



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

LICENCIATURA EN QUÍMICA DE ALIMENTOS

**TESIS**

**DESARROLLO DE UN CHOCOLATE CON RELLENO A BASE  
DE BIÓTICOS PROVENIENTES DE PRODUCTOS DE  
AGUAMIEL**

**Para obtener el título de  
Licenciado en Químico de Alimentos**

**PRESENTA**

Guillermo Enrique Liborio Aldana

**Directora**

Dra. Araceli Castañeda Ovando

**Codirectora**

Dra. Yari Jaguey Hernández

Mineral de la Reforma, Hgo., México, diciembre 2024



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería  
*School of Engineering and Basic Sciences*

Mineral de la Reforma, Hgo., a 13 de diciembre de 2024

**Número de control:** ICBI-D/2414/2024  
**Asunto:** Autorización de impresión.

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO  
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Con fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio le comunico que el Jurado asignado al Egresado de la Licenciatura en Química de Alimentos **Guillermo Enrique Liborio Aldana**, quien presenta el trabajo de titulación “**Desarrollo de un chocolate con relleno a base de bióticos provenientes de productos de aguamiel**”, después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

**Presidente:** Dr. Javier Añorve Morga

**Secretario:** Dra. Ana Luisa Gutiérrez Salomón

**Vocal:** Dra. Araceli Castañeda Ovando

**Suplente:** Dra. Yari Jaguey Hernández

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

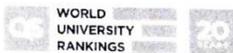
Atentamente  
“Amor, Orden y Progreso”

Mtro. Gabriel Vergara Rodríguez  
Director del ICBI



GVR/YCC

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184  
Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 40001  
direccion\_icbi@uaeh.edu.mx.  
vergarar@uaeh.edu.mx



Algunos de los resultados del presente trabajo han sido presentados en el siguiente foro científico:

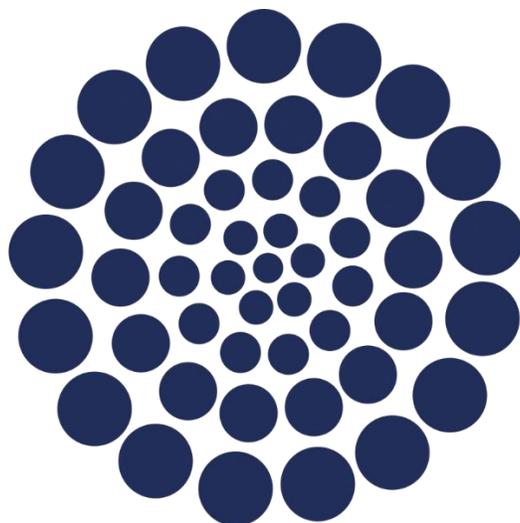
- XXV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos celebrado en Guanajuato, Guanajuato del 15 al 17 de mayo de 2024, con el trabajo titulado *“Evaluación de la calidad microbiológica del aguamiel y el pulque de la región de San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México”*.

Algunos resultados han sido aceptados para su publicación en:

- Liborio-Aldana G.E., Castañeda-Ovando A., Jaguey-Hernández Y., Romo-Gómez C., Contreras-López E., Jaimez-Ordaz J., Tapia-Ignacio C. “Evaluación de la calidad microbiológica del aguamiel y el pulque de la región de San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México”. *Journal of Basic Sciences*. Artículo aceptado.



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisicoquímica de Alimentos 2 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.



# CONAHCYT

CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS

El presente trabajo de investigación fue financiado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías, a través del proyecto *“Valorización del aguamiel producido en comunidades del Estado de Hidalgo: producción sustentable de jarabe rico en oligofructanos destinado a sectores económicos medio y medio alto”*, con clave 317510.

# DEDICATORIAS & AGRADECIMIENTOS



Poema "Agua" (1926) de Xavier Villaurrutia (1903-1950, México):

"Tengo sed.  
¿De qué agua?  
¿Agua de sueño?, No.  
De amanecer."

Despertemos, vayamos a desayunar lo que tiene la vida  
que brindar antes de que el vino del deseo que fluye por  
nuestras venas se agote y nos marchitemos.

Hiram Silva Velasco

## **Dedicatorias**

A mis padres, Ana María y Ascensión, por su increíble labor como los precursores de que esta tesis pueda elaborarse. Sin su dedicación, esfuerzo, tiempo y energía, no estaría presenciando el gran mundo de la ciencia. Sin ustedes absolutamente nada de esto sería posible, en verdad, gracias por tanto... Realmente es invaluable todo el tiempo y la confianza que invirtieron en mí para que hoy sea un profesionalista.

A mi hermano Luis Antonio, por sus invaluable conocimientos en diversas herramientas digitales que contribuyeron a la elaboración de esquemas presentados en esta tesis. Además de su respaldo emocional, las risas, además de su disposición en todo.

A mi hermana Ana Karen, por sus conocimientos en el campo del idioma inglés, los cuales fueron claves para mi comprensión en este idioma. Agradezco infinitamente su eterna generosidad, sus palabras de aliento y su constante apoyo.

A ambos les agradezco tanto todo lo que han hecho por mí y es una deuda que nunca podré pagar. Son un ejemplo a seguir para mí y en más de una ocasión dejan la vara muy alta.

A Karina, por contribuir en mi desarrollo humano y estudiantil. Le agradezco su acompañamiento y sus palabras de apoyo en la elaboración de este proyecto; de la misma forma agradezco infinitamente el tiempo de calidad y conocimientos que hemos compartido. Gracias por hacerme una mejor persona y por ser una gran fuente de inspiración.

A mis mascotas, Pituka y Janna por acompañarme en tantas noches, por su cariño y por ser ejemplo de que debo valorar las cosas pequeñas de la vida.

## **Dedicatorias**

Esta tesis la dedico especialmente a los profesores que confiaron en mí y cuyos aportes fueron fundamentales para mi desarrollo como estudiante y profesionista. Sin su labor, dedicación y apoyo, no tendría las herramientas suficientes para que hoy vea completada esta tesis. A continuación, hago mención honorífica de los profesores que más remarcaron mi crecimiento estudiantil y profesional.

A la doctora Araceli Castañeda Ovando, por ser la primera en confiar en este proyecto. Sus ideas, consejos, conocimientos, apoyo, interés, oportunidades y, sobre todo, las enseñanzas que me ha dado. Gracias a usted le tengo una gran pasión a esta licenciatura. Su paso por mi vida académica fue fundamental para darme cuenta de que necesitaba conocer más de la química de los alimentos. Su exigencia es un aliciente para seguir aprendiendo y hacer las cosas sin atajos y bien hechas.

A la doctora Yari Jaguey Hernández, por su increíble paciencia en todos los experimentos que teníamos que hacer y en todos los avances de este proyecto. Su acompañamiento y búsqueda de rutas para esta investigación fue precisa para la culminación de esta tesis. Sus conocimientos fueron cruciales para llevar a cabo toda la parte microbiológica del proyecto, pero también me ayudaron a aprender cosas que desconocía de esta y otras áreas de las ciencias.

A ambas les agradezco enormemente el apoyo y las oportunidades que me dieron, incluso en los momentos más difíciles. Ese apoyo emocional y profesional es la cuna de este proyecto. ¡Gracias!

Al ingeniero Plinio Herrera Hernández, por sus valiosas contribuciones en el campo de las matemáticas. Gracias a sus invaluable conocimientos, mi paso por el bachillerato y la universidad fue duradero. Es ejemplo de los profesores que tienen verdadera vocación por sus alumnos y que, de manera totalmente desinteresada, compartió conmigo gran parte de los conocimientos que poseo en este campo. ¡Gracias!, infinitas gracias.

## **Agradecimientos**

Agradezco a mis amigos: Abril, América, Jonathan, Lorena y Mariana por las risas, por escucharme, por su apoyo, por sus consejos y conocimientos que fueron claves en mi paso por la universidad. Gracias por todas las horas que convivimos y todas las batallas que atravesamos juntos.

A las doctoras Elizabeth y Judith, por todo su apoyo, préstamo de instalaciones, consejos y conocimientos que me ayudaron a orientar mis pasos por la vida universitaria y en este proyecto.

Le agradezco a la Esp. Biotec. Xochitl por sus enseñanzas en gestión de calidad, que sirvieron para algunos enfoques del proyecto, además de su confianza y oportunidades.

Agradezco especialmente al doctor Felipe Mera Reyes, por haber facilitado asesorías, además de material bibliográfico que servirían como referente histórico para contextualizar al aguamiel y una fracción de la justificación de este proyecto. Gracias por transmitir sus conocimientos de una manera muy clara y con mucho ánimo.

Agradezco a Laura Elena Gómez Lizárraga por el Servicio Académico de Microscopía Electrónica de Barrido del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.

A Pablo por auxiliarme en la elaboración de las portadas de las diferentes secciones de la presente tesis.

A la doctora Claudia Romo, por servir como puente de comunicación con los productores de aguamiel y pulque, dos de las tres materias primas protagónicas de esta tesis.

A los doctores Luis Guillermo, Javier Añorve, Emmanuel y Daniel Omar, que aportaron conocimientos, información, facilidades e instalaciones que sirvieron para la estructuración de esta tesis.

A mis amigos de laboratorio: Lizbeth Nava, Diana Gálvez, Lizeth Luna, Selene, Itzury, Mayerli, Jovani, Laura, Daniela Tolentino, Oliver y Maribel, por su compañía y apoyo en esta tesis.

Agradezco a la química Patricia por inducirme en el mundo de la química, y al ingeniero Rubalcava por sus conocimientos. Gracias a ambos por formar mis bases como estudiante.

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, gracias por el préstamo de instalaciones, equipo, materiales e insumos que hicieron posible la realización de este proyecto de tesis.

## Contenido

Índice de figuras .....	IV
Índice de tablas .....	V
Lista de acrónimos.....	VI
1. Introducción .....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1. Aguamiel.....	2
2.1.1. Composición y propiedades fisicoquímicas .....	2
2.1.2. Microorganismos presentes en el aguamiel .....	4
2.2. Jarabe de aguamiel.....	5
2.2.1. Obtención.....	5
2.2.2. Composición y propiedades fisicoquímicas .....	7
2.2.3. Propiedades funcionales .....	7
2.3. Pulque .....	9
2.3.1. Proceso de obtención .....	10
2.3.2. Microorganismos presentes en el pulque .....	10
2.3.3. Propiedades fisicoquímicas .....	11
2.3.4. Propiedades funcionales .....	12
2.4. Microbiota humana .....	12
2.5. Probióticos.....	14
2.5.1. Fuentes de probióticos .....	15
2.5.2. Beneficios a la salud .....	16
2.6. Prebióticos .....	16
2.6.1. Fuentes .....	16
2.6.2. Beneficios a la salud.....	17

2.7.	<b>Chocolate</b> .....	18
2.7.1.	<b>Propiedades</b> .....	18
2.7.2.	<b>Características fisicoquímicas</b> .....	19
2.7.3.	<b>Rellenos</b> .....	20
3.	<b>Objetivos</b> .....	22
3.1.	<b>Objetivo general</b> .....	22
3.2.	<b>Objetivos específicos</b> .....	22
4.	<b>Metodología</b> .....	23
4.1.	<b>Obtención y caracterización microbiológica del aguamiel</b> .....	23
4.1.1	<b>Obtención del aguamiel</b> .....	23
4.1.2	<b>Caracterización microbiológica del aguamiel</b> .....	23
4.2.	<b>Jarabe de aguamiel</b> .....	24
4.2.1.	<b>Obtención</b> .....	24
4.2.2.	<b>Caracterización</b> .....	24
4.3.	<b>Bióticos del pulque</b> .....	26
4.3.1.	<b>Obtención</b> .....	26
4.3.2.	<b>Determinación de proteínas por método de Bradford</b> .....	27
4.3.3.	<b>Análisis por SEM</b> .....	27
4.4.	<b>Formulación y caracterización del chocolate relleno</b> .....	27
4.4.1.	<b>Diseño del relleno a base de jarabe de aguamiel y sólidos del pulque</b> .....	27
4.4.2.	<b>Formulación del chocolate relleno</b> .....	28
4.4.3.	<b>Análisis por microscopía digital</b> .....	29
4.4.4.	<b>Evaluación de la estabilidad oxidativa</b> .....	29
5.	<b>Resultados y discusión</b> .....	30
5.1.	<b>Análisis microbiológico del aguamiel y el pulque</b> .....	30

5.2.	Jarabe de aguamiel.....	34
5.3.	Análisis de parámetros fisicoquímicos del jarabe de aguamiel.....	34
5.3.1.	Actividad de agua ( <i>aw</i> ) y sólidos solubles totales (°Bx).....	34
5.3.2.	Viscosidad .....	35
5.3.3.	Color.....	36
5.3.4.	pH .....	37
5.3.5.	Composición proximal.....	39
5.4.	Sólidos del pulque .....	39
5.4.1.	Rendimiento .....	39
5.4.2.	Morfología .....	40
5.4.3.	Determinación del contenido proteico .....	42
5.5.	Chocolate con relleno de productos de aguamiel.....	42
5.5.1.	Propiedades fisicoquímicas del chocolate .....	42
5.5.2.	Análisis microbiológico.....	43
5.5.3.	Análisis microscópico de la superficie del chocolate.....	45
5.5.4.	Análisis microscópico de la parte interna del chocolate.....	47
5.5.5.	Análisis microscópico de mohos y levaduras del chocolate.....	49
5.5.6.	Estabilidad oxidativa del chocolate .....	51
6.	Conclusiones .....	54
7.	Referencias .....	55

## Índice de figuras

Figura 1. Proceso de extracción del aguamiel, elaboración del pulque y jarabe de aguamiel. ....	6
Figura 2. Propiedades benéficas de los fitoquímicos presentes en el jarabe de aguamiel. (A) Fenoles, flavonoides y taninos. (B) Efecto de las saponinas y cumarinas sobre el corazón. .9	
Figura 3. Representación de interacciones por puentes de hidrógeno.....	35
Figura 4. Productos de la formación de HMF. ....	38
Figura 5. Mecanismo de formación de derivados del furfural a partir de sacarosa, a través de la caramelización. ....	39
Figura 6. Sólidos de pulque liofilizados conteniendo (A) Probióticos (PPr) y (B) Parabióticos (PPa). ....	40
Figura 7. Micrografías de los sólidos de pulque. (A y C) sólidos de pulque sin esterilizar [PPr], (B y D) sólidos de pulque esterilizados [PPa]. Las adquisiciones se realizaron a 3000X y 10 000X, respectivamente. ....	41
Figura 8. Micrografías del chocolate 1:5. (A) y (B) Superficie del chocolate a 80x. ....	45
Figura 9. Micrografías del chocolate 1:5. (A) y (B) Cumbre del chocolate a 100x y 300x, respectivamente. ....	46
Figura 10. Micrografías del chocolate 1:6. (A) y (B) Superficie del chocolate a 20x. ....	46
Figura 11. Micrografías del chocolate: (A) Chocolate seccionado, (B), (C) y (D) presencia de gas dentro del relleno del chocolate.....	48
Figura 12. Micrografías de la colonia CTC. (A) Cocobacilos G+, (B) Partículas del chocolate. ....	50
Figura 13. Estructuras de mohos en pulque. (A) Micelio de <i>Penicillium</i> spp. a 1500x, (B) <i>Penicillium</i> spp. a 1500x, (C) Estructura completa del moho a 300x. ....	51
Figura 14. Estabilidad oxidativa de los chocolates 1:5 y 1:6 a 90°C. ....	52

## Índice de tablas

Tabla 1. Características fisicoquímicas del aguamiel.....	3
Tabla 2. Composición nutricional del jarabe de aguamiel. ....	8
Tabla 3. Cepas de microorganismos probióticos aislados de pulque. ....	15
Tabla 4. Características fisicoquímicas de distintos tipos de chocolate. ....	20
Tabla 5. Formulaciones de rellenos a base de sólidos de pulque y jarabe de aguamiel. ....	28
Tabla 6. Resultados del análisis microbiológico de las muestras de aguamiel y pulque. ....	30
Tabla 7. Diferencia total de color ( $\Delta E$ ) del JAC contra otros jarabes de aguamiel.....	36
Tabla 8. Actividad de agua de los chocolates rellenos a diferentes proporciones.....	43
Tabla 9. Análisis microbiológico de las mezclas entre jarabe de aguamiel y liofilizado de pulque. ....	43
Tabla 10. Análisis microbiológico de las muestras de chocolate. ....	44
Tabla 11. Comparación de cifras de la carga microbiológica de diferentes chocolates. ....	45
Tabla 12. Comparación de características morfológicas de las colonias. ....	50

## Lista de acrónimos

°Bx (Sólidos solubles totales).

$a_w$  (Actividad de agua).

CFC (Colonia Filamentosa-Chocolate).

cP (centipoise).

CTC (Colonia Transparente-Chocolate).

CTIC (Colonia Transparente, Irregular-Chocolate)

EPS (Exopolisacáridos).

FOS (Fructooligosacáridos).

GOS (Galactooligosacáridos).

HMF (Hidroximetilfurfural).

IP (Periodo de inducción).

JAC (Jarabe de aguamiel elaborado en cazo de cobre).

LDL (Lipoproteínas de baja densidad).

NMP (Número Más Probable).

PPa (Sólidos parabióticos).

PPr (Sólidos probióticos).

RPM (Revoluciones Por Minuto).

SAGT (San Agustín Tlaxiaca, Hgo.).

SEM (Microscopia Electrónica de Barrido).

UFC (Unidades Formadoras de Colonias).

Z1 y Z2 (Muestras de Zempoala, Hgo.).

$\Delta E$  (Diferencia total de color).

1

# Introducción



## 1. Introducción

El aguamiel es la savia proveniente del agave, cuya composición y sabor cambia dependiendo de la especie y el suelo del cultivo del cual se extrajo. Siendo su principal derivado el pulque, que es una bebida fermentada por un consorcio de bacterias y levaduras que tienen como producto final de su metabolismo el etanol que es el causante de la graduación alcohólica de esta bebida. Aunque el pulque tiene posibles efectos probióticos a la salud del consumidor, esta bebida no tiene una gran diversificación para producir una amplia gama de productos.

Algunos productores del aguamiel han buscado expandir su uso procesándolo para la obtención de su jarabe. Mientras que los productores del pulque buscan diversificarlo produciendo curados, destilados, galletas, pan y paletas congeladas. A pesar de esos esfuerzos, la difusión del consumo del aguamiel y el pulque siguen siendo pobremente arraigados. Los estudios enfocados al aislamiento de inulina y probióticos han ganado más fuerza ante la exigencia de los consumidores por alimentos más saludables y con beneficios potenciales a su salud.

Sin embargo, al día de hoy no se ha encontrado un estudio que utilice al jarabe de aguamiel como una materia prima para un producto alimenticio diferente en la industria chocolatera. Asimismo, el pulque también tiene poca participación como actor protagonista en la elaboración de productos, salvo para el aislamiento de probióticos.

Por otro lado, el chocolate es un alimento ampliamente consumido alrededor del mundo. Suiza es mundialmente conocida por su extenso consumo de chocolate entre sus habitantes, ostentando el primer lugar a nivel mundial con un consumo per cápita de 11.8 kg en 2022, mientras que en México se cuenta con un consumo de 6.4 kg per cápita en el mismo año (Richter, 2023, Food Tech, 2023). Se prevé que la industria chocolatera en México siga en aumento con un valor de 64.3 millones de dólares para el 2026 (Food Tech, 2023).

Por lo que, el objetivo del presente trabajo fue formular un chocolate con relleno a base de productos de aguamiel y enriquecido con bióticos (prebióticos y parabióticos) obtenidos del pulque con potencial efecto benéfico a la salud. El desarrollo de este chocolate permitirá dar otra alternativa de diversificación del uso del aguamiel y el pulque.

2

Antecedentes



## 2. Antecedentes

### 2.1. Aguamiel

#### 2.1.1. Composición y propiedades fisicoquímicas

El aguamiel es una savia obtenida del maguey pulquero (*Agave mapisaga*, *A. salmiana*, *A. durangensis*, *A. ferox*, *A. atrovirens*, *A. americana*), es una bebida de sabor dulce, puede ser incoloro, amarillo claro o ámbar, con olor herbáceo y textura viscosa (Villareal-Morales *et al.*, 2019; Vera-Morales *et al.*, 2024; Castañeda-Ovando *et al.*, 2023). La extracción del aguamiel se da en las siguientes especies: *Agave macroculmis*, *A. masipaga*, *A. masipaga* var. *lisa*, *A. salmiana*, *A. angustifolia*, *A. ferox*, *A. salmiana* subsp. *Crassispina*, y *A. tecta* (Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018).

En la región de Mesoamérica se cultivaban una gran diversidad de especies de agave, principalmente entre los estados de Hidalgo, Estado de México, Morelos, Tlaxcala, Querétaro y la Ciudad de México (García-Arce & Castro-Muñoz, 2021). Navarrete-Torres y García-Muñoz (2021) reportaron que el estado de Hidalgo sigue siendo el mayor productor de maguey pulquero con el 78.14% de la producción nacional. La producción mayoritaria se encuentra en el Valle del Mezquital y la Altiplanicie Pulquera, se presume que los *hñähñu* fueron los primeros en producirla hacia el año 1500 – 2000 a.C. (Medina-Mendoza *et al.*, 2022), en la actualidad, estos pueblos y sus mezclas, son la población indígena que ha mantenido la extracción del aguamiel y sus derivados (Reyes-Agüero *et al.*, 2019).

El aguamiel se puede consumir como alimento fresco, aunque también se ha empleado como materia prima para la obtención de pulque y para la extracción de componentes de importancia alimentaria gracias a su valor nutricional y/o nutracéutico como gomas, proteínas, saponinas, vitaminas (B y C), aminoácidos libres, compuestos fenólicos y minerales entre los que destacan K, Ca, Na, Fe, Co, Mg, Se y Zn (Cázares-Vásquez *et al.*, 2021; Vera-Morales *et al.*, 2024). Se ha reportado que las saponinas presentan actividad antiinflamatoria, antifúngica, antibacteriana y anticancerígena; mientras que, los compuestos fenólicos le confieren actividad antioxidante, de hecho, se han reportado valores de 904.8µM de ácido gálico (Cázares-Vásquez *et al.*, 2021).

El principal componente del aguamiel es el agua ~88% y del 7 – 14% de carbohidratos que se han aprovechado para la elaboración de jarabes y bebidas alcohólicas (Peralta-García, 2019; Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018).

En peso seco, el aguamiel llega a contener hasta el 75% de carbohidratos, de los cuales el 10% son fructo-oligosacáridos (FOS). El 32.4% corresponde a fructosa, 26.5% glucosa y 8.8% sacarosa y en menor proporción xilosa, galactosa y arabinosa (Castañeda-Ovando *et al.*, 2023; Ávila-Lara *et al.*, 2021), además de proteínas (3%), minerales (3%) y aminoácidos libres (0.26%), como fenilalanina, tirosina, triptófano, lisina, metionina, valina, leucina, arginina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glicina, treonina, alanina, prolina, cisteína e isoleucina (Romero-López *et al.*, 2015; Hernández-González *et al.*, 2017).

