



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto del método de conservación del inóculo
("semilla") de pulque y de la concentración de
carbohidratos en la fermentación del aguamiel.

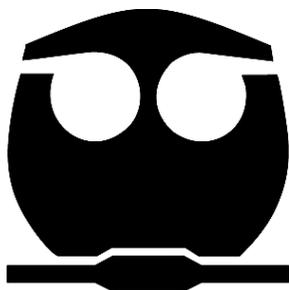
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ISRAEL BURGOS BADILLO



MÉXICO, D. F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

VOCAL: Profesor: GLORIA DÍAZ RUÍZ

SECRETARIO: Profesor: FRANCISCO RUÍZ TERÁN

1er. SUPLENTE: Profesor: NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA

2° SUPLENTE: Profesor: ALEIDA MINA CETINA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 324, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

SUPERVISOR TÉCNICO:

MARÍA TERESA FLORES ESPINOSA

SUSTENTANTE (S):

ISRAEL BURGOS BADILLO

ÍNDICE

1. RESUMÉN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. SIMBOLOGÍA	5
4. ANTECEDENTES	6
4.1. Agave	6
4.1.1.Descripción botánica.	6
4.1.2.Usos del agave.	7
4.2. Aguamiel	8
4.2.1.Definición	8
4.2.2.Proceso de extracción tradicional del aguamiel.	8
4.2.3.Composición química y fisicoquímica.	10
4.3. Pulque	12
4.3.1.Definición y aspectos históricos.	12
4.3.2.Composición química y fisicoquímica.	14
4.3.3.Proceso de elaboración tradicional.	15
4.3.3.1. Semilla de Pulque	19
4.3.4.Estudios sobre la ecología microbiana del pulque.	19
4.3.5.La industria del pulque.	22
4.4. Fermentación.	24
4.4.1.Fermentación alcohólica.	24
4.4.1.1. <i>Levaduras y Saccaromices cerevisiae</i>	25
4.4.1.2. <i>Zymomonas mobilis</i>	26
4.4.2.Fermentación láctica.	28
4.4.2.1. Bacterias ácido lácticas.	28
4.4.3.Producción de polisacáridos.	29
4.4.3.1. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	30
4.4.4.Fermentación acética.	31
4.4.4.1. <i>Acetobacter spp.</i>	31
4.5. Métodos de conservación de microorganismos.	31
4.5.1.Congelación y ultracongelación.	32
4.5.1.1 Definición.	32
4.5.1.2 Procedimiento general y consideraciones.	33

4.5.2.Liofilización.	34
4.5.2.1 Definición.	34
4.5.2.2 Procedimiento general y consideraciones	34
4.5.3.Secado.	35
5. JUSTIFICACIÓN.	36
6. HIPÓTESIS.	36
7. OBJETIVOS.	37
7.1. Objetivos generales.	37
7.2. Objetivos particulares.	37
8. ESQUEMA EXPERIIMENTAL GENERAL.	38
9. MATERIALES Y MÉTODOS.	40
9.1. Efecto de modificar la concentración de carbohidratos del aguamiel en el desarrollo microbiano, consumo de carbohidratos y producción de etanol durante la fermentación.	40
9.1.1.Materia prima y acondicionamiento del aguamiel.	40
9.1.2.Condiciones de fermentación.	40
9.2. Efecto del método de conservación de la semilla de pulque en el desarrollo microbiano, consumo de carbohidratos y producción de etanol durante la fermentación del aguamiel.	41
9.2.1.Materia prima y acondicionamiento del aguamiel.	41
9.2.2.Métodos de conservación de la semilla.	41
9.2.2.1. Congelación.	41
9.2.2.2. Liofilización.	42
9.2.2.3. Secado	42
9.2.3. <i>Reactivación de la semilla.</i>	42
9.2.3.1. Semilla sin tratamiento (fresca o control).	42
9.2.3.2. Semilla congelada,	43
9.2.3.3. Semilla liofilizada.	43
9.2.3.4. Semilla deshidratada.	43
9.2.4.Condiciones de fermentación.	43
9.3. Desarrollo de un cultivo iniciador: Semilla conservada adicionada con una cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> aislada del pulque.	44
9.3.1.Acondicionamiento del aguamiel.	44
9.3.2.Reactivación de la semilla.	44

9.3.3. Selección y caracterización de una cepa aislada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	44
9.3.4. Condiciones de fermentación.	45
9.4. Metodologías de análisis.	45
9.4.1. Muestras	45
9.4.2. Análisis microbiológicos.	46
9.4.2.1. Método de cuenta en placa.	46
9.4.2.2. Aislamiento y conservación de microorganismos.	47
9.4.2.3. Identificación de levaduras (PCR-RFLP de la región ribosomal ITS1-ITS)	47
9.4.3. Análisis fisicoquímicos.	48
9.4.3.1. Determinación de pH y °Bx.	48
9.4.3.2. Cuantificación de carbohidratos reductores	48
9.4.3.3. Cuantificación de carbohidratos totales.	49
9.4.3.4. Cuantificación de Etanol.	49
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	50
10.1. Efecto en el desarrollo microbiano, consumo de azúcares y producción de etanol modificando la concentración de carbohidratos del aguamiel durante la fermentación.	50
10.1.1. Caracterización del aguamiel y semilla, calidad microbiológica, aspectos fisicoquímicos y sensoriales.	50
10.1.2. Efecto de la pasteurización del aguamiel.	54
10.1.3. Resultados de la Fermentación: crecimiento, pH, °Bx, carbohidratos y etanol (aguamiel ajustado a 8°Bx, 10°X y 10°Bx sin pasteurizar).	55
10.1.3.1 Efecto de la concentración de sólidos totales en el crecimiento microbiano.	55
10.1.3.2 Efecto de la Pasteurización en el crecimiento microbiano.	57
10.1.3.3 Efecto de la concentración de carbohidratos en el pH y °Bx.	58
10.1.3.4 Efecto en los carbohidratos reductores y totales.	59
10.1.3.6 Efecto en la producción de etanol.	60
10.2. Efecto del método de conservación de la semilla de pulque en el desarrollo microbiano, consumo de carbohidratos y producción de etanol durante la fermentación del aguamiel.	62
10.2.1. Caracterización del aguamiel y semilla, calidad microbiológica, aspectos fisicoquímicos y sensoriales.	62
10.2.2. Efecto del método de conservación y tiempo de almacenamiento sobre la comunidad microbiana de la semilla, y aspectos fisicoquímicos.	64
10.2.3. Efecto del método de conservación de la semilla y tiempo de almacenamiento en	69

el desarrollo microbiano, consumo de azúcares y producción de etanol durante la fermentación del aguamiel.	
10.2.3.1. Efecto del método de conservación de la semilla sobre el desarrollo de la comunidad microbiana en la fermentación	69
10.2.3.2. Efecto del método de conservación en la fermentación, sobre el pH y °Brix.	71
10.2.3.3. Efecto del método de conservación de la semilla en la fermentación, sobre los carbohidratos reductores.	72
10.2.3.4. Efecto del método de conservación de la semilla en la fermentación, sobre los carbohidratos totales.	74
10.2.3.5. Efecto del método de conservación de la semilla en la fermentación, sobre la producción de etanol.	75
10.2.3.6. Efecto sobre las propiedades sensoriales del pulque.	77
10.3. INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL, INOCULANDO UN SEMILLA CONSERVADA JUNTO CON UNA CEPA DE <i>S. cerevisiae</i> AISLADA DEL PULQUE.	78
10.3.1. Identificación de levaduras por el método PCR-RFLP (ITS 1-ITS 4).	78
10.3.2. Caracterización de la cepa <i>S. cerevisiae</i> .	80
10.3.3. Fermentación conjuntando un inóculo de Semilla conservada por congelación y una cepa de levadura identificada como <i>S. cerevisiae</i> .	83
11. CONCLUSIÓN	86
12. PERSPECTIVAS.	87
13. ANEXOS	88
14. BIBLIOGRAFIA	100

1. RESUMÉN

El pulque es una bebida tradicional mexicana que se obtiene por la fermentación de la savia azucarada obtenida de diferentes especies de magueyes (*A. atrovirens*, *A. mapisaga*, *A. salmiana*), conocida como aguamiel. El aguamiel es un líquido incoloro, transparente, con olor herbáceo especial y un sabor dulce agradable y el pulque se caracteriza por ser una bebida alcohólica, blanca, con olor fuerte y consistencia viscosa. Esta bebida es consumida por poblaciones indígenas y mestizas de muchas regiones del país, particularmente en la zona centro de México (Lappe O. 2008).

Esta fermentación tradicional es muy compleja y depende de muchos factores para su producción, en ella participan una gran cantidad de microorganismos entre ellos bacterias y levaduras. La composición del aguamiel, el tipo de carbohidratos que contiene son variables y dependen de la especie de agave, así como su edad, clima, época del año, etc. Es por ello que dicho proceso es pocas veces controlado o estandarizado y además está fuertemente sujeto a ciertas reglas empíricas, basadas por la experiencia del productor (Loyola, 1956). Para obtener un producto de buena calidad es necesario mantener un equilibrio en la composición del sustrato, y del inóculo o semilla, que garanticen el perfil sensorial característico de la bebida y que satisfaga el paladar del consumidor. A pesar de que existe cierta demanda del pulque en el extranjero, el estudio de esta bebida es importante para recuperar la aceptación de esta bebida principalmente por los jóvenes y en zonas urbanas.

Existen numerosos métodos de conservación de microorganismos, los más usados son el secado, congelación y liofilización, en todos se busca reducir drásticamente el metabolismo de la célula, ya sea disminuyendo la temperatura o retirando el agua disponible (Day, 1995); cada uno de estos métodos ofrecen ventajas y desventajas, sin embargo, poco son los estudios para conservar matrices microbianas complejas o con diferentes grupos de microorganismos. Este proyecto forma parte de otro más grande cuyo objetivo es conocer los factores que afectan la fermentación, con el fin de producir una bebida similar al pulque, en condiciones controladas. Con el presente trabajo se busca estandarizar la concentración inicial de carbohidratos ($^{\circ}\text{Bx}$) del aguamiel. Posteriormente, aplicando métodos de conservación sobre la semilla (ultracongelación, liofilización y secado), se pretende definir el mejor método para conservar la semilla, de manera que se pueda producir una bebida similar al pulque, con 6% (p/v) de alcohol.

2. INTRODUCCIÓN

El pulque, así como todos los alimentos y bebidas fermentadas, son aquéllos en los que la etapa esencial y más importante para su procesamiento involucra el crecimiento y la actividad metabólica de microorganismos (García, 1993). En el mundo existe una gran variedad de estos alimentos, su elaboración es una práctica muy antigua en varias culturas, como el pan, vino, cerveza y el queso, todos estos han trascendido sus fronteras de origen para convertirse en productos cotidianos en más de un continente. En nuestro país destacan los alimentos fermentados tradicionales, la mayoría de los cuales se producen de forma artesanal, siguiendo los procedimientos que han sido pasados de generación en generación y han sufrido pocas modificaciones en su proceso de elaboración. Actualmente se producen de manera artesanal o semicomercial y principalmente son consumidos por grupos étnicos y rurales.

Durante muchos siglos los alimentos fermentados han sido de gran relevancia en la vida diaria y ceremonial de las antiguas civilizaciones indígenas de México, desde entonces y hasta la fecha se consumían como parte de la dieta alimentaria debido a su carácter nutricional, también con fines medicinales, estimulantes y rituales. Algunos de los alimentos fermentados tradicionales de México más conocidos son el pulque, tepache, mezcal, tequila, pozol, atole agrio, tesgüino, y balché principalmente (Ulloa 1982; Herrea 1993).

Las bebidas y alimentos tradicionales de México se pueden clasificar de muchas maneras, pero en términos generales puede hacerse una distinción entre los productos fermentados alcohólicos y los no alcohólicos, a partir de los primeros se puede hacer otra subclasificación de las bebidas obtenidas a partir de la fermentación de la savia del agave y subsecuentemente los que son destilados (como lo son el tequila y el mezcal), y los que no lo son como es el caso del pulque (Lappe O. 2008).

El pulque, se obtiene por la fermentación de aguamiel (savia azucarada de diferentes especies de agaves) que puede ser natural o inducida con el empleo de una semilla (porción de pulque previamente elaborado) o el empleo de cultivos iniciadores, se caracteriza por ser una bebida alcohólica, blanca, con olor fuerte y consistencia viscosa. Se tiene la creencia popular que el consumo de esta bebida tiene propiedades curativas, nutricionales y benéficas a la salud. Estudios afirman que el pulque es una de las bebidas más completas debido a su aporte de vitamina, aminoácidos esenciales y a que es una buena fuente de energía (Guerrero, 1985).

Esta fermentación tradicional es muy compleja y depende de muchos factores para su producción, en ella participan una gran cantidad de microorganismos entre ellos bacterias y levaduras, los cuales, en proporción y especies presentes son muy diversos y varían respecto a la región donde se elabora. Así también lo es la composición del aguamiel. El tipo de carbohidratos que lo componen dependen de la especie de agave, así como su edad, clima, época del año, etc. Es por ello que dicho proceso es pocas veces controlado o estandarizado y además está fuertemente sujeto a ciertas reglas empíricas basadas por la experiencia del productor (Loyola, 1956).

En 1977 Sánchez Marroquín señaló que los microorganismos esenciales en el proceso de la fermentación del pulque eran *Leuconostoc dextranicum* y *Leuconostoc mesenteroides*, responsables de la producción de polisacáridos (dextranas y β -glucanos) que modifican la consistencia y viscosidad final del pulque; lactobacilos homolácticos y heterolácticos, que producen ácidos láctico y acético que contribuyen también en la acidez característica de la bebida; y *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*, que principalmente aportan alcohol y CO₂, este último le da la característica espumosa al pulque.

En México, el pulque es un ícono entre las bebidas tradicionales prehispánicas por excelencia; sin embargo su consumo ha venido desplazándose desde el incremento en el mercado de otras bebidas alcohólicas como la cerveza y el aumento de la popularidad del tequila y el mezcal en zonas urbanas, peor aún, en el siglo XX existió una campaña muy fuerte de desprestigio hacia esta bebida por empresas cerveceras, argumentando principalmente la baja sanidad de los tinacales, expendios e higiene de los productores entre otras cosas. Si bien es cierto que durante el proceso de elaboración no se cuenta con condiciones estrictamente controladas y hay poca higiene, no todos los sitios donde lo producen presentan estas características, y al contrario, algunos cuentan con reconocimientos a nivel regional por la calidad de sus productos, tal es así y a pesar de todo, actualmente ha llegado a enlatarse para exportación a países que aprecian la variedad de sabores en comidas y bebidas, sin embargo, todavía solo se consume en ciertos establecimientos populares y fondas de categoría, como una curiosidad gastronómica o por tradición, y por tanto, sigue siendo producida y consumida por diversos grupos étnicos en zonas rurales de la meseta central del país, principalmente los estados de Hidalgo, Tlaxcala, Morelos, Estado de México y Distrito Federal, estados donde a su vez se cuenta con la mayor producción de la bebida (Loyola 1956; Conçlaves 1978).

Pero, ¿qué importancia tiene el estudio de esta bebida? Desde el punto de vista cultural y económico, es importante rescatar y fomentar el consumo de alimentos fermentados tradicionales de México. En el caso del pulque conlleva a mejorar su procesamiento tradicional e industrial para obtener un producto de mejor calidad y seguro para el consumidor, que nos permita a futuro expandir su mercado y rescatar este sector. Por otro lado desde el punto de vista tecnológico, existe un interés por la búsqueda de alimentos funcionales, con mayor vida de anaquel y que cuenten con propiedades benéficas al consumidor, ya que hoy en día hay una tendencia por el consumo de productos naturales. O simplemente por curiosidad científica, que nos permita conocer más de los microorganismos involucrados durante el proceso fermentativo, saber más de las interacciones presentes con el sustrato u otros microorganismos, y conocer cuáles de estos representan un riesgo a la salud pública, En fin, el potencial biotecnológico y económico para su explotación es muy amplio, no cabe duda que aún hay mucho trabajo por hacer (Owens, 1993).

3. SIMBOLOGÍA

- ▶ ADP: Adenosin difosfato.
- ▶ ATP: Adenosin trifosfato.
- ▶ BAL: Bacterias ácido lácticas.
- ▶ CG 30d: Semilla congelada a -60°C con glicerol al 7.5%y almacenada 30dias.
- ▶ CG 90d: Semilla congelada a -60°C con glicerol al 7.5%y almacenada 90dias.
- ▶ DH: Semilla deshidratada o sometida al tratamiento de secado.
- ▶ DNS: Dinitrosalisílico.
- ▶ FR: Semilla fresca sin tratamiento de conservación (control).
- ▶ LF 30d: Semilla liofilizada en soporte de leche descremada y almacenada 30dias.
- ▶ LF 90d: Semilla liofilizada en soporte de leche descremada y almacenada 90dias.
- ▶ Log₁₀ UFC/ml: Logaritmo en base diez de las unidades formadores de colonia en 1 ml.
- ▶ °Brix (°Bx): Es una medida en grados de la cantidad de gramos de sacarosa disueltos en 100ml de agua.
- ▶ °C: Medica de temperatura (grados centígrados).
- ▶ PCR-RFLP
- ▶ PET: Tereftalato de polietileno.
- ▶ rpm: revoluciones por minuto, o número de ciclos o giros que se dan en un minuto.

4. ANTECEDENTES

4.1 Agave

Los agaves (del griego *agavus* que significa admirable o noble), mejor conocidos por su nombre vernáculo como magueyes, son plantas endémicas del continente americano, características de los paisajes áridos, semiáridos y templados de México. Crecen en suelos pobres y en climas con lluvias escasas o irregulares. Los estados más ricos en diversidad de especies son Oaxaca, Chiapas, Jalisco, Coahuila, Chihuahua, Sonora, Durango y estados que del centro como: Hidalgo, Estado de México, Morelos, Tlaxcala, Puebla y Distrito Federal.

La palabra “maguey” puede tener varios orígenes, uno de ellos proviene de una derivación post-conquista a la palabra “metl” (denominación antigua del agave por los mexicas), otro origen de la palabra hace referencia a la diosa náhuatl del pulque “Mayahuel”. Cuenta la historia que esta diosa penetró en el maguey para hacer brotar su “sangre” o bien jugo de agave, la cual, es la materia prima esencial para producir tequila, mezcal y pulque (Conçlaves, 1978). Se cree que la domesticación de algunas especies de agaves para la producción de pulque se inició hace 3000 años gracias a su aprovechamiento por diversos pueblos indígenas de Mesoamérica, principalmente por los aztecas.

4.1.1 Descripción botánica.

El agave es una planta xerófila perteneciente a la familia de las Agaváceas, se conocen alrededor de 166 especies y en México se han encontrado el 75% de especies del total mundial, se caracteriza por crecer muy lentamente (tarda alrededor de 10 años en alcanzar su madurez), está constituida por una raíz fibrosa, un tallo grueso y corto llamado “metlitzontlitetl”, del cual salen unas hojas llamadas pencas que son gruesas y dispuestas en roseta alrededor del tallo, estas pencas están provistas de púas en sus extremos y puntas, y también están cubiertas por una cutícula cética que impide la evaporación del agua almacenada en ellas en grandes cantidades.

Los agaves son monocárpicos, es decir, sólo florecen una vez en su vida, después de la cual la planta muere; se considera al agave como una planta hermafrodita y a pesar de que produce una gran cantidad de semillas, alrededor del 96% de estas son estériles y se pierden. Por lo tanto su propagación vegetativa es por medio de brotes o hijuelos (mecuates), estos mismos brotan de las raíces de la planta madre, constituyendo plantas nuevas que pueden ser trasplantadas resultando así nuevos magueyes (Granados S. 1993).

4.1.2 Usos del Agave.

Los magueyes eran considerados como una planta sagrada que ocupó un lugar importante tanto en la vida religiosa, ritual y mitológica como en la económica en el México prehispánico; para ello los indígenas contaban con un profundo conocimiento de la naturaleza de esta planta que les permitió utilizar los magueyes de múltiples formas.

De sus pencas obtenían hilos para la elaboración de costales, tapetes, morrales, ceñidores, redes de pesca y cordeles; las espinas se usaban como agujas o clavos; las pencas completas eran utilizadas como tejas para techar sus casa; los quiotes servían como vigas o como cercas para delimitar terrenos; con las raíces elaboraban cepillos, escobas y canastas; y finalmente si se extrae la sabia de la planta se obtiene el aguamiel, indispensable para obtener la bebida ritual por excelencia “el pulque”. E incluso las cenizas de su incineración resultan buenas para la tierra (Cervantes R. 2002).

Hoy en día puede decirse que los usos de los magueyes, económicamente redituables, pueden reducirse a tres, que en orden de importancia son los siguientes: productores de bebidas destiladas: tequila, y mezcal principalmente, productores de bebidas fermentadas: magueyes pulqueros (*A. salmiana* Otto, *A. ferox*, *A. atrovirens* Kraw, *A. mapisaga*, *A. americana*), y como productores de fibras: henequén y lechuguilla, (Figura 1).

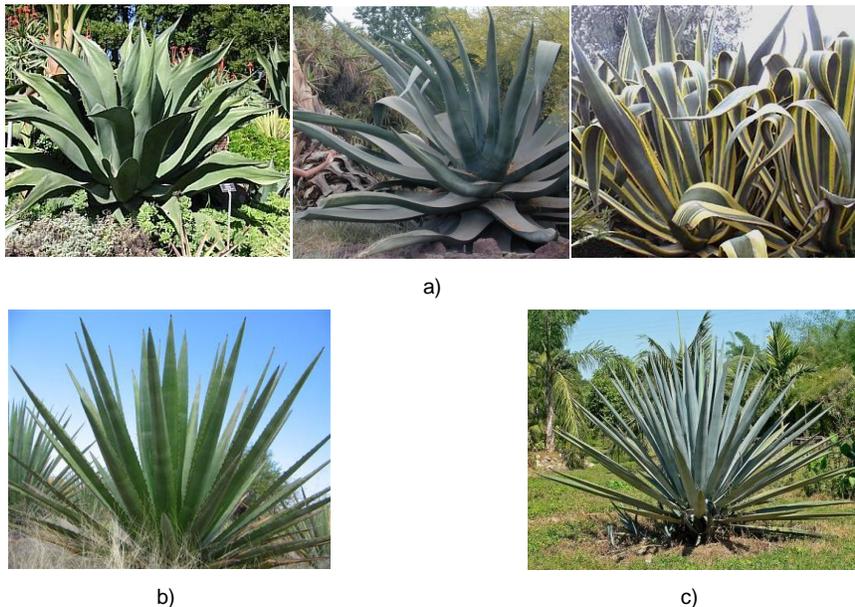


Figura 1. Especies de agaves aprovechadas para preparar bebidas alcohólicas destiladas y no destiladas: a) Maguey pulquero (*Agave salmiana* Otto, *A. mapisaga*, *A. atrovirens* Kraw, *A. americana*); b) Maguey mezcalero (*A. angustifolia* Haw); c) Maguey tequilero (*A. tequilana* Weber), (Sánchez M. 1979).

