar ese nombre particular si no fue producida dentro de la región específica de esa denominación, con la materia prima del lugar y bajo determinadas normas de proceso y calidad establecidas por las autoridades de los países correspondientes y aceptados en acuerdos internacionales por otros países (García-Garibay *et al.*, 2000).

Las bebidas consideradas como tradicionales mexicanas se clasifican en destiladas y fermentadas. Las bebidas destiladas incluyen al tequila, mezcal, bacanora y sotol. Entre las bebidas fermentadas se puede mencionar al pulque, tesgüino, tepache, colonche, pozol y tuba. Dichas bebidas se elaboran local o regionalmente, con fines domésticos, medicinales-curativos o incluso religiosos o rituales y no están, por lo general, disponibles para la venta masiva sino que se utilizan en casa o siguiendo ancestrales tradiciones de los antiguos mexicanos (Godoy *et al.*, 2003).

2.1.1 Bebidas destiladas

Tequila. De acuerdo con la definición prevista en la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005 Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones, tequila es la bebida alcohólica regional obtenida por destilación de mostos, preparados directa y originalmente del material extraído, en las instalaciones de la fábrica de un productor autorizado. Es tradicional del estado de Jalisco, consta con denominación de origen en cinco estados de la República Mexicana (Jalisco,

Guanajuato, Michoacán, Tamaulipas y Nayarit) y se elabora a partir del agave azul (*Agave tequilana* Weber). El proceso consiste en cortar el agave hasta dejar solas las cabezas, luego se descuartizan para proceder a cocerlas, se extraen los azúcares contenidos en las cabezas de agave y se pasa a la fermentación agregándole levadura, siendo susceptibles los mostos de ser enriquecidos y mezclados conjuntamente en la formulación con otros azúcares hasta en una proporción no mayor de 49% de azúcares reductores totales. Una vez fermentado se destila, obteniendo en la primera destilación el “ordinario” y en la segunda destilación se obtiene el tequila. Las características del tequila van a depender del tiempo de reposo, clasificándolos en: tequila blanco, el cual se obtiene al término de la destilación; tequila reposado que permanece de dos meses hasta menos de un año en barricas de encino o roble y en tequila añejo, cuando se deja madurar mínimo un año en barricas de roble blanco. También va a depender del tipo de tequila, si es puro (solo azúcar del agave) o mixto (mostos enriquecidos con azúcares) y del volumen de la barrica (Lennort, 2000).

Mezcal. Es producto de la fermentación del corazón de la planta de agave o maguey. El cultivo de maguey mezcalero se ubica principalmente en Oaxaca y en los valles centrales. El proceso de elaboración es similar al tequila, el maguey después de haber crecido hasta 8 ó 9 años se le cortan las pencas obteniendo la piña, estos cuartos de piña, se cargan a los cajones; al estar cargados los cajones a su máxima capacidad estos se sellan en la parte superior y en las puertas por donde posteriormente se descargará el maguey cocido. El maguey se cuece por 72 h, se saca de los mismos y se coloca en los molinos de piedra. El jugo se deja reposar por 24 h para su fermentación. Finalmente se bombea al alambique para proceder con la destilación (Lennort, 2000).

Bacanora. Es un licor destilado originario de México, incoloro y de alta graduación alcohólica, parecido al mezcal. Es elaborado a base del vegetal *Agave angustifolia* Haw antes llamado *A. pacifica*. La mayoría de la producción de esta bebida es originaria del estado de Sonora, al noroeste del país y elaborada de manera artesanal. Bacanora es una denominación de origen avalada ante organizaciones

comerciales internacionales. El proceso de elaboración de esta bebida es similar a la del tequila y el mezcal. La piña o cabeza de maguey recién recolectadas se disponen dentro de un pozo, donde se hornean las cabezas durante 48 h, esto con la finalidad de hidrolizar los almidones y carbohidratos en azúcares digeribles para la levadura en el proceso de fermentación. Posteriormente las cabezas de maguey horneadas son cortadas en fragmentos y molidas para la extracción del jugo. La pulpa del maguey molido se dispone en barricas con agua y se deja fermentar por 5 días. La pulpa fermentada se pone en un alambique para su destilación obteniendo el bacanora como producto resultante de los vapores condensados (Godoy *et al.*, 2003).

Sotol. Es una bebida alcohólica destilada que se elabora a partir de una agavácea silvestre llamada “sereque” o “sotol” que crece preferentemente en el desierto del norte de México, Nuevo México y oeste de Texas. Esta bebida continúa como un producto artesanal y con poca industrialización. Tiene un sabor y textura similar al tequila, puesto que es producido de forma similar; sin embargo tiene propiedades menos dulces y más fuertes (Godoy *et al.*, 2003).

2.1.2 Bebidas fermentadas

Colonche. Es la bebida alcohólica roja de sabor dulce, obtenido por fermentación espontánea del jugo de tuna, especialmente de la tuna Cardona (*Opuntia streptacantha*). Las tunas se pelan y enseguida se exprimen y cuelan a través de un cedazo de ixtle o paja para eliminar las semillas. El jugo se hierve, luego se deja reposar para que sufra la fermentación espontánea; se le puede agregar al jugo también algunas de las cáscaras de la tuna, ya que éstas son las que contienen los microorganismos que inician la fermentación (Godoy *et al.*, 2003).

Pozol. Del náhuatl *pozolli*, es una bebida densa, a base de cacao y maíz de origen mesoamericano que es popular en el sur de México, en especial en el estado de Tabasco, así como en algunas regiones de Chiapas y parte de Centroamérica.

Para elaborar esta bebida el maíz se nixtamaliza, luego los granos se frotan con las manos y se envuelve en hojas de plátano. Se muele y se bate en agua fría, se deja fermentar la masa 4 ó 5 días. Una vez fermentada la masa, se bate en agua produciendo una suspensión blanca y se bebe solo o adicionado con sal, azúcar, miel o chiles secos molidos. Ésta se consume como bebida refrescante y nutritiva (Godoy *et al.*, 2003).

Tuba. Es un vino de palma que se obtiene por la fermentación de la savia del tallo de varias especies de palma, principalmente de la palma de coco. La tuba es una bebida cuyo nombre y forma de preparación fueron introducidas en México desde las Filipinas, considerada como una bebida semejante al pulque (Godoy *et al.*, 2003).

Pulque. Es una bebida alcohólica tradicional mexicana obtenida de la fermentación natural de la savia azucarada o aguamiel que produce el maguey pulquero donde se obtiene al eliminar el quiote o brote floral y al hacer una cavidad en donde se acumula el aguamiel en cantidades que puedan llegar a cinco litros diarios durante tres meses (Ruvalcaba, 1983).

El pulque es un producto blanco, viscoso, mucilaginoso, alcohólico, con sabor ácido y aroma peculiar. Es suavemente ácido ya que su pH está entre 3.5 y 4.2, lo que evita la proliferación de microorganismos patógenos (Anderson *et al.*, 1946). Contiene del 7 al 10% v/v de alcohol. Durante su fermentación es dulce y espumeante, cuando la fermentación termina se torna viscoso y ácido. La calidad del pulque depende del tipo de maguey, la tierra donde crece y del clima en su entorno (García-Garibay *et al.*, 2000; Cervantes y Pedroza, 2007).

Los estudios especializados afirman que el pulque es una de las bebidas más completas y balanceadas, que contiene los niveles vitamínicos y energéticos necesarios para el ser humano. El pulque ha contribuido de forma importante en la adquisición de nutrientes en la dieta de las personas que habitan en sectores rurales de México, por ejemplo el pulque contribuye con el 10% de tiamina, 24%

de riboflavina, 23% de niacina, 48% de vitamina C y 26% de hierro en la dieta del otomí (Backstrand *et al.*, 2001).

Entre los componentes del pulque sobresalen: el agua, el alcohol, los azúcares, las sustancias albuminoides y las sales minerales, encontrándose fosfatos, carbonatos, sulfatos y cloruros. Como elementos básicos contiene calcio, sodio, potasio, magnesio y hierro (Ortíz de Montellano, 1990).

Esta bebida es consumida por poblaciones indígenas y mestizas de muchas regiones del país (Escalante *et al.*, 2004). Históricamente, toda la zona centro del país ha sido la mayor consumidora y productora de pulque, por lo que esta era una importante actividad económica. Actualmente Hidalgo sigue siendo considerado el mayor productor de pulque en la República Mexicana con el 70% de la producción nacional, le sigue Tlaxcala, el Estado de México y Puebla. En menor proporción de producción esta San Luis Potosí, Oaxaca, Veracruz, Guanajuato y Zacatecas (García-Garibay *et al.*, 2000).

En la época prehispánica el pulque era conocido como bebida de los dioses ya que se concebía como bebida ritual y como ofrenda ceremonial para los dioses (Delfín, 2004). Esta bebida era consumida de manera exclusiva por gobernantes, sacerdotes, ancianos y por las víctimas que iban a ser sacrificadas. Las mujeres lo podían consumir cuando estaban embarazadas o en periodo de lactancia. La embriaguez era penada con fuertes castigos, incluso la muerte (Camacho, 2005; Castillo y Leyva, 2005).

Después de la época de la conquista, el pulque perdió tanto su concepto de divinidad como el simbolismo ceremonial y religioso; los españoles invalidaron las sanciones por el alcoholismo injustificado, y debido a esta ingesta de pulque se convirtió en un verdadero problema de salud pública, ya que su consumo se popularizó y generalizó, principalmente entre los indígenas dedicados a la servidumbre (Camacho, 2005; Castillo y Leyva, 2005).

En la actualidad, a pesar de que el consumo de pulque ha sufrido una disminución progresiva y es concebida como una bebida que sólo se consume entre la clase

humilde y campesina, en muchos pueblos indígenas del centro del país, especialmente del Valle del Mezquital, dentro del Estado de Hidalgo, sigue siendo una bebida tradicional (Camacho, 2005; Castillo y Leyva, 2005; Delfín, 2004; Musacchio, 1999).

Maguey pulquero

El maguey es una planta que pertenece al orden de las *Amarilidáceas* y al género *Agave*. Tiene forma de roseta, compuesta por un tallo grueso y corto, sobre el que se insertan en espiral las hojas. Las hojas jóvenes son rectas y ligeramente separadas del eje central, cuando son adultas están separadas del eje, son gruesas, carnosas y se curvan con dirección al suelo con una púa terminal y espinas ganchudas en los bordes. Florece sólo una vez y muere después de fructificar (Martínez, 1979).

Por su importancia económica el género de los agaves se divide en tres grupos: los textileros, los pulqueros y los mezcaleros (Ruvalcaba, 1983). Las especies de las cuales se obtiene el pulque de forma común son *A. salmiana*, *A. mapisaga* y *A. atrovirens* que se distribuyen principalmente en el Valle de México y en los estados de México, Tlaxcala, Hidalgo y Puebla (Rzedowski y Calderón, 1990).

El maguey manso (*A. atrovirens*) llega a dar hasta cuatro litros de aguamiel por alzada o recolección que regularmente se hace dos veces por día durante cuatro meses aproximadamente, seguido a esto el agave muere (Ruvalcaba, 1983). *A. salmiana*, y *A. mapisaga* se usan con igual fin, pero el producto es de diferente calidad (Martínez, 1979, Rzedowski y Calderón, 1990).

Proceso de elaboración del pulque

La elaboración del pulque a pequeña escala y de manera artesanal forma parte de la cultura de muchas zonas rurales de la meseta central de México, sin embargo, su producción varía de unos pocos litros hasta miles de litros en un mismo sitio.

El proceso de elaboración del pulque involucra diferentes etapas que van desde la recolección del aguamiel, hasta la distribución y venta del mismo (Figura 1). Estas etapas son:

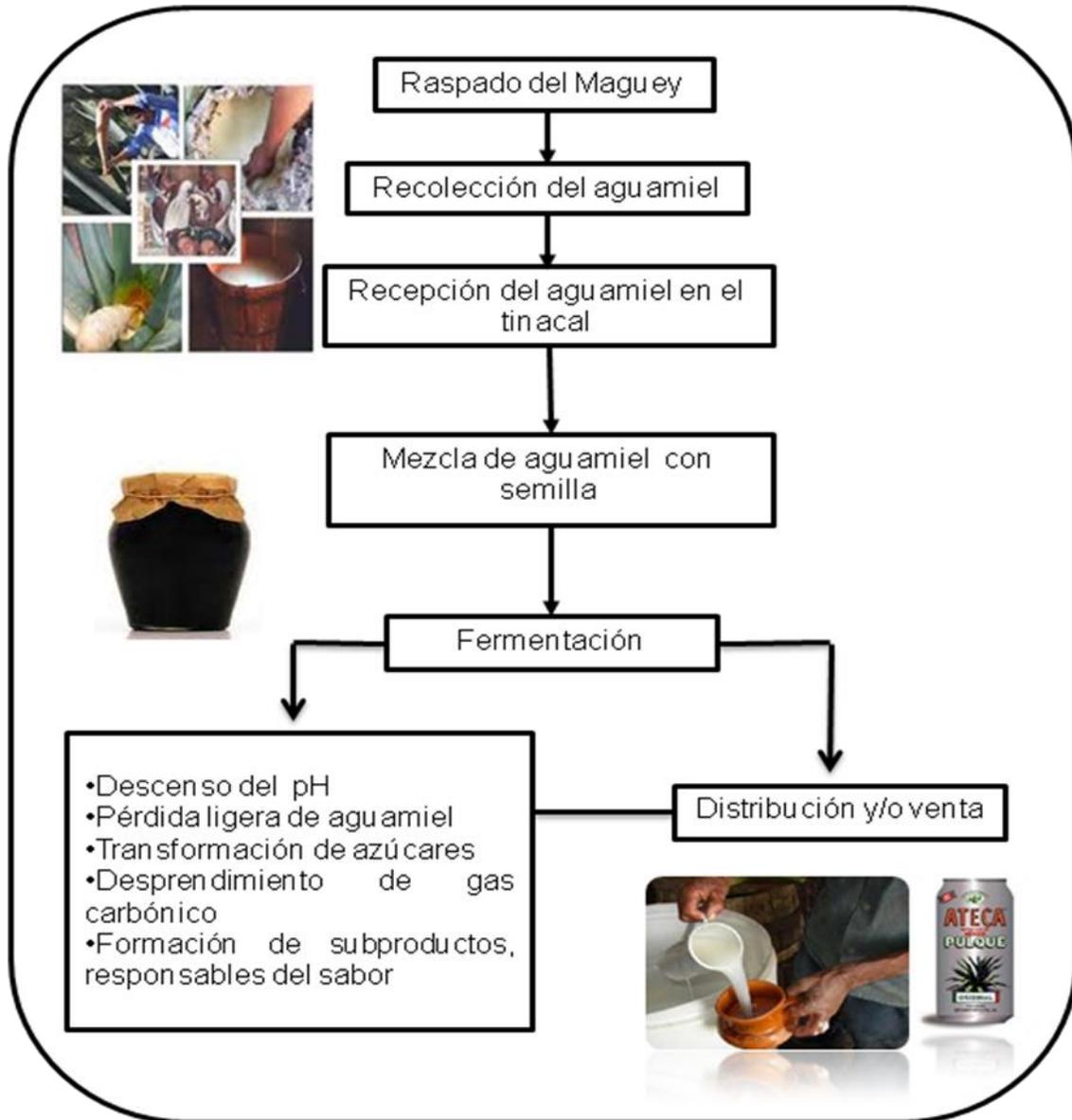


Figura 1. Proceso de elaboración del pulque (Adaptada de Abundis, 2007, García-Garibay *et al.*, 2000, Hatcher *et al.*, 1992, Ruvalcaba, 1983).

