

Aislamiento de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico de alimentos fermentados típicos de México: una revisión

Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potential from typical fermented Mexican food: a review

A.I. Santander-Cortés ^{a,*}, J. Castro-Rosas ^a

^a Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Ciudad del Conocimiento, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Km 4.5, Mineral de la Reforma, C.P. 42184, Hidalgo, México.

Resumen

El interés en la determinación de los efectos beneficiosos que se les adjudican a algunas cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) ha dirigido la atención hacia el aislamiento de cepas que puedan ejercer mejor potencial probiótico. Los alimentos fermentados son fuente conocida de microorganismos probióticos, los cuales pueden exhibir beneficios adjudicados a cada cepa. Por lo que, en esta revisión se analizan previas investigaciones sobre las distintas técnicas empleadas para el aislamiento y evaluación *in vitro* del potencial probiótico de cepas de BAL aisladas de pulque, pozol, tepache y queso de tenate. Los ensayos preliminares *in vitro* más comunes para considerar a una BAL como potencial microorganismo probiótico fueron resistencia a pH ácido y jugos gástricos, tolerancia a sales biliares y actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Listeria monocytogenes* a través de ensayos en placa de doble capa.

Palabras Clave: Probiótico, Pulque, Pozol, Tepache, Tenate.

Abstract

The interest in determining the beneficial effects that have been attributed to some strains of lactic acid bacteria (LAB), has directed attention to isolation of strains that may exert better probiotic potential. Fermented foods are a known source of probiotic microorganisms, which can exhibit benefits attributed to each strain. Therefore, this review analyzes previous research studies about the different techniques used for isolating and assessing *in vitro* probiotic potential of strains isolated from pulque, pozol, tepache and tenate cheese. The most common preliminary *in vitro* assays to regard a LAB as a potential probiotic microorganism were resistance to acidic pH and gastric juices, tolerance to bile salts and antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* through double-layer plaque assays.

Keywords: Probiotic, Pulque, Pozol, Tepache, Tenate.

1. Introducción

El término probiótico fue definido en 2002 como “microorganismos vivos, que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped” (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [ONUAA] y Organización Mundial de la Salud [OMS], 2002), para el año 2014 la definición fue enriquecida por Hill et al. (2014), quien estipuló que los probióticos deben tener un contenido definido, recuentos viables y apropiados al fin de la vida útil del producto, y poseer evidencia de los beneficios para la salud.

De acuerdo con Šušković et al. (2010) los mohos y levaduras son capaces de ser probióticos; sin embargo, la mayoría de ellos son bacterias, específicamente ácido lácticas (BAL); así pues, las BAL son un grupo de bacterias nombradas informalmente que comparten ciertas características en común, como: la obtención de energía celular por fosforilación a nivel de sustrato, ser no esporulantes, no motiles, y ser categorizadas como anaerobios facultativos (Prescott et al., 2002), además de estar conformadas por géneros como *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*,

*Autor para la correspondencia: sa401052@uaeh.edu.mx

Correo electrónico: sa401052@uaeh.edu.mx (Alejandro Iraid Santander Cortés), jcastro@uaeh.edu.mx (Javier Castro Rosas).

Enterococcus, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Mokoena, 2017).

Las BAL ostentan características deseables en la producción de ciertos tipos de alimentos, ya que poseen un comportamiento homo y hetero fermentativo. Son frecuentemente halladas en alimentos elaborados de manera artesanal ya que son introducidas a través de utensilios, equipos o bacterias autóctonas procedentes de la materia prima como el maguey en el caso del pulque, nixtamal en el pozol o aquellas nativas de la leche de cabra (Cervantes & Pedroza, 2007; Pérez & Cardoso, 2020; Ramírez & Vélez, 2016); de la misma manera, las BAL son empleadas en la elaboración de alimentos lácteos y aquellos que son fermentados, ya que contribuyen con el mejoramiento de la textura, vida útil, seguridad microbiana, y con el perfil sensorial (Leroy & de Vuyst, 2004). Además de su importancia en la elaboración de productos alimentarios fermentados han sido identificadas cepas de BAL que son capaces de otorgar beneficios específicos a la salud del consumidor, tales como el efecto antagónico frente a microorganismos patógenos (bacterias, levaduras y hongos filamentosos) (Zapašnik et al., 2022) a través de la secreción de sustancias antimicrobianas (Ácidos orgánicos de cadena corta y bacteriocinas), adherencia competitiva a la mucosa y epitelio, fortalecimiento de la barrera epitelial intestinal y modulación del sistema inmune, mejoramiento en la digestión de lactosa, prevención y tratamiento de diarrea (Bermudez et al., 2012; Colombo et al., 2018).

En este sentido, existe una relación directa entre las BAL y el potencial probiótico; de manera que, la mayoría de los microorganismos probióticos pertenecen al grupo de las BAL junto a las bifidobacterias (Bermudez et al., 2012; Romero et al., 2017), aunado al hecho que las bebidas y alimentos fermentados son una fuente de BAL con determinadas cepas que pudieran ejercer efectos probióticos.

En México existen alrededor de 200 alimentos y bebidas fermentadas (Romero et al., 2017); no obstante, pocas investigaciones han sido realizadas respecto a sus propiedades probióticas, por esto, es importante diferenciar aquellas cepas de BAL procedentes de alimentos no fermentados y de aquellos que sí lo son que presenten aptitudes para ser consideradas probióticas, es de vital importancia ya que encasillar a todas aquellas BAL del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* como microorganismos probióticos es incorrecto, por lo que solo algunas de las BAL pueden llegar a otorgar específicos beneficios a la salud del consumidor, o incluso diferir significativamente en la síntesis de enzimas como la hidrolasa de sales biliares (Palanivelu et al., 2022); así pues, un probiótico siempre debe ser completamente caracterizado a nivel de cepa (Azaís et al., 2010; Hill et al., 2014); de tal forma, que el objetivo fue realizar una revisión de las distintas técnicas *in vitro* empleadas para el aislamiento y la determinación del potencial probiótico de cepas de BAL aisladas de pulque, pozol, tepache y queso de tenate.

2. Importancia de las bacterias ácido lácticas en alimentos fermentados

Las BAL son el grupo de microorganismos mayormente extendido cuya presencia es deseable en los alimentos fermentados ya que provocan la acidificación de la materia prima a través de la producción de ácidos orgánicos,

igualmente son capaces de producir etanol, compuestos aromáticos, bacteriocinas, exopolisacáridos y variedad de enzimas de importancia para la producción de alimentos (Leroy & de Vuyst, 2004), por ejemplo, las bacteriocinas son capaces de otorgar un sabor ácido y agrio, además de inhibir particularmente a bacterias grampositivas (Bautista et al., 2020; Silva et al., 2018).

Las BAL son el primer grupo de bacterias en desarrollarse y estar presente durante todo el proceso de manufactura de alimentos fermentados, como el pozol (Wacher, 2014). Leroy y de Vuyst, (2004) comentan que esto se debe a que la fermentación de este tipo de alimentos es frecuentemente iniciada por BAL provenientes de la materia prima.