Por otra parte considerando su importancia gastronómica y económica, cabe señalar que sus pencas y raíces, son el hábitat de dos especies de gusanos, los cuales, forman parte de platillos únicos y tradicionales de México, dichos gusanos conocidos como “*Chinicuiltes*” llegan a encontrarse en los mercados populares con un precio relativamente caro y son considerados además de un alimento delicioso también una fuente importante de nutrientes (Cervantes R. 2002).

4.2 Aguamiel

4.2.1 Definición.

El aguamiel es la savia azucarada que se extrae de varias especies de agave y se obtiene mediante un proceso que interrumpe el desarrollo normal de la planta. Dependiendo de la especie de la planta, normalmente es un líquido ambarino o incoloro y transparente, tiene un gusto dulce y presenta un aroma herbáceo característico (Loyola 1956).

4.2.2 Proceso de extracción tradicional del aguamiel.

Por lo general cuando el maguey alcanza su madurez, edad de entre 8 a 12 años, el agave empieza a florecer. Para obtener el aguamiel es necesario evitar que el maguey florezca, ya que durante esta etapa, la planta consume sus grandes reservas de jugos y agua de sus hojas para formar el tallo floral llamado qurote, es entonces que se realiza una operación conocida como “castración”, en la cual se realiza un corte para retirar la yema florar que se encuentra en el tronco central de la planta, “meyolote”, y con ello formar una cavidad de aproximadamente 2 litros de capacidad (“*mezontete*” o “*cajete*”).

Posteriormente el maguey se deja “orear” durante 4 meses a 1 año, en ese tiempo el agave se añeja con el fin de incrementar el contenido de azúcares de su savia. El agricultor se da cuenta que el maguey ha añejado lo suficiente con la aparición de ciertas manchas sobre las hojas. Se procede a la “*picazón*”, que es producir en la planta una lesión para que el aguamiel fluya y se acumule, esto se hace raspando la costra y tejido blando de la cavidad. Así mismo se deja reposar por una semana tapando la entrada con pencas y una piedra.

En este último punto se hace evidente la facilidad con que se puede contaminar el líquido, ya que el sellado del “*cajete*” del maguey permite la entrada de insectos, polvo, lluvia o animales que ponen en riesgo la higiene de la materia prima.

Después se prosigue con el periodo de “raspa” y recolección, como su nombre lo dice se raspa periódicamente el interior la cavidad para abrir los vasos y aumentar el flujo de aguamiel, esto se hace con un utensilio en forma de cuchara muy afilado (“raspador” u *ocaxtle*).

El aguamiel se extrae mediante succión utilizando un “*acocote*” (fruto seco y hueco del calabazo, *Lagenaria siceraria*; hoy día se fabrican de materiales como plástico y fibra de vidrio para facilitar su limpieza), finalmente se transfiere a recipientes de piel de becerro, madera (castañas) o bidones de plástico que son enviados “*tinacal*” (lugar donde se almacena el aguamiel y prepara el pulque). La recolección del aguamiel se verifica y realiza diariamente por el “*Tlachiquero*” por la mañana y por la tarde. Algunas veces se recoge a medio día durante el verano para evitar que las lluvias diluyan la proporción de azúcares y echen a perder el aguamiel (Figura 2).



Figura 2. Principales etapas de la extracción del aguamiel de *A. atrovirens* Kraw. Nanacamilpa, Tlaxcala. a) Herramientas usadas durante la capazón, picazón, raspa, extracción y transporte; b) Acumulación del aguamiel en la cavidad del maguey, succión con el “*acocote*”; c) Raspado rutinario de la cavidad del maguey posterior a la recolección de aguamiel; d) Transporte del aguamiel en castañas de madera hacia el tinacal (Loyola 1956), (Turismo en Nanacamilpa, 2011).

Cabe señalar que la deficiencia fundamental durante la recolecta del aguamiel es sin duda la falta de higiene, por un lado se emplea un método poco confiable para tapar la cavidad del maguey, así como el uso de herramientas de difícil aseo o de construcción rudimentaria. Y por otro lado se tiene la mala manipulación del operario, debida a los escasos hábitos higiénicos, desconocimiento de buenas prácticas, y la poca información sobre las repercusiones que puede tener a la salud este tipo de acciones.

Finalmente, la planta comienza produciendo alrededor de 250ml de aguamiel hasta llegar a tres o cuatro litros por las mañanas y la mitad de este volumen por la tarde. El tiempo que dura la explotación de un maguey es de tres a cinco meses, dependiendo de la calidad del raspado sobre la planta. De este modo y a razón de que un maguey promedio produce de 2 a 3 litros de aguamiel diarios durante la vida útil de la planta, la producción por maguey es de 180 a 250 litros aproximadamente.

4.2.3 Composición química y fisicoquímica.

El aguamiel es un líquido dulce (7 a 14° Bx), éste puede ser ácido o ligeramente alcalino, incoloro y transparente. Posee un ligero olor herbáceo y contiene diversos minerales, además de ser relativamente rico en carbohidratos pero pobre en proteína (tabla 1). El aguamiel presenta un pH promedio cercano a la neutralidad (6.8), un contenido de humedad del 86% y una proporción de sólidos solubles promedio de 10.85 °Brix.

Tabla 1. Composición química del aguamiel en su periodo de cosecha (Granados S. 1993) (Cravioto, 1951).

Componente	g/100ml
Glucosa	0.12 - 0.60
Sacarosa	9.18 - 11.15
Fructo-oligosacaridos y fructanas	0.58 - 1.45
Aminoácidos libres	0.26 - 0.30
Proteínas	0.45 - 0.81
Cenizas	0.23 - 0.45
Acidez	0.068%
Densidad	1.049 g/L

Los carbohidratos, tales como la sacarosa, fructosa, glucosa y algunas pentosas, le atribuyen el gusto dulce al aguamiel. Sin embargo, existen polisacáridos conformados por glucosa y fructosa como los fructo-oligosacáridos (FOS) y polifruetosacáridos (fructanas o polímeros de fructosa), que además de ser carbohidratos de reserva energética de la planta, también son utilizados como fuente de carbono por los microorganismos durante la fermentación. Estas sustancias contribuyen con efectos beneficiosos sobre la fisiología gastrointestinal actuando como fibra dietética, además se ha reportado que tienen propiedades prebióticas favoreciendo el aumento en el intestino de microorganismos probióticos como *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp (Rendón H. 2012; Coudray, 2003).

En cuanto al tipo de enlace, los FOS son cadenas de entre 2 y 10 moléculas de fructosa y una glucosa terminal. Las fructanas son cadenas de más de 10 moléculas de fructosa con o sin una molécula terminal de glucosa α -1,2. Se tienen principalmente de 2 tipos: las inulinas, cadenas de fructosa con enlaces β -2,1 teniendo muchas ramificaciones β -2,6, y levanas, cadenas de fructosa pero con enlaces β -2,6 y ramificaciones ocasionales β -2,1 (Kaur, 2002), (Figura 3).

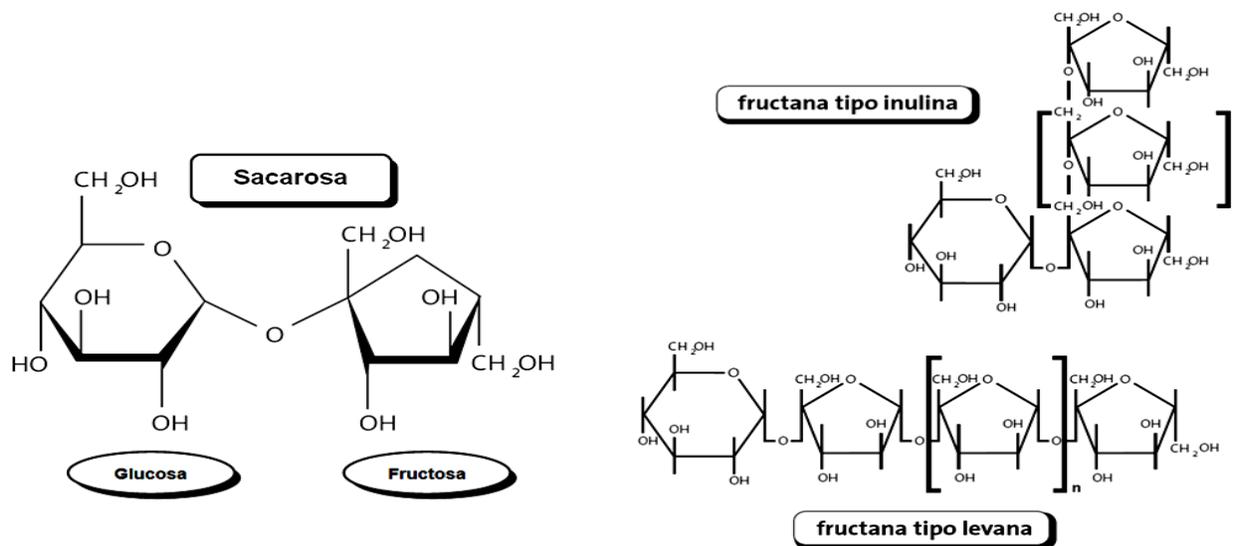


Figura 3. Estructura química de los principales carbohidratos que componen al aguamiel (Olvera, 2007).

De acuerdo con la legislación mexicana existen dos tipos de aguamiel de acuerdo a su calidad y características fisicoquímicas, estos son el aguamiel Tipo I de mejor calidad, que es empleado para la elaboración de la “semilla” y pie de cuba del pulque, y el Tipo II de menor calidad, que es dedicado para la elaboración del pulque en sus últimas etapas antes de ponerlo a su comercialización (ANEXO 1, tabla 18).

4.3 Pulque

4.3.1 Definición y antecedentes históricos.

En resumen el pulque es una bebida fermentada tradicional e indígena de México que se obtiene por la fermentación del líquido azucarado o savia que emana después de cortar el brote floral de varias especies de magueyes (aguamiel), en particular del *Agave atrovirens Karw* o maguey manso (Sánchez M., 1970).

El nombre náhuatl original de la bebida es octli o “vino de aguamiel”, los Aztecas distinguieron diversos tipos de pulque: el “metoctli” o vino de Agave, el “iztacoctli” o vino blanco, el “teoctli” o vino ceremonial o de los dioses y el nombre polihquioctli fue dado al vino descompuesto con un olor y sabor desagradable (Conçlaves 1978). En tanto que la denominación “pulque” fue dada por los españoles a la bebida recientemente preparada y a la que sufrió un proceso de descomposición o putrefacción.

En el caso de los Aztecas, constituyó una bebida divina, medicina, y un intoxicante ritual relacionado con su cosmología (Villalpando 2004). También fue objeto de una estimación especial, como lo comprueba la dedicación de un culto al pulque presidido por Mayah(uel, mujer a la que se rindió culto como diosa de maguey y por haber descubierto el aguamiel para preparar la apreciada bebida y además, se le veneró por haber sido la madre de numerosos dioses relacionados con la fermentación o la elaboración del pulque y con los efectos del mismo hasta culminar en la embriaguez (Del Campo R., 1938), (Figura 4).

Al caer el imperio azteca, la bebida perdió su importancia religiosa ceremonial, pero mantuvo su relevancia como buen suplemento alimenticio y sustituto de agua, principalmente era consumida por grupos indígenas y por el sector más popular de las ciudades coloniales.

A finales del siglo XIX e inicios del siglo XX, el pulque alcanzó su mayor auge gracias a la construcción de la red ferroviaria que facilitaba su transporte desde las comunidades rurales donde se fabricaba hasta las más de mil 200 expendios y pulquerías de la capital del país, sin embargo, existieron campañas negativas por parte del gobierno y la iglesia católica, argumentando decadencia de la población atribuido a los efectos embriagantes que provocaba esta bebida.

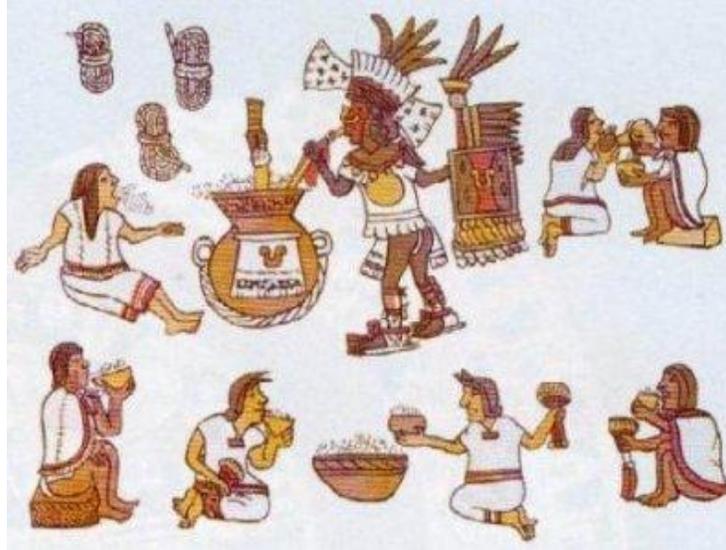


Figura 4. Representación pictográfica del culto y veneración del pulque como bebida ceremonial para los Aztecas (Enoplaneta, 2010).

El declive del consumo sucedió al término de la Revolución, debido principalmente a la introducción y producción de cerveza en México, y a numerosas campañas de desprestigio orquestadas por compañías cerveceras, argumentando que durante la elaboración del pulque se llevaban a cabo adulteraciones y poco sanitarias. Para 1882, el 94% de las bebidas consumidas en México era pulque, ya para 1929 solamente el consumo constituía un 58%, y después de la Segunda Guerra Mundial fue de apenas el 48% (Zayas 2011).

Después de la segunda mitad del siglo XX hubieron muchos intentos para rescatar la producción y consumo del pulque, por ejemplo, estudios de Sánchez Marroquín, sentaron las bases para la producción industrial del pulque en su planta piloto de Santa María Tecajete, Tlaxcala (Sánchez Marroquin 1977). A pesar de estos esfuerzos y por mencionar otros, actualmente la bebida persiste sólo como bebida popular y es principalmente vendida en pulquerías.

Dado que las nuevas generaciones no cargan con las leyendas negras atribuidas al pulque, nos hace pensar que es el mejor momento para rescatarlo e industrializarlo. Por fortuna su comercialización se ha diversificado en lo que hoy conocemos como pulques “curados” que son preparados a base de pulque natural mezclado de muchas maneras con frutas, hortalizas y semillas, los cuales han ganado popularidad entre los jóvenes (García, 2004).

4.3.2 Composición química y fisicoquímica.

A diferencia del aguamiel, el pulque es de carácter ácido, con un pH entre 3.5 y 4.3 aproximadamente y con un grado alcohólico que varía del 4.0 al 6.0%, pero los pulques más fuertes contienen de 6 a 8 grados de alcohol (Ulloa, 1982).

Su composición química así como sus atributos sensoriales finales son muy variables y están determinadas en parte por las condiciones de fermentación y la calidad de la materia prima.

Dentro de su composición se encuentran minerales, vitaminas y proteínas en pequeñas cantidades, que en su conjunto dan un buen aporte nutricional a la bebida (tabla 2), es por ello que ha sido esencial en la vida de personas de bajos recursos como suplemento alimenticio. Algunas de las vitaminas y nutrientes que contiene son: vitamina C, hierro, fósforo, tiamina, riboflavina, calcio y niacina. En la tabla 3, se mencionan los principales aminoácidos presentes en el pulque, se observa en dicha tabla que el pulque es rico en lisina, fenilalanina, leucina y arginina.

Tabla 2. Análisis composicional promedio de diferentes clases de pulques del estado de Hidalgo y el estado de México. (Cravioto, 1951), algunos datos son proporcionados por el Instituto de Nutriología (Loyola, 1956).

Componente	g (%)	Componente	mg (%)
Agua	94.0	Calcio	10.3
Proteína	0.34	Fósforo	7.00
Glúcidos	0.50	Hierro	0.70
Gomas	0.66	Caroteno	0.00
Etanol	3.68	Tiamina	0.23
Cenizas	0.20	Riboflavina	0.23
Glicéridos	0.00	Niacina	0.27
Sacarosa	0.03	Ácido ascórbico	5.30
Azúcares reductores	0.02	Ácido fólico	0.01

La normatividad Mexicana NMX-V-037-1972 PULQUE establece dos tipos de calidad de pulque de acuerdo a la etapa de elaboración a la que pertenece, estos son: Tipo I, es el pulque de semilla y “pie”, actúa como iniciador para dar comienzo la fermentación de aguamiel. El Tipo II es el pulque comercial y es menos fuerte o con menos alcohol que el Tipo I, los datos fisicoquímicos de ambos tipos se mencionan en el ANEXO 1, tabla 19.

Tabla 3. Contenido de aminoácidos del pulque, importancia nutricional Instituto de salubridad y enfermedades tropicales, Depto. de Nutriología (Loyola, 1956).

Aminoácidos y nitrógeno	mg por 100ml
Nitrógeno (g por 100ml)	0.14
Lisina	16.12
Triptofano	2.7
Histidina	4.7
Fenilalanina	11.2
Leucina	10.5
Treonina	6.4
Metionina	0.7
Valina	6.6
Arginina	10.9

4.3.3 Proceso de elaboración tradicional del pulque.

La fermentación del aguamiel comienza desde el momento de que se encuentra en la cavidad abierta del maguey y toma lugar debido a la presencia de microorganismos del medio ambiente. Si el aguamiel no es recogido oportunamente, esta fermentación espontánea se acentúa y consecutivamente puede avanzar hasta convertirse en pulque o con el paso del tiempo llegar a su descomposición.

El procedimiento normal para la elaboración del pulque es someter al aguamiel recién recolectado a la acción de una porción de pulque previamente elaborado que funcione como fermento o iniciador, al cual se le denomina “Semilla”, “pie” o *xinaxtli*. Si la producción de pulque va a iniciar apenas, en este caso el primer paso sería preparar una semilla (figura 5).

Con base en la observación y la práctica cada operario que dirige la fermentación del pulque posee un procedimiento propio para preparar dicha semilla. Es muy raro que esta persona dé a conocer exactamente su receta, dicho hermetismo desafortunadamente ha dado lugar a la circulación de versiones negativas sobre la manera en que la semilla se elabora y sobre el tipo de sustancias empleadas en su preparación, y que finalmente, solo generan desconfianza y desprestigio a la industria pulquera.

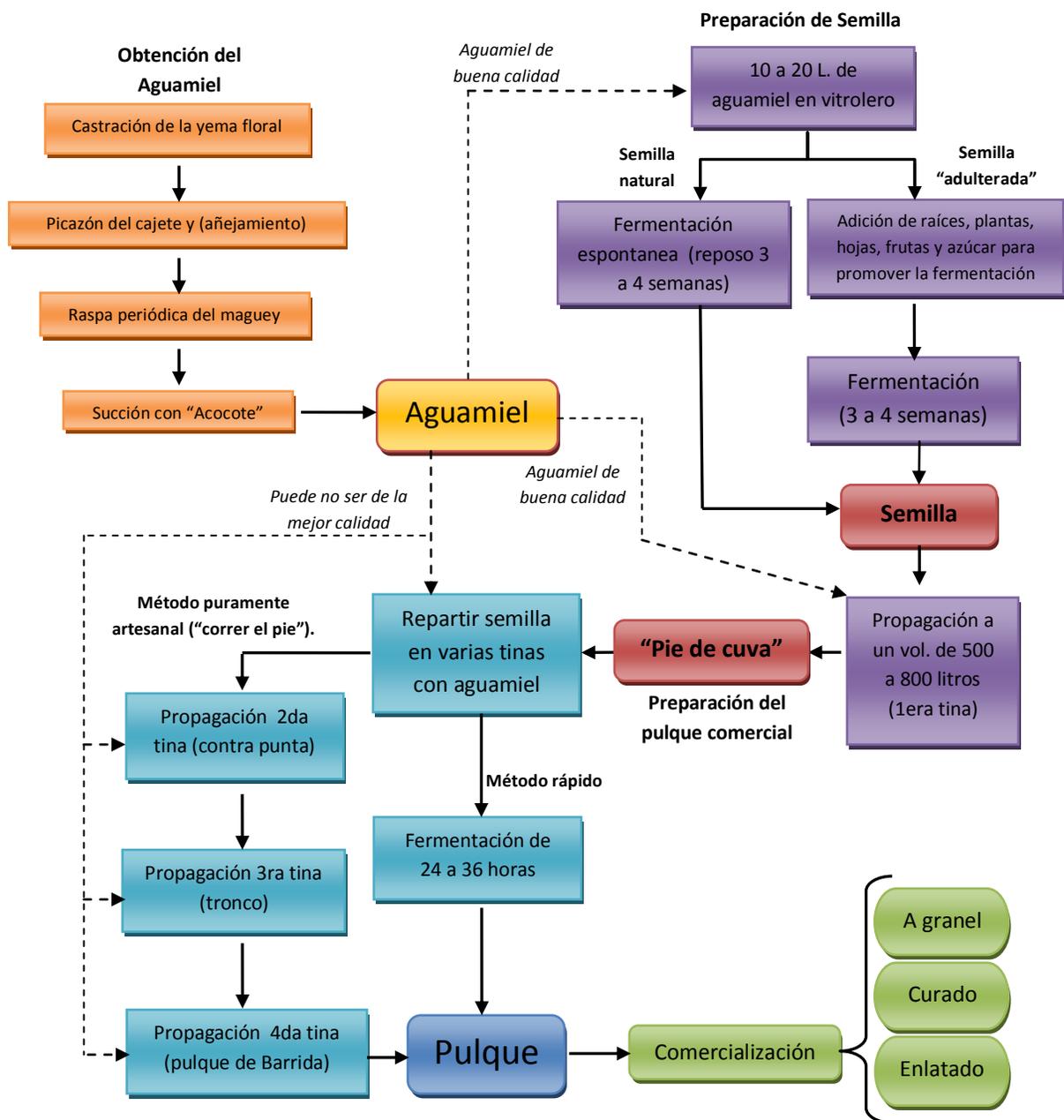


Figura 5. Proceso de elaboración del pulque: extracción del aguamiel y preparación de la semilla (García, 2004; Loyola 1956).

