

Análisis bromatológico y aislamiento de microorganismos con potencial probiótico del pulque

Bromatological analysis and isolation of microorganisms with probiotic potential from pulque

Dante Israel León-de la O., Daniel Sedrac Méndez-Colín, Darling Paola Rodríguez-Padilla, Lorena Puente-Hurle, Fernanda Isabel García-Sorrondegui y Rosa Salgado-Brito

Universidad Simón Bolívar, México

dleon@bolivar.usb.mx, caminantedelaluna@hotmail.com, sakutolee_6@hotmail.com, uroborossnake@hotmail.com, fer_31003@hotmail.com, dirqfb@bolivar.usb.mx

Recepción: 18 de junio de 2012

Aceptación: 05 de noviembre de 2012

(pp. 115-122)

Resumen

El pulque es un producto de la fermentación del aguamiel del agave; a partir de éste es posible aislar levaduras y bacterias; en análisis por ADNr 16s se identificaron cepas de Lactobacillus, por lo que es posible aislar cepas de microorganismos con potencial probiótico a partir de esta bebida fermentada. El análisis bromatológico muestra un contenido pobre en carbohidratos, proteínas, y alcohol. Se aislaron ocho microorganismos por técnicas microbiológicas convencionales: seis fueron bacterias, cinco bacilos, un coco y dos levaduras. Una levadura y un bacilo fueron resistentes a pH ácido y a jugo gástrico artificial, por lo que estos dos microorganismos pueden tener potencial probiótico.

Palabras clave: *Pulque, probiótico, análisis bromatológico*

Abstract

Pulque is a fermentation product of mead agave; from this fermented beverage is possible to isolate yeasts and bacteria; Results from 16s rDNA analysis were identified strains of Lactobacillus, therefore it is possible to isolate strains of microorganisms with probiotic potential from this fermented beverage. The chemical composition analysis shows a low carbohydrate, protein and alcohol content. Eight organisms were isolated by conventional microbiological techniques; six were bacteria, five bacilli a coccus and two yeasts. A yeast and a bacilli were resistant to low pH and artificial gastric juice, therefore these two organisms may have probiotic potential.

Key Words: *Pulque. probiotic. bromatologic analysis*

Introducción

El pulque es una bebida prehispánica mexicana, obtenida de la fermentación del aguamiel, es una bebida alcohólica, blanca y espesa, que se obtiene haciendo fermentar el aguamiel o jugo extraído de diferentes especies de maguey como Agave americana, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. mapisaga*, *A. salmiana*. La fermentación de los azúcares del aguamiel se inicia en el agave gracias a los microorganismos que forman parte de la microbiota del mismo maguey. Sin embargo el proceso se acelera gracias a la adición de la semilla (porción de pulque producido anteriormente), la fermentación dura desde unas horas hasta toda la noche, dependiendo si la savia se recoge al amanecer o al atardecer. (Escalante, Giles-Gómez, Hernández, Córdova-Aguilar, López-Munguía, Gosset y Bolívar, 2008).

En la actualidad se pueden utilizar diversas formas de identificación de microorganismos, desde métodos básicos de pruebas bioquímicas hasta la comparación de las secuencias de los ADNr 16S. Esta última, permite establecer las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos procariotas al compararlas con bibliotecas genómicas (Rodicio y Mendoza, 2004). Existen diferentes análisis microbiológicos que se han hecho al pulque; Sánchez Marroquín (1967) fue de los pioneros mexicanos en aislar levaduras y bacterias a partir de esta bebida, al igual que Ulloa y Herrera (1976). Recientemente Escalante y colaboradores (2004), hicieron el análisis del ADNr 16s comparando las secuencias de estos ADN con bibliotecas de clones a partir de tres muestras de pulque, logrando identificar a *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus* cepa ASF360, *L. kefir*, *L. acetotolerans*, *L. hilgardii*, *L. plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Microbacterium arborescens*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Acetobacter pomorium*, *Gluconobacter oxydans*, y *Hafnia alvei*; es importante hacer notar que el 80.9% de los microorganismos identificados correspondieron al género bacteriano *Lactobacillus*, reconocido por su capacidad para funcionar como probiótico gracias a (i) la inhibición de patógenos y la restauración de la homeostasis microbiana a través de interacciones microbio-microbio, (ii) el aumento de la función de la barrera epitelial, y (iii) la modulación de la respuesta inmune, ya sea que las cepas tengan una sola característica o a varias de éstas. (Escalante *et.al.*, 2004; Lebeer S., Vanderleyden J. y De Keermaecker S. C. J., 2008).