3. Alimentos fermentados y de elaboración artesanal

Los alimentos fermentados son comúnmente elaborados de manera artesanal, se convirtieron en una parte importante en la dieta de muchas culturas (Sanlier et al., 2017); así pues, la fermentación tradicional es una forma de procesar alimentos que se logra por el empleo de microorganismos, especialmente BAL, y levaduras (Mokoena et al., 2016).

Como señala Prescott et al. (2002) entre los principales tipos de fermentaciones empleadas en microbiología de alimentos a nivel industrial y en un amplio rango de culturas se encuentra la propiónica, láctica y etanólica; sin embargo, existen alimentos que involucran en su producción más de un tipo de fermentación, como en el caso del tepache, pulque o vinagre.

De acuerdo con Chaves et al. (2014) en los productos fermentados tradicionales, el proceso de fermentación es espontáneo y no controlado; por consiguiente, los atributos sensoriales y de calidad son variables; no obstante, según Šušković et al. (2010) las BAL autóctonas de la materia prima forman las propiedades características de muchos alimentos fermentados naturalmente.

Para efectos de esta revisión se seleccionaron algunos alimentos de consumo popular y de elaboración tradicional en México.

3.1. Pulque

El pulque (Figura 1) es una bebida alcohólica de color blanco, de olor fuerte y textura viscosa (Cervantes & Pedroza, 2007), es obtenida mediante la fermentación de los azúcares presentes en el aguamiel de las especies *Agave atrovirens* y *Agave americana*, de donde es posible aislar cepas de microorganismos con potencial probiótico hacia los seres humanos (González et al., 2016).

Se ha propuesto que el proceso de fermentación inicia en el maguey, en donde se encuentran microorganismos autóctonos de la misma planta como levaduras, BAL, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de exopolisacáridos (Cervantes & Pedroza, 2007). Escalante et al. (2016) menciona que se ha identificado que la diversidad bacteriana del producto final está dominada por especies de *Lactobacillus*, tales como *Lactobacillus acidophilus* y *Lactiplantibacillus plantarum*, de la misma manera entre aquellas especies frecuentemente identificadas se encuentran BAL homofermentativas y heterofermentativas (Escalante et al., 2004), mientras que las fermentaciones ácido (láctica y acética) y alcohólica fungen como las responsables para el

desarrollo del perfil de sabor final del pulque (Pérez & Cardoso, 2020).

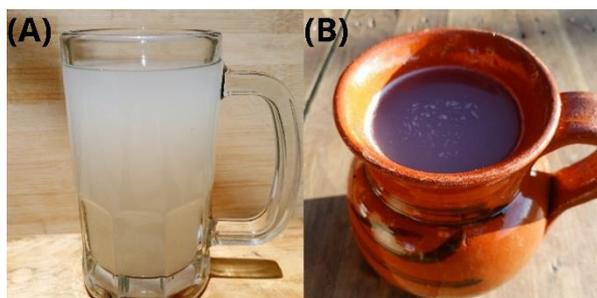


Figura 1: Tarro de pulque (A), jarrón de pulque visto desde arriba (B). Fuente: Elaboración propia, fotografías tomadas de muestra procedente de San Juan Tizahuapan, municipio de Epazoyucan Hidalgo.

Rivas (2014) determinó el perfil sensorial y realizó pruebas de nivel de agrado de distintas muestras de pulque a través de evaluaciones descriptivas, encontró que la textura fue un atributo sensorial apreciado y despreciado por su panel conformado de consumidores habituales y no consumidores; por lo tanto, el empleo de cepas de BAL con facultad de formar exopolisacáridos como β -glucanos y dextranos podrían ganar interés, debido a su capacidad de incrementar la viscosidad del pulque (Cervantes & Pedroza, 2007). De acuerdo con Escalante et al. (2004) *Leuconostoc mesenteroides* posee la capacidad de producir dextrano, lo cual le otorga al pulque una textura viscosa característica, que es apreciada por un selecto grupo de consumidores.

3.2. Pozol

Como lo menciona Velázquez et al. (2018) el pozol (Figura 2) es una bebida tradicional mexicana no alcohólica y fermentada, a base del cereal *Zea mays*, de sabor ácido y refrescante adjudicado a la producción de ácido láctico por las BAL durante el proceso de fermentación en hojas de plátano. Jiménez et al. (2010) menciona que no es necesario adicionar algún tipo de inóculo a la masa, de modo que numerosos tipos de microorganismos son introducidos durante la molienda.

De acuerdo con Ramírez et al. (2019), la elaboración consta primeramente de la nixtamalización de los granos de maíz con una solución de óxido de calcio al 0.5%-2% v/v, la remoción del pericarpio y exceso de la solución alcalina, posteriormente la molienda de los granos y el boleado de la masa en hojas de plátano con el fin de ser fermentada a temperatura ambiente por horas o incluso días. Finalmente, la masa es suspendida en agua; no obstante, existen distintos ingredientes que pueden adicionarse para mejorar el sabor, como lo son chiles secos, miel, azúcar o cacao; no obstante, a la combinación de pozol con cacao se le conoce como “chorote” (Figura 2).

Se ha encontrado que el consorcio microbiano de pozol fresco se compone principalmente de BAL y de aquellas cepas con actividad amilolítica (Escalante et al., 2001; Wachter et al., 2000); sin embargo, también se incluyen en menor medida, enterobacterias, levaduras y mohos.

Wachter et al. (2000) observó mayor crecimiento en agar papa dextrosa de mohos y levaduras en muestras procedentes de la región interior de bolas de masa para pozol, que de la región interior; en cambio, no encontró diferencias significativas para el conteo de BAL.



Figura 2: Pozol con cacao (chorote) en masa (A), vitrolero de pozol con cacao (chorote) disperso en agua (B). Fuente: Elaboración propia, fotografías obtenidas de muestra procedente del municipio de San Pedro Comitancillo Oaxaca.

El método tradicional para la preparación de pozol no involucra el calentamiento de la bebida para reducir el tamaño de los gránulos de almidón, si bien es una práctica que no afecta de manera significativa la microbiología del pozol (Wacher et al., 2000), tiene el potencial de ser sustituida a través de la selección de cepas de BAL capaces de ejercer mejor actividad amilolítica, especies como *L. acidophilus* y *Lactobacillus crispatus* poseen esta capacidad.

Rizo et al. (2021) determinó las principales proteínas bacterianas halladas en masa de pozol durante el proceso de fermentación. Encontró que la mayoría correspondieron a proteínas de BAL, específicamente a cepas del género *Streptococcus*, seguido de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Lactococcus* en menor abundancia.

3.3. Tepache

El tepache (Figura 3) es una bebida tradicional mexicana consumida desde tiempos prehispánicos, y producida por la fermentación mixta láctica-alcohólica. Presenta distintas variaciones en el proceso de elaboración a lo largo del país (Ramírez et al., 2019); ahora bien, Pérez y Cardoso. (2020) hacen mención que la manera más común de elaborarlo consiste en dejar fermentar la cascara de la piña y en algunas ocasiones naranja, manzana, guayaba y tamarindo en agua con piloncillo (Azúcar no procesada, similar a la melaza) dentro de barriles de madera llamados “tepacheras” por 1 a 5 días.

