



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

ADICIÓN DE EXTRACTO DE CÁLIZ ACRESCENTE DE  
*Physalis ixocarpa* PARA AUMENTAR LA VIDA DE ANAQUEL  
DEL PULQUE

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

DANIEL DURÁN SEGURA

DIRIGIDA POR

Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2024.

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ADICIÓN DE EXTRACTO DE CÁLIZ ACRESCENTE DE  
*Physalis ixocarpa* PARA AUMENTAR LA VIDA DE ANAQUEL  
DEL PULQUE”

**TESIS INDIVIDUAL**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

DANIEL DURÁN SEGURA

DIRIGIDA POR

Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA

SINODALES

Dra. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA  
DIRECTOR

---

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ  
SINODAL

---

Dr. ALDO AMARO REYES  
SINODAL

---

Dra. ELVIA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ  
SINODAL

---

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
RESUMEN .....	1
Introducción.....	2
1. Antecedentes .....	1
1.1 Pulque .....	1
1.1.1 Bacterias ácido lácticas (BAL) .....	3
1.1.2 <i>Zymomonas mobilis</i> .....	4
1.1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	5
1.1.4 Métodos de conservación de pulque .....	6
1.2.1 Fisalinas.....	9
1.2.2 Microencapsulación de antimicrobianos.....	11
2. Hipótesis .....	12
3. Objetivos.....	13
3.1 General.....	13
3.2 Específicos.....	13
4. Metodología.....	14
4.1 Materiales.....	14
4.2 Métodos.....	14
4.2.1 Acondicionamiento de materia prima.....	14
4.2.2 Extracción de fisalinas .....	14
4.2.3 Microencapsulación de fisalinas .....	15
4.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de fisalinas.....	15
4.2.6 Caracterización del pulque.....	16
4.2.6.1 Adición de fisalinas en pulque .....	16
4.2.6.2 Acidez .....	16
4.2.6.3 Viscosidad .....	17
4.2.6.4 Espectroscopia Infrarroja .....	17

4.3 Análisis estadístico .....	17
5. Resultados y Discusión de resultados.....	18
5.1 Caracterización de fisalinas.....	18
5.1.1 Identificación de fisalinas.....	18
5.1.2 Actividad antimicrobiana fisalinas libres y encapsuladas.....	19
5.2 Actividad antimicrobiana .....	20
5.3 Caracterización del pulque.....	24
5.3.1 Acidez.....	24
5.3.2 Viscosidad .....	25
5.3.3 Espectroscopía infrarroja.....	27
6. Conclusiones.....	29
7. Referencias .....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Magüey pulquero ( <i>Agave salmiana</i> ). A) con brote floral, B) sin brote floral	2
2	Vía Entner-Duodoroff para el catabolismo anaeróbico y aeróbico de glucosa de bacterias Gram-negativas.	5
3	Partes anatómicas del tomate verde	8
4	Estructura química de las fisalinas tipo 1 (a) y tipo 2 (b)	9
5	HPLC de extracto de fisalinas	18
6	Actividad antimicrobiana de fisalinas libres (L) y fisalinas encapsuladas (E) ante <i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , y <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	19
7	Cinéticas de crecimiento. A) <i>Zymomonas mobilis</i> , B) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , C) <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	21
8	Parámetros cinéticos de <i>Zymomonas mobilis</i> . A) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) B) Tiempo de duplicación (TD).	21
9	Parámetros cinéticos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . A) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) B) Tiempo de duplicación (TD)	22
10	Parámetros cinéticos de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> . A) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) B) Tiempo de duplicación (TD)	23
11	Acidez de muestras de pulque a diferente tiempo de almacenamiento	24
12	Viscosidad de muestras de pulque a diferente tiempo de almacenamiento	26
13	Espectrograma IR de muestras de pulque con Fisalinas y sin Fisalinas (Control) a diferentes tiempos de almacenamiento	28

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Comparación de los métodos de conservación utilizados en pulque	7
2	Actividad antimicrobiana de fisalinas	10

## RESUMEN

El pulque es una bebida fermentada tradicional mexicana que se obtiene a través de la planta *Agave salmiana*; con características como el color blanco y textura viscosa esta bebida ha sido de gran interés debido a la cantidad de microorganismos responsables de la fermentación y sabor. La producción de pulque consta de 4 etapas principales, castración, raspado de aguamiel, colocación del inóculo y fermentación. Este proceso no se lleva bajo un control riguroso por lo que el tiempo de vida de anaquel del pulque es alrededor de 3 días. Aunque se han estudiado diferentes métodos para lograr extender el tiempo de vida de anaquel del pulque, estos siempre afectan algunas propiedades organolépticas. Las fisalinas extraídas de *Physalis ixocarpa* (tomate verde) han demostrado tener la capacidad de inhibir el crecimiento de algunas bacterias y levaduras. El objetivo del presente trabajo fue obtener fisalinas de *Physalis ixocarpa* mediante un extracto etanólico y adicionarlas al pulque para aumentar su vida de anaquel. Se hicieron pruebas microbiológicas para determinar la concentración mínima inhibitoria de fisalinas para disminuir el crecimiento de *Leuconostoc mesenteroides*, *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Se adicionaron fisalinas en el pulque para aumentar su vida de anaquel, los parámetros a evaluar fueron la viscosidad la cual se determinó usando reómetro, así como la actividad antimicrobiana de las fisalinas en pulque, encontrando que la concentración óptima de microencapsulado para lograr el efecto bacteriostático adecuado fue 3.5% actuando alrededor de 15 días y comportamiento de la concentración de alcohol determinado por HPLC.



## Introducción

El pulque, una bebida tradicional mexicana obtenida de la fermentación del aguamiel de diversas especies de agave (*Agave atrovirens*, *Agave mapisaga* y *Agave salmiana*), destaca por sus cualidades nutricionales y su rol en la cultura mexicana. No obstante, el pulque enfrenta desafíos significativos en términos de conservación y vida de anaquel debido a su alta carga microbiana, la cual afecta rápidamente su sabor, acidez y estabilidad, lo que limita su tiempo de consumo a menos de tres días.

Los intentos de conservar el pulque han incluido métodos térmicos como la pasteurización, la termosonicación, así como la aplicación de antioxidantes y conservadores; sin embargo, estas técnicas a menudo afectan las propiedades organolépticas y probióticas de la bebida. En este contexto, surge el interés por explorar compuestos naturales, como las fisalinas, que podrían ofrecer una alternativa innovadora para extender su vida de anaquel sin comprometer su calidad sensorial.

Las fisalinas son compuestos con un núcleo esteroide, lo que les confiere una estructura que permite ajustes en el perfil de polaridad mediante modificaciones en sus grupos funcionales. Estos atributos las convierten en candidatos prometedores como conservadores naturales. Se ha demostrado que las fisalinas poseen propiedades antimicrobianas y antioxidantes, lo cual sugiere que podrían inhibir la proliferación de bacterias y levaduras no deseadas en el pulque, contribuyendo a mantener sus características sensoriales y microbiológicas durante más tiempo. Además, su aplicación podría preservar las propiedades probióticas del pulque, ya que no implica procesos de alta temperatura que afecten la viabilidad de microorganismos benéficos.

Las fisalinas como conservador natural en el pulque representan una estrategia viable para prolongar su frescura y estabilidad. Esto no solo beneficiaría la conservación de una bebida tradicional, sino que también brindará nuevas oportunidades para su comercialización en mercados más amplios y con mayor tiempo de almacenamiento.

Una de las fuentes más importantes de fisalinas es cáliz acrescente *de Physalis ixocarpa*, por lo que los residuos del consumo de tomate verde como fuente de fisalinas para aplicaciones en la conservación de alimentos, como el pulque, representa una alternativa natural y sostenible.

## 1. Antecedentes

### 1.1 Pulque

El pulque, denominado así por su término en Náhuatl *polihqui* que significa “corromperse o destruirse” es una bebida alcohólica tradicional y emblemática mexicana, obtenida de la fermentación del aguamiel (Contreras y Rodríguez, 2007; de la Rosa y col., 2019). El aguamiel se obtiene de plantas sexualmente maduras de especies específicas de *Agave* como *Agave atrovirens*, *Agave mapisaga* y *Agave salmiana* (Rocha-Arriaga y col., 2020). En México, los principales estados productores de agave para pulque son Hidalgo (60 %), Estado México (19 %) y Puebla (12 %) (Figueredo-Urbina y col., 2021).

El pulque es una bebida que presenta una graduación alcohólica entre 4 y 7 % v/v no destilada, esta bebida se caracteriza por poseer un aroma herbal, consistencia líquida viscosa de color blanco, con un valor de pH entre 3.5 y 4.2 (García-Arce y Castro-Muñoz, 2021). Se ha reportado que es una fuente importante de proteínas (6 %), vitaminas (riboflavina 24 %; tiamina 10 %, niacina 23 %; y vitamina C 48 %), minerales como hierro no asociado con hemoglobina (51 %) y calcio (8 %) (Alcántara-Zavala y col., 2021).

En la actualidad, la producción de agave se ha reducido significativamente, esto a causa de restricciones económicas y sociales de las regiones pulqueras, el cambio de uso de tierra, la longevidad del ciclo biológico del agave (más de 5 años) y la disminución del consumo de pulque (Álvarez-Duarte y col., 2018). La producción de pulque mostró dos picos máximos de producción en 1987 con aproximadamente 550 millones de litros, producidos en el Estado de México y en el 2013 con una producción aproximada de 504 millones de litros, producidos en Hidalgo. En el 2019 se reportó una producción de 171 millones litros, lo cual representa una disminución del 66 % de los picos máximos de producción presentados en 1987 y 2013 (Valdivieso Solís y col., 2021).

Aunado a la situación socioeconómica, el pulque al ser elaborado mediante un proceso no controlado tiene una vida de anaquel no mayor a tres días, esto debido a que la alta carga microbiana presente en la bebida, después de este tiempo genera una modificación en pH, contenido alcohol y acidez del producto generando cambios en sabor, olor y color del producto final, siendo estos rechazados por el consumidor (Alcántara-Zavala y col., 2019).

El proceso de elaboración de pulque consiste en cuatro etapas, castración, raspado y extracción de aguamiel, preparación de inóculo y fermentación. El principal objetivo de la castración es evitar el brote floral (Figura 1), ya que, si esto sucede, la planta nunca producirá aguamiel, sin embargo, si esta se realiza a una temprana edad del maguey se obtendrá bajo volumen de producción y mala calidad de aguamiel. En la segunda etapa, se raspa la pared del cajete, ubicado en el corazón de la planta, para inducir la salida de la savia, este proceso se lleva a cabo durante 3-6 meses, realizando el raspado de la planta dos veces al día, con la finalidad de evitar contaminación y brindar un ambiente aséptico, posteriormente la cavidad se sella con hojas de maguey (Escalante y col.,2016; Villarreal-Morales y col.,2019).



Figura 1. Maguey pulquero (*Agave salmiana*). A) con brote floral, B) sin brote floral.

La preparación de inóculo consiste en la adición de una proporción de pulque ya fermentado al aguamiel, lo cual dará paso a una fermentación, dicho proceso se lleva

a cabo aproximadamente de 1 a 4 semanas. El proceso de fermentación del pulque inicia con la degradación de azúcares (sacarosa, fructosa, glucosa y fructooligosacáridos) presentes en el aguamiel, el cual tiene un pH inicial de 6. El aguamiel se coloca en un tinacal que contiene una pequeña cantidad de pulque fermentado (inóculo) disminuyendo así el pH a 4.5 (Escalante y col., 2012). La fermentación del pulque es un proceso no controlado y sin destilación posterior (Escalante y col., 2016; Villarreal-Morales y col., 2018).

Estudios han reportado que la fermentación del pulque se lleva a cabo por microorganismos autóctonos de la savia de agave, siendo estos principalmente *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Saccharomyces cerevisiae* (Kuligowski y col., 2019; Rocha-Arriaga y col., 2020).

#### 1.1.1 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son bacterias Gram positivas reconocidas como las principales productoras de ácido láctico a nivel industrial. El rendimiento y producción de ácido láctico producido, depende de condiciones como pH, temperatura, nutrientes y la cepa bacteriana que se utilice (Abedi y Hashemi, 2020).

Son indispensables en la fermentación del pulque, es por ello que a nivel industrial se utilizan para mejorar sabor, textura, así como modificar la acidez en el pulque (Parra-Huertas, 2015). Estas bacterias juegan roles claves en el proceso de fermentación de los alimentos, algunas con capacidad de inhibir a otros microorganismos para evitar descomposición o cambio de propiedades del producto (Ramos Gorbeña y Agurto Sáenz, 2017).

Algunos estudios reportan que la principal BAL presente en el pulque es *Leuconostoc mesenteroides* (Escalante y col., 2004). Es una bacteria heterofermentativa obligada, es decir, utiliza únicamente la ruta metabólica dependiente de fosfoacetolasa para procesar azúcares y ácido láctico y producir ácido acético y etanol. *L. mesenteroides* se caracteriza por no presentar la enzima fructosa 1,6- difosfato aldolasa, la cual

participa en la oxidación de glucosa para obtener ácido láctico mediante la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), además, en medios con sacarosa como fuente de carbono produce dextrano (Gorbeña y Sáenz, 2008; Soetaert y col., 1995). El género *Leuconostoc spp* se caracteriza por ser Gram positivo, anaerobio facultativo, catalasa negativo y heterofermentativo, con una temperatura óptima de crecimiento de entre 20 a 35 °C (Díaz-Montes, 2023). Además, se ha demostrado la propiedad probiótica de las BAL extraídas de muestras de pulque, indicando un gran beneficio para la salud, demostrando ser de gran ayuda en enfermedades inflamatorias en intestino y diarrea (Pérez-Armendáriz y Cardoso-Ugarte, 2020).