En 1965 Lilly y Stillwell utilizaron por primera vez el término de "probiótico", para nombrar a los produc-

tos de la fermentación gástrica (Lilly y Stillwell, 1965). Probiótico deriva de dos vocablos, del latín "pro" que significa "por" o "en favor de", y del griego "bios" que quiere decir "vida", es decir probiótico significa en *pro de la vida o a favor de la vida*, sin embargo el término ha sufrido algunas modificaciones, por lo que probiótico también se ha definido como *microorganismos vivos y compuestos que participan en el balance y desarrollo microbiano intestinal*, mediante diferentes mecanismos; estos probióticos también han recibido el nombre de *bioterapéuticos*, *bioprotectores* o *bioprotectores*, ya que se han utilizado para prevenir infecciones entéricas y gastrointestinales. Algunas consideraciones para que un microorganismo pueda cumplir con esta función de probiótico son: ser habitante normal del intestino, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaz de producir compuestos antimicrobianos y ser estable durante el proceso de producción, comercialización y distribución para que pueda estar vivo en el intestino (Fuller, 1989; Penna, 1998; Pardio, Krzysatof, Waliszewski y Robledo, 1994; Boyle, Robins-Browne y Tang, 2006; Gotteland, Brunser y Cruchet, 2006; y Cervantes-Contreras y Pedroza, 2008).

En este trabajo se define como probiótico a un cultivo puro o mezcla de microorganismo vivo, bacterias o levaduras así como compuestos incluidos en la dieta del ser humano como suplementos, los cuales pueden tener alguna o varias de las siguientes funciones: reducir la colonización de patógenos, disminuir o suprimir la producción de factores de virulencia, estimular la respuesta inmunológica (producción y secreción de factores antiinflamatorios), producir compuestos con actividad antimicrobiana y antiviral en el intestino, bronquios, aparato genital urinario y glándulas mamarias, es decir que pueden tener efectos sobre todo en mucosas (Boyle, *et.al.*, 2006; Gotteland, M., *et.al.*, 2006; Maldonado y Llanca, 2007; Cervantes-Contreras y Pedroza, 2008; DuPont, Ericsson y Farthing, 2009; Eaton, Honkala, Auchtung y Britton, 2010).

Objetivo

Caracterizar bromatológicamente pulque de la zona metropolitana y aislar a partir del mismo, microorganismos que demuestren capacidad acidófila para determinar su potencial probiótico.

Método

Toma de muestras

Las muestras de pulque se tomaron conforme a lo establecido en el proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-SSA1-109. Bienes y Servicios.

Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico

Se puso el pulque desde el tradicional contenedor de madera de las pulquerías, en un recipiente estéril de un litro y etiquetado con la fecha, lugar, hora de muestreo y observaciones que describen las características en que se encontraba la muestra; se tapó inmediatamente de forma hermética y se transportó al laboratorio para su análisis.

Análisis bromatológico del pulque

Determinación de azúcares totales. Esta determinación se hizo por el método de antrona, descrito por Witham *et.al.* (1971). La absorbencia se leyó a 600 nm en un espectrofotómetro Genesis. Cada muestra se trabajó por triplicado y la concentración de azúcares se estimó a partir de una curva patrón que contenía de 20 a 200 µg de glucosa mL⁻¹.

Determinación de humedad y cenizas totales. Esta determinación se realizó por el método de secado en charolas en estufa por triplicado. 5 mL de muestra de pulque perfectamente mezclada, se pusieron en charolas de aluminio a peso constante, se pesó cada dos horas hasta obtener un peso constante. La muestra seca se incineró en mufla a 800°C hasta obtener cenizas blancas.