Loyola Montemayor en 1956 reportó que para preparar la semilla se toma una pequeña cantidad de aguamiel (de 10 a 20 litros) de la más limpia, recién extraída y alto contenido de azúcares. Esta se deposita en un vitrolero o una tina de cuero dedicada especialmente para este fin, se deja fermentar espontáneamente de 3 a 4 semanas tapándola adecuadamente con otro recipiente invertido o manta de cielo.

Si se pretende que su elaboración sea puramente natural, se deja reposar hasta verificar la fermentación alcohólica y acética del aguamiel, y hasta la formación de una capa espesa en la superficie, a este punto se le dice que la semilla “ya cortó”. Sin embargo, de no ser un proceso natural y antes de llegar a este punto de fermentación, muchos productores adicionan diversos materiales con el fin de acelerar el proceso o según ellos para otorgar un “toque propio” de sabor característico al producto. Se sabe que estos materiales pueden ser raíces, hierbas, azúcar, gomas, e inclusive frutas, todos estos son permitidos ya que no representan un riesgo a la salud. Al producto resultante se le conoce como semilla adulterada o sintética (figura 5).

Con el fin de obtener grandes cantidades de la semilla, se somete a una propagación, “dar de comer a la semilla”, se empieza adicionando aguamiel limpio pequeñas cantidades que se van aumentando progresivamente hasta llenar una tina de 500 a 800 litros, dicho proceso puede tomar algunas semanas. Una vez llena la tina se le conoce como “pie de cuba” y se procede formalmente a la elaboración del pulque.

La norma mexicana NMX-V-037-1972 para Pulque (Anexo 1) define al “pie de cuba” (o pulque de punta) como el producto que se obtiene de las primeras tinas en el desarrollo de la producción y en cuya preparación se utilizan la semilla y aguamieles del Tipo 1, estableciéndose en estas condiciones en forma óptima el equilibrio bioquímico entre el substrato fermentable y los microorganismos básicos. Este pulque es el que sirve de base para el desarrollo de la producción.

Para la elaboración del pulque comercial, el “pie” se reparte en varias tinas con aguamiel (no es necesario que sea de la mejor calidad), las cantidades de estos dependen de la época del año, por ejemplo: en tiempo normal, partes iguales de semilla y aguamiel; en tiempos fríos, más “pie de pulque” que de aguamiel; y en tiempos cálidos, más aguamiel que “pie de pulque”. Actualmente parte de los tinacales sólo dejan fermentar el aguamiel de esta tina aproximadamente de 24 a 36 horas, dando como resultado el pulque listo para su comercialización (figura 6).

El pulque alcanza su grado de fermentación adecuado, cuando los expertos advierten un sabor, acidez y consistencia especiales. La viscosidad llega a ser tal que forma un hilo al levantar el líquido del recipiente, y en todo caso, cuando la fermentación alcohólica se hace perceptible se clasifica como pulque “dulce” (2 a 4 % alcohol) o pulque “fuerte” (5 a 7% de alcohol). El producto final es blanco, líquido viscoso, con aproximadamente 45 g/L de etanol y un pH de 3.4 (Tovar, 2008).

En la norma anteriormente mencionada define al pulque de producción comercial como el que se "alimenta" con la generalidad de los aguamieles, pudiendo utilizarse durante las siguientes etapas de producción, aguamieles enriquecidos con cualquier cantidad de concentrados de aguamiel.



a)



b)

Figura 6. Producción del pulque. a) Repartición del "pie de cuba" en varias tinas. b) Etapa de fermentación del aguamiel.

Por otro lado, algunos tinacales grandes siguen haciendo un procedimiento más tradicional llamado "correr el pie", es decir, se aparta una porción de pie de cuba y se repite nuevamente el procedimiento de propagación de la semilla hasta llenar otra tina. Al completar una segunda tina se denomina "contrapunta" y se vuelve apartar una porción. Luego, al repetir el procedimiento de alimentación, se obtiene una tercera tina a la cual le llaman "tronco", y por último se produce una cuarta tina, de la cual se obtiene el pulque "de barrida", que es el que finalmente sale al mercado (Fuente: Sr. Cenobio Becerra G., agrónomo productor de agave y pulque, Edo. Tlaxcala). Resulta evidente que este método permite una mayor producción que el otro, sin embargo, se incrementa la merma hasta un 10% y puede aumentar el riesgo de contaminación por tanta manipulación si es que no se toman las medidas necesarias.

Dada la facilidad con la que el producto se puede contaminar y/o adquirir características indeseables, hace notar la magnitud de la complejidad de procesos de fermentación. Por lo que existen un gran número de adjetivos para clasificar los pulques defectuosos, y algunos se relacionan fuertemente con los procesos bioquímicos resultantes: "picado" (sufrió una fermentación láctica), "delgado" (baja viscosidad o deficiente producción de dextranas), "agrio" (excesiva producción de ácido láctico y ácidos orgánicos), "chamalte, tlachique o aguamielado" (deficiente producción de alcohol), "empachado" (aguamiel poco transformado por insuficiente inóculo), "húmedo o desabrido" (aguamiel diluido por lluvias o fraudes), etc.

Los fraudes son adulteraciones donde se agregan fuentes de azúcares distintas a las presentes naturalmente, ejemplos se sabe el organillo molido (un cactus), sacarina, linaza, gomas espesantes, fécula, almidones, agua, sacarosa e intencionalmente alcohol (Loyola, 1956).

4.3.3.1 Semilla de pulque.

La Norma Mexicana NMX-V-037-1972 para Pulque, define a la semilla de pulque como el producto obtenido del empleo del aguamiel de primer grado de calidad (Tipo 1) y que se prepara para lograr una microbiota óptima que determina una correcta fermentación, en la elaboración del pulque, y pudiendo agregarse las sustancias que, aprobadas por la Secretaría de Salubridad y Asistencia, se destinen a favorecer el mejor crecimiento de los diversos microorganismos propios del aguamiel que intervienen en el proceso fermentativo.

Dicha norma no señala restricciones sobre el tipo de sustancias que se pueden agregar para favorecer el desarrollo de la fermentación, tampoco especifica cómo es una “flora microbiana óptima”, esto es debido a que hay muy poca información respecto al inóculo (la semilla). A la fecha no se sabe a ciencia cierta la composición óptima de microorganismos que debe tener. Además existe un gran hermetismo de los productores lo que origina una gran especulación y rumores negativos sobre su composición, generando desconfianza en los consumidores

En 1977 el Dr. Sánchez Marroquín señaló que los microorganismos que deben estar presentes en la semilla y que son esenciales en el proceso de la fermentación del pulque son: *Leuconostoc dextranicum* y *Leuconostoc mesenteroides*, responsables de la fermentación viscosa, que conlleva en la producción de dextranas y β -glucanos; lactobacilos homolácticos y heterolácticos, que producen ácido láctico y acético; *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*, que producen alcohol y CO₂ lo que le da la característica espumosa al pulque y peculiarmente *Z. mobilis*, que produce también ácido láctico y acetil carbinol que contribuyen también en la acidez de la bebida.

4.3.4 Estudios sobre la ecología microbiana del Pulque:

Los primeros estudios realizados en México sobre la bebida fueron de carácter histórico, étnico, social y médico. Fue hasta finales del siglo XIX que se iniciaron las investigaciones microbiológicas y químicas (Lappe, 1993), (tabla 4).

Tabla 4. Cronología de los principales estudios sobre la microbiología del pulque.

Año	Investigador	Estudio
1864	Río de la Loza	Primera observación de pulque al microscopio, creyó ver cúmulos de sustancias albuminoides pero no microorganismos.
1870	José Barragán	Describió las primeras levaduras aisladas del pulque, a las que identificó como especies del género <i>Cryptococcus spp.</i>
1892	Fernando Altamirano	Señaló que el aspecto opalino del pulque se debía a la presencia de multitud de bacterias suspendidas en mucilagós. Primero en reconocer la importancia de las bacterias en la fermentación del pulque.
1886	Ángel Gaviño	Logró aislar una levadura rosa, probablemente del género <i>Rhodotorula spp.</i> , y varias especies de bacterias, cocos, diplococos y bacilos.
1904	Ángel Gaviño	Presentó un trabajo sobre los microorganismos del pulque, describió a la levadura <i>S. cerevisiae agavica</i> y a la bacteria <i>Bacterium aceti</i> .
1904	Antonio Carbajal	Aisló las bacterias <i>Micrococcus luteus</i> y <i>M. translucidus</i> , y la levadura <i>S. cerevisiae agavicus silvestre</i> a la que consideró el agente principal de la fermentación alcohólica del pulque.
1916	Miguel Cordero	A partir del aguamiel, aisló varias levaduras que fueron identificadas por el francés Guillermond en los géneros de <i>Pichia spp.</i> y <i>Saccharomyces spp.</i> , sin indicar especies.
1926	Paul Linder	Perteneiente al instituto de fermentaciones de Berlín, realizó una estancia en México para estudiar los problemas relativos a la fabricación científica del pulque, de la cual publicó un trabajo: Importancia práctica y científica del estudio del pulque y mejoras para el uso del aguamiel; además se identificaron las bacterias <i>Bacterium iridescens</i> y <i>B. vermiforme</i> .
1928	Paul Linder	Describió las especies <i>Diplobacter viscosus</i> , <i>Leuconostoc spp.</i> , <i>Pediococcus major</i> , <i>P. minor</i> , <i>S. corrosus</i> y <i>Termobacterium mobile</i> .
1931	Fernández de Tagle	Presentó el estudio sobre las vitaminas del pulque, y señaló a <i>Leuconostoc mesenteroides</i> como el microorganismo responsable de la fermentación viscosa.
1932	Gerardo Varela	Describió dos especies de <i>Escherichia spp</i> del pulque. <i>E. wekanda</i> y <i>E formica</i> , y realizó un análisis interesante sobre la calidad higiénica de esta bebida.
1942	Ruiz Orozco	Estudió las levaduras y describió las especies <i>Saccharomyces carbajali</i> , <i>Pichia barragani</i> , <i>Torulopsis hydromelitis</i> , <i>T. aguamelis</i> y <i>Rhodotorula incarnata</i> como nuevas.
1942	Sánchez Marroquín y col.	Realizaron estudios sobre la actividad metabólica de diversas especies de microorganismos. Reconocieron las especies <i>L. dextranicun</i> y <i>L. mesenteroides</i> como parte de la biota normal del pulque.
1948	Pedro Brechtel	Presentó un estudio bacteriológico del aguamiel y del pulque, describió las especies <i>Micrococcus candidus</i> , <i>M. roseus</i> , <i>M. ruizii</i> , <i>Sarcina flava</i> y <i>Bacillus teres</i> .
1962	Sánchez Marroquín	Presentó un trabajo sobre el metabolismo de cinco especies de levaduras resgistradas por Ruíz Orozco, tres de las cuales consideró sinónimos de otras especies: <i>Saccharomyces carbajali</i> = <i>S. cerevisiae</i> , <i>Pichia barragani</i> = <i>Pichia membranaefaciens</i> , y <i>Torulopsis hydromelitis</i> = <i>Candida parapsilosis</i> .
1977	Sánchez Marroquín	Señaló que los microorganismos esenciales en el proceso de la fermentación del pulque eran <i>Leuconostoc dextranicum</i> y <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , responsables de la fermentación viscosa, que conlleva en la producción de Dextranas y β -glucanos; lactobacilos homolácticos y heterolácticos, que producen ácidos láctico y acético; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y <i>Zymomonas mobilis</i> , que producen alcohol y CO ₂ lo que le da la característica espumosa al pulque y peculiarmente <i>Z. mobilis</i> , que produce también ácido láctico y acetil carbinol que contribuyen también en la acidez de la bebida.
1989	Lappe y col.	Estudiaron 21 aislamientos de levaduras de pulque de diversas localidades. Determinaron como especies constantes a <i>S cerevisiae</i> , <i>P. membranaefaciens</i> (cuyo estado asexual corresponde a <i>C. valida</i>), <i>P. carsonii</i> , <i>Candida guillermondii</i> , y a <i>Kluiveromyces marxianus var. Bulgaricus</i> .
1990	Herrera y Calderón Villagómez	Estudiaron levaduras de pulque natural y curado, para el primero registraron por primera vez las especies <i>Candida coliculosa</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. rugopeliculosa</i> , <i>K. maxianus var. lacies</i> , y <i>S. cerevisiae</i> , razas acéti y globosus. Con excepción de <i>C. coliculosa</i> , todas las demás también fueron encontradas en el pulque.

Estudios recientes de Escalante (2004), determinaron la diversidad bacteriana del pulque mediante la secuenciación del gen rDNA 16S. Reportaron la predominancia de especies de *Lactobacillus spp* (80.97%), e identificaron por primera vez en el pulque las especies *Lactobacillus* cepa ASF36 y *L. acidophilus*, las cuales forman parte de la microbiota en intestinos en animales y humanos; y otras anteriormente descritas: *Lactobacillus acetotolerans*, *L. hilgardii*, *L. kefir*, *L. plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Microbacterium arborescens*, *Flavobacterium jhonsoniae*, *Acetobacter pomorium*, *Gloconobacter oxydans* y *Hafnia alvei*.

En otro estudio se realizó un análisis de la comunidad bacteriana del aguamiel y semilla de pulque, mediante técnicas moleculares. Éste señala que la diversidad bacteriana del aguamiel está compuesta mayoritariamente por las heterofermentativas *Leuconostoc citreum*, *L. mesenteroides*, *L. kimchi*, y las proteobacterias *Erwinia rhapontici*, *Enterobacter spp*, y *Acinetobacter radioresistens*, estas últimas son atribuidas a manejos poco higiénicos.

Se observó que el pulque, empleado como semilla, incorpora microbiota homofermentativa del género *Lactobacillus*, en específico, cepas como *L. acidophilus*, proteobacterias como *Zymomonas mobilis* y *Acetobacter malorum*, y una importante cuenta de levaduras.

Al final de la fermentación se detectó que la diversidad bacteriana está compuesta por la homofermentativa *Lactobacillus acidophilus*, la heterofermentativa *L. mesenteroides*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y la proteobacteria *A. malorum* (Escalante., 2008).

A continuación se presenta una tabla con los microorganismos predominantes y constantes durante la fermentación espontánea del aguamiel, así como los microorganismos esenciales en la fermentación industrial (tabla 5).

Tabla 5: Microbiota representativa del pulque y principales productos se fermentación (Lappe 2008). (Sánchez Marroquín, 1977)

Microbiota funcional	<u>Fermentación espontánea</u>
	<ul style="list-style-type: none"> • Bacterias ácido lácticas: <i>Lactobacillus spp.</i>, <i>L. brevis</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>L. mesenteroides spp.</i> • Proteobacterias: <i>Zimomonas mobilis spp.</i> • Levaduras: <i>no-Saccharomyces (Candida spp., C parapsilosis, Clavispora lusitaniae, Haanseniaspora uvarum, Kluyveromycews marxianus, Kluyveromyces lactis, Pichia membranifaciens, Pichia spp. Torulaspora delbrueckii), Saccharomyces (S. bayanus, S cerevisiae, S. paradoxus).</i>
	<u>Fermentación Industrializada</u>
	El cultivo iniciador es una mezcla de <i>Lactobacillus spp</i> , <i>Z. mobilis spp.</i> y <i>S. cerevisiae</i> . Además la mezcla puede contener o no especies de <i>Leuconostoc</i> (productor de exopolisacáridos).
Productos de fermentación	Etanol (4-6%), ácidos orgánicos, dextranos, vitaminas, aminoácidos, ésteres, aldehídos, diacetilo y CO ₂ .

4.3.5 Industria del Pulque.

Un aspecto sumamente importante para la producción del pulque, es el aprovechamiento agrícola del maguey en grandes cantidades. Actualmente las hectáreas dedicadas a la plantación del agaves pulquero han decaído debido a que los productores ven poco redituable esperar de 8 a 10 años a que crezca la planta y poder explotarla. Sn embargo, aunque parece que la industria está casi extinta, y que ha habido intentos fallidos para rescatarla, en el siglo XXI se sigue impulsando la industrialización de la bebida.

En los años 60 se desarrollaron tecnologías tendientes y experimentos enfocados a la estandarización del proceso de producción del pulque, dicho proceso se describe a grandes rasgos a continuación:

- **Materia prima.** Aguamiel pasteurizado.
- **Inóculo.** Utilización de cultivos puros de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* para la fermentación alcohólica, *Lactobacillus spp.* para la fermentación láctica y *Leuconostoc mesenteroides* como agente de viscosidad.
- **Fermentación.** Para una planta con capacidad de 50 000 litros diarios de pulque, los autores proponen 10 tanques de 5 000 litros para una etapa de fermentación y 5 tanques de 10 000 litros para una etapa de maduración (propagación).

Dichos tanques se esterilizan y la fermentación se controla a una temperatura de entre 20 a 25°C. El proceso dura de 48 a 72 horas. No se mencionan datos sobre la aireación y el acondicionamiento del producto (García, 2004).

Para 1970 existían 3 plantas que utilizaban dicho proceso y se encaminaban en la fabricación del pulque enlatado. Por desgracia resulta evidente el fracaso que tuvo su venta en tiendas de autoservicio y a la fecha se prefiere mucho más el pulque elaborado tradicionalmente.

Actualmente se sigue impulsando la producción de pulque enlatado, aparentemente los productores están optando por enlatar o embotellar la bebida preparada del modo tradicional y sin el empleo de cultivos puros, pero con las dificultades que esto implica.

Empresas como Néctar del Raso S.A. de C.V. (Tlaxcala), Pulquemex (Hidalgo), Torre Grande (Puebla, Tlaxcala e Hidalgo) y Poliwhuil (Hidalgo) por ejemplo, han encontrado un mercado en crecimiento del pulque enlatado exportándolo a países de Europa, Asia y Estados Unidos, al representar este como un producto innovador y por la alta demanda que se ha acentuado en dichos países (Bancomext, 2007).

La mayor producción de pulque se encuentra en el estado de Hidalgo con el 70% de la producción nacional, teniendo un promedio 112 mil litros al mes, después sigue el estado de Tlaxcala que produce y consume 35mil litros al mes y el Estado de México con 17mil litros al mes (Abundis, 2007).

Aunque hay muchas modalidades del pulque y el proceso de elaboración del mismo varía según las tradiciones de los grupos étnicos que lo consumen, casi todos los estudios sobre dicha bebida están enfocados al aspecto microbiológico de la bebida. Aún así, hace unos años se realizó un trabajo sobre el pulque curado de avena, que es una de las muchas variedades de los llamados pulques curados, los cuales son elaborados con base de pulque blanco, a la que se adiciona algún producto vegetal, en particular cereales, verduras, frutas o semillas (Herrera 1990).

Como ejemplo, la empresa Torre Grande (“Pulque de Hacienda 1881”) se dedica a la exportación de pulque enlatado natural y curado (mango, piña, maracuyá y limón). Con una producción de 300 mil latas, el 90% son destinadas a venderse en Estados Unidos y el resto en países como Alemania, Austria y nuestro país.

4.4 Fermentación.

La fermentación es un tipo de catabolismo parcial, que se caracteriza por ser un proceso de oxidación incompleta, típico de los organismos anaeróbicos, es decir, sin la intervención de oxígeno. Durante la fermentación, la energía obtenida procede, igual que en la respiración aerobia, de las reacciones de oxido-reducción habidas durante el catabolismo de la glucosa (glucólisis), pero en la fermentación las coenzimas reducidas no ceden sus electrones a una cadena cuyo aceptor final es el oxígeno, sino que los ceden directamente a un compuesto orgánico que se reduce y es el producto característico de cada fermentación (láctica, alcohólica, acética, etc.).

4.4.1 Fermentación alcohólica.

En el pulque la fermentación se realiza principalmente por levaduras del género *Saccharomyces spp.* y ciertas bacterias como *Zymomonas mobilis* que poseen la enzima alcohol deshidrogenasa. Las moléculas de glucosa o fructosa sufren glucólisis originando ácido pirúvico. Este ácido pirúvico sigue la vía metabólica Embden-Meyerhof en condiciones anaeróbicas. El píruvato se descarboxila liberando CO₂ para transformarse en acetaldehído, el cual se reduce a alcohol etílico por acción del NADH convirtiéndose así en el aceptor final de los electrones del NAD⁺ obtenido en la glucólisis (figura 7). La cantidad de alcohol producido es sumamente importante durante la elaboración de bebidas tales como el vino, cerveza, sidra, etc., y el pulque no es la excepción.

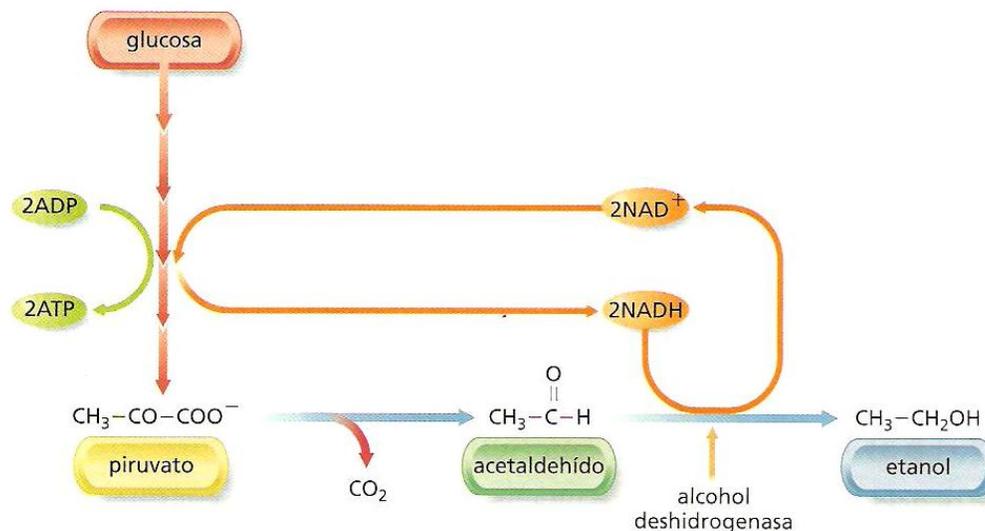


Figura 7. Fermentación alcohólica. Conversión del piruvato a etanol (Berg., 2008).