Las características fisicoquímicas del aguamiel dependen principalmente de la variedad del agave, así como de las condiciones de cultivo. En la Tabla 1 se muestran algunos resultados encontrados en la literatura.

**Tabla 1.** Características fisicoquímicas del aguamiel.

Propiedad	Ortiz-Basurto <i>et al.</i> , 2008 <sup>a</sup>	Medina-Mendoza <i>et al.</i> 2022 <sup>b</sup>	Escalante <i>et al.</i> , 2016 <sup>b</sup>
pH	4.5	6.8	4.5-7.5
Densidad (g/mL)	NA	1.025	1.032-1.051
°Brix	NA	10	7 - 17
Proteínas <sup>c</sup>	3.00±0.60	1.18	0.30-0.60
Cenizas <sup>c</sup>	3.30±0.80	0.24	0.30-0.43
Acidez total <sup>d</sup>	NA	1.60	0.9–1.03
Alcohol <sup>c</sup>	NA	0.10	NA

Variedades analizadas: <sup>a</sup>*Agave mapisaga*, <sup>b</sup>sin determinar. Resultados expresados como: <sup>c</sup>%(m/v), <sup>d</sup>g de ácido láctico/L. NA: No analizados, SD: Sin determinar.

El contenido de azúcares totales y directos se ha reportado de 6-12 y 2-3 mg de glucosa/100 mL, respectivamente (Escalante *et al.*, 2016). Estos componentes son importantes para la fermentación del aguamiel a pulque. Las gomas son otra familia de componente de interés contenidas en el aguamiel, las cuales presentan niveles de 0.2-0.6 mg de glucosa/100 mL (Escalante *et al.*, 2016). De los compuestos de mayor interés desde el punto de vista de

bioactividad están los FOS, los cuales representan hasta el 10% del total de carbohidratos presentes en el aguamiel (Ortíz-Basurto *et al.*, 2018). El aguamiel también contiene aminoácidos libres, aunque en menor proporción (0.3%), encontrándose la mayoría de los esenciales (Ortíz-Basurto *et al.*, 2018).

Debido a la presencia de prebióticos como los FOS y exopolisacáridos, se ha planteado su uso en la industria alimentaria como una bebida funcional (Cázares-Vásquez *et al.*, 2021).

### **2.1.2. Microorganismos presentes en el aguamiel**

En el aguamiel se ha reportado una gran diversidad de microorganismos, dentro de los que se incluyen: *Acetobacter malorum*, *Amycolatopsis orientalis*, *Candida*, *Clavispora*, *Diplobacter*, *Hansenula*, *Kluyveromyces marxianus var. Bulgaricus*, *Leuconostoc*, *Mycoderma*, *Pseudomonas*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *S. cerevisiae*, *Sarcina*, *Streptococcus*, *Zymomonas mobilis*, *Bacillus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei*, *L. citreum*, *L. mesenteroides*, *Pichia* (Cázares-Vásquez *et al.*, 2021).

Los exo-polisacáridos producidos por *Zymomonas mobilis*, *Bacillus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus casei*, *L. citreum*, *L. mesenteroides* y *Pichia* se les han atribuido propiedades anticoagulantes, antibacterianas, actividad fibrinolítica, fuente prebiótica, efecto emulsionante, antioxidante y actividad inmunomoduladora (Cázares-Vásquez *et al.*, 2021). Mientras que, los FOS son producidos por *Aspergillus niger* y *A. oryzae* (Vera-Morales *et al.*, 2024).

Debido a la gran cantidad y variedad de microorganismos en el aguamiel se observa una rápida fermentación, por lo que, algunos productores optan por pasteurizarlo y refrigerarlo hasta su comercialización (Ávila-Lara *et al.*, 2021), sin embargo, esta práctica elimina gran cantidad de microorganismos presentes y que podrían ser beneficiosos para la salud humana. El consumo de aguamiel ha disminuido en las últimas décadas, por lo que los productores han optado por desarrollar productos con una vida útil mayor y que permita su comercialización. A partir de la década de 1990, los productores rurales que cultivan y extraen el aguamiel han producido el jarabe de aguamiel, que se obtiene principalmente a partir de la especie de *A. salmiana* (Saraiva *et al.*, 2022).

## **2.2. Jarabe de aguamiel**

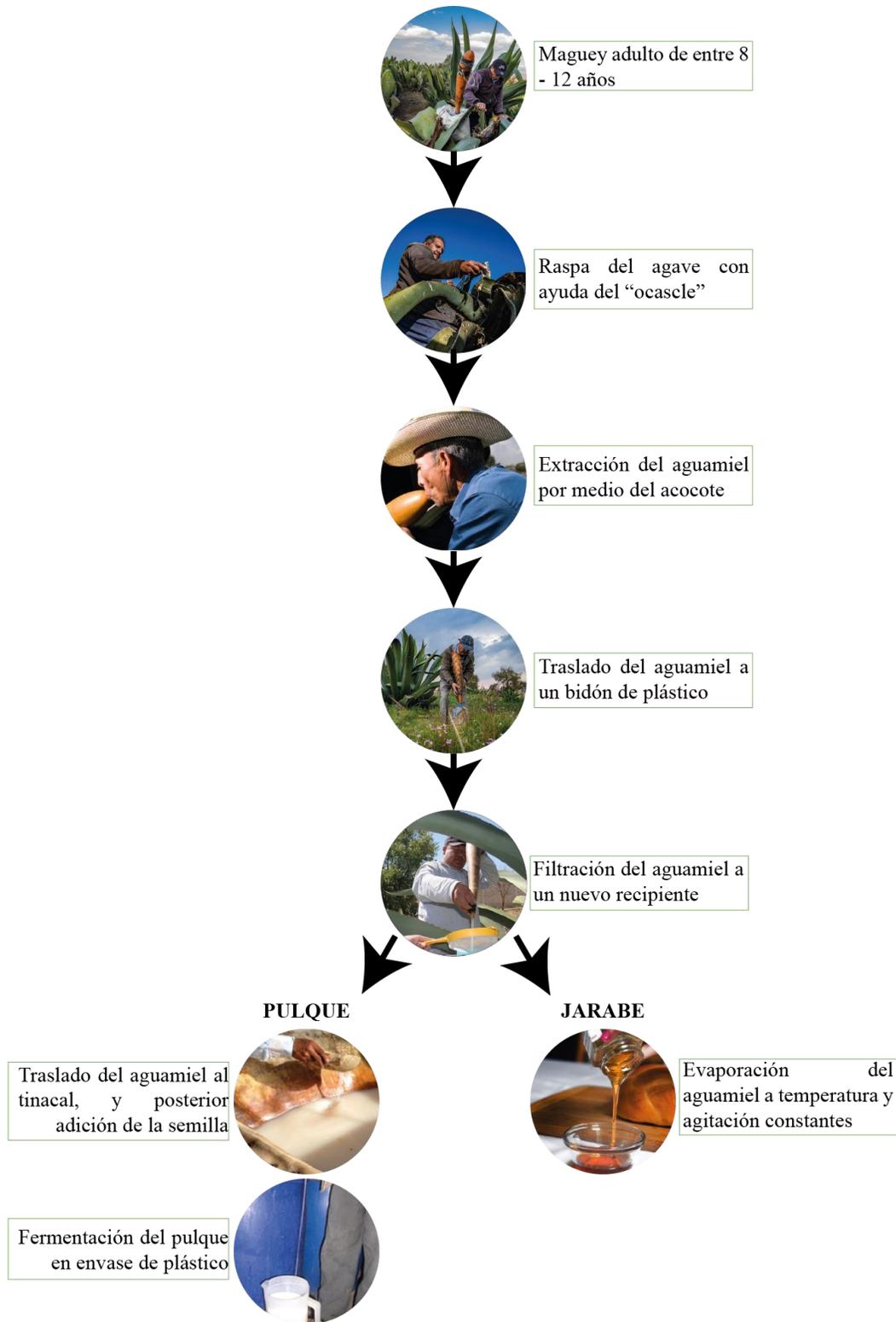
En las últimas décadas, como resultado del importante aumento de diabetes tipo 2, resistencia a la insulina, sobrepeso y obesidad, el consumo de alimentos ha cambiado hacia la búsqueda de productos alimenticios más saludables y algunas investigaciones se han orientado a la exploración de alimentos que sirvan como sustituyentes de la sacarosa y alimentos con un bajo índice glucémico (Saraiva *et al.*, 2022). En este sentido, el jarabe de aguamiel ha ganado relevancia gracias a sus propiedades nutraceuticas que se adjudican a la presencia de saponinas, prebióticos (FOS y EPS) y capacidad antioxidante (Santos-Zea *et al.*, 2016a; Castañeda-Ovando *et al.*, 2023; Saraiva *et al.*, 2022; Santos-Zea *et al.*, 2016b).

Este producto alimenticio abre la posibilidad de su uso en productos que son dependientes de la sacarosa; pero, se requieren de otros estudios para determinar los demás beneficios a la salud que pueden proveer sus compuestos bioactivos, principalmente para aquellas personas que padecen diabetes y resistencia a la insulina (Castañeda-Ovando *et al.*, 2023).

### **2.2.1. Obtención**

El jarabe de aguamiel es un producto derivado del aguamiel, que se obtiene mediante un proceso de evaporación (altas temperaturas, presión atmosférica y tiempos prolongados) (Hernández-Ramos *et al.*, 2020). Es importante no confundirlo con la miel de agave que se obtiene mediante hidrolizado de la piña del *Agave* (Ozuna, & Franco-Robles, 2022).

El proceso para la obtención del jarabe de aguamiel de manera tradicional no resulta complejo porque no requiere de equipos y/o infraestructura moderna o costosa, sin embargo, presenta un inconveniente que es la poca reproducibilidad del producto como resultado de la falta de estandarización, provocando que la composición química del jarabe sea incierta y que las características organolépticas del producto sean diferentes entre artesanos (Pérez-Vargas, 2020).



**Figura 1.** Proceso de extracción del aguamiel, elaboración del pulque y jarabe de aguamiel. Fuente: Villareal-Morales *et al.*, 2019; Rizo-Villeda *et al.*, 2021.

### **2.2.2. Composición y propiedades fisicoquímicas**

El jarabe de aguamiel posee una diversidad de propiedades nutricionales y nutraceuticas similares a las del aguamiel. La composición fisicoquímica se muestra en la Tabla 2. Se observan valores de humedad de entre 25-35%, elevada actividad de agua, pH ácido (4.4-5), y la presencia de hasta 4.2% de proteínas. Se encuentran también fitoquímicos como flavonoides, polifenoles y saponinas, además de presentar actividad antioxidante y vitamina C. Esta composición es la que permite proponer el jarabe de aguamiel como un endulzante con ventajas sobre la sacarosa, ya que además de la presencia de carbohidratos, entre los que destacan los fructanos, se encuentran otros compuestos que han demostrado ser benéficos para la salud humana.

### **2.2.3. Propiedades funcionales**

El jarabe de aguamiel preserva varios de los componentes nutri-funcionales del aguamiel. Además de los nutrientes anteriormente mencionados, este alimento aporta compuestos fitoquímicos relevantes para la salud del consumidor, por ejemplo, polifenoles con capacidad antioxidante (Tabla 2). Por otra parte, también se ha reportado la presencia de vitaminas B3, B1 y C, FOS y saponinas (Saraiva *et al.*, 2022; Santos-Zea *et al.*, 2016b) y ácido abscísico (Castañeda-Ovando *et al.*, 2023).

Los polifenoles le confieren efectos antiinflamatorios, antialergénicos, antimicrobianos, antioxidantes, entre otros (Villareal-Morales *et al.*, 2019). Se ha reportado que el jarabe de aguamiel presenta capacidad antioxidante al contener fitoquímicos como flavonoides, polifenoles y vitamina C (Pérez-Vargas, 2020; Santos-Zea *et al.*, 2016b).

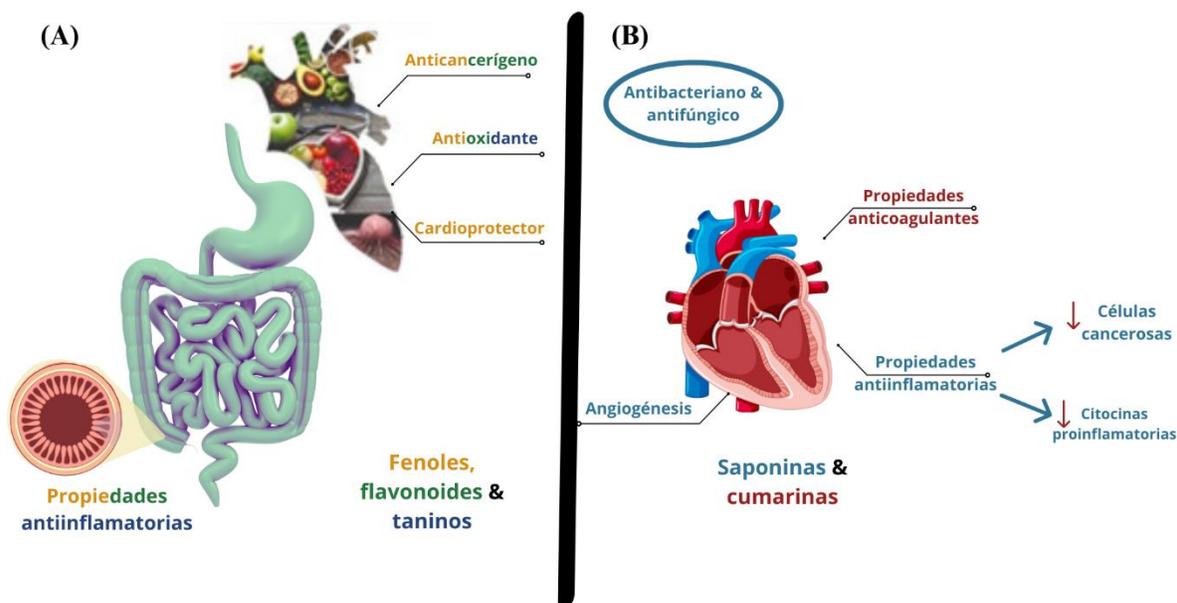
Las saponinas muestran una fuerte actividad anticancerígena, hipolipemiente, antiasmática, antihipertensiva, antimicrobiana, poseen actividad para disminuir el colesterol, triglicéridos y citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) (Khan *et al.*, 2022; Sharma *et al.*, 2023). Santos-Zea *et al.* (2016a) encontraron once saponinas en jarabe de aguamiel, de las cuales dos de ellas (magueyosido B y un tetraglucósido de gentrogenina) parecen tener propiedades en la reducción de la viabilidad de la línea celular cancerosa Caco-2 (adenocarcinoma colorectal). Asimismo, se ha reportado la presencia de alcaloides, taninos y cumarinas como parte de los fitoquímicos que pueden producir ciertas especies de *Agave* (Rojo-Burgos, 2021; Alcázar-Valle, 2016).

**Tabla 2.** Composición nutricional del jarabe de aguamiel.

<b>Componente</b>	<b>Contenido</b>
Actividad de agua ( $a_w$ )	0.73 – 0.83
Humedad (%)	25.2 – 32.5
Sólidos solubles totales (°Brix)	64.8 – 75.5
pH	4.4 – 5.0
Índice de oscurecimiento ( $OD_{490}/g^a$ )	23.5 – 57.7
Carbohidratos (%) <sup>b</sup>	
Sacarosa	13.8 – 41.7
Fructosa	12.4 – 20.7
Glucosa	13.9 – 19.9
Fructanos	4.0 – 10.0
Proteínas (%) <sup>b</sup>	3.4 – 4.2
Aminoácidos (mg/g) <sup>b</sup>	5.2 – 16.3
Fitoquímicos	
Flavonoides (mg EQ/100mg)	0.57 – 1.49
Actividad antioxidante (TE $\mu$ mol/g) <sup>b</sup>	12.7 – 18.9
Polifenoles totales (EAG mg/g) <sup>b</sup>	0.56 – 1.14
Vitamina C (mg EAA/100g)	0 – 197
Saponinas ( $\mu$ g/g) <sup>b</sup>	200 - >400
Minerales (mg/100 g)	
Hierro	3.2 – 10.19
Magnesio	71.24 – 88.90
Potasio	921.98 – 1113.05
Calcio	31.27 – 43.88
Sodio	70.26 – 123.34

<sup>a</sup>Peso fresco, <sup>b</sup>Base seca. Fuentes: Pérez-Vargas, 2020; Santos-Zea *et al.*, 2016b.

El contenido de FOS posiciona al jarabe de aguamiel como un posible alimento funcional por su actividad prebiótica y su posible uso en el desarrollo de alimentos para personas que padecen diabetes (López & Mancilla-Margalli, 2007; Castañeda-Ovando *et al.*, 2023). En la Figura 2 se muestran los efectos benéficos de los fitoquímicos presentes en el jarabe de aguamiel sobre la salud humana.



**Figura 2.** Propiedades benéficas de los fitoquímicos presentes en el jarabe de aguamiel. (A) Fenoles, flavonoides y taninos. (B) Efecto de las saponinas y cumarinas sobre el corazón.

### 2.3. Pulque

El pulque es una bebida alcohólica no destilada que se obtiene a partir de la fermentación del aguamiel, cuyo origen data de al menos 2300 años (Álvarez Ríos, Figueredo Urbina, & Casas, 2021). Es líquido, de color blanco, olor ácido y consistencia viscosa, un pH que se encuentra alrededor de 3.4, mientras que, su contenido de alcohol varía de 4-7.5% (NOM 199-SCFI-2017).

La fermentación del pulque se lleva a cabo en condiciones no asépticas, en donde se promueve la proliferación de muchos microorganismos, principalmente bacterias y levaduras, que se encuentran de forma natural en el aguamiel, y algunos más que son

adicionados voluntaria e involuntariamente por los productores durante la recolección, transporte, inoculación y manipulación. Esta bebida presenta una elevada viscosidad que se adjudica a la presencia de dextran y levan producidos por *Leuconostoc mesenteroides* (Cázares-Vásquez *et al.*, 2021).

### **2.3.1. Proceso de obtención**

El proceso de obtención del pulque (Figura 1) requiere primero de la obtención del aguamiel, posteriormente pasa por cuatro etapas que le confieren sus características fisicoquímicas y organolépticas: fermentación ácida, fermentación alcohólica, producción de exopolisacáridos y fermentación producida por bacterias del ácido láctico (Vera-Morales *et al.*, 2024).

La Norma Mexicana NMX-V-037 y NMX-V-022.1972 reconoce dos tipos de pulque: el tipo I incluye el pulque de semilla, que es utilizado como inóculo inicial para la fermentación, puesto que enriquece la microbiota natural, este tipo de pulque se le denomina que fue elaborado con aguamiel de alta calidad, y el tipo II que hace referencia al pulque comercial, este mismo pulque se le denomina que fue elaborado con aguamiel de calidad pobre o ligeramente ácido (Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018; Escalante *et al.*, 2016).

El tiempo de la fermentación para la obtención del pulque varía en función de la calidad del aguamiel, madurez de la semilla, temporada y región de producción, entre otros (Escalante *et al.*, 2016). La fermentación alcohólica se observa después de que se haya introducido el inóculo de microorganismos anaerobios/anaerobios facultativos para la fermentación del aguamiel obteniendo etanol. A este pulque se le puede añadir otros ingredientes (generalmente frutas) para la obtención de bebidas más atractivas (Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018) que se conocen comúnmente como “curados” que contienen menor cantidad de alcohol que el pulque natural.

### **2.3.2. Microorganismos presentes en el pulque**

La producción del pulque es posible gracias a la fermentación del aguamiel. Los principales microorganismos involucrados son bacterias del género *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Zymomonas* y *Acetobacter*, así como levaduras del género *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*

(Álvarez-Ríos, Figueredo-Urbina, & Casas, 2021). Además, se han encontrado otros microorganismos como *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Diplobacter*, *Bacillus*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Mycoderma*, *L. mesenteroides* y *Companilactobacillus kimchi* algunos de ellos son productores de exopolisacáridos (Cázarez-Vásquez et al., 2021).

Escalante y colaboradores (2016) consideran una clasificación de acuerdo con los rasgos metabólicos de los microorganismos presentes en el pulque, por ejemplo:

- (1) Bacterias productoras de ácido → Bacterias ácido lácticas y bacterias productoras de ácido acético.
- (2) Microorganismos productores de alcohol → *S. cerevisiae* & *Z. mobilis*.
- (3) Bacterias productoras de dextranos → *L. mesenteroides*.
- (4) Microorganismos deterioradores.

### **2.3.3. Propiedades fisicoquímicas**

En muchas comunidades en donde los alimentos escasean, el pulque representa un alimento que es capaz de subsanar en cierta medida algunas deficiencias alimentarias (Hernández-Bravo, 2015). Es necesario considerar que el pulque propiamente es una bebida alcohólica, por lo que, su consumo está limitado a personas mayores de edad y que no se encuentren en periodo de gestación o lactancia, además que, las cantidades que pueden ser ingeridas deben ser limitadas, para evitar riesgos al consumidor.

Se han reportado múltiples beneficios nutricionales al consumir pulque, gracias a la presencia de macronutrientes (carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales) y micronutrientes (vitaminas y minerales) (Rodríguez-Juárez *et al.*, 2021; Torres-Maravilla *et al.*, 2016).

Los carbohidratos presentes en el aguamiel son fermentados por microorganismos inoculados a través de la semilla además de los intrínsecos del aguamiel. El piruvato obtenido mediante la glucólisis puede ir a la fermentación ácido láctica, fermentación alcohólica, e incluso fermentación viscosa (Matías-Luis *et al.*, 2019). Se reporta que el pulque posee hasta 4.76 g/L de carbohidratos (Matías-Luis *et al.*, 2019), mientras que Escalante y colaboradores (2016) han reportado una concentración de 20 a 60 mg/L de glucosa en el pulque.

El pulque contiene hasta 6% de proteínas, se han identificado los aminoácidos isoleucina, leucina, lisina, cisteína, fenilalanina, tirosina, treonina, triptófano, valina, metionina e histidina (Medina-Mendoza *et al.*, 2022). Uno de los aminoácidos más importantes es el triptófano, ya que es necesario para el balance de nitrógeno en adultos, la biosíntesis de neuromoduladores como serotonina y melatonina, se le atribuye el correcto crecimiento de bebés, y contribuye al desarrollo cerebral (Matías-Luis *et al.*, 2019). Adicionalmente, el pulque puede emplearse como suplemento alimenticio porque contiene nitrógeno amínico. En cuanto al contenido lipídico, sólo se ha demostrado la presencia de hopanoides proxy de *Z. mobilis* en recipientes utilizados para el almacenaje de pulque en la época precolonial (Correa-Ascencio *et al.*, 2014). Por último, en el pulque se ha cuantificado vitamina C y vitamina B1, B2 y B3, mientras que, se ha encontrado Ca, Mg, Zn, Fe, P, Se, B y Cu (Matías-Luis *et al.* 2019; Medina-Mendoza *et al.*, 2022).