1. El raspado del maguey, que tiene por objeto evitar que el tejido de la concavidad del maguey donde se acumula el aguamiel cauterice y así se continúe emanando de este el aguamiel. El raspado lo efectúa el tlachiquero o recolector de aguamiel con un “raspador” (tipo de navaja filosa y curva en forma de concha que se adapta al tipo de corte en una superficie cóncava) (Ruvalcaba, 1983).
2. La recolección del aguamiel, es el procedimiento de extracción del aguamiel de los diferentes magueyes. Éste se efectúa con una pipeta hecha con el fruto de una cucurbitácea (*Lagenaria siceraria*) conocida como “acocote”. Es un guaje oblongo con una cavidad variable que llega a ser de hasta 8 L (Abundis, 2007).
3. El aguamiel recolectado es depositado en los “toros” o tinas de madera. La capacidad es de 500 a 800 L. Dado que las “magueyeras” (campo donde están los magueyes) no siempre están cerca del tinacal o lugar donde se procesa el producto este es transportado por medio de animales de granja o dependiendo de la zona en vehículos motorizados (Ruvalcaba, 1983).
4. La recepción del aguamiel en el tinacal o lugar de procesado del pulque se efectúa a diferentes horas; durante la mañana y por la tarde. El aguamiel que ha sido recolectado por el tlachiquero es depositado en tinas de madera de diferentes volúmenes según la capacidad del tinacal y el punto de fermentación del pulque en la tina (Hatcher *et al.*, 1992).
5. Para elaborar el pulque, éste es inoculado con la “semilla”, “nana”, “madre” o “pie de cuba”, lo que disminuye el tiempo que tomará la fermentación espontánea, durando de 12 a 48 h a 25°C. El inóculo es preparado mediante fermentación natural de aguamiel de alta calidad, en tinacales de 25 L protegidos generalmente con manta de cielo, cuidando que los recipientes no tengan ninguna sustancia que inhiba a los microorganismos mesofílicos. La producción del inóculo llega a tomar de 25 a 30 días. Después de la inoculación, la fermentación se continúa, vaciando parcialmente tinacales y llenándolos con aguamiel fresco (Chellapandian *et al.*, 1998; García-Garibay *et al.*, 2000).

Otra manera de elaboración consiste en comprar las aguamieles, procesar la semilla y expender la mayor parte de su producto como pulque sintético (tipo de pulque que es elaborado a partir de la fermentación de azúcar comercial disuelta en agua; el aguamiel se utiliza únicamente para darle cuerpo, aroma y sabor de pulque verdadero). Entre estos dos tipos extremos hay una gama numerosa de explotaciones con características intermedias y combinadas (Ruvalcaba, 1983).

6. Durante la fermentación el descenso del pH tiene un efecto directo en la selección de los microorganismos viables en el producto final y en el tipo de flora predominante: levaduras, hongos y bacterias, entre las que destacan las BAL (Hatcher *et al.*, 1992).

También se presentan cambios importantes como un incremento en el porcentaje de etanol y formación de exopolisacáridos como B-glucanos y dextranos, compuestos de alto peso molecular los cuales generan un incremento en la viscosidad transformando el fluido newtoniano a no newtoniano (Chellapandian *et al.*, 1998).

En el proceso se pueden distinguir tres tipos de fermentación: la fermentación alcohólica, la fermentación láctica y la fermentación viscosa, aunque *Leuconostoc mesenteroides*, responsable de la fermentación viscosa, al ser un microorganismos heterofermentativo, es también parcialmente responsable de la producción de ácido láctico y de etanol (Escalante *et al.*, 2004).

El pulque puede adquirir características no deseables, que se manifiestan cuando no se tiene un control durante los procesos microbiológicos: puede sufrir una fermentación acética, una deficiente producción de dextranos, una excesiva fermentación láctica, una deficiente fermentación alcohólica, etcétera, lo cual se ve reflejado en las propiedades sensoriales del pulque (García-Garibay *et al.*, 2000).

Microbiología en el pulque

Los microorganismos contenidos en el pulque han sido estudiados tanto por métodos tradicionales (Sánchez-Marroquín *et al.*, 1969) como por métodos sofisticados, Escalante *et al.* reporta (2004) que los estudios de microbiología se han enfocado más en el aislamiento y la identificación de microorganismos presentes en el aguamiel; por esto, ellos estudiaron tres muestras de pulque empleando técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como la ampliación de genes 16S rRNA y análisis de secuencias. En este estudio se reporta que las bacterias dominantes fueron Gram positivas, en específico del género *Lactobacillus* con un 80.97% en las muestras (Escalante *et al.*, 2004).

De acuerdo a lo reportado por Cervantes y Pedroza (2007) las levaduras que mayormente se presentan en el pulque son de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, así mismo se encuentran especies de géneros como *Candida*, *Kloeckera*, *Rhodotorula* y *Torulopsis*; en cuanto a bacterias las más abundantes son *Lactobacillus buchneri*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc dextranicum*, responsables de la viscosidad característica produciendo polisacáridos del tipo de las dextranas; además de *Zymomonas mobilis*, responsable del inicio de la fermentación alcohólica transformando la glucosa en ácido láctico y alcohol, liberando dióxido de carbono (Abundis, 2007; Cervantes y Pedroza, 2007).

Tepache. El tepache es una bebida tradicional mexicana que se elabora desde épocas prehispánicas, la palabra tepache proviene del náhuatl *tepiatl* que significa bebida de maíz (Moreno, 2005).

A pesar del significado de la palabra, la elaboración de tepache ha ido evolucionando a lo largo del tiempo cambiando de una bebida que se elaboraba con maíz y caña de maíz a una combinación de maíz, caña de maíz o de azúcar y piña, hasta que actualmente se elabora únicamente con restos de frutas como la piña, manzana, naranja y guayaba con azúcar. Es importante mencionar que en

algunas regiones de Oaxaca, Guerrero, Puebla, Sonora y Veracruz aún es elaborado tradicionalmente a base de maíz y azúcar (Moreno, 2005).

Características fisicoquímicas y sensoriales

Las bebidas de tepache analizadas por Moreno (2005) poseen las siguientes características fisicoquímicas; pH que va de 3.22 a 3.66, un porcentaje de acidez (expresado en términos de ácido láctico) de 0.2-0.8 %, porcentaje de etanol de 0.14-0.62 %, el contenido de ácido láctico y acético fue de 0.15-0.49 % y 0.21-0.04 % respectivamente (Moreno, 2005).

Los atributos sensoriales de la bebida son debidos a las características de la fruta empleada en su elaboración, así como al proceso de fermentación que se lleva a cabo; presenta sabor dulce y agradable, sin embargo a medida que aumenta el tiempo de fermentación el sabor dulce se percibe con menos intensidad y aumenta el sabor a alcohol, las notas ácidas son poco percibidas en la bebida. Presenta un color cobre con apariencia brillante y con partículas en suspensión. El olor de la bebida es afrutado y en algunas ocasiones se perciben notas a alcohol (Moreno, 2005).

Proceso de elaboración del tepache

El proceso de elaboración del tepache no está estandarizado. A continuación se describe el método tradicional para su producción:

Se realiza la mezcla del agua y los trozos de piña dentro de un barril de madera; posteriormente se colocan las cáscaras de la misma, después el tamarindo machacado y por último el jugo y las cáscaras de naranja, normalmente las frutas son añadidas en las siguientes proporciones 2:1:1, piña, tamarindo y naranja respectivamente.

La mezcla se deja fermentar dentro del barril por 24 h sin añadir azúcar, transcurrido este tiempo la bebida es diluida al 50 % con agua y transferida a otro barril, en el cual se agrega un 10 % de azúcar y se deja fermentar por 24 h.

Pasado este tiempo se repite el procedimiento sólo que esta vez la fermentación dura doce horas (figura 2).

Una vez terminada la fermentación de la bebida se corrige el sabor de la misma con la adición de más azúcar, hasta obtener un valor aproximado de 12 a 13° Brix.

Es importante mencionar que en muchos casos los tiempos de fermentación no son constantes, generalmente la bebida se deja fermentar por más de 60 h debido a que permanece en los barriles hasta que es vendida; para enmascarar el sabor ácido del tepache cuando este ha sido fermentado por más tiempo los productores agregan azúcar (Moreno, 2005).

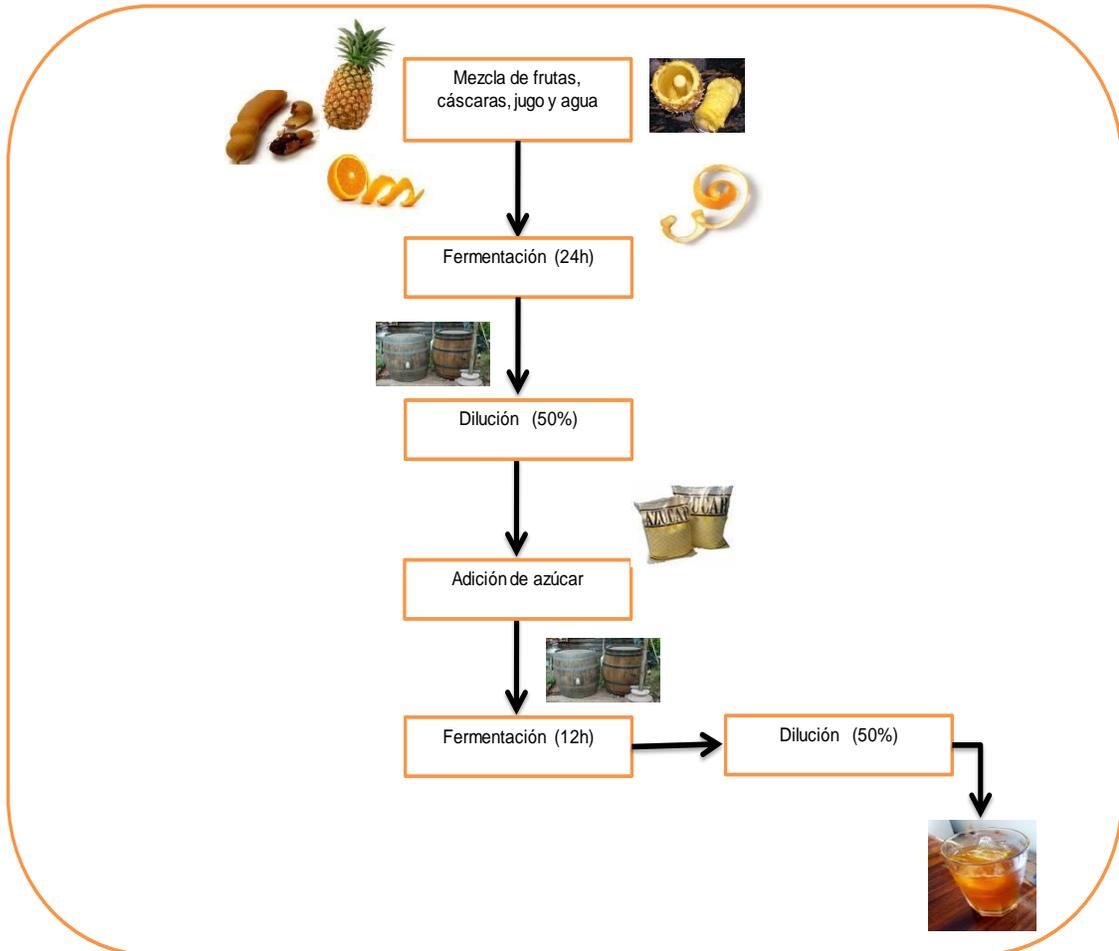


Figura 2. Proceso de elaboración del tepache (Adapatada de Moreno, 2005).

Microbiología del tepache

Pocos son los estudios científicos que se han realizado acerca de esta bebida sin embargo se sabe que el interés por conocer más acerca de ella se remonta a tiempos antiguos, cuando el consumo de la misma comienza a popularizarse en México (Moreno, 2005).

En el año de 1953 se aislaron microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida inconspicua*; posteriormente en 1978 se encontró *Candida queretana* y *Pichia membranaefaciens* (Moreno, 2005).

En el año de 1932 se realiza el primer aislamiento de microorganismos del tepache, los resultados de este primer estudio coinciden con los del siguiente realizado en el año de 1952 (Moreno, 2005).

De acuerdo a Moreno (2005) las colonias de microorganismos (levaduras y bacterias) formadas en el tepache son de color blanco parecidas a granos de arroz cocido, se forman cuando la bebida es dejada a la intemperie. Las colonias de microorganismos mencionadas están compuestas por una matriz de polisacáridos generalmente dextranas, dispuestos en dos capas. La externa es compacta y en ella se encuentran bacterias y levaduras, mientras que la interna presenta una estructura esponjosa debido a la acumulación de CO₂ producido durante la fermentación. Las macrocolonias formadas son usadas en múltiples ocasiones como semilla en la producción de tepache. Las especies de microorganismos encontradas por el autor en el tepache incluyen: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* ssp. *Salivarius*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis*, *Lactobacillus* spp, *Weissella confusa*, *Lactococcus* spp, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus* spp, *Acetobacter* spp, *Gluconobacter* sp, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella* sp, *Acinetobacter* sp, *Bacillus* spp, *Micrococcus* sp, *Escherichia coli*, *Candida guilliermondii*, *Candida intermedia*, *Candida pseudointermedia*, *Candida sorbosa*, *Candida sake*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera africana*, *Kloeckera apiculata*, *Kloeckera apis*, *Kloeckera*

japonica, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Penicillium* sp. (Moreno, 2005).

Tesgüino. La palabra tesgüino es de origen náhuatl viene de “*tecuin*” que puede traducirse como “*latir*”, esta bebida es típica de los pueblos indígenas del norte y de noroeste de México (Yaquis y Pimas en Sonora, Tarahumaras en Chihuahua, Guarijíos en Chihuahua y Sonora, Tepehuanos en Durango, Huicholes en Jalisco y Nayarit y Zapotecos en Oaxaca) y de la población mestiza de varios estados del norte y noroeste de México (Chihuahua, Sinaloa, Durango, Nayarit, Jalisco y Oaxaca) (Lappe y Ulloa., 1989; Paredes *et al.*, 2006).

Entre los pueblos indígenas el tesgüino se consume durante ceremonias religiosas, funerales y en los juegos deportivos; mientras que entre la población mestiza es consumido como un refresco de bajo contenido alcohólico, se sabe que incluso los niños ingieren esta bebida si se le diluye con agua (Lappe y Ulloa, 1989).

Proceso de elaboración del tesgüino

Para la preparación de tesgüino se hacen germinar los granos de maíz en la obscuridad, esto para evitar el reverdecimiento de los brotes; durante este proceso los almidones presentes en los granos de maíz son transformados en azúcares simples, una vez ocurrida la germinación, los granos son molidos, se mezclan con agua y se hierven, posteriormente se cuela la mezcla y se pone a fermentar por aproximadamente siete días, el inóculo de la bebida se encuentra adherido a los recipientes donde se elabora el tepache y procede de bebidas elaboradas anteriormente, el proceso se muestra en la figura 3 (Lappe y Ulloa., 1989; Paredes *et al.*, 2006).