4.4.1.1 Las levaduras y *Saccharomyces cerevisiae*.

Las levaduras son organismos unicelulares eucariontes que se reproducen vegetativamente por germinación y sexualmente formando ascosporas. Se consideran organismos quimiorganótrofos, es decir, los que requieren una fuente de carbono orgánico y una fuente de energía producida por reacciones de óxido reducción a partir de monosacáridos y oligosacáridos, tales como la glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, lactosa, melobiosa, tetralosa y rafinosa, sin embargo, no utilizan el CO₂ como fuente de carbono. Por otro lado tampoco asimilan directamente el N₂ atmosférico como fuente de nitrógeno, pero si son capaces de asimilarlo de fuentes tales como las sales de amonio, aminoácidos simples, aminas, urea y nitratos (Villalpando, 2004).

Metabólicamente, las levaduras son organismos predominantemente anaerobios facultativos, es decir, son organismos capaces de crecer tanto en ausencia de oxígeno (fermentación) como en presencia de este mismo (respiración). En el caso del proceso fermentativo, la ganancia neta energética es de dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADH por cada molécula de glucosa. Mientras tanto, el metabolismo aeróbico o respiración, es el metabolismo de mejor rendimiento energético de la célula, ya que se generan una ganancia energética neta de 36 moléculas de ATP y 4 moléculas de agua, por molécula de glucosa, además de precursores metabólicos esenciales en la biosíntesis de componentes celulares. Como resultado de esto, dependiendo de las concentraciones de oxígeno presente en el ambiente o en un sistema de fermentación, la levadura desempeñará en cierta medida uno o ambos metabolismos.

Algunos de los factores que influyen directamente sobre en el crecimiento de *S. cerevisiae* son la temperatura, concentración de azúcar, pH y tolerancia al etanol. Se considera que el crecimiento de la célula en general está en 20-30°C, sin embargo, se ha visto que la temperatura máxima en que sigue creciendo está entre los 35 - 43°C.

Un parámetro físico importante es el pH, como es sabido las levaduras se favorecen en ambientes ácidos, y por tanto, para *S. cerevisiae* se considera un pH óptimo oscilante entre 4.5-6.5, pero se ha visto que se desarrolla desde pH = 3 hasta pH = 8. Por otro lado, la concentración de azúcar puede ser un factor determinante en el crecimiento, ya que una o varias fuentes de carbono por lo general resultan benéficas, se sabe que en grandes cantidades en el medio pueden ejercer una presión osmótica tal que inhiba el crecimiento de la célula.

Finalmente el etanol también puede representar un factor inhibitorio sobre el desarrollo de la célula, por ejemplo, Novojo y Ouchi (1962) determinaron la tolerancia para cepas en un rango entre 20 – 30% v/v y en el caso de *S. cerevisiae* se ha determinado una concentración de etanol que ejerce efecto inhibitorio de 13% v/v (Déak T. 1996).

4.4.1.2 *Zymomonas mobilis*.

Originalmente esta bacteria fue aislada como contaminante en la producción de sidra en 1912, desde entonces ha sido blanco de numerosos estudios, y gracias a su eficiencia evidenciada desde 1931 por Kluyver y Hooppenbrouwers para producir etanol se buscan muchas aplicaciones biotecnológicas con este microorganismo. En los años 60 fue utilizada a nivel industrial para la producción de pulque, obtenido por fermentación con cultivos de *Lactobacillus spp.* y *Leuconostoc mesenteroides* (Sánchez Marroquin, 1970), desde entonces fue descrita como microorganismo esencial durante la fermentación del aguamiel.

Zymomonas mobilis es una bacteria Gram negativa con morfología bacilar de 1 a 5 μm de ancho por 2 a 6 μm de largo, se caracteriza por tener un arreglo celular del tipo pleomórfico (cadenas, rosetas o filamentos), es un microorganismos anaerobio y microaerófilo que presenta reacción positiva a la prueba de catalasa, y negativa a la oxidasa. No posee esporas ni cápsula, sin embargo, tiene la capacidad de producir levanas a partir de sacarosa como fuente de energía. Las únicas fuentes de carbono que puede metabolizar son la glucosa, fructosa y sacarosa (Favela, 1993). En general esta bacteria crece en un rango de temperaturas de 20-40°C y un rango de pH de desarrollo de 3 a 7 (Swing, 1977).

A diferencia de las levaduras, la gran capacidad de esta bacteria para producir etanol y dióxido de carbono no se lleva por medio de la vía metabólica EMP, si no por la vía de Entner-Doudoroff (figura 8), es por este aspecto que se le ha clasificado dentro de la familia de las *Pseudomonadaceae* (Doelle Horst & Greenfield, 1985). Por medio de dicha vía metabólica, *Z mobilis* es capaz de producir 1.9 mol de etanol por cada mol de glucosa, con un rendimiento típico de un 5-10% mayor que la de la mayoría de las levaduras (Rogers P. 1982), pero es ineficiente para producir biomasa, ya que solamente obtiene una molécula de ATP por cada molécula de hexosa metabolizada. También produce ácido láctico y acetil carbinol que contribuyen en la acidez del pulque.

Una característica a destacar es que la membrana celular de *Z. mobilis* contiene hemanoides y componentes pentacíclicos (similares a los esteroides en células eucariontes) que le confieren una mayor tolerancia al etanol (alrededor del 13%) y altas concentraciones de azúcar en el medio. Se ha visto por estudios de Swing y Deley (1977), que *Zymomonas mobilis* llega a crecer en medios que contienen de 200 a 400 g/l de glucosa.

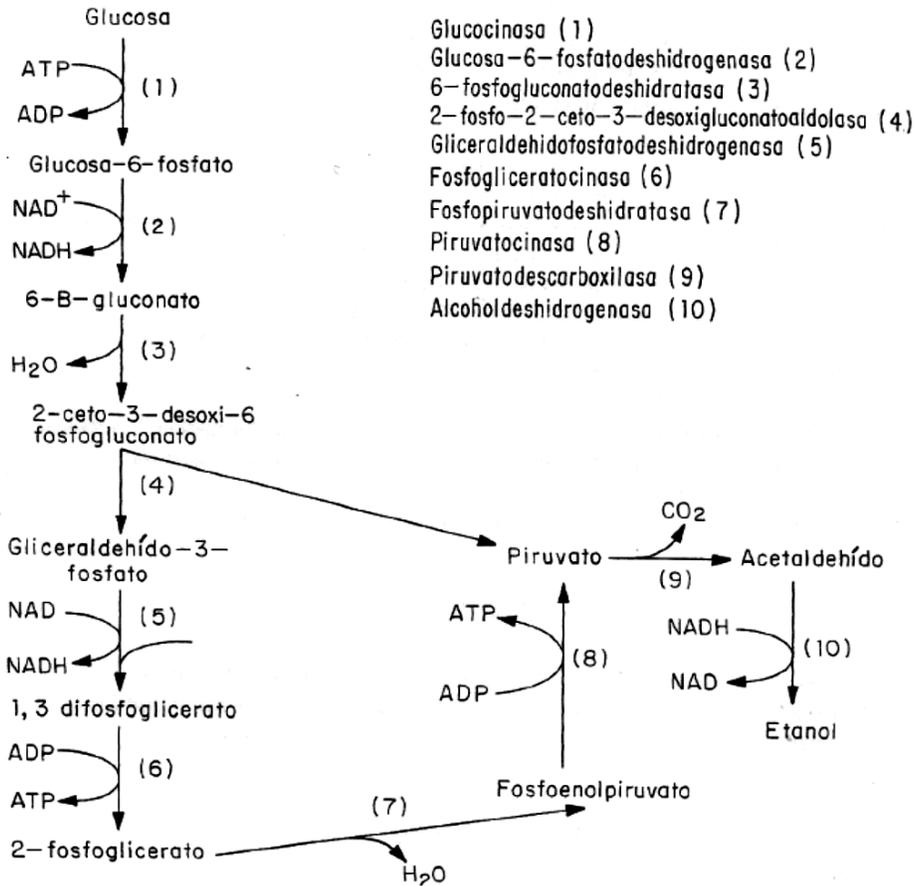


Figura 8. Vía metabólica de degradación de sustrato de Entner-Doudoroff (Favela 1993).

En resumen las principales ventajas de *Z. mobilis* sobre las levaduras para la producción de etanol son:

- Mayores velocidades específicas de consumo de sustrato y producción de etanol.
- Rendimiento de etanol superior, pero menor rendimiento de biomasa.
- No es necesario el control y aporte de oxígeno durante la fermentación.
- Mayores posibilidades a la manipulación genética.

4.4.2 Fermentación ácido láctica.

La fermentación láctica es un proceso biológico dado en condiciones anaerobias, que producen principalmente algunas bacterias y células de animales (células musculares). En este proceso la glucosa, fructosa o sacarosa se convierten en energía celular y en lactato como subproducto de la fermentación, el cual le da un carácter ácido en los alimentos que sufren dicho proceso.

4.4.2.1 Bacterias ácido lácticas.

El grupo de las bacterias ácido lácticas incluyen los siguientes géneros de microorganismos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*. Posteriormente se incluyeron los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium* y *Vagococcus*. Se caracterizan todas ellas por ser bacterias Gram positivas, catalasa y citocromo negativos, y principalmente por producir ácido láctico como subproducto de la fermentación a partir de las hexosas.

Se encuentran regularmente en la mucosa del tracto intestinal del humano y de otros animales, también están presentes en alimentos fermentados de origen lácteo, cárnico, jugos de frutas o productos vegetales fermentados donde desempeñan un papel primordial en su elaboración. Por otro lado muchos de ellos actúan como agentes probióticos dando beneficios a la salud regulando la microbiota intestinal (Amores R. 2004).

Con base en los productos finales del metabolismo de la glucosa, las bacterias ácido lácticas se dividen en dos grupos principales: BAL homofermentativas, que producen ácido láctico como producto principal o único en la fermentación, y BAL heterofermentativas, que producen cantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono y etanol a partir de las hexosas. Se ha generalizado que los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y algunas especies de *Lactobacillus* son homofermentativos, mientras que todas las especies de *Leuconostoc*, así como especies de *Lactobacillus* son microorganismos heterofermentativos.

Por otra parte las bacterias homolácticas poseen las enzimas aldolasa y hexosaisomerasa, pero carecen de fosfoctolasa. Utilizan la vía Embden-Meyerhoff-Parnas para producir dos moléculas de lactato por molécula de glucosa. Sin embargo, las bacterias heterolácticas tiene fosfoctolasa pero no poseen ni aldolasa ni hexosaisomerasa, y en lugar de utilizar la vía EMP, utilizan la vía del monofosfato o de las pentosas, (figura 9) (Kandler, 1983).

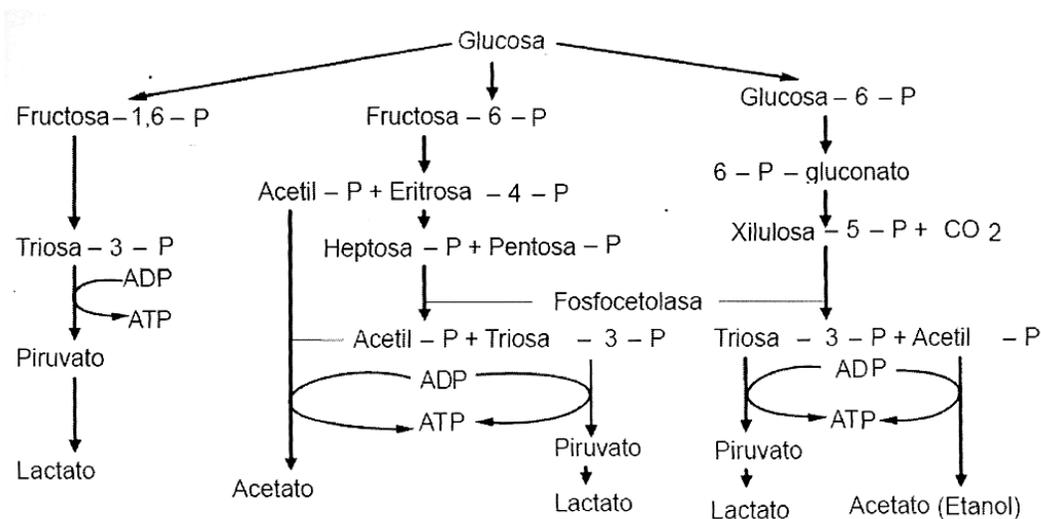


Figura 9. Vías metabólicas de degradación de hexosas por bacterias ácido lácticas (Kandler, 1983).

Ambos grupos son relevantes en la industria alimenticia, sin embargo, las bacterias heterolácticas presentan un valor adicional sobre las homolácticas por su capacidad de producir componentes de aroma y sabor en alimentos fermentados tales como aldehídos y el diacetilo.

En cuanto a las exigencias nutricionales y factores ambientales que influyen sobre el crecimiento, las bacterias ácido lácticas por lo general requieren de aminoácidos preformados, vitaminas del grupo B, bases nitrogenadas y algunas de minerales como Mg y Mn para su metabolismo enzimático.

Si bien son considerados como mesófilos, ciertas especies son capaces de crecer a 5°C, mientras que cepas de lactobacilos termófilos tienen temperaturas óptimas de crecimiento de 40-45°C. Con respecto a su pH de crecimiento, algunas son capaces de crecer a pH tan bajo como 3.2 y otras tan alto como 9.6, pero la gran mayoría presentan su mejor desarrollo entre 6 y 7. Se consideran bacterias débilmente proteolíticas y lipolíticas (Jay, 2006).

4.4.3 Producción de polisacáridos.

En el pulque esta fermentación es debida principalmente a bacterias del género *Leuconostoc spp.*, pero en específico es recurrente la presencia de especies como *L. mesenteroides*, *L. dextranicum* y *L. citreum*, donde a partir de los azúcares presentes en el aguamiel producen un polisacárido del tipo dextrana que le confiere viscosidad y textura gomosa a la bebida (Escalante 2008).

Las soluciones con dextranas tienen un comportamiento reológico no Newtoniano, y por tanto tienden a ser muy viscosas y espesas de tipo pseudoplástico (Harrys, 1992), es por ello, que en la industria alimenticia se utilizan principalmente para proveer volumen y cuerpo.

Las dextranas son α -D-glucanos u homo polisacáridos de glucosa de alto peso molecular que tiene una cadena principal con enlaces α -1,6 y ramificaciones α -1,3 y α -1,4. Además de *Leuconostoc spp.*, también pueden ser sintetizadas por otras especies bacterianas como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, y *Aerobacter*. En este proceso se ve implicada la enzima dextrano sacarasa (glucosiltransferasa), que cataliza la siguiente reacción mostrada en la figura 10. (García, 2004).

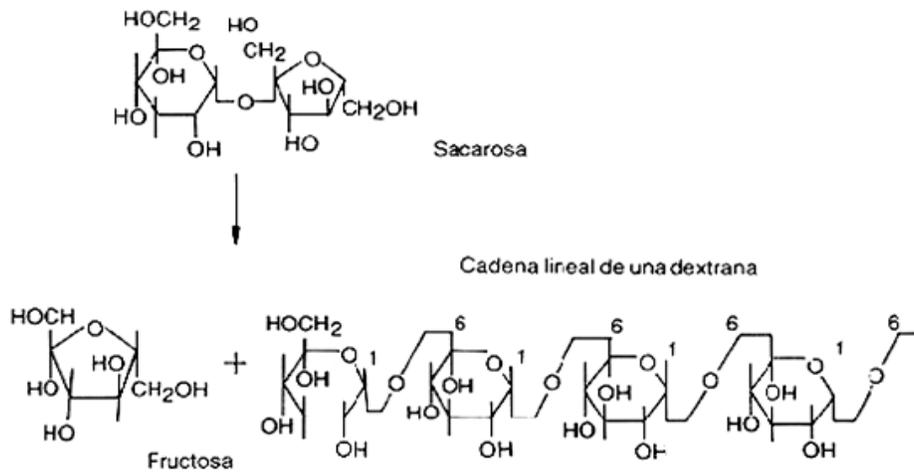


Figura 10. Síntesis de la dextrana por fermentación de sacarosa como sustrato.

4.4.3.1 *Leuconostoc mesenteroides*.

Anteriormente se mencionó que la especie *L. mesenteroides* pertenece a un grupo de bacterias conocido como bacterias ácido lácticas, esta bacteria se considera dentro del grupo de las heterofermentativas, por su capacidad de producir, dextranas, CO₂ y etanol además de ácido láctico. Las bacterias de *Leuconostoc* generalmente tienen morfología cocoide ovoide y a menudo forman cadenas.

Se considera un mesófilo, con temperaturas óptimas de crecimiento de alrededor de los 30°C, sin embargo, hay datos que llega a sobrevivir a 2°C durante doce días de almacenamiento. (Reuter, 1981).

4.4.4 Fermentación acética.

4.4.4.1 *Acetobacter spp.*

Aunque en el pulque se lleva a cabo en menor medida, el producto final que es el ácido acético, también influye en las propiedades sensoriales de esta bebida. La fermentación acética se lleva a cabo principalmente por bacterias pertenecientes al género *Acetobacter spp.*

La principal propiedad que distingue a este género de bacterias es su capacidad de convertir el etanol en ácido acético en presencia de oxígeno (Madigan, 2004). Esta habilidad es debida a que posee los mecanismos funcionales del ciclo del ácido tricarboxílico y por ello puede oxidar el acetato a dióxido de carbono (Stainer, 1992). Principalmente es utilizada para la producción del vinagre industrial debido a su altísima tolerancia a niveles altos de etanol y al pH bajo.

4.5 Métodos de Conservación de microorganismos.

En la actualidad, la industria de alimentos fermentados emplea comúnmente cepas o cultivos microbianos iniciadores que les permiten alcanzar un control sobre el proceso de fermentación y la estandarización de sus productos.

Muchas veces se adicionan por que ofrecen uno o más atributos sensoriales, o porque proporcionan ventajas tecnológicas, nutricionales o beneficiosas a la salud; o porque simplemente se ha demostrado que determinado cultivo es esencial y toma un lugar importante en alguna fermentación. Es por tanto importante mantener los cultivos microbianos por largos periodos de tiempo para ser inoculados en las mejores condiciones y que estos desempeñen correctamente su funcionalidad, tanto utilizados en la investigación como en la biotecnología.

Los tres objetivos necesarios para conservar correctamente los cultivos microbianos son:

- Pureza: El cultivo sea puro o libre de microorganismos perjudiciales o antagónicos, evitando así, que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación o en la fermentación en sí.
- Viabilidad: En el tiempo de conservación sobrevivan al menos el 70-80% de las células
- Estabilidad: Las células permanezcan bioquímicamente y genéticamente estables.

Existen varios métodos para la conservación de microorganismos, todos buscan que las células sufran el mínimo daño y se preserven por el máximo periodo de tiempo posible. Los procedimientos más comunes son: La resiembra, la congelación, la liofilización y el secado, en la tabla 6 se hace una breve comparación de estos métodos.

Tabla 6: Comparación de los principales métodos de conservación de microorganismos, ventajas y desventajas (Lapage, 1970) (Hernández, 2002).

Método de conservación	Descripción	Equipo requerido	Ventajas	Desventajas
Resiembra o subcultivo	Consiste en sembrar el microorganismo en determinado medio de cultivo. El procedimiento se debe repetir cada cierto tiempo.	Tubos de agar inclinado. Refrigerador 4°C.	Simple y no requiere equipo especializado o costoso.	Muerte del cultivo por deshidratación del medio. Mucha mano de obra. Probabilidad de cambios genéticos o bioquímicos. Riesgo de contaminación por resiembras.
Congelación	Disminución de la temperatura del medio de cultivo (líquido) hasta alcanzar el estado de congelación y formación de cristales. Suspensión del cultivo en un agente crioprotector.	Uso de criotubos y agentes crioprotectores. Equipo especializado de enfriamiento: Congelación ordinaria (-5 a 20°C) Ultra-congelación (-50 a -80°C) Congelación con N2 líquido (-150 a -196°C).	Largos periodos de conservación de hasta 20 años con N2 líquido, 5 años ultracongelación y de 1 a 2 congelación ordinaria. Menos riesgo de contaminación. Pocos cambios genéticos y bioquímicos.	El equipo con N2 líquido es costoso y necesita un flujo continuo. Previsiones a fallas mecánicas o eléctricas. Equipo especial para transporte.
Liofilización	Remoción del agua de las células congeladas mediante la sublimación la misma aplicando presión reducida (vacío). Suspensión del cultivo en un agente crioprotector.	Agente crioprotector. Uso de recipientes tolerantes al alto vacío y bajas temperaturas. Equipo: Liofilizador. Refrigerador 4°C.	Alrededor de 20 años el periodo de conservación. Almacenamiento en refrigeración. Menos riesgo de contaminación. Pocos cambios genéticos y bioquímicos. Fácil transporte y manejo.	Gasto inicial del equipo muy costoso. Errores en los tiempos y velocidad de congelación pueden dañar significativamente a la célula.
Secado	Remoción del agua e impedir la rehidratación por medio de calor, aire o vacío. Empleo de un material de soporte.	Material de soporte. Refrigerador 4°C.	Fácil aplicación. No requiere de equipos especializados generalmente. Recomendable para microorganismo esporulados.	Menor viabilidad que otros métodos. Menor tiempo de conservación.