Durante la fermentación del pulque, *L. mesenteroides* confiere la viscosidad característica, ya que durante el proceso metabólico acidifica la savia utilizando sacarosa, produciendo CO<sub>2</sub> polisacáridos extracelulares responsables de la viscosidad, como los dextranos (Álvarez-Ríos y col., 2020).

#### 1.1.2 *Zymomonas mobilis*

*Zymomonas mobilis* es una bacteria etanológena Gram negativa, anaerobia facultativa y no esporulante que metaboliza el azúcar a través de la vía Entner-Doudoroff (ED) junto con las enzimas clave piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa para la producción de etanol, fermenta un mol de glucosa en 2 moles de etanol, 2 mol de CO<sub>2</sub> y algunos ácidos orgánicos (Xia y col., 2019). En medios ricos en glucosa, *Z. mobilis* además de etanol, produce glicerol, succinato, acetato, lactato, acetoína y butanodiol (Baratti y Bu'lock, 1986). Por otra parte, es capaz de producir varios ácidos orgánicos utilizando como sustrato mezclas de fructosa y algunas aldosas, siendo una alternativa a la glucosa (Valle, 2013).

La vía de ED (Figura 2) utiliza un 50 % de ATP menos en relación con la vía EMP en la fermentación, además en comparación a otros microorganismos tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* tiene un área de superficie celular específica alta y consume glucosa más rápido, lo que lleva a una mayor producción de etanol (Yang y col., 2016).

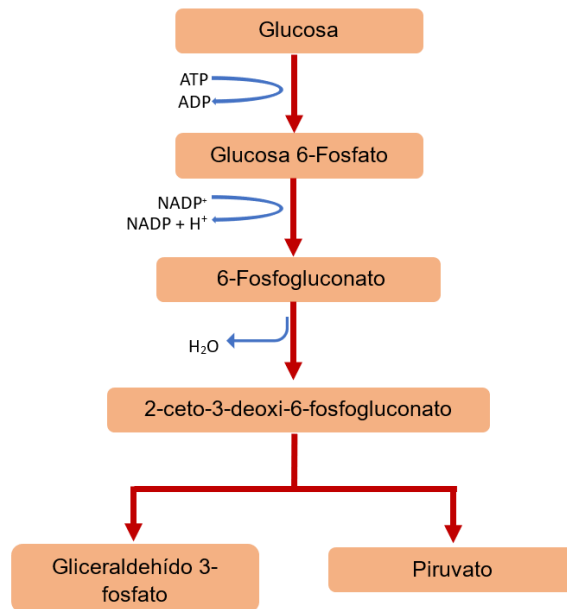


Figura 2. Vía Entner-Duodoroff para el catabolismo anaeróbico y aeróbico de glucosa de bacterias Gram-negativas (Elbeshbishy, 2014).

### 1.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras realizan el proceso de fermentación para obtener energía convirtiendo el azúcar en alcohol. Las levaduras son microorganismos eucariotas; su reproducción es principalmente por gemación y se caracterizan por su alta capacidad de fermentar un alto espectro de azúcares. Muchos de los procesos fermentativos como es el caso de vinos, cervezas o sidras se realizan con *S. cerevisiae*, por ser la más disponible a nivel comercial (Maicas, 2020).

*Saccharomyces cerevisiae* es una levadura única, fácil de cultivar, con un tiempo de duplicación entre 1.25 y 2 h a 30 °C, lo cual permite una rápida producción y mantenimiento a bajo costo, es por esto que *S. cerevisiae* es considerada la más utilizada por el hombre para la producción de etanol a través de la fermentación de glucosa (Stewart, 2014; Suárez-Machín y col., 2016). La resistencia a la concentración de alcohol etílico de *S. cerevisiae* varía de un 8 a 12 % (v/v) y sobrevive a concentraciones de alrededor del 15 %, esto es de suma importancia debido a que

la mayoría de las fermentaciones llegan a alcanzar concentraciones de aproximadamente 12 % de etanol (Stewart, 2014). *S. cerevisiae* es altamente utilizada ya que aprovecha una gran variedad de sustratos para fermentar, produciendo altos niveles de alcohol, sustancias no tóxicas y compuestos importantes para el sabor, como ésteres y fenoles (Álvarez-Ríos y col., 2020).

#### 1.1.4 Métodos de conservación de pulque

Debido a la carga microbiana contenida en el pulque, este tiene una vida de anaquel de menos de 3 días, estudios han demostrado, que transcurrido este tiempo la bebida se vuelve muy ácida, amarga y no recomendada para consumo (Alcántara-Zavala y col., 2019).

Se han realizado varios estudios con la finalidad de aumentar la vida de anaquel del pulque (Cuadro 1). Los tratamientos térmicos han sido de los métodos más utilizados en la conservación de alimentos, ya que proporcionan un producto seguro para el consumo y con una alta eficiencia en la eliminación de microorganismos patógenos (Rodríguez-Salinas y col., 2021). Sin embargo, en la conservación de pulque este tipo de tratamientos al alcanzar temperaturas mayores a 80 °C afecta las propiedades organolépticas del producto.

Otros métodos tales como la pasteurización y la aplicación de sustancias como antioxidantes o conservadores se han utilizado para extender la vida de anaquel del pulque, pero este tipo de procesos afectan de manera directa a la producción de ácido láctico, afectando en gran medida el sabor y la calidad del producto (Alcántara-Zavala y col., 2019).

Rodríguez-Salinas y col., (2021) han aplicado la termosonicación como método de conservación del pulque, esta técnica combina ultrasonido con calor, afectando la pared celular de las bacterias y favoreciendo la inactivación de enzimas. Este proceso ha logrado aumentar la vida de anaquel de esta bebida durante 24 días (T= 4° C), conservando gran parte de las propiedades organolépticas. Otro método



utilizado en la conservación de este producto es la filtración y esterilización, las cuales han brindado estabilidad y una mayor vida de anaquel. Sin embargo, reduce de manera significativa su carácter probiótico (Escalante y col., 2012).

La congelación es otro método aplicado para conservar el pulque, el cual ha mostrado una disminución de velocidad de crecimiento de bacterias. Sin embargo, microorganismos psicrófilos y algunos otros logran adaptarse a estas condiciones (Arroyo Cruz y Reynoso Ocampo, 2017).

Cuadro 1. Comparación de los métodos de conservación utilizados en pulque

Método	Vida de anaquel	Referencias
Pasteurización	12 días	(Alcántara-Zavala y col., 2019b)
Termosonicación	24 días (4°C)	(Alcántara-Zavala y col., 2021)

### 1.2 Tomate (*Physalis ixocarpa*)

El tomate verde (*Physalis ixocarpa*) es un fruto originario de México y Guatemala, su nombre proviene del náhuatl tomatl que significa “objeto gordo”. El tomate se caracteriza por su forma redonda, color verde, textura suave, además de poseer un cáliz que sirve como cubierta del fruto (Figura 3) llamado cáliz acrescente (González-Pérez y Guerrero-Beltrán, 2021).

El tomate verde contiene 54.22 % de azúcares (reductores 25.26 % y no reductores 28.96 %), 12.75 % de proteína bruta, 1.29 % de pectina, 5.98 % de cenizas, además de minerales tales como Ca (113.58 ppm), Mg (317.04 ppm), Na (1106.62 ppm), y K (6034.01 ppm). Debido a su alto contenido de humedad se considera un alimento

perecedero, se caracteriza por poseer un sabor dulce de carácter ácido y alto valor nutritivo (Abou-Farrag y col., 2013).

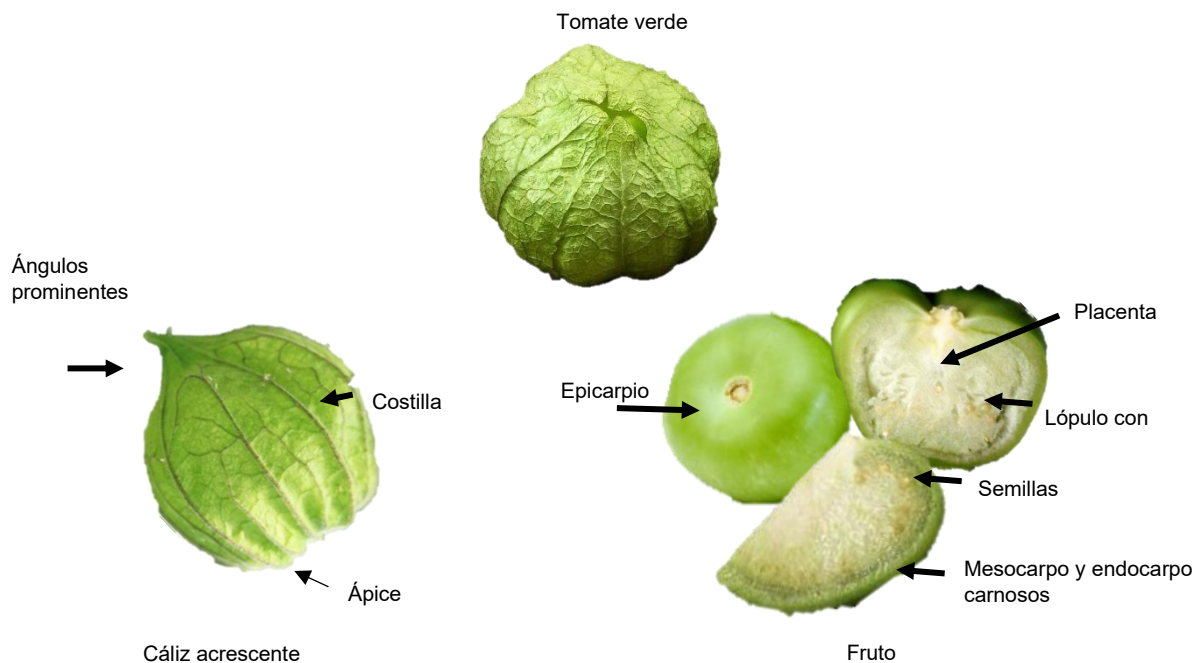


Figura 3. Partes anatómicas del tomate verde

Es una fuente de vitaminas (tiamina, riboflavina, vitamina B3, entre otras) antioxidantes (antocianinas, compuestos fenólicos, flavonoides y taninos),  $\beta$ -caroteno y luteína en bajas concentraciones (González-Pérez y Guerrero-Beltrán, 2021a). Por otra parte, la planta contiene una gran cantidad de compuestos volátiles, tales como,  $\beta$ -pineno, decanal, alcohol bencílico,  $\beta$ -elemeno, linolenato de etilo salicilato de metilo,  $\beta$ -cariofileno, germacreno D, linolenato de metilo y ácido hexadecanoico (Calyecac-Cortero y col., 2007).

Estudios (Silva y col., 2005, Helvacı y col., 2010) han demostrado que las especies de *Physalis* tienen actividad antibacteriana, antitumorales, inmunomoduladoras y antipiréticas. El fruto del tomate verde crece dentro de un cáliz que protege al fruto, este cáliz es capaz de sintetizar compuestos repelentes y antioxidantes, a pesar de

que los compuestos presentes en el cáliz son considerados fitoquímicos, este es considerado un desecho agroalimentario (Guerrero-Romero y col., 2021).

### 1.2.1 Fisalinas

Uno de los metabolitos secundarios principales presentes en el tomate verde es el 16,24-ciclo-13,14 secoesteroide llamado fisalina (Helvacı y col., 2010). Un secoesteroide que posee una estructura similar a los esteroides excepto que 2 átomos pertenecientes al anillo B, en específico los átomos de carbono C-9 y C-10 no están unidos (Figura 4) (Stites y col., 2018).

Las fisalinas son pseudo-esteroides aislados de *Physalis* spp., poseen actividad inmunosupresora, inhiben el crecimiento de células, tienen actividad citotóxica ante ciertas células patógenas como Hep G2 (Hepatoma humano), K562 (leucemia mieloide crónica) (Zavala y col., 2013). De igual manera se conoce que las fisalinas J y B tienen actividad citotóxica contra células HL-60 (células de leucemia promielocítica humana) y ciertas líneas celulares tumorales (Wu y col., 2021). Tienen un potente supresor para inhibir la proliferación de linfocito e inhiben la producción de citocinas proinflamatorias (Puente y col., 2011). Se ha reportado que el extracto crudo del cáliz acrescente del tomate verde contiene fisalinas, la cual posee actividad antimicrobiana ante *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, bacterias ácido lácticas entre otras (Cuadro 2) (Helvacı y col., 2010; Silva y col., 2005).