#### **2.3.4. Propiedades funcionales**

Uno de los beneficios ampliamente investigados es la caracterización de microorganismos con potencial uso probiótico. Los probióticos son microorganismos no patógenos que, al ser ingeridos en concentraciones adecuadas y que sean viables pueden ejercer efectos positivos sobre la salud del hospedero (Rodríguez-Juárez, Urbina-Carrasco & Zapata-Hernández, 2021).

De los microorganismos encontrados en el pulque, se han reportado estudios en los que se han aislado cepas y se han estudiado sus efectos en la salud. En este sentido, Torres-Maravilla *et al.* (2016) lograron aislar una cepa de *L. sanfranciscensis*, para después introducirla a la dieta de ratones que se les indujo colitis crónica, encontrando una reducción en el peso, reducción en la permeabilidad intestinal y modulación de citocinas proinflamatorias.

Por otra parte, ciertas cepas del género *Lactobacillus*, como *L. kimchii*, que en conjunto con *L. mesenteroides* producen exopolisacáridos extracelulares, pueden tener efectos prebióticos al ser consumidos (Rodríguez-Juárez, Urbina-Carrasco & Zapata-Hernández, 2021).

#### **2.4. Microbiota humana**

En el organismo de los seres humanos se encuentra una gran cantidad de microorganismos (bacterias, hongos, protozoos y virus), que participan de forma activa en la regulación de

funciones vitales. Al conjunto de microorganismos y sus productos génicos se denomina microbioma. El microbioma humano cumple con diversas funciones entre las que destacan entrenamiento del sistema inmunológico, digestión de macronutrientes, síntesis de vitaminas y protección ante microorganismos patógenos por competencia (Ariza-Andraca, & García-Ronquillo, 2016).

El correcto equilibrio entre la microbiota promueve la homeostasis, específicamente la microbiota intestinal juega un papel muy importante en el proceso salud-enfermedad, de modo que se ha asociado a algunas enfermedades mentales como la depresión, el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, estas interacciones se explican por el eje intestino-cerebro (Gómez-Eguílaz *et al.*, 2019). Adicionalmente, se ha asociado un aumento en la microbiota intestinal del género *Firmicutes* respecto al género *Bacteroidetes* con mayor riesgo de padecer obesidad, diabetes tipo 2 e hipercolesterolemia (Campo-Moreno *et al.*, 2018). La microbiota se modifica a lo largo de la vida variando en función de factores anatómicos, ambientales, dietéticos, así como patologías, infecciones y el uso de fármacos como antibióticos y laxantes, por mencionar algunos.

El término biótico hace referencia a organismos que interactúan con otros organismos, por lo que se ha acotado el término bióticos para referirse a los probióticos, prebióticos, simbióticos y parabióticos, los cuales han sido sujetos de ensayos en animales y humanos y que se ha demostrado que están asociados con los microorganismos intestinales y los biomarcadores de inmunidad que conducen a una mejora en la salud general. Estudios recientes han reportado que el consumo de bióticos ayuda a mantener la diversidad microbiana, mejora la homeostasis inmune de la mucosa asociada al intestino y brinda protección contra una amplia gama de trastornos del estilo de vida. Sin embargo, aún no se han establecido los bióticos como terapia alternativa para una variedad de condiciones de salud, de hecho, aunque las investigaciones han demostrado una correlación entre los bióticos y la modulación inmune, aún no se ha demostrado la dosis requerida (Revankar & Negi, 2023). Aunado a ello, en años recientes se ha propuesto regenerar el equilibrio de la microbiota intestinal mediante la ingesta de probióticos.

## 2.5. Probióticos

La FAO y la OMS definen a los probióticos como una mezcla de microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas proporcionan o generan efectos benéficos a la salud del hospedero (Oliveira & González-Molero, 2016; Comisión del Codex Alimentarius, 2018), son capaces de soportar la acidez gástrica, la hidrólisis enzimática y la absorción del tracto gastrointestinal superior (Ashaolu *et al.*, 2020). Markowiak-Kopeć y Ślizewska (2017) definen a los probióticos como una célula microbiana viable o no viable en estado vegetativo o de spora, intacta o lisada, que es potencialmente saludable para el huésped. Mientras que, Zendeboodi y colaboradores (2020) han propuesto tres clases principales de probióticos, entre ellas: (1) probiótico verdadero, para referirse a una célula probiótica viable y activa; (2) pseudoprobioótico, una célula viable e inactiva como una spora o cuerpo vegetativo; y (3) probiótico fantasma o, una célula muerta/no viable que está intacta o lisada.

Recientemente, se han integrado los términos de parabióticos para referirse a células muertas inactivas de probióticos, y postbióticos para referirse a metabolitos saludables de los probióticos (Zendeboodi *et al.*, 2020).

En las últimas décadas, los estudios respecto al uso de probióticos en alimentos han crecido vertiginosamente, e inclusive hay estudios que han evaluado la adición de los probióticos en alimentos para contribuir con la mejora de las propiedades funcionales del alimento original (Vilaplana-Batalla, 2015). Los probióticos más comunes incluyen *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., y *Saccharomyces boulardii* (Roobab *et al.*, 2020).

El desarrollo de productos probióticos se puede mejorar al modificar la matriz de los alimentos y se puede lograr la sinergia entre los fitoquímicos de los alimentos y las cepas de probióticos, por ejemplo, se han encapsulado cepas de *L. rhamnosus* en partículas a base de una mezcla entre maltodextrinas y FOS que aseguran su entrega en los alimentos (Rodríguez-Barona *et al.*, 2016). Las cepas de probióticos deben de cumplir los siguientes requisitos, a) la bacteria debe mantenerse activa en el producto donde se incorpore (atención al procesado y almacenamiento), b) debe sobrevivir al paso por el tracto intestinal y c) debe mantenerse funcionalmente activo en el intestino (Vilaplana-Batalla, 2015).

### 2.5.1. Fuentes de probióticos

Los probióticos suelen ser extraídos de alimentos fermentados como el yogurt, queso, kéfir, pulque, *etc.* Para que los probióticos lleguen al intestino, los microorganismos deben sortear muchas barreras fisiológicas como el pH ácido del estómago, las sales biliares en el duodeno, las enzimas digestivas y el movimiento peristáltico por mencionar algunas (Roobab *et al.*, 2020).

El pulque se posiciona como una importante fuente de probióticos puesto que se produce gracias a un consorcio de microorganismos que provienen de la semilla y se desarrolla por los nutrientes del aguamiel. En ciertos estudios se han aislado microorganismos con importantes beneficios a la salud, la mayoría de ellos demostrados en sistemas murinos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Cepas de microorganismos probióticos aislados de pulque.

Cepa aislada	Aplicaciones	Referencia
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> SD23	Mejora la disfunción metabólica asociada a la obesidad. Reducción del peso corporal, niveles de glucosa, colesterol y leptina.	Cerero-Calvo <i>et al.</i> , 2023
Cepas de los géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Pediococcus</i>	Actividad antagónica frente a <i>H. pylori</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> P45	Efecto antagónico frente a <i>Salmonella Typhimurium</i> .	
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> LBH 1068	Propiedades antiinflamatorias, reducción de la pérdida de peso, disminución de la permeabilidad intestinal y modulación de las citocinas.	
<i>Lactobacillus casei</i> J57	Reducción potencial del colesterol.	
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LB1_P46	Efecto antagónico contra diversas bacterias patógenas y el efecto antiinfeccioso contra <i>S. Typhimurium</i> .	Giles-Gómez <i>et al.</i> , 2024

### **2.5.2. Beneficios a la salud**

La incorporación de los probióticos a la dieta humana ha demostrado ser potencialmente benéfica, puesto que ayuda la prevención y/o tratamiento de enfermedades provocadas por microorganismos patógenos, además de regular el metabolismo, así como efectos tróficos.

Se ha demostrado que los probióticos favorecen la absorción de agua y calcio, modulan el metabolismo lipídico con disminución de las LDL y aumento de las HDL, previenen el estreñimiento mediante el efecto masa. Además, se ha confirmado el efecto protector de algunos probióticos al competir con microorganismos patógenos previniendo las infecciones intestinales caracterizadas por diarrea aguda o crónica, así como su utilidad en el tratamiento de la diarrea por antibióticos y la prevención de infecciones por *Clostridium difficile* (Olveira & González-Molero, 2016).

Adicionalmente, se ha reportado su utilidad en la reducción de manifestaciones de atopia, prevención de infecciones vaginales y de parto prematuro, mejora de la esteatosis hepática, mejora de la encefalopatía hepática, mejora de la tasa de erradicación de *Helicobacter pylori*, disminución de la intolerancia a la lactosa, prevención y control de la enfermedad inflamatoria intestinal, así como reducción del riesgo de cáncer colorrectal (Olveira & González-Molero, 2016; Vilaplana Batalla, 2015).

## **2.6. Prebióticos**

Los prebióticos se definen como ingredientes que pueden ser fermentados exclusivamente por ciertos géneros de bacterias, es decir, los microorganismos probióticos ocupan estos ingredientes de forma selectiva para su sobrevivencia, produciendo cambios específicos en la composición y/o la actividad gastrointestinal, confiriendo aportes benéficos a la salud del huésped (Olveira & González-Molero, 2016).

### **2.6.1. Fuentes**

Las fuentes de los prebióticos yacen en los alimentos que contengan compuestos no amiláceos (celulosa, hemicelulosa, pectinas, *etc.*), como la inulina, fructo-oligosacáridos, galacto-oligosacáridos, entre otros (Olveira & González-Molero, 2016; Vilaplana Batalla, 2015). Por lo que se encuentran en alimentos ricos en fibra como las frutas, las legumbres,

tubérculos, cereales integrales, semillas y nueces, principalmente (Dahiya, & Singh-Nigam, 2022).

Las fibras dietéticas tienen varias propiedades fisicoquímicas como fermentabilidad, solubilidad y viscosidad, que afectan la fermentación producida por la microbiota intestinal, así como de sus efectos terapéuticos de las fibras después de su consumo (Ashaolu *et al.*, 2020). Cabe mencionar que no toda la fibra es prebiótica, ni todos los prebióticos son fibra.

Las moléculas que forman la fibra dietética no son metabolizadas por los mecanismos presentes en los seres humanos, porque están ausentes las enzimas necesarias para hidrolizarlas. Pero, este tipo de polisacáridos sí pueden ser metabolizados por los microorganismos de la microbiota intestinal (Dahiya, & Singh-Nigam, 2022).

Los FOS, GOS, inulina, celulosa, hemicelulosa y pectinas presentan enlaces glucosídicos de tipo  $\beta(1-4)$ ,  $\beta(1-6)$ ,  $\beta(2-1)$  &  $\beta(2-6)$ , estas moléculas entran dentro de los polisacáridos estructurales que tienen la capacidad de formar fibras muy rígidas, forman interacciones por puentes de hidrógeno muy fuertes, además de ser muy resistentes a enzimas (microorganismos y agentes químicos) (Badui-Dergal, 2006).

Los FOS no son sensibles al ácido gástrico y no son aprovechables en el tracto gastrointestinal superior (Macfarlane *et al.*, 2007), son considerados como prebióticos porque se ha demostrado que al menos las bacterias pertenecientes del género *Prevotella* y *Lactobacillus* tienen selectividad a este tipo de sustrato, estas mismas aumentan la producción de butirato y acetato como lípidos de cadena corta (Ashaolu *et al.*, 2020).

### **2.6.2. Beneficios a la salud**

Los prebióticos no tienen un efecto directo sobre la salud puesto que, actúan como sustrato específico para los probióticos, de modo que, los beneficios a la salud observados tras la ingesta de prebióticos son, en realidad producto de los probióticos, de tal manera que el probiótico no tenga dificultad para sobrevivir y competir contra los microorganismos autóctonos de la microbiota intestinal. El efecto real de los prebióticos se encuentra en sus metabolitos, que son los que aportarán beneficios a la salud del hospedero (Vilaplana Batalla, 2015).

Los FOS tienen importantes aplicaciones como sustituyente en alimentos para diabéticos, porque no son carbohidratos que proveen de energía de forma inmediata como la glucosa o la sacarosa, cuando llegan a la microbiota intestinal pueden proporcionar de entre 1.5 a 2 kcal/g (Sabater-Molina *et al.*, 2009; Macfarlane *et al.*, 2007), adicionalmente, presentan capacidad no cariogénica, bajo poder edulcorante, nulo o poco aprovechamiento calórico (Ganesh-Kumar *et al.*, 2018).

Cuando los FOS son fermentados producen ácidos grasos de cadena corta como el acetato (reduce el pH que puede dificultar la sobrevivencia de bacterias patógenas y la producción de sus metabolitos secundarios potencialmente carcinogénicos) y butirato (fuente importante de energía, es un regulador del crecimiento y diferenciación celular de la mucosa intestinal) (Sabater-Molina *et al.*, 2009), traduciéndose así en beneficios para el consumidor.

Se ha relacionado el consumo de FOS con la disminución de la aparición y duración de la diarrea infecciosa o asociada a antibióticos, además, su consumo se relaciona con la prevención de enfermedades inflamatorias, obesidad, control de la diabetes tipo 2, reducción de niveles de triglicéridos y LDL, efectos protectores contra el cáncer de colon y enfermedades cardiovasculares; mejorar la biodisponibilidad y absorción de minerales, mejorar la saciedad, y la pérdida de peso (Dahiya, & Singh-Nigam, 2022; Ashaolu *et al.*, 2020; Sabater-Molina *et al.*, 2009; Ganesh-Kumar *et al.*, 2018; Moskovitz, & Kim, 2004; André-David & Duflot, 2007).

## **2.7. Chocolate**

### **2.7.1. Propiedades**

El chocolate es un alimento que se produce a base de semillas de cacao, que se obtienen del árbol de cacao (*Theobroma cacao*), de este árbol se conocen 4 tipos: criollo, forastero, trinitario y nacional (Gibson & Newsham, 2018). Los olmecas fueron los primeros en cultivar y consumir el cacao en forma de bebida, posteriormente, este conocimiento pasó a los mayas, y a los mexicas, estos últimos preparaban un brebaje amargo que únicamente era consumido por el *tlatoani*, nobles, y guerreros (Larrondo-Posadas, 2017). Aunque en la actualidad su consumo se prefiere con leche y endulzantes.

En la formulación típica del chocolate se emplea un 32.5% de pasta de cacao, 15.5% de manteca de cacao, 51.6% de azúcares y 0.4% de lecitina (Talbot, 2012). El chocolate es un alimento ampliamente consumido alrededor del mundo con un consumo per cápita de 10.77 kg/persona en Suiza, siendo este país el mayor consumidor de este alimento (Talbot, 2012). El chocolate es tan versátil que se ofrece en diversas presentaciones, desde polvos para preparar bebidas, tablillas para cubiertas, así como golosinas (Alfonso-Valenzuela, 2007).

### **2.7.2. Características fisicoquímicas**

La composición fisicoquímica del chocolate varía de acuerdo con su tipo, debido a los diversos componentes que contiene. Es decir, el chocolate se clasifica considerando el porcentaje de pasta de cacao que posee, siendo el chocolate con 85% el de mayor contenido, mientras que el chocolate con leche es el que presenta una menor concentración de esta pasta, alcanzando una concentración del 20% (Talbot, 2012). En la Tabla 4 se presenta la composición fisicoquímica del chocolate negro en diferentes proporciones de cacao, al igual que del chocolate con leche.

Al chocolate se le han atribuido propiedades antioxidantes, tan solo en el cacao se encuentra del 6 al 8% de contenido de flavonoides en su peso seco. Además, el contenido de fenoles oscila de los 12.5 – 124.83 mg GAE/g, el cual es mayor que el reportado para té verde, manzana y pera (Colin-Rincon, 2014). Por otra parte, se ha encontrado que el chocolate es fuente de ácidos grasos mono y poliinsaturados, con un rango de 7.2 – 12.8% y 1 – 1.4%, respectivamente (Colin-Rincon, 2014).

**Tabla 4.** Características fisicoquímicas de distintos tipos de chocolate.

<b>Componente</b>	<b>Chocolate negro 45-59% cacao</b>	<b>Chocolate negro 60-69% cacao</b>	<b>Chocolate negro 70-85% cacao</b>	<b>Chocolate con leche</b>
Energía (kcal)	546.0	579.0	598.0	535.0
Proteína (g)	4.9	6.1	7.8	7.7
Lípidos (g)	31.3	38.3	42.6	29.7
Fibra	7	8.0	10.9	3.4
Calcio (mg)	56.0	62.0	73.0	189.0
Hierro (mg)	8.0	6.3	11.9	2.4
Magnesio (mg)	146.0	176.0	228.0	63.0
Fósforo (mg)	206.0	260.0	308.0	208.0
Sodio (mg)	24.0	10.0	20.0	79.0
Potasio (mg)	559.0	567.0	715.0	372.0
Zinc (mg)	2.0	2.7	3.3	2.3
Cobre (mg)	1.0	1.3	1.8	0.5
Manganeso (mg)	1.4	1.3	2.0	0.5
Selenio (µg)	3.0	8.4	6.8	4.5
Niacina (mg)	0.7	0.8	1.1	0.4
Vit. A (UI)	50.0	50.0	39.0	195.0
Vit. E $\alpha$ -tocoferol (mg)	0.5	0.6	0.6	0.5
Cafeína (mg)	43.0	86.0	80.0	20.0
Teobromina (mg)	493.0	632.0	802.0	205.0

Fuente: Torres Moreno, 2012.

### **2.7.3. Rellenos**

La versatilidad que posee el chocolate es inmensa, si se habla desde el aspecto de que con él se puede innovar para la creación de novedosos productos. Uno de los que se encuentra con mayor frecuencia es el relleno, que para lograrlo se realiza primero un “bombo”, motivo por el que a estos chocolates se les llama bombones o bombos de chocolate.

Precisamente, los 'bombos de chocolate' son de los productos más conocidos en el mundo, debido a que, se puede derivar una gran cantidad de productos, según al relleno que contenga este bombo, el relleno tiene la característica de ser blando o incluso líquido. Típicamente el relleno puede consistir en mantequilla, licor, frutas, azúcar, nueces, mazapán, o diferentes tipos de chocolate (Marvig, Kristiansen, Madsen, & Nielsen, 2014).

3

# Objetivos



### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo general**

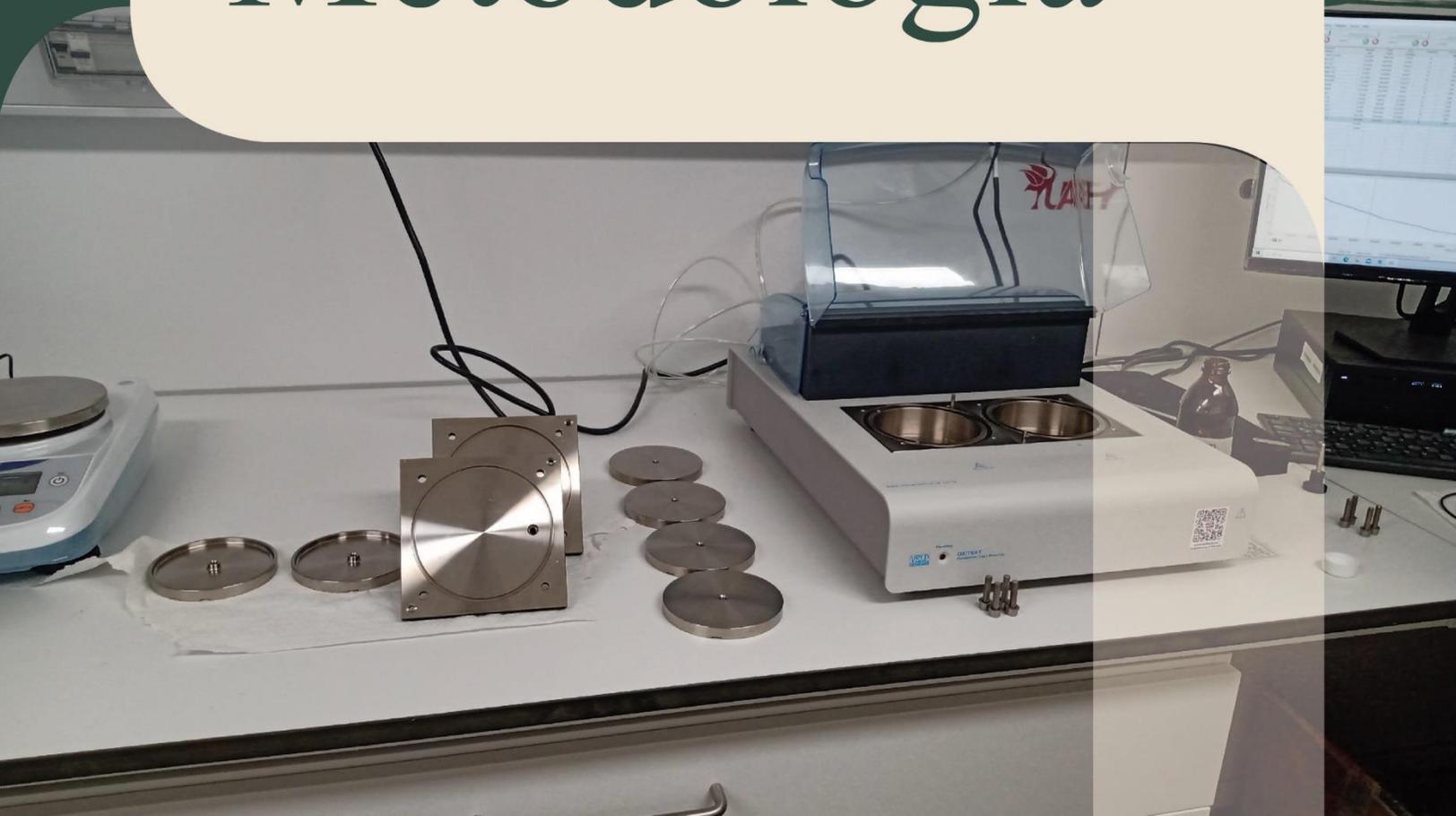
Formular un chocolate con relleno a base de jarabe de aguamiel y enriquecido con bióticos obtenidos del pulque para obtener un producto con potencial efecto benéfico a la salud.

#### **3.2. Objetivos específicos**

1. Caracterizar la materia prima empleada para la elaboración del relleno de jarabe de aguamiel y pulque mediante técnicas analíticas para identificar los compuestos con posibles efectos benéficos a la salud humana.
2. Formular un relleno a base de jarabe de aguamiel enriquecido con parabióticos y postbióticos obtenidos del pulque con el propósito de que sean el vehículo de los componentes con posible beneficio a la salud.
3. Evaluar la viabilidad de los probióticos provenientes del pulque en el jarabe de aguamiel mediante técnicas microbiológicas para estimar la carga microbiana del relleno.
4. Formular un bombo de chocolate con el relleno obtenido y evaluar la estabilidad de sus componentes para identificar los cambios químicos que influyen en el producto terminado.