Con base a resultados obtenidos por Gutiérrez et al. (2022) tras estudiar la comunidad microbiana en tepache fermentado por 3 días, determinó que tal comunidad se encontraba dominada por los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, y *Acetobacter*.

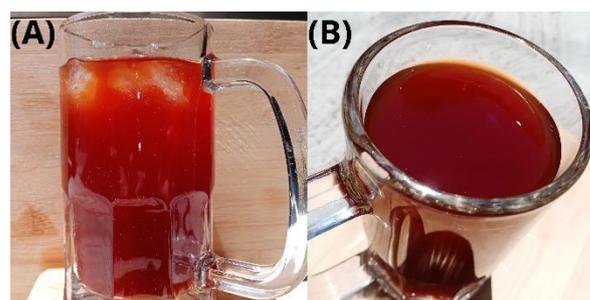


Figura 3: Tarro de tepache de piña (A), tarro de tepache de piña visto desde arriba (B). Fuente: Elaboración propia, fotografías tomadas de muestra procedente del municipio de San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo.

3.4. Queso de tenate

Villegas et al. (2016) designa un producto típico como aquel que se encuentra ligado especialmente a un territorio, costumbres y hábitos, particularmente considera que un queso típico debe poseer características cualitativas impartidas por las materias primas, proceso de hechura, el entorno físico y cultural, características que cumple el queso de tenate (Figura 4). Es un queso fresco nítidamente territorial de Tlaxco en Tlaxcala (Grass et al., 2013) y del valle de Tulancingo en Hidalgo, de pasta blanda, semidura y prensada (Monroy, 2007). De acuerdo con Villegas et al. (2016) este queso es elaborado de manera artesanal con leche cruda de vaca y posteriormente empacado en un cesto tejido de hoja de palma, llamado tenate, el cual imparte características sensoriales agradables, como sabor, olor y textura (Villegas et al., 2014).

La elaboración es de manera familiar y de traspatio, por productores con infraestructura y equipo escaso; por consiguiente, la leche cruda llega a las queserías a una temperatura de 30 a 36°C ya que no cuentan con un sistema de refrigeración eficiente (Villegas et al., 2014). Sbodio y Revelli (2012) comentan que el nulo control de calidad e higiene, así como el empleo de leche cruda para la elaboración de cualquier queso propicia la acidificación de la leche a través de la producción de ácido láctico por las BAL nativas de la leche; en cualquier caso, aquellos ácidos orgánicos como el acético o láctico provocan el descenso del pH hasta el punto isoeléctrico de las caseínas (pH 4.6), lo cual induce la disminución de la repulsión electrostática entre los grupos cargados, tales como los residuos de fosfoserina, así como la liberación del fosfato de calcio coloidal y la disgregación de micelas en submicelas hasta un punto en que las caseínas se hacen insolubles (Walstra et al., 1987); de manera que, tal acidificación contribuye a la elaboración del queso, del cual una de sus características es la adición de sal a la cuajada después de haberse acidificado (Palacios, 2006).

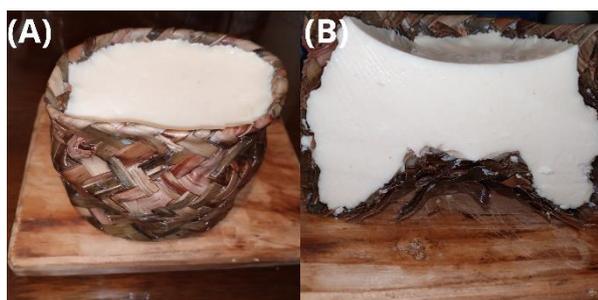


Figura 4: Pieza de queso de tenate de 350 g (A), corte transversal en pieza de queso de tenate (B). Fuente: Elaboración propia, fotografías tomadas de muestra procedente del municipio de Acatlán Hidalgo.

Hasta la fecha un restringido número de estudios han sido realizados sobre las propiedades probióticas de las BAL aisladas de este queso, limitándose a recuentos microbianos de microorganismos indicadores y BAL (Palacios, 2006) así como un estudio realizado por Falfán et al. (2021). En ausencia de información específica referente al queso de tenate no es posible mencionar exactamente los géneros bacterianos predominantes; sin embargo, Coelho et al. (2022) reconoce que en los quesos elaborados de manera artesanal predomina la presencia de *Lactococcus* spp, *Leuconostoc* spp, *Lactobacillus* spp y *Streptococcus* spp.

4. Aislamiento de BAL de alimentos fermentados

El empleo de medios para la dilución seriada de las muestras de alimentos fermentados es variable en la mayoría de los autores, en primer lugar no todos emplean un medio de pre-enriquecimiento selectivo como el agua peptonada, Velázquez et al. (2018) diluyó una muestra de pozol en agua destilada desionizada para formar la primera dilución 1:10, este hecho se puede deber a que tal muestra partió del pozol en forma de masa, sin haber sido previamente preparado en agua potable como se realiza de forma tradicional, posiblemente podría haber repercutido en obtener muy pocas colonias en los cultivos en agar MRS a partir de diluciones posteriores como 1/10000 o 1/100000.

Si bien el agar MRS es indispensable para el desarrollo de BAL procedentes de las muestras, no todos los autores abordaron de una serie de diluciones seriadas a partir de las dispersiones de los alimentos, por un lado, Giles et al. (2016) y Arenas (2015) partieron de cepas de BAL previamente aisladas y preservadas bajo ultracongelación en caldo MRS, ambos reactivaron las cepas en agar MRS a 37°C en condiciones de microaerofilia en tarros de vela.

El agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) se empleó para el aislamiento de BAL presuntivas por la totalidad de los autores que determinaron el potencial probiótico de BAL en pulque, pozol, tepache y queso de tenate; así mismo, su uso prevaleció en los trabajos de aquellos autores que asilaron BAL de alimentos fermentados distintos a los contemplados en esta revisión, por ejemplo: chorizo español fermentado (Santos et al., 1998), miel y pétalos (Leska et al., 2022), leche de vaca (Goa et al., 2022) y pepinillos fermentados (Kumar et al., 2017); no obstante, el agar MRS para el aislamiento presuntivo de BAL fue adicionado de natamicina (100 mg/L) por Falfán et al. (2021) con el objetivo de inhibir el crecimiento de levaduras procedentes del queso de tenate.

La pureza de las placas de agar MRS fue incrementada en la totalidad de los casos mediante el aislamiento presuntivo de cepas de BAL haciendo uso de criterios y características predominantes en BAL, por ejemplo: ser Gram-positivo, negativo en la prueba de catalasa y oxidasa, presentar la morfología colonial típica de una BAL inoculada en agar MRS y morfología microscópica típica de BAL. Los criterios previamente mencionados no fueron considerados en su totalidad por todos los autores. Giles et al. (2016) no realizó ninguna de las pruebas ya que partió de una cepa previamente caracterizada y conocida, por otro lado, Falfán et al. (2021) cumplió con todos los criterios para identificar en primera instancia a una BAL bajo las características y criterios anteriormente mencionados.