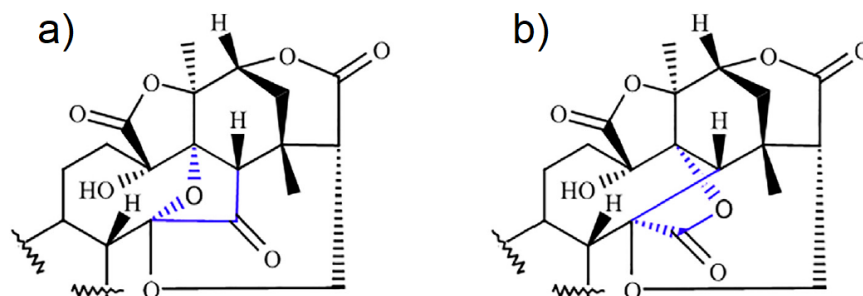


Figura 4. Diferencia entre las fisalinas tipo 1 (a) y tipo 2 (b). (Meira et al., 2022)

Existe una amplia cantidad de tipos de fisalinas, las diferencias radican en las diferentes posiciones de grupos hidroxilo y puentes formados. Estos secosteroides tienen una desconexión del C-13 y C-14 dando origen a un anillo de ocho o nueve carbonos. Por lo general poseen un puente de oxígeno acoplado al C-14 y C-27. De acuerdo a los enlaces formados en torno al C-14 las fisalinas pueden ser divididas en fisalinas de tipo I (C-14 unido a C-17 mediante un puente de oxígeno) y tipo II (C-14 unido a C-16, mientras que la esterificación de C-15 con C-18 forma lactona) (Wu y col., 2021). Un ejemplo de similitud está en la fisalina D, la cual contiene una estructura similar a la B, teniendo los 2 un puente de oxígeno C-14/C-25 y dobles enlaces en los C-2 y C-3, ambas tienen actividad citotóxica, pero actúan de manera diferente dependiendo a la concentración que se coloque (Januário y col., 2002).

Cuadro 2. Actividad antimicrobiana de fisalinas

Microorganismo	Tipo de fisalina	Concentración mínima inhibitoria (µg/mL)	Referencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	D	32	Helvací y col., (2010)
<i>Escherichia coli</i>		256	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		512	
<i>Candida albicans</i>		512	
<i>Staphylococcus aureus</i>	B	200	Silva y col., (2005)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	B	32	Januário y col., (2002)
	F	32	
	D	32	
<i>Leishmaniasis amazonensis</i>	B	2	Guimarães y col., (2009)
	F	2	

### 1.2.2 Microencapsulación de antimicrobianos

La microencapsulación es el proceso por el cual diminutas partículas de algún material de interés son recubiertas con una película polimérica. Un importante paso en el proceso de microencapsulación es la selección del material adecuado, ya que debe ser químicamente compatible, no reactivos con el componente a microencapsular y proporcionar características de recubrimiento e impermeabilidad (Bansode y col., 2010). Algunos de los materiales utilizados son lípidos, polisacáridos (almidón), algunos extractos de plantas y proteínas, ya que estos poseen la facilidad de formar macropartículas (Rodríguez y col., 2016). El almidón modificado ha sido ampliamente utilizado para la microencapsulación gracias a sus grandes propiedades físico químicas, tales como la reducción de tensión superficial, estabilización molecular y prevención de fenómenos como la floculación o coalescencia (Thanh Blicharz y col., 2012).

La descomposición de los alimentos siempre ha presentado un problema a nivel financiero en las industrias alimenticias. La preservación de estos es un gran reto para este tipo de industrias, algunas han optado por preservantes de origen químico pero algunos consumidores presentan reacciones alérgicas por lo que se ha generado un incremento en la demanda de alimentos libres de preservantes químicos (Castro-Rosas y col, 2017). La microencapsulación de antimicrobianos de origen natural ha sido un método ampliamente utilizado por las industrias cosméticas, farmacéuticas y de alimentos, ya que protege compuestos bioactivos de interés de la inactivación provocada por el entorno (Maresca y col., 2016). Se ha microencapsulado diferentes compuestos extraídos del género *Physalis*, como la *Physalis peruviana* con propósitos de evaluar y caracterizar las microcápsulas obtenidas y aplicarlas sobre diferentes bacterias (Espinoza, 2018)

## 2. Hipótesis

La adición de microencapsulado de extracto del cáliz acrecente de *Physalis ixocarpa*, debido a la liberación controlada de compuestos bioactivos como las fisalinas, ejerce un efecto bacteriostático sobre los principales microorganismos fermentadores en el pulque (*Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*). Estas intervienen en los procesos metabólicos y de replicación de las bacterias y levaduras, permitiendo así la conservación de las propiedades físico-químicas del pulque y mejorando la estabilidad del producto durante su almacenamiento. Esto beneficiaría tanto a los productores, al reducir pérdidas por deterioro, como a los consumidores, al ofrecer un producto de calidad durante un período de tiempo más prolongado.

### 3. Objetivos

#### 3.1 General

Evaluar el efecto de la adición de extracto proveniente del cáliz acrescente de *Physalis ixocarpa* en el pulque para aumentar su vida de anaquel.

#### 3.2 Específicos

- Extraer fisalinas provenientes del cáliz acrescente de *Physalis ixocarpa* para su uso como agente antimicrobiano.
- Evaluar la concentración mínima inhibitoria de las fisalinas libres y microencapsuladas ante *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* para determinar la concentración funcional de microencapsulado.
- Evaluar la efectividad de la actividad antimicrobiana de la microencapsulación del extracto de *Physalis ixocarpa* proveniente del cáliz acrescente.
- Determinar la viscosidad del pulque con y sin efecto de la adición de fisalinas.
- Determinar la vida de anaquel del pulque mediante la evaluación de la actividad antimicrobiana y cambios en la viscosidad del pulque, con la adición de fisalinas.

## 4. Metodología

### 4.1 Materiales

Cáliz acrescente de tomate (*Physalis ixocarpa*) proporcionado por locatarios del mercado de Aculco de Espinoza, Estado de México observando textura firme y coloración brillante. Almidón modificado (octenil succinato sódico E1450, Ingredion, San Juan del Río, Querétaro), glucosa (Meyer, Ciudad de México, México), extracto de levadura, peptona de caseína, citrato de sodio (todos de Merk, San Luis Misuri, EUA), sacarosa cristal (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA) y agar bacteriológico (Becton Dickinson, New Jersey, EUA). *L. mesenteroides* MCDO523 y *S. cerevisiae* P530 proporcionados por el Laboratorio de Biotecnología en Alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro; *Z. mobilis* donado por el Dr. José Adelfo Escalante Lozada del Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Morelos. Todos almacenados en solución leche en polvo entera-glicerol 1:1 al -70 °C. El pulque fue proporcionado por la comunidad de Texcatepec, Chilcuautla, Hidalgo.

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Acondicionamiento de materia prima

El cáliz acrescente de tomate se secó en un horno (Felisa FE-293) durante 48 h a 4 °C. Una vez seco el material, se realizó una molienda utilizando un molino de café (Krupps Epices GX4100, Alemania) y se redujo el tamaño de partícula a través de un tamiz #40 (Advantech, Taipéi, Taiwán) para lograr un tamaño de partícula de 0.420 mm.

#### 4.2.2 Extracción de fisalinas

La extracción de fisalinas se realizó de acuerdo con Huang y col. (2014) con modificaciones. Se colocó 8 g del cáliz de tomate pulverizado y se adicionó 200 mL de etanol 96° % (v/v), se mezcló en un plato caliente (Yellow MAG HS7, Staufen, Alemania) con agitador durante 1 h y se distribuyó en tubos cónicos de centrifuga con 40 mL cada uno, se sonicó (Ultrasonicador Br ansonic 5510R-DTH, San Luis, Misuri, EUA) durante 45 minutos a temperatura ambiente. La solución se centrifugó



(Eppendorf 5810R, Hamburgo, Alemania) a 10,000 rpm durante 10 minutos. Se decantó el sobrenadante, posteriormente se eliminó el etanol utilizando un evaporador rotatorio (Büchi, Flawil, Suiza) a condiciones de vacío y 39 °C. La caracterización de las fisalinas se realizó mediante HPLC (HPLC1260, Agilent, Santa Clara, California, EUA), con una columna de 150 mm x 4.6 mm x 5 µm (ECLIPSEXDB C18, Agilent, Santa Clara, California, EUA), una fase estacionaria C18 no polar, como fase móvil se utilizó acetonitrilo y ácido fosfórico 0.2% en agua. Gradiente de 20-23% de acetonitrilo de 0-13 min, 23-31% de acetonitrilo de 13-37 min, luego 31-23% de 37-42 min y finalmente 23-20% de 42-45 min. Se utilizó un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> flujo y un volumen de inyección de 20 µL.

#### 4.2.3 Microencapsulación de fisalinas

La microencapsulación de las fisalinas se realizó siguiendo lo propuesto por Hernández-Hernández y col. (2014) con algunas modificaciones. Se elaboró una solución de almidón (28.6 % p/p) y se calentó a 50 °C con agitación toda la noche. Se adicionó las fisalinas en la solución de almidón en una proporción (10 % v/v). Se realizó un secado por aspersión (Büchi B290, Flawil, Suiza) con una temperatura de entrada de 190 °C y una temperatura de salida de 100 °C. El producto se recolectó en un envase hermético y se almacenó a temperatura ambiente.

#### 4.2.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de fisalinas

La actividad antimicrobiana de fisalinas libres y microencapsulado al 3.5% se evaluó ante *Saccharomyces cerevisiae*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Zymomonas mobilis* utilizando como medios de cultivo Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) (20 g L<sup>-1</sup> de peptona, 20 g L<sup>-1</sup> de glucosa y 10 g L<sup>-1</sup> de levadura), Mayeux (10 g L<sup>-1</sup> de peptona, 5 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura, 100 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 1 g L<sup>-1</sup> de citrato de sodio y 5 g L<sup>-1</sup> de glucosa) y medio para *Zymomonas* (20 g L<sup>-1</sup> de glucosa, 10 g L<sup>-1</sup> de peptona y 10 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura) respectivamente, para las pruebas en cultivo sólido se utilizó 1.5 % de agar bacteriológico. Para la identificación de las fases de crecimiento de cada uno de los microorganismos, se realizó curvas de crecimiento midiendo la densidad óptica a 600 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis

(Thermoscientific genesys 10s UV-Vis, EUA), para ello se colocó inóculos con  $10^6$  UFC/mL y se registró la absorbancia a 600 nm cada hora, se utilizó el medio de cada microorganismo sin inóculo como blanco, las lecturas se realizaron cada hora hasta la fase estacionaria (Abdollahzadeh y col., 2021). Utilizando inóculos en fase logarítmica ( $10^6$  UFC/mL) se determinó la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) determinando crecimiento celular mediante densidad óptica a 600 nm, al igual que el tiempo de duplicación (Td) y velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), aplicando el modelo de Monod (Olivares-Marin y col., 2018), utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, California, EUA). Las concentraciones de fisalina libre y microencapsulado que evaluaron en la actividad antimicrobiana fueron de 2.5 ,3 y 3.5 %.

#### 4.2.6 Caracterización del pulque

La caracterización se realizó en muestras de pulque a las 24, 48 y 72 h de fermentación con y sin la adición de las fisalinas libres y encapsuladas.

##### 4.2.6.1 Adición de fisalinas en pulque

Las fisalinas se adicionaron de acuerdo con la concentración mínima inhibitoria obtenida en las pruebas de actividad antimicrobiana. Para ello se obtuvieron 2 muestras, en la primera, la adición de fisalinas se realizó una vez extraído el aguamiel, para la segunda muestra, las fisalinas se agregaron después del segundo día de fermentación. La vida de anaquel se evaluó a los 2, 5 ,10, 15 y 24 días, reportando únicamente los días 5, 10 y 15 los cuales presentaron mayor diferencia.

##### 4.2.6.2 Acidez

La acidez del pulque se determinó por el método AOAC 942.15. Se pesaron 20 g de pulque y se llevó a un volumen de 100 mL con agua destilada y se adicionó 2 gotas de fenolftaleína como indicador. La muestra se tituló con NaOH 0.1 M, la acidez se calculó mediante la Ecuación 1.

$$\% \text{ Acidez } \frac{g_{\text{ácido láctico}}}{100 \text{ ml}} = \frac{V_{\text{NaOH}} * N * P_{\text{eq ácido láctico}}}{A} \quad (1)$$

donde  $V_{\text{NaOH}}$  es el gasto utilizado de NaOH, N es la normalidad del NaOH,  $P_{\text{eq}}$  es el miliequivalente del ácido láctico (0.090) y A es la alícuota tomada de la muestra.

#### 4.2.6.3 Viscosidad

La viscosidad se determinó utilizando un viscosímetro rotatorio análogo NDJ-4 Luzeren (EUA). Las mediciones se realizaron depositando 45 mL de la muestra en un tubo cónico de 50 mL. Se utilizó una aguja #1 a 60 RPM, se dejó 1 min en rotación y se registraron los resultados tomando un coeficiente de 1.

Se determinó la velocidad de corte, el esfuerzo de corte y la viscosidad aparente, con el software TRIOS 4 ajustando las curvas de flujo al modelo de Casson (TA instruments, Delaware, EUA) (Ecuación 2):

$$\sigma_{1/2} = \sigma_0 + \eta_{1/2} \gamma_{1/2} \quad (2)$$

donde  $\sigma$  es el esfuerzo cortante (Pa),  $\sigma_0$  es el límite elástico (Pa),  $\gamma$  es la velocidad de corte ( $\text{s}^{-1}$ ) y  $\eta$  es la viscosidad aparente del fluido.