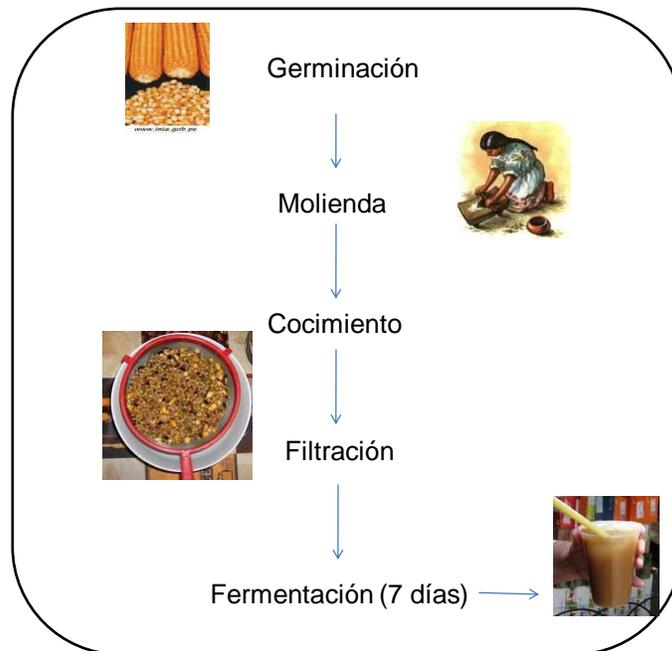


Figura 3. Proceso de elaboración del Tescüino (Adaptada de Paredes *et al.*, 2006).

Microbiología del tescüino

De esta bebida se han aislado algunos microorganismos pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Sacharomyces*, *Streptococcus*, *Candida*, *Criptococcus*, *Hansenula*, *Pichia*, *Geotrichum* y *Penicillium* (Ulloa *et al.*, 1987). No se cuenta con más información acerca de los microorganismos presentes en esta bebida ya que los estudios que se han realizado de la misma son limitados.

2.2. Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Bajo el término BAL se agrupan diferentes géneros que tienen como característica común y principal la producción de ácido láctico. Las BAL comprenden los géneros

Lactobacillus, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus* y *Weissella* (Fernández, 2000).

Estas bacterias se localizan frecuentemente en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno (Aguirre y Collins, 1993), como por ejemplo, la leche y productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, ensilados, pescado y derivados de la pesca (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Stiles y Holzapfel, 1997; Cintas *et al.*, 2001). Además, algunas bacterias lácticas son habitantes comunes del tracto gastrointestinal y mucosas del hombre y animales (Jay, 2000).

Las BAL desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación; y son utilizadas en la industria alimentaria, no solamente por su habilidad por acidificar y por lo tanto preservar alimentos de las esporas, sino también por su implicación en la textura, sabor, olor y desarrollo de aroma de alimentos fermentados así como sus propiedades antimicrobianas (Parra, 2010).

2.2.1. Características Generales

Las BAL incluyen un grupo de géneros que poseen características ecológicas y metabólicas de importancia económica y tecnológica en los alimentos (Axelsson, 1993).

En 1919 Orla-Jensen elaboró una monografía en la que asienta que las verdaderas bacterias del ácido láctico constituyen un grupo natural de bacterias Gram-positivas, generalmente inmóviles, no esporuladas, las cuales poseen forma de cocos o bacilos. Son fermentadoras de carbohidratos con producción de ácido láctico como producto principal, y tolerantes a los ácidos. Además son catalasa y oxidasa negativa porque están desprovistas de citocromos, no realizan fosforilación acoplada a cadena transportadora de electrones, por lo que obtienen su energía por fosforilación oxidativa a nivel de sustrato mientras oxidan los

carbohidratos y no tienen un ciclo de Krebs funcional (Jay, 2000; Stiles y Holzapfel, 1997).

Son anaerobias facultativas o microaerofílicas (soportan tensiones reducidas de oxígeno) (Larpent, 1994; Adams y Moss, 1998).

Las BAL se caracterizan por numerosas exigencias nutricionales, ya que se reproducen y crecen en medios ricos en vitaminas, bases nitrogenadas y fuentes de carbono; así, el medio debe aportar una mezcla compleja de las vitaminas B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas; y es por ello que pueden desarrollarse en alimentos como leche, productos lácteos, vegetales en descomposición, carnes, etc., (Leveau y Bouix, 2000). A pesar de ser muy exigentes, éstas son débilmente proteolíticas y lipolíticas (Santillán, 2004).

Además de los requerimientos nutricionales, la temperatura es otro de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las BAL (Parra, 2010). Existe una temperatura óptima a la cual la velocidad de crecimiento es más alta y depende de las características del microorganismo utilizado, como también de las condiciones ambientales. Las BAL son mesófilas, aunque algunas son psicrotrofas capaces de crecer a temperaturas tan bajas como 5°C y otras a temperaturas tan altas como a 45°C, generalmente su temperatura óptima se encuentra entre 25°C y 30°C (Parra, 2010, Santillán, 2004).

En cuanto al pH de crecimiento, existen algunas que pueden desarrollarse desde pH 3.2 hasta 9.6, pero la mayoría crece entre 4.0 y 4.5 (Axelsson, 1993).

Debido a las características de las BAL y a su importancia en la industria alimentaria, se utilizan medios de cultivo selectivos o diferenciales para su aislamiento y recuento, uno de los más utilizados es el medio MRS (Man-Rogosa Sharpe).

2.2.2. Metabolismo de los carbohidratos

Muchos microorganismos son capaces de provocar cambios químicos en diferentes sustancias durante una fermentación, sin embargo las características y rendimientos del producto final dependerán del tipo de microorganismo o en su defecto del uso de consorcios microbianos, así como también del sustrato a emplear (Pearl-Solomon *et al.*, 1998).

Las BAL sólo pueden obtener energía a través de la fermentación de los carbohidratos. Desde el punto de vista bioquímico, un proceso fermentativo es aquel proceso metabólico en el que los carbohidratos y los compuestos afines son oxidados con liberación de energía en ausencia de aceptores externos de electrones. Los aceptores finales de electrones son compuestos orgánicos producidos directamente en el desdoblamiento de los carbohidratos. En la fermentación se produce la oxidación incompleta del compuesto originario y solamente una pequeña cantidad de la energía es liberada durante el proceso (Jay, 2000).

Para llevar a cabo esta fermentación, las BAL utilizan dos vías diferentes para la glucólisis: el esquema de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), con generación casi exclusiva de ácido láctico y la vía 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa, del que resultan otros productos finales como etanol, ácido acético y dióxido de carbono (CO₂). Las BAL en función del metabolismo de los carbohidratos puede ser clasificadas como: homofermentativas, heterofermentativas y heterofermentativas facultativas (Wood, 1995; Lyhs, 2002).

Homofermentativas

El grupo homofermentativo está representado por los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y *Streptococcus*. Estos microorganismos producen más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa; poseen las enzimas aldolasa y

hexosa isomerasa, utilizan la vía de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) para la producción de dos moléculas de ácido láctico por molécula de glucosa consumida (figura 4) (Jay, 2000; Wood, 1995).

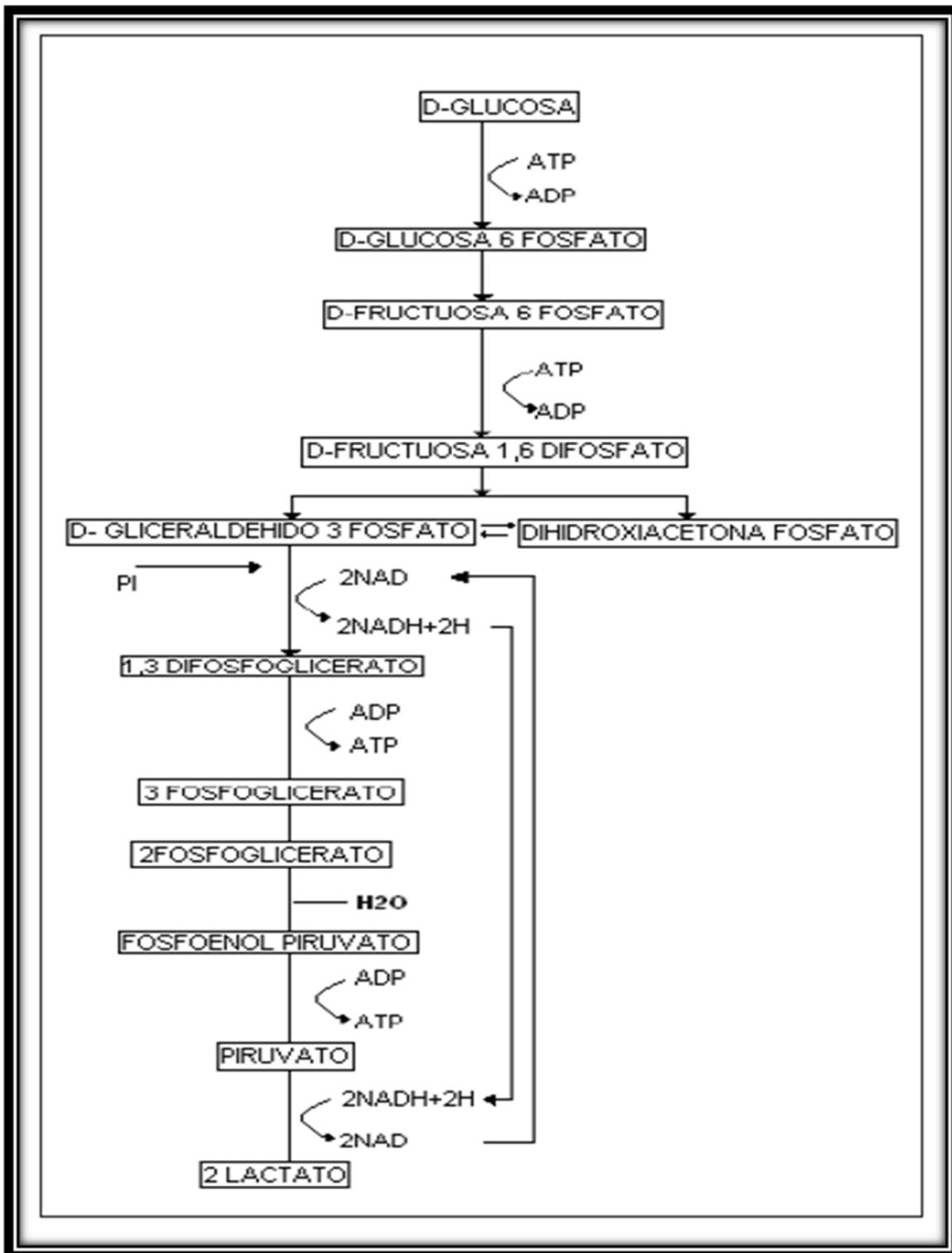


Figura 4. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Tomada de Parra, 2010).

Así mismo, es posible cambiar el carácter homofermentativo de las bacterias modificando condiciones de cultivo como la concentración de glucosa y la reacción de nutrientes (Leveau y Bouix, 2000).

Heterofermentativas

Las bacterias heterofermentativas son más importantes que las homofermentativas desde el punto de vista de la producción de componentes de aroma y sabor (Lyhs, 2002).

Este grupo está compuesto de un número de géneros incluyendo *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Weissella* y algunos del género *Lactobacillus*. Producen un 50 % de ácido láctico y cantidades apreciables de etanol, aldehídos y dióxido de carbono (CO₂). No tienen fructosa-difosfato-aldolasa, pero tienen fosfoacetolasa y por lo tanto degradan la glucosa por la vía de las pentosas fosfato o de las hexosas fosfato (figura 5); a partir de las hexosas producen cantidades equimolares de ácido láctico, ácido acético, etanol y dióxido de carbono (CO₂), y degradan las pentosas para obtener ácido acético y ácido láctico (Jay, 2000; Lyhs, 2002; Parra, 2010).

Heterofermentativas Facultativas

Estas especies utilizan la vía de EMP o la vía de las pentosas para dar como productos en su mayoría ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono (CO₂), ácido fórmico y etanol (Lyhs, 2002; Vandamme *et al.*, 1996). Sin embargo, algunas especies de BAL utilizan la vía fosfoacetolasa inducida, en la cual la enzima fosfoacetolasa rompe el azúcar de 5 carbonos producida a partir de la glucosa y da lugar a la formación de lactato y etanol, en un proceso de fermentación heteroláctica (Salminen y Wright, 1998).

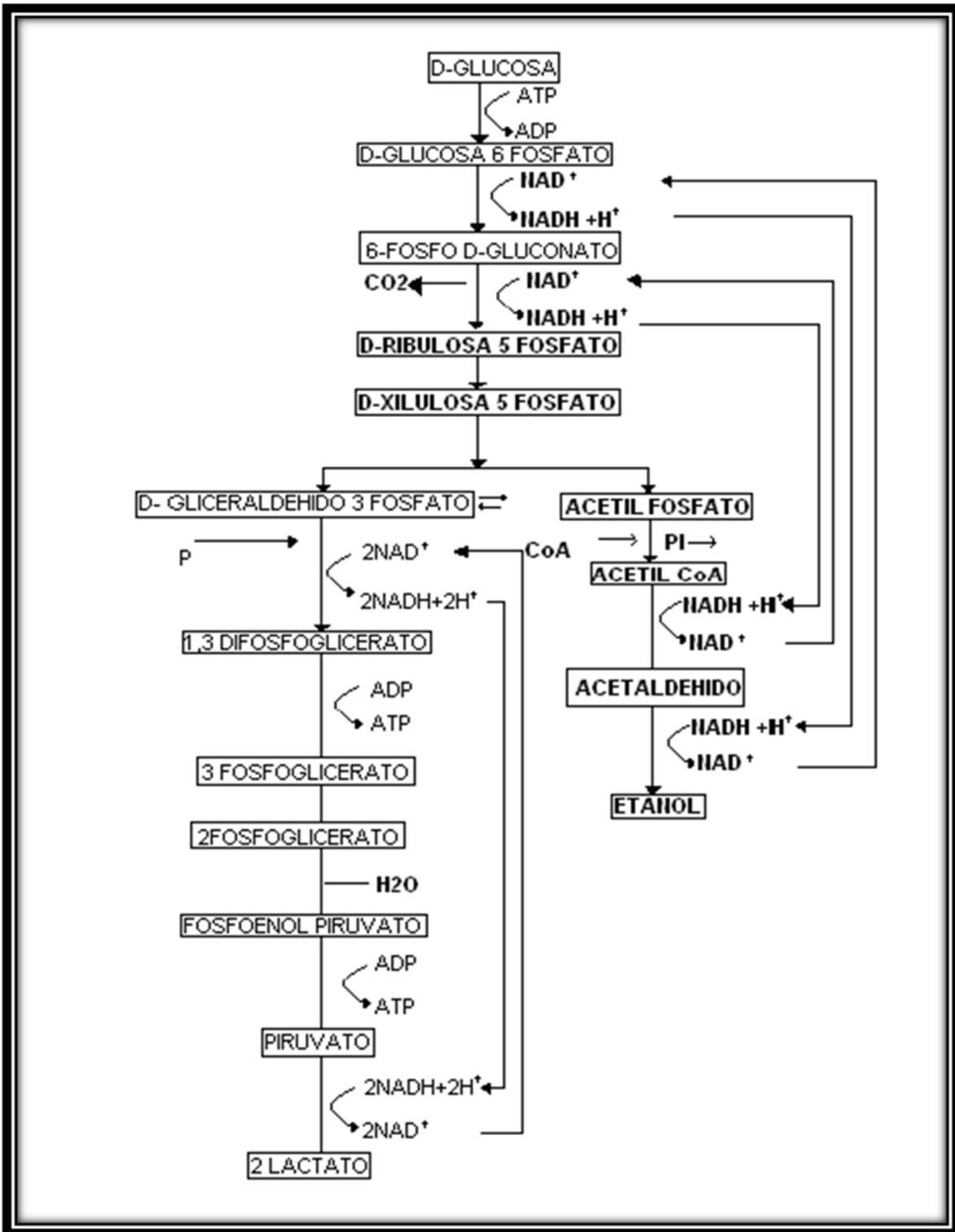


Figura 5. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Tomada de Parra, 2010).