5. Determinación *in vitro* del potencial probiótico

Bajo las pautas y recomendaciones otorgadas por la ONUUA y OMS del año 2002 es requerido el cumplimiento de una serie de requisitos para afirmar que cierto alimento posee un efecto probiótico adjudicado a la presencia de microorganismos concretos. En primer lugar la ONUUA y OMS (2002) contemplaron la identificación de los microorganismos probióticos a nivel especie, género y cepa, mediante métodos fenotípicos y genotípicos, puesto que el aumento de beneficios sobre el hospedero depende de la especificidad del probiótico (Vélez et al., 2015), y de la forma

de ejercer esos efectos benéficos, por ejemplo Huligere et al. (2023) evaluó la capacidad de cepas de BAL para inhibir el funcionamiento de enzimas involucradas en el aumento súbito de la glucemia en pacientes diabéticos. En segundo lugar, la ONUUA y OMS (2002) recomendaron la realización de pruebas *in vitro*, para identificar el mecanismo por el cual ejercen el posible efecto probiótico, y por último la realización de pruebas *in vivo* capaces de correlacionarse con las pruebas *in vitro*.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) no ha establecido una definición formal ni criterios para determinar a un microorganismo como probiótico; sin embargo, Binda et al. (2020) propuso 4 criterios mínimos en forma de un árbol de decisiones para el correcto empleo del término probiótico, basados en las declaraciones de posición del 2017 de la Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos (ISAPP) ISAPP (2018); así pues, los criterios mínimos establecidos por Binda et al. (2020) hacen entender que las cepas probióticas deben estar caracterizadas suficientemente, ser seguras bajo el uso previsto, presentar al menos un estudio positivo relevante en humanos y que el producto sea capaz de mantener viables a los posibles probióticos hasta el final de la vida útil.

La ONUUA y OMS (2002) en las Directrices para la Evaluación de Probióticos en Alimentos, consideraron a la resistencia a la acidez gástrica, adherencia a células epiteliales humanas, actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas, habilidad de reducir la adhesión de patógenos y actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares, como principios a tomar en cuenta para determinar el potencial de un microorganismo para ser considerado como probiótico. Estos principios se correlacionan con aquellos criterios mínimos establecidos por Binda et al. (2020) para discernir entre posibles probióticos.

Distintos estudios han sido realizados para determinar el potencial probiótico de BAL; no obstante, pocos consideran a cabalidad los principios de la ONUUA y OMS (2002), los cuales contemplan las barreras gastrointestinales a las que son sometidos los microorganismos con potencial probiótico.

En las tablas 1, 2, 3 y 4 se indican las pruebas *in vitro* que fueron realizadas por los autores contemplados en esta revisión, para determinar el potencial probiótico en pulque, pozol, tepache y queso de tenate respectivamente.

5.1. Resistencia a lisozima

Uno de los criterios tomados en cuenta por distintos autores para determinar el potencial probiótico es la supervivencia a la primera etapa de la digestión, particularmente su resistencia al efecto lítico de la lisozima en la saliva humana. Giles et al. (2016) fue el único autor en esta revisión que realizó la evaluación *in vitro* de la resistencia de BAL frente a la lisozima, específicamente partió de una cepa de *L. mesenteroides* aislada de pulque, frente a una concentración de 100 mg/L, a 37°C para comprobar la supervivencia a 30 y 120 minutos.

De manera similar Zago et al. (2011) realizó la evaluación de la supervivencia de distintas cepas *L. plantarum* aisladas de quesos argentinos de elaboración artesanal y simuló las condiciones *in vivo* de la saliva. En general demostró una alta resistencia a la lisozima. En el mejor de los casos obtuvo una

taza de supervivencia mayor al 95% en todos los tiempos de incubación para determinadas cepas.

Giles et al. (2016) obtuvo igualmente resultados favorables con la cepa de *L. mesenteroides*, con un porcentaje de supervivencia mayor a 70% a 120 minutos y cercano a 89% a los primeros 30 minutos.

5.2. Resistencia a pH ácido y jugo gástrico

La determinación de la resistencia en medios ácidos es una propiedad del potencial probiótico de microorganismos. Después del consumo oral y la exposición transitoria a la lisozima en la boca, las bacterias quedan expuestas inmediatamente a las condiciones antimicrobianas extremas en el estómago (pH entre 1.5 y 3) (Zago et al., 2011).

La resistencia al pH ácido fue realizada por la mayoría de los autores; sin embargo, algunos de ellos la decidieron realizar en conjunto con la resistencia a los jugos gástricos.

Por un lado, Giles et al. (2016) determinó el porcentaje de supervivencia de una cepa de *L. mesenteroides* aislada de pulque. Ajustó caldo All Purpose Tween (APT) a pH 2.5 y lo incubó a 37°C por 5 horas, de manera que obtuvo un porcentaje de supervivencia del 74.98 %; al contrario, Rodríguez y Villalva (2010) aislaron BAL presuntivas de pozol, a las cuales determinaron su supervivencia en agua destilada esterilizada a pH de 1, 2 y 3 y a tiempos variables de incubación (0, 1, 2 y 3 h), de manera cualitativa hallaron que la mayoría de las cepas presuntivas de ser BAL probióticas sobrevivieron a las condiciones ácidas.

Velázquez et al. (2018) en pozol no evaluó la resistencia a distintos niveles de pH ácido; pero, evaluó la tolerancia de las BAL presuntivas en agar MRS acidificado a pH 4.0, 5.0, 6.0 y 7.0.

Escobar et al. (2020) aisló una BAL, identificada como *Lactobacillus pentosus* ABHEAU-05, determinó su resistencia a condiciones ácidas a través de su inoculación en caldo MRS ajustado a pH 2 e incubado a 37°C por 2 horas.

Finalmente, Falfán et al. (2021) evaluó la resistencia de *Lactocaseibacillus paracasei* aislado de queso de tenate; en primer lugar, inóculo a la cepa en agua peptonada ajustada a pH 2 y 3, posteriormente realizó la cuenta en placas de agar MRS a tiempos variables (0, 1 y 2 h).

La viabilidad de las BAL tras su supervivencia en un medio acidificado con HCl hasta un pH cercano a 2 o 3, si bien es un criterio aceptado por la ONUUA y OMS (2002) en las Directrices para la Evaluación de Probióticos en Alimentos, no es capaz de simular completamente las condiciones del jugo gástrico en el momento de la digestión. Carballido et al. (2005) afirma que el jugo gástrico se encuentra formado de moco secretado por células mucosas, gastrina, pepsinógeno, lipasa gástrica, y HCl; no obstante, ciertos autores consideraron en su metodología incluir algunas de las enzimas gástricas en conjunto a niveles de pH ácido, por ejemplo: para el aislamiento de BAL de pulque, León et al. (2012) empleó jugo gástrico artificial, a un pH de 2, y compuesto por NaCl en una concentración 0.2 % m/v y pepsina al 0.32 % m/v, inoculó las cepas de BAL al jugo gástrico, y las incubó por 24 horas a 37°C; ahora bien, Cervantes et al. (2019) partió de un caldo MRS el cual fue ajustado a pH 2, y adicionado de únicamente pepsina en un 1% m/v. Si bien ambas metodologías están diseñadas para conocer la supervivencia de los potenciales

microorganismos probióticos, existen diferencias significativas en la expresión de resultados.