#### 4.2.6.4 Espectroscopia Infrarroja

Las muestras de pulque se evaluaron mediante espectroscopía IR (espectrofotómetro UV-Vis Thermoscientific genesys1 10 s, EUA) con la finalidad de evaluar los cambios en las muestras tratadas con fisalinas y las muestras sin tratamiento a diferentes tiempos de almacenamiento. Los espectros IR se realizaron entre 600 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  a una resolución de 1  $\text{cm}^{-1}$  Zeinalipour-Yazdi y Loizidou, 2021).

#### 4.3 Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como el promedio de las mediciones  $\pm$  la desviación estándar. Para ello todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado. La diferencia

significativa se determinó mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA) utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, California, EUA). Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de Tukey ( $p < 0.01$ ). Todas las pruebas se realizaron por triplicado y se reportaron con  $\pm$  desviación estándar.

## 5. Resultados y Discusión de resultados

### 5.1 Caracterización de fisalinas

#### 5.1.1 Identificación de fisalinas

En la Figura 5 se presenta el cromatograma obtenido del extracto obtenido de la extracción del cáliz acrescente de *Physalis ixocarpa*, donde se observan picos representativos de fisalinas en los tiempos de retención a 20.649 min (Fisalina A), 25.535 min (Fisalina D), 28.442 min (Fisalina H) y 32.611 min (Fisalina O) (Baoli, 2012; Zheng et al., 2012).

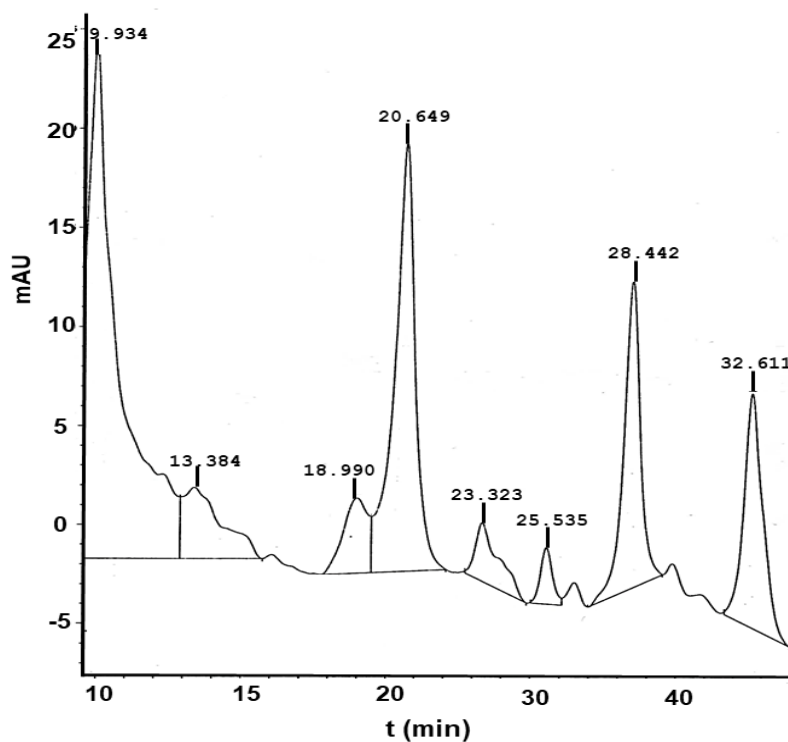


Figura 5. HPLC de extracto de fisalinas

### 5.1.2 Actividad antimicrobiana fisalinas libres y encapsuladas

En la Figura 6 se muestra el comparativo de la actividad antimicrobiana de las fisalinas libres y encapsuladas ante *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, y *Leuconostoc mesenteroides*. Se puede observar que las fisalinas encapsuladas mostraron una mayor actividad antimicrobiana ante los tres microorganismos. En el caso de las fisalinas libres, se presentó una menor inhibición en *S. cerevisiae*.

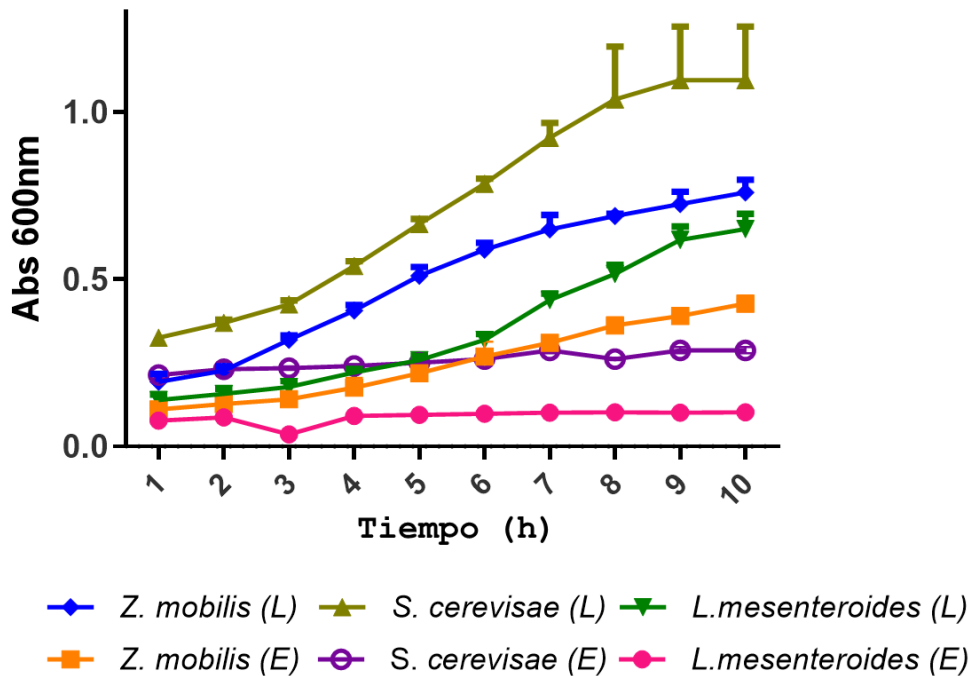


Figura 6. Actividad antimicrobiana de fisalinas libres (L) y fisalinas encapsuladas (E) ante *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, y *Leuconostoc mesenteroides*

La encapsulación de las fisalinas mejora su actividad antimicrobiana en comparación con las fisalinas libres, ya que la capa protectora las aísla de factores ambientales que podrían degradarlas, como la luz y el oxígeno. Esto permite una liberación controlada y prolongada, lo que extiende su efecto contra los microorganismos. Además, la encapsulación enmascara posibles características sensoriales

indeseables, permitiendo una integración más neutral en los alimentos. En conjunto, estas propiedades aumentan la estabilidad y eficacia antimicrobiana de las fisalinas, optimizando su uso en la preservación de alimentos (Eghbal et al., 2022).

## 5.2 Actividad antimicrobiana

Se evaluó la actividad antimicrobiana de las fisalinas microencapsuladas a diferentes concentraciones (2%, 3% y 3.5%) ante *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, y *Leuconostoc mesenteroides* (Figura 7). Se puede observar que la presencia de fisalinas disminuye el crecimiento de los tres microorganismos, presentando el mayor efecto bacteriostático en *L. mesenteroides* (Figura 7C) y las más resistente *Z. mobilis* (Figura 7A), mientras que con *S. cerevisiae* se presenta un efecto bacteriostático (Figura 7B).

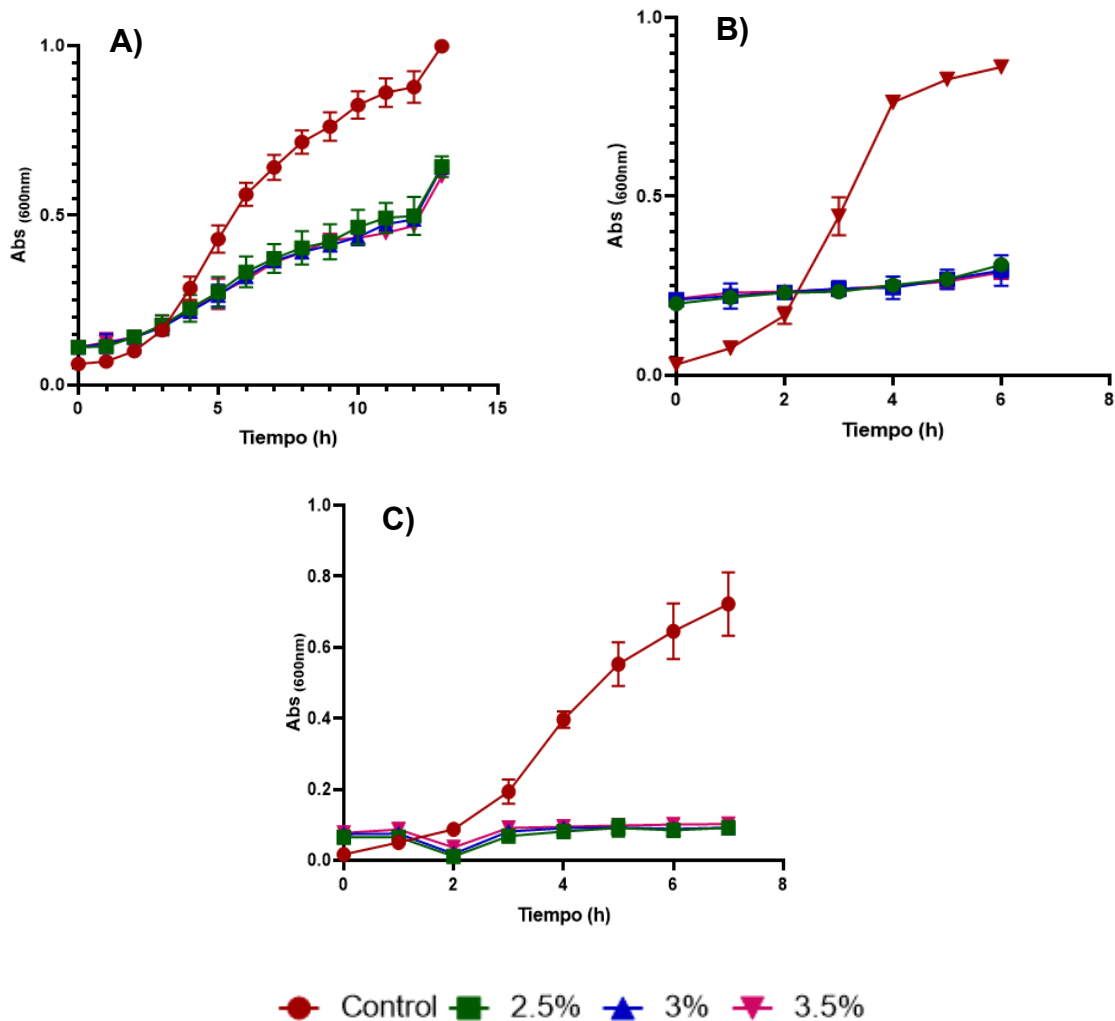


Figura 7. Cinéticas de crecimiento. A) *Zymomonas mobilis*, B) *Saccharomyces cerevisiae*, C) *Leuconostoc mesenteroides*

Helvacı y col. (2010b) reportaron resultados similares al evaluar la actividad antimicrobiana de la fisalina D, encontrando una mayor eficacia contra bacterias Gram positivas en comparación con las Gram negativas. Esta diferencia podría deberse a la membrana externa de las bacterias Gram negativas, compuesta por lipoproteínas, porinas y lipopolisacáridos, lo que las hace más resistentes a la acción de los antimicrobianos (MacDermott-Opeskin y col. , 2022).

En la Figura 8 se muestran los parámetros cinéticos de *Z. mobilis* en presencia de las fisalinas a tres concentraciones diferentes. Se puede observar que en presencia de fisalinas disminuye significativamente la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) (Figura 8A) en comparación al medio sin fisalinas, sin embargo, no se presenta diferencias significativas entre las diferentes concentraciones.

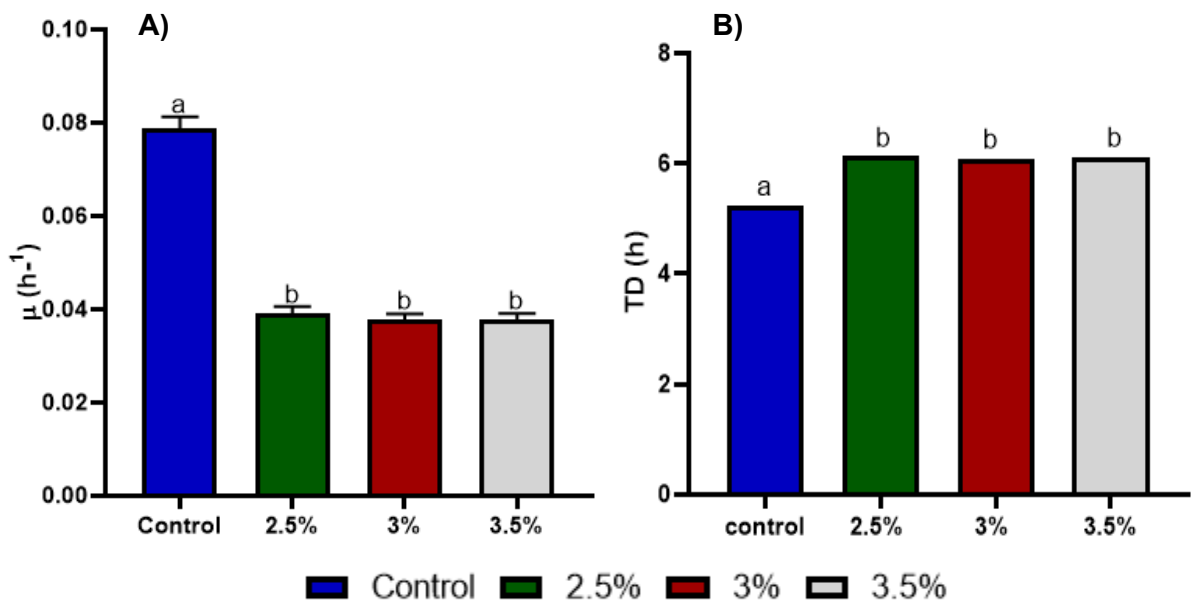


Figura 8. Parámetros cinéticos de *Zymomonas mobilis*. A) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) B) Tiempo de duplicación (TD).