# 4

## Metodología



## 4. Metodología

### 4.1. Aguamiel

#### 4.1.1 Obtención

Se obtuvo una muestra de 32 L de aguamiel de productores hidalguenses de dos regiones, una en San Agustín Tlaxiaca (SAGT) y otra en Zempoala. El aguamiel proveniente de SAGT se recolectó en dos periodos diciembre de 2023 y febrero de 2024. Las muestras se transportaron en hielo, en un lapso menor a 2 h y se congelaron a -20°C hasta su uso.

El aguamiel proveniente de SAGT se descongeló a temperatura de refrigeración (4°C) durante 12 h, mientras que, el de Zempoala se analizó de inmediato. Para ello, se filtró en una manta de cielo y colador de acero inoxidable, para eliminar la materia orgánica macroscópica proveniente del raspado. Un volumen de 10 L se empleó para la elaboración de jarabe de aguamiel y el resto se fermentó para obtener pulque.

#### 4.1.2 Caracterización microbiológica

Se determinó la cuenta viable de mesófilos aerobios de acuerdo con la NOM-092-SSA1-1994 (SSA, 1995a), empleando agar para métodos estándar. Las cajas de Petri se incubaron a 35±2 °C por 48±2 h, pasado este tiempo se contabilizaron las colonias y se consideraron aquellas diluciones con 25-250 colonias. Mohos y levaduras se determinaron según la NOM-111-SSA1-1994 (SSA, 1995b) en agar papa dextrosa, las cajas de Petri se incubaron a 25±1 °C, las colonias se contaron a las 72, 96 y 120 h de incubación, se emplearon las cajas que contenían entre 10-150 colonias. El conteo de coliformes totales se realizó conforme a la NOM-113-SSA1-1994 (SSA, 1995c) en agar rojo violeta bilis, una vez inoculadas las cajas de Petri con las diluciones correspondientes se incubaron a 35±2 °C por 24 ± 2 h, pasado el tiempo el conteo de UFC/ml se obtuvo considerando las diluciones que contenían 15 a 150 colonias empleando la Ecuación 1.

$$UFC = \text{Número de colonias} \times \text{Inverso de la dilución} \times \text{Factor de alicuota} \quad (1)$$

Finalmente, se realizó un frotis para tinción de Gram siguiendo la técnica reportada por Bauman (2014).

## **4.2. Jarabe de aguamiel**

### **4.2.1. Obtención**

El aguamiel de cada región se procesó de manera diferente. El de la región de San Agustín Tlaxiaca (4.60 kg) se procesaron mediante el método tradicional basado en evaporación. Para ello, se empleó un cazo de cobre de 10 L y se aplicó una pasteurización lenta a 63°C por 30 min en agitación constante, utilizando una pala de madera, se mantuvo en agitación y se midieron los grados Brix (°Brix) cada 30 min, se mantuvo la temperatura hasta obtener 70°Brix momento en que se retiró del calor.

Mientras que, 9.71 kg de aguamiel de la región de Zempoala se procesó en una marmita con capacidad de 22 L (TECNODAC, KEV-22-AR), con aspás de agitación y sensor de temperatura. Para ello, se pasteurizó a 80°C durante 15 min en agitación constante, posteriormente, se mantuvo el calentamiento y la agitación tomando una muestra cada 30 min para medir °Brix y pH, el proceso se mantuvo hasta obtener 70°Brix, momento en que la muestra se sometió a choque térmico en un baño de agua helada hasta que la temperatura descendió a 20°C.

### **4.2.2. Caracterización**

Estos análisis consistieron en la determinación de parámetros fisicoquímicos y la evaluación microbiológica del jarabe de aguamiel. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

#### **4.2.2.1. Actividad de agua ( $a_w$ )**

La actividad de agua es un parámetro que permite conocer el tipo de reacciones químicas y cambios microbiológicos que se pueden desarrollar en el alimento.

Para evaluar este parámetro fisicoquímico se utilizó un AQUALAB TDL. La calibración se realizó de acuerdo con el manual y utilizando cinco estándares que proporciona el mismo fabricante. La medición de la actividad de agua del jarabe de aguamiel se midió una vez que se temperó a 20-25°C. Esta misma medición se realizó a las diferentes formulaciones del chocolate a esa misma temperatura, pero con la diferencia de que el chocolate se seccionó por la mitad.

#### 4.2.2.2. Viscosidad

Esta característica da información de las interacciones que presentan las moléculas y su concentración, así como datos acerca de la textura del jarabe y su papel en la estabilidad del relleno.

Se determinó siguiendo la metodología propuesta por Giron-Ortiz (2019), con la diferencia de que se utilizó un viscosímetro del modelo DV-III Ultra (Brookfield). Para ello, una muestra de 200 mL de jarabe de aguamiel se atemperó a 20°C y se sometió a 60, 30 y 15 RPM con una aguja del número tres (3).

#### 4.2.2.3. Color

El análisis se siguió de acuerdo con la metodología utilizada por Cerón-Zamora (2022) con modificaciones. Para ello, se empleó un colorímetro digital de la marca FRU y modelo WR-100Q, en una cámara blanca iluminada con dos focos led de 100 W para proyectar luz blanca.

La muestra se añadió en una caja Petri de plástico, la cual se introdujo en la caja blanca y sobre ella se realizó la medición con el colorímetro, para así obtener las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ . Finalmente, se determinó la diferencia de color con la ecuación 2.

$$\Delta E = \sqrt{(L_1 - L_0)^2 + (a_1 - a_0)^2 + (b_1 - b_0)^2} \quad (2)$$

En el que, Color 1 ( $L_0$ ,  $a_0$ ,  $b_0$ ) y Color 2 ( $L_1$ ,  $a_1$ ,  $b_1$ ).

#### 4.2.2.4. pH

El análisis de pH permite determinar el tipo de reacciones que se llevan a cabo en un alimento, así como los microorganismos que pueden proliferar en él. Se siguió el procedimiento de acuerdo con la NOM-F-317-S-1978. Se utilizó un potenciómetro de la marca HANNA Instruments, así como de un electrodo combinado de pH de punta esférica. Se utilizaron 3 puntos de calibración con soluciones amortiguadoras de pH 4, 7 y 10 con un condicionamiento de >85%, en todos los casos se empleó agua destilada.

#### 4.2.2.5. Sólidos solubles totales (°Bx)

Los °Brix permiten determinar la cantidad de sólidos solubles totales o suspendidos, especialmente de la sacarosa contenida en una matriz. Este parámetro se utiliza para conocer

la relación que hay entre los sólidos solubles y la viscosidad de un producto alimenticio, además de ciertos cambios fisicoquímicos que ocurren.

Se siguió el procedimiento establecido en la NMX-F-436-SCFI-2011. Los grados Brix ( $^{\circ}\text{Bx}$ ) se determinaron con un refractómetro digital de la marca HANNA Instruments. Se utilizó agua destilada para la calibración del equipo.

#### **4.2.2.6. Análisis proximal**

El análisis proximal del jarabe de aguamiel se realizó bajo los métodos oficiales de la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC, por sus siglas en inglés): humedad (método 935.36), cenizas (método 930.22), proteína cruda (método 950.36), mientras que los carbohidratos fueron obtenidos por diferencia (AOAC, 2005).

### **4.3. Bióticos del pulque**

#### **4.3.1. Obtención**

Los sólidos del pulque ricos en microorganismos se obtuvieron mediante la fermentación controlada de aguamiel. La semilla se produjo a partir del aguamiel de SAGT, para lo cual, se mantuvieron 100 mL de aguamiel a temperatura ambiente durante 24 h, posteriormente, se adicionaron otros 50 mL de aguamiel cada 12 h durante 60 días, manteniendo la mezcla a temperatura ambiente en un recipiente de polietileno cerrado con tapa.

El pulque se elaboró por fermentación del aguamiel de SAGT mediante la adición de la semilla, manteniendo una relación 4:1. La fermentación se realizó durante 36 h a temperatura ambiente. Pasado el tiempo, se tomó un inóculo de 10 mL para realizar el análisis microbiológico. Para ello, se evaluó la cuenta viable de mesófilos totales y coliformes totales siguiendo las recomendaciones de la NOM 092, 111 y 113 de la Secretaría de Salud (SSA, 1995a; SSA, 1995b; SSA, 1995c).

El pulque se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente, después, se descartó el sobrenadante y el sólido se congeló a  $-72^{\circ}\text{C}$  para posteriormente liofilizarlo (43mBar,  $-50^{\circ}\text{C}$ ) durante 48 h. Posteriormente, el sólido se molió en un mortero de ágata hasta obtener un polvo y se almacenó en recipientes con cierre hermético hasta su uso, este sólido se etiquetó como sólidos de pulque probiótico (PPr).

Para la producción de parabióticos se esterilizaron 5.5 L de pulque en autoclave a 121°C 1 atm durante 30 min y se dejó enfriar. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 20 min a temperatura ambiente, se eliminó la fase líquida, y el sólido se congeló a -72°C para finalmente liofilizar. Posteriormente, el sólido se molió en un mortero de ágata hasta obtener un polvo y se almacenó en recipientes con cierre hermético hasta su uso, este sólido se etiquetó como sólidos de pulque parabiótico (PPa). El rendimiento se calculó mediante la Ecuación 3.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{masa liofilizado}}{\text{masa de pulque}} \times 100 \quad (3)$$

#### **4.3.2. Determinación de proteínas por método de Bradford**

Se realizó una solución primaria de albúmina de suero bovino de 10 mg/mL, de esta misma se realizaron siete soluciones patrón de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 y 1.4 mg/mL. Posteriormente, en siete tubos de ensayo de 10 mL se vertieron 0.5 mL de cada una de las soluciones, seguido de ello se añadieron 2.5 mL del reactivo de Bradford, todos los tubos se agitaron manualmente y se dejaron en reposo por dos minutos. Finalmente, el contenido de cada tubo de ensayo se vertió en una celda de plástico y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV-vis (GENESYS 10S UV-Vis). Este procedimiento se repitió para las muestras PPr y PPa.

#### **4.3.3. Análisis por SEM**

La morfología de los sólidos de pulque se determinó utilizando un microscopio electrónico de barrido marca JEOL JSM6360LV con pistola de emisión de campo (FE-SEM), previo recubrimiento de las muestras con oro mediante una ionizadora JEOL JFC-1100.

### **4.4. Formulación y caracterización del chocolate relleno**

#### **4.4.1. Diseño del relleno a base de jarabe de aguamiel y sólidos del pulque**

Para la presente investigación se plantearon dos líneas de producción, una de ellas para la elaboración del relleno con sólidos PPr y la segunda con el uso de los sólidos PPa. En cada una de ellas se evaluaron cuatro formulaciones para el desarrollo del relleno, para lo cual se trabajaron con diferentes proporciones de jarabe de aguamiel y sólidos obtenidos del pulque.

Ambas líneas de chocolate se prepararon siguiendo las especificaciones de la norma CODEX STAN 87-1981, esta norma indica que los chocolates rellenos deben contener al menos el 25% de chocolate de revestimiento. Para tales propósitos, se optó por realizar las mezclas descritas en la Tabla 5. Es así que, para un chocolate de 5 g se requirió de un 75% de relleno (3.75 g) y 25% corteza (1.25g de chocolate amargo 70% cacao marca Turin®).

**Tabla 5.** Formulaciones de rellenos a base de sólidos de pulque y jarabe de aguamiel.

<b>Proporción</b>	<b>Jarabe de aguamiel, g</b>	<b>Liofilizado (PPr o PPa), g</b>
1:5	3.000	0.750
1:6	3.125	0.625
1:7	3.210	0.540
1:8	3.280	0.470

PPr: sólido probiótico, PPa: sólido parabiótico.

#### **4.4.2. Formulación del chocolate relleno**

Primeramente, el chocolate se fundió a una temperatura entre 45-50°C en baño María, se precrystalizó a 27°C manteniendo agitación para lograr un aspecto brillante, liso y de buena dureza. Para estabilizar se aumentó la temperatura a 32°C. Se realizó el vertido en un molde de silicona de semiesferas con capacidad de 5 mL, se llevó a un proceso de enfriamiento en un congelador (Torrey®) hasta apreciarse que la cobertura estuviese totalmente solidificada.

Las mezclas del relleno se realizaron mientras se solidificó la cobertura de chocolate con el fin de minimizar las variaciones y maximizar la viabilidad de los microorganismos. Después, se retiró el molde del congelador y se agregó la mezcla del relleno en cada una de las camisas de chocolate que se elaboraron para cada formulación. Nuevamente, el molde se sometió a congelación por 40 min. Pasado el tiempo, se agregó otra cantidad de chocolate atemperado, el excedente se retiró cuidadosamente con una hoja de acetato. El molde se llevó a congelación por 20 min hasta observar que el chocolate de la base del bombo estuviera completamente solidificado.

Finalmente, se recuperó el molde de la congelación y se procedió a desmoldar los bombos de chocolate, para después almacenarlos en bolsas de celofán 8x15 cm con adhesivo.

#### **4.4.3. Análisis por microscopía digital**

Para la observación de las estructuras del chocolate, así como de las tinciones de Gram se utilizó un microscopio digital Keyence, equipado con lentes de poco, medio, alto y de muy alto aumento para cabezal totalmente integrado, estos lentes permitieron la observación de las estructuras anteriormente mencionadas en un rango que va de los 20 – 6000x de aumento (Keyence Corporation, 2020).

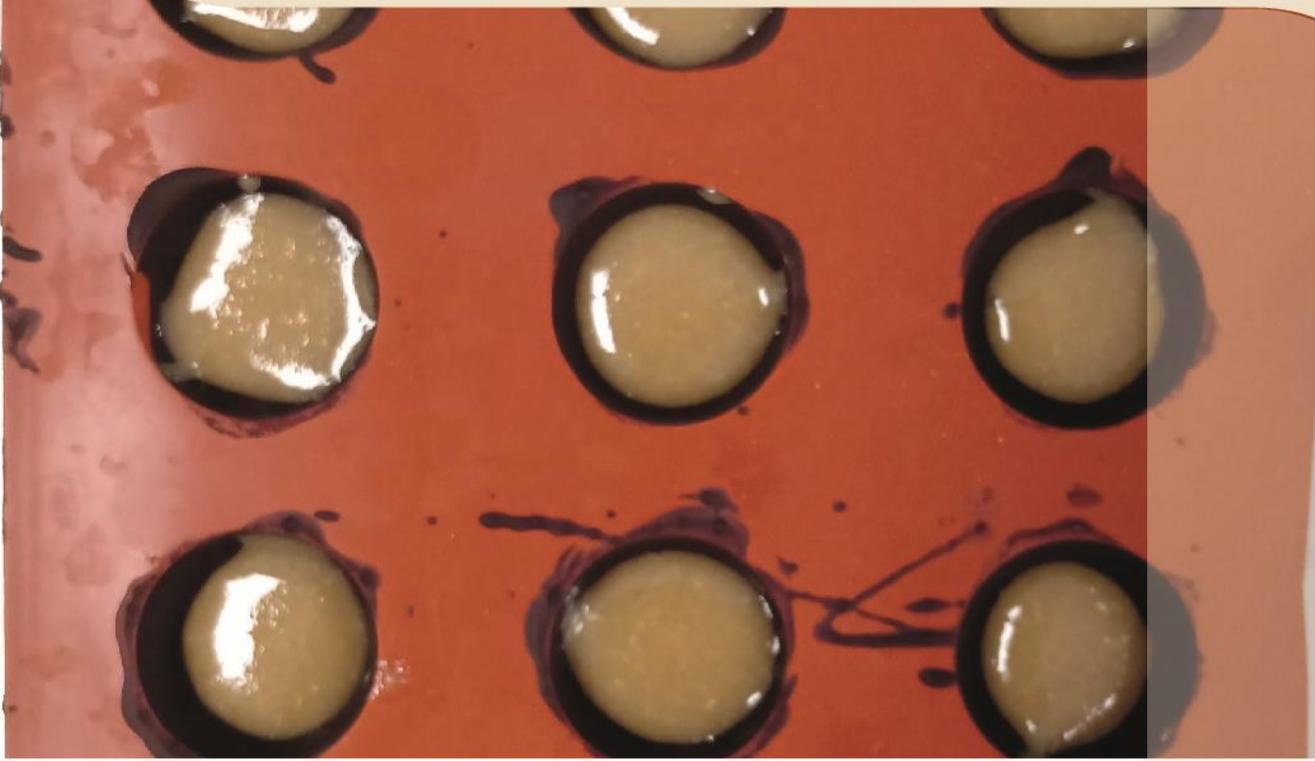
#### **4.4.4. Evaluación de la estabilidad oxidativa**

La evaluación de la estabilidad oxidativa del chocolate relleno se realizó en el equipo Oxitest (VELP Scientifica). Este análisis sólo se realizó en la formulación 1:5 y 1:6. Para el chocolate 1:5 se pesaron en total 30.69 g de muestra, repartidos entre los tres contenedores del equipo. Posteriormente, los tres contenedores se apilaron y se colocaron en el reactor A. Estos pasos se siguieron para el reactor B con el chocolate relleno 1:6, sólo que la cantidad de muestra fue de 30.15 g.

Seguido de ello, los reactores se sellaron y se ajustó una temperatura de 90°C y una presión de 6 bar de oxígeno (O<sub>2</sub>). Finalmente, se fijó el tiempo de operación del equipo al máximo de 200 horas (VELP Scientifica SRL, 2020).

5

# Resultados & discusión



## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Análisis microbiológico del aguamiel y el pulque

Estas determinaciones se realizaron para conocer la calidad microbiológica de las materias primas utilizadas para la formulación del chocolate.

Se analizaron tres muestras de aguamiel una de ellas de la región de San Agustín Tlaxiaca (SAGT) y otras dos más de la región de Zempoala (Z1 y Z2), ambas localizadas en el estado de Hidalgo. Cabe señalar que las muestras de fermento de aguamiel y de pulque son de la región de San Agustín Tlaxiaca, Hgo. La Tabla 6 muestra las cifras del conteo viable de mesófilos, coliformes, mohos y levaduras de estas muestras.

**Tabla 6.** Resultados del análisis microbiológico de las muestras de aguamiel y pulque.

Producto	Mesófilos aerobios	Coliformes totales	Mohos y levaduras
Aguamiel SAGT	$1.85 \times 10^3 \pm 3.54 \times 10^1$	$6.5 \times 10^1 \pm 7.07^a$	$2.69 \times 10^4 \pm 7.07 \times 10^3$
Aguamiel Z1	$1.21 \times 10^6 \pm 2.12 \times 10^5$	$3.80 \times 10^4 \pm 4.24 \times 10^3$	$1.96 \times 10^6 \pm 4.24 \times 10^5$
Aguamiel Z2	$8.35 \times 10^2 \pm 3.54 \times 10^1$	$1.0 \times 10^1 \pm 0.00^a$	NA
Fermento de aguamiel	$2.99 \times 10^6 \pm 2.5 \times 10^5$	SC	$3.96 \times 10^6 \pm 5.68 \times 10^5$
Pulque	$1.02 \times 10^5 \pm 7.07 \times 10^2$	SC	$6.43 \times 10^6 \pm 7.78 \times 10^5$

Datos expresados en: UFC/mL,<sup>a</sup> número más probable (NMP/100 mL). NA No analizado. SC Sin crecimiento

Los valores reportados para la carga microbiológica de las muestras de aguamieles analizados varían respecto a los reportado previamente en otros trabajos (Palafox-Gonzalez, 2017; Sepúlveda-Saenz 2020). Por los resultados obtenidos se puede determinar que los aguamieles analizados presentan contaminación microbiana, lo que es de esperarse por el tipo de producto. Sin embargo, también influye la composición fisicoquímica, el tiempo, y sobre todo la manipulación (raspado).

Además de lo anteriormente expuesto, la muestra Z1 presentó la concentración más elevada de los microorganismos analizados, siendo la más contaminada con coliformes, incluso superior a lo reportado por Sepúlveda-Saenz (2020), que determinaron una concentración de hasta  $1.7 \times 10^3$  NPM/100 mL. Mientras que, en la muestra de aguamiel Z2 y SAGT se observó

una concentración de 10 y 65 NMP/100 mL respectivamente, estos datos son similares a lo reportado por Ramírez Cuellar y colaboradores (2018), quienes encontraron de 35 a 55 NMP/100 mL.

Estos datos dan una idea bastante amplia de las condiciones higiénicas que son empleadas en la extracción del aguamiel, materiales, utensilios, manipulación y condiciones de almacenamiento. Desafortunadamente, incluso en el estado de Hidalgo que es el mayor productor de aguamiel, hay carencia de normas que hablen de la calidad microbiológica de este producto, por lo que es necesario que se promuevan para darle certeza a los consumidores que están adquiriendo un producto inocuo, así mismo, serviría para reducir los mitos en torno a la producción del pulque.

Es importante mencionar que, la presencia de microorganismos en el aguamiel varía en función de la especie de agave, la temporada de recolecta y la técnica y utensilios empleados en su obtención, se ha reportado que, en temporada de lluvia, el agua puede diluir el aguamiel disminuyendo la cantidad de nutrientes disponibles para los microorganismos (Sepúlveda-Saenz, 2020). Debido a la presencia de coliformes en la muestra de aguamiel de Z1, y la baja cantidad de mesófilos totales en el aguamiel Z2, se decidió emplear el aguamiel de SAGT para la obtención de pulque, sólidos de pulque y jarabe de aguamiel.

Se puede observar un importante aumento en el número de microorganismos presentes en el pulque comparado con el aguamiel inicial, esto se explica por la adición del inóculo de microorganismos presentes en la semilla, los cuales aprovechan los carbohidratos presentes en el aguamiel como una fuente de carbono.

Esta elevada concentración de mesófilos, mohos y levaduras representa a todo el consorcio de microorganismos que hacen posible las características típicas de esta bebida y que es muy diferente de las características del aguamiel. Se observó un aumento en el número de mesófilos aerobios y de mohos y levaduras en 1.74 log y 2.08 log respectivamente después de 36 h de fermentación, estos valores son superiores a los reportados por Palafox-González (2017) en pulque de Nanacamilpa, Tlaxcala y Zozutla, Puebla.

De manera similar, se observa un importante aumento en la concentración de microorganismos presentes en el fermento de aguamiel, comparado con el aguamiel inicial.

Es importante diferenciar el fermento de aguamiel del pulque, porque el proceso de obtención de ambos productos es diferente. El fermento de aguamiel se obtiene al permitir la proliferación de los microorganismos presentes en el aguamiel, mientras que, al pulque se le adiciona la “semilla”, que contiene una elevada cantidad del consorcio de microorganismos que le confieren las características organolépticas propias del pulque. En el caso específico del fermento de aguamiel, se observa un aumento de mesófilos de 3.2 log y de mohos y levaduras de 1.88 log después de 36 h de fermentación.