Por un lado, la metodología de León et al. (2012) permitió obtener resultados cualitativos y menos exactos, ya que únicamente identificó la presencia o no de turbiedad en tubos de ensayo inoculados con las presuntivas cepas probióticas de BAL; en cambio, la metodología de Cervantes et al. (2019) fue capaz de obtener un porcentaje de viabilidad de cada una de las cepas. Se considera que Cervantes et al. (2019) obtuvo mejores resultados que León et al. (2012) en cuanto a la supervivencia, ya que las condiciones de Cervantes et al. (2019) fueron menos hostiles al haber considerado como medio de crecimiento caldo MRS en vez de jugo gástrico.

La evaluación de la resistencia de BAL aisladas de tepache a medios similares al jugo gástrico fue realizada por Escobar et al. (2020). Las condiciones seleccionadas por el autor fueron similares a aquellas tomadas en cuenta para determinar la supervivencia en jugo gástrico; sin embargo, omitió la adición de NaCl. Por su parte Escobar et al. (2020) adicionó 1000 UI de pepsina a caldo MRS que fue acidificado hasta pH 2.5 y posteriormente incubado a 37°C, obtuvo resultados desfavorables, de manera que solamente una cepa logró sobrevivir las condiciones enzimáticas y ácidas previamente mencionadas.

5.3. Resistencia a sales biliares

Acorde a lo mencionado por Carballido et al. (2005) la bilis es expulsada por la vesícula biliar hacia el intestino delgado durante la digestión. Conforme a Cueto y Aragón (2012) algunas cepas de BAL han logrado reducir el colesterol sérico a partir de su capacidad de desconjugar sales biliares por acción de la enzima hidrolasa (BSH); así pues, la actividad de esta enzima consta de uno de los criterios propuestos por la ONUUA y OMS (2002) en las Directrices para la Evaluación de Probióticos en Alimentos para considerar a un microorganismo como probiótico.

Con excepción de León et al. (2012) la mayoría de los autores efectuaron ensayos para determinar la resistencia a sales biliares.

La resistencia a sales biliares de BAL procedentes de pulque fue efectuada por Cervantes et al. (2019), quien inoculó cepas de BAL presuntivas en caldo MRS adicionado de pancreatina en una concentración de 1 % m/v, 0.3% de ácido cólico, así como taurocolato de sodio en una proporción 50:50, posteriormente evaluó la resistencia tras haber incubado a 37°C durante 2 h, encontró resultados favorables, de manera que la mayor parte de las cepas de *Lactobacillus casei* exhibieron porcentajes por encima o cercanos de la cepa control de *L. casei* Shirota; de la misma manera, Giles et al. (2016) evaluó la resistencia de una cepa *L. mesenteroides* aislada de pulque, su método radicó en inocular a 37°C por 24 h la cepa en caldo APT adicionado de sales biliares comerciales al 0.1 % y 0.3 %. Los resultados fueron satisfactorios, ya que obtuvo porcentajes de resistencia del 100% en ambas concentraciones. Arenas (2015) también determinó la resistencia a sales biliares en conjunto con la tolerancia a pH ácido de cepas provenientes de pulque. Obtuvo resultados cualitativos y cuantitativos. La evaluación cualitativa fue realizada en caldo MRS, a pH 3.5 adicionado de 0.3 % m/v de sales biliares comerciales, observó el desarrollo de turbidez en cada tubo para discernir entre crecimiento o

ausencia; ahora bien, para la determinación cuantitativa, contabilizó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) resultantes de la inoculación en agar APT a 37°C por 24 h en microaerofilia, de los caldos MRS previamente empleados para el análisis cualitativo.

La determinación de la resistencia de cepas de BAL aisladas de pozol fue realizada por Velázquez et al. (2018) y Rodríguez y Villalva (2010). Ambos grupos de autores emplearon métodos similares tales como la utilización del medio MRS y la técnica de sembrado por extensión en placa; no obstante, las diferencias radicarón en la adición de sales biliares, concentraciones y temperaturas de incubación. Velázquez et al. (2018) adicionó variadas concentraciones (0.1, 0.15, y 0.3 % m/v) de sales biliares comerciales al agar MRS, y su temperatura de incubación fue de 37°C; al contrario, Rodríguez y Villalva (2010) adicionaron específicamente ácido taurodesoxicólico al 0.5% m/v en adición de CaCl₂ a una concentración de 0.37 mg/mL a caldo MRS.

En el tepache la evaluación de la tolerancia a las sales biliares por Escobar et al. (2020) consistió en inocular *L. pentosus* en caldo MRS ajustado a pH 7 y enriquecido de 0.3 % m/v de sales biliares, fue incubado a 37°C por 2 h.

En el queso de tenate Falfán et al. (2021) inoculó la cepa de BAL presuntiva en caldo soya tripticasa con sales biliares a distintas concentraciones (0.15, 0.3, 0.5 y 1 % m/v), posteriormente incubó a 30°C por 48 h para identificar turbidez y crecimiento en los caldos.

5.4. Actividad antimicrobiana contra patógenos

La actividad antimicrobiana en muestras de pulque fue un criterio que no todos los autores tomaron en cuenta para determinar el potencial probiótico de las presuntivas cepas de BAL probióticas. Por un lado, Cervantes et al. (2019) determinó la actividad antimicrobiana mediante ensayos en placa de doble capa, empleando como cepas patógenas a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Primeramente, aplicó una capa de agar MRS para inocular a las cepas previamente aisladas de BAL, posteriormente vertió agar soya tripticasa para poder inocular a los patógenos, finalmente 60% de las cepas de BAL presuntivas lograron inhibir el crecimiento de las cepas patógenas, la cepa P24-2 (*L. pentosus* 124-2) tuvo la mayor inhibición contra *E. coli* ATCC 25922, mientras P24-4 (*L. plantarum* NBRC 15891) logró inhibir a *S. aureus* ATCC 29213 en mayor medida.

Giles et al. (2016) determinó igualmente la actividad antimicrobiana mediante ensayos en placa de doble capa, usando a *L. mesenteroides* P45 procedente de pulque para medir su actividad antimicrobiana frente a cepas de *E. coli* enteropatógena (EPEC), *Salmonella enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Typhimurium y *Listeria monocytogenes*. Inicialmente la primera capa fue vertida con agar APT e inoculada con *L. mesenteroides* P45, posteriormente fue vertida una segunda capa de agar ligero nutritivo, seguidamente, la segunda capa fue inoculada por cada una de las cepas de los microorganismos patógenos. *L. mesenteroides* P45 logró la mayor zona de inhibición en *E. coli*.