El tiempo de duplicación (TD) de *Z. mobilis* aumentó significativamente en presencia de las fisalinas (Figura 8B). Este efecto sobre los parámetros cinéticos de la bacteria podría deberse a la estructura lipófila y polioxifuncional de las fisalinas. Su naturaleza lipofílica podría permitirles integrarse en la membrana de *Z. mobilis*, alterando así la estructura de la membrana celular y afectando el crecimiento de la bacteria (Januário y col. , 2002b).

En la Figura 9, se puede observar el efecto de las fisalinas en los parámetros cinéticos de *S. cerevisiae*. La velocidad específica de crecimiento disminuyó significativamente en presencia de las fisalinas, sin embargo, no presenta diferencia a las diferentes de fisalinas utilizadas (Figura 9A). En cuanto el tiempo de duplicación se observa que este se duplicó con la concentración de 2.5 % y llegó a triplicar el tiempo con la concentración de 3.5%, mostrando diferencia significativa entre las diferentes concentraciones (Figura 9 B).

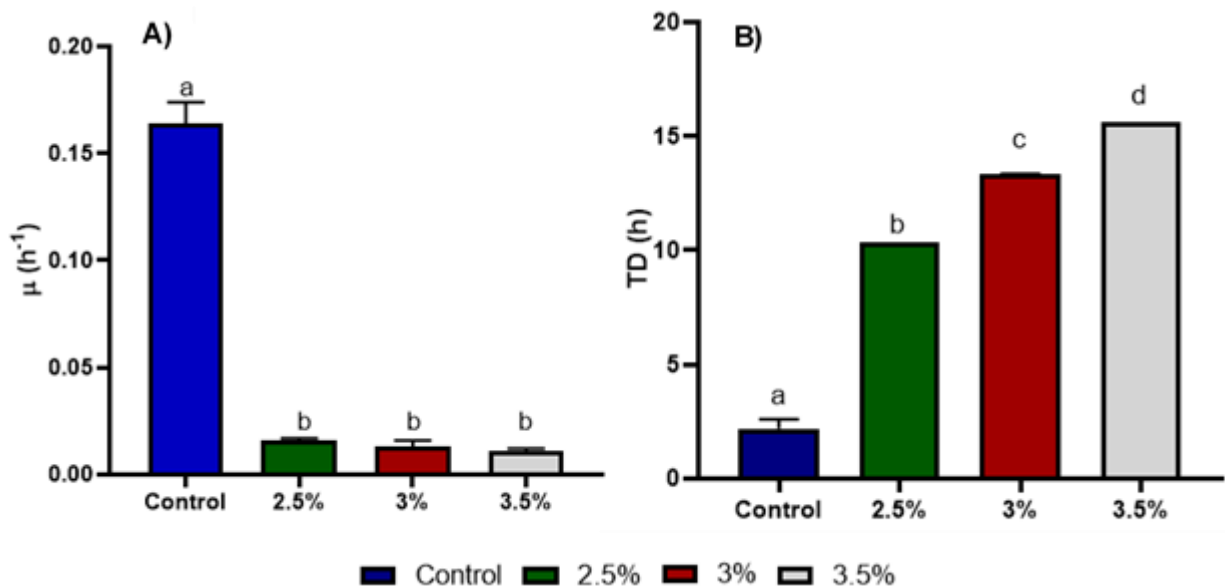


Figura 9. Parámetros cinéticos de *Saccharomyces cerevisiae*. A) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) B) Tiempo de duplicación (TD).



Torabzadeh y Panahi, (2013) reportaron que las fisalinas tienen un efecto antifúngico de espectro limitado. En su estudio, observaron que se requieren concentraciones mayores para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras. A las concentraciones que inhibían el crecimiento bacteriano, se observó un efecto fungistático, con los hongos mostrando una mayor resistencia.

En la Figura 10 se presentan los parámetros cinéticos de *L. mesenteroides*. Se observa que, en presencia de las fisalinas, la velocidad específica disminuye significativamente (Figura 10A) y el tiempo de duplicación aumenta (Figura 10B). Este efecto es más pronunciado en *L. mesenteroides* en comparación con *Z. mobilis* y *S. cerevisiae*. Según lo reportado por Wu y col. , (2021), el impacto antimicrobiano de las fisalinas varía según su estructura y tipo. Por lo tanto, para futuros estudios será crucial identificar el tipo específico de fisalina utilizada y evaluar de manera más precisa su efecto sobre los diferentes microorganismos

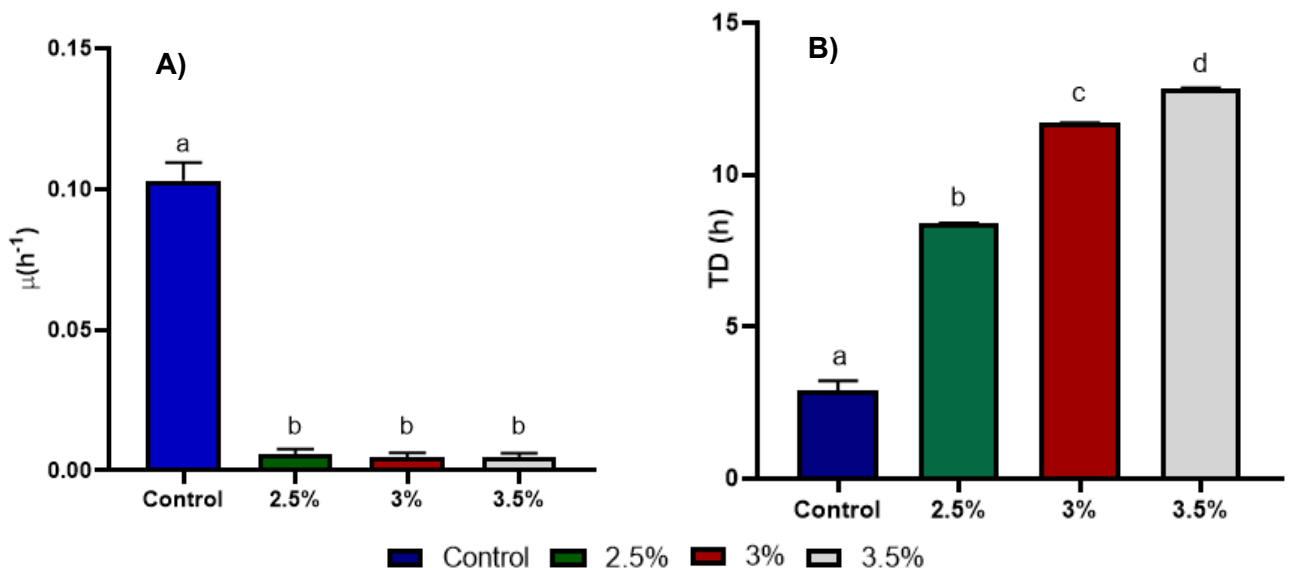


Figura 10. Parámetros cinéticos de *Leuconostoc mesenteroides*. A) Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) B) Tiempo de duplicación (TD).

### 5.3 Caracterización del pulque

La caracterización del pulque se llevó a cabo en muestras con fisalinas al 3.5% y muestras sin fisalinas (control) a diferentes tiempos de almacenamiento (0, 5, 10 y 15 días), todas las muestras se obtuvieron de tres diferentes magueyes.

#### 5.3.1 Acidez

Se evaluó el efecto de las fisalinas microencapsuladas en el pulque durante diferentes tiempos de almacenamiento, utilizando como control pulque sin fisalinas. En la Figura 11 se puede observar que la acidez del pulque aumenta a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento. La adición de fisalinas resulta en una disminución significativa de la acidez en comparación con la muestra de pulque sin fisalinas.

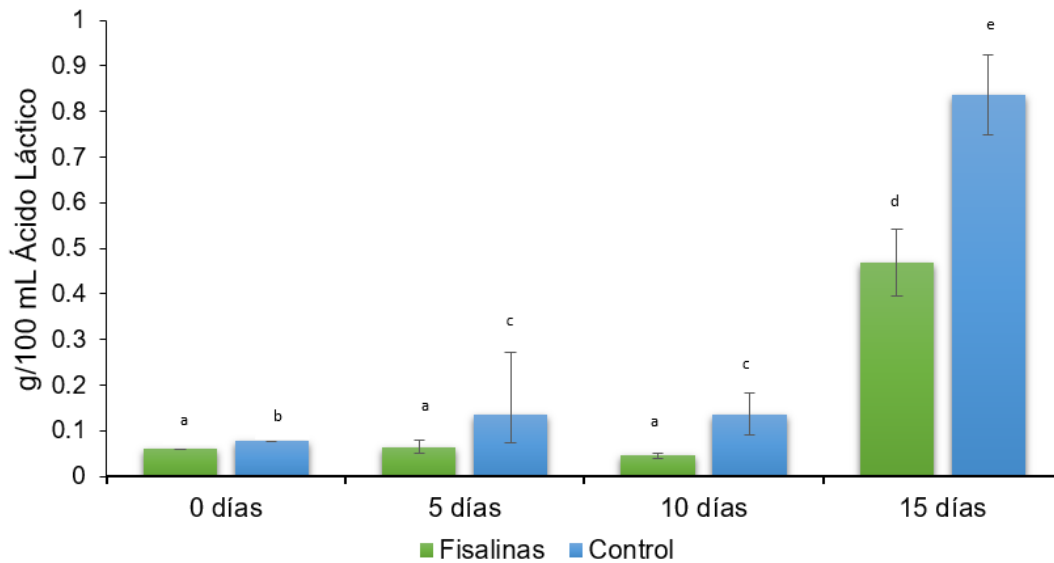


Figura 11. Acidez de muestras de pulque a diferente tiempo de almacenamiento. Columnas con letras iguales no presentan diferencia significativa  $p < 0.05$

El aumento de la acidez del pulque durante el almacenamiento se debe a la actividad de las bacterias ácido lácticas, las cuales al consumir la glucosa generan ácido láctico (Álvarez-Ríos y col. , 2020). Las fisalinas reducen el crecimiento de los microorganismos principales responsables de la fermentación del pulque, por lo que la acidez del pulque en las muestras tratadas con fisalinas es menor. Sin embargo,

al no inhibir completamente el crecimiento microbiano, el pulque tratado también llega a acidificarse, esto puede deberse a la resistencia y crecimiento presentado por cierto tipo de lactobacillus con características diferentes a *L. mesenteroides* presentes en el pulque, tal como *Lactobacillus acidophilus*, siendo este uno de los microorganismos esenciales para la fermentación del pulque. Siendo la principal diferencia que mientras los Lactobacillus son bacterias probióticas y Leuconostoc son un género encargada únicamente de la producción de ácido láctico (Ballesteros-Rodríguez & Sánchez-Teyer, 2021), ya que al ser las dos bacterias gram positivas no poseen diferencia significativa en las paredes celulares.

De acuerdo con el Reglamento para el Control Sanitario del Pulque (*DOF - Diario Oficial de la Federación, s/f*), para que un pulque sea considerado apto para el consumo público, debe tener una acidez total (en ácido láctico) de 400-700 mg/100 mL. Se puede observar que el pulque sin fisalinas, a los 15 días de almacenamiento, ya no cumple con esta regulación, mientras que el pulque con fisalinas presenta una acidez de 450 mg/100 mL, siendo apto para el consumo público según este parámetro.

### 5.3.2 Viscosidad

En la Figura 12 se presentan los resultados de la viscosidad de las muestras de pulque con y sin fisalinas a diferentes tiempos de almacenamiento. Generalmente, la viscosidad del pulque está asociada con la actividad de *L. mesenteroides*. Sin embargo, las cinéticas de crecimiento muestran que las fisalinas tienen una mayor actividad antimicrobiana frente a *L. mesenteroides*. Por lo tanto, se esperaría que las muestras con fisalinas tuvieran una menor viscosidad en comparación con las muestras control. No obstante, se observa que las muestras con fisalinas presentan una mayor viscosidad. Durante el almacenamiento, la viscosidad disminuyó en comparación con la muestra inicial del día cero.

Este aumento en la viscosidad de las muestras con fisalinas podría estar relacionado con la estructura de las fisalinas y su interacción con los microorganismos presentes.