Determinación de nitrógeno total por método de micro Kjeldahl. La determinación se realizó por triplicado. Se utilizó 0.5 mL de pulque, con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado y 0.1 g de sulfato de potasio y sulfato de cobre pentahidratado.

Extracción de grasa total. A 0.2 g de pulque deshidratado se extrajeron las grasas totales utilizando un reflujo con éter de petróleo en soxhlet, las muestras se realizaron por triplicado.

Extracción de etanol. La determinación se realizó por triplicado. La fracción etanólica contenida en 250 mL de pulque fue destilada mediante un rota-

vapor (Yamato RE500) con vacío a 60°C. Al finalizar, se utilizó un alcoholímetro para calcular el contenido de alcohol en el extracto.

Aislamiento y selección de microorganismos con potencial probiótico

Aislamiento. Se realizaron diluciones 10⁻¹ hasta 10⁻³ del pulque utilizando como diluyente agua peptonada. Las tres diluciones se sembraron por dispersión en placa usando varilla acodada en cajas Petri con agar Yeast Peptone Glucose (YPG), Macconkey, de Man, Rugosa y Sharpe (MRS) y agar soya tripticaseina (AST). Todas las cajas se incubaron a 30°C por 42 horas.

Se obtuvieron los cultivos puros de cada cepa por resiembras sucesivas por estría cruzadas en el agar en el que mejor presentaron crecimiento. Las cepas puras se sembraron por estría cruzada en los diferentes medios para observar el cambio de la morfología colonial.

Selección de cepas con propiedades probióticas.

La selección de las cepas se realizó de acuerdo con las características que definen a los probióticos, como sobrevivir al proceso de digestión principalmente por el pH ácido y la degradación enzimática del estómago, (Pardio-Sedas, *et.al.*, 1994).

Resistencia y crecimiento en pH ácido. Se evaluó la tolerancia a distintos valores de pH en tres matraces de 250 mL con 90 mL de caldo YPG, formulado con extracto de levadura (Bioxon) 1% (p/v), peptona (Bioxon) 2% (p/v) y glucosa (Reasol) 2% (p/v) (Ortiz, Reuto, Fajardo, Sarmiento, Aguirre, Arbeláez, Gómez y Quevedo-Hidalgo, 2008), y tres matraces de MRS (Difco) con pH 2 con HCl concentrado y se montaron controles para cada medio. Cada matraz, se inoculó con una dilución de 10⁻³ del pulque diluido con agua peptonada (Difco), al 10% (Ortiz, *et.al.*, 2008). Las muestras se incubaron a 28 ± 2°C durante 24 horas. Finalizado el periodo de incubación se observó el crecimiento microbiano por turbiedad y además se realizaron siembras por estría cruzada en placa con agar YPG y agar MRS, para recuperar las cepas resistentes a los pH probados.

Resistencia a jugos gástricos. En condiciones de esterilidad, se preparó jugo gástrico artificial, para el cual se adicionó NaCl (2 g/L) y pepsina (3.2 g/L), ajustando a pH final de 2 con HCl concentrado (Ortiz A., *et.al.*, 2008). Como control, se ajustó

jugo gástrico artificial a un pH de 6.5 - 7.0 con NaOH 5N. La esterilización se llevó a cabo por filtración con membrana de celulosa estéril de 0.22 μm con vacío. La resistencia al jugo gástrico artificial estéril se probó en matraces de 250 mL con 90 mL del jugo, estos matraces se incubaron con una asada de los cultivos puros, se incubaron a 28 ± 2 °C, tomando una muestra para siembra por estría cruzada en placas con agar YPG y MRS a las 24 horas. El experimento se realizó por triplicado. Las cepas resistentes se aislaron hasta obtener el cultivo puro por resiembras por estría cruzada.

Todas las cepas aisladas del pulque, de las pruebas de resistencia a pH ácido y jugo gástrico, se sembraron en los diferentes medios de cultivo para descartar cepas que fueran la misma, mediante la observación de la morfología colonial y microscópica.