Arenas (2015) empleó de la misma manera ensayos en placa de doble capa tal como los anteriores autores que investigaron la actividad antimicrobiana de BAL procedentes de pulque; en primera instancia, inoculó las cepas de BAL en agar APT,

posteriormente vertió una capa de agar ligero nutritivo previamente mezclado con una solución salina de los patógenos. Los microorganismos patógenos consistieron en cepas de *S. enterica* serovar Typhi, *S. enterica* serovar Enteritidis, *L. monocytogenes*, *Vibrio cholerae* serovar 01 y EPEC; así pues, *L. plantarum* LGC 3 presentó la mayor actividad antimicrobiana frente a *S. Typhi*, mientras que la cepa C, caracterizada como *L. plantarum*, obtuvo la mayor inhibición contra *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *V. cholerae* serovar 01 y EPEC.

La actividad antimicrobiana de cepas aisladas de pozol fue evaluada por un solo autor, Velázquez et al. (2018) determinó el antagonismo microbiano de 4 cepas de BAL presuntivas que ejercieron actividad antimicrobiana frente a *Salmonella* sp. Los ensayos fueron realizados por la técnica de difusión en discos impregnados del líquido de cultivo de las cepas de BAL, los discos fueron colocados sobre la superficie de un agar Müller-Hinton previamente inoculado por *Salmonella* sp mediante la técnica de estría. Las 4 cepas mostraron halos de inhibición de 1 mm a 2 mm; sin embargo, no fueron identificadas las cepas de BAL presuntivas.

La determinación de la actividad antimicrobiana de cepas de BAL procedentes de tepache no fue estudiada por Escobar et al. (2020); al contrario, Falfán et al. (2021) valoró la actividad antagonista de cepas presuntivas de BAL procedentes de queso de tenate a través de la técnica de difusión en pozos y empleando a las cepas *E. coli* O157:H7E0 9, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. aureus* ATCC 25923, y *S. enterica* serotipo Typhimurium ATCC 14028, las cepas patógenas fueron inoculadas en caldo soya tripticasa hasta presentar crecimiento, posteriormente fue inoculada una porción del caldo en agar comercial y se formaron pozos en donde se vertió caldo soya tripticasa previamente inoculado con cada una de las cepas de BAL presuntivas. La mejor actividad antagonista fue obtenida de la cepa T40, caracterizada como *L. paracasei*.

5.5. Resistencia a antibióticos

Si bien la resistencia a antibióticos de uso común no figura en los criterios establecidos por la ONUUA y OMS (2002) para establecer a un microorganismo como un potencial probiótico, constituye un criterio de seguridad a la salud del consumidor. Clementi y Aquilanti (2011) mencionan que algunas de las BAL pueden poseer mecanismos de resistencia a antibióticos que podrían transferirse a bacterias comensales o patógenas en el medio ambiente, alimentos, piensos y sistema digestivo humano o animal.

Un reducido número de autores realizó la evaluación a la resistencia a antibióticos en cepas aisladas de los alimentos que comprende esta revisión.

En pulque, Cervantes et al. (2019) valoró la susceptibilidad de 10 cepas de BAL frente a 8 antibióticos (amoxicilina, amikacina, cloranfenicol, gentamicina, levofloxacino, espectinomicina, tetraciclina, y vancomicina) a través del método de micro dilución en caldo, establecido por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). En primera instancia preparó caldo Müller-Hinton, al cual fue adicionado

cada uno de los antibióticos a concentraciones entre 0.5-500 µg/mL, posteriormente vertió en cada uno de los pocillos de microplacas el caldo adicionado de antibióticos y una porción del inóculo bacteriano de las BAL. Finalmente incubó a 37°C por 24 h el microplato con el fin de observar la inhibición del crecimiento bacteriano en cada uno de los pocillos. Determinó que la mayoría de las cepas son sensibles casi todos los antibióticos evaluados, a excepción de la vancomicina, a la cual todas las cepas de BAL son moderadamente resistentes por requerir ≥ 8 µg/mL para inhibir su crecimiento. La resistencia de las BAL frente a vancomicina ya ha sido reportada previamente, Erginkaya et al. (2018) aisló cepas de BAL no caracterizadas procedentes de lácteos de Turquía, el 57 % de ellas fue resistente a vancomicina.

Por otro lado, Rodríguez y Villalva (2010) evaluaron la resistencia a antibióticos de cepas de BAL aisladas de pozol, emplearon la técnica de difusión en disco y 10 antibióticos a distintas concentraciones (cloxacilina, gentamicina, penicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, tetraciclina y vancomicina). Colocaron discos impregnados de cada uno de los antibióticos sobre cultivos de BAL en agar MRS. Finalmente fueron incubadas las placas a 30°C durante 18 h y se midieron las zonas de inhibición.

Ninguna cepa fue resistente a cloranfenicol, eritromicina y tetraciclina, todas fueron resistentes a kanamicina, mientras que el 63 % de las cepas resistió la vancomicina.

Falfán et al. (2021) determinó la resistencia de una cepa de *L. paracasei* a 16 antibióticos (ampicilina, colistina,

estreptomina, neomicina, gentamicina, ácido nalidíxico, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, amikacina, ceftriaxona, amoxicilina-ácido clavulánico, sulfisoxazol, eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol y ciprofloxacino) a distintas concentraciones que variaron de 10-250 µg/mL por la técnica de difusión en discos sobre agar MRS. La cepa de *L. paracasei* fue resistente al 50% de los antibióticos y sensitivo al 50 % restante.

No fue resistente a la amikacina, ampicilina, gentamicina, cloranfenicol, sulfisoxazol, ceftriaxona, eritromicina, tetraciclina. Rodríguez y Villalva (2010) hallaron resultados similares respecto a la sensibilidad a cloranfenicol, eritromicina y tetraciclina.

6. Conclusiones

Sin importar el tipo de alimento del que son aisladas BAL, es claro identificar que las metodologías aplicadas por cada autor suelen variar, cada técnica debería de correlacionarse con pruebas *in vivo*; así pues, podrían realizarse a la temperatura interna del ser humano durante el tiempo promedio del proceso de digestión; ahora bien, llevar a cabo cada una de las pruebas de manera seriada podría llevar a una mejor correlación, empezando con la resistencia a la lisozima y siguiendo con la evaluación a tolerancia en jugo gástrico y tolerancia a sales biliares, con el fin de recrear el proceso digestivo en el tracto gastrointestinal. Por otro lado, la designación como probiótico por investigadores, debería de proseguir rigurosamente con los requisitos de seguridad establecidos por ONUUA y OMS, así como ser actualizados constantemente; en consecuencia, a la constante transferencia de genes de resistencia por probióticos.