2.2.3. Géneros de las BAL

Al tratarse de un grupo heterogéneo, las BAL comprenden varios géneros de importancia: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium*. Siendo *Lactobacillus* el más grande de estos géneros (Adams y Moss, 1998; Stiles y Holzapfel, 1997).

A continuación se presenta una descripción breve de los microorganismos de mayor relevancia en alimentos, pertenecientes a diferentes géneros:

Streptococcus son cocos esféricos u ovoides de 0.8-1.2 μm , dispuestos en cadenas o en pares y son anaerobios facultativos. Son homofermentativos puesto que transforman la lactosa a ácido láctico. Son sensibles al oxígeno y poseen una considerable actividad superóxido dismutasa. Estas bacterias tienen una compleja necesidad de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. Esta es una de las razones por las que abundan en un medio rico como la leche. Los más conocidos son *S. lactis* y *S. cremoris*, los cuales son responsables de la acidificación de la leche, el *S. diacetylactis* que produce la fermentación de ácido cítrico a diacetilo, sustancia característica del aroma de la mantequilla (Requena y Peláez 1995).

Leuconostoc se encuentra en productos cárnicos, lácteos, vinos, frutas, hortalizas, vegetales en fermentación, productos de panificación y de soluciones viscosas de azúcar. Los microorganismos de este género son cocos en pares o cadenas de 0.5-1.2 μm , heterofermentativos, con producción del isómero *L* del ácido láctico, etanol y CO_2 ; y no producen amoníaco a partir de la arginina. Requieren medios complejos para desarrollarse. Algunas especies son ácidotolerantes, capaces de crecer a pH de 4.4. Son mesófilos y no soportan las concentraciones de sal. Se encuentran involucrados en el deterioro de alimentos ricos en carbohidratos simples, pero utilizados en forma controlada en la fabricación de algunos quesos debido a la generación de aromas apreciables. Su desarrollo es más lento que otras BAL, las cuales suelen desplazarlo en cultivos

mixtos (Jay, 2000; Stiles y Holzapfel, 1997). Puede formar cantidades significativas de diacetilo a partir del citrato en leche y algunas especies, principalmente *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* se han usado en la industria de los lácteos para este propósito (Salminen y Wright, 1998).

Lactobacillus es el grupo más diverso, abarca especies con una larga variedad de propiedades genotípicas, bioquímicas y fisiológicas (Salminen y Wright, 1998). Comprende bacterias Gram positivas, en forma de bacilos y cocobacilos de 0.5 a 1.2 por 1.0 a 10.0 μm , no esporulados, aerotolerantes o anaerobios o acidófilos, con requerimientos nutricionales complejos. Incluyen especies homofermentativas obligadas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas. Los límites de temperatura para desarrollar van de 2 a 53°C con temperaturas óptimas de 30-40°C. Se aíslan fácilmente de productos cárnicos, lácteos, pescados, frutas y verduras (Requena y Peláez, 1995; Leveau y Bouix, 2000).

Las especies homofermentativas están asociadas con el hombre y animales. Las especies heterofermentativas con los alimentos, en donde llevan a cabo fermentaciones controladas o causan deterioros especialmente bajo refrigeración de productos empacados. Las especies heterofermentativas obligadas son comunes en productos lácteos, cereales y verduras fermentadas (Jay,2000).

Lactococcus es utilizado como cultivo iniciador en la obtención de productos lácteos, siendo considerada la bacteria láctica por excelencia de la leche. Presenta células ovoides que aparecen aisladas, en pares o en cadenas Gram positivas. Algunas cepas forman material gelatinoso que les rodea a manera de cápsula, son homofermentativas (Stiles y Holzapfel, 1997).

Carnobacterium, estos tipos de microorganismos se aislaron de carnes envasadas a vacío y almacenadas a baja temperatura. Son bacilos de 0.5-0.7 x 1.1-3.0 μm ; en cultivos viejos se alargan y tienden a perder el Gram. Son psicrótrofos y de metabolismo homofermentativo y menos rigurosos en sus demandas nutricionales y de intolerancia al oxígeno. Originalmente se distinguen seis especies en el género: *C. alterfunditum*, *C. funditum*, *C. mobile*, *C. divergens*,

C. gallinarum y *C. piscicola*, las tres primeras móviles todas pueden desarrollar a 0°C; la penúltima especie fermenta la lactosa, y la última débilmente (Fernández, 2000; Jay, 2000).

Pediococcus está formado por microorganismos con forma de cocos esféricos de 1.0-2.0 μm , anaerobios facultativos. Son homofermentativos. Sus exigencias nutricionales, su débil actividad proteolítica y en la mayor parte de las especies su incapacidad de utilizar la lactosa, no les permite acidificar y coagular la leche. Las especies se diferencian por su tolerancia a la temperatura, pH y NaCl (Salminen y Wright, 1998).

Weissella comprenden el único grupo de BAL en el que pueden encontrarse cocos o bacilos. Las especies pertenecientes a este género llevan a cabo la fermentación del azúcar por la ruta heterofermentativa, produciendo CO₂ y el isómero *D* y *L*. No forman tétradas, son mesófilas y tienen la capacidad de crecer a 6.5 % NaCl como máxima concentración, pueden o no crecer a pH de 4.4 y no crecen a pH de 9. Las especies de *Weissella* pueden ser fácilmente confundidas con *Leuconostoc* o con otros lactobacilos heterofermentativos. Muchas de estas especies parecen estar asociadas con la carne donde pueden proliferar a bajas temperaturas (Salminen y Wright, 1998).

2.3 Importancia de las BAL en alimentos

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos de importancia en la industria alimentaria, pues han sido empleadas desde tiempos muy antiguos en la fermentación de muchos alimentos a nivel industrial (Cabeza, 2006).

En la industria alimentaria la importancia de estos microorganismos ha aumentado considerablemente, esto se debe en gran medida a los descubrimientos que se han hecho a cerca del papel que este consorcio microbiano juega en la elaboración de una gran cantidad de alimentos principalmente cárnicos y lácteos (Cabeza, 2006; Parra, 2010).

Durante el metabolismo las bacterias ácido lácticas producen una serie de compuestos que confieren a los alimentos en los que se desarrollan propiedades sensoriales únicas y que en muchas ocasiones contribuyen en la bioconservación de los mismos (Parra, 2010). Entre estos compuestos se encuentran ácido láctico, ácido acético, ácidos grasos libres, peróxido de hidrógeno, etanol, diacetilo, acetaldehído y bacteriocinas entre algunos otros (De Vuyst y Leroy, 2007).

Por las razones expuestas anteriormente las BAL son usadas a nivel industrial para la producción de ácido láctico, saborizantes, espesantes y bacteriocinas (Cabeza, 2006).

En la última década se han generado diversos estudios acerca del papel que estos microorganismos pueden desempeñar dentro de los alimentos y actualmente se sabe que pueden emplearse como probióticos, como cultivos iniciadores y que participan en la inhibición de algunos microorganismos patógenos mediante la producción de bacteriocinas y ácidos orgánicos principalmente (Cabeza, 2006 y Parra, 2010).

A pesar de los beneficios que las BAL pueden aportar a los alimentos cuando se encuentran en ellos, es importante considerar que estos microorganismos también pueden actuar como deterioradores cuando se encuentran en concentraciones muy elevadas (Cabeza, 2006).

2.3.1 Cultivos iniciadores

Las BAL se usan como cultivos iniciadores principalmente en la industria cárnica, láctea y de vegetales fermentados (Cabeza, 2006).

En la industria cárnica las BAL son empleadas por su papel en la maduración de los productos generando cambios importantes durante este proceso. El primero de estos cambios es la aceleración de la acidificación del producto debida a la producción de ácido láctico; la acidificación del medio junto con la producción de

algunas bacteriocinas por las BAL puede evitar la proliferación de organismos contaminantes Gram negativos como *Pseudomonas* y *Enterobacteriaceae* (Cabeza, 2006; Niinivaara, 1991).

Las BAL participan también de manera importante en el desarrollo del aroma de los productos cárnicos madurados (Aymerich *et al.*, 2004; Cabeza, 2006).

Las principales especies de BAL empleadas en la industria de los cárnicos pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Aymerich *et al.*, 2004); se sabe que los microorganismos pertenecientes al género *Pediococcus* llevan a cabo una acidificación más lenta, disminuyen en menor medida el pH y la producción de aromas es menos intensa, por lo que son menos empleados. Los microorganismos del género *Lactobacillus* por su parte llevan a cabo una acidificación espontánea, sin embargo esta está limitada a la cantidad de azúcar presente en el producto. En los productos cárnicos la acidificación determina la coagulación de las proteínas, la formación del color y el desarrollo de microorganismos (Cabeza, 2006; Milena *et al.*, 2009).

En la industria láctea las BAL se usan principalmente en la obtención de yogurt y quesos madurados. En el yogurt la especie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* acidifica el medio convirtiendo la lactosa presente en la leche en ácido láctico hasta obtener un valor de pH por debajo de 4.6. Como resultado del descenso de pH las micelas de caseína se desestabilizan lo que favorece la formación del gel, además de esto contribuyen a la consistencia, la formación del sabor ácido y del aroma. En los quesos al igual que en el yogurt las BAL son usadas para acidificar el medio y propiciar la coagulación de caseína, produciendo una cuajada suave y fácil de desuerar, la diferencia es que en los quesos las BAL suelen estar acompañadas de otros microorganismos como bacterias propiónicas, mohos y levaduras. Las BAL empleadas como cultivos iniciadores en la industria láctea pertenecen principalmente a las familias *Streptococcaceae* y *Lactobacillaceae* (Cabeza, 2006; Niinivaara, 1991).

En la industria de los vegetales las BAL son usadas principalmente para la elaboración de productos fermentados, los cuales son consumidos principalmente en el continente Asiático, ya que en los continentes Europeo y Americano el consumo de este tipo de productos se limita a pepinillos, aceitunas y coles; las BAL en estos productos tienen la capacidad de acidificar el medio y eliminar microorganismos deterioradores y sus enzimas pectinolíticas producidas ya que son responsables de las putrefacciones blandas en los vegetales. Las principales especies implicadas en la fermentación de los vegetales son *Streptococcus faecalis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus plantarum*, siendo los dos últimos los más tolerantes al pH ácido y a concentraciones de sal, por lo que por lo general son los encargados de llevar a cabo las etapas finales de la fermentación (Cabeza, 2006; Niinivaara, 1991).

2.3.2 Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren al huésped un beneficio para la salud (Gilliland *et al.*, 2001); aunque un buen número de microorganismos pueden ser empleados como probióticos los más utilizados en humanos son las bifidobacterias y las BAL, esto se debe a que estos dos grupos de bacterias se encuentran en el intestino humano de manera natural y a que en general son consideradas como inocuas (Hernani *et al.*, 2007; Parra, 2010; Ruiz *et al.*, 2000).

Gracias a los estudios realizados hoy en día se atribuyen un gran número de efectos benéficos a los probióticos cuando estos llegan al intestino, entre los cuales se pueden resaltar los siguientes: tienen la capacidad de absorber colesterol, facilitan la biodisponibilidad de calcio, vitaminas y minerales en el intestino; tienen actividad anticancerígena puesto que absorben o retienen sustancias mutagénicas, además de evitar o reducir la adhesión de microorganismos carcinogénicos; poseen actividad inmunomoduladora,

incrementando la respuesta inmune a la inflamación y reduciéndola en las alergias, activan la motilidad intestinal reduciendo los síntomas y la duración de diarreas y metabolizan la lactosa ayudando a personas con intolerancia a la misma (Ferrer y Dalmau, 2001; Parra, 2010; Ruiz *et al.*, 2000).

Los efectos benéficos de los probióticos se deben en gran medida a la gran capacidad que estos microorganismos tienen para adherirse a la mucosa intestinal, dicha capacidad es debida a la naturaleza hidrofóbica de la membrana de estos microorganismos la cual les permite unirse con otros microorganismos de la misma especie y en algunas ocasiones de otras especies formando agregados, dichos agregados tienen la capacidad de ser rodeados por una matriz extracelular compuesta por moléculas de carácter hidrofóbico, como el colágeno o moléculas que permiten que la característica hidrofóbica de la pared celular de los microorganismos probióticos sea transmitida a la superficie del agregado. De este modo se facilita la adherencia a la mucosa, este hecho hace posible la incorporación de grandes cantidades de microorganismos a las paredes del intestino (Ljungh y Wadström, 2005).

De lo anterior se desprende la capacidad que presentan los microorganismos probióticos de poblar grandes porciones del tracto intestinal, reduciendo los espacios libres y evitando por tanto la adherencia de microorganismos causantes de enfermedades (Gilliland *et al.*, 2001).

Se sabe también que parte de la flora nativa del intestino es capaz de sintetizar nitrosaminas, compuestos bien conocidos por su actividad carcinogénica, la repoblación del intestino por probióticos evita que los microorganismos productores de nitrosaminas se unan a la mucosa, disminuyendo por tanto la producción de nitrosaminas y por ende la aparición de cáncer (Gilliland *et al.*, 2001).

Otra característica importante que presentan los microorganismos probióticos es la tolerancia a pH ácidos, esta característica permite que algunos de ellos puedan

pasar por el estómago hasta llegar al tracto intestinal donde se adhieren, sin ser dañados por el pH ácido del estómago (Ljungh y Wadström, 2005).

La resistencia de los probióticos a las sales biliares podría deberse a la capacidad que estos microorganismos tienen de hidrolizar dichos compuestos, esta podría ser también la causa de la disminución de colesterol sérico en pacientes tratados con probióticos y por tanto puede asociarse con la reducción de problemas cardiovasculares (Ljungh y Wadström, 2005; Gilliland *et al.*, 2001).

Muchos probióticos pueden ser incluidos en matrices alimenticias que les permiten llegar al intestino vivos, es decir que son protegidos por esta de los ácidos gástricos y de la bilis, llegando vivos al intestino (Gilliland *et al.*, 2001).

Las BAL no son la excepción a esto y llegan al intestino a través del gran número de productos en los que se encuentran, sin embargo se sabe que la viabilidad de las células de BAL depende de las características del sustrato y que no es inmutable durante el tiempo, por esta razón no todos los alimentos con estos microorganismos causan el mismo efecto en la salud de los consumidores (Parra, 2010).

Para que un microorganismo pueda ser considerado y empleado como probiótico dentro de los alimentos debe cumplir con una serie de requisitos que se mencionan a continuación:

- Deben ser resistentes a la acción de enzimas pancreáticas así como a la acidez y a bilis.
- Deben tener la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal.
- Deben ser de origen humano.
- El efecto benéfico de las cepas empleadas como probióticos debe estar probado
- Deben tener propiedades tecnológicas adecuadas como estabilidad, resistencia a bacteriófagos, facilidad de desarrollo, supervivencia y tolerancia al oxígeno.

Lo anterior es importante para lograr que los organismos cumplan su función dentro del organismo del consumidor (Hernani *et al.*, 2007).

Muchas especies de BAL del género *Lactobacillus* pueden ser empleadas como probióticos, sin embargo las mas empleadas son *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. johnsoni*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. rhamnosus*, debido a que su efecto saludable se ha demostrado en muchas experiencias clínicas comprobadas; otros géneros de BAL usadas comúnmente como probióticos son las siguientes: *Streptococcus* y *Enterococcus* (Parra, 2010).

A pesar de los efectos benéficos atribuidos a los probióticos es importante señalar que estos son específicos de algunas especies de BAL y no pueden generalizarse para todo el grupo, además se sabe que para que estos microorganismos puedan desarrollar su efecto benéfico deben llegar al intestino en concentraciones aproximadas de 10^6 - 10^7 ufc/mL (Guarner *et al.*, 2008; Parra, 2010).