Resultados

Análisis bromatológico del pulque

Los resultados obtenidos de la determinación bromatológica del pulque se muestran en la tabla 1, donde además se hace una comparación entre el pulque y el producto comercial Yakult, así como con los resultados obtenidos de referencias bibliográficas. Como se puede apreciar el Yakult presenta mayor concentración de nitrógeno total y de carbohidratos, en comparación con el pulque, además de que el pulque tiene etanol y el Yakult no, y en cuanto a calorías el pulque brinda menos que el Yakult.

Aislamiento de cepas

Se aislaron en total ocho cepas diferentes, de las diluciones decimales de pulque y de los experimentos de resistencia a pH ácido y jugos gástricos en los diferentes medios de cultivo. De las cuales cinco son bacilos Gram positivos, un coco Gram positivo y dos levaduras. En la figura 1 se muestran las morfologías coloniales y microscópicas de cada cepa.

Tabla 1. Bromatología del pulque, referencia bibliográfica del pulque y producto comercial Yakult

Determinación	Muestras de Pulque (Media)	Referencia Bibliográfica	Yakult ^f
Humedad	98%	97% ^f	98%
Cenizas	0.5% \pm 0.1	0.3% ^f	No reportado
Grasas	0 g	0 g	0.025 g/ 100 mL
Nitrógeno total (Proteína)	0.31 g/100 mL \pm 0.05	0.14 – 0.37 g/100 mL ^{b, a}	1.25 g/100 mL
Fibra	0 g/ L	0 g/L	0
Carbohidratos totales	3.5 g/ 100 mL \pm 2	3.0 - 6.2 g/ 100 mL \pm 2 ^{e, f}	17.5 g/ 100 mL
Etanol % (V/V)	6% \pm 2	5-10% ^{a, d}	0
Calorías	40.8 Kcal/ 100 mL	42.5 Kcal/ 100 mL	73.7 Kcal/ 100 mL

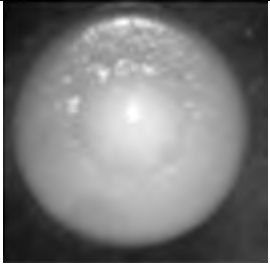
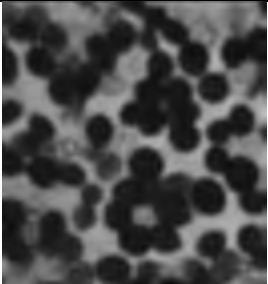
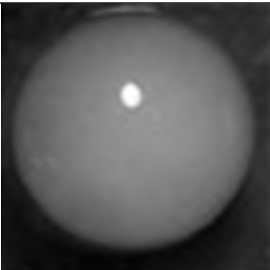
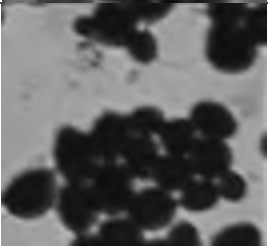
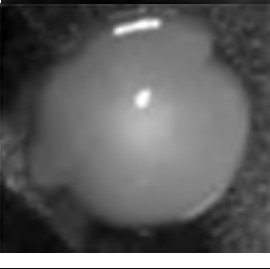
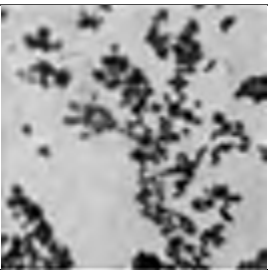
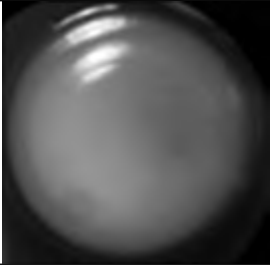
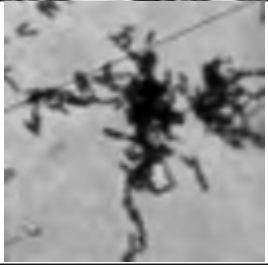
Referencias: a) Sánchez-Marroquín., 1957, b) Cervantes-Contreras y Pedroza-Rodríguez., 2007., c) Yakult., 2011., d) Escalante et al. 2008., e) Massieu, Guzmán, Cravioto y Calvo, 1949, f) Trejo-Estrada., 2012.