Tabla 1: Realización de pruebas para evaluar el potencial probiótico de las cepas de BAL en pulque

Autor	Resistencia a pH ácido	Resistencia a jugos gástricos	Resistencia a antibióticos	Resistencia a sales biliares	Tolerancia a enzima lisozima	Actividad antimicrobiana
León et al. (2012)	R	R	NR	NR	NR	NR
Cervantes et al. (2019)	NR	R	R	R	NR	R
Giles et al. (2016)	R	NR	NR	R	R	NR
Arenas (2015)	NR	NR	NR	R	NR	R

R: Realizado. NR: No realizado

Tabla 2: Realización de pruebas para evaluar el potencial probiótico de las cepas de BAL en pozol

Autor	Resistencia a pH ácido	Resistencia a jugos gástricos	Resistencia a antibióticos	Resistencia a sales biliares	Tolerancia a enzima lisozima	Actividad antimicrobiana
Velázquez et al. (2018)	R	NR	NR	R	NR	R
Rodríguez y Villalva (2010)	R	NR	R	R	NR	NR

R: Realizado. NR: No realizado

Tabla 3: Realización de pruebas para evaluar el potencial probiótico de las cepas de BAL en tepache

Autor	Resistencia a pH ácido	Resistencia a jugos gástricos	Resistencia a antibióticos	Resistencia a sales biliares	Tolerancia a enzima lisozima	Actividad antimicrobiana
Escobar et al. (2020)	R	R	NR	R	NR	NR

R: Realizado. NR: No realizado

Tabla 4: Realización de pruebas para evaluar el potencial probiótico de las cepas de BAL en queso de tenate

Autor	Resistencia a pH ácido	Resistencia a jugos gástricos	Resistencia a antibióticos	Resistencia a sales biliares	Tolerancia a enzima lisozima	Actividad antimicrobiana
Falfán et al. (2021)	R	NR	R	R	NR	R

R: Realizado. NR: No realizado

Referencias

- Arenas, L. F. (2015). *Caracterización de cepas de bacterias lácticas con actividad probiótica de pulque de la región mixteca* [Tesis de grado]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Azañs, V., Bresson, J. L., Guarnier, F., & Corthier, G. (2010). Not all lactic acid bacteria are probiotics, . . .but some are. *British Journal of Nutrition*, 103(7), 1079–1081. <https://doi.org/10.1017/s0007114510000723>
- Bautista, J., Medina, E., Sánchez, B., Benítez, A., & Arroyo, F. N. (2020). Role of lactic acid bacteria in fermented vegetables. *Grasas y Aceites*, 71(2). <https://doi.org/10.3989/gya.0344191>
- Bermúdez, M., Plaza, J., Muñoz, S., Gómez, C., & Gil, A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2), 160–174. <https://doi.org/10.1159/000342079>
- Binda, S., Hill, C., Johansen, E., Obis, D., Pot, B., Sanders, M. E., Tremblay, A., & Ouwehand, A. C. (2020). Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>
- Carballido, F. C., Santos, J., & Fuentes, I. M. (2005). *Fisiología y fisiopatología de la nutrición: I Curso de Especialización en Nutrición: Anatomía del sistema digestivo* (1.a ed., Vol. 1). Universidade da Coruña, Servizo de Publicacións. <https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/11321/CC-77%20art%201.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cervantes, A., Cruz, N., Ramírez, E., Vega, V., Velázquez, N., Zafra, Q., & Piloni, J. (2019). In Vitro Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Aguamiel and Pulque and Antibacterial Activity Against Pathogens. *Applied Sciences*, 9(3), 601. <https://doi.org/10.3390/app9030601>
- Cervantes, M., & Pedroza, A. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *NOVA-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 5(8), 135-146. <https://www.redalyc.org/pdf/411/41150804.pdf>
- Chaves, C., Serio, A., Grande, C., Mullet, R., Delgado, J., & Paparella, A. (2014). Traditional Fermented Foods and Beverages from a Microbiological and Nutritional Perspective: The Colombian Heritage. *Comprehensive Reviews*, 13(5). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12098>