2.3.3 Efecto antimicrobiano

El efecto antimicrobiano que muchas BAL tienen cuando se aplican en alimentos fermentados se debe principalmente a la producción de ácidos orgánicos, láctico y acético, los cuales son generados como productos de la fermentación; además de estos compuestos algunas especies de BAL tienen la capacidad de sintetizar otros compuestos con actividad antimicrobiana, tales compuestos son: peróxido de hidrógeno, acetaldehído, acetoína, reuterina, etanol, diacetilo, CO₂, ácidos grasos y bacteriocinas (Parra, 2010; De Vuyst y Leroy, 2007).

2.3.3.1 Ácidos orgánicos

Las BAL homofermentativas producen a partir del metabolismo de la glucosa cantidades importantes de ácido láctico; mientras que las BAL heterofermentativas

además de ácido láctico llegan a producir también ácido acético; estos dos ácidos orgánicos son empleados comúnmente en la industria alimentaria como conservadores.

Los ácidos orgánicos también considerados ácidos lipofílicos o débiles muestran un notable efecto antibacteriano cuando se encuentran en su forma no disociada, esto se debe a la capacidad que tienen para atravesar la membrana.

La fracción lipófila del ácido muestra solubilidad en la membrana celular atravesándola y afectando la permeabilidad de la misma al desacoplar el sustrato y la fosforilación oxidativa del sistema de transporte de electrones, una vez dentro de la célula se disocian lo que lleva a una disminución del pH intracelular, esta caída del pH provoca que la célula active un proceso de expulsión de protones, este proceso agota las reservas energéticas de la célula disminuyendo por tanto el desarrollo de la misma.

El pH ácido intracelular ocasiona la desnaturalización de las proteínas y de los enzimas presentes en la célula lo que origina la muerte del microorganismo (Fernández, 2000; Parra, 2010).

De los dos ácidos orgánicos producidos por las BAL el más eficiente en términos de inhibición de microorganismos patógenos y deterioradores es el acético, debido a que presenta un valor de pKa mayor (Fernández, 2000).

2.3.3.2 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son compuestos peptídicos segregados por bacterias con efecto bactericida o bacteriostático sobre otras especies relacionadas taxonómicamente, a pesar de que existen muchas bacterias que tienen la capacidad de producir bacteriocinas las producidas por BAL han cobrado importancia debido a su potencial uso en la industria alimentaria y a que dichos microorganismos son

considerados como GRAS (por sus siglas en ingles, Generally Recognized As Safe) (De Vuyst y Leroy, 2007; Savadogo *et al.*, 2004).

Son sintetizadas en el ribosoma y están formadas por alrededor de 60 aminoácidos; existe una gran diversidad de bacteriocinas que pueden ser producidas por BAL, varían en tamaño, la secuencia y composición de aminoácidos que las conforman; pueden encontrarse de manera elongada o de manera globular (Savadogo *et al.*, 2004).

Se sabe que las bacteriocinas son sintetizadas al final de la fase exponencial y al inicio de la fase estacionaria y que la síntesis de las mismas puede aumentar en condiciones ácidas (Cintas *et al.*, 2001).

De acuerdo con el tamaño, la estabilidad al calor y la presencia de un aminoácido poco común, lantionina, se clasifican en tres categorías: clase I, clase II y clase III.

Las bacteriocinas pertenecientes a la clase I, son péptidos pequeños (< 5 KDa) poli cíclicos, poco estables al calor y que contienen aminoácidos poco comunes como lantionina, β -metil-lantionina y dihidroalanina, a este grupo pertenece la nisina; las de clase II son pequeñas (<10 KDa) estables al calor y no contienen lantionina, entre las bacteriocinas de este grupo se encuentran la pediocina y la sakacina; las bacteriocinas pertenecientes a la clase III son péptidos grandes (>10 KDa) e inestables al calor, la helveticina es un ejemplo de esta clase (De Vuyst y Leroy, 2007).

Algunas características importantes que poseen las bacteriocinas son las siguientes: tienen sitios específicos de unión, debido a esta característica es que el campo de acción de cada bacteriocina es específico contra algunos microorganismos; poseen cargas positivas y son de naturaleza hidrofóbica (Savadogo *et al.*, 2004).

El mecanismo de acción de las bacteriocinas es variado, sin embargo se sabe que éstas se unen a la membrana celular de los microorganismos Gram positivos mediante una atracción electrostática entre los fosfolípidos presentes en la

membrana cargados negativamente y las bacteriocinas cargadas positivamente. Una vez que la bacteriocina se ha unido a la membrana de los microorganismos, se genera la pérdida del potencial electrostático de la membrana y se forman poros en ella; la formación de los poros modifica la permeabilidad de la membrana ocasionando la salida de aminoácidos, cationes esenciales y ATP lo que desencadena en la muerte del microorganismo (Ruiz *et al.*, 2000; De Vuyst y Leroy, 2007).

La presencia de algunos cationes como Mg^{2+} y Ca^{2+} en el medio puede interferir con la acción de las bacteriocinas, puesto que estos tienen la capacidad de neutralizar las cargas negativas de la membrana celular. Esto induce a una condensación fosfolipídica que incrementa la rigidez de la membrana citoplasmática evitando la unión de las bacteriocinas a la membrana (Cintas *et al.*, 2001).

La actividad de las bacteriocinas contra microorganismos Gram negativos, es limitada, esto se debe en gran medida a que la pared celular de estos microorganismos está compuesta por lipopolisacáridos, los cuales impiden la unión de las bacteriocinas con la membrana; se sabe que la adición de agentes quelantes como EDTA puede ayudar a que se de la unión de las bacteriocinas con la membrana de los organismos Gram negativos (Cintas *et al.*, 2001; De Vuyst y Leroy, 2007).

Las bacteriocinas más usadas en el área de alimentos son la nisina y la pediocina, estas son producidas por *Lactococcus lactis* y *Pediococcus*, respectivamente, la nisina es una bacteriocina de amplio espectro de acción, pues se sabe que es eficaz contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium sp.*, mientras que la pediocina tiene una actividad casi específica contra *Listeria* (Ruiz *et al.*, 2000).

Para que las bacteriocinas puedan ser empleadas en la industria alimentaria deben cumplir con una serie de requisitos como ser producidas por microorganismos considerados como inocuos, preferentemente deben ser

resistentes a la temperatura, tener efecto antimicrobiano contra bacterias patógenas o alterantes de alimentos, no deben ser adicionadas en concentraciones superiores a las que se encuentran de modo natural; todo esto para asegurar la inocuidad de las mismas (Ruiz *et al.*, 2000).

Las bacteriocinas pueden ser agregadas a los alimentos de tres modos distintos, el primero de ellos es adicionar la bacteria productora en el alimento como cultivo iniciador, de este modo la bacteriocina es generada *in situ*; otra forma de adicionarlas es purificadas o semipurificadas como aditivos alimentarios y la última forma es en un extracto del fermento (Ruiz *et al.*, 2000).

2.3.3.3 Metabolitos secundarios

Además de las bacteriocinas y los ácidos orgánicos las BAL tienen la capacidad de sintetizar durante su metabolismo otros compuestos con capacidad antimicrobiana. El peróxido de hidrógeno es producido por algunas BAL en presencia de oxígeno como resultado de la acción de la enzima NADH peroxidasa; este compuesto puede provocar la oxidación de los grupos sulfhidrilo de algunas enzimas, provocando la desnaturalización de las mismas, además de esto puede ocasionar la peroxidación de los lípidos presentes en la membrana celular, incrementando la permeabilidad de esta. El peróxido de hidrógeno puede también ser precursor de radicales libres como el hidroxilo y el superóxido, estos pueden dañar el material genético de las células microbianas (Savadogo *et al.*, 2004).

El bióxido de carbono (CO₂) es producido por BAL heterofermentativas. A pesar de que el mecanismo de inhibición de este compuesto no está bien descrito, este se puede atribuir a la generación de un ambiente anaerobio lo que impide el desarrollo de microorganismos aerobios. Si el CO₂ se acumula en la membrana puede alterar la permeabilidad de ésta, ocasionando fallas importantes en el funcionamiento de la misma (Yang y Ray, 2000).

El diacetilo es un compuesto producido por cepas de todos los géneros de BAL y se sabe que este compuesto inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas impidiendo la utilización de la arginina, sin embargo el efecto de este compuesto no puede apreciarse de manera significativa cuando es producido por especies de BAL debido a la baja cantidad que estas producen por lo que su uso potencial en la industria de los alimentos es limitado (Jay, 2000).

La reuterina es un compuesto no proteico producido por *Lactobacillus reuteri* que afecta a un gran número de bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras, mohos y protistas; su amplio espectro de acción se debe a que esta sustancia inhibe la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa involucrada en la síntesis de DNA (Cabeza, 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

El consumo de pulque, tepache y otras bebidas fermentadas ha sido importante en el Estado de Hidalgo desde tiempos remotos, actualmente estas dos bebidas siguen siendo consumidas con relativa frecuencia entre la población hidalguense.

Las BAL participan en un gran número de procesos metabólicos que se desarrollan en los alimentos y que intervienen de modo importante en la calidad y vida de anaquel de los mismos, puesto que producen agentes antimicrobianos y metabolitos de importancia industrial, además de ser los responsables de la fermentación de diversos alimentos. Actualmente se emplean también como probióticos y como cultivos iniciadores principalmente en productos lácteos y cárnicos.

En estudios anteriores se ha demostrado la existencia de concentraciones importantes de BAL en pulque y tepache obtenidos de otras regiones del país, y dada la importancia de este tipo de microorganismos en la inhibición de agentes patógenos, resulta interesante el aislamiento y selección de nuevas cepas BAL nativas con características antimicrobianas a partir de este tipo de bebidas elaboradas artesanalmente.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Aislar y conservar bacterias ácido lácticas de bebidas alcohólicas fermentadas tradicionales (pulque, tepache y tesgüino) elaboradas en el Estado de Hidalgo que posteriormente pueden ser aplicadas por sus propiedades antimicrobianas.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar un análisis microbiológico de diferentes bebidas tradicionales mexicanas elaboradas en el estado de Hidalgo.
- Aislar cepas de BAL de los productos analizados.
- Purificar y confirmar las cepas de BAL aisladas.
- Conservar por congelación y conformar un banco de cepas de BAL para un estudio posterior de diagnóstico de producción de compuestos antimicrobianos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Medios de cultivo

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- Agar cuenta estándar (Bioxon, México) el cual se empleó para el crecimiento de las bacterias mesófilas aerobias presentes en las bebidas alcohólicas fermentadas.
- Agar Bilis Rojo Violeta (Bioxon, México) usado para probar la existencia de microorganismos coliformes en las bebidas analizadas.
- Agar dextrosa Sabouraud (Bioxon, México) suplementado con 0.05 g/L de cloranfenicol (Sigma, Aldrich, USA) utilizado para el crecimiento de mohos y levaduras encontrados en el pulque y el tepache.
- Agar MRS (de Man, Rogosa y Sharpe, Difco, Huston USA) este medio fue usado para el crecimiento, purificación y aislamiento de las BAL presentes en las muestras analizadas.
- Caldo MRS (Merck, Darmstadt, Alemania) empleado para el crecimiento de las BAL puras aisladas de las muestras de pulque y tepache.
- Caldo MRS (Merck, Darmstadt, Alemania) con 20% de glicerol (J.T Baker) utilizado para la congelación de las BAL aisladas.
- Solución Ringer (Oxoid, España) al 25%, el cual se empleó como diluyente al realizar las diluciones decimales de las muestras para su análisis.

5.2. Reactivos

- Diclorhidrato de NNN-tetrametilparafenilendiamina (Sigma, Aldrich, USA) al 0.1% usado para la realización de la prueba de la oxidasa.
- Peróxido de hidrógeno al 30% empleado para realizar la prueba de la catalasa.
- Cristal violeta (Merck, Darmstadt, Alemania) al 0.5% empleado en la tinción de Gram.
- Lugol (1g de yodo (J.T. Baker) mas dos gramos de yoduro de potasio (J.T. Baker) en 300 mL de agua) empleado como mordente en la tinción de Gram.
- Alcohol/Acetona (40% de alcohol etílico al 95% y 60% de acetona) usado para la decolorar en la tinción de Gram.
- Safranina (Merck, Darmstadt, Alemania) al 0.25% empleado en la tinción de Gram.

5.3. Toma de muestras

Se colectaron un total de 13 muestras de pulque artesanal, 5 de tepache y una de tesgüino, todas en municipios pertenecientes al estado de Hidalgo. En la tabla 1 se indica la codificación de las muestras y el origen de las mismas. Las muestras fueron recolectadas en botellas de plástico y se congelaron en la nevera para posteriormente ser transportadas al laboratorio de Microbiología de Alimentos del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en el que se realizaron los análisis.

La muestra de tesgüino (Tg1) y la primera muestra de tepache (Tp1) fueron hechas por un estudiante que conocía el proceso de elaboración de las mismas, dentro de la UAEH para un proyecto de investigación de la asignatura de Ciencia y Tecnología de bebidas.

Tabla 1. Lugar de origen de las muestras y códigos de las mismas

Alimento	Código	Lugar de origen
Pulque	P1	San Pedro Huaquilpan
Pulque	P2	San Pedro Huaquilpan
Pulque	P3	San Pedro Huaquilpan
Pulque	P4	San Pedro Huaquilpan
Pulque	P5	Apan
Pulque	P6	San Pedro Huaquilpan
Pulque	P7	Tepetitlán
Pulque	P8	Progreso
Pulque	P9	Tepetitlán
Pulque	P10	Tlamaco
Pulque	P11	Atotonilco
Pulque	P12	Ocampo
Pulque	P13	Zapotlán de Juárez
Tepache	Tp1	UAEH
Tepache	Tp2	Tula
Tepache	Tp3	Boxthá
Tepache	Tp4	Actopan
Tepache	Tp5	Tepatepec
Tesgüino	Tg1	UAEH

5.4. Determinación de pH

Una vez teniendo las muestras en el laboratorio se descongelaron, se tomaron 100 mL de cada una de ellas y se determinó el pH de las mismas por triplicado con un potenciómetro marca Thermo (electronic corporation).

5.5. Análisis Microbiológico

Las muestras se mantuvieron en congelación en el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Área Académica de Química, hasta el momento de su análisis. La descongelación de las muestras se realizó en el refrigerador durante una noche y posteriormente se realizó el análisis microbiológico.

Los parámetros microbiológicos que se determinaron fueron: recuento total, coliformes, BAL, mohos y levaduras, de acuerdo al procedimiento señalado en la figura 6.

Inicialmente se tomó 1 mL de muestra y se adicionó en un tubo que contenía 9 mL de solución de Ringer (Oxoid), realizando diluciones decimales. A partir de estas diluciones se analizaron los distintos grupos microbianos.

En el caso de recuento total, se sembraron 100 μ L de la dilución en caja Petri con agar recuento estándar (Oxoid) solidificado, por la técnica de superficie o extensión en placa. De acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994 las cajas se incubaron a 35°C por 48 h. Transcurrido este tiempo, se contaron todas las unidades formadoras de colonias (ufc).

En el caso de coliformes, se empleó la técnica de vertido en placa con sobrecapa. Para ello se sembró 1 mL de la dilución en caja Petri y se adicionó agar bilis rojo violeta (Oxoid), luego se homogeneizó el inóculo haciendo movimientos circulares, verticales y horizontales, se dejó solidificar para después agregar más agar y

formar la sobrecapa. Una vez solidificadas, las placas se incubaron a 35°C por 24 h de acuerdo a la NOM-113-SSA1-1994, y se realizó la lectura de las placas, contando las colonias rojo púrpura, rodeadas de una zona de precipitación de las sales biliares color violeta.