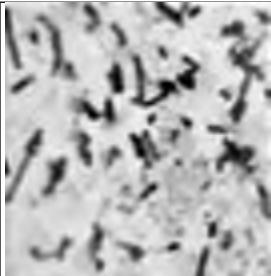
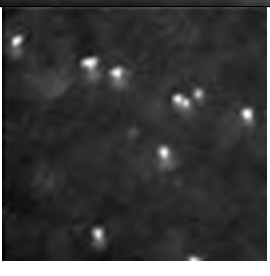
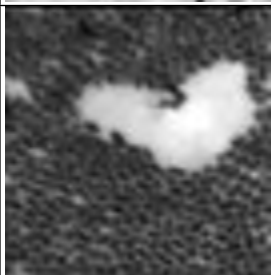
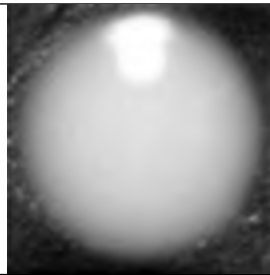
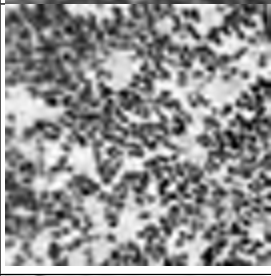
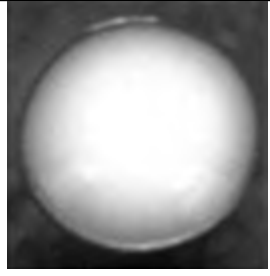
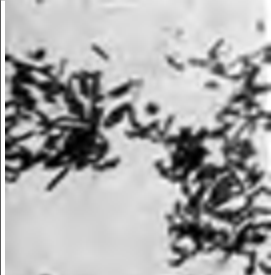
Discusión

Análisis Bromatológico. La determinación bromatológica del pulque muestra una concentración definida de macroelementos comparable con aquellos pulques analizados por Massieu *et.al.* en 1949. El análisis bromatológico del pulque es comparado con el producto comercial con probióticos más popular en el mercado (Yakult, 2012), con el fin de evaluar los requerimientos nutricionales de macroelementos en el que se encuentran los microorganismos con potencial probiótico. Como puede observarse en la tabla 1, el Yakult tiene una mayor concentración de carbohidratos y de azúcares lo que otorga un mayor contenido calórico al producto.

La humedad del pulque es del 98% (ver tabla 1), concordando con lo reportado por diferentes autores (Massieu, *et.al.*, 1949.; Sánchez-Marroquín, 1957., y Richmond, *et.al.*, 2009) y es comparable con la humedad que tienen los productos comerciales tal como el Yakult en presentación de 80 mL (Yakult, 2012).

Tabla 2. Cepas aisladas del pulque

Cepa	pH 2 y jugos gástricos	Morfología Colonial	Morfología Microscópica
Levadura Gram + YPG	+	 Colonias grandes, color blanco, opacas, circular con bordes regulares, elevación convexa en el centro y planas en los extremos, lisas en el centro y rugosas en los extremos. Textura granulada.	
Levadura Gram + YPG	-	 Colonias grandes, brillantes, lisas, convexas, circulares con bordes redondeados.	
Coco Gram + AST	+	 Colonias pequeñas, translúcidas, opacas, circulares con bordes lisos, elevación acuminada.	
Bacilos Gram + AST	-	 Colonias grandes viscosas, plano convexas, pardas, lisas, circulares,	

Bacilos Gram + AST	-		Colonias pequeñas, pardas, opacas, circulares con bordes lisos, elevación convexa.	
Bacilos Gram + MRS	-		Colonias muy pequeñas, translúcidas, brillosas, circulares con bordes lisos, elevación convexa.	
Bacilos Gram + MRS	-		Colonias grandes, color beige, brillantes, mucoides con bordes irregulares, elevación convexa, viscosas.	
Bacilos Gram + MRS	+		Colonias pequeñas, color blanco, brillantes, redondas, bordes lisos, convexas,	

La Morfología microscópica que se presenta es un frotis de cada cepa teñida por la técnica de Gram y con un aumento de 100X con microscopio óptico.