Para la carga microbiológica del pulque se observa que la muestra obtenida en el presente estudio presenta la mayor cantidad microorganismos ( $1.02 \times 10^5$  UFC/mL de mesófilos aerobios y  $6.43 \times 10^6$  UFC/mL de mohos y levaduras), comparado con los datos reportados previamente (Palafox-González, 2017; Sepúlveda-Saenz, 2020). Llama la atención la ausencia de coliformes totales en el pulque. Esta ausencia está relacionada con el cambio de pH durante el proceso de fermentación.

Generalmente, el proceso para la obtención del pulque se lleva a cabo en cuatro etapas: (a) fermentación ácida (láctica) originada por bacterias homo y heterofermentativas *Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc*; (b) fermentación alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*; (c) producción de exopolisacáridos (EPS) como dextranos y fructanos producidos por *Leuconostoc* spp. *Z. mobilis*, *B. subtilis*, *L. caseii* y *L. citreum*; y (d) fermentación de bacterias productoras de ácido acético, como *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Vera-Morales *et al.*, 2024; Peralta-García, 2019).

Los ácidos láctico y acético son los principales causantes del descenso del pH, limitando el crecimiento de especies neutrófilas patógenas. Sepúlveda-Saenz (2020) reportó una disminución significativa de coliformes totales después de la fermentación del aguamiel, este efecto también lo reportó Díaz-Cruz (2008), quien investigó el comportamiento de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en aguamiel y pulque, encontrando una reducción significativa en todos ellos, a excepción de *E. coli* O157:H7 que mantuvo estable su población hasta por más de 60 horas después de la fermentación.

Se ha propuesto que el pulque presenta microorganismos con propiedades probióticas. Una importante cualidad de los probióticos es que son capaces de evitar la invasión del tracto

gastrointestinal por bacterias patógenas; en este sentido, se ha reportado la capacidad antimicrobiana del pulque para inhibir *S. aureus*, *E. coli* y *H. pylori*, este efecto se explica por la producción de catabolitos de azúcar, metabolitos de grasas y aminoácidos, así como la presencia de oxígeno y bacteriocinas (Vera-Morales *et al.*, 2024).

La presencia de *L. plantarum*, *L. sanfranciscensis* y *L. composti* en algunos pulques han demostrado su potencial probiótico al disminuir la hiperpermeabilidad intestinal y la secreción de citocinas proinflamatorias en un modelo murino de colitis (Vera-Morales *et al.*, 2024; Cerero-Calvo *et al.*, 2023). De manera similar, se ha demostrado la utilidad de un fermento de aguamiel con *L. plantarum*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus brevis* al disminuir el estrés académico y modular la microbiota intestinal, aumentando la presencia de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Vera-Morales *et al.*, 2024). Es importante señalar que, en el pulque, la presencia de estos microorganismos depende de la calidad del aguamiel, el tiempo de fermentación y la adición de semilla.

Adicionalmente, la producción de EPS es un proceso de gran relevancia debido a que estas macromoléculas son estables en el aparato gastrointestinal del huésped y su metabolismo resulta en ácidos grasos de cadena corta (Vera-Morales *et al.*, 2023), por lo que se consideran prebióticos (Rodríguez-Juárez *et al.*, 2021).

Con los resultados obtenidos, el pulque analizado puede ser considerado como pulque de tipo I según la normativa mexicana (NMX-V-037-1972 y NMX-V-022-1972) que reconoce dos tipos de pulque: I) incluye el pulque de semilla, que es utilizado como inóculo inicial para la fermentación, puesto que enriquece la microbiota natural, este tipo de pulque se le denomina que fue elaborado con aguamiel de alta calidad, y el II) que hace referencia al pulque comercial, a este mismo se le denomina que fue elaborado con aguamiel de calidad pobre o ligeramente ácido (Guzmán-Pedraza, & Contreras-Esquivel, 2018).

## **5.2. Jarabe de aguamiel**

Con la metodología empleada se obtuvieron dos lotes de jarabe de aguamiel. El lote 1 se obtuvo al procesar el jarabe de aguamiel en cazo de cobre, teniendo un rendimiento de 24.48%, con 61.43 °Bx. Mientras que, el lote 2 se obtuvo mediante el procesamiento en marmita alcanzando un rendimiento de 14.42%, con 69.55°Bx. Espíndola-Sotres y colaboradores (2018) obtuvieron un 10.15% de rendimiento con 74.33°Bx al emplear la misma técnica para el lote 1. La diferencia entre rendimientos de jarabes de aguamiel producidos en cazo de cobre se debe a varios factores, entre los que destacan la concentración inicial de azúcares (°Bx) que presentaba el aguamiel y la concentración final que se alcanzó. Además, esto representa que el tiempo de calentamiento, la temperatura, método y la concentración de azúcares al inicio influyen de manera directa en el rendimiento del producto final.

Por otro lado, aunque el proceso en marmita ofrece ventajas como ser semiautomático y llevarse a cabo en menor tiempo, el rendimiento obtenido es menor, nuevamente por los factores antes mencionados. Por lo que, se decidió utilizar el jarabe de aguamiel procesado en cazo de cobre para la formulación de los rellenos.

## **5.3. Análisis de parámetros fisicoquímicos del jarabe de aguamiel**

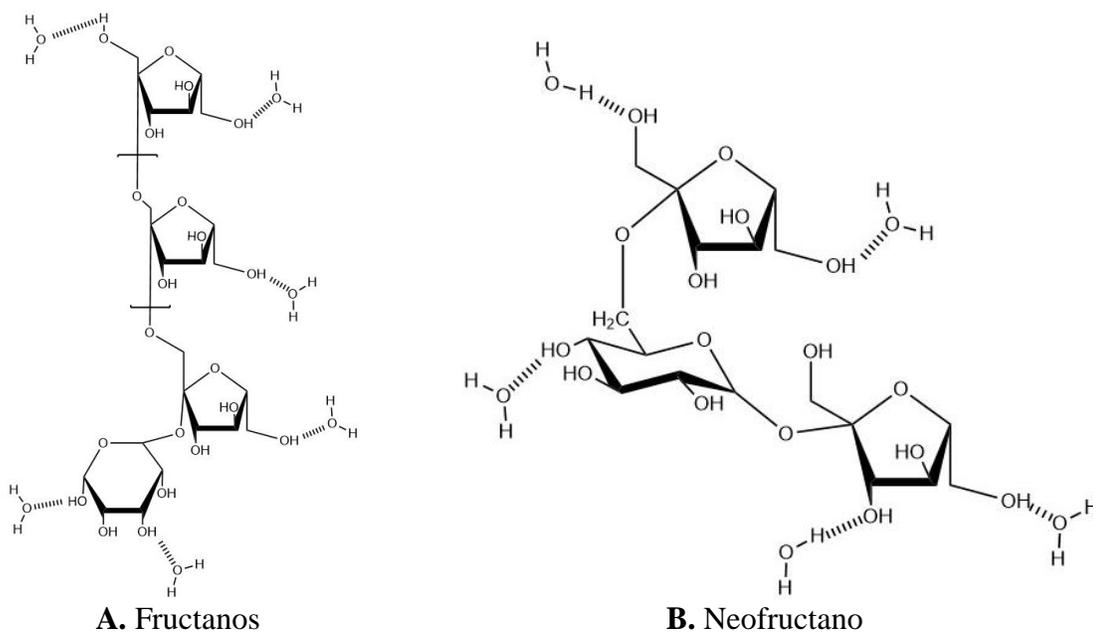
### **5.3.1. Actividad de agua ( $a_w$ ) y sólidos solubles totales (°Bx)**

El jarabe de aguamiel elaborado en cazo de cobre presentó  $a_w$  de  $0.83 \pm 0.006$ , lo que representa un alimento de humedad intermedia, esta actividad de agua es menor que el reportado para el aguamiel con  $a_w$  de hasta 0.97 (Ramírez *et al.*, 2001). Esta reducción de la actividad de agua es causada por el proceso de evaporación que produce la concentración de los carbohidratos.

Asimismo, este jarabe (procesado en cazo de cobre) presentó  $61.43 \pm 0.35$  °Bx. Valores similares de actividad de agua y sólidos solubles totales han sido reportados previamente por Santos-Zea (2016a; 2016b) con  $a_w$  de 0.72-0.83 y 59.5-76°Bx. Esta actividad de agua es especialmente importante debido a que, permite la proliferación de microorganismos, por lo que puede ser empleado por los microorganismos contenidos en el PPr y PPa como sustrato.

El jarabe de aguamiel posee una alta concentración de glucosa, fructosa, sacarosa y FOS, los cuales forman interacciones por puentes de hidrógeno con el agua a través de los grupos alcohol de los carbohidratos (Figura 3). Los puentes de hidrógeno son un tipo de interacción intermolecular muy importante y quizás la más común en los alimentos (Badui-Dergal, 2006).

De acuerdo con la actividad del agua que presenta el jarabe de aguamiel utilizado para este estudio, en este alimento puede haber crecimiento de microorganismos que soportan condiciones ambientales hostiles, los llamados osmófilos, otros microorganismos que se desarrollan a actividades de agua superiores no tienen esa capacidad de sobrevivencia debido a la presión osmótica.



**Figura 3.** Representación de interacciones por puentes de hidrógeno Fuente. Elaboración propia.

### 5.3.2. Viscosidad

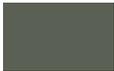
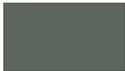
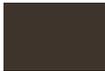
JAC al ser sometido a 60, 30 y 15 RPM, se obtuvieron mejores resultados a 15 RPM puesto que no mostró ninguna variación en la medida, teniendo una viscosidad de  $220 \pm 0.00$  cP. Estos datos difieren de lo encontrado por Cerón-Zamora (2022), que encontró una viscosidad de  $3226 \pm 45.09$  cP en jarabe de agave y difiere de los datos encontrados por Pérez-Vargas (2020), quien halló un rango de viscosidades de 12.80 a 18.80 cP en jarabe de aguamiel, la

diversidad en estos datos puede ser dada por la selección de la aguja y de las RPM, tipo de muestra y de la temperatura de la misma.

### 5.3.3. Color

La Tabla 7 muestra una comparación entre el jarabe de aguamiel producido en este trabajo (JAC) y ciertos jarabes de agave y aguamiel reportados por Cerón-Zamora (2022) y González-Montemayor y colaboradores (2020), en la que se demuestra que todos los jarabes tienen diferencias de color ( $\Delta E$ ) notables para el ojo humano.

**Tabla 7.** Diferencia total de color ( $\Delta E$ ) del JAC contra otros jarabes de aguamiel.

Coordenadas	Jarabe de aguamiel	Jarabes de agave pulquero <sup>a</sup>			Jarabe de aguamiel <sup>b</sup>	
	JAC	JAERv	MAYE®	Hacienda Amoltepec	S95	A95
<b>L*</b>	51.91±0.30	51.90±0.20	39.88±0.36	41.94±0.91	22.50	23.29
<b>a*</b>	9.63±0.59	-3.41±0.36	-3.91±1.25	-3.61±2.76	3.96	1.79
<b>b*</b>	34.71±0.10	12.23±0.08	5.99±5.87	2.98±0.57	6.94	6.36
<b><math>\Delta E</math></b>	-	25.98	33.95	35.79	40.84	41.03
<b>Muestra</b>						
<b>°Bx</b>	61.43±0.35	75.20±0.90	72.16±0.28	73.20±0.26	70.00±0.00	65.00±0.00

Fuente: <sup>a</sup>Cerón-Zamora, 2022; <sup>b</sup>González-Montemayor et al., 2020.

La fila denominada como “*Muestra*” da una representación visual de los datos de cada jarabe presentado en la Tabla 7, en donde se ve reflejado que el oscurecimiento en la mayoría de los jarabes es evidente. Esa variación del color nuevamente está relacionada con los °Bx de los jarabes, puesto que da una idea de la exposición que tuvo el aguamiel al calentamiento y por tanto a reacciones de oscurecimiento no enzimático, como las reacciones de caramelización y de Maillard.

### 5.3.4. pH

Para los valores de pH se encontró que el jarabe de aguamiel elaborado presentó un pH de  $4.2 \pm 0.00$ . Santos-Zea y colaboradores (2016a, 2016b), al igual que Cerón-Zamora (2022) reportan datos semejantes al determinar un rango de valores de pH de 4.15 a 5.73 de diferentes jarabes de aguamiel de diferentes estados de la República Mexicana.

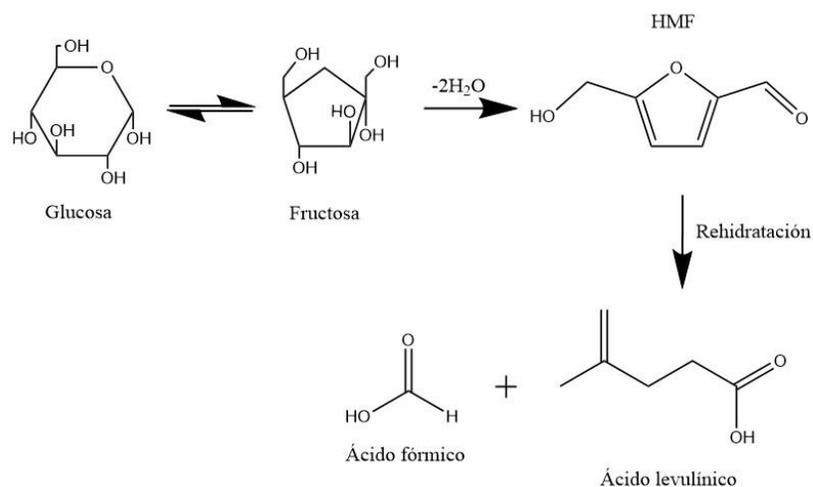
La tendencia de los datos denota que todos los jarabes de aguamiel presentan un pH inferior a 5.73, lo cual expresa que todos son ácidos. Esta reducción en el pH se explica por dos razones:

- *Reducción del pH por proliferación microbiana:* es dada por la introducción de mesófilos, mohos y levaduras, los cuales al metabolizar los carbohidratos producen ácidos orgánicos previo a que estos microorganismos fuesen reducidos o eliminados por tratamientos térmicos.

Lo anterior tiene importancia, porque cuando el aguamiel se pasteuriza y seguido de ello continua al proceso de evaporación, esto conlleva a que los carbohidratos se concentran, pero también se concentran los ácidos producidos por los microorganismos, por lo que conlleva a la reducción del pH.

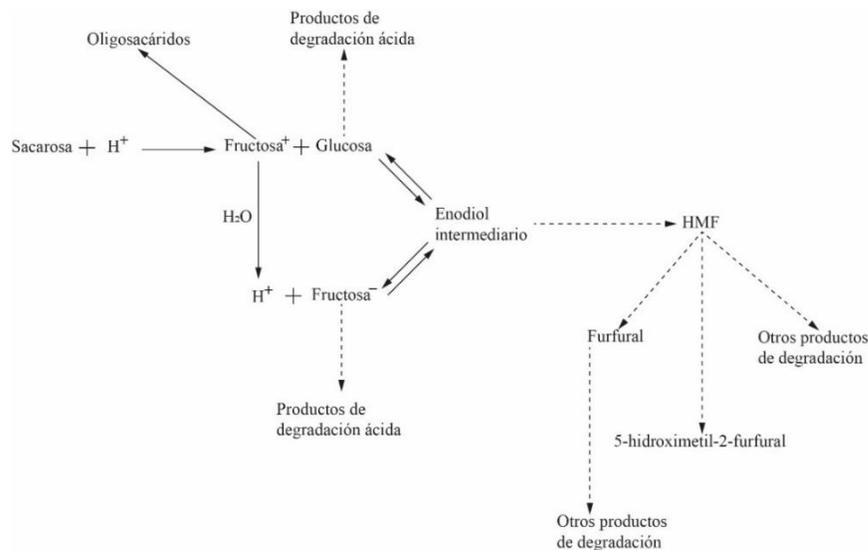
- *Reducción del pH por degradación de compuestos químicos:* en este caso, el pH disminuye porque cuando los carbohidratos se concentran pueden ocurrir reacciones de caramelización.

Las reacciones de caramelización pueden conllevar la formación de hidroximetilfurfural (HMF) a partir de glucosa o fructosa (Garrido *et al.*, 2012). Cuando se produce el HMF puede ocurrir una rehidratación que conlleva la formación de ácido levulínico y ácido fórmico (Figura 4), lo cual representan reacciones indeseables de la reacción de caramelización (Villanueva-Martínez, 2017).



**Figura 4.** Productos de la formación de HMF. Fuente: Villanueva-Martínez, 2017.

En la industria confitera es crucial el control de HMF porque presenta actividad citotóxica, genotóxica y tumoral, por lo que representa un defecto de calidad importante, es por ello que es importante su control en alimentos procesados a temperaturas altas y en medios marcadamente ácidos (Arias-Giraldo & López-Velasco, 2019). La Figura 5 muestra los mecanismos de formación de derivados furfurales a partir de sacarosa, en donde se puede observar nuevamente la posible formación de ácidos en etapas avanzadas de la reacción de caramelización.



**Figura 5.** Mecanismo de formación de derivados del furfural a partir de sacarosa, a través de la caramelización. Fuente: Arias-Giraldo & López-Velasco, 2019.

### 5.3.5. Composición proximal

En el JAC se encontró que el contenido de humedad se ubica dentro del  $37.83 \pm 0.6\%$ ,  $2.4 \pm 0.1\%$  de proteína cruda,  $1 \pm 0.03\%$  de cenizas y el  $58.77\%$  restantes de carbohidratos. Los datos de humedad y proteína cruda tienen semejanza con lo reportado por Santos-Zea y colaboradores (2016b), donde describen un rango de humedad del  $25.2$  al  $32.5\%$  y  $3.4 - 4.2\%$  de proteína. Sin embargo, son significativamente mayores a los reportados por Saraiva y colaboradores (2022), cuyo jarabe presentó  $23\%$  de humedad y  $0.1\%$  de proteínas; pero el contenido de carbohidratos fue relativamente mayor ( $58.77\%$  vs  $68\%$ ).

## 5.4. Sólidos del pulque

### 5.4.1. Rendimiento

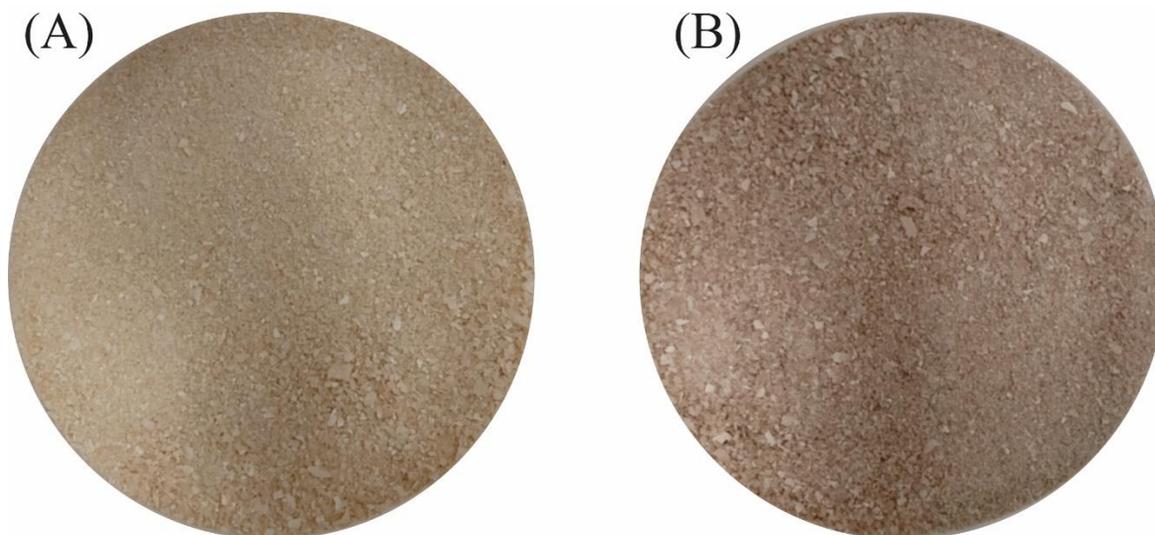
Como producto de la fermentación del aguamiel junto con semilla, se obtuvo pulque que sirvió para la obtención de sólidos al ser tratados por centrifugación y liofilización. Estos sólidos fueron necesarios por su presunta capacidad probiótica descrita en la literatura (Cerero-Calvo *et al.*, 2023; Giles-Gómez *et al.*, 2024; Torres-Maravilla *et al.*, 2016; Escalante *et al.*, 2016).

Para ello,  $2233 \text{ mL}$  de semilla ( $2197.442 \text{ g}$ ) se destinó para la obtención de PPa, obteniendo un rendimiento de  $0.44\%$ . Mientras que, del pulque sin esterilizar ( $11734 \text{ mL}$ ) se obtuvo un

rendimiento de  $0.34 \pm 0.05\%$  PPr y del pulque estéril (7975 mL),  $0.23 \pm 0.03\%$  PPa. El rendimiento de PPa obtenido de la semilla es mayor al PPa proveniente del pulque. Esta diferencia se explica por el tiempo de fermentación que permitió la presencia de otros componentes presentes en los sólidos además de los microorganismos, por ejemplo, la presencia de EPS u otros metabolitos secundarios (Rodríguez-Juárez *et al.*, 2021).