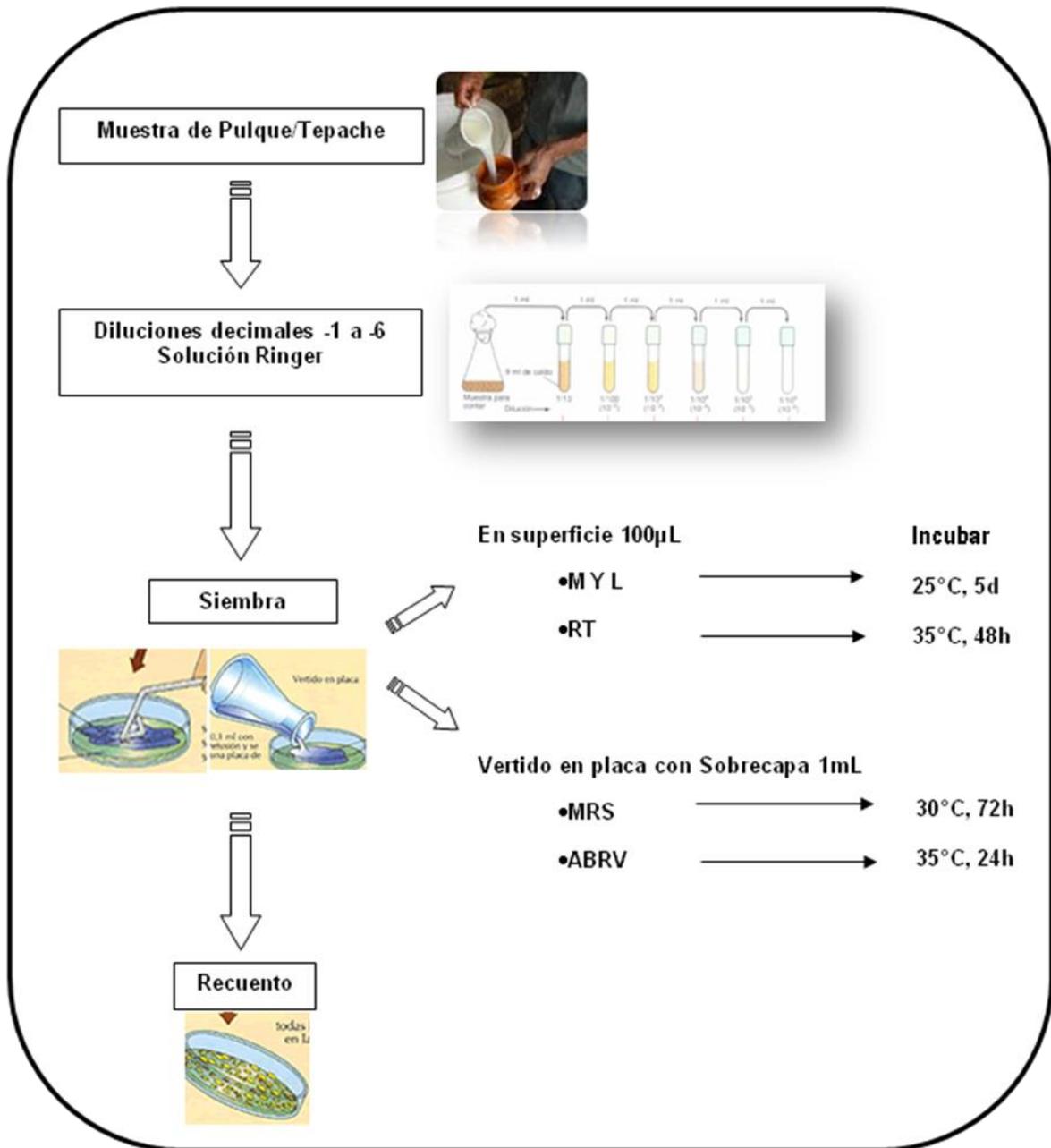


Figura 6. Análisis microbiológico de las bebidas (MyL: mohos y levaduras; RT: recuento total)

Para la determinación de BAL, se prefirió la técnica de vertido en placa con sobrecapa, esto para restringir el crecimiento de otros microorganismos que crecían en superficie como levaduras o especies de *Bacillus*. En este caso se sembró 1 mL de la dilución en caja Petri y se adicionó agar MRS (Difco), se homogeneizó el inóculo haciendo movimientos circulares, verticales y horizontales, se dejó solidificar para posteriormente adicionar más agar, formando la sobrecapa. Una vez solidificadas, las placas se incubaron a 30°C por 72 h. Transcurrido este tiempo se contaron todas las colonias blancas con forma lenticular presentes.

En mohos y levaduras, se utilizaron cajas Petri con agar dextrosa Sabouraud (Oxoid) suplementado con 0.05 g/L de cloranfenicol (Sigma). Se sembraron 100 µL de la dilución en la caja petri, por la técnica de vertido en placa en superficie. Una vez distribuida la dilución en el agar, se incubaron a 25°C por 5 días, de acuerdo a la NOM-111-SSA1.1994. Transcurrido este tiempo, se contaron todas las colonias, estableciendo si eran mohos o levaduras. Las levaduras se caracterizaron por ser redondas, amarillentas y cremosas.

Los resultados se expresaron en Log ufc/mL y los límites de detección eran de 1 Log ufc/mL para coliformes y BAL, y 2 Log ufc/mL para recuento total y mohos y levaduras.

Se realizó el análisis estadístico (media y desviación estándar) de los recuentos microbiológicos, expresados en Log ufc/mL.

5.6. Purificación de las BAL

Para verificar la pureza de las cepas de BAL se siguió el procedimiento señalado en la figura 7. De las placas MRS que presentaron crecimiento de BAL y que contenían entre 25 y 250 ufc, se seleccionaron 10 colonias por muestra, las cuales fueron extraídas por picadura y sembradas por estría en placas de agar MRS. Se incubaron a 30°C por 72 h. Después del crecimiento de las colonias, se tomo de la

placa una colonia aislada y se resembró por estría en placa de agar MRS y se incubaron en las mismas condiciones descritas anteriormente.

Posteriormente se observó visualmente la pureza de las colonias; en los casos en los que aún aparecían diferentes morfologías de colonias en la placa se realizó un tercer paso de purificación. Una vez que se observó homogeneidad en las colonias y que estas presentaron características morfológicas típicas de las BAL, como la formación de colonias pequeñas blancas puntiformes, con un halo transparente alrededor de la colonia, se verificó mediante pruebas bioquímicas que realmente se trataba de BAL.

Tinción de Gram. Ésta técnica consiste en una tinción diferencial, ya que permite dividir a las bacterias en dos grupos: Gram positivas las cuales retienen el cristal violeta y las Gram negativas que se decoloran con el descolorante de contraste, generalmente de color rojo como la safranina. Dicha prueba se realizó depositando sobre un portaobjetos limpio una gota de agua destilada. Posteriormente, se tomó una parte de una colonia de BAL con la ayuda de un asa bacteriológica, mezclándola con la gota de agua y fijando a la flama. Después el frotis, se cubrió con la solución cristal violeta durante 1 min, se desechó el colorante y se lavó ligeramente al chorro del agua, posteriormente se aplicó la solución de yodo durante 1 min, se desechó y lavó al chorro de agua. Con el portaobjetos inclinado, se agregó gota a gota la solución de alcohol-acetona y se lavó al chorro de agua. El frotis se cubrió con safranina durante 1 min, se desechó el colorante y se lavó al chorro de agua. Finalmente se observó al microscopio con el objetivo de inmersión.

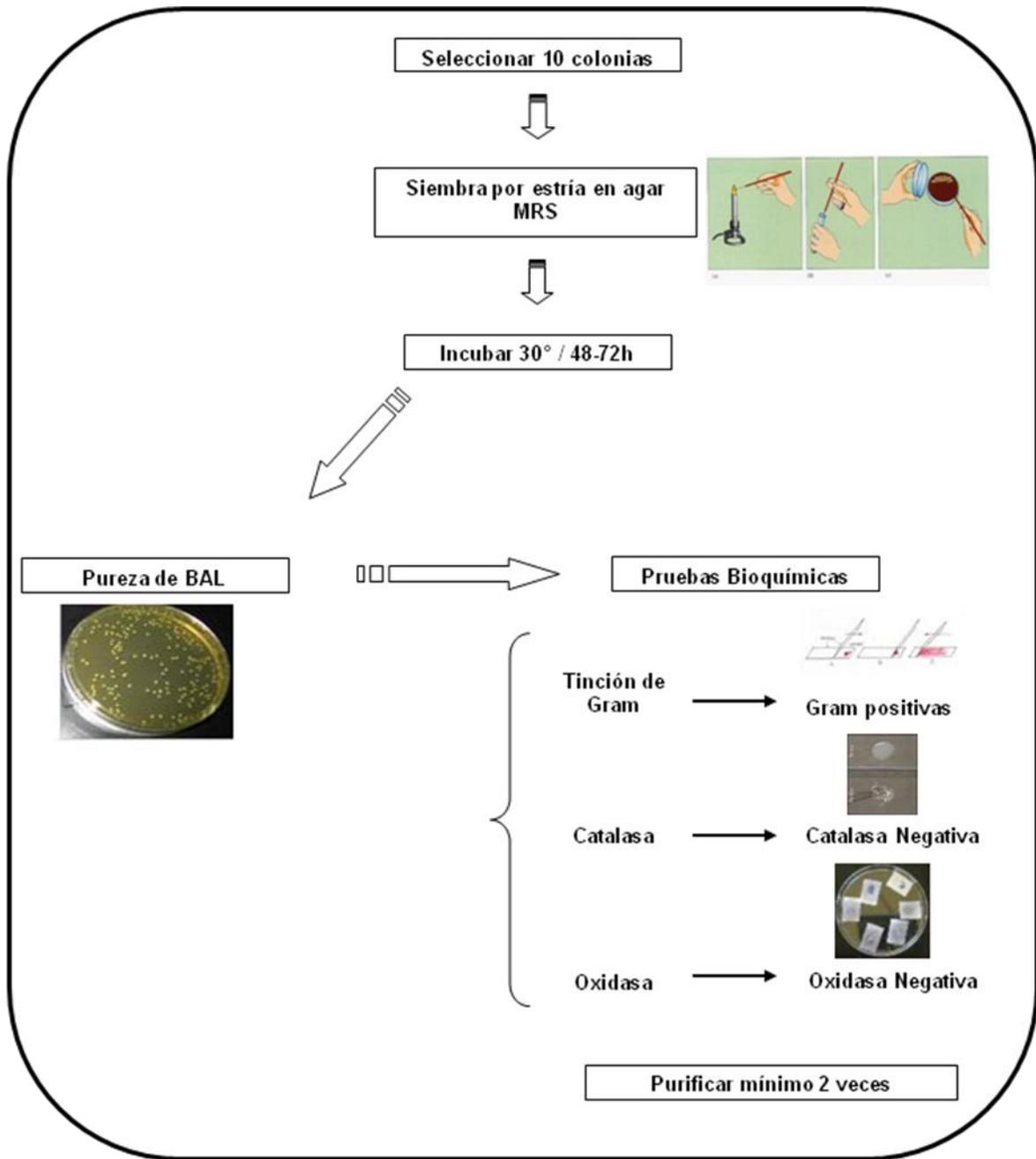


Figura 7. Procedimiento para verificar la pureza de las BAL

Prueba de catalasa. Consistió en tomar con un asa bacteriológica una gota de peróxido de hidrogeno al 30%, colocándola sobre un portaobjetos, luego se tomó una parte de la colonia BAL y se mezcló. Al observar la inmediata formación de burbujas (liberación de gas) la prueba se consideró como positiva, descartando dicha colonia, ya que las BAL son catalasa negativa.

Prueba de oxidasa. Esta prueba se realizó colocando una gota del reactivo clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% sobre papel filtro, posteriormente se tomó una colonia de BAL con un asa metálica y se froto sobre el reactivo; la prueba se consideró positiva cuando el reactivo cambio de color azul cielo a azul rey.

5.7. Conservación de las cepas

Las cepas que se confirmaron como BAL, una vez purificadas, fueron conservadas por congelación, siguiendo el procedimiento plasmado en la figura 8. Para ello se seleccionó una colonia de la placa donde estaba la cepa ya pura y se sembró en 10 mL de caldo MRS, luego se incubó a 30°C de 12 a 18 h.

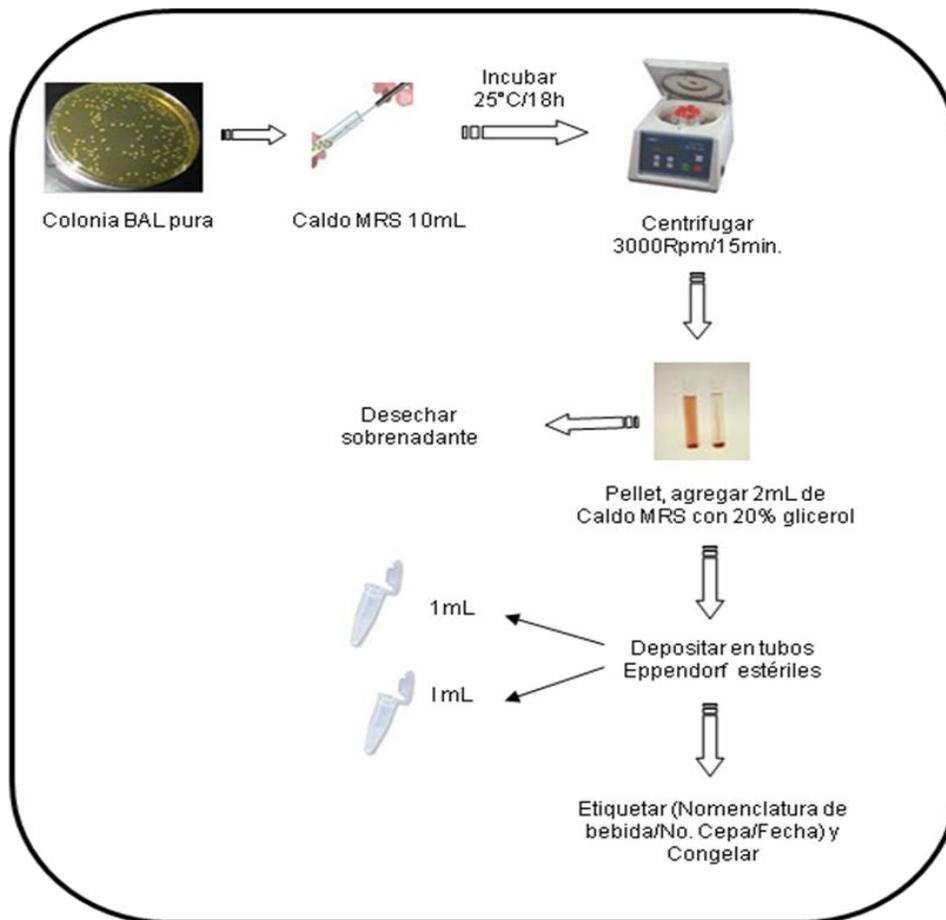


Figura 8. Procedimiento para la conservación de las cepas de BAL.

Transcurrido el tiempo los tubos se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min, posteriormente se desechó el sobrenadante y se dejó el pellet en el tubo agregando 2 mL de caldo MRS con 20% de glicerol. El inóculo se depositó en tubos eppendorf estériles. Se etiquetaron con la nomenclatura de la bebida de la que fue aislada, el número de cepa y la fecha. Se dejaron en congelación a una temperatura de -20°C.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la medición del pH de las bebidas fermentadas analizadas en este estudio se muestran en la tabla 2; en ella se puede notar que de los tres tipos de bebida, el tesgüino es la que presenta un valor de pH significativamente ($P < 0.005$) más bajo (3.15), seguida por el tepache (3.64), siendo el pulque la muestra con el valor más alto ($P < 0.005$) de pH (4.13), aunque las tres bebidas presentan un pH ácido.