La Morfología colonial que se presenta se observó con un estereoscópio a 1.6X en las cajas petri con el medio de cultivo en el que se obtuvo el mejor crecimiento.

El símbolo (+) representa un resultado positivo. El (-) es un resultado negativo.

El contenido de cenizas es bajo (ver tabla 1) comparado con otras bebidas fermentadas mexicanas como el tesgüino, bebida obtenida de la fermentación del grano de maíz, esto se debe a que en las bebidas fermentadas a base de maíz, se utiliza la misma materia prima dentro del mismo proceso de fermentación (Nava-Arenas, 2009), el pulque proviene de la fermentación del extracto de la piña del agave pulquero (llamado aguamiel), por lo que en la extracción se separa una gran cantidad de sólidos con los minerales que estarían en forma de cenizas en el pulque.

La determinación bromatológica no mostró un contenido significativo de grasa, ya que la cantidad encontrada (<0.01 g/ 100 mL) pudo deberse a errores de procedimiento. En ningún estudio bromatológico del pulque muestran concentraciones de grasas (Massieu, *et.al.*, 1949; Sánchez-Marroquín, 1957, y Richmond, Calvo, Serrano y Payne, 2009) esto es debido a que desde la piña de los diferentes agaves la concentración de grasas es de 1.82% base seca (Vargas-Vázquez, 2009). El contenido graso de productos comerciales presenta cierta cantidad de grasas las cuales son de origen animal, debido a que utilizan leche o sueros de leche de vaca para la elaboración del producto.

La determinación de concentración de nitrógeno total (proteína) en las muestras de pulque entra dentro del intervalo de la concentración de nitrógeno total encontrada por Sánchez-Marroquín (1957) y por Cervantes-Contreras y Pedroza-Rodríguez (2007), en otras muestras de pulque en el Distrito Federal y Estados aledaños a la capital. El contenido proteico en el pulque tiene un amplio intervalo de concentración, debido a la época de cosecha de los agaves, las especies utilizadas de agave y las condiciones climáticas en que se efectuó la cosecha (Sánchez-Marroquín, 1957). El contenido proteico de la bebida comercial con probióticos (Yakult) presenta una relación cuatro veces mayor en la concentración de proteína en comparación con la concentración obtenida en el pulque. Como anteriormente se mencionó, el producto Yakult tiene como base el uso de leche o suero de leche de vaca, la cual tiene una concentración apreciable de proteína de 3.38% (Vera, Romero, Comerón y Maciel, 2008). Sin embargo, el consumo de pulque provee 50% del aporte proteico diario recomendado en comunidades que no tienen acceso a productos cárnicos (Richmond, Calvo, Serrano y Payne, 2009), y en algunas comunidades del Valle de México el pulque es consumido con moderación en el embarazo para que los niños nazcan con buena salud y ganen altura (Backstrand, Allen, Martinez y Pelto, 2001).

El contenido de carbohidratos totales determinados en el pulque y el contenido de etanol están dentro del intervalo de carbohidratos totales y etanol analizados por Massieu et.al. (1949) y Trejo-Estrada (2010). Se encontró que existe una relación entre la concentración de carbohidratos totales y el contenido de etanol en el pulque, debido a que los microorganismos presentes en el pulque realizan fermentación alcohólica a partir de los azúcares disponibles en el pulque como parte de metabolismo, tal es el caso de géneros encontrados en el pulque como *Zymomonas* (Swings y De ley, 1977) y *Saccharomyces* (Ortiz, et.al., 2008) por lo que en pulques con diferentes tiempos de fermentación es común encontrar un contenido alto de etanol y una disminución de los azúcares, lo cual brinda un sabor amargo y fuerte al pulque (Cervantes-Contreras, 2008; Pedroza-Rodríguez, 2007). El Yakult, al ser una bebida fermentada no alcohólica e industrializada, mantiene estable el contenido de carbohidratos, siendo la concentración de carbohidratos totales 5 veces mayor que en el pulque, lo que afecta a su vez el contenido calórico de ambas bebidas el cual es casi el doble en comparación con el pulque.