#### 5.4.2. Morfología

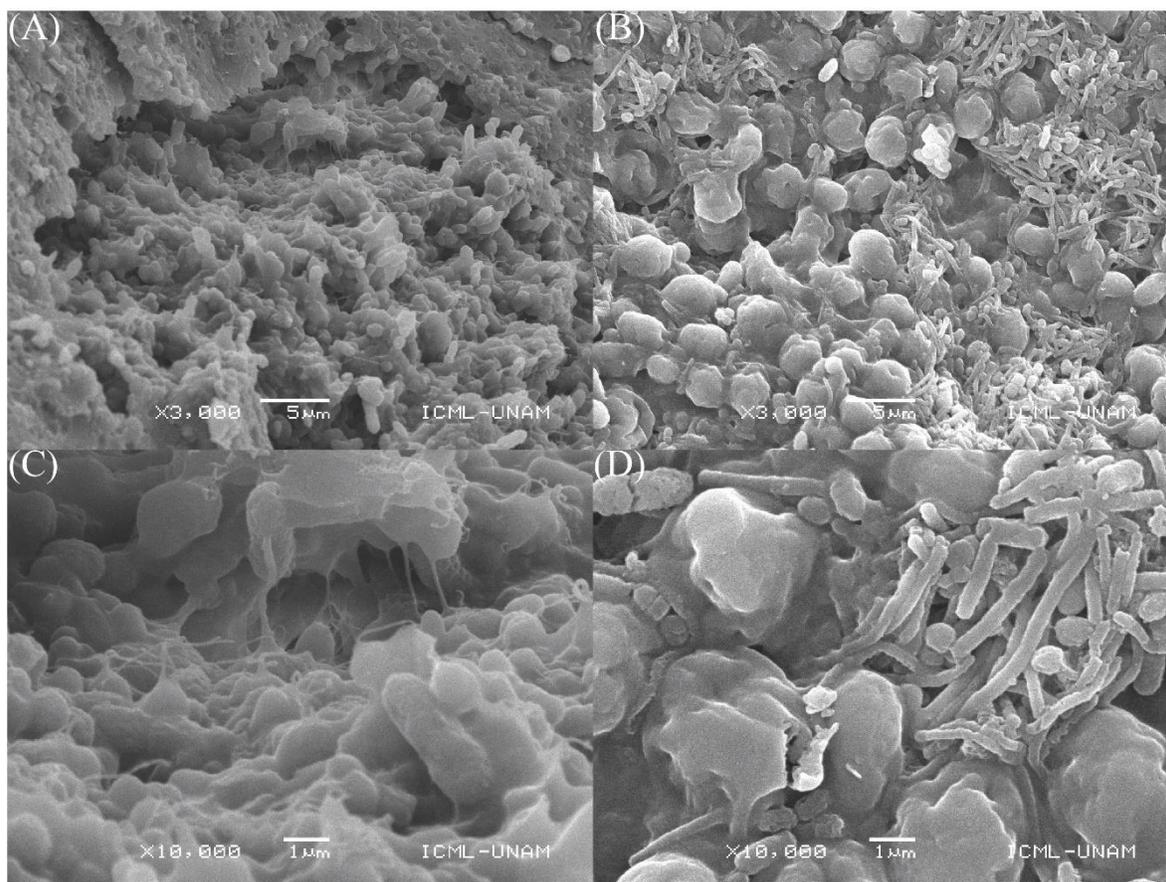
En la Figura 6A se presenta una fotografía del sólido que contiene probióticos (PPr), es decir, el liofilizado del pulque sin esterilizar. Por otra parte, la Figura 6B muestra el sólido que contiene parabióticos (PPa), el cual se distingue por un color más oscuro comparado con el PPr.



**Figura 6.** Sólidos de pulque liofilizados conteniendo (A) Probióticos (PPr) y (B) Parabióticos (PPa).

Ambos liofilizados también se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), en donde se aprecia que existe viabilidad de microorganismos en el liofilizado probiótico [PPr] (Figuras 7A y 7C). Mientras que las micrografías presentadas en las Figuras 7B y 7D demuestran que el liofilizado parabiótico [PPa] está desprovisto de vida.

Se puede observar que en las micrografías del PPr (Figuras 7A y 7C) existen bacilos y cocobacilos que están generando exopolisacáridos (EPS), lo que evidencia que los microorganismos aún están realizando funciones metabólicas. Esto puede tener concordancia con lo evidenciado por Rodríguez-Juárez y colaboradores (2021), donde presentaron la presencia de EPS producida por *L. kimchii* y *L. mesenteroides* en pulque.



**Figura 7.** Micrografías de los sólidos de pulque. (A y C) sólidos de pulque sin esterilizar [PPr], (B y D) sólidos de pulque esterilizados [PPa]. Las adquisiciones se realizaron a 3000X y 10 000X, respectivamente.

La importancia de los EPS radica en que, le confieren las propiedades organolépticas al pulque, principalmente la viscosidad, contribuye a su estabilidad y al efecto biológico. *B. subtilis* es productor de levan, *L. plantarum* produce un compuesto de xilosa, glucosa y galactosa además de otro compuesto de ramnosa, arabinosa, fucosa, xilosa, manosa, fructosa, galactosa y glucosa, mientras que *L. caseii* produce un heteropolisacárido de glucosa y ramnosa, finalmente *L. citreum* produce un dextrano conformado por D-glucopiranosas. Estos EPS presentan propiedades antioxidantes, antibacteriales, anticoagulantes, fibrinolíticas y, a

nivel tecnológico, espesantes, gelificantes y estabilizantes (Vera-Morales *et al.*, 2024), por lo que pueden ser introducidos a la industria alimentaria.

Por otra parte, en las micrografías para PPa (Figuras 7B y 7D) se muestran que los microorganismos presentes aparentemente no están vivos, por lo que ya no cumplen con funciones metabólicas. Esto se observa especialmente en la micrografía 7D en la que se pueda evidenciar que hay presencia de células con roturas, lo cual puede explicar que el proceso de esterilización con vapor húmedo en autoclave causó la muerte celular.

### **5.4.3. Determinación del contenido proteico**

La determinación del contenido de proteínas mediante el método Bradford se utilizó para conocer que el sólido con probióticos (PPr) presentó una concentración de  $5.7 \pm 0.007$  mg de proteína/100 mg de liofilizado, es decir, 5.7% de contenido proteico; mientras que el sólido con parabióticos (PPa) tuvo un contenido de  $4.3 \pm 0.003$  mg/100 mg de liofilizado (4.3%). Hay estudios que abordan el efecto de la liofilización como método de conservación de la semilla y el pulque y han evaluado la forma que afectan estos tratamientos a la viabilidad de los microorganismos de estos alimentos (Burgos-Badillo, 2013; Manrique-Dorronsoro, 2013), pero no reportaron algún tipo de análisis proximal o tan solo la determinación cuantitativa de proteína soluble en pulque, por lo que existe poca información con respecto a la cantidad de proteína que aporta de manera individual el liofilizado de pulque.

Para dar una idea, el pulque tal y como se conoce tiene 0.44 mg de proteína/100 mg de muestra (0.44%) (Manrique-Dorronsoro, 2013), por lo que es significativamente menor a las concentraciones reportadas en esta investigación.

## **5.5. Chocolate con relleno de productos de aguamiel**

### **5.5.1. Propiedades fisicoquímicas del chocolate**

En la Tabla 8 se muestran los resultados de la  $a_w$  obtenida para los chocolates rellenos con jarabe de aguamiel y liofilizado de pulque sin esterilizar y estéril (PPr y PPa). Dados los resultados, se determinó que la proporción 1:5 y 1:6 con presunta actividad probiótica son los mejores candidatos al presentar una actividad de agua menor, en comparación con sus homólogos 1:5 y 1:6 con actividad parabiótica.

La reducción de la actividad de agua de los chocolates rellenos con probióticos con respecto de los chocolates rellenos con parabióticos puede ser dada porque los componentes celulares de los microorganismos están ligando agua por interacciones de puentes de hidrógeno, también de las posibles interacciones ion – dipolo entre las sales y el agua libre, así como del uso del agua libre por parte de esos mismos microorganismos para sus funciones metabólicas (Badui-Dergal, 2006).

**Tabla 8.** Actividad de agua de los chocolates rellenos a diferentes proporciones.

<b>Chocolate</b>	<b>a<sub>w</sub></b>	<b>Temperatura (°C)</b>
1:5	0.73 ± 0.01	24.31 ± 0.09
1:6	0.73 ± 0.00	25.08 ± 0.14
1:7	0.75 ± 0.01	25.56 ± 0.07
1:5 (estéril)	0.75 ± 0.01	25.60 ± 0.22
1:6 (estéril)	0.76 ± 0.01	25.84 ± 0.13

### 5.5.2. Análisis microbiológico

Se determinó la presencia de microorganismos presentes en los rellenos mediante cuenta viable de mesófilos, coliformes y mohos y levaduras. La Tabla 9 muestra que el liofilizado de pulque añadido al jarabe de aguamiel presentó un crecimiento de mesófilos de entre 0.770-0.985x10<sup>3</sup> UFC/mL, este comportamiento evidencia que los microorganismos del pulque continuaron viables aun después del proceso de liofilización y que, utilizan como sustrato al jarabe de aguamiel para su crecimiento.

**Tabla 9.** Análisis microbiológico de las mezclas entre jarabe de aguamiel y liofilizado de pulque.

<b>Mezcla</b>	<b>Mesófilos aerobios</b>	<b>Coliformes totales</b>	<b>Mohos y levaduras</b>
1:5	7.70x10 <sup>2</sup> ±2.83x10 <sup>1</sup>	Ausente	1.37x10 <sup>3</sup> ±1.24x10 <sup>2</sup>
1:6	9.85x10 <sup>2</sup> ±6.36x10 <sup>1</sup>	Ausente	1.30x10 <sup>4</sup> ±7.21x10 <sup>2</sup>

Datos expresados en UFC/mL.

Los resultados que se muestran en la Tabla 9 también evidencian que el crecimiento de mesófilos y mohos y levaduras es menor en comparación con el conteo que se le realizó al pulque antes de liofilizar, el cual exponía un crecimiento de mesófilos de 1.02x10<sup>5</sup> UFC/mL, es decir, 5 log de crecimiento de mesófilos, mientras que, en la mezcla de jarabe de aguamiel + PPr (1:5) tuvo 3 logaritmos de esos mismos microorganismos, observando una restricción de 2 log, esto se explica porque los microorganismos presentes en el PPr soportaron el

proceso de liofilización, lo que pudo disminuir su viabilidad, así como la  $a_w$  del jarabe de aguamiel que es menor a la del pulque, adicionalmente la presencia de una mayor cantidad de carbohidratos en el jarabe de aguamiel lo que favorece el crecimiento de mohos y levaduras.

En este sentido, se encontró que el máximo crecimiento se observó en la mezcla 1:6, que alcanzó  $1.30 \times 10^4$  UFC/mL, representando 4.11 log, esto en contraste al crecimiento de 6.8 log del pulque (Tabla 6) indica que también hubo una restricción de 2.68 log.

La Tabla 10 muestra la determinación microbiológica que se llevó a cabo a los chocolates rellenos con formulación 1:5 y 1:6. Se observa que el chocolate 1:6 presentó un mayor crecimiento de mesófilos y mohos y levaduras a comparación del chocolate 1:5. Esto último podría estar relacionado a que los microorganismos en el chocolate 1:6 tengan mayor disponibilidad de nutrientes.

**Tabla 10.** Análisis microbiológico de las muestras de chocolate.

Chocolate	Mesófilos aerobios	Coliformes totales	Mohos y levaduras
1:5	$8.65 \times 10^2 \pm 2.12 \times 10^1$	Ausente	$1.62 \times 10^3 \pm 1.24 \times 10^2$
1:6	$1.26 \times 10^3 \pm 2.40 \times 10^2$	Ausente	$1.62 \times 10^4 \pm 1.07 \times 10^3$

Datos expresados en UFC/g.

En la Tabla 11 se observa la comparación de los valores obtenidos del chocolate 1:6 frente a otros estudios que han evaluado la posibilidad de adicionar especies de *Lactobacillus plantarum* 299v, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* a barras de chocolate (Faccinnetto-Beltrán *et al.*, 2021; Nebesny *et al.*, 2006).

A comparación de los estudios anteriormente mencionados, el principal reto de este estudio fue el desarrollo de un relleno con adición de prebióticos y microorganismos del pulque (simbionte), siendo particularmente complejo porque al mantener la vialidad, los microorganismos presentes en el PPr continuaron su metabolismo al mezclarlos con el jarabe de aguamiel. Como se mencionó previamente, durante la fermentación se producen diversos metabolitos incluyendo  $CO_2$ , que es capaz de aumentar el volumen interno del chocolate causando su colapso. Esta comparación muestra que ya existen antecedentes sobre la posible adición de microorganismos probióticos a otras matrices alimentarias que no sean lácteos fermentados.

**Tabla 11.** Comparación de cifras de la carga microbiológica de diferentes chocolates.

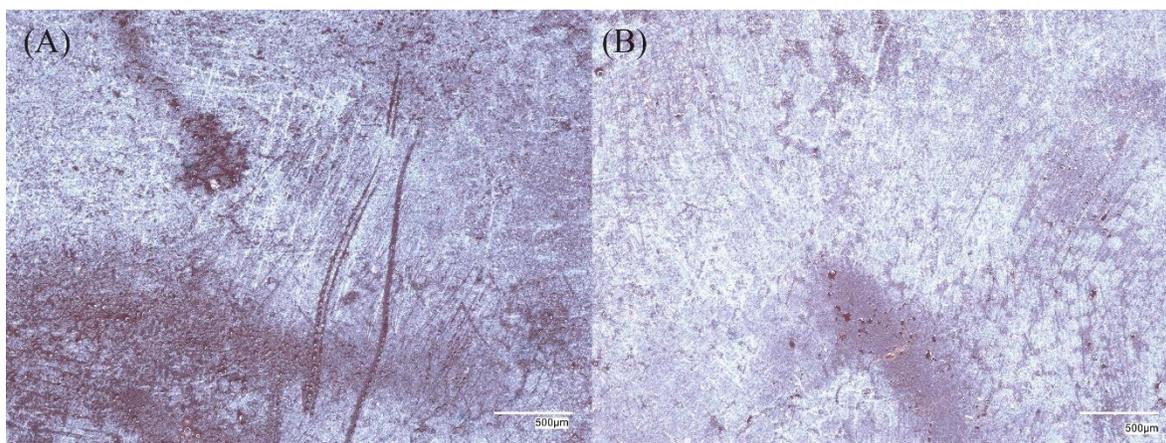
Microorganismo	Chocolate 1:6	Faccinetto-Beltrán <i>et al.</i> , 2021	Nebesny <i>et al.</i> , 2006
Mesófilos aerobios	$1.26 \times 10^3 \pm 2.40 \times 10^2$	$1 \times 10^6$ A	$1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ B
Mohos y levaduras	$1.62 \times 10^4 \pm 1.07 \times 10^3$	NA	NA

Datos expresados en UFC/g. NA. No analizados. A: *Lactobacillus plantarum* 299v, B: *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*.

### 5.5.3. Análisis microscópico de la superficie del chocolate

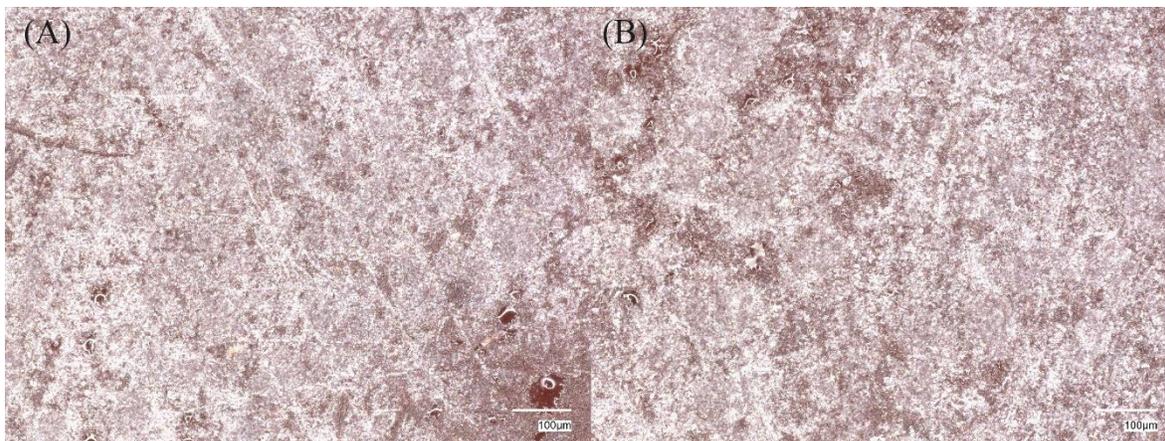
Este apartado está enfocado en los fenómenos que se presentaron en la parte superficial del chocolate con formulaciones 1:5 y 1:6 con actividad probiótica. La superficie del chocolate presentó un defecto de calidad común en los chocolates denominado “*fat bloom*” o mejor conocido como “eflorescencia de la grasa” que se caracteriza por presentarse como una capa blanquecina en la parte superficial del chocolate (Daza-La Plata *et al.*, 2020).

En las Figuras 8A y 8B, correspondientes a la formulación 1:5 se puede observar que en la cumbre del chocolate se encuentra la presencia de filamentos blanquecinos que son característicos de cristalización de grasas que se separaron del chocolate, probablemente causado por un cambio brusco de la temperatura, puesto que los chocolates después de ser producidos se llevaron a refrigeración por motivos de conservación y para ralentizar la fermentación que producen los microorganismos existentes dentro del chocolate.



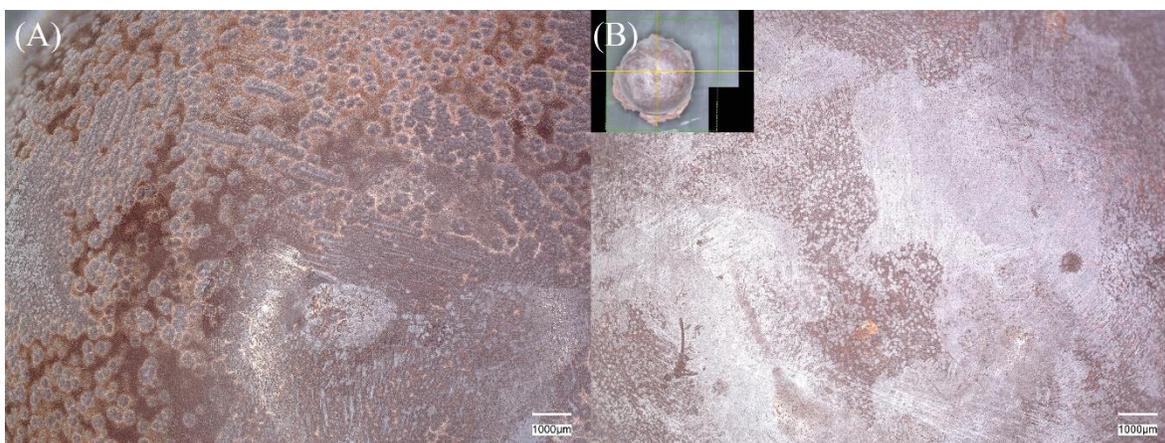
**Figura 8.** Micrografías del chocolate 1:5. (A) y (B) Superficie del chocolate a 80x.

En las Figuras 9A y 9B se presentan las micrografías a 100x y 300x que presentan las mismas características explicadas anteriormente, aunque también se llega a observar agua adsorbida en la superficie.



**Figura 9.** Micrografías del chocolate 1:5. (A) y (B) Cumbre del chocolate a 100x y 300x, respectivamente.

En el chocolate 1:6 se distinguió el mismo fenómeno, pero en este caso el suceso se dio de manera más progresiva (Figuras 10A y 10B). En la micrografía de la Figura 10A se presentan cristales de grasas y manchas de cacao en la parte superficial del chocolate, pero la micrografía mostrada en la Figura 10B se observa que los cristales de grasa predominaron sobre toda la cumbre del chocolate.



**Figura 10.** Micrografías del chocolate 1:6. (A) y (B) Superficie del chocolate a 20x.

Este fenómeno se puede explicar porque al igual que en el chocolate 1:5 la grasa de la manteca de cacao se desestabilizó por efecto de la temperatura, humedad o por un mal atemperado del chocolate, provocando que las grasas no tuvieran una estructura estable al momento de solidificarse, es decir, la estructura  $\beta_1V$  y  $\beta_2VI$  que se prefiere en el chocolate (Ohene Afoakwa *et al.*, 2008), puesto que esas estructuras dan un mejor brillo y chasquido al chocolate (Ruiz *et al.*, 2022).

Ahora bien, otros estudios han evidenciado que este fenómeno es común en el chocolate y representa un defecto de calidad importante, puesto que hay personas que confunden este defecto con crecimiento de moho en el alimento (Ruiz *et al.*, 2022).

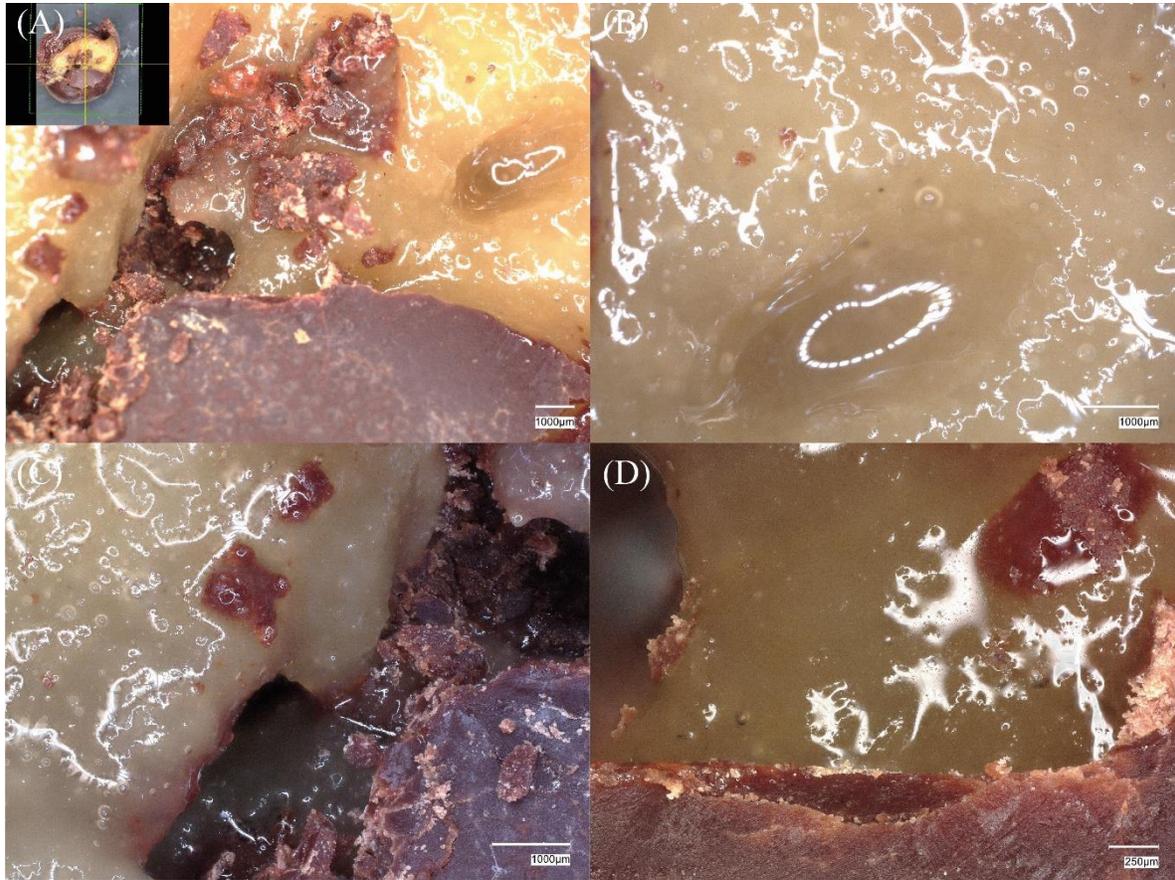
#### **5.5.4. Análisis microscópico de la parte interna del chocolate**

Con fines de verificar que los microorganismos continúan viables dentro del chocolate, se optó por realizar un corte al chocolate relleno de ambas formulaciones (1:5 y 1:6) con el fin de tener una evidencia que diera nociones de que la fermentación continua dentro del mismo chocolate.