Aunque las fisalinas afectan el crecimiento de *L. mesenteroides*, su impacto en *Z. mobilis* es menos pronunciado. *Z. mobilis* es conocido por contribuir a la viscosidad del pulque mediante la producción de levansacarasa, una enzima que sintetiza levano, un polímero de fructosa de alto peso molecular que incrementa la viscosidad (Escalante y col. , 2012). La presencia y actividad de *Z. mobilis* en las muestras con fisalinas podrían estar favorecidas por la estructura única de estas moléculas. Las fisalinas, con su núcleo esteroide grande y rígido combinado con grupos funcionales derivatizables, podrían interactuar de manera que potencien la producción de levano o modifiquen la viscosidad de manera diferente. Esta interacción entre la estructura de las fisalinas microencapsuladas y los componentes microbianos podría explicar el aumento observado en la viscosidad de las muestras con fisalinas, a pesar de su efecto antimicrobiano sobre *L. mesenteroides* (Svobodová y col. , 2012). Otro factor a considerar en el aumento de la viscosidad es el almidón modificado utilizado para la microencapsulación, el cual tiene la capacidad de enlazar moléculas de agua y aumentar la organización estructural (Vega-Mejía, 2024).

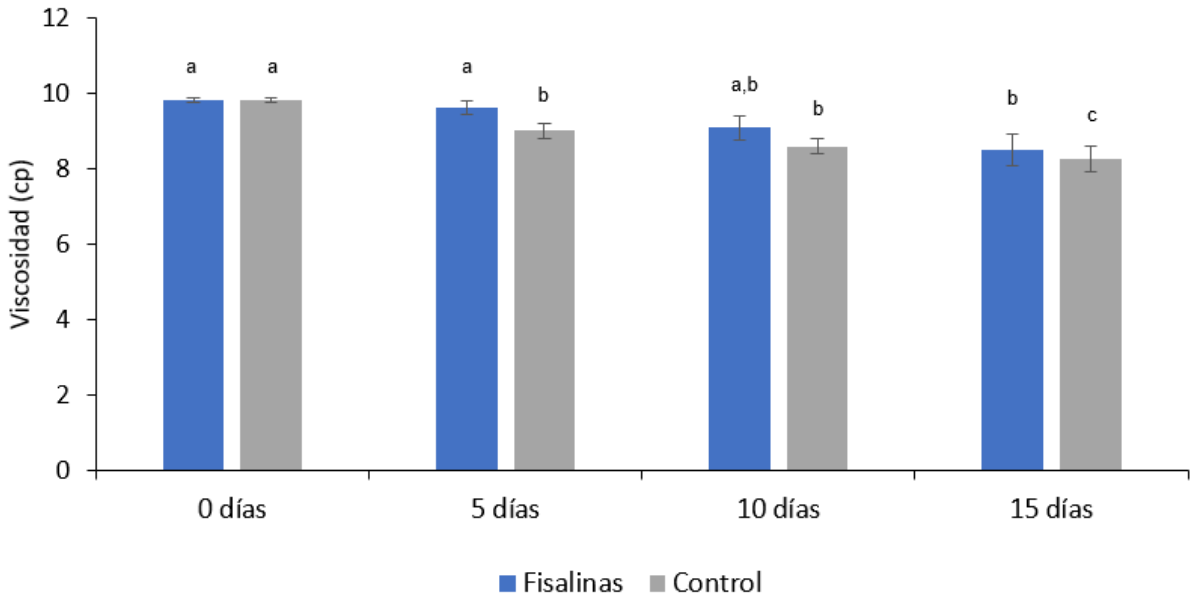


Figura 12. Viscosidad de muestras de pulque a diferente tiempo de almacenamiento. Columnas con letras iguales no presentan diferencia significativa  $p < 0.05$

### 5.3.3 Espectroscopía infrarroja

En la Figura 13 se muestra el espectrograma de las muestras de pulque tratadas con fisalinas microencapsuladas y sin tratamiento. Se puede observar que, a los 5 días, la muestra tratada con fisalinas presenta un espectro diferente en comparación con el resto de las muestras. La muestra tratada con fisalinas a los 5 días presenta señales a 1702, 1570 y 1042  $\text{cm}^{-1}$ . La señal a 1042  $\text{cm}^{-1}$  podría atribuirse a grupos C-O-C, característicos de azúcares. Las señales a 1702  $\text{cm}^{-1}$  y 1570  $\text{cm}^{-1}$  son características de grupos carbonilo, lo que podría indicar la presencia de ácido láctico. En el resto de las muestras se observa una banda a 1637  $\text{cm}^{-1}$ , una región también característica de ácidos orgánicos, lo que sugiere la producción de ácido láctico en el resto de las muestras (Silverstein y col., 2005).

Los espectrogramas muestran señales a 3388.3  $\text{cm}^{-1}$  y 3211  $\text{cm}^{-1}$ , las cuales son características de los alcoholes y corresponden específicamente a vibraciones de estiramiento del enlace O-H. Cabe destacar que en esta región se observa una mayor formación de puentes de hidrógeno, lo que indica la presencia de alcoholes más concentrados. En la Figura 13, se observa que los picos de las muestras de pulque sin fisalinas a los 5 días presentan una intensidad similar a la de las muestras con mayor tiempo de almacenamiento. Por el contrario, en la muestra de 5 días tratada con fisalinas, estos picos tienen una intensidad menor, lo que indica un retraso en la producción de alcohol en comparación con el resto de las muestras. A pesar de que las fisalinas retardaron la fermentación, al finalizar el tiempo de almacenamiento, la intensidad de estos picos es similar en las muestras tratadas con fisalinas y en las muestras sin tratamiento (Ponce Peña y col., 2023).

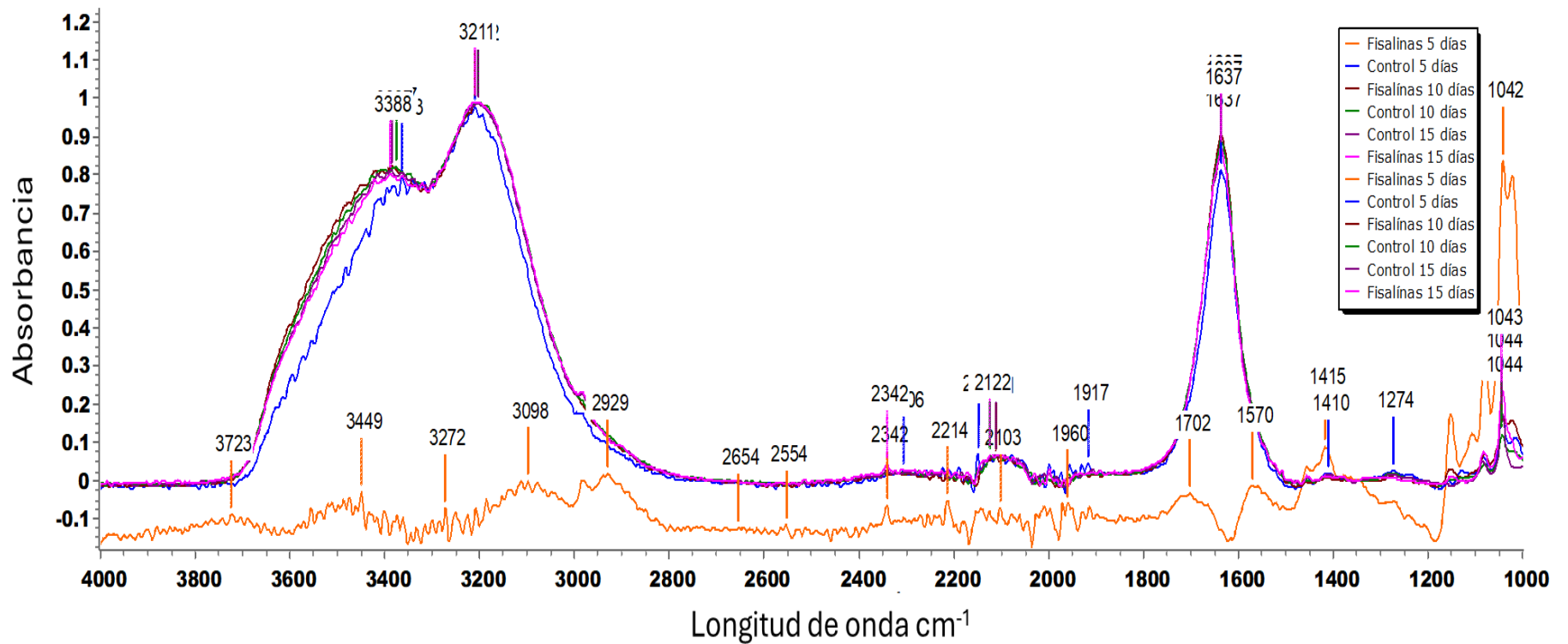


Figura 13. Espectrograma IR de muestras de pulque con Fisalinas y sin Fisalinas (Control) a diferentes tiempos de almacenamiento

## 5 Conclusiones

Las fisalinas encapsuladas mostraron una mayor actividad antimicrobiana en comparación con las fisalinas libres, lo que motivó su evaluación en la vida de anaquel del pulque. En función de los valores de acidez y porcentaje de alcohol, se observó que las muestras tratadas con fisalinas encapsuladas mantuvieron una estabilidad significativa hasta los 10 días de almacenamiento, mientras que la muestra control (sin fisalinas) mostró cambios considerables desde el día 5.

Estos resultados sugieren que las fisalinas tienen un efecto relevante en el crecimiento de microorganismos, la viscosidad y la vida de anaquel del pulque. Las fisalinas demostraron una eficaz acción antimicrobiana, especialmente contra *Leuconostoc mesenteroides*, y un menor efecto sobre *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Su capacidad para reducir la acidez se debe a la inhibición de microorganismos responsables de la fermentación, mientras que su estructura lipofílica y habilidad para interactuar con otros compuestos contribuyen a una mayor viscosidad en las muestras tratadas, lo que podría beneficiar la textura y consistencia del pulque durante el almacenamiento.

La reducción de la acidez y el incremento en la viscosidad favorecen la estabilidad del pulque, sugiriendo que las fisalinas podrían prolongar su vida de anaquel al mejorar su estabilidad y reducir la tasa de deterioro. La capacidad de las fisalinas para modificar la actividad microbiana, incrementar la viscosidad y estabilizar el producto durante el almacenamiento las posiciona como aditivos potencialmente valiosos para la industria del pulque, optimizando el proceso de fermentación y mejorando la durabilidad del producto final.

## 6 Referencias

**Abdollahzadeh**, E., Nematollahi, A., & Hosseini, H. Composition of antimicrobial edible films and methods for assessing their antimicrobial activity: A review. *Trends Food Sci*, (2021). 110, 291-303.

**Abedi**, E., & Hashemi, S. M. Lactic acid production, producing microorganisms and substrates sources: State of art. *Heliyon*, (2020). 6, 1-32.

**Abou-Farrag**, H., Abdel-Nabey, A., Abou-Gharbia, A., & Osman, A. Physicochemical and technological studies on husk tomato (*Physalis pruinose* L.). *Alex. Sci. Exch. J.*, (2013). 34, 204-221.

**Alcántara-Zavala**, A. E., Figueroa-Cárdenas, J. D., Morales-Sánchez, E., Aldrete-Tapia, J. A., Arvizu-Medrano, S. M., & Martínez-Flores, H. E. Application of ohmic heating to extend shelf life and retain the physicochemical, microbiological, and sensory properties of pulque. *Food Bioprod. Process.*, (2019). 118, 139-148.

**Alcántara-Zavala**, A. E., Figueroa-Cárdenas, J. de D., Morales-Sánchez, E., Aldrete-Tapia, J. A., Arvizu-Medrano, S. M., & Martínez-Flores, H. E. Application of ohmic heating to extend shelf life and retain the physicochemical, microbiological, and sensory properties of pulque. *Food and Bioproducts Processing*, (2019). 118, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.09.007>

**Alcántara-Zavala**, A. E., Figueroa-Cárdenas, J. de D., Pérez-Robles, J. F., Arámbula-Villa, G., & Miranda-Castilleja, D. E. Thermosonication as an alternative method for processing, extending the shelf life, and conserving the quality of pulque: A non-dairy Mexican fermented beverage. *Ultrasonics Sonochemistry*, (2021). 70,1-9, 105290. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105290>

**Alcántara-Zavala**, A. E., Figueroa-Cárdenas, J. de D., Pérez-Robles, J. F., Arámbula-Villa, G., & Miranda-Castilleja, D. E. Thermosonication as an alternative method for processing, extending the shelf life, and conserving the quality of pulque: A non-dairy



Mexican fermented beverage. *Ultrasonics Sonochemistry*, (2021). 70, 105290.  
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105290>

**Ballesteros-Rodríguez**, & Sánchez-Teyer. El Pulque: probiótico ancestral. *Elementos*, (2021). 3-6.  
<https://elementos.buap.mx/directus/storage/uploads/00000005785.pdf>

**Alvarado**, M., & Roitz, C. S. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , insulin resistance, lipoprotein metabolism, and obesity in humans. *DOAJ*, (2013). 27(6), 1751-1757.  
<https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6004>

**Álvarez-Duarte**, M. C., García-Moya, E., Suárez-Espinosa, J., Luna-Cavazos, M., & Rodríguez-Acosta, M. Conocimiento tradicional, cultivo y aprovechamiento del maguey pulquero en los municipios de Puebla y Tlaxcala. *Polibotánica*, (2018). 45, 205-222.

**Álvarez-Ríos**, G., Figueredo-Urbina, C. J., & Casas, A. Physical, chemical, and microbiological characteristics of pulque: Management of a fermented beverage in Michoacán, Mexico. *Foods*, (2020). 9, 361-378.