Aislamiento y selección de microorganismos con potencial probiótico

A partir del pulque se aislaron ocho cepas diferentes y a partir de la prueba de resistencia a pH ácido de 2 y de jugo gástrico artificial estéril sólo dos cepas, las cuales también se aislaron a partir de la muestra original del pulque, por lo que de las ocho cepas aisladas a partir del pulque sólo dos pueden presentar potencial probiótico, ya que estas dos cepas una levadura y un bacilo Gram positivo podrán resistir el pH ácido del estómago (ver tabla 2).


Las levaduras ya se han aislado a partir del pulque (Sánchez-Marroquín, 1957; Cervantes-Contreras, 2008) así como bacilos Gram positivos han sido reportados por Escalante y colaboradores (2004), quienes identifican por análisis de ADNr 16s doce cepas, de las cuales seis corresponden al género de *Lactobacillus*, bacterias ácido resistentes y que en el caso de algunas especies ya se ha demostrado su capacidad probiótica como es el caso de *L. reuteri* (Eaton, et.al., 2011) *L. plantarum* WCFS1, *L. acidophilus* NCFM, *L. johnsonii* NCC533, *L. salivarius* UCC118, *L. reuteri* ATCC 55730 y *L. rhamnosus* GG (Leeber, et.al., 2008), por lo que resulta muy importante haber aislado una cepa de bacilos Gram positivos resistente a pH de 2 y jugo gástrico artificial, ya que esta cepa pudiera corresponder al género *Lactobacillus* con capacidad probiótica bien conocida. Por otra parte es conveniente hacer notar que no fueron aisladas bacilos Gram negativos que pudieran indicar alguna contaminación de origen fecal.

Conclusión

La concentración de macronutrientes en el pulque es menor que en los productos comerciales con probióticos, lo que demuestra que los microorganismos con potencial probiótico obtenidos en el pulque tienen menos requerimientos nutricionales que los utilizados en bebidas comerciales de probióticos.

Se aislaron un total de ocho cepas a partir de técnicas convencionales de Microbiología, de estas ocho cepas, dos pueden tener potencial probiótico, un bacilo Gram positivo y una levadura, las cuales presentaron resistencia a pH ácido y a jugo gástrico artificial.

La investigación realizada permite conocer las

características nutricionales a nivel macroscópico en que las cepas aisladas con potencial probiótico pueden desarrollarse. 

Agradecimientos.

Queremos agradecer la ayuda de la coordinadora de laboratorios, M. en C. Rosalba Santiago Reyes, la C. Alejandra Barba y el apoyo de la Universidad Simón Bolívar por el financiamiento del proyecto.