Esto se demostró con la presencia de burbujas de dióxido de carbono al interior del chocolate y manifestándose en la parte superficial de la mezcla de JAC y liofilizados probióticos (Figuras 11A-11D).

Específicamente en la Figura 11A llama mucho la atención la formación de esas estructuras amorfas en el borde del corte del chocolate porque sugieren la presencia de EPS cristalizados, esto tiene concordancia con lo reportado por Deming & Young (2017) al señalar que los EPS producidos por ciertos microorganismos como bacterias y algas tienen funciones cruciales para la sobrevivencia de esas especies al cubrir a estos microorganismos contra daños fisiológicos provocados por cristales de agua, cambios bruscos en el potencial osmótico, además de que se sugiere que es posible que también actúan como barrera física que reduce la probabilidad de infección viral.

Lo anterior tiene relevancia en la Figura 11A, porque esto indica que los microorganismos del pulque sobrevivientes tienen un mecanismo similar para sobrevivir a condiciones adversas durante la liofilización y la refrigeración constante del producto.



**Figura 11.** Micrografías del chocolate: (A) Chocolate seccionado, (B), (C) y (D) presencia de gas dentro del relleno del chocolate.

Otro hecho interesante de la continuidad de la fermentación del chocolate es que este alimento presenta un sistema aireado. Otros alimentos como el pan, helados, merengues, entre otros, son formados gracias a la incorporación de aire o gases en su estructura, produciendo alimentos con densidades bajas y texturas diversas (Valdivia, 2014).

A manera introductoria, los geles son considerados como dispersiones coloidales de un gas o mezcla de gases suspendidos en una fase dispersante líquida, líquido viscosa, semisólida o sólida (Badui, 2006; Salais-Obregón *et al.*, 2022). Las espumas tienden a ser termodinámicamente inestables, puesto que un determinado sistema busca minimizar su energía total. Esto último aplicado en las espumas se traduce a reducir el área de las interfaces o *lamelas*, por lo tanto, las espumas tienden a colapsar debido a que las burbujas de aire o gas optarán por fusionarse formando así burbujas más grandes, fenómeno que recibe el nombre de coalescencia (Badui, 2006).

La manera de estabilizar las espumas se da por la adición de ciertos componentes químicos, los cuales son:

- *Tensoactivos*: estas moléculas ayudan a la reducción de la tensión superficial, en la industria alimentaria es común el uso de proteínas porque poseen grupos funcionales hidrofílicos e hidrófobos (Salais-Obregón *et al.*, 2022).
- *Hidrocoloides*: el uso de polisacáridos en las espumas como espesantes y estabilizantes es crucial para que estos sean capaces de ligar agua por interacciones por puentes de hidrogeno, conllevando a un aumento de la viscosidad, el aumento de esta representa que las burbujas requerirán de una mayor energía para coalescer. Además, estas moléculas son útiles para la formación de geles, retención de la humedad de la espuma y modificación de la textura (Navarro-Martínez, 2013).

Si lo anterior se aplica al relleno que se observa en las micrografías mostradas en las figuras 11B-11D, se puede llegar a las siguientes precisiones:

- El jarabe de aguamiel se comporta como la fase dispersante tratándose de un líquido viscoso.
- Los microorganismos provenientes del liofilizado de pulque al estar en el jarabe de aguamiel reconocen que es un medio similar al aguamiel en cuestión de nutrientes, por lo que optan por metabolizar las macromoléculas que allí se encuentran produciendo entre otras cosas, dióxido de carbono que actúa como fase dispersa.
- El aumento de la viscosidad durante la elaboración del jarabe, la producción de EPS por parte de los microorganismos y la presencia de polisacáridos del jarabe de aguamiel actúan como hidrocoloides, mientras que la presencia de saponinas funge como tensoactivo.

#### **5.5.5. Análisis microscópico de mohos y levaduras del chocolate**

Proveniente de los cultivos de mohos y levaduras del chocolate con proporción de mezcla 1:6 se observaron unas colonias con las características macroscópicas que se muestran en la Tabla 12.

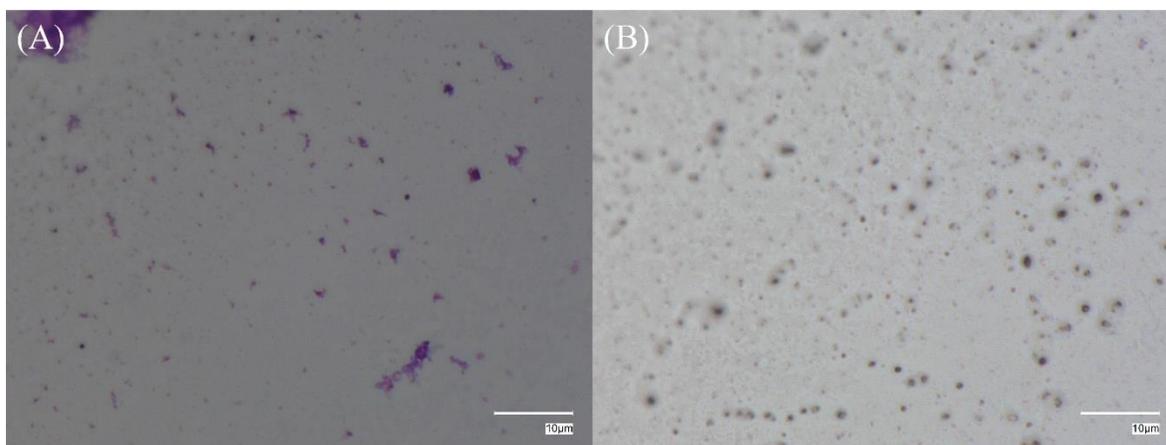
**Tabla 12.** Comparación de características morfológicas de las colonias.

Características	Colonia		
	CTC	CFC	CTIC
Tamaño	Pequeña	Grande	Mediana
Forma	Circular	Filamentosa	Irregular
Borde	Entero	Filamentoso	Ondulado
Transparencia	Transparente	Opaca	Transparente
Textura	Lisa	Rugosa	Lisa
Elevación	Plana	Convexa	Plana

Donde: CTC es Colonia Transparente-Chocolate, CFC: Colonia Filamentosa-Chocolate y CTIC es Colonia Transparente, Irregular-Chocolate.

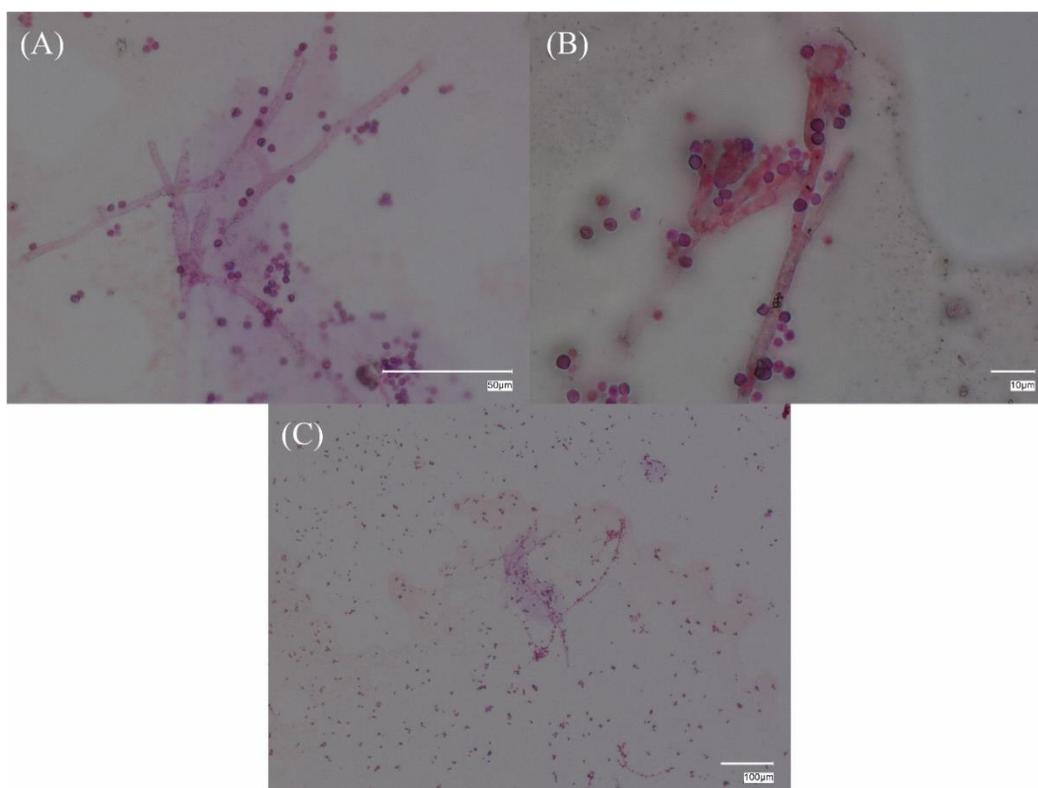
A continuación, la Figura 12 muestra los microorganismos observados en la colonia CTC las cuales evidencian la presencia de bacilos Gram+, dispuestos en forma de cadena. Cervantes-Contreras (2008) describió la presencia de estructuras similares en pulque, asociando esto a *Leuconostoc* spp., en esa misma investigación correlacionó su presencia al aumento de la viscosidad y cambio físico del pulque maduro.

Por otra parte, Manrique-Dorronsoro (2013) encontró varias estructuras relacionadas a cocobacilos, bacilos y bacilos alargados Gram+, estos aislados los correlacionó a la presencia de *Lactobacillus* spp., *L. brevis*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* spp. *dextranicum*, y *L. mesenteroides* spp. *mesenteroides*. Por otra parte, en la Figura 12B se observa la presencia de partículas negras que provienen del mismo chocolate.



**Figura 12.** Micrografías de la colonia CTC. (A) Cocobacilos G+, (B) Partículas del chocolate.

Las Figuras 13A y 13B evidencian la presencia de mohos de la colonia CFC. En este caso se presenta un tipo de ramificación de *Penicillium* spp. En la Figura 13A se aprecian las estructuras del micelio, mientras que en la Figura 13B se distinguen las estructuras del estípite o conidióforo, ramas, ramillas y conidios.



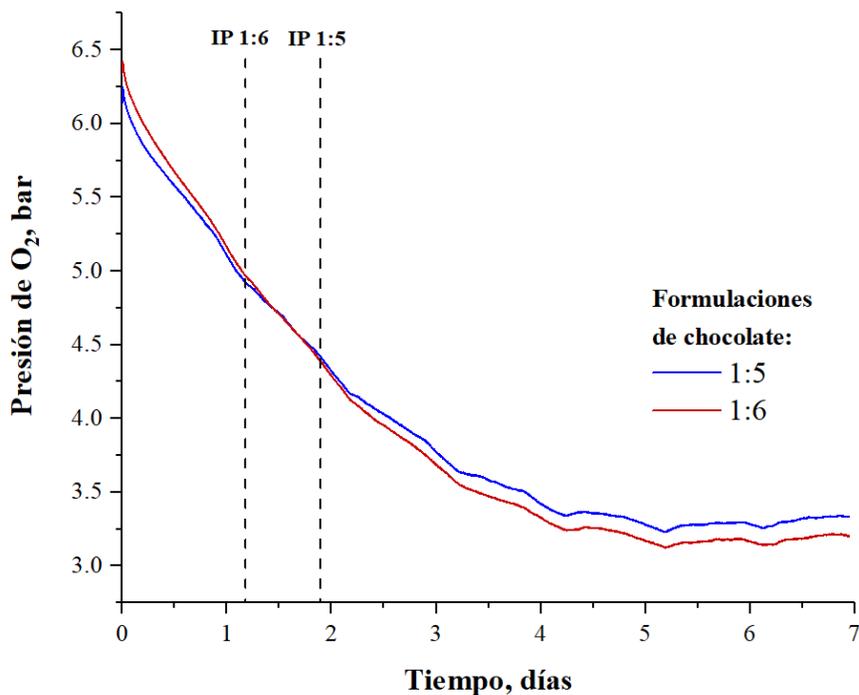
**Figura 13.** Estructuras de mohos en pulque. (A) Micelio de *Penicillium* spp. a 1500x, (B) *Penicillium* spp. a 1500x, (C) Estructura completa del moho a 300x.

#### 5.5.6. Estabilidad oxidativa del chocolate

Esta medición da información útil con respecto a las modificaciones químicas de las moléculas de triacilglicerol, así como de la vida útil del producto final. La oxidación lipídica son una serie de reacciones químicas que modifican notoriamente la percepción sensorial del alimento, siendo de gran interés el seguimiento de las mismas para evaluar hasta qué momento seguirá siendo seguro (inocuo), estable y aceptado por el consumidor.

Ante esto, los chocolates con la mejor formulación del relleno (1:5 y 1:6) se sometieron a la medición de su estabilidad oxidativa a través del equipo Oxitest. Una vez finalizado el análisis ( $t= 200$  h) se obtuvo una presión de oxígeno de 4.425 bar, para la muestra 1:5 y de 4.969 bar para la muestra de 1:6. En la Figura 14 se muestran las gráficas del cambio de la

presión de oxígeno con respecto al tiempo, para las dos muestras analizadas. A partir de esta información se obtuvo el período de inducción (IP), el cual indica el inicio de la rancidez en el producto. Los valores de IP que se obtuvieron a 90°C fueron de 45 h 25 min para el chocolate 1:5, y de 28 h 15 min para el de formulación 1:6.



**Figura 14.** Estabilidad oxidativa de los chocolates 1:5 y 1:6 a 90°C.

Estos datos ponen en evidencia que la estabilidad del chocolate con la formulación 1:6 tiene un periodo de inducción significativamente menor, en comparación del chocolate 1:5. Esto último puede deberse a la cantidad de jarabe de aguamiel de cada mezcla, ya que la formulación 1:6 presenta mayor cantidad de este producto.

Esa inestabilidad oxidativa más acelerada del chocolate 1:6 no es debida propiamente a la oxidación de los triacilglicéridos, porque la cantidad de chocolate empleado en ambos chocolates fue exactamente la misma, por lo que este cambio puede ser debido a las reacciones de oscurecimiento no enzimático (reacción de Maillard y caramelización) que ocurren en el relleno del chocolate.

El relleno del chocolate se compone de jarabe de aguamiel, el cual se constituye por carbohidratos en su mayoría. Por otro lado, otro elemento del relleno es el sólido liofilizado de pulque, que contiene una mayor cantidad de proteínas. La presencia de carbohidratos y proteínas significa que hay posibilidad de que se presenten reacciones de isomerización, caramelización y de Maillard. Van Boekel (2001) describió que a una temperatura superior a los 80°C los carbohidratos tienen una mayor tasa de “desaparición” vía reacciones de isomerización y de degradación. Es por esa causa que la hipótesis que se plantea es que el deterioro acelerado del chocolate 1:6 es a causa de la rápida degradación de los azúcares provenientes del jarabe de aguamiel al encontrarse en una mayor proporción en este mismo chocolate.

La producción de compuestos volátiles provenientes de las reacciones de oscurecimiento no enzimático produjo que el chocolate 1:6 tenga una menor estabilidad oxidativa, comparando con el chocolate 1:5. Por otra parte, también causó que durante la cinética se detectaran algunas fluctuaciones en la presión, puesto que hay ciertos puntos donde en ambas cinéticas la presión se reducía constantemente, pero en ciertos momentos llegó a elevarse ligeramente para después continuar descendiendo (Figura 14). Lo anteriormente mencionado se justifica por las reacciones de Maillard, caramelización y de oxidación lipídica.

Durante esta serie de reacciones de Maillard se producen una gran cantidad de compuestos volátiles, entre los que destacan: acetaldehído, 2-mercaptoacetaldehído, 2-metilpropanal, 3-metilbutanal, metional, metanitol, disulfuro de dimetilo, trisulfuro de dimetilo, fenilacetaldehído, furaneol, furanos, maltol, pirazinas, entre otros (Bertrand *et al.*, 2018).

# 6

## Conclusiones



## 6. Conclusiones

La calidad microbiológica del aguamiel depende de las condiciones en las que fue extraído, así como de su almacenamiento y transporte. En el caso del pulque, los microorganismos presentes son dependientes de la forma en la que se produce éste y de la calidad del aguamiel de partida.

De acuerdo con la caracterización fisicoquímica del jarabe de aguamiel y microbiológica de los sólidos del pulque, se encontró que la cantidad de carbohidratos contenidos en el jarabe fueron potencialmente utilizados por los microorganismos provenientes de los sólidos del pulque, estos últimos demostraron viabilidad en el chocolate desarrollado.

La formulación del relleno a partir de subproductos del aguamiel representa una innovación en la explotación del uso del jarabe de aguamiel y sólidos del pulque para el desarrollo de productos de confitería con posibles beneficios a la salud y potenciales consumidores.

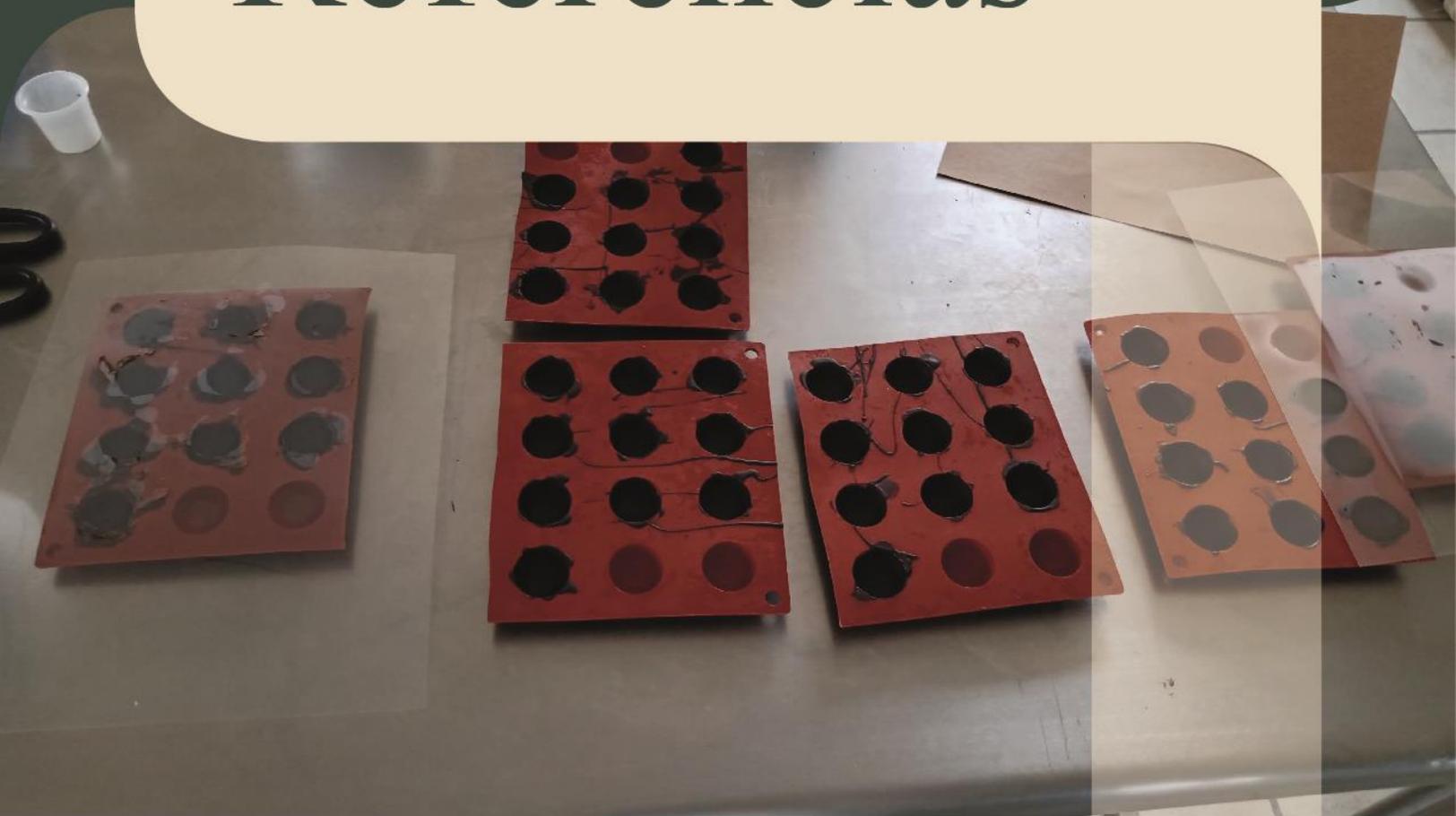
El relleno desarrollado resultó ser una espuma alimentaria que, una vez dentro del chocolate e incluso a temperatura de refrigeración, permite que la fermentación continúe y provoca que el chocolate colapse, esto asociado a la producción de dióxido de carbono. Por lo que, las mejores dos formulaciones (1:5 y 1:6) representaron ser las más estables en este aspecto, sin embargo, faltan más estudios que determinen la vida útil de los productos, además de evaluar la acidez como parámetro de calidad crítico, así como su estabilidad vía reacciones de caramelización y de Maillard.

La presente investigación es una aportación en la revalorización del aguamiel, producto que tiene profundas raíces culturales y que recientemente ha generado gran interés por sus propiedades funcionales.

El desarrollo del chocolate presentado en este proyecto es un parteaguas para la diversificación de los subproductos del aguamiel, con el propósito de que la población se interese por conocer la historia, conocimientos requeridos para su explotación, oportunidades y beneficios que aporta. Finalmente, es crucial que se promuevan normas que traten de forma robusta la calidad microbiológica y fisicoquímica que debe poseer el aguamiel para su comercialización, además de impulsar su consumo y el de sus subproductos en innovaciones tecno-funcionales.