4.5.1 Congelación y ultracongelación.

4.5.1.1 Definición.

La congelación es un fenómeno físico que se produce a consecuencia de un descenso de la temperatura por debajo de los cero grados centígrados (paso del estado líquido a sólido del agua). Se maneja que en los alimentos el punto de congelación está entre los -2°C a -5°C. La congelación no solo implica una disminución del calor sensible de un producto, si no también es necesario retirar el calor latente asociado a la transición de líquido a sólido para que se dé el cambio de estado del agua.

Como consecuencia de la formación de cristales de hielo se produce una disminución de la actividad de agua en la fase líquida, es decir, el agua deja de estar disponible para reacciones químicas, enzimáticas, etc (Fennema, 1973).

4.5.1.2 Procedimiento general y consideraciones.

Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida se detiene su crecimiento y metabolismo. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura, pero, existen ciertos factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas, los cuales son:

- **Velocidad en la congelación:** Es mejor que las variaciones de temperatura sean rápidas tanto para la congelación; una congelación lenta favorece la formación de cristales grandes con posibilidad de mayor daño en membranas y paredes celulares, por lo que una congelación rápida forma cristales pequeños y el daño a la célula es menor y la viabilidad se ve menos afectada.
- **Temperatura de almacenamiento:** Debe ser lo más baja posible, de preferencia inferiores a -50°C, a temperaturas entre -20°C y -40°C, no es aconsejable, entre otras cosas porque debido a la gran concentración de solutos que existen en la suspensión celular, su punto de congelación baja. El daño que se produce en las células es debido a que a estas temperaturas hay frecuentes congelaciones y descongelaciones. Si se añade un crioprotector no iónico, como por ejemplo el glicerol, se reduce la cantidad de hielo que se produce y se evita el aumento de la concentración sales y la formación de sus respectivos cristales.
- **Material y respaldos:** Para la conservación en armarios congeladores, las células se almacenan en criotubos (tubos de plástico esterilizables resistentes a la congelación que cierran herméticamente) o también se emplean tubos con criobolas (bolitas que se impregnan con la solución celular a congelar). La principal ventaja de los criotubos es que se pueden adicionar soportes y medios de cultivo que permitan la mayor sobrevivencia de las células durante su almacenamiento. Por otro lado la ventaja de las criobolas es que basta con tomar una o varias bolitas sin necesidad de descongelar el resto para tomar una muestra.
- **Empleo de agentes crioprotectores:** Existen muchas sustancias utilizadas como crioprotectores, pero el más usado es el glicerol a una concentración del 15 al 20%. La mayoría de los casos se utilizan soluciones con glicerol al 15% para conservar levaduras y al 30% para conservar Bacterias ácido lácticas u otras bacterias.

También se utilizan el dimetilsulfóxido, la leche descremada y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa, inositol, etc. En su elección influye el tipo de microorganismo que se quiera conservar (Hernández, 2002).

4.5.2 Liofilización.

4.5.2.1 Definición.

La liofilización es un proceso que remueve el agua y/o solventes de un producto previamente congelado, a través de su sublimación y desorción mediante el vacío. En este proceso no se alteran las propiedades fisicoquímicas y permite la estabilidad microbiológica con menos del 15% de humedad. En alimentos es ideal ya que a diferencia del secado con calor, existe un mínimo encogimiento, poca alteración de propiedades sensoriales. Se recomienda para productos que no deben ser calentados ni a temperaturas moderadas. Otra ventaja de este método sobre el secado es que el liofilizado presenta una mejor rehidratación que el producto deshidratado convencional.

4.5.2.2 Procedimiento general y consideraciones.

Por este método tampoco se da crecimiento en las células conservadas, puesto que se les ha eliminado el agua mediante la liofilización. La liofilización se consigue por sublimación del hielo de las células. Por lo tanto, primero tenemos que congelar el agua libre de las células y después eliminarla mediante el vacío, sin que haya necesidad de subir la temperatura, lo que acabaría afectando a la viabilidad del microorganismo.

Para este proceso se emplean los aparatos denominados liofilizadores. Este es un método muy recomendable por su comodidad para el almacenamiento y para el envío de las cepas, pues una vez conseguidos los líofilos pueden almacenarse a temperatura ambiente (18°C-20°C), (Hernández, 2002). Los factores que hay que tener en cuenta para hacer una buena liofilización son lógicamente los mismos que influyen en la congelación, a los que habrá que añadir otros que surgen como consecuencia de la deshidratación.

Respecto a los crioprotectores, se pueden utilizar varios dependiendo del tipo de microorganismo, pero para liofilizar no se debe utilizar glicerol, debido a su elevado punto de evaporación y a su higroscopicidad. Tampoco es conveniente utilizar el dimetilsulfóxido, porque es algo tóxico, y al concentrarse por la evaporación del agua puede dañar a las células microbianas.

Por lo tanto, para la liofilización se recomiendan crioprotectores como el inositol y la leche descremada para la mayoría de las bacterias, levaduras y actinomicetos, pero para algunos microorganismos pueden ser más convenientes otros crioprotectores, como por ejemplo el glutámico-glutamato para las bacterias lácticas, mezclas de glucosa con caldo de hígado o carne molida para bacterias anaerobias, etc. Algunos otros factores que influyen específicamente en la eficacia de la liofilización como medio de conservación son:

- **Tipo de microorganismo:** Hay algunos que no resisten la liofilización y lógicamente serán aquéllos que contengan más agua en su interior. Algunos hongos filamentosos, especialmente los no esporulados, no se pueden guardar liofilizados y hay que recurrir a otros métodos (Juarros, 1993).
- **Concentración celular:** Para bacterias se recomienda liofilizar suspensiones celulares con una concentración del orden de 10^8 - 10^9 células/ml y en el caso de hongos filamentosos y levaduras se pueden utilizar concentraciones inferiores.
- **Temperatura durante la sublimación:** Debe ser lo más baja posible, sin subir por encima de -50°C .
- **Grado de deshidratación alcanzado:** Debe ser lo más alto posible, aunque puede existir una pequeña cantidad de agua remanente que no es perjudicial.

4.5.3 Secado.

El método consiste en remover el agua e impedir la rehidratación de los microorganismos, esto disminuye drásticamente la actividad metabólica. Para llevarlo a cabo se inocula una muestra de cultivo en un soporte estéril, se seca con corrientes de aire o al vacío y luego el cultivo se guarda en atmósferas secas o en refrigeración, también se utilizan equipos de secado por aspersión que reducen significativamente los tiempos de secado. Algunos de los principales materiales de soporte pueden ser la silica gel, discos de gelatina, tiras de papel o algunas harinas y carbohidratos (Kirsop, 1991).

Utilizando este método se reporta una viabilidad del 50% por algunos años, sin embargo, la viabilidad es menor respecto a los otros dos métodos. Este método se recomienda para especies de microorganismos esporulados.

5. JUSTIFICACIÓN

La tradición mexicana del consumo del pulque se encuentra en vías de extinción ante la abundancia de nuevas y diversas bebidas, así como a los cambios en los hábitos de su consumo. Es necesario entonces modificar la bebida tradicional, para producir una con características aceptables por los consumidores actuales. Es por ello importante contar con una materia prima libre de impurezas y microorganismos no deseables, así como con un inóculo que cuente con los microorganismos necesarios (bacterias y levaduras) que permitan un proceso fermentativo controlado y adecuado que finalmente ayude a impulsar la industria pulquera.

6. HIPÓTESIS

Dado que los principales métodos de conservación garantizan la sobrevivencia de microorganismos durante largos periodos de tiempo, y que la semilla de pulque que se empleó como inóculo proviene de un mismo lugar, se espera que el desarrollo microbiano, consumo de carbohidratos y producción de etanol sean similares durante la fermentación de aguamiel usando una semilla conservada por congelación, liofilización o secado.

De acuerdo con resultados preliminares, se espera que el uso de aguamiel ajustado a 10°Bx favorezca el desarrollo de microorganismos y la producción de etanol que otro con 8°Bx.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general:

Evaluar el efecto de algunos métodos de conservación (congelación, liofilización y secado), aplicados en la semilla de pulque tradicional, durante la fermentación del aguamiel.

7.2 Objetivos particulares:

- Determinar cuál concentración de carbohidratos del aguamiel, si 8°Bx o 10°Bx, permite el mayor desarrollo de los microorganismos involucrados durante la fermentación, y el mayor contenido alcohólico al término de la misma.
- Evaluar el efecto de pasteurizar del aguamiel antes de la fermentación.
- Evaluar la eficiencia como fermento de semilla almacenada usando cada método de conservación, a través de un periodo de almacenamiento (de 30 a 90días).
- Seleccionar un método de conservación de la semilla de pulque con base en el crecimiento de BAL y levaduras, actividad metabólica (pH, consumo de carbohidratos) y contenido de etanol producido durante la fermentación del aguamiel.
- Determinar si es posible obtener una concentración de etanol de 6% v/v en la fermentación del aguamiel, si junto con la semilla conservada se inocula una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* aislada del pulque.

8. ESQUEMA EXPERIMENTAL GENERAL.

El esquema experimental está dividido en 3 partes principales:

- La primera parte consistió en evaluar el efecto de modificar la concentración de carbohidratos del aguamiel observando los cambios en el desarrollo microbiano, consumo de carbohidratos y producción de etanol durante la fermentación del mismo (figura 11, inciso A).
- La segunda parte se basó en comparar el efecto del método de conservación de la semilla de pulque en el desarrollo microbiano, consumo de carbohidratos y producción de etanol durante la fermentación del aguamiel (figura 11, inciso B).
- La tercera pretendió alcanzar la producción de al menos 6% v/v de Etanol, durante una fermentación de aguamiel, utilizando un inóculo que conjuntara una semilla de pulque conservada y una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, la cual fue aislada del pulque e identificada hasta nivel de género por el método PCR-RFLP de la región ribosomal ITS1-ITS4, (figura 11, inciso C).

En la figura 11 se muestra un diagrama de flujo donde se resume de forma general el trabajo experimental, desde la caracterización materia prima, pasteurización y acondicionamiento del aguamiel, así como los diferentes métodos de conservación empleados en la semilla de pulque, su almacenamiento, reactivación e inoculación en sus correspondientes fermentaciones.

Por otro lado se presentan los parámetros de muestreo evaluados durante las fermentaciones: análisis fisicoquímicos, microbiológicos y bioquímicos. Además, en dicho esquema se señala el aislamiento, conservación e identificación de una cepa de *S. cerevisiae*, a partir de una fermentación por el método PCR-RFLP de la región ribosomal ITS1-ITS4, la cual fue caracterizada y empleada como inóculo.

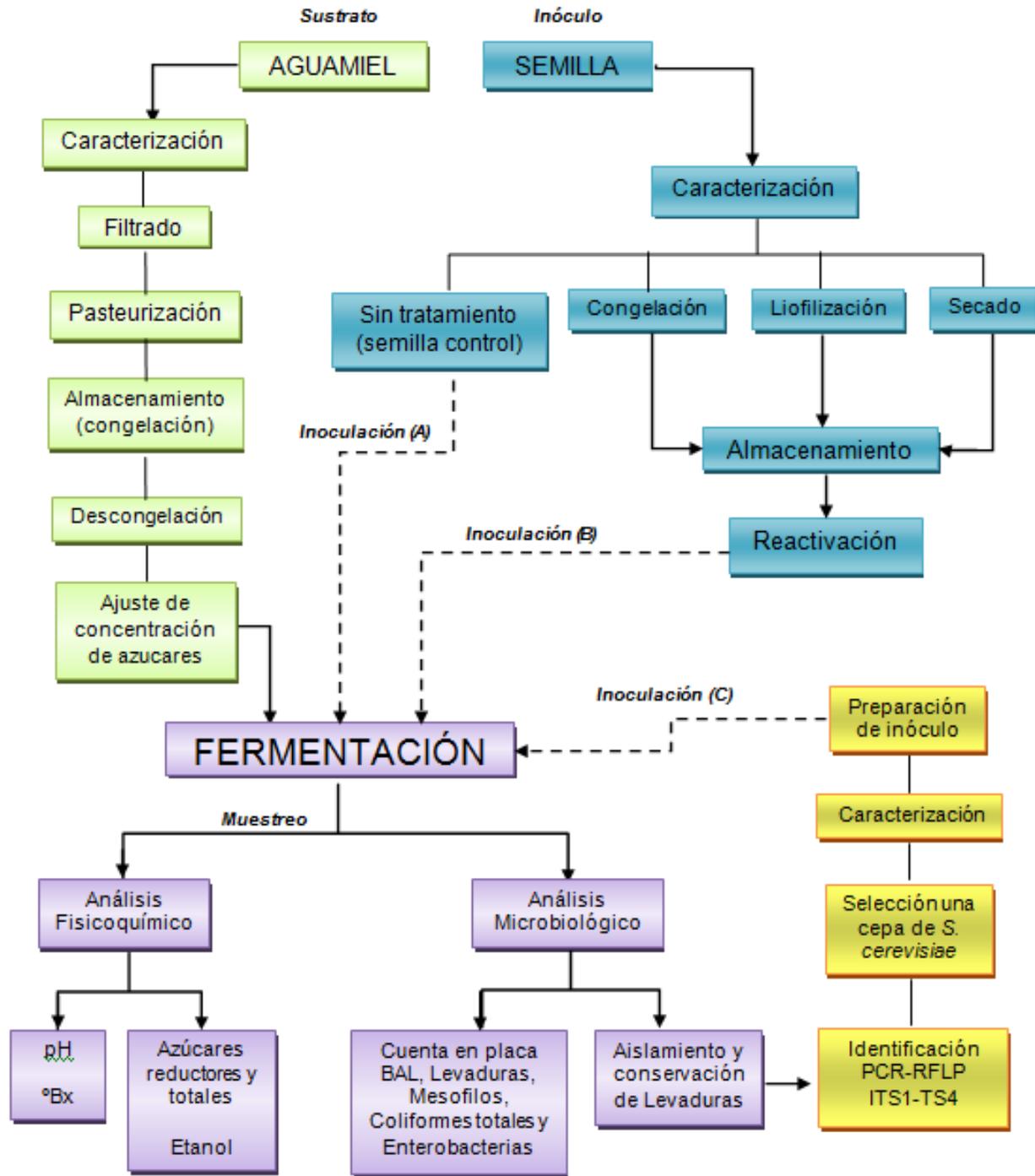


Figura 11. Diagrama de flujo experimental. (A) Fermentaciones con semilla fresca y aguamiel del Edo. Méx ajustado a 8°Bx y 10°Bx; (B) Fermentaciones utilizando semillas conservadas y almacenadas durante un periodo de 30 a 90 días por distintos métodos; (C) Fermentación conjuntando una cepa de aislada, identificada hasta género y caracterizada de *S. cerevisiae* a la cual se le adicionó después de 12 y 24h de fermentación una semilla conservada por el método de congelación.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Efecto de modificar la concentración de carbohidratos del aguamiel en el desarrollo microbiano, consumo de carbohidratos y producción de etanol durante la fermentación.

9.1.1 *Materia prima y acondicionamiento del aguamiel.*

El aguamiel y la semilla para este experimento se recibieron del Pueblo “San Nicolás de Guadalupe San Felipe del Progreso” (Estado de México) en bidones de plástico de 4 litros de capacidad, estuvo aproximadamente 6 horas desde su recolección hasta su pasteurización a una temperatura entre los 4 y 8°C. Cabe mencionar que dicha semilla y aguamiel pertenecieron al lote #5 empleado en trabajos anteriores del mismo proyecto (Manrique 2012).

Previo al ajuste de sólidos totales, el aguamiel se filtró a través de una manta de cielo limpia y seca con el fin de eliminar toda aquella materia extraña como residuos de insectos, hojas, tallos, tierra etc., y tanto el aguamiel como la semilla, se caracterizaron microbiológica, fisicoquímicamente (las metodologías se mencionan en el punto 9.4).

Para su pasteurización se utilizó un pasteurizador cilíndrico (marca Elecrem) de 15 Litros de capacidad el aguamiel se llevó a una temperatura de 70°C sostenida durante 15min, al finalizar el proceso el aguamiel se dejó enfriar en condiciones asépticas y una parte se guardó en bolsas con cierre fácil bajo congelación a -20°C hasta el momento de su fermentación. Dicho aguamiel se recibió con un porcentaje de sólidos de 10°Bx, por lo que se decidió diluir una parte del aguamiel hasta un valor de 8°Bx usando agua destilada estéril.

9.1.2 Condiciones de fermentación.

Se realizaron fermentaciones por duplicado de 500ml de aguamiel, modificando su concentración de sólidos totales diluyéndolo con agua corriente estéril. Las condiciones evaluadas fueron 8°Bx, 10°Bx y 10°Bx sin pasteurizar. Dichas fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de vidrio de 1L de capacidad que fueron esterilizados previamente en autoclave a 121°C. Para la inoculación se utilizaron 10ml (2% v/v) de semilla fresca sin reactivar, procedente del mismo productor. Todos los matraces fueron tapados con torundas de algodón estériles. La fermentación se llevó a cabo a una temperatura de 30°C sin agitación, se monitorearon a las 0, 12 y 24 horas para evaluar los cambios en el pH, °Bx, etanol, carbohidratos reductores y totales, y crecimiento de mesófilos aerobios, levaduras, bacterias lácticas, enterobacterias y coliformes totales por la técnica de cuenta en placa.

9.2 Efecto del método de conservación de la semilla de pulque en el desarrollo microbiano, consumo de carbohidratos y producción de etanol durante la fermentación del aguamiel.

9.2.1 Materia prima y acondicionamiento del aguamiel.

Para este experimento y posteriores, el aguamiel y la semilla se consiguieron en el Municipio de Nanacamilpa Tlaxcala. Se acudió muy temprano en la mañana a la raspa del maguey para garantizar que nuestra materia prima no presentará signos de fermentación y que fuese 100% obtenida de agave sin ninguna adulteración. Se extrajo de la especie *A. atrovirens* o maguey manso. Ambos se transportaron en bidones de plástico (desinfectados con agua hirviendo) en hieleras a una temperatura de 4°C hasta el laboratorio 324 del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, donde el aguamiel se filtró a través de una manta de cielo y se caracterizaron sus parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales, de la forma que se menciona en el punto 9.4.

La semilla fue caracterizada así como el aguamiel, pero en este caso se sometió a algunos métodos de conservación, los cuales fueron congelación, liofilización y secado, que posteriormente serán descritos.

Para garantizar la eficiencia de la pasteurización del aguamiel, y dado que este estaría almacenado por un tiempo mayor hasta ser empleado, se pasteurizó a 75° C por 15 min (5°C más). A partir de este experimento y posteriores, se ajustó el aguamiel a 10% de sólidos totales diluyendo con agua destilada estéril. Fue almacenado a -20°C en bidones de plástico desinfectados con agua hirviendo.

9.2.2 Métodos de conservación de la semilla.

9.2.3.1 Congelación.

Partiendo de 900 ml de semilla, se repartieron 300 ml en 3 vasos de centrifuga de 500ml de capacidad, estos se centrifugaron 15 min / 7000rpm a 4°C en una centrifuga marca BECKMAN mod. J2-21M/E Centrifuge. El sobrenadante se desechó en condiciones asépticas y se realizó un primer lavado con 300 ml de solución salina isotónica al 0.85% estéril resuspendiendo totalmente el pellet con ayuda de una espátula estéril. Una vez resuspendido el pellet se prosiguió a una segunda centrifugación y un segundo lavado con las mismas condiciones antes descritas.

Finalmente, del segundo lavado se desechó el sobrenadante y los pellets fueron resuspendidos pero ahora en 900ml de glicerol al 7.5% estéril. Finalmente se repartieron 30ml en 30 tubos Falcón de 50ml estériles, estos tubos fueron cerrados y sellados con parafilm y almacenados a -65°C en un ultracongelador marca Puffer Hubbard.

9.2.3.2 Liofilización.

De la misma manera que la congelación se partieron con 900 ml de semilla, los cuales se repartieron 300 ml en 3 vasos de centrifuga de 500ml de capacidad. Se centrifugaron y lavaron 2 veces bajo las condiciones anteriormente descritas. Después del segundo lavado se desechó el sobrenadante y los pellets se resuspendieron, para este caso, en 900ml de leche descremada estéril al 10%.

Posteriormente se repartieron 100ml del resuspendido en 9 recipientes estériles de plástico grueso y con boca ancha, estos recipientes fueron cerrados con tapa y almacenados a -70°C por una semana. Pasado este tiempo los recipientes se colocaron en un equipo de liofilización marca LABCONCO FREEZE DRY System (mod. 709509) hasta que las muestras llegaron a peso constante, se formaron hojuelas que fácilmente se fragmentaban a polvo. Dicha liofilización tomó alrededor de una semana para cada 100ml de muestra y se observó que por cada 100ml de muestra se obtuvieron 10grs de liofilizado aproximadamente. El contenido liofilizado de cada recipiente se homogenizó y guardó a -20°C hasta ser usado.

9.2.3.3 Secado.

Con la colaboración del Ingeniero Abel Blancas Cabrera se realizó el tratamiento de la semilla en la unidad de Bioprocesos, edificio C, del Instituto de Ciencias Biomédicas de la UNAM. En dicho tratamiento la semilla de pulque se resuspendió en un soporte de maltodextrinas que se sometió al proceso de secado utilizando un secador por aspersión (secador spray), cuya temperatura de entrada fue de 160°C y de salida 85°C. Las características finales fueron de un polvo harinoso de color blanco.

9.2.4 Reactivación de las semillas.

9.2.4.1 Semilla sin tratamiento (semilla fresca o FR).

A esta semilla no se le acondicionó, parte de ella fue almacenada a 4°C y empleada como inóculo control 12 horas después de ser refrigerada (la cantidad de inóculo empleada fue de 5%v/v de semilla). La otra parte fue sometida a los métodos de conservación ya mencionados.

9.2.4.2 Semilla congelada (CG).

Se descongeló a temperatura ambiente uno de los tubos falcón que contenían la semilla congelada, se reactivaron 25ml de semilla congelada que se disolvieron en matraces estériles de 1litro con 500 ml. de aguamiel ajustado a 6°Bx de sólidos totales con agua destilada estéril (lo que equivale 5%v/v de semilla original). Después el matraz se incubó con un tapón de algodón estéril a 30°C durante 24h. Al término fue utilizada como semilla (inoculó) y caracterizados sus parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales.

9.2.4.3 Semilla liofilizada (LF).

Con la ayuda de una espátula estéril, se pesaron asépticamente 1.5 gramos de liofilizado y se disolvieron en un matraz estéril de 500ml, con 300 ml de aguamiel ajustado a 6°Bx de sólidos totales con agua destilada estéril (la cantidad de liofilizado añadido equivale al 5% v/v de semilla, si se considera que por cada gramo de liofilizado equivale a 10ml de semilla de pulque original). Este matraz se tapó con algodón estéril y se incubó a 30°C por 24h. Al término fue utilizada como semilla (inoculó) y caracterizados sus parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales.

9.2.4.4 Semilla deshidratada (DH).

Utilizando una cuchara metálica estéril, se pesaron asépticamente 15 gramos del polvo y se disolvieron en un matraz estéril de 500ml con 300ml de aguamiel a 6°Bx de sólidos totales con agua destilada estéril. Del mismo modo el matraz se incubó con un tapón de algodón estéril a 30°C por 24h. Al término fue utilizada como semilla (inoculó) y caracterizados sus parámetros microbiológicos y fisicoquímicos.

9.2.5 Condiciones de fermentación.

Para este experimento, el cronograma de las fermentaciones con sus diferentes tratamientos fue el siguiente: recién recolectados el aguamiel y la semilla de Nanacamilpa, se realizó una fermentación con la semilla sin tratamiento (fresca o control). A la semana se hizo otra con la semilla deshidratada. Pasados 30 días de almacenamiento de las semillas congelada y liofilizada, se les realizó una fermentación con cada una y del mismo modo, con estas semillas, se hicieron dos fermentaciones más a los 90 días de almacenamiento.

Únicamente las fermentaciones en las que se utilizó la semilla congelada se llevaron a cabo en recipientes de PET (garrafrones de 10 litros de capacidad) desinfectados con solución de cloro al 5%, se utilizó agua corriente estéril para eliminar el exceso de cloro y se dejaron secar en condiciones asépticas. Cada recipiente fue llenado con 6.0 litros de aguamiel ajustado a 10°Bx de sólidos totales y tapado con una torunda de algodón estéril. Se inocularon con la semilla reactivada en una proporción 5% v/v (300ml) y se incubaron a 30°C durante 24h, sin agitación.

Para el caso de las demás fermentaciones, estas se realizaron en matraces estériles de un litro con 700ml de aguamiel ajustado a 10°Bx de sólidos totales y tapados con una torunda de algodón estéril. Se inocularon con la semilla reactivada en una proporción 5% v/v (35ml) y se incubaron a 30°C durante 24h, sin agitación. Sin embargo, la fermentación con la que se utilizó la semilla deshidratada en polvo fue monitoreada hasta las 44h bajo las mismas condiciones de incubación.

9.3 Incremento de la producción de etanol, inoculando un semilla conservada junto con una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* aislada del pulque.

9.3.1 Acondicionamiento del aguamiel.

El aguamiel usado en este experimento fue del mismo origen que el descrito en el punto 9.2, para prevenir riesgos de contaminación se volvió a pasteurizar y ajusto a 10°Bx.

9.3.2 Reactivación de la semilla.

En este experimento se decidió usar la semilla congelada después de 150 días de almacenamiento, para su reactivación se adicionaron 15ml de semilla en un matraz estéril de 500ml con 300ml de aguamiel ajustado con agua destilada estéril a una concentración de 6°Bx de sólidos totales.

*9.3.3 Selección y caracterización de una cepa aislada de *Saccharomyces cerevisiae*.*

Se identificaron 4 cepas de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* por el método PCR-RFLP de la región ribosomal ITS1-ITS4, aisladas de las placas con medio agar extracto de malta al tiempo cero de fermentación (el método se describe en el punto 9.4.2.3). Las cepas provenían de una fermentación descrita en el punto 9.1 donde se empleo aguamiel del Edo de México ajustado a 8°Bx de sólidos totales. La metodología que se utilizó para el aislamiento se menciona en el punto 9.4.2.2.

Para elegir una de estas cepas identificadas, se crecieron en caldo YM y se evaluó su crecimiento en placas con medio YM a 30°C por 24h, así como su pureza, morfología y capacidad para producir etanol.

La cepa seleccionada se le caracterizó morfológicamente y realizó una cinética de crecimiento en 250ml aguamiel a 10°Bx, inoculando con 10% v/v que equivalen a 15 y 25ml de cultivo madre), la cepa previamente se creció en caldo con medio YM que se incubó a 30°C por 24. Se cuantificó el crecimiento microbiano cada 4 horas por el método de cuenta en placa en placas con medio YM e incubadas a las mismas condiciones.

Durante la cinética también se monitoreo el cambio de pH, °Bx y el contenido de etanol. Con base en los resultados se determinó en qué momento se debía adicionar la semilla conservada.

9.3.4 Condiciones de fermentación.

Con el objeto de favorecer la producción de etanol se dejó fermentar el aguamiel con la cepa de *S. cerevisiae* 12 horas en un matraz estéril de 1 litro con 700 ml de aguamiel a 10°Bx sólidos totales a 30°C. La cepa previamente se creció en caldo YM y se inoculó en una proporción 10% v/v (70ml). Pasado ese tiempo de incubación se inoculo la semilla tratado por congelación previamente reactivada en una proporción 5% v/v (35ml). Se dejó incubar a las mismas condiciones durante otras 24 horas más, durante ese tiempo se monitorearon sus parámetros microbiológicos, fisicoquímicos y sensoriales, las metodologías se describen en el punto 9.4.

9.4 Metodologías de análisis.

9.4.1 Muestreos.

Durante el muestreo cada garrafón y matraz fue agitado con el fin de homogenizar el producto.

En cada tiempo de muestreo se tomaron 500µl que se utilizaron para la determinación de las cuentas microbianas en placa. Por otro lado se tomaron 1ml para la cuantificación de carbohidratos totales y reductores y 1 ml para la cuantificación de etanol, las muestras se guardaron a -10°C en tubos Eppendorf estériles de 1.5ml.

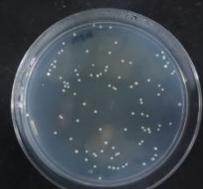
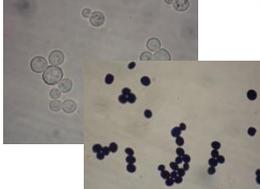
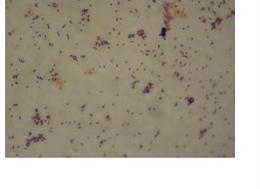
Adicionalmente se tomaron 100 µl para medir °Brix con un refractómetro de mano y de 5 a 10ml para medir pH, tal como se explica más adelante.

9.4.2 Análisis microbiológicos.

9.4.2.1 Método de cuenta en placa.

Para monitorear el crecimiento microbiano se utilizó el método de cuenta en placa por extensión de 100 μ L de muestra utilizando una escuadra de metal estéril y considerando las diluciones sucesivas necesarias con solución salina 0.85% estéril. Los grupos microbianos monitoreados así como el medio de cultivo utilizado y las condiciones de incubación para cada uno y la composición de los medios de cultivo se mencionan en el ANEXO 2 tabla 20. A continuación se mencionan las características macroscópicas y microscópicas de los grupos microbianos evaluados.

Tabla 7. Características macro y microscópicas de los diferentes grupos microbianos evaluados.

Grupo microbiano	Morfología colonial	Ejemplo	Morfología celular	Gram	Aumento 100x
Levaduras	Colonias en medios PDA o Extracto de malta, Son típicamente blancas y opacas, forma convexa y circulares (3 a 8mm)		Células grandes forma ovoide, circulares o redondas.	NP	
Bacterias ácido lácticas	Colonias en medio MRS, Son muy pequeñas, circulares (1 a 2mm), traslucidas color ámbar claro		Bacilos largos o cortos, cocobacilos o cocos formando cadenas o agrupaciones,	Gram +	
Mesofilos aerobios	Colonias que crecen en medio PCA, Pueden ser de varios tamaños, y formas, crecen a 30°C (discriminar levaduras).		Bacterias de varias morfologías.	Gram + o -	
Enterobacterias	Colonias en medio VRBGA color morado y precipitado violeta, son viscosas, brillantes y convexas.		Bacilos	Gram -	
Coliformes totales	Colonias en medio VRBA color rojo y precipitado rosado, son viscosas, brillantes y convexas.		Bacilos cortos.	Gram -	

9.4.2.2 Aislamiento y conservación de Levaduras.

Durante la fermentación descrita en el punto 9.1 se seleccionaron de 15 a 20 colonias características de levadura de las placas extracto de malta para cada tiempo (0, 12 y 24h) y de los dos tratamientos (aguamiel 10°Bx y aguamiel 10°Bx no pasteurizado), en total se aislaron cerca de 110 levaduras para su futura identificación.

Para la conservación se realizó lo siguiente: se utilizó el medio GELPA (agar glucosa-peptona extracto de levadura) para resembrar y purificar las colonias con ayuda de la tinción de GRAM. Después que se observaron puras las cepas bajo el microscopio, se resembraron en placas con el mismo medio y se tomó una asada de la parte del crecimiento, la cual fue resuspendida en tubos de conservación con solución estéril de glicerol al 15%, dichos tubos fueron almacenados en ultra-congelación a -70°C.

9.4.2.3 Identificación de levaduras (PCR-RFLP de la región ribosomal ITS1-ITS4).

Se hizo un análisis de restricción (PCR-RFLP) o también llamado polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. En este, uno de los genes ribosomales de las levaduras (5S, 5.8S, 18S y 26S), así como una las regiones ITS o NTS, o mezcla de regiones, son amplificadas con la reacción de PCR y luego digeridas con enzimas de restricción para generar patrones de ruptura.

El método consiste en la diferenciación de dichos patrones de ruptura en un sitio conservado específico del genoma y con ello establecer correlaciones entre especies y géneros con respecto a las similitudes de los patrones generados de otras levaduras ya descritas que se comparan en base de datos y así conocer la identidad de la levadura (Orberá, 2004).

Reacción de PCR: Cabe señalar que para la identificación se optó por hacer la reacción de PCR a partir de colonia de levaduras aisladas del pulque en medio GELPA y no partiendo de DNA extraído por el método fenol- cloroformo; hacer esto tiene como ventaja ahorro de tiempo pero como principal desventaja es que no se sabe cuánto DNA se pone a reaccionar y además que existe la presencia de enzimas y compuestos celulares pueden afectar o inhibir a la reacción de PCR.

Las cepas puestas a identificar fueron 4 levaduras aisladas del tiempo cero de la fermentación con 8°Bx de sólidos. En la tabla 8 se muestran las concentraciones de los reactivos para la reacción de PCR, así como las condiciones que se utilizaron.

Tabla 8. Cantidades utilizadas para la reacción de PCR así como las condiciones de ciclos y temperaturas (modificado de Cova, 2010).

Master Mix	Cantidades (μL)	Programa (No. ciclos)	Temperatura $^{\circ}\text{C}$ y tiempo
Buffer Base 10X	5	1	99 (lisis y liberación DNA, 15min)
dNTP	4		94 (Desnaturalización, 1min)
MgCl ₂	3		
Oligo ITS 1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCGG-3'	1	45	52 (alineamiento, 2min) 72 (extensión, 2min)
Oligo ITS 4 5'-TCCTCCGCTTATTAGATATGC-3'	1	1	72 (extensión final 2min)
DNA Polimerasa (1.0U)	2.5	1	
Agua destilada	Cbp: 50		4 (enfriamiento)

El producto de amplificación se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X a 100V durante 50 min, se utilizó el marcador de peso molecular marca Fermentas (GeneRuler™ 1kb Low Range DNA Ladder) y se tiñó con bromuro de etidio durante 15min.

Análisis de restricción: Se tomaron alícuotas de 17 μL del producto de PCR a las cuales se les agregó 2 μL de buffer de restricción y 1 μL de enzima de restricción Hinf1 (1U), la mezcla de reacción se incubó toda la noche en agitación a 37 $^{\circ}\text{C}$. Los fragmentos resultantes se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 3% y a 80V durante 2 horas cargando los 20 μL de la reacción. Los patrones de banda se compararon con los registrados en la base de datos europea (www.yeast-id.com) y la literatura.

9.4.3 Análisis fisicoquímicos:

9.4.3.1 Determinación de pH y $^{\circ}\text{Brix}$.

Para esta evaluación se tomaron muestras directas bajo condiciones asépticas. Se utilizó un potenciómetro calibrado (JEANWAY 3020pH Meter) para la determinación de pH. Los $^{\circ}\text{Bx}$ se midieron con un refractómetro de mano (Fisher 0-32% Japón).

9.4.3.2 Cuantificación de carbohidratos reductores.

Se determinaron por el método ácido dinitrosalicílico DNS (Miller G. 1959), se tomaron 0.5ml de cada muestra por triplicado y adicionaron 0.5 de reactivo DNS, la mezcla se calentó en un baño de agua hirviendo por 5 min, la reacción se detuvo con 5ml de agua destilada y se leyó a 540nm, en un espectrofotómetro (Spectronic modelo 21D) frente a un blanco de reactivos.

Los resultados se compararon con una curva patrón de 0mg/ml a 1.0 mg/ml de glucosa. En el ANEXO 3 inciso (a) se menciona el procedimiento de preparación del reactivo DNS.

9.4.3.3 Cuantificación de carbohidratos totales.

Se determinaron por el método Fenol Sulfúrico (Dubois, 1956) por triplicado, para ello se tomó una muestra de 1 ml que se encontrara en el rango de sensibilidad del método de 10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se le adicionaron 0.5 ml de un solución de Fenol al 5% y 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se agitaron las soluciones y se dejaron enfriar por 20 min. Se midió la intensidad de color a 492 nm frente a un blanco de reactivos en un espectrofotómetro (Spectronic modelo 21D). La curva patrón se realizó con fructosa que iba del rango de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

9.4.3.4 Cuantificación de Etanol.

Se empleó el kit de diagnóstico enzimático Bioanalysis for Ethanol/ food Analysis de Boehringer Mannheim A. / R-Biopharm-Roche S.A. (No. catálogo 0176290), el procedimiento se menciona en el ANEXO 3 inciso (b).

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

10.1 EFECTO EN EL DESARROLLO MICROBIANO, CONSUMO DE CARBOHIDRATOS Y PRODUCCIÓN DE ETANOL, MODIFICANDO LA CONCENTRACIÓN DE CARBOHIDRATOS DEL AGUAMIEL DURANTE SU FERMENTACIÓN.

10.1.1 Caracterización del aguamiel y semilla, calidad microbiológica, aspectos fisicoquímicos y sensoriales.

Los factores que alteran la calidad de la materia prima durante su obtención y manejo, como ya se mencionó en el marco teórico, son muy difíciles de controlar. Factores tales como, la exposición al ambiente o las malas prácticas en la elaboración de la bebida, que si bien influyen negativamente en la sanidad del producto, también contribuyen con los microorganismos necesarios para que la fermentación se lleve a cabo adecuadamente y posteriormente el producto final presente las propiedades organolépticas características de la bebida.

Para desarrollar de mejor manera el estudio de la microbiología del pulque, y comprender un poco más la complejidad que implica la fermentación del aguamiel, se necesita partir de una materia prima constante y que esté en las mejores condiciones posibles y que permitan un óptimo desarrollo de los microorganismos en dicho proceso. El factor que se intentó acotar para este fin fue la concentración de fuente de carbono.

Dado que la cantidad y tipo de carbohidratos en el aguamiel depende mucho del clima, momento del día, época del año y desarrollo fisiológico de la planta, por mencionar algunos; es imprescindible tratar de alcanzar una estandarización de la misma y subsecuentemente desarrollar un proceso controlado de la fermentación. Una manera práctica para alcanzar esto es ajustando los °Brix o porcentaje de sólidos totales (g de sacarosa/100g agua), sin embargo, no hay que olvidar que el aguamiel no únicamente contiene sacarosa como fuente de carbono disponible para los microorganismos.

Aguamiel: Al recibir el aguamiel y la semilla del pueblo de “San Nicolás de Guadalupe San Felipe del Progreso” (Edo. de Mex.) se caracterizaron fisicoquímicamente y cuantificaron diferentes grupos microbianos de ambas materias primas.

A pesar de que se recolectó el aguamiel recién extraído de la planta, y que se refrigeró inmediatamente para su transporte a la Cd. De México, se observó que el aguamiel presentaba algunos signos de fermentación, debido a que se percibía ligeramente ácido, astringente y efervescente (tabla 9), esto es normal desde un punto de vista, ya que para la elaboración directa del pulque la fermentación del aguamiel inicia desde que este se encuentra acumulado en el maguey.

La finalidad del proyecto es procurar una estandarización de la materia prima y el proceso de fermentación, y por tanto, un estado avanzado en la fermentación en la materia prima involucra mayor variabilidad en los resultados y menor control en la fermentación; sin embargo no fue posible obtener aguamiel sin que presentara algún grado de fermentación. El aguamiel inicia su fermentación en el maguey. Este es un punto que deberá ser resuelto posteriormente, por lo que se procedió con el experimento, ya que se consideró que es la materia prima que se usa tradicionalmente.

Tabla 9. Características sensoriales del aguamiel “Pueblo San Nicolás de Guadalupe San Felipe del Progreso” (Edo. de Mex.).

Atributo	Descripción	Imagen
Apariencia	<ul style="list-style-type: none"> • Poco turbio. • Color: Amarillo opaco que tiende a café claro. • Ligeramente espumoso y efervescente. • Ligeramente Viscoso. 	
Aroma	<ul style="list-style-type: none"> • Poco picoso • Ligera nota fétida • Nota herbácea 	
Sabor	<ul style="list-style-type: none"> • Dulce • Poco ácido (enmascarado por lo dulce) • Sabor a tierra 	

Con base en las especificaciones de la NMX-V-022-1972. (AGUAMIEL), el aguamiel no cumple ni como calidad Tipo 2 (anexo 1, tabla 19), ya que presentó un pH de 4.25, menor al 4.5 mínimo para considerarse con ese grado.

Posteriormente se determinó el porcentaje de sólidos, que fue de 10.2, se cree que el aguamiel fue adulterado con azúcar corriente, ya que un pH tan ácido sólo puede indicar un cierto grado de fermentación, y dichos grados Brix, aunque corresponden con un aguamiel recién extraído, el pH se asemeja más a un pulque que al aguamiel.

La carga microbiana inicial del aguamiel es principalmente la de mesófilos y bacterias ácido lácticas, en el orden de 10^7 y 10^6 UFC/mL respectivamente. Comparando con el pH de 4.25, se puede decir que la fermentación láctica y producción de ácido láctico ya se ha hecho presente. En la Tabla 10 se reportan los resultados obtenidos de dichas cuentas.

Tabla 10. Calidad microbiológica del aguamiel y semilla “Pueblo San Nicolás de Guadalupe San Felipe del Progreso” (Edo. de Méx), ND = No detectado.

Materia prima	Parámetros físicoquímicos		Grupo microbiano (log ₁₀ UFC/ml).				
	pH	°Bx	Mesófilos	Levaduras	BAL	Enterobacterias	Coliformes totales
Aguamiel	4.25	10.2	7.12	4.67	6.97	4.73	4.50
Semilla	3.45	3.0	6.14	7.74	8.08	3.65	2.92

Con base en estos resultados se observó que la calidad sanitaria del aguamiel es baja, a pesar de que se tomaron las medidas de refrigeración e higiene durante su transporte al laboratorio.

Entre los primeros aspectos negativos encontrados fue la apariencia sensorial; si bien el aguamiel presentó un color ambarino, aspecto traslúcido, sabor dulce y aroma herbáceo que son característicos, también presentaba una ligera nota fétida (descomposición), aromas azufrados que generalmente son producidos por microorganismos del grupo de las Gram negativas, tal vez de los géneros *Pseudomonas spp.* o de la familia de las *Enterobacteriaceae* (Jay, 2006), indicativo directo de malas prácticas higiénicas o pocas medidas de limpieza de los utensilios para la raspa del maguey. También cualquier insecto como moscas, por ejemplo, puede contaminar el interior del maguey con dichos microorganismos, por ello la importancia de tapar bien el maguey después del proceso de recolección.

Como se observa en la tabla 10, las cuentas de enterobacterias y de coliformes totales son de 4.73 log₁₀ UFC/ml y 4.5 log₁₀ UFC/ml respectivamente, lo que indica contaminación por malas prácticas higiénicas. La presencia de bacterias lácticas y el valor de pH de 4.25 debido al ácido láctico, debería ser suficiente para ejercer un efecto inhibitor sobre las enterobacterias y coliformes, sin embargo, esto no fue así y se encuentran presentes.

Reportes de Gómez A. y col. (2012) señalan que es posible la sobrevivencia de la cepa *Escherichia coli* O157:H7 en aguamiel fermentado y semilla de pulque a un pH 4.1 y 3.7 respectivamente, son por tanto reiterante la importancia de las medidas de manejo higiénico en la recolección y almacenamiento en los tinacales.

Para el caso del grupo de las levaduras, se obtuvieron 4.67 log₁₀ UFC/ml, cantidad no tan alta como la detectada para bacterias ácido lácticas (7.12 log₁₀ UFC/ml), sin embargo, se puede observar que es muy importante la microbiota que proporciona el aguamiel para llevar a cabo la fermentación.

Semilla: En cuanto a la semilla procedente del mismo lugar, esta presentó una apariencia de un líquido blanquecino y turbio. Se le percibía con un gusto muy ácido, astringente y amargo, no presentó aromas fétidos lo que es un buen indicativo, más bien cierto aroma afrutado fermentado. Al paladar se percibió la efervescencia y viscosidad característica.

Los valores de pH y °Brix de la semilla, que fueron de 3.45 y 3.0 respectivamente, son indicativo de un avanzado estado de fermentación (Tabla 10). Gómez A. y col. (2012) reportan valores promedio de pH de 4.1 y °Bx de 4.2 durante muestreos de semilla en la región central del estado de Hidalgo. Sánchez Marroquín en 1977 menciona que el pH promedio del pulque es de 4.2 a 4.6, y la norma NMX-V-037-1972 (PULQUE) señala como mínimo un pH de 3.5 para clasificar al pulque de tipo 2 o más ácido (Véase anexo 1, Tabla 19). Por lo tanto, la semilla se puede considerar dentro de los valores promedios mencionados.

Se detectaron cuentas muy altas de bacterias lácticas y levaduras de 8.08 log₁₀ UFC/ml y 7.74 log₁₀ UFC/ml respectivamente (tabla 10), eso esto es favorable para dar pie la fermentación láctica. Por otra parte las cuentas para coliformes totales y enterobacterias indican valores de 2.92 log₁₀ UFC/ml de y 3.65 log₁₀ UFC/ml respetivamente, por tanto, la calidad sanitaria de la semilla es baja a pesar del pH de 3.45 que se determinó, pero esto no fue suficiente para inhibir a estos 2 grupos de microorganismos.

Cervantes y Pedrosa (2007) presentan un estudio microbiológico del pulque en sus diferentes etapas de elaboración, los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Estudio de la comunidad microbiana en cada etapa de proceso de elaboración del pulque (Cervantes C. y Pedrosa A. (2007).

Etapa del proceso	Grupo Microbiano. log ₁₀ (UFC/ml)		
	Levaduras	Bacilos Gram positivos	Bacilos cortos Gram negativos
Aguamiel	5.2	2.0	4.8
Semilla	3.2	1.2	2.5
Contra punta (pie de cuba)	6.9	5.9	5.7
Corrida (pulque comercial)	9.7	7.5	8.3

Como se observa en la tabla 11, los resultados de levaduras y bacterias lácticas de la semilla, no se relacionan con los reportados por estos autores. Se puede notar que las cuentas son más similares a los presentados para la etapa de contrapunta ya que son cuentas mucho más altas que las de la semilla, lo que puede indicar que la semilla utilizada en este experimento equivale al pie de cuba del proceso de elaboración del pulque, sin embargo, el tener cuentas más altas disminuye el tiempo del proceso fermentativo.

10.1.2 Efecto de la pasteurización del aguamiel.

El aguamiel fue pasteurizado en un pasteurizador cilíndrico de aproximadamente 15 litros de capacidad a 70°C durante 15min. Posteriormente se cuantificaron los grupos microbianos y se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas cuyos resultados fueron: pH = 5.2 y °Bx = 10.2.

La pasteurización mostró un efecto benéfico sobre la calidad higiénica ya que mediante este tratamiento se lograron reducir poco más de 4 ciclos logarítmicos en las cuentas de enterobacterias y coliformes, sin embargo, aún se mostró sobrevivencia de enterobacterias y mesofilos pero en concentraciones muy bajas en el orden de 1.0 log UFC/ml (Figura 12). Estos resultados muestran la importancia y el impacto que tiene la pasteurización para garantizar que el producto elaborado sea inocuo y seguro para su consumo.

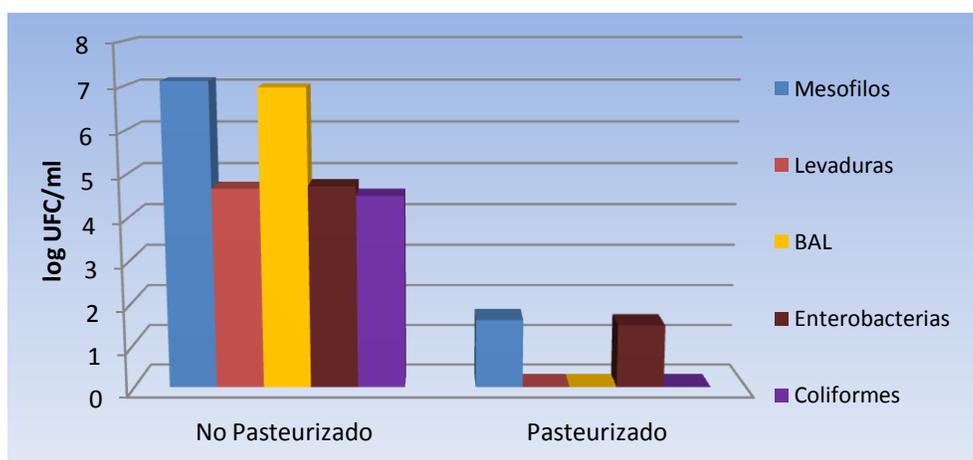


Figura 12. Efecto de la pasteurización sobre la comunidad microbiana del aguamiel del Edo. de México.

También se observó que prácticamente todas las levaduras y bacterias ácido lácticas fueron destruidas por el tratamiento térmico, en este sentido, la fermentación a nivel laboratorio se lleva a cabo únicamente por los microorganismos provenientes de la semilla, que deberían ser los representativos e importantes para llevar a cabo la fermentación.

Por otro lado la pasteurización presentó algunos otros efectos sobre el aguamiel. El pH del aguamiel aumentó de 4.25 a 5.20, esto puede ser debido a que con el calor se perdió la acidez volátil lo que ocasionó un aumento en el pH. Además, como se mostrará más adelante, también hubo un aumento en la concentración de carbohidratos reductores posiblemente debido a un desdoblamiento parcial de la sacarosa o de los FOS presentes.

El aspecto visual y sensorial del aguamiel también se vieron alterados, ya que se percibió más claro, menos turbio, menos efervescente y desapareció el aroma fétido que tenía, quizá debido al desdoblamiento de los azúcares, y a la volatilización dióxido de carbono debida a la conversión del ácido carbónico en solución a CO₂ dado el aumento del pH después del tratamiento.

10.1.3 Resultados de la Fermentación: crecimiento microbiano, pH, °Bx, carbohidratos y etanol (aguamiel Estado de México).

10.1.3.1 Efecto de la concentración de sólidos totales en el crecimiento microbiano.

Se realizaron las fermentaciones respectivas ajustando el porcentaje de sólidos en el aguamiel a 8 y 10°Bx, e inoculando cada tratamiento al 2% v/v de semilla fresca. Las fermentaciones se monitorearon cada 12 horas durante 24 horas.

De acuerdo a los resultados de la figura 13, para el caso de las levaduras (a) tanto en el aguamiel pasteurizado ajustado a 8 y 10 °Bx el comportamiento del crecimiento fue prácticamente el mismo, ambos iniciaron con cuentas de 5.7 log₁₀ UFC/ml en el tiempo cero hasta terminar con 7.1 log₁₀ UFC/ml al final de la fermentación.

Respecto a las bacterias ácido lácticas (b), al igual que con las levaduras, no se observaron diferencias entre los aguamieles con 8 y 10 °Bx, al tiempo cero las cuentas fueron del orden de 5.6 log₁₀ UFC/ml y al final de la fermentación se obtuvieron en promedio valores de 7.8 log₁₀ UFC/ml para ambas concentraciones de solutos del aguamiel.

El caso de los mesófilos aerobios (e), el uso de aguamiel con 10°Bx favorece un poco más su desarrollo respecto al uso de aguamiel a 8°Bx (de casi medio 0.3 punto logarítmico a las 12horas de fermentación),sin embargo, en ambos casos ocurre un descenso en sus cuentas bajando de entre 7.9 log₁₀ UFC/ml y 7.7 log₁₀ UFC/ml hasta 7.5 log₁₀ UFC/ml a las 24h de la fermentación.

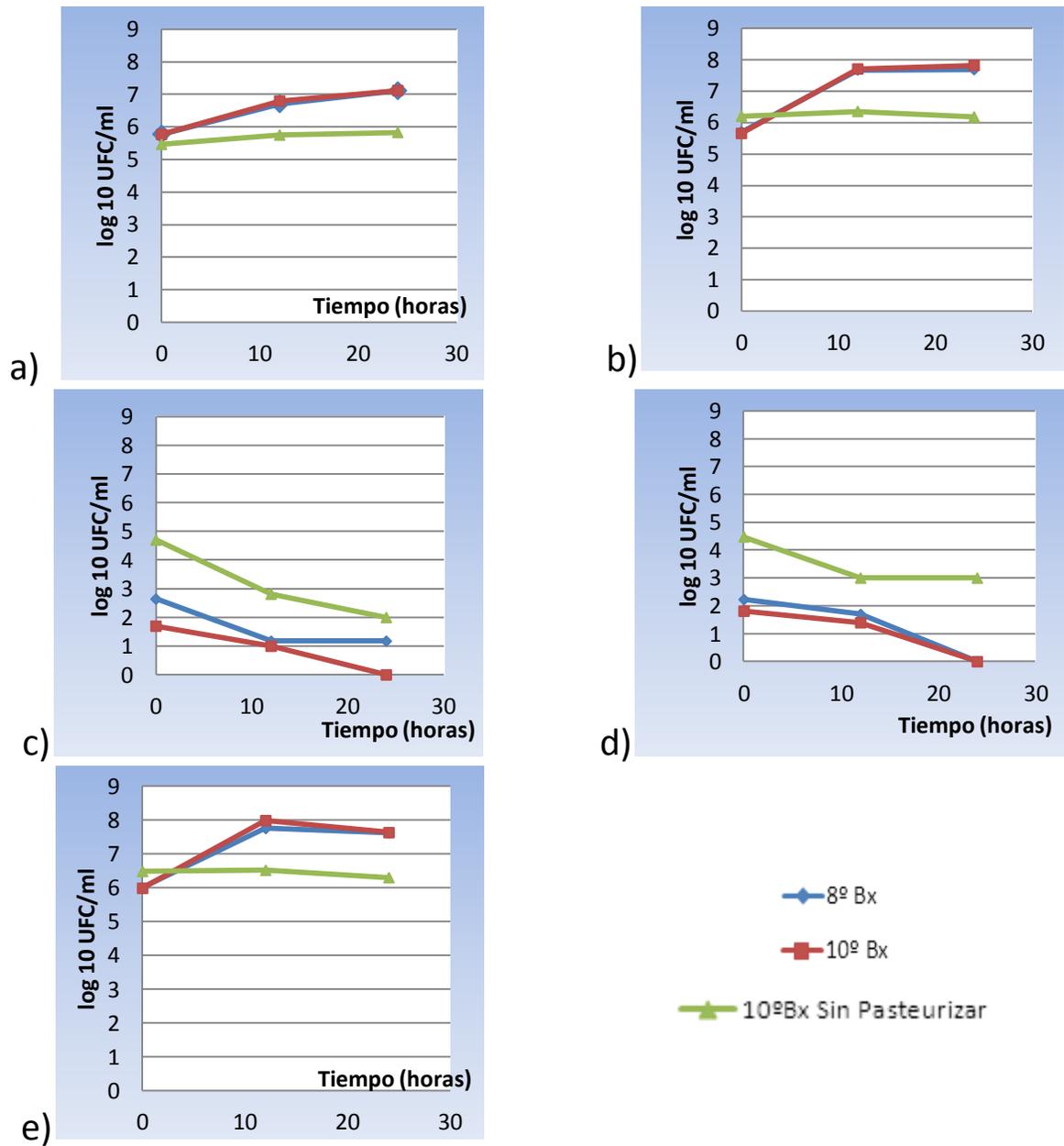


Figura 13: Fermentación. Efecto de la concentración de carbohidratos. Crecimiento microbiano empleando aguamiel sin pasteurizar (10°Bx) y pasteurizado con 8°Brix y 10°Brix. a) Levaduras b) Bacterias ácido lácticas c) Enterobacterias d) Coliformes totales e) Mesófilos aerobios.

Con respecto al crecimiento de Enterobacterias y coliformes (c y d), se observó lo esperado, las cuentas se redujeron prácticamente a cero y bajaron casi 2 ciclos logarítmicos. Esto último es debido a la producción de ácido láctico por parte de las BAL, como consecuencia se da aumento en la acidez. Las enterobacterias son bacterias Gram negativas que en general son poco resistentes a la acción de ácidos orgánicos y a ambientes con niveles bajos de pH. Se sabe que el efecto inhibitor de estos ácidos se atribuye principalmente a su forma no disociada, es así que penetra libremente en la célula, donde se ioniza provocando un descenso en el pH interno y el bloqueo de algunos mecanismos de transporte (Bourgeois, 1995).

Se observó que utilizando 10% de sólidos totales, las bacterias de estos dos grupos mueren en su totalidad al final de la fermentación. Esto no ocurre con la fermentación a 8°Bx, en donde se mantuvieron las cuentas de estas entre el tiempo 12 y 24 horas. A pesar de su sobrevivencia, los niveles finales indican una presencia apenas de 10 UFC / ml, las cuales son insignificantes comparado con la cantidad inicial aportada por la semilla (3.65 log₁₀ UFC / ml) y nulas si se compara con la cantidad que existía en el aguamiel al recibirlo (4.73 log₁₀ UFC / ml).

10.1.3.2 Efecto de la Pasteurización en el crecimiento microbiano.

Los resultados de crecimiento microbiano, con el aguamiel no pasteurizado a 10° Brix, mostraron que las cuentas levaduras prácticamente se mantuvieron sin cambios después de 24 horas de fermentación, aumentando cerca de 0.4 ciclos logarítmicos terminando en 5.83 Log₁₀ UFC/ml. Del mismo modo, las bacterias ácido lácticas mantuvieron su cuenta. A las primeras 12 horas aumentaron apenas 0.2 ciclo logarítmicos, ya a las 24 horas se observó una cuenta similar a la del tiempo cero (6.18 Log₁₀ UFC/ml).

Para el caso de los mesófilos aerobios se observó un comportamiento similar, la cuentas de mantuvieron en el orden de 6.5 log₁₀ UFC/ml, disminuyendo muy poco al final de la fermentación, solamente 0.2 ciclos logarítmico. Una explicación para el poco desarrollo se observa con los resultados de carbohidratos reductores y totales (figuras 16 y 17), se aprecia que los niveles iniciales de estos azúcares fueron más bajos con respecto a los del aguamiel pasteurizado con 10°Bx, es decir, los azúcares se siguieron consumiendo por los microorganismos presentes en el aguamiel durante su almacenamiento.

Cabe señalar que tanto para las levaduras, BAL y mesofilos aerobios se partió con cuentas similares en la fermentación con aguamiel pasteurizado y no pasteurizado en el tiempo inicial, sin embargo, en la figura 15 se observa que solo los microorganismos en el aguamiel pasteurizado se desarrollaron. Al no pasteurizarse, el pH inicial del aguamiel pasó de 5.2 a 4.15, lo que posiblemente generó ciertas condiciones de estrés que además también evitaron un mayor desarrollo de los grupos microbianos evaluados.

Respecto a las enterobacterias y coliformes totales se observó que se mantuvo una sobrevivencia importante al no pasteurizarse el aguamiel; iniciaron con 4.5 log10 UFC/ml, por lo menos 2 ciclos logarítmicos más que en el aguamiel pasteurizado, las enterobacterias se redujeron hasta 1.9 log10 UFC/ml a las 24 horas y los coliformes mantuvieron su cuenta de 3.0 log10 UFC/ml desde las 12 a las 24 horas.

10.1.3.3 Efecto de la concentración de la carbohidratos en el pH y °Bx

Comparando los resultados obtenidos de pH y °Bx de los aguamieles pasteurizados a 10 y 8°Bx (figura 14), se observa que sus valores de pH se comportan de manera muy similar a ambas concentraciones de azucres y que disminuyen hasta 3.7 y 3.6 respectivamente. Para el no pasteurizado el pH baja mucho más hasta 3.2.

Para los grados Brix se observa que si se disminuye el porcentaje de sólidos, es evidente que estos se agotan mucho más rápido que cuando se adiciona mayor cantidad de estos mismos. En la figura 15 se aprecia que el aguamiel con 8°Bx a las 24 horas de fermentación disminuye su contenido de sólidos hasta 4.2%, y el aguamiel con 10°Bx solo baja hasta 5.0%.

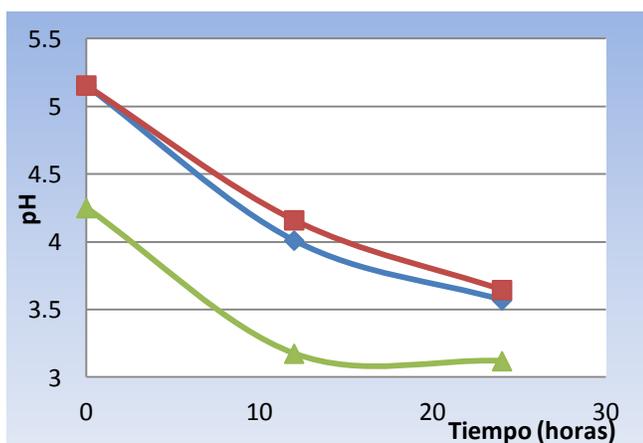


Figura 14. Fermentación. Efecto de la concentración de carbohidratos. Cambios en el valor de pH.

—●— 8° Bx —■— 10° Bx —▲— 10°Bx Sin Pasteurizar

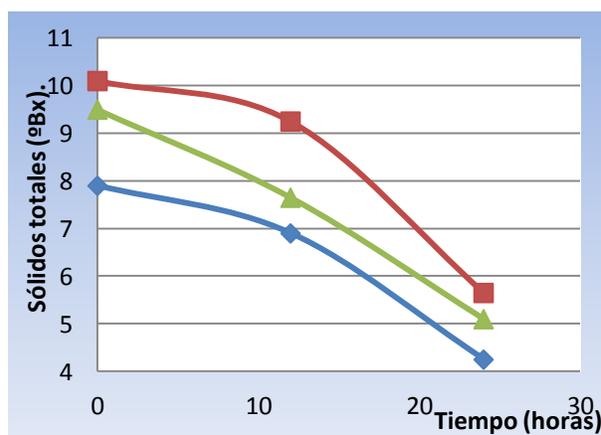


Figura 15. Fermentación: Efecto de la concentración de carbohidratos Comportamiento del % sólidos.

—●— 8° Bx —■— 10° Bx —▲— 10°Bx Sin Pasteurizar

10.3.1.4 Efecto en los carbohidratos reductores y totales.

Respecto a la velocidad de consumo de azúcares reductores se observa que fue similar para el aguamiel pasteurizado con 10°Bx y 8°Bx. Al tiempo cero presentaban 42.9g/L y 37.0g/L, y a las 24 horas descendieron hasta valores de 10.7 y 9.7 respectivamente (figuras 16 y 17). Los resultados puntuales se presentan en el ANEXO 4.

Se sabe que las levaduras y otros microorganismos producen una enzima conocida como invertasa, la cual es capaz de actuar sobre la sacarosa para liberar una molécula de glucosa y una de fructosa (Bourgeois, 1995). Para el caso del aguamiel no pasteurizado, se observó que los niveles de azúcares aumentaron a las 12 horas de fermentación y posteriormente volvieron a disminuir hasta 52g/L. La acción de enzimas hidrolíticas que liberan monosacáridos pueden explicar este fenómeno de incremento de los azúcares reductores para el aguamiel no pasteurizado. Pero en el caso de usar aguamiel pasteurizado este efecto no se observa, es posible que si se haya llevado a cabo pero entre las 0 y 12 horas de la fermentación.

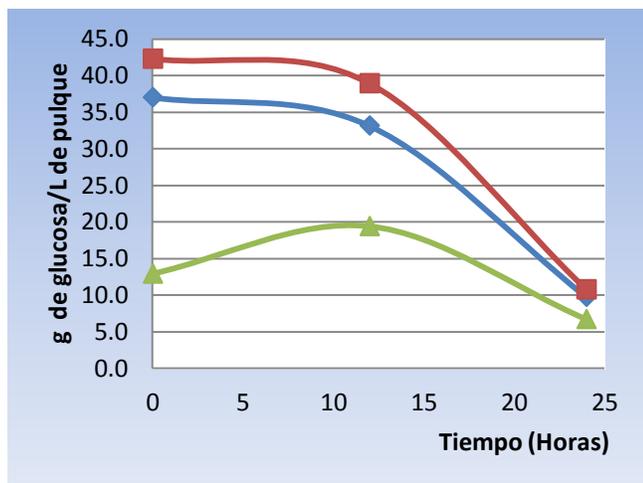


Figura 16. Fermentación. Efecto de la concentración de carbohidratos. Comportamiento de los azúcares reductores.

◆ 8° Bx ■ 10° Bx ▲ 10° Bx Sin Pasteurizar



Figura 17. Fermentación: Efecto de la concentración de carbohidratos. Comportamiento de los azúcares totales.

◆ 8° Bx ■ 10° Bx ▲ 10° Bx Sin Pasteurizar

En el caso de los carbohidratos totales se aprecia que al inicio, para las condiciones evaluadas (10°Bx, 8°Bx), no presentan las mismas cantidades de azúcares totales, 73g de fructosa/L y 58g de fructosa por litro respectivamente, se observa que diluirlo en 2°Bx al aguamiel se disminuye efectivamente el 20% (15g fructosa/L) la concentración de azúcares totales en el mismo. Al termino de la fermentación el consumo de azúcares es similar ubicándose entre los 28 y 22g de fructosa/L en ambos tratamientos, así también para el aguamiel no pasteurizado.

10.3.1.6 Efecto de la concentración de carbohidratos en la producción de etanol.

Finalmente se presenta un cuadro con las concentraciones obtenidas de etanol para la fermentación del aguamiel pasteurizado con 8 y 10°Bx.

Tabla 12. Cuantificación de etanol g/100 ml de pulque.

Tiempo	8°Bx	10°Bx
0	0.0147	0.0244
12	0.3145	0.6234
24	2.4306	2.4659

Como se aprecia en la tabla 12, se obtuvo una concentración similar de etanol en el aguamiel con 10°Bx que con 8°Bx. Se esperaría una mayor concentración de etanol al proporcionar más fuente de carbono, sin embargo, se observó que el incrementar en 2% la cantidad de sólidos en el aguamiel de 8 a 10, no hay un aumento significativo de la biomasa de las levaduras y tampoco mayor producción de etanol.

Relacionando con los resultados de crecimiento microbiano de levaduras de la figura 15, se observa que ambas condiciones tuvieron el mismo patrón de crecimiento, y por tanto, las concentraciones de fuente de carbono utilizadas en este experimento no impactan positiva o negativamente sobre el crecimiento de este grupo microbiano.

Las concentraciones de etanol obtenidas resultaron ser muy bajas comparando a las reportadas por Sánchez M. (1977), el cual afirma que se obtienen valores entre 4.1 a 5.1% de etanol partiendo de aguamiel con 8°Bx de sólidos. Existen muchas circunstancias para que no se produjeran cantidades representativas de etanol, una posibilidad sugiere que en la semilla no se encontraban buenas cantidades de levaduras eficientes para producir etanol o que por alguna razón estas no se desarrollaron de la forma esperada.

Como se observa en la figura 13, existe una cuenta mayor de casi un ciclo logarítmico más de bacterias lácticas que de levaduras, por lo que posiblemente la producción baja de etanol podría deberse a que las bacterias lácticas prevalecieron sobre las levaduras. Estas bacterias producen principalmente ácidos orgánicos, dextranas y compuestos volátiles de bajo peso molecular, a diferencia de las levaduras que preferentemente producen etanol y CO₂.

Tal vez lo recomendado sería prolongar la fermentación más tiempo para que se desarrollen más las levaduras y con ello se incrementen los niveles de etanol en la bebida, otra opción es inocular junto con la semilla una levadura más eficiente para producir etanol.

Dado que no existieron diferencias importantes en el desarrollo microbiano, consumo de azúcares y producción de etanol modificando la concentración de azúcares del aguamiel se puede decir que es suficiente trabajar con aguamiel a 8°Bx, y que los resultados que se puedan obtener son semejantes que si se utiliza aguamiel a 10°Bx.

10.2 EFECTO DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN DE LA SEMILLA DE PULQUE EN EL DESARROLLO MICROBIANO, CONSUMO DE CARBOHIDRATOS Y PRODUCCIÓN DE ETANOL DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL AGUAMIEL.

10.2.1 Caracterización del aguamiel y semilla, calidad microbiológica, aspectos fisicoquímicos y sensoriales.

Aguamiel: Para este experimento se optó por no utilizar el aguamiel del Estado de México, como se mencionó anteriormente, este ya presentaba un avanzado estado de fermentación, además muy probablemente estaba adulterado con sacarosa, ya que los grados Brix eran altos (10.2). Es por tanto que se intentó conseguir un aguamiel recién extraído, con un pH lo más neutro posible y que fuera 100% néctar de maguey pulquero.

Se recolectó aguamiel de Nanacamilpa, Tlaxcala, ya que en otros proyectos había dado buenos resultados. Acompañados con los productores de la localidad se realizó la recolecta del aguamiel a las 6:30 am. El aguamiel se recibió en bidones previamente desinfectados y fueron transportados en hieleras hasta el laboratorio 6 horas después de su recolección.

En cuanto llegó al laboratorio se caracterizó y pasteurizó, pero esta vez a 75°C por 15min, para evitar la sobrevivencia de enterobacterias y coliformes, como ocurrió con el anterior aguamiel.

Sensorialmente se percibió dulce y agradable al paladar, no presentaba aromas fétidos y tampoco un gusto ácido (tabla 13). Aparentemente no presentó signos de fermentación previa, esto se comprobó con los resultados de pH y °Bx.

Tabla 13. Características organolépticas para el aguamiel del “Pueblo Nanacamilpa” (Estado de Tlaxcala.).

Atributo	Descripción	Imagen
Apariencia	<ul style="list-style-type: none">• Poco turbio• Color: Amarillo blanquecino• Con cuerpo pero no espeso• Poco espumoso	
Aroma	<ul style="list-style-type: none">• Nota herbácea• Aroma a tierra y a planta	
Sabor	<ul style="list-style-type: none">• Dulce• No ácido• Sabor a tierra• Sensación a fresco	

Por otro lado, el aguamiel se recibió con una temperatura de 6°C, esto ayudó a que los microorganismos disminuyeran su metabolismo y que se conservaran en buen estado el aguamiel. Respecto al pH y grados Brix, estos fueron de 6.71 y 11.3 respectivamente (tabla 14), a diferencia del anterior aguamiel este prácticamente presenta un pH neutro (ausencia de ácido orgánicos generados por fermentación) además de un porcentaje de sólidos bueno, que también indican que la fermentación no se ha llevado a cabo.

De acuerdo con la norma Mexicana de aguamiel (NMX-V-022- 1972), el aguamiel de Tlaxcala se clasifica como aguamiel Tipo 1 (de mejor calidad), por tener un pH mayor a 6.6 y un porcentaje de sólidos alto (11.3), es por ello que este aguamiel puede ser destinado para la preparación y propagación de la semilla.

Es importante mencionar que dado que no se encontraron diferencias al usar aguamieles con 8°Bx y 10°Bx en las fermentaciones anteriores, hubiese sido suficiente ajustar el aguamiel de las futuras fermentaciones a 8% de sólidos, sin embargo, el aguamiel de ahora en adelante se utilizó a 10°Bx por intentar modificar lo menos posible el estado original del mismo cosa que ocurre si se diluye hasta el 8%, ya que el aguamiel de Nanacamilpa presentó 11.3°Bx.

En la tabla 14 se muestran los resultados de las cuentas de los grupos microbianos evaluados. Como se puede observar, en general la concentración de microorganismos fue diez veces menor que las que contenían el aguamiel del Estado de México (6.97 a 5.4 Log10 UFC/ml de Bacterias lácticas y 4.67 a 4.17 Log10 UFC/ml de levaduras). Por otro lado, este aguamiel también presentó contaminación por enterobacterias y coliformes totales con cuentas de 3.4 y 2.42 Log10 UFC/ml respectivamente, estos valores sugieren una contaminación que posiblemente se origina en el maguey, y puede ser debida a factores ambientales o a la presencia de animales o insectos.

Tabla 14. Calidad microbiológica del aguamiel y semilla “Pueblo Nanacamilpa” (Edo. de Tlaxcala), v.e.= valor estimado, ND = No detectado

		Aguamiel	Semilla
Parámetros fisicoquímicos	pH	6.71	3.93
	°Bx	11.3	4.00
Grupo microbiano (log10 UFC/ml)	Mesófilos aerobios	5.4 v.e.	7.38
	Levaduras	4.17v.e.	6.95
	Bacterias lácticas	5.4 v.e.	7.41
	Enterobacterias	3.4 v.e.	ND
	Coliformes totales	2.42	ND

La semilla de pulque se nos proporcionó en el tinacal el mismo día de la recolecta del aguamiel. Como se observa en la tabla 15, el pH y °Bx no son tan bajos respecto a la semilla del estado de México, (de 3.45 a 3.93 de pH y 3.00 a 4.00 de porcentaje de sólidos). Aunque la diferencia no es muy grande, la semilla del pueblo de Nanacamilpa se asemeja más a un pulque de barrida (pulque alimentado) que a una semilla, sin embargo, se procedió a trabajar con esta misma.

Se observa por ejemplo que hay ausencia de microorganismos no deseables (enterobacterias y coliformes), esto sugiere que son adecuadas las condiciones de higiene del tinacal y de las medidas que toman durante el seguimiento de la fermentación para que no se les contamine el producto.

En cuanto a las levaduras, bacterias lácticas y mesófilos, se observaron valores alrededor de 7.41 y 7.38 Log₁₀ UFC/ml respectivamente, aunque son menores las cuentas comparando con el aguamiel del Edo de México, son muy altas para considerarse una “semilla madre” (Cervantes, 2007).

Posteriormente se sometió la semilla a los métodos de conservación (ultra-congelación, liofilización y secado). Estas se almacenaron y programaron para realizar fermentaciones a los 30 y 90 días de almacenamiento, y observar si había cambios en la composición microbiológica y en su funcionalidad para fermentar el aguamiel.

10.2.2 Efecto del método de conservación y tiempo de almacenamiento sobre la comunidad microbiana de la semilla, y aspectos fisicoquímicos.

Como se menciona en el apartado de materiales y métodos, las semillas conservadas que se utilizaron para las fermentaciones fueron reactivadas 24horas (aguamiel a 6°Bx) antes de inocular el aguamiel, con la finalidad de que los microorganismos recuperaran su actividad.

Se pensó así para asegurar y aumentar la producción de metabolitos primarios como son el ácido láctico, dióxido de carbono y etanol, así como para la producción de dextranas u otros compuestos que le dan los aromas y sabores característicos del pulque, y además para disminuir en lo posible el tiempo de fermentación.

La única semilla que no se reactivó para las fermentaciones fue la semilla sin tratamiento de conservación (FR o control). En la figura 18 se presenta una gráfica con los resultados de las cuentas microbianas de las semillas sometidas a los diferentes métodos de conservación y a los distintos tiempos de almacenamiento.

Estos valores se obtuvieron después someter dichas semillas al procedimiento de reactivación ya mencionado, justo antes de la inoculación del aguamiel.

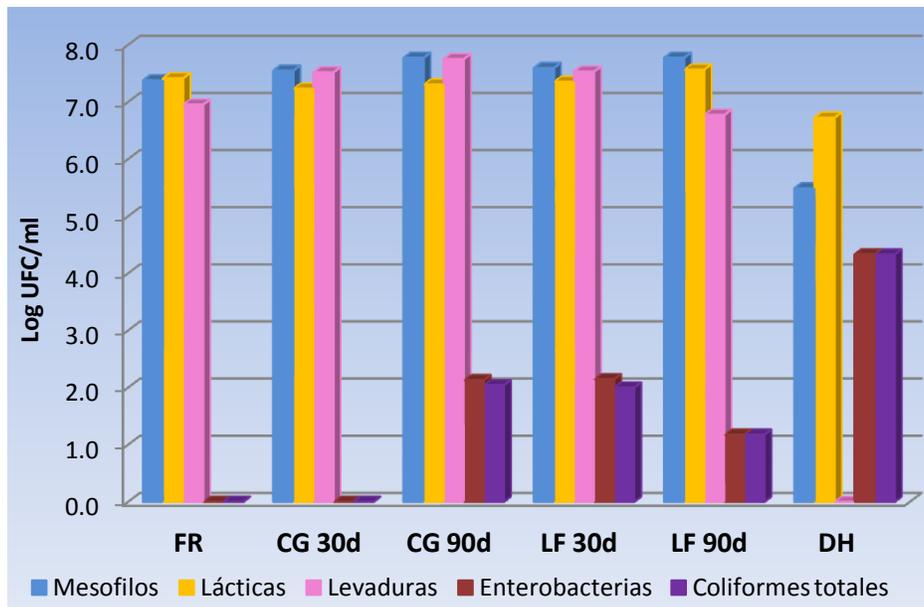


Figura 18. Resultados de la concentración de microorganismos en la semilla sometida a métodos de conservación y por diferentes periodos de almacenamiento. FR= Semilla control, CG= Semilla congelada, LF= Semilla Liofilizada y DH= Semilla seca; 30 y 90 días de almacenamiento.

Se observa que la semilla control y las semillas congeladas y liofilizadas mantienen cuentas promedio de 7.0 log₁₀ UFC/ml después de su reactivación, es decir, las semillas sometidas a un método de conservación y posteriormente reactivadas son similares y comparables con la semilla sin tratamiento. Excepto el caso de la semilla sometida al secado, que presentó cuentas de 6.73 log₁₀ UFC/ml de bacterias lácticas y 5.49 log₁₀ UFC/ml de mesófilos aerobios, diez veces menos que la semilla control (sin tratamiento).

Como se observa en la figura 18, no se detectaron levaduras en la semilla seca, es probable que en el tratamiento de secado se hayan eliminado y por eso no se desarrollaron en el aguamiel al reactivar la semilla. Otra peculiaridad de la semilla deshidratada fue que presentó cuentas altas de enterobacterias y coliformes totales, superior a 10⁴UFC/ml (4.34 y 4.33 log₁₀ UFC/ml respectivamente).

Basándose en las bajas cuentas de bacterias lácticas en la semilla secada, resulta muy lógico la alta sobrevivencia de estas bacterias indeseables, ya que quizá no hubo tanta inhibición por presencia de compuesto antimicrobianos o por el mismo ácido láctico que las bacterias lácticas producen, y comparando con el pH de la semilla, que fue de 4.72 (figura 18), el cual no es tan bajo para ejercer un efecto inhibitorio determinante.

En la semilla control (FR) no se detectaron enterobacterias ni coliformes totales, lo que hace suponer que la contaminación en la semilla seca (DH) proviene directamente del soporte de maltodextrinas usado durante el tratamiento de secado.

Para el caso de la semilla congelada con glicerol al 7.5% (Semilla CG, figura 20), se observa que se mantienen las cuentas de mesófilos aerobios, bacterias lácticas y levaduras por encima de 7.5 log₁₀ (UFC/ml) a largo de 30 y 90 días de almacenamiento, esto indica que la sobrevivencia de la matriz microbiana se mantiene muy bien con la ultra-congelación empleando crioprotectores.

En la semilla liofilizada (Semilla LF, figura 18), se observa que hay un descenso en casi un ciclo logarítmico en las cuentas de levaduras de los 30 a los 90 días de almacenamiento (de 7.53 a 6.77 log₁₀ UFC/ml). Esto puede ser debido a que las levaduras al ser células más grandes y con mayor contenido de agua en su interior que las bacterias, toleren menos los procesos de deshidratación que estas últimas, por tanto su viabilidad se ve afectada con el paso del tiempo (Day, 1995). Sin embargo estas cuentas son comparables a las presentadas en la semilla control (6.95 log₁₀ UFC/ml).

Otro aspecto que cabe mencionar es la presencia de enterobacterias y coliformes totales en la semillas CG 90d, LF 30d y LF 90d de (2.13, 2.15 y 1.17 Log₁₀ UFC/ml respectivamente). Para las fermentaciones subsecuentes se re-pasteurizó el aguamiel para disminuir la presencia de estos microorganismos, sin embargo, la presencia aunque mínima de esta bacterias, se hizo notar nuevamente. Se cree que la contaminación provino durante el tratamiento de liofilización, debido a que este proceso no se lleva a cabo en condiciones asépticas.

Por otro lado respecto a los resultados de pH de las semillas, se encontró que no hay una variación evidente, los valores fluctuaron entre los 3.9 a 4.2 en todos las condiciones evaluadas (Figura 21), excepto nuevamente con la semilla seca que presentó un valor de pH de 4.76 (mayor a los demás tratamientos). Esto resulta lógico ya que con este método la sobrevivencia de bacterias lácticas fue menor que con los otros tratamientos.

En cuanto a los grados Brix (figura 19), se observa un comportamiento que puede estar relacionado con la actividad metabólica de cada semilla. Se vio que durante la reactivación de las semillas el consumo de sólidos totales es mayor en la semilla congelada que la liofilizada.

Todas las semillas se reactivaron en aguamiel a 6°Bx, en las semillas congeladas a los 30 y 90 días de almacenamiento hay un descenso de 3.6% y 2.9% de sacarosa respectivamente; y en las semillas liofilizadas 30 y 90 días el consumo es de 2.2% y 1.8% respectivamente.

Respecto al bajo consumo de sacarosa de la semilla liofilizada almacenada por 90 días, probablemente se deba a que hay menor cantidad de levaduras en dicha semilla (alrededor de un ciclo logarítmico), y quizá, en esta se esté produciendo menor cantidad de la enzima invertasa que les permita a los microorganismos disponer de la sacarosa como fuente de carbono.

En el caso de la semilla seca (DH), se observa que apenas hubo consumo de azúcares (bajando de 6.0 a 5.5 unidades), sin duda es debido a su menor sobrevivencia de bacterias lácticas y a la ausencia de levaduras en su composición.

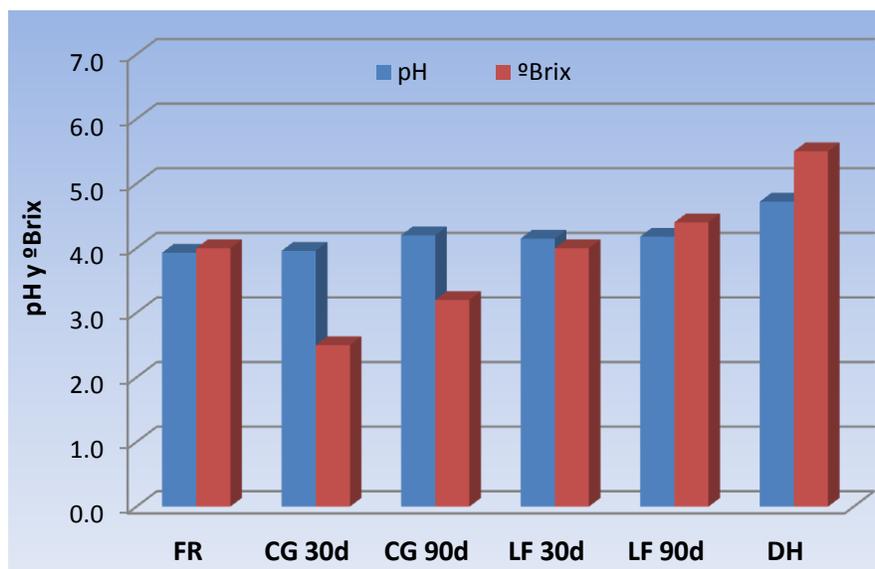


Figura 19. Propiedades fisicoquímicas (pH y porcentaje de sólidos) de la semilla sometida a métodos de conservación y a diferentes periodos de almacenamiento. FR= Semilla control, CG= Semilla congelada, LF= Semilla Liofilizada y DH= Semilla seca; 30 y 90 días de almacenamiento.

Adicionalmente a los resultados anteriores, también se le cuantificó el etanol de las semillas sometidas a los métodos de conservación y posteriormente reactivadas. Los resultados del contenido de etanol se muestran en la figura 20.

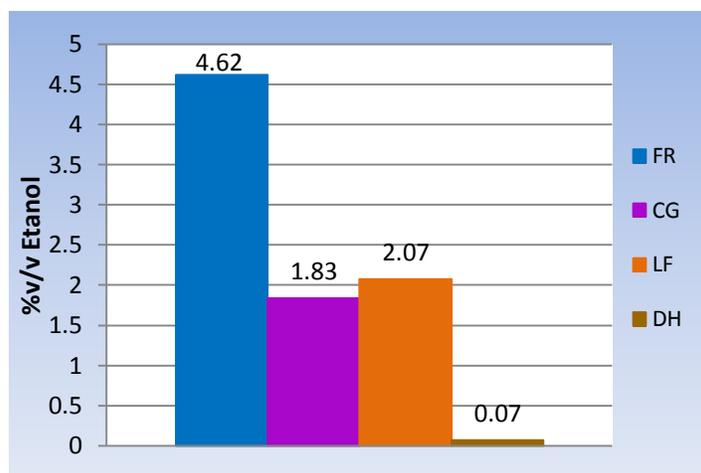


Figura 20. Contenido de Etanol (%v/v) para las semillas control (FR), congelada 30d (CG), liofilizada 30d (LF) y seca (DH).

Como se observa en los resultados de la figura 20, el someter la semilla a un método de conservación impacta fuertemente en la capacidad metabólica para producir etanol, ya que aproximadamente menos de la mitad de etanol se genera al someter las semillas a los métodos de conservación respecto a la semilla sin tratamiento que obtuvo 4.62%. Es por ello que se decidió realizar una reactivación previa de los microorganismos para que recuperaran su actividad y que estuvieran en plena fase exponencial de su crecimiento, así, favorecer la producción de este metabolito.

También se observa que se obtuvieron cantidades muy similares de etanol en la semilla liofilizado y en la congelado (2.07% y 1.83% respectivamente), esto era de esperarse ya que prácticamente las cuentas de levaduras son idénticas en ambas semillas (7.53 log₁₀ UFC/ml para la liofilizada y 7.52 log₁₀ UFC/ml para la congelada).

Finalmente se observa que en la semilla seca prácticamente no se produjo etanol, eso debido a que con el tratamiento de secado la sobrevivencia de las levaduras fue prácticamente nula. Aún con ello se llegaron detectar apenas pequeñas cantidades de etanol, quizá producido por la presencia de *Zymomonas mobilis*, bacteria que tiene la capacidad de producirlo y se ha reportado que se encuentra presente en le pulque (García, 2004)..

10.2.3 Efecto del método de conservación de la semilla y tiempo de almacenamiento en el desarrollo microbiano, consumo de azúcares y producción de etanol durante la fermentación del aguamiel.

En esta sección se consideraron en el análisis: las semillas control, congeladas (30 y 90 días) y liofilizadas (30 y 90 días) y se descartó el uso de la semilla seca. Es importante mencionar que debido a que no se detectaron levaduras en la semilla seca y que prácticamente no se produjo etanol, ya no se procedió trabajar con ella, puesto que además el producto de fermentación no se asemejaba sensorialmente al pulque.

En las curvas de crecimiento de la figura 21 no se presenta etapa de latencia, eso gracias a la reactivación previa de las semillas, con lo que se reduce el tiempo de fermentación.

10.2.3.1 Efecto del método de conservación de la semilla sobre el desarrollo de la comunidad microbiana en la fermentación.

Analizando los resultados de la figura 21, se observa en el caso de las levaduras que el comportamiento de su crecimiento en los distintos tratamientos de la semilla y periodos de almacenamiento es muy similar, solamente se detectaron diferencias con la semilla liofilizada y almacenada 90 días, la cual obtuvo una menor cantidad de estos microorganismos (7.54 log₁₀ UFC/ml), apenas 0.1 punto logarítmico menor comparado con los otros tratamientos,

En el caso de las bacterias lácticas, se observa que a partir de las 12 horas de fermentación llegan a la fase estacionaria en todas las condiciones evaluadas, también se observa que al final de la fermentación hay un mayor desarrollo con el método de congelación tanto a los 30 como 90 días de almacenamiento (8.4 log₁₀ UFC/ml y 8.52 log₁₀ UFC/ml respectivamente), mientras que la semilla liofilizada en general mostró casi medio punto logarítmico menos de estas bacterias en sus dos tiempos de almacenamiento (8.02 log₁₀ UFC/ml para los 30 días y 8.16 log₁₀ UFC/ml para los 90 días). Aunque ciertamente la diferencia no es muy grande, si se empieza a notar que la liofilización afecta en cierto grado la sobrevivencia del consorcio de bacterias lácticas y levaduras.

Para la semilla sin tratamiento, se observa que los mesófilos y bacterias lácticas se desarrollaron muy poco, además en ambos casos aparentemente comenzaron su fase estacionaria a partir de las 12 horas de crecimiento, muy probablemente debido a que como esta semilla no fue reactivada previamente, y las células apenas comenzaban a recuperar viabilidad.