- Clementi, F., & Aquilanti, L. (2011). *Anaerobe: Recent investigations and updated criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria* (6.a ed., Vol. 17). Iowa State University. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.021>
- Coelho, M. O., Malcata, F. X., & Silva, C. A. (2022). Lactic Acid Bacteria in Raw-Milk Cheeses: From Starter Cultures to Probiotic Functions. *Foods*, *11*(15), 2276. <https://doi.org/10.3390/foods11152276>
- Colombo, M., Castilho, N. P. A., Todorov, S. D., & Nero, L. A. (2018). Beneficial properties of lactic acid bacteria naturally present in dairy production. *BMC Microbiology*, *18*. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1356-8>
- Cueto, C., & Aragón, S. (2012). Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria to reduce in vitro cholesterol. *Scientia Agropecuaria*, *1*.
- Erginkaya, Z., Turhan, E., & Tatli, D. (2018). Determination of antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from traditional Turkish fermented dairy products. *Iranian Journal of Veterinary Research*, *19*(1). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5960774/>
- Escalante, A., López, D. R., Velázquez, J. E., Giles, M., Bolívar, F., & López, A. (2016). Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Frontiers in Microbiology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>
- Escalante, A., Rodríguez, M., Martínez, A., López, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, *235*(2), 273–279. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09599.x>
- Escalante, A., Wachter, C., & Fares, A. (2001). Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, *64*, 21–31. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00428-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00428-1)
- Escobar, M. C., Jaimez, J., Escorza, V. A., Rodríguez, G. M., Contreras, E., Ramírez, J., Castañeda, A., & González, L. G. (2020). *Lactobacillus pentosus* ABHEAU-05: An in vitro digestion resistant lactic acid bacterium isolated from a traditional fermented Mexican beverage. *Revista Argentina de Microbiología*, *52*(4), 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.10.005>
- Falfán, R. N., Mora, N., Gómez, C. A., Rangel, E., Acevedo, O. A., Franco, M. J., & Castro, J. (2021). Characterization and Evaluation of the Probiotic Potential In Vitro and In Situ of *Lactobacillus paracasei* Isolated from Tenate Cheese. *Journal of Food Protection*, *85*(1), 112–121. <https://doi.org/10.4315/jfp-21-021>
- Giles, M., Sandoval, J. G., Matus, V., Campos, I., Bolívar, F., & Escalante, A. (2016). In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *SpringerPlus*, *5*. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2370-7>
- Goa, T., Beyene, G., Mekonnen, M., & Gorems, K. (2022). Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Fermented Milk Produced in Jimma Town, Southwest Ethiopia, and Evaluation of their Antimicrobial Activity against Selected Pathogenic Bacteria. *International Journal of Food Science*, *2022*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2022/2076021>
- González, F., Vázquez, P., Jaimez, J., & Zuñiga, M. A. (2016). Potencial probiótico de bacterias aisladas del pulque: Una revisión. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, *1*(1), 924–930. Recuperado de <http://www.fcb.uanl.mx/IDCYTA/files/volume1/1/10/159.pdf>
- Grass, J. F., Cervantes, F., & Reyes, J. (2013). Estrategias para el rescate y valorización del queso tenate de Tlaxco. Un análisis desde el enfoque de sistemas agroalimentarios localizados (Sial). *Culturales*, *1*(2), 9–54.
- Gutiérrez, W., Peña, B. A., Gutiérrez, A., Guzmán, J., Jasso, R., & Ruíz, V. (2022). Microbial community structure, physicochemical characteristics and predictive functionalities of the Mexican tepache fermented beverage. *Microbiological Research*, *260*
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G., Merenstein, D., & Pot, B. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *11*, 506–514. <https://aura.abdn.ac.uk/bitstream/handle/2164/4189/nrgastro.2014.66.pdf?sequence=1>
- Huligere, S., Kumari, C., Kumar, S., Cull, C., Amachawadi, R., & Ramu, R. (2023). Isolation and characterization of lactic acid bacteria with potential probiotic activity and further investigation of their activity by α -amylase and α -glucosidase inhibitions of fermented batters. *Frontiers in Microbiology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1042263>
- ISAPP. (2018). *ISAPP position statement on minimum criteria for harmonizing global regulatory approaches for probiotics in foods and supplements* [Comunicado de prensa]. <https://isappsociety.org/wp-content/uploads/2018/10/summary-document-probiotics-criteria-ISAPP.pdf>
- Jiménez, R., González, N., Magaña, A., & Magaña, A. (2010). Evaluación microbiológica y sensorial de fermentados de pozol blanco, con cacao (*Theobroma cacao*) y coco (*Cocos nucifera*). *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, *1*(1).
- Kumar, V., Kumari, A., Angmo, K., & Chand, T. (2017). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India. *Journal of Food Science and Technology*, *54*(7). <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2629>
- León, D. I., Méndez, D. S., Rodríguez, D. P., Puente, L., García, F. I., & Salgado, R. (2012). Análisis bromatológico y aislamiento de microorganismos con potencial probiótico del pulque. *INVESTIGACIÓN UNIVERSITARIA MULTIDISCIPLINARIA*, *11*, 115–122.
- Leroy, F., & de Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, *15*(2), 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- Leska, A., Nowak, A., & Motyl, I. (2022). Isolation and Some Basic Characteristics of Lactic Acid Bacteria from Honeybee (*Apis mellifera* L.) Environment—A Preliminary Study. *Agriculture*, *12*(10), 1562. <https://doi.org/10.3390/agriculture12101562>
- Mokoena, M., Mutanda, T., & Olaniran, A. (2016). Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. *Food & Nutrition Research*, *60*. <https://doi.org/10.3402/fnr.v60.29630>
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules*, *22*(8), 1255–1268. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Monroy, K. E. (2007). Propiedades funcionales de los principales quesos elaborados en el valle de Tulancingo (Tesis de grado). Recuperado de <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/1617/Propiedades%20funcionales%20de%20los%20principales%20quesos%20elaborados%20en%20el%20valle%20de%20Tulancingo%20Hidalgo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura & Organización Mundial de la Salud. (2002). *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. FAO/WHO Working Group.
- Palacios, S. (2006). Caracterización microbiológica de diversos tipos de quesos elaborados en el valle de Tulancingo Hidalgo (Tesis de grado). Recuperado de <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/507/Caracterizacion%20microbiologica%20de%20quesos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Palanivelu, J., Thanigaivel, S., Vickram, S., Dey, N., Mihaylova, D., & Desseva, I. (2022). Probiotics in Functional Foods: Survival Assessment and Approaches for Improved Viability. *Applied Sciences*, *12*(1), 455. <https://doi.org/10.3390/app12010455>
- Pérez, B., & Cardoso, G. (2020). Traditional fermented beverages in Mexico: Biotechnological, nutritional, and functional approaches. *Food Research International*, *136*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109307>
- Prescott, L., Harley, M., & Klein, D. A. (2002). *Microbiology* (5.a ed., Vol. 1). Nueva York, Estados Unidos de América: McGraw-Hill College.
- Ramírez, C., & Vélez, J. F. (2016). Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *Información tecnológica*, *27*(6), 115–128. <https://doi.org/10.4067/s0718-07642016000600012>
- Ramírez, N., Torres, C., Martínez, G., De la Rosa, O., Almanza, A., Alvarez, B., Araujo, R., Rodríguez, L., Londoño, L., & Ventura, J. (2019). *Fermented Beverages: Traditional Fermented Beverages in Mexico* (1.a ed., Vol. 5). Woodhead Publishing.
- Rivas, C. (2014). *Desarrollo del perfil sensorial del pulque, Muestras: Tradicionales y experimentales* [Tesis de grado]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rizo, J., Guillen, D., Díaz, G., Wachter, C., Encarnación, S., Sánchez, S., & Rodríguez, R. (2021). Metaproteomic Insights Into the Microbial Community in Pozol. *Frontiers in Nutrition*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.714814>
- Rodríguez, A., & Villalva, B. (2010). *Estudio del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol* [Tesis de grado]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Romero, H. E., Hernández, H., & Dávila, G. (2017). Traditional fermented beverages from Mexico as a potential probiotic source. *Annals of Microbiology*, *67*(9), 577–586. <https://doi.org/10.1007/s13213-017-1290-2>

- Sanlier, N., Gokcen, B., & Ceyhun, A. (2017). Health Benefits of Fermented Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(3). <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1383355>
- Santos, E. M., González, C., Jaime, I., & Rovira, J. (1998). Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of 'chorizo'. *International Journal of Food Microbiology*, 39. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(97\)00128-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(97)00128-1)
- Sbodio, O. A., & Revelli, G. R. (2012). Coagulación de la leche. Desarrollo de un dispositivo para el "monitoreo" online del proceso. *Avances en la Argentina. Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 38(3), 236–246.
- Silva, C. C. G., Silva, S. P. M., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>
- Šušković, J., Kos, B., Beganovic, J., & Pavunc, A. (2010). Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3).
- Velázquez, A., Covatzin, D., Toledo, M. D., & Vela, G. (2018). Bebida fermentada elaborada con bacterias ácido lácticas aisladas del pozol tradicional chiapaneco. *CienciaUAT*, 13(1), 165–178. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i1.871>
- Vélez, J., Gutiérrez, L., & Montoya, O. (2015). Molecular identification and evaluation of the probiotic ability of lactic acid bacteria from sow colostrum. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 10(2), 141-149. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321443145007>
- Villegas, A., Cervantes, F., Cesín, A., Espinoza, A., & Hernández, A. (2014). *Atlas de los quesos mexicanos genuinos* (1.a ed., Vol. 1). Colegio de postgraduados.
- Villegas, A., Santos, A., & Cervantes, F. (2016). *Los quesos mexicanos tradicionales* (1.a ed., Vol. 1). Juan Pablos Editor.
- Wacher, C. (2014). La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. *Revista digital universitaria*, 15(8). Recuperado de <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art64/#>
- Wacher, C., Cañas, A., Bárzana, E., Lappe, P., Ulloa, M., & Owens, J. (2000). Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*, 17(3), 251–256. <https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0310>
- Walstra, P., Jenness, R., & Badings, H. T. (1987). *Química y Física lactológica* (1.a ed., Vol. 1). Zaragoza, España: Acribia.
- Zapašnik, A., Sokołowska, B., & Bryla, M. (2022). Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Safety. *Foods*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/foods11091283>
- Zago, M., Fornasari, M., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., & Reinheimer, J. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.009>