Tabla 2. Valores promedio del pH de las bebidas analizadas

Muestra	pH (promedio)	DE
Pulque	4.13	0.13
Tepache	3.64	0.15
Tesgüino	3.15	0.007

DE: Desviación estándar

La diferencia del pH de las bebidas podría estar relacionado con el tipo de sustrato empleado para la elaboración de las bebidas y a la producción de ácidos orgánicos, láctico y acético principalmente, durante el metabolismo de las BAL. Se sabe que el aguamiel empleada en la elaboración de pulque presenta un pH de alrededor de 8 (Flores *et al.*, 2002), la piña usada en la producción de tepache tiene un valor de pH de 4 (Montillo *et al.*, 1997) y el maíz materia prima del tesgüino muestra un valor de pH de alrededor de 6.34 (Nava y Hernández, 2007). Si se tomaran en cuenta únicamente los valores de pH de los sustratos empleados se esperaría que el tepache fuese la bebida más ácida, seguida por el tesgüino y finalmente el pulque; sin embargo se puede suponer que las BAL presentes en el tesgüino producen una mayor cantidad de ácidos orgánicos generando una bebida más ácida que las restantes.

La concentración de cada uno de los grupos microbianos de importancia presentes en las bebidas analizadas se presenta en las tablas 3, 4 y 5, en ellas

también se pueden observar la desviación estándar de cada valor. En el caso de mohos y levaduras sólo se detectó la presencia de levaduras.

Tabla 3. Resultados microbiológicos de las muestras de pulque analizadas, medias y desviaciones estándar expresadas en Log UFC/mL.

MUESTRA	RT	DE	BAL	DE	LEV	DE	COL
P1	5.06	0.17	4.17	0.18	7.65	0.07	<2
P2	4.11	0.46	4.17	0.18	8.11	0.06	<2
P3	4.90	0.14	4.85	0.27	7.97	0.03	<2
P4	3.34	0.19	2.85	0.01	<2	0	<2
P5	5.19	0.09	6.45	0.23	6.87	0.04	<2
P6	5.50	0.04	7.53	0.26	7.74	0.02	<2
P7	5.71	0.11	7.54	0.16	7.76	0.03	<2
P8	7.31	0.10	7.63	0.13	7.51	0.04	<2
P9	7.58	0.03	7.58	0.19	7.39	0.01	<2
P10	3.91	0.29	3.55	0.49	4.60	0.00	<2
P11	6.56	0.40	6.88	0.36	7.48	0.10	<2
P12	5.90	0.35	6.34	0.23	7.28	0.46	<2
P13	4.09	0.12	3.39	0.79	<2	0	<2
Promedio	5.32	0.19	5.61	0.27	6.33	0.07	<2

RT: Recuento Total BAL: Bacterias Ácido Lácticas LEV: Levaduras COL: Coliformes
DE: Desviación Estándar

Tabla 4. Resultados microbiológicos de las muestras de tepache analizadas, medias y desviaciones estándar expresadas en Log UFC/mL.

MUESTRA	RT	DE	BAL	DE	LEV	DE	COL
Tp1	2.85	0.49	3.68	0.1	2.00	0.00	<2
Tp2	3.71	0.84	6.18	0.11	4.35	0.17	<2
Tp3	6.20	0.03	7.61	0.08	5.57	0.19	<2
Tp4	7.65	0.24	7.30	0.22	4.79	0.18	<2
Tp5	7.39	0.15	7.24	0.71	5.02	0.03	<2
PROMEDIO	5.56	0.35	6.40	0.24	4.35	0.11	<2

RT: Recuento Total BAL: Bacterias Ácido Lácticas LEV: Levaduras COL: Coliformes
DE: Desviación Estándar

Tabla 5 Resultados microbiológicos de la muestra de tesgüino analizada, media y desviación estándar expresadas en Log UFC/mL.

MUESTRA	RT	DE	BAL	DE	LEV	DE	COL
Tg1	5.81	0.19	4.08	0.05	5.42	0.13	<2

RT: Recuento Total BAL: Bacterias Ácido Lácticas LEV: Levaduras COL: Coliformes
DE: Desviación Estándar

De acuerdo a los resultados mostrados en las tablas 3, 4 y 5, se observa que en la mayoría de las muestras analizadas, los recuentos de bacterias ácido lácticas y de mohos y levaduras están por encima de los valores de recuento total, estas variaciones pueden atribuirse a que los medios usados para el crecimiento de BAL (MRS) y MyL (Sabouoard) contienen nutrientes específicos para el desarrollo de cada tipo de microorganismo; en cambio el agar cuenta estándar dispone de nutrimentos que permiten el desarrollo de todos los microorganismos mesófilos aerobios presentes en la muestra, esta condición genera antagonismo entre los

diferentes grupos microbianos impidiendo que la totalidad de microorganismos se desarrollen de manera óptima.

Otra condición que ocasiona diferencias entre las concentraciones de microorganismos en los diferentes medios de cultivo, es el tiempo de incubación. Algunos microorganismos como las bacterias ácido lácticas y las levaduras requieren mayor tiempo de incubación (Fernández, 2000).

Los valores promedio de los recuentos para cada una de las bebidas, señalan que en la que hubo mayor desarrollo de BAL fue en el tepache.

Uno de los factores que influye en el crecimiento de las BAL es el tipo y la cantidad de nutrientes presentes en el sustrato (Holzapfel y Wood, 1995). Como se puede observar en la tabla 6, los tres sustratos cuentan con los nutrientes suficientes para garantizar el crecimiento de las BAL, sin embargo la piña es la que cuenta con una mayor cantidad de azúcares, fuente principal de energía de las BAL, además de esto el bajo contenido proteico de la misma limita el crecimiento de otro tipo de microorganismos evitando el fenómeno antagónico entre microorganismos.

Tabla 6. Cantidad de nutrientes presentes en los sustratos

Nutriente	Piña Tepache	Aguamiel Pulque	Maíz Tegüino
Proteína (%)	0.5	3.41	9
Azúcares (%)	14	11.90	11.76
Vitaminas del complejo B (mg/100g)	0.12	0.46	4.55
Mg (mg/100g)	16.9	NR	140

NR= No Reportado

(Adaptada de Montillo *et al*, 1997; Flores *et al*, 2002; Ripusudan *et al*, 2001).

El contenido de etanol es otro de los factores que afecta el crecimiento de las BAL, ya que a concentraciones superiores al 6% pueden inhibir u ocasionar la muerte

de algunas especies de BAL (Flanzy, 2003). En base a la bibliografía consultada el pulque es la bebida que contiene mayor grado alcohólico (7-10% v/v) (Cervantes y Pedroza, 2007; García-Garibay *et al.*, 2000), seguida por el tesgüino (1.8% v/v) (Nava y Hernández, 2007) y por último el tepache (0.28% v/v) (Moreno 2005). Con base en estos datos podemos suponer que el pulque es la bebida en donde puede haber mayor inhibición del crecimiento de las BAL por el elevado contenido de etanol de la misma. Cabe mencionar que el contenido de etanol de las bebidas depende en gran medida de la cantidad de azúcares simples presentes en los sustratos, del desarrollo de microorganismos fermentadores y del proceso de elaboración de la bebida (García-Garibay, 2000).

En las muestras estudiadas no se detectaron coliformes, esto puede deberse a que las bebidas fueron elaboradas bajo condiciones de higiene adecuadas o a la muerte de dichos microorganismos, ya que se sabe que este género no sobrevive en ambientes con pH inferior a 4 y que es muy susceptible a temperaturas de congelación (Fernández, 2000), por lo que podemos suponer que dadas las condiciones de acidez de las muestras, el género coliformes no sobrevivió y las muestras se pueden considerar adecuadas para el consumo.

En la figura 9, se puede observar que en la mayoría de las muestras de pulque analizadas, los recuentos de mohos y levaduras son superiores a los de BAL. Esto puede atribuirse a que ambos grupos microbianos comienzan a desarrollarse en la bebida de forma paralela (Cervantes y Pedroza, 2007), sin embargo a medida que la fermentación transcurre, la concentración de etanol en la bebida aumenta inhibiendo la proliferación de las bacterias ácido lácticas predominando el crecimiento de levaduras.

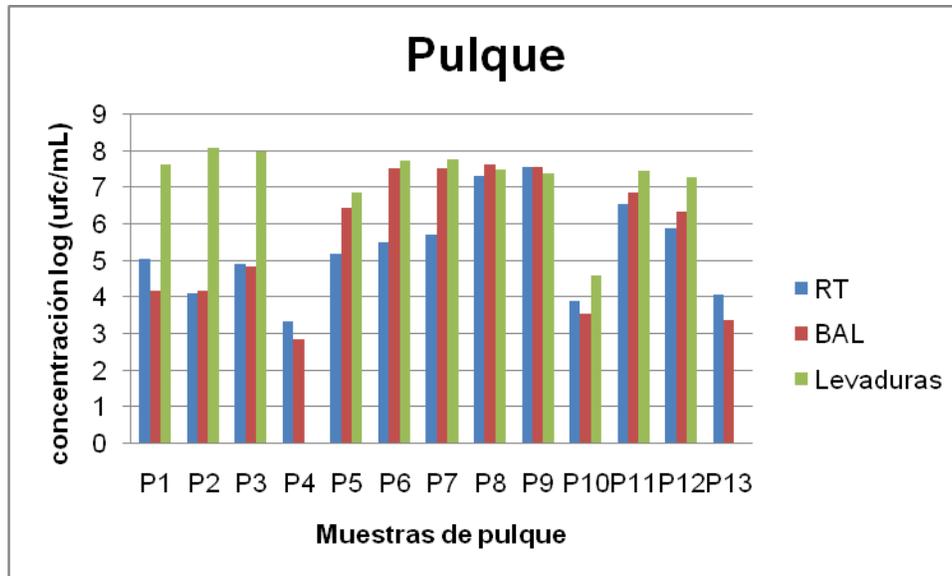


Figura 9. Recuentos microbiológicos de las muestras de pulque

También se observa que en el pulque 4 y el pulque 13, la cantidad de levaduras es mínima en comparación al crecimiento de las BAL, por lo que se puede predecir que el tiempo de fermentación de ambas bebidas fue corto y todavía los grupos microbianos no habían alcanzado su fase estacionaria, considerándolos como pulques jóvenes o poco fermentados (Cervantes y Pedroza, 2007).

En estudios anteriores acerca de la microbiología del pulque se han encontrado concentraciones de microorganismos semejantes a las obtenidas en este estudio. Cervantes y Pedroza (2007) reportan concentraciones de BAL en pulque que van de 1.35 a 8.53 ufc/mL y en el caso de levaduras de 3.57 a 8.69 ufc/mL, dependiendo del tiempo de fermentación de la bebidas. En el presente trabajo los recuentos promedio de BAL son de 5.61 ufc/mL y los de levaduras son de 6.33 ufc/ml; estos valores se encuentran dentro de los rangos reportados por Cervantes y Pedroza (2007).

La figura 10 muestra el comportamiento de los diferentes grupos de microorganismos en las muestras de tepache analizadas, en ella se puede notar que a diferencia del pulque en la mayoría de estas bebidas predominan las BAL,

esto puede atribuirse a que el contenido de alcohol de la bebida es más bajo que en el pulque quizá porque durante el proceso de elaboración de la misma se realizan diluciones consecutivas del fermento lo que disminuye la concentración del alcohol y por ende un mejor desarrollo de las BAL.

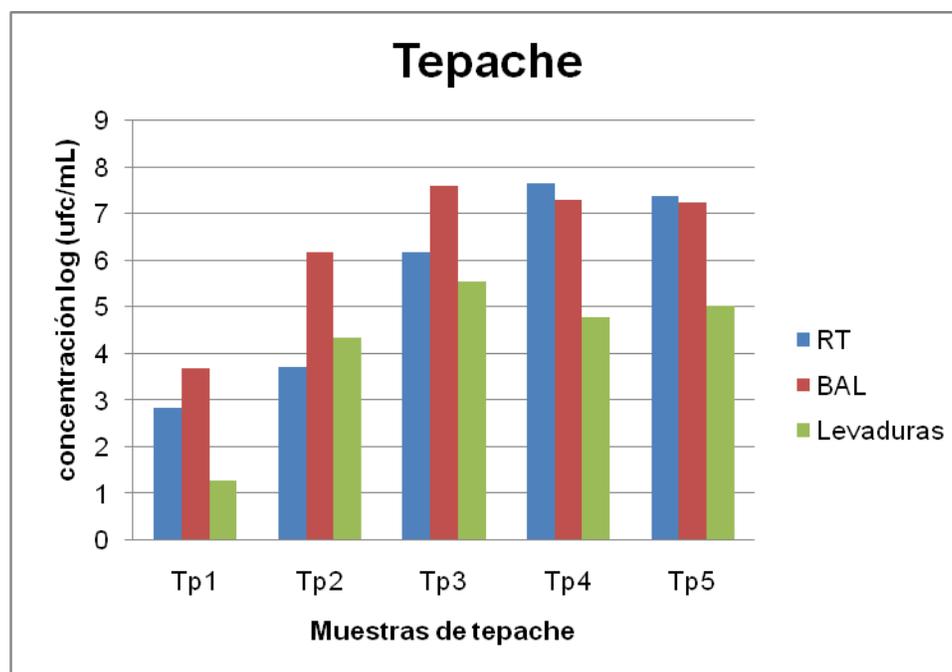


Figura 10. Recuentos microbiológicos de las muestras de tepache

La concentración promedio de BAL encontradas en el presente estudio, 6.40 ufc/mL, es similar a las concentraciones reportadas por Moreno (2005) de 6.37 a 8.56 ufc/mL, en el caso de las levaduras el valor obtenido en nuestro análisis fue de 4.35 ufc/mL y el reportado por dicho autor de 5.27-6.42 ufc/mL. Esta diferencia en la concentración de levaduras puede deberse a los diferentes tiempos de fermentación de las bebidas así como al origen de las mismas, pues las analizadas en este estudio son provenientes del estado de Hidalgo y no se sabía con certeza el tiempo de fermentación de las mismas, mientras que las usadas por

Moreno (2005) son elaboradas en el estado de México y en su estudio se controlaban los tiempos de fermentación.

En el caso de la muestra de tesgüino es importante resaltar que no se tienen datos de estudios microbiológicos anteriores a este que reporten la concentración de cada uno de los grupos microbianos presentes en la bebida. Sin embargo, en la figura 11, se puede ver que el comportamiento de los mismos es un poco parecido al del pulque, puesto que la concentración de levaduras supera la de BAL, aunque es importante mencionar que las concentraciones de microorganismos en el tesgüino son bastante menores a las del pulque.