Referencias

- Backstrand, J. R., Allen, L. H., Martinez, E. y Pelto, G. H. (2001). "Maternal consumption of pulque, a traditional central Mexican alcoholic beverage: relationships to infant growth and development". En *Public Health Nutrition*. 4(4), 883-891.
- Boyle, R. J., Robins-Browne, R. M., y Tang, M. L. (2006). "Probiotic use in clinical practice: What are the risks?" En *American Journal of Clinical Nutrition*. 83(6), 1256-1264.
- Cervantes-Contreras, M. y Pedroza-Rodríguez, A. M. (2007). "El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman". En *NOVA*. 5(8), 101-212.
- Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P. y Hill, C. (2011). "Bacteriocin production: a Probiotic Trait?" En *Appl. Environ. Microbiol.* 78(1),1-6.
- DuPont, H. L., Ericsson, C. D. y Farthing, M. J., (2009). "Expert review of the evidence base for self-therapy of traveler diarrhea". En *J. Travel Med.* 16, 161-71.
- Eaton, K. A., Honkala, A., Auchtung, T. A. y Britton, R. A. (2010). "Probiotic *Lactobacillus reuteri* Ameliorates Disease Due to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Germfree Mice".
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G. y Bolívar, F. (2008). "Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach". En *Int J Food Microbiol.* 124(2), 126-34.
- Fuller, R. (1989). "Probiotics in man and animals". En *J. Appl. Bacteriol.* 66:365-378.
- Galdeano, C. M., Moreno de LeBlanc, A., Vinderola, G., Bibas-Bonet, M. E. y Perdigón, G. (2007). "Proposed Model: Mechanisms of immunomodulation Induced by Probiotic Bacteria". En *Vaccine Immunol.* 14(5), 485-492.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. y De Keermaecker, S. C. J. (2008). "Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action". En *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72(4), 728-764.
- Lilly, D. M. y Stillwell, R. H. (1965). "Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms". En *Science*. 147, 747-748.
- Maldonado, R. y Llanas, L., (2007). "Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano" En *Rev. Fac. Agron.* 33,147- 163.
- Massieu, G. H., Guzmán, J., Cravioto, R. O., y Calvo, J. (1949). "Determinación de algunos aminoácidos esenciales en algunos alimentos mexicanos crudos y cocinados". En *Jour. Nutrition*. 38(3), 293-30.
- Nava-Arenas, D. (2009). *Estudio de cambios estructurales y en algunos compuestos fenólicos durante la elaboración de tesgüino de maíz azul (Zea mays)*. Tesis de Doctorado. México: Instituto Politécnico Nacional.
- Ortiz, A., Reuto, J., Fajardo, E., Sarmiento, S., Aguirre, A., Arbeláez, G., Gómez, D. y Quevedo-Hidalgo, B. (2008). "In vitro evaluation of the probiotic capacity of a native strain of *Saccharomyces cerevisiae*". En *Universitas scientiarum*. 13(2),138-148.
- Pardio, V. T., Krzysatof, N., Waliszewski, K. N. y Robledo, G. (1994). "Los probióticos y su futuro". En *Arch. Latinoam. Nutr.* 4681, 6-10.
- Penna, F. J. (1998). "Diarrea y probióticos. Simposio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas". En *Rev. Enfer. Infec. Ped.* 11(6), 182.
- Richmond, K. A., Calvo, J., Serrano, G., y Payne, G. C., (2009). "Estudio del estado de nutrición y los hábitos alimentarios de comunidades otomíes en el Valle del Mezquital de México". En *Salud pública de México*. 51, 25-31.
- Rodicio, M. R. y Mendoza, M. C. (2004) "Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica". En *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 22(4):238-45.
- Sanchez-Marroquín, A. (1956). "Estudios sobre la microbiología del pulque". En *Revista hispano-americana de ciencias puras y aplicadas*. 15(6),129-140.
- Sánchez-Marroquín, A. (1957). "Estudios, sobre la microbiología del pulque presencia de *Candida parapsilosis*". En *Revista hispano americana de ciencias puras y aplicadas*, 16(2), 129-134.
- Swings, J. y De Ley, J. (1977). "The Biology of Zymomonas". En *Bacteriological Reviews*. 41(1), 1-46.
- Trejo-Estrada, S. R. (2012). "Consorcio de bacterias lácticas para la producción de una bebida fermentada a base de jugos de agave". En *Revista chilena de nutrición*. 5, 8-12.
- Ulloa, M. y Herrera, T. (1976). "Estado actual del conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache". En *Anales, Universidad Nacional Autónoma de México*. 47(53), 145-163.
- Valdivieso, U. M, (2008). *Obtención y caracterización de cepas de Saccharomyces cerevisiae superconductoras de glutation*. Tesis de Doctorado. España: Universidad de Granada.
- Vargas-Vázquez, C. G. (2009). "Obtención de insumos de interés industrial a partir de las fructanas del agave mezcalero potosino (*Agave salmiana*)". Tesis de Maestría. México: Instituto Politécnico Nacional.
- Vera, M., Romero, L., Comerón, E. y Maciel, M. (2008). "Contenidos de porcentaje de grasa y proteína en leche logrado por cruzamiento alterno rotacional de dos razas lecheras bovinas". En *Producir XXI, Bs. As.* 16(198), 12-18.
- Witham, F. H., Blaydes, D. F. y Devlin, R. M. (1971). *Experiments in plant physiology*. New York: Van Nostrand Reinhold Company. 245.
- Yakult México (2012). *Sobre Yakult, productos* (versión electrónica). Recuperado el 1° de junio de 2012 en http://www.yakult.com.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=49&Itemid=82