**AOAC942\_15.pdf**—37.1.37 AOAC Official Method 942.15 Acidity (Titratable) of Fruit Products First Action 1942 A. Indicator Method Final Action | Course Hero. (s/f). Recuperado el 5 de abril de 2022, disponible en:  
<https://www.coursehero.com/file/31995804/AOAC942-15pdf/>

**AOAC942\_15.pdf**—37.1.37 AOAC Official Method 942.15 Acidity (Titratable) of Fruit Products First Action 1942 A. Indicator Method Final Action | Course Hero. (s/f). Recuperado el 5 de abril de 2022, disponible en:  
<https://www.coursehero.com/file/31995804/AOAC942-15pdf/>

**Arroyo-Cruz**, C., & Reynoso-Ocampo, C. A Evaluación de temperaturas de congelación en la supervivencia de la microbiota del pulque. *Revista de Simulación y Laboratorio*. (2017). 4, 42-48.

**Bansode**, S. S., Banarjee, S. K., Gaikwad, D. D., Jadhav, S. L., & Thorat, R. M. Microencapsulation: A review. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 1, 38-43. Baratti JC, Bu'lock JD. *Zymomonas mobilis* a bacterium for ethanol production. Biotechnol. Adv. 1986; (2010). 4:95-115.

**Baoli Xu**. High-performance liquid chromatography (HPLC) determination of five active ingredients in the calyces of *Physalis Alkekengi* L. var. *Franchetii* (mast.) Mskino. Journal of Medicinal Plants Research, (2012). 6(12). <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1435>

**Calyecac-Cortero, H. G.**, Cibrián-Tovar, J., Soto-Hernández, M., García-Velasco, R., & Calyecac-Cortero, H. G. Aislamiento e identificación de volátiles de *Physalis philadelphica* LAM. Agrociencia, (2007). 41, 337-346.

**Castro-Ramos, J.** Raman spectroscopy and its applications. Óptica Pura y Aplicada, (2013). 46(1), 83-95. <https://doi.org/10.7149/opa.46.1.83>

**Castro-Rosas, J.**, Grosso, C. R. F., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Rodríguez-Marín, M. L., Guzmán-Ortiz, F. A., & Falfán-Cortés, R. N. Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food: A review. Food Research International, (2017). 102, 575-587. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.054>

**Cervantes Contreras, M. C. V.**, & Martínez, A. M. Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman. Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales, (2008). 21(1), 1-5. ISSN: 1665-3521

**Cinza-Sanjurjo, S.**, Cabarcos-Ortiz de Barrón, A., Castilla-Galicia, G., & Lorenzo-Zúñiga, V. Bacteriemia por *Leuconostoc* spp. en paciente sin factores de riesgo. Anales de Medicina Interna, (2006). 23, 77-79.

**Cobas, H. C.**, Pavoni, S., Rodríguez, F., Álvarez, E., & Contreras, R. Aplicación de la voltametría en el análisis del crecimiento microbiológico. Sociedad Cubana de Bioingeniería. (2007).1.

**Contreras**, M. C., & Rodríguez, M. P. El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *Nova*, (2007). 5, 135-146.

**D. Álvarez-Ríos**, G., Figueredo-Urbina, C. J., & Casas, A. Physical, Chemical, and Microbiological Characteristics of Pulque: Management of a Fermented Beverage in Michoacán, Mexico. *Foods*, (2020). 9(3), 361. <https://doi.org/10.3390/foods9030361>

**D. Álvarez-Ríos**, G., Figueredo-Urbina, C. J., & Casas, A. Physical, Chemical, and Microbiological Characteristics of Pulque: Management of a Fermented Beverage in Michoacán, Mexico. *Foods*, (2020). 9(3), 361. <https://doi.org/10.3390/foods9030361>

**De la Rosa**, O., Flores-Gallegos, A. C., Muñíz-Marquez, D., Nobre, C., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. Fructooligosaccharides production from agro-wastes as alternative low-cost source. *Trends Food Sci*, (2019). 91, 139-146.

**Diario Oficial de la Federación**. (n.d.). Recuperado el 11 de abril de 2022, de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5594809&fecha=11%2f06%2f2020&msc\\_lkid=228fce7cba1c11ec86d857e7c3e065aa](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5594809&fecha=11%2f06%2f2020&msc_lkid=228fce7cba1c11ec86d857e7c3e065aa)

**Díaz-Montes**, E Efecto de  $\mu_{\text{máx}}$  de cepas *Leuconostoc mesenteroides* en fermentaciones simuladas. *PADI Boletín Científico de Ciencias Básicas E Ingenierías del ICBI*, 11(Especial) . (2023).76-82. <https://doi.org/10.29057/icbi.v11iespecial.10035>

**DOF** - Diario Oficial de la Federación. (s/f). Recuperado el 25 de julio de 2024, disponible en: [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4662203&fecha=18/06/1981#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4662203&fecha=18/06/1981#gsc.tab=0)

**DOF** - Diario Oficial de la Federación. (s/f). Recuperado el 25 de julio de 2024, disponible en: [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4662203&fecha=18/06/1981#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4662203&fecha=18/06/1981#gsc.tab=0)

**Eghbal**, N., Liao, W., Dumas, E., Azabou, S., Dantigny, P., & Gharsallaoui, A. Microencapsulation of Natural Food Antimicrobials: Methods and Applications. *Applied Sciences*, (2022). 12(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/app12083837>

**Elbeshbishy, E.** METABOLIC PATHWAYS | Release of Energy (Anaerobic). En Elsevier eBooks (2014). 588-601. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00198-1>

**Escalante, A., Giles-Gómez, M., Flores, G. E., Matus Acuña, V., Moreno-Terrazas, R., López-Munguía, A., & Lappe-Oliveras, and P.** - Pulque Fermentation. En Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology (2012). (2a ed.). CRC Press.

**Escalante, A., Giles-Gómez, M., Flores, G. E., Matus Acuña, V., Moreno-Terrazas, R., López-Munguía, A., & Lappe-Oliveras, and P.** - Pulque Fermentation. En Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology (2012). (2a ed.). CRC Press.

**Escalante, A., Giles-Gómez, M., Flores, G., Acuña, V., Moreno-Terrazas, R., López-Munguía, A., & Lappe-Oliveras, P.** Pulque fermentation. In Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology (2012). 2, pp. 691-706.

**Escalante, A., López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., & López-Munguía, A.** Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: Historical microbiological and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*, (2016). 7, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>

**Escalante, A., Rodríguez, M. E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G.** Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, (2004). 235(2), 273-279. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.04.045>

**Escamilla-García, M., Calderón-Domínguez, G., Chanona-Pérez, J. J., Mendoza-Madrigal, A. G., Di Pierro, P., García-Almendárez, B. E., Amaro-Reyes, A., & Regalado-González, C.** Physical structural barrier and antifungal characterization of chitosan zein edible films with added essential oils. *International Journal of Molecular Sciences*, (2017). 18(21). <https://doi.org/10.3390/ijms18102111>

**Escamilla-García, M., Ríos-Romo, R. A., Melgarejo-Mancilla, A., Díaz-Ramírez, M., Hernández-Hernández, H. M., Amaro-Reyes, A., Di Pierro, P., & Regalado-González, C.** Rheological and antimicrobial properties of chitosan and quinoa protein filmogenic suspensions with thyme and rosemary essential oils. *Foods*, (2020). 9(10). <https://doi.org/10.3390/foods9101458>

**Espinoza Silva, C. R.** Lactobacillus spp. microencapsulado en jugo de aguaymanto (*Physalis peruviana*) y maltodextrina como probiótico [Monografía en Internet]. Universidad Nacional de Frontera. (2018). Recuperado el 6 de mayo de 2022, disponible en: <http://repositorio.unf.edu.pe/handle/UNF/39>

**Esquivel-González, B., Martínez, L. O., & Rutiaga-Quiñones, O. M.** Microencapsulación mediante secado por aspersion de compuestos bioactivos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, (2015). 16(2), 180-192. <https://www.redalyc.org/pdf/813/81343176006.pdf>

**Figueredo-Urbina, C. J., Álvarez-Ríos, G. D., García-Montes, M. A., & Octavio-Aguilar, P.** Morphological and genetic diversity of traditional varieties of agave in Hidalgo State, Mexico. *PLOS ONE*, (2021). 16(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269480>

**Filella, X., & Molina,** REstructura y función de las citocinas. *Med Integral*, . (2002). 39(2), 63-71.

**Flores-Rodríguez, E., & Miranda-López,** RCaracterización fisicoquímica y sensorial del pulque producido en la zona sur del estado de Guanajuato. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, . (2023). 8(1), 363-368. <https://doi.org/10.29105/idcyta.v8i1.49>

**Gamero-Vega, G., Llanos, M. O., Bazalar-Palacios, J., Juárez, C. A., & Quitral, V.** Efectos terapéuticos del género *Physalis* L.: una revisión de la literatura. *Perspectivas en Nutrición Humana*, (2022). 24(2), 247-265. <https://doi.org/10.17533/udea.penh.v24n2a07>

**García-Arce**, Z. P., & Castro-Muñoz, R. Exploring the potentialities of the Mexican fermented beverage pulque. *Journal of Ethnic Foods*, (2021). 8, 35-39. <https://doi.org/10.1186/s42779-021-00108-1>

**González-Pérez**, J. E., & Guerrero-Beltrán, J. Á. Tomatillo or husk tomato *Physalis philadelphica* and *Physalis ixocarpa*: A review. *Scientia Horticulturae*, (2021). 288, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110303>

**Gorbeña**, J. C. R., & Sáenz, T. A. Bacterias ácido lácticas. *Biotempo*, (2008). 8, 54-64.

**Guerrero-Romero**, F., Simental-Mendía, L. E., Guerra Rosas, M. I., Sayago-Monreal, V. I., Morales Castro, J., & Gamboa-Gómez, C. I. Hypoglycemic and antioxidant effects of green tomato *Physalis ixocarpa* Brot. calyxes extracts. *Journal of Food Biochemistry*, (2021). 45(8), 1-12. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13612>

**Guevara**, J. J. L., Fuentes, J. M. L., Jiménez-González, O., & Guevara, L. L. Microencapsulación de algunos compuestos bioactivos mediante secado por aspersión / Microencapsulation of some bioactive compounds through spray drying. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, (2016). 5(10), 39. <https://doi.org/10.23913/ciba.v5i10.56>

**Guimarães**, E. T., Lima, M. S., Santos, L. A., Ribeiro, I. M., Tomassini, T. B., Ribeiro dos Santos, R., dos Santos, W. L. C., & Soares, M. B. P. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (2009). 64, 84-87. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp165>

**Guimarães**, E. T., Lima, M. S., Santos, L. A., Ribeiro, I. M., Tomassini, T. B. C., Ribeiro dos Santos, R., dos Santos, W. L. C., & Soares, M. B. P. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (2009). 64(1), 84–87. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp170>

**Guimarães**, E. T., Lima, M. S., Santos, L. A., Ribeiro, I. M., Tomassini, T. B. C., Ribeiro dos Santos, R., dos Santos, W. L. C., & Soares, M. B. P. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (2009). 64(1), 84–87. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp170>

**Gusakov**, A. V., Kondratyeva, E. G., & Sinitsyn, A. P. Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. *International Journal of Analytical Chemistry*, (2011). 1-8. <https://doi.org/10.1155/2011/963761>

**Helvacı**, S., Kökdil, G., Kawai, M., Duran, N., Duran, G., & Güvenç, A. Antimicrobial activity of the extracts and physalin D from *Physalis alkekengi* and evaluation of antioxidant potential of physalin D. *Pharmaceutical Biology*, (2010). 48(1), 142-150. <https://doi.org/10.3109/13880200903239447>

**Hernández**, A. H. (2016). *Microbiología industrial*. EUNED.

**Hernández-Hernández**, E., Regalado-González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., & García-Almendárez, B. E. Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of Mexican *Lippia graveolens* H.B.K. and European *Origanum vulgare* L. oregano essential oils. *The Scientific World Journal*, (2014). 1-12. <https://doi.org/10.1155/2014/896759>

**Hernández-Hernández**, E., Regalado-González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., & García-Almendárez, B. E. Microencapsulation, Chemical Characterization, and Antimicrobial Activity of Mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and European (*Origanum vulgare* L.) Oregano Essential Oils. *The Scientific World Journal*, (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/641814>

**Hernández-Hernández**, E., Regalado-González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., & García-Almendárez, B. E. (Microencapsulation, Chemical Characterization, and Antimicrobial Activity of Mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and

European (Origanum vulgare L.) Oregano Essential Oils. The Scientific World Journal, (2014). 641814. <https://doi.org/10.1155/2014/641814>

**Huang**, C., Xu, Q., Chen, C., Song, C., Xu, Y., Xiang, Y., Feng, Y., Ouyang, H., Zhang, Y., & Jiang, H. The rapid discovery and identification of physalins in the calyx of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* Makino using ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry together with a novel three-step data mining strategy. Journal of Chromatography, (2014). 1361, 139-152. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.09.026>

**Huertas**, R. A. P. Revisión: Microencapsulación de alimentos. Revista Facultad Nacional de Agronomía, (2010). 63(2), 5669-5684. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n2/a20v63n01.pdf>