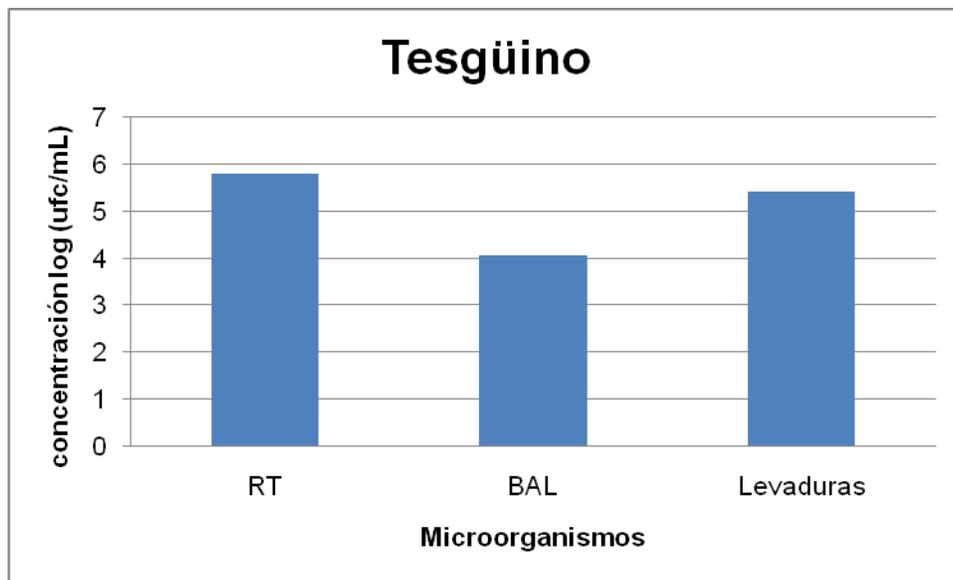


Figura 11. Recuento microbiológico de la muestra de Tesgüino

El análisis de más muestras de tesgüino no fue posible, debido a que en el Estado de Hidalgo no es común la producción y el consumo de esta bebida, la mayor producción de esta bebida se da en los estados del norte y noroeste del país, lo que complicó la obtención de más muestras para su análisis.

Un dato que resultó interesante es que el tesgüino a pesar de ser la bebida con el pH más ácido de las bebidas analizadas, no es la que presenta una mayor concentración de BAL, lo cual nos lleva a suponer que los géneros de estas

bacterias presentes en el tescüino sean principalmente heterofermentativos con producciones importantes de ácido acético, lo que disminuye en mayor proporción que el ácido láctico el pH de la bebida (Holzapfel y Wood, 1995).

En este estudio se aislaron un total de 180 cepas, sin embargo se descartaron 40 de ellas, ya que estas no cumplían con las características de BAL. Es importante resaltar que de algunas muestras se aislaron más cepas que de otras, esto se observa en la tabla 7.

Tabla 7. Morfología y número de BAL aisladas

MUESTRA	BACILOS	COCOS	COCOBACILOS	TOTAL
P1	10	0	0	10
P2	5	0	0	5
P3	6	0	1	7
P4	4	2	0	6
P5	0	0	0	0
P6	6	0	0	6
P7	6	4	0	10
P8	6	2	0	8
P9	7	2	0	9
P10	9	0	0	9
P11	4	0	0	4
P12	6	4	0	10
P13	2	6	0	8
Tp1	0	0	0	0
Tp2	3	5	2	10
Tp3	6	1	3	10
Tp4	0	0	9	9
Tp5	9	0	0	9
Tg1	2	8	0	10
Total	91	34	15	140

En la selección de las colonias de BAL se presentó el crecimiento de otros microorganismos en el medio MRS, aún cuando las BAL eran cultivadas con sobrecapa lo cual permitía una mejor diferenciación de las cepas respecto a otros microorganismos, pues cuando se cultivan de este modo se puede observar mejor la forma lenticular de las mismas lo que facilita su aislamiento.

Otro hallazgo fue la presencia de una cepa con características semejantes a las BAL, las cuales no tenían la capacidad de desarrollar en caldo. Sin embargo, no se sabe con certeza a que género y especie pertenece esta bacteria. Es posible que esta sea la causa de que a pesar de que se encontraron recuentos de BAL tanto en la muestra No.5 de pulque como en la como en la No.1 de tepache, no se aisló ninguna cepa.

De las 140 cepas aisladas, el 65% son bacilos, el 24% cocos y el 11% cocobacilos, esto se muestra en la figura 12.

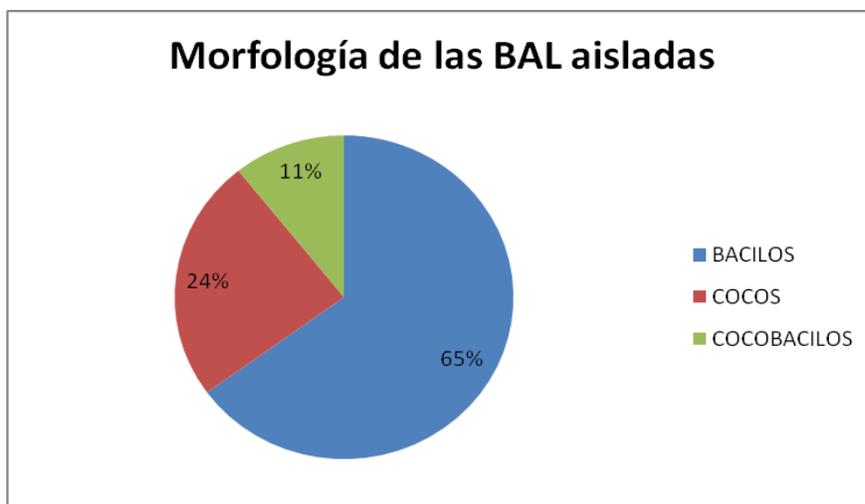


Figura 12. Morfología de las BAL aisladas

Las cepas de BAL aisladas en el presente trabajo se conservaron para posteriormente realizar otros estudios en base a ellas como la identificación a nivel

genotípico de las mismas y probar la capacidad de estas para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos o deterioradores, así como su posible uso en alimentos.

7. CONCLUSIONES

- Las bebidas analizadas presentaban adecuada calidad microbiológica ya que no fueron detectados coliformes en ninguna de las muestras.
- En la mayoría de las bebidas los microorganismos predominantes están conformados por bacterias lácticas y levaduras.
- Las muestras de tepache presentaron en promedio un mayor recuento de bacterias lácticas y de este tipo de bebida se aislaron más cepas de BAL en proporción al resto de bebidas.
- Los valores medios de los resultados microbiológicos para el pulque fueron en orden ascendente LEV>BAL>RT>COL.
- Los valores medios de los resultados microbiológicos para el tepache fueron en orden ascendente BAL>RT>LEV>COL.
- Los valores medios de los resultados microbiológicos para el tesgüino fueron en orden ascendente RT>LEV>BAL>COL.
- Se purificaron y conservaron por congelación un total de 140 cepas de BAL a las que se les determinarán en un estudio posterior sus propiedades antimicrobianas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abundis, V. B. (2007). Monografía de Agave Pulquero. Secretaría de Desarrollo Social del Estado de Puebla.
- Adams, M. R. y Moss M. O. (1998). Microbiología de los alimentos. Ed. ACRIBIA, Zaragoza España. 321-330.
- Aguirre, M. y Colins, M.D. (1993). Lactic acid bacteria and human clinical infection. J. Application Bacteriology. 75: 95-107
- Anderson, R. K., Calvo, J., Payne, G. C., Serrano, G. (1946). A Study of the Nutritional Status and Food Habits of Otomi Indians in the Mezquital Valley of Mexico. Journal Public Health. 36(8):883-903.
- Axelsson, L. T. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. En: *Lactic Acid Bacteria*, Salminen, S. y von Wriegt, A. (Eds) Marcel Dekker, Nueva York. 1-53.
- Aymerich, T; Martín, B; Rovira, J y Garriga, M. (2004). Caracterización de bacterias de interés tecnológico en productos fermentados mediante técnicas moleculares. Revista Eurocarne 131:1-4.
- Backstrand J.R., Allen L. H., Martínez E., y Pelto G.H. (2001). Maternal consumption of pulque a traditional central Mexican alcoholic beverage: relationships to infant growth and development. Health Nutrition. Cambridge University Press. 4:883-891.

- Cabeza H. E. (2006). Bacterias ácido lácticas: aplicación como cultivos estárter en la industria láctea y cárnica. Simposio regional de microbiología “Microorganismos eficientes en el sector productivo”. Colombia.
- Camacho, C. (2005). Hidalgo: alarma elevado número de muertes ligadas al consumo de pulque. La Jornada (28 agosto del 2007).
- Castillo, F. M. A. y Leyva , P. M. A. (2005). Alcoholismo: El despojo de una herencia cultural a la caricatura del poder. El cotidiano. 20(132): 64-77.
- Cervantes, C., Pedroza, R. (2007). El pulque características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. Revista ciencias biomédicas México DF 5(8): 135-144
- Chellapandian, M., Larios, C., Sánchez-González, C., López-Munguía, A. 1998. Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from pulque, a traditional aztec alcoholic beverage. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 22:857-863.
- Cintas, L; Casaus, M; Herranz, C; Nes, I., Hernández, P. (2001) Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria REVIEW. Food Science Technology International. 7(4): 281-305.
- Delfin, G. M. E. 2004. Breves noticias sobre la producción de pulque en Tacubaya durante la época colonial. Dirección: http://www.historiacocina.com/paises/articulos/pulque.html#_ftnref3. Acceso: 12/09/10.
- De Vuyst L. y Leroy F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 13:194–199.

- Escalante, A., Rodriguez, M., Martínez A., López-Munguía, A., 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: 273-279.
- Fernández E. E. *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. (2000). Editorial Universidad Autónoma de Querétaro. México. 31-33, 43-48, 53-54.
- Ferrer, B y Dalmau, J. (2001). Alimentos funcionales probióticos. *Acta Pediátrica Española*. 59(3): 150-152.
- Flanzy, C. (2003). *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Ed. Mundi prensa. 2ª edición. Madrid España. 344-350.
- Flores, M., Mora, E., Romero, A. (2002). Evaluación fisicoquímica del aguamiel de tres variedades de maguey pulquero (*Agave spp*). Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala. Escuela nacional de ciencias biológicas. Departamento de graduados en alimentos.
- García-Garibay, M., Quintero-Ramírez, R., López-Munguía C. A., (2000). *Biotechnología alimentaria*. Ed. Limusa. México. 263-269, 301-306.
- Gilliland, S; Morelli, L., Reid, G. (2001). Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico.85: 4-14.
- Godoy A., Herrera T., Ulloa M. (2003). Más allá del pulque y el tepache. Las bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México. UNAM. México D.F. 61-78.

- Guarner, F; Khan, A; Garisch, J; Eliakim, R; Gangl, A; Thomson, A; Krabshuis, J., Le Mair, T. (2008). Probióticos y Prebióticos. Organización Mundial de Gastroenterología. 12-17
- Hatcher, E.S., Weihe, J.L., Splittstoesser, D.F. (1992). Fruit Beverages. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Publication. Health Association., Washington. DC. 953-960.
- Hernani, L., Flórez, F. y Huapaya, J. (2007). Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Revista Horizonte Médico 7:1.
- Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B. (1995). Lactic acid bacteria in contemporary perspective. The genera of lactic acid bacteria. Chapman and Hall press, Gran Bretaña 1-5.
- Jay, M. J. (2000). Alimentos fermentados y productos de fermentación afines. Microbiología Moderna de los alimentos. 3ra ed. Acribia, España. 441-479.
- Lappe, P., Ulloa, M. (1989) Introducción. Estudios étnicos, microbianos y químicos del tesgüino tarahumara. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 9-22.
- Larpent, J.P. (1994). Microbiología Alimentaria. Fermentaciones alimentarias. Capítulo 2 "Las bacterias lácticas". Ed. ACRIBIA, Zaragoza, España. 3-15.
- Lennart Blomberg. 2000. Tequila, mezcal y pulque, lo auténtico mexicano. Ed. Diana. México. D.F. 101-120.
- Leveau, J. y Bouix, M. (2000). Microbiología Industrial. Los microorganismos de interés industrial. Ed. ACRIBIA, Zaragoza, España. 220-242.

- Lindgren, S.E. y Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology*. 87:149-164.
- Ljungh, A. y Wadström, T. (2005). Lactic Acid Bacteria as Probiotics. *Issues Intestinal Microbiology*. 7: 73–90.
- Lyhs U. (2002). Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki. 9-10.
- Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Primera edición, 3ra reimpresión 1994, Fondo de cultura económica. México.
- Milena, V; Suarez, M., Zapata, B (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por BAL en la conservación de carne. *Revista Chilena de nutrición*. 36(1):64-68.
- Montillo, B; Fernández, S; Alcala, M y Gallardo, M. (1997). El cultivo de la piña en Venezuela. Fondo nacional de investigaciones agropecuarias. Centro de Investigación del Estado de Lora Venezuela. 143-145.
- Moreno T. C. R. D. (2005). “Determinación de las características microbiológicas, bioquímicas, fisicoquímicas y sensoriales para la estandarización del proceso de elaboración de tepache”. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. 3-12, 13-14, 48-60.
- Musacchio, H. (1999). Pulque. *Milenios de México*. Tomo III. Diagrama, México. 2465-2466.

- Nava, A. y Hernández, S. (2007). Elaboración y caracterización de tesgüino azul.. XII congreso nacional de biotecnología y bioingeniería. México.
- Niinivaara, E. (1991). Starter Cultures in the Processing of Meat by Fermentation and Dehydration. Reciprocal Meat Conference Proceedings. 44: 59-62.
- Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCF1-2005. Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones.
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
- Ortiz de Montellano, B. (1990). Aztec Medicine, Health and Nutrition. New Brunswick: Rutgers University Press. 217.
- Paredes, L. O., Guevara, L., Bello, P. A. (2006). Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. México. Fondo de Cultura Económica. 212:68-92
- Parra, H. (2010). Bacterias ácido lácticas: papel funcional de los alimentos. Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 8(1): 94-102.
- Pearl-Solomon, E., Berg, L., Martin, D., Ville, C. (1998). Biología de Villee, Editorial McGraw-Hill. Interamericana. 184-185, 542.

- Requena T. y Peláez C. (1995). Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. Revista Española Tecnología de alimentos. 35:19-44.
- Ripusudan, L; Granados, G., Lafitte, R. (2001). El maíz en los tropicos mejoramiento y producción. FAO. 45-47.
- Ruiz, L. Rojo, B. Sáenz, Y., Navarro, L. Diez, L. Zarazaga M., Torres, C. (2000). Bacteriocinas para la estabilización microbiológica y reducción de la dosis de SO₂. 1-4
- Ruiz, M (2008). Un nuevo producto probiótico de cerdo ibérico. La agricultura y la ganadería extremeñas. 105-115.
- Ruvalcaba M.J. (1983). El maguey manso historia y presente de Epazoyucan, Hgo. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- Rzedowski R.J., Calderón, R. G. (1990). Flora Fanerogámica del Valle de México: Instituto de Ecología. Michoacán, México.
- Salminen, S. y Wright, A. (1998). Lactic acid bacteria, microbiology and functional aspects. USA. 6-16.
- Sánchez-Marroquín, A., Vierna L., Manriques, S., Hiranaka, H. (1969). Producción extracelular de L-lisina por mutantes de *Ustilago maydis*, en jugo de *Agave sp.* Revista Latinoamericana de Microbiología y Parasitología. 11:183-190.
- Santillán, M. A. (2004). Aislamiento y caracterización de cepas bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 1-11.

- Savadogo, A; Cheik, A; Ouattara, T; Imael, H; Bassole, A y Traore, S. (2004). Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Burkina Faso Fermented Milk. *Pakistan Journal of Nutrition* 3 (3): 174-179.
- Stiles, M. E. y Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36:1-29.
- Ulloa, M., Herrera, T., Lappe, P. (1987). Fermentaciones tradicionales indígenas de México. N° 6. México, D.F.: Instituto Nacional Indigenista.
- Vandamme P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. y Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* 60(2): 407-438.
- Ward, O.P. (1997). *Biotecnología de la fermentación*. Editorial Acribia. Zaragoza España. 133.
- Wood B. J. (1995). *The lactic acid bacteria in health and disease*. Aspen. 1:15-45.
- Yang R., Ray B. (2000). Factors influencing production of bactericins by lactic acid bacteria. *Food microbial*. 11:282-291.