# 7

## Referencias



## 7. Referencias

- Alcázar-Valle, E. M. (2016). Caracterización de Saponinas de *Agave durangensis* y *salmiana* y su efecto en la pared y membrana celular de *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae* [Tesis doctoral: Posgrado Interinstitucional en Ciencia y Tecnología]. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.
- Alfonso-Valenzuela, B. (2007). El chocolate, un placer saludable. *Revista Chilena de Nutrición*, 34(3). <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182007000300001>
- Arias Giraldo, S., & López Velasco, D. M. (2019). Reacciones químicas de los azúcares simples empleados en la industria alimentaria, *Lámpsakos*, (22), 123-136. <https://doi.org/10.21501/21454086.3252>
- Ariza-Andraca, R., García-Ronquillo, M. (2016). El microbioma humano. Su papel en la salud y en algunas enfermedades. *Cirugía y Cirujanos*, 84(1), 31-35.
- Álvarez Ríos, G. D., Figueredo Urbina, C. J., & Casas, A. (2021). El pulque como elemento de identidad y reservorio de diversidad bio-cultural. *Memorias del 7mo Congreso Nacional del Maguey y el Pulque*, 46-51.
- André-David, F., & Duflot, V. (2007). About the value of controlling appetite. *Nutritopics*, Danone research Centre Daniel Carasso. 1-18, (34). ISSN: 1634-1678.
- Ashaolu, T. J., Ashaolu, J. O., & Adeyeye, S. A. (2020). Fermentation of prebiotics by human colonic microbiota in vitro and short-chain fatty acid production: a critical review. *Journal of Applied Microbiology*, 677-687. <https://doi.org/10.1111/jam.14843>
- Association of Official Analytical Chemists. (2005). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th ed.; AOAC International: Washington, D.C.
- Ávila-Lara, D., González-Montemayor, Á. M., Espinoza-Arellano, J. J., Flores-Gallegos, A. C., & Rodríguez-Herrera, R. (2021). Rentabilidad de la producción de aguamiel en el sureste del estado de Coahuila, México: Un estudio de caso. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 29(82), 61-71. <https://doi.org/10.33064/iycuaa2021822561>
- Badui-Dergal, S. (2006). *Química de los alimentos* (4 ed.). México: Pearson Education.
- Bauman, R. W. (2014). *Microbiology with diseases by taxonomy*. 5th Edition. USA: Pearson, 2014.

- Bertrand, E., El Boustany, P., Faulds, C. B., & Berdagué, J.-L. (2018). The Maillard Reaction in Food: An Introduction. *Reference Module in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21459-5>
- Burgos-Badillo, I. (2013). Efecto del método de conservación del inóculo (“semilla”) de pulque y de la concentración de carbohidratos en la fermentación del aguamiel [*Tesis que para la obtención del título de Químico en Alimentos*], Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Castañeda-Ovando, A., Moreno-Vilet., L., Jaimez-Ordaz., J., Ramírez-Godínez, J., Pérez-Escalante., E., Cruz-Guerrero, A. E., & González-Olivares, L. G. (2023). Aguamiel syrup as a technological diversification product: Composition, bioactivity and present panorama. *Future Food*, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2023.100249>
- Campo-Moreno, R., Alarcón-Cavero, T., D’Auria, G., Delgado-Palacio, S., Ferrer-Martínez, M. (2018). Microbiota en la salud humana: técnicas de caracterización y transferencia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiológica Clínica*, 36(4), 241-245. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2017.02.007>
- Cázares-Vásquez, M. L., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar-González, C. N., Sáenz-Galindo, A., Solanilla-Duque, J. F., Contreras-Esquivel, J. C., & Flores-Gallegos, A. C. (2021). Microbial exopolysaccharides in traditional Mexican fermented beverages. *Fermentation*, 7(4), 249. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040249>
- Cerero-Calvo, C., Sánchez-Medina, M. A., Pérez-Santiago, A. D., Matías-Pérez, D., & García-Montalvo, I. A. (2023). Probióticos presentes en bebidas fermentadas mexicanas. *TIP. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 25. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.436>
- Cerón Zamora, C. (2022). Índice glucémico *in vitro* y actividad antioxidante de jarabe de agave obtenido por evaporación rotatoria al vacío [*Tesis para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud*]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Cervantes-Contreras, M., & Pedroza, A. M. (2008). Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de contenido de etanol mediante espectroscopia Raman. *Superficies y Vacío*, 1-5.

- Codex Alimentarius. (2022). CODEX STAN 87-1981 Norma para el chocolate y los productos del chocolate CXS 87-1981. [Normas internacionales de los alimentos]. Disponible en: [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B87-1981%252FCXS\\_087s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B87-1981%252FCXS_087s.pdf)
- Colin-Rincon, M. (2014). Evaluación de la calidad de cacao y chocolates artesanales provenientes de Tabasco [*Tesis que para la obtención del título de Ingeniero de Alimentos*]. Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México, México.
- Comisión del Codex Alimentarius (2018). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias: Documento de debate sobre las directrices armonizadas sobre el uso de probióticos en alimentos y complementos alimenticios (CX/NFSDU 18/40/12). FAO & OMS. URL: [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fmeetings%252FCX-720-40%252FWD%252Fnf40\\_12s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fmeetings%252FCX-720-40%252FWD%252Fnf40_12s.pdf)
- Correa-Ascencio, M., Robertson, I. G., Cabrera-Cortés, O., Cabrera-Castro, R., & Evershed, R. P. (2014). Pulque production from fermented agave sap as a dietary supplement in Prehispanic Mesoamerica. *PNAS Early Edition*, 1-6. doi:10.1073/pnas.1408339111
- Dahiya, D., & Singh-Nigam, P. (2022). Probiotics, prebiotics, synbiotics, and fermented foods as potential biotics in nutrition improving health via microbiome-gut-brain axis. *Fermentation*, 1-16. doi: <https://doi.org/10.3390/fermentation8070303>
- Daza – La Plata, A., Chire – Fajardo, G. C., Ureña – Peralta, M. O. (2020). Cinética de eflorescencia grasa en muestras de chocolate oscuro comercial en Perú. *Acta Agronómica*, 69(2), 81 – 88. <https://www.redalyc.org/journal/1699/169968950001/html/>
- Deming, J. W., Young, J. N. (2017). El papel de los exopolisacáridos en la adaptación microbiana a hábitos fríos. En: Margesin, R. (eds) *Psicrófilos: de la biodiversidad a la biotecnología*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-57057-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-57057-0_12)
- Díaz-Cruz, C. A. (2008). Comportamiento de *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 y *Staphylococcus aureus* en aguamiel y pulque [*Tesis para la obtención del título en Químico en Alimentos*], Área Académica de Química, Mineral de la Reforma, Hgo.

- Escalante, A., López-Soto, D. R., Velázquez-Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolivar, F., & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>
- Espíndola-Sotres, V., Trejo-Márquez, M. A., Lira-Vargas, A. A., Ramírez-Ortiz, M. E. (2018). Estandarización del proceso de elaboración de jarabe a partir de aguamiel. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3, 515-521.
- Faccinnetto-Beltrán, P., Gómez-Fernández, A. R., Orozco-Sánchez, N. E., Pérez-Carrillo, E., Marín-Obispo, L. M., Hernández-Brenes, C., Santacruz, A., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2021). Physicochemical Properties and Sensory Acceptability of a Next-Generation Functional Chocolate Added with Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Probiotics. *Foods*, 1-18. <https://doi.org/10.3390/foods10020333>
- Food Tech (2023) Chocolate: la golosina preferida por los “enamorados” en México. *THE FOOD TECH*, Consultado el 10 de octubre. Disponible en <https://acortar.link/yfvTEv>
- Ganesh-Kumar, C., Sripada, S., & Poornachandra, Y. (2018). Status and future prospects of fructooligosaccharides as nutraceuticals. *Handbook of Food Bioengineering*, 451-503. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811448-3.00014-0>
- García-Arce, Z. P., & Castro-Muñoz, R. (2021). Exploring the potentialities of the Mexican fermented beverage: Pulque. *Journal of Ethnic Foods*, 8-35. <https://doi.org/10.1186/s42779-021-00111-6>
- Garrido S., A., Linares F., T., Otiniano C., M., Armijo C., J., & Ugarte T., N. (2012). Deshidratación de fructosa para obtener hidroximetilfurfural. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 15(1), 11 – 14.
- Gibson, M., & Newsham, P. (2018). Chocolate/Cacao. *Food Science and the Culinary Arts*, 341-352.
- Giles-Gómez, M., Morales Huerta, X., Pastelin-Palacios, R., López-Macías, C., Flores Montesinos, M. S., Astudillo-Melgar, F., & Escalante, A. (2024). Analysis of the probiotic potential of *Lactiplantibacillus plantarum* LB1\_P46 isolated from the Mexican fermented pulque beverage: a functional and genomic analysis. *Microorganisms*, 12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081652>

- Giron Ortiz, M. de la C., & Mendoza Ortiz, M. de los A. (2019). Estudio piloto para la determinación de la influencia del bitartrato de potasio en la precipitación de azúcares en jarabes simples. *Tesis para la obtención del título de Licenciatura en Química y Farmacia*. Universidad de El Salvador, El Salvador.
- Gómez-Eguílaz, M., Ramón-Trapero, J. L., Pérez-Martínez, L., & Blanco, J. R. (2019). El eje microbiota-intestino-cerebro y sus grandes proyecciones. *Revista de Neurología*, 68(3), 111-117. <https://doi.org/10.33588/rn.6803.2018223>
- González Montemayor, A. M., Flores Gallegos, A. C., Serrato Villegas, L. E., Ruelas Chacón, X., López, M. G., & Rodríguez Herrera, R. (2020). Processing temperature effect on the chemical content of concentrated aguamiel syrups obtained from two different Agave species. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 1733 – 1743. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00421-4>
- Guzmán-Pedraza, R., & Contreras-Esquivel, J. C. (2018). Aguamiel y su fermentación: Ciencia más allá de la tradición. *Mexican Journal of Biotechnology*, 3(1), 1-22. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.1>
- Hernández-Bravo, R. (2015). El pulque como elemento gastronómico del Centro Histórico de la Ciudad de México [*Tesis que para obtener el título de Licenciado en Turismo*]. Escuela Superior de Turismo, Instituto Politécnico Nacional. México.
- Hernández-González, M., Hernández-Centeno, F., López De La Peña, H. Y., Flores-Verástegui, M. I., & Sánchez-Maldonado, M. P. (2017). Método alternativo para la identificación de aminoácidos en aguamiel de maguey (*Agave atrovirens Karw*). *CiBlyT*, 1-5.
- Keyence Corporation. (2020). *Manual de usuario de microscopio digital VHX-7000*. Keyence Corporation.
- Khan, M. I., Karima, M. Z., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2022). Therapeutic Effects of Saponins for the Prevention and Treatment of Cancer by Ameliorating Inflammation and Angiogenesis and Inducing Antioxidant and Apoptotic Effects in Human Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10665. <https://doi.org/10.3390/ijms231810665>
- Larrondo-Posadas, L. G. (2017). Evaluación inicial de la sustentabilidad de la producción de cacao (*Theobroma cacao L.*) en Tacotalpa, Tabasco y Pichucalco, Chiapas [*Tesis*

- para la obtención del título de licenciada en Ciencias Ambientales*]. Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán.
- López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A. (2007). The nature of fructooligosaccharides in Agave plants, N. Shiomi (1<sup>st</sup> edition), *Recent Advances in Fructooligosaccharides* (1<sup>st</sup> edition, 47-67). Research Signpost.
- Macfarlane, G. T., Steed, H., & Macfarlane, S. (2007). Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 305-344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03520.x>
- Manrique-Dorronsoro, R. (2013). Caracterización y conservación de inóculos tradicionales para la producción de pulque [*Tesis que para la obtención del título como Químico de Alimentos*]. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Marvig, C. L., Kristiansen, R. M., Madsen, M. G., & Nielsen, D. S. (2014). Identification and characterization of organisms associated with chocolate pralines and sugar syrups used for their production. *International Journal of Food Microbiology*, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.017>
- Matías Luis, G., Peña Caballero, V., González, W. R., Domínguez Díaz, L. R., & Martínez Hernández, J. J. (2019). Valor nutricional y medicinal del pulque. *Journal of Negative & no Positive Results*, 4(12), 1291-1303. <https://doi.org/10.19230/jonnpr.3148>
- Medina-Mendoza, C., Roldán-Cruz, E. I., & Vázquez-Jahuey, M. (2022). Caracterización fisicoquímica, microbiológica y organoléptica del aguamiel y el pulque del Alto Mezquital, Hidalgo. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 1-15. <https://doi.org/10.22231/asyd.v19i4.1412>.
- Moskovitz, D. N., & Kim, Y. I. (2004). Dietary Fiber. *Encyclopedia of Gastroenterology*, 597-612. <https://doi.org/10.1016/B0-12-386860-2/00184-2>
- Navarrete-Torres, M., C., & Muñoz-Aparicio, C. G. (2021). The" pulque" the drink of the gods with milenary value and tradition. *Journal of Tourism and Heritage Research*, 4(1), 20-36. <https://jthr.es/index.php/journal/article/view/244>

- Navarro Martínez, R. D. (2013). Efecto de la concentración de suero de leche y goma xantana sobre la estabilidad de espumas lácteas [*Tesis que para la obtención del título como Ingeniera en Alimentos*]. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Nebesny, E., Żyzelewicz, D., Motyl, I., & Libudzisz, Z. (2006). Dark chocolates supplemented with Lactobacillus strains. *European Food Research and Technology*, 225(1), 33–42. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0379-9>
- Ohene Afoakwa, E., Paterson, A., Fowler, M., Vieira, J. (2008). Fat bloom development and structure-appearance relationships during storage of under-tempered dark chocolates. *Journal of Food Engineering*, 91, 571-581. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.011>
- Olveira, G., & González-Molero, I. (2016). Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endocrinología y Nutrición*, 482-494. <https://doi.org/10.1016/j.endonu.2016.07.006>
- Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M., & Belleville, M. P. (2008). Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3682-3687. <https://doi.org/10.1021/jf072767h>
- Ozuna, C., & Franco-Robles, E. (2022). Agave syrup: An alternative to conventional sweeteners? A review of its current technological applications and health effects. *LWT – Food Science and Technology*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113434>
- Palafox González, L. (2017). Desarrollo de alternativa de consumo de productos de maguey mediante la microfiltración de aguamiel y pulque de los Estados de Puebla y Tlaxcala [*Tesis para la obtención del grado en Maestría en Tecnología en Agroindustria*], Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Amatlán de los Reyes, Ver.
- Peralta-García, I. (2019). Evolución de los fructanos de agave del aguamiel durante la vida productiva del agave [*Tesis para la obtención del grado en Maestro en Ciencias*]. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca.
- Pérez-Vargas, I. (2020). Estandarización del proceso para la producción artesanal de jarabe de aguamiel hidalguense [*Tesis que para la obtención del título de licenciatura en Químico de Alimentos*]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Mineral de la Reforma.

- Ramírez, Ma. E., Hernández, H., Cruz, Ma. T., & Gallardo, V. Y. (2001). Caracterización de fructooligosacáridos en aguamiel y jugos del *Agave atrovirens* Karw. *IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, XIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica*. Veracruz, Veracruz.
- Ramírez-Cuellar, L.I., Alfaro-Rodríguez, C., Ramos-Muñoz, L. G., Hernández-Castañeda, V. N., Carranza-Concha, J. (2018). Capacidad antioxidante, fenoles totales y análisis microbiológico del aguamiel. *IDCTA*, 3, 495-499.
- Revankar, N. A., & Negi, P. S. (2023). Biotics: An emerging food supplement for health improvement in the era of immune modulation. *Nutrition in Clinical Practice*, 39(2), 311–329. <https://doi.org/10.1002/ncp.11036>
- Reyes-Agüero, J. A., Peña-Valdivia, C. B., Aguirre-Rivera, J. R., & Mora-López, J. L. (2019). Variación intraespecífica de *Agave mapisaga* Trel. Y *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck. (*Asparagaceae*) relacionada con los usos ancestrales en la región *hñähñu* en el centro de México. *Agrociencia*, 53(4), 563-579.
- Richter, F. (07 de Julio de 2023). Everybody loves Chocolate. *Statista*, 1. Obtenido de <https://www.statista.com/chart/3668/the-worlds-biggest-chocolate-consumers/>
- Rizo-Villeda, J. A., Polo, D., Stresser-Péan, G., Galarza, J., & Lagarde, V. (2021). Milpa Alta: Entre magueyales y tradiciones. Centro Francés de Estudios Mexicanos y Centroamericanos. Disponible en: <https://desarrollo.cemca.org.mx/es/galeria-milpa-alta-entre-magueyales-y-tradiciones/>
- Rodríguez-Barona, S., Giraldo, G. I., & Montes, L. M. (2016). Encapsulación de alimentos probióticos mediante liofilización en presencia de prebióticos. *Información Tecnológica*, 27(6), 135-144. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600014>
- Rodríguez-Juárez, F.A., Urbina-Carrasco, H.S., & Zapata-Hernández, A. (2021). Pulque: contenido probiótico y potencial en la industria biotecnológica. *RD-ICUAP*, 7(20), 95-110. <https://doi.org/10.32399/icuap.rdic.2448-5829.2021.20.601>
- Rojo-Burgos, M. (2021). Fructooligosacáridos y calidad nutracéutica de jarabe de *Agave salmiana* obtenido a bajas presiones. *Tesis para la obtención del grado en maestro en ciencias en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria*. Universidad Autónoma

- Chapingo, Estado de México, Chapingo. URL: <https://repositorio.chapingo.edu.mx/handle/123456789/1222>
- Romero-López, M. R., Osorio-Díaz, P., Flores-Morales, A., Robledo, N., & Mora-Escobedo, R. (2015). Chemical composition, antioxidant capacity and prebiotic effect of aguamiel (*Agave atrovirens*) during in vitro fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 281-292.
- Roobab, U., Batool, Z., Manzoor, M. F., Shabbir, M. A., Khan, M. R., & Aadil, R. M. (2020). Sources, formulations, advanced delivery and health benefits of probiotics. *Current Opinion in Food Science*, 32, 17-28. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.01.003>
- Ruiz M., J. Y., Caballero, P., Luz A., & Maldonado O., Y. (2022). Influencia de la cristalización de la manteca de cacao en las propiedades sensoriales y físico-químicas de una cobertura de chocolate con leche. *@limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 10(1). DOI: <https://doi.org/10.24054/limentech.v10i1.1567>
- Sabater-Molina, M., Larqué, E., Torella, F., & Zamora, S. (2009). Dietary fructooligosaccharides and potential benefits on health. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 315-328. <https://doi.org/10.1007/BF03180584>
- Salais Obregón, A., Báez González, J. G., Gallardo Rivera, C., Castillo Hernández, S. L., García Alanís, K. G., Amaya Guerra, C. A., y Durán Lugo, R. (2022). Espumas alimenticias en el desarrollo de alimentos funcionales ejemplo: Mousse de fresa (*Fragaria L.*). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 7, 145-152. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume7/7/8/25.pdf>
- Santos-Zea, L., Leal-Díaz, A. M., Jacobo-Velázquez, D. A., Rodríguez-Rodríguez, J., García-Lara, S., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2016b). Characterization of concentrated agave saps and storage effects on browning, antioxidant capacity and amino acid content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 113-120. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2015.10.005>
- Santos-Zea, L., Rosas-Pérez, A. M., Leal-Díaz, A. M., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2016a). Variability in saponin content, cancer antiproliferative activity and physicochemical properties of concentrated agave sap. *Journal of Food Science*, 1-7. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13376>

- Saraiva, A., Carrascosa, C., Ramos, F., Raheem, D., & Raposo, A. (2022). Agave syrup: Chemical analysis and nutritional profile, applications in the food industry and health impacts. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 1-16. <https://doi.org/10.3390/ijerph19127022>
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial [SCFI]. (1972a). NMX-V-037-1972, pulque manejado a granel, [Norma Mexicana]. Disponible en: <https://gotomexico.today/media/doc/nmx-v-037-1972.pdf>
- Secretaría de Comercio y Fomento Industrial [SCFI]. (1972b). “NMX-V-022-1972 Aguamiel”, [Norma Mexicana]. Disponible en: <https://gotomexico.today/media/doc/nmx-v-022-1972.pdf>
- Secretaría de Salud [SSA]. (1995a). NOM-092-SSA1-1994: Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. [Norma Oficial Mexicana]. Disponible en: [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886029&fecha=12/12/1995#gsc.tab=0)
- Secretaría de Salud [SSA]. (1995b). NOM-111-SSA1-1994: Bienes y servicios: Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. [Norma Oficial Mexicana]. Disponible en: [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0)
- Secretaría de Salud [SSA]. (1995c). NOM-113-SSA1-1994: Bienes y servicios: Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa. [Norma Oficial Mexicana]. Disponible en: <https://faolex.fao.org/docs/pdf/mex13519.pdf>
- Sepulveda-Saenz, L. F. (2020). Evaluación del efecto estacional sobre el microbioma involucrado en la fermentación del aguamiel y su influencia en las propiedades químicas del pulque, [*Tesis para la obtención del grado de Maestría en Ciencias en Biotecnología*], Facultad de Ciencias Químicas, Chihuahua, Chih.
- Sharma, K., Kaur, R., Kumar, S., Saini, R. K., Sharma, S., Pawde, S. V., & Kumar, V. (2023). Saponins: a concise review on food related aspects, applications and health implications. *Food Chemistry Advances*, 100191. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100191>

- Talbot, G. (2012). Chocolate and Cocoa Butter—Structure and Composition. *Cocoa Butter and Related Compounds*, 1-33. <https://doi.org/10.1016/B978-0-9830791-2-5.50004-9>
- Torres Moreno, M. (2012). Influencia de las características y procesado del grano de cacao en la composición físico-química y propiedades sensoriales del chocolate negro [Tesis para la obtención del grado de doctor]. Universitat Rovira I. Virgili, Tarragona.
- Torres-Maravilla, E., Lenoir, M., Mayorga-Reyes, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., Sánchez-Pardo, M. E., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2016). Identification of novel antiinflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 385-396. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7049-4>
- Valdivia, Ma. de los Á. (2014). Espuma en alimentos. *Revista digital universitaria*, 15(5), 2-9. URL: <https://www.revista.unam.mx/vol.15/num5/art34/#>
- Van Boekel, M. A. J. S. (2001). Kinetic aspects of the Maillard reaction: a critical review. *Nahrung/Food*, 45(3), 150–159. doi:10.1002/1521-3803(20010601)45:3<150::aid-food150>3.0.co;2-9
- VELP Scientifica SRL. (2020). Manual de usuario de OXITEST. VELP Scientifica SRL.
- Vera-Morales, J. M., Vargas-Hernández, M., Dector-Espinoza, A., & Amaya-Cruz, D. M. (2024). Aguamiel y pulque: más que bebidas tradicionales. *Perspectivas de la Ciencia y la Tecnología*, 7(12), 40-51. <https://doi.org/10.61820/pct.v7i12.1117>.
- Vilaplana Batalla, M. (2015). Probióticos y salud. *Farmacia Profesional*, 29(3), 36-39.
- Villanueva Martínez, N. I. (2017). Obtención de 5-Hidroximetilfurfural a partir de glucosa proveniente de licores de corteza de pino y eucalipto, utilizando catalizadores sólidos en medio acuoso [Tesis para la obtención del grado de Magister en Ciencias de la Ingeniería con mención en Ingeniería Química]. Universidad de Concepción, Chile.
- Villareal-Morales, S. L., Muñiz-Márquez, D. B., Michel-Michel, M., González-Montemayor, Á. M., Escobedo-García, S., Salas-Tovar, J. A., Flores-Gallegos, A. C., & Rodríguez-Herrera, R. (2019). Aguamiel a fresh beverage from Agave spp. sap with functional properties. In Mihai-Grumezescu, A., & Holban, A. A., *Natural Beverages*, 179-208. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816689-5.00007-9>

Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103-123. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.009>