**Januário**, A. H., Filho, E. R., Pietro, R. C. L. R., Kashima, S., Sato, D. N., & França, S. C. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). Phytotherapy Research, (2002). 16(5), 445-448. <https://doi.org/10.1002/ptr.1102>

**Januário**, A. H., Filho, E. R., Pietro, R. C. L. R., Kashima, S., Sato, D. N., & França, Kuligowski, M., López-Otero, R., Polanowska, K., Montet, D., Jasińska-Kuligowska, I., & Nowak, J. Influence of fermentation by different microflora consortia on pulque and pulque bread properties. Journal of the Science of Food and Agriculture . (2019). 99(15), 6307-6314. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9894>

**Lorenzo**, T. D., Gálvez, M. C., Torres, A. C., Martín, P. M., & Azahares, Y. S. Caracterización de la conservación de alimentos en diferentes instalaciones. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, (2005). 36, 65-77. <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181220525064.pdf>

**Luis**, G. M., Caballero, V. P., González, W. R., Díaz, L. R. D., & Hernández, J. J. M. (2019). Nutritional and medicinal value of pulque. DOAJ (Directory of Open Access Journals). <https://doi.org/10.19230/jonnpr.3148>



**MacDermott-Opeskin, H. I., Gupta, V., & O'Mara, M. L.** Lipid-mediated antimicrobial resistance: A phantom menace or a new hope? *Biophysical Reviews*, (2022). 14(1), 145–162. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00912-8>

**MacDermott-Opeskin, H. I., Gupta, V., & O'Mara, M. L.** Lipid-mediated antimicrobial resistance: A phantom menace or a new hope? *Biophysical Reviews*, (2022). 14(1), 145–162. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00912-8>

**Madigan, M. T. (2015).** Brock, biología de los microorganismos (14a ed.).

**Maicas, S.** The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, (2020). 8, 1-8.

**Mandell, E. B. G. L., Bennett, J. E., & Dolin, R.** Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier eBooks. (2015). <https://doi.org/10.1016/c2012-1-00075-6>

**Maresca, D., de Prisco, A., La Stora, A., Cirillo, T., Esposito, F., & Mauriello, G.** Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: Preliminary investigation. *Food Science and Technology*, (2016). 66, 436–443.

**Meira, C. S., Soares, J. W. C., Reis, B. P. Z. C. D., Pacheco, L. V., Santos, I. P., Silva, D. K. C., De Lacerda, J. C., Daltro, S. R. T., Guimarães, E. T., & Soares, M. B. P.** Therapeutic Applications of Physalins: Powerful Natural Weapons. *Frontiers In Pharmacology*, (2022). 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.864714>

**Mendoza, C. M., Cruz, E. I. R., & Jahuey, M. V.** Caracterización fisicoquímica, microbiológica y organoléptica del aguamiel y pulque del Alto Mezquital, Hidalgo. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo (En Línea)*, (2023). 19(4). <https://doi.org/10.22231/asyd.v19i4.1412>

**Miller, G. L.** Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, (1959). 31, 426-428.

**Nielsen, S. (2014).** Food analysis. Springer Science & Business Media.

**Ogunlana**, E. O., & Ramstad, E. Investigations into the antibacterial activities of local plants of Nigeria. *Planta Medica*, (1975). 27, 354-360.

**Parra-Huertas**, R. A. Digestión anaeróbica: Mecanismos biotecnológicos en el tratamiento de aguas residuales y su aplicación en la industria alimentaria. *Producción más Limpia*, (2015). 10, 142-159.

**Pérez-Armendáriz**, B., & Cardoso-Ugarte, G. A. Traditional fermented beverages in Mexico: Biotechnological, nutritional, and functional approaches. *Food Research International*, (2020). 136, 109307. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109307>

**Ponce Peña**, P. P. P. E., Escobedo, M. Á., & Gonzáles, M. A. (2023). Espectroscopía de infrarrojo: Análisis e interpretación de compuestos. Universidad Juárez del Estado de Durango.

**Puente**, L. A., Pinto-Muñoz, C. A., Castro, E. S., & Cortés, M. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International*, (2011). 44, 1733-1740.

**Puente-Garza**, C. A., Espinosa-Leal, C., & García-Lara, S. Steroidal saponin and flavonol content and antioxidant activity during sporophyte development of maguey (*Agave salmiana*). *Plant Foods for Human Nutrition*, (2018). 73(4), 287-294. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0684-z>

**Ramos-Gorbeña**, J. C., & Agurto-Sáenz, T. Bacterias ácido lácticas. *Biotempo*, (2017). 8, 54–64.

**Ray**, A. B., & Gupta, M. Withasteroids, a growing group of naturally occurring steroidal lactones. In W. Herz, G. W. Kirby, R. E. Moore, W. Steglich, & C. H. Tamm (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (1994). 2-13, 56-58. Springer-Verlag.

**Rios-Aguirre**, S., & Garzón, M. A. GMicroencapsulación por secado por aspersión de compuestos bioactivos en diversas matrices: Una revisión. *Tecno Lógicas*, . (2021). 24(51), e1836. <https://doi.org/10.22430/22565337.1836>

**Rocha-Arriaga, C., Espinal-Centeno, A., Martínez-Sánchez, S., Caballero-Pérez, J., Alcaraz, L. D., & Cruz-Ramírez, A.** Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a biocultural resource of Mexico. *Microbiological Research*, (2020). 241, 1-51.

**Rodríguez, R. Y. A., Rojas, G. A., & Rodríguez, B. S.** Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. *Biosalud*, (2016). 15, 106–115.

**Rodríguez, S. P., Urías-Orona, V., Muy-Rangel, D., Basilio-Heredia, J., Suarez-Jacobo, A., Báez-González, J. G., Zavala-García, F., & Niño-Medina, G.** Efecto de termosonicación y pasteurización sobre propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y nutraceuticas en bebidas de maíz. *Biotecnia*, (2021). 23, 92-101.

**Rodríguez, Y. A., Rojas, A. F., & Rodríguez-Barona, S.** Encapsulación de probióticos para aplicaciones alimenticias. *Revista Biosalud*, (2016). 15(2), 106-115. <https://doi.org/10.17151/biosa.2016.15.2.10>.

**S. C.** Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Phytotherapy Research: PTR*, (2002). 16(5), 445–448. <https://doi.org/10.1002/ptr.939>

**Salgado, E. R., & Arana, G. V.** Usos tradicionales, fitoquímica y farmacología de la bolsa mullaca (*Physalis angulata* L.). *Revista de Fitoterapia*, (2014). 14(1), 49-64. <https://busqueda.bvsalud.org/portal/resource/es/ibc-125883>

**Secretaría de Salud.** (1972). NMX-V-037-1972, Bebidas alcohólicas. Pulque. Especificaciones. Ciudad de México, México: D.O.F.

**Shu, Z., Xing, N., Wang, Q., Li, X., Xu, B., Li, Z., & Kuang, H.** Antibacterial and anti-inflammatory activities of *Physalis alkekengi* var. *Franchetii* and its main constituents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (2016). 1-10. <https://doi.org/10.1155/2016/4359394>

**Silva, M. T. G., Simas, S. M., Batista, T. G. F. M., Cardarelli, P., & Tomassini, T. C. B.** Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memórias do*

Instituto Oswaldo Cruz, (2005). 100(7), 779-782. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000700018>

**Silva**, M. T., Simas, S. M., Batista, T. G., Cardarelli, P., & Tomassini, T. C. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, (2005). 100, 779–782. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000700018>

**Silva**, M. T., Simas, S. M., Batista, T. G., Cardarelli, P., & Tomassini, T. C. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, (2005). 100, 779–782. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000700018>

**Silverstein**, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. Spectrometric identification of organic compounds. John Wiley & Sons. (2005).

**Soetaert**, W., Schwengers, D., Buchholz, K., & Vandamme, E. J. A wide range of carbohydrate modifications by a single micro-organism: *Leuconostoc mesenteroides*. Progress in Biotechnology, (1995). 10, 351-358.

**Stites**, R. E., MacKrell, J. G., & Stayrook, K. R. Nonsecosteroidal ligands and modulators of the vitamin D receptor. Vitamin D, (2018). 2, 615–627.

**Svobodová**, H., Noponen, V., Kolehmainen, E., & Sievänen, E. Recent advances in steroidal supramolecular gels. RSC Advances, (2012). 2(12), 4985–5007. <https://doi.org/10.1039/C2RA01343F>

**Svobodová**, H., Noponen, V., Kolehmainen, E., & Sievänen, E. Recent advances in steroidal supramolecular gels. RSC Advances, (2012). 2(12), 4985–5007. <https://doi.org/10.1039/C2RA01343F>

**Tapia**, J. A., Arvizu-Medrano, S. M., & Martínez-Flores, H. EApplication of ohmic heating to extend shelf life and retain the physicochemical, microbiological, and

sensory properties of pulque. *Food and Bioproducts Processing*, . (2019). 118, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.09.007>

**Thanh-Blicharz**, J. L., Małyszczek, Z., Szwengiel, A., Zięba, T., & Lewandowicz, G. Sodium salt of starch octenylsuccinate as an emulsifier in light type mayonnaises. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, (2012). 11, 265–271.

**Torabzadeh**, P., & Panahi, P. Evaluation of Antifungal Activity of *Physalis alkekengi* L. Extracts on *Microsporum canis*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Nocardia asteroides*. *Middle East Journal of Scientific Research*, (2013). 13. <https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2013.13.7.2849>

**Torabzadeh**, P., & Panahi, P. Evaluation of Antifungal Activity of *Physalis alkekengi* L. Extracts on *Microsporum canis*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Nocardia asteroides*. *Middle East Journal of Scientific Research*, (2013). 13. <https://doi.org/10.5829/idosi.mejsr.2013.13.7.2849>

**Tortora**, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la microbiología*. Ed. Médica Panamericana.

**Valdivieso-Solís**, D. G., Vargas-Escamilla, C. A., Mondragón-Contreras, N., Galván-Valle, G. A., Gilés-Gómez, M., Bolívar, F., & Escalante, A. Sustainable production of pulque and maguey in Mexico: Current situation and perspectives. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, (2021). 5, 1-19.

**Valle**, T. A. (2013). Lactobionic acid produced by *Zymomonas mobilis*: Alternative to prepare targeted nanoparticles. *Pharmaceutica Analytica Acta*, 4, 1-5.

**Vega-Mejía**, R. Characterization of natives starches and their effect on physical properties of water-based drilling fluids. *Nexo Revista Científica*, (2024). 37(01), 99-114. <https://doi.org/10.5377/nrc.v37i01.18333>

**Villarreal-Morales**, S. L., Montañez-Saenz, J. C., Aguilar-González, C. N., & Rodríguez-Herrera, R. Metagenomics of traditional beverages. (2018). *Advances in Biotechnology for Food Industry*, 11, 301-326

- Villarreal-Morales**, S. L., Muñiz-Márquez, D. B., Michel-Michel, M., González-Montemayor, A. M., Escobedo-García, S., Salas-Tovar, J. A., Flores-Gallegos, A. C., & Rodríguez-Herrera, R. Aguardiente: A fresh beverage from *Agave* spp. sap with functional properties. *Natural Beverages*, (2019). 7, 179-208.
- Walton**, H. F., & Reyes, J. (2021). *Análisis químico e instrumental moderno*. Reverte.
- Wrolstad**, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D. M., & Sporns, P. *Handbook of food analytical chemistry*, (2004). Volume 1.
- Wu**, J., Zhao, J., Zhang, T., Gu, Y., Khan, I. A., Zou, Z., & Xu, Q. Naturally occurring physalins from the genus *Physalis*: A review. *Phytochemistry*, (2021). 191, 112925. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112925>
- Xia**, J., Yang, Y., Liu, C. G., Yang, S., & Bai, F. Engineering *Zymomonas mobilis* for robust cellulosic ethanol production. *Trends in Biotechnology*, . (2019). 37, 960-972.
- Yang**, I., Choi, H., Nam, S. J., & Kang, H. A new 9,11-seco-sterol with a 1,4-quinone from a Korean marine sponge *Ircinia* sp. *Archives of Pharmacal Research*, (2015). 38(11), 1970-1974. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0620-9>
- Yang**, S., Fei, Q., Zhang, Y., Contreras, L. M., Utturkar, S. M., Brown, S. D., Himmel, M. E., & Zhang, M. *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. *Microbial Biotechnology*, (2016). 9, 699-717.
- Yang**, Y., Xiang, K., Sun, D., Zheng, M., Song, Z., Li, M., Wang, X., Li, H., & Chen, L. Withanolides from dietary tomatillo suppress HT1080 cancer cell growth by targeting mutant IDH1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2021). 36, 116095. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116095>
- Zavala**, D., Quispe, A., Posso, M., Rojas, J., & Vaisberg, A. Efecto citotóxico de *Physalis peruviana* capulí en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica. *Anales de la Facultad de Medicina*, (2013). 67, 283-289.

**Zeinalipour-Yazdi**, C. D., & Loizidou, E. Z. An experimental FTIR-ATR and computational study of H-bonding in ethanol-water mixtures. *Chemical Physics*, (2021). 550, 1-7.

**Zheng**, Y., Luan, L., Chen, Y., Ren, Y., & Wu, Y. Characterization of physalins and fingerprint analysis for the quality evaluation of *Physalis alkekengi* L. var. *Franchetii* by ultra-performance liquid chromatography combined with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2012). 71, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.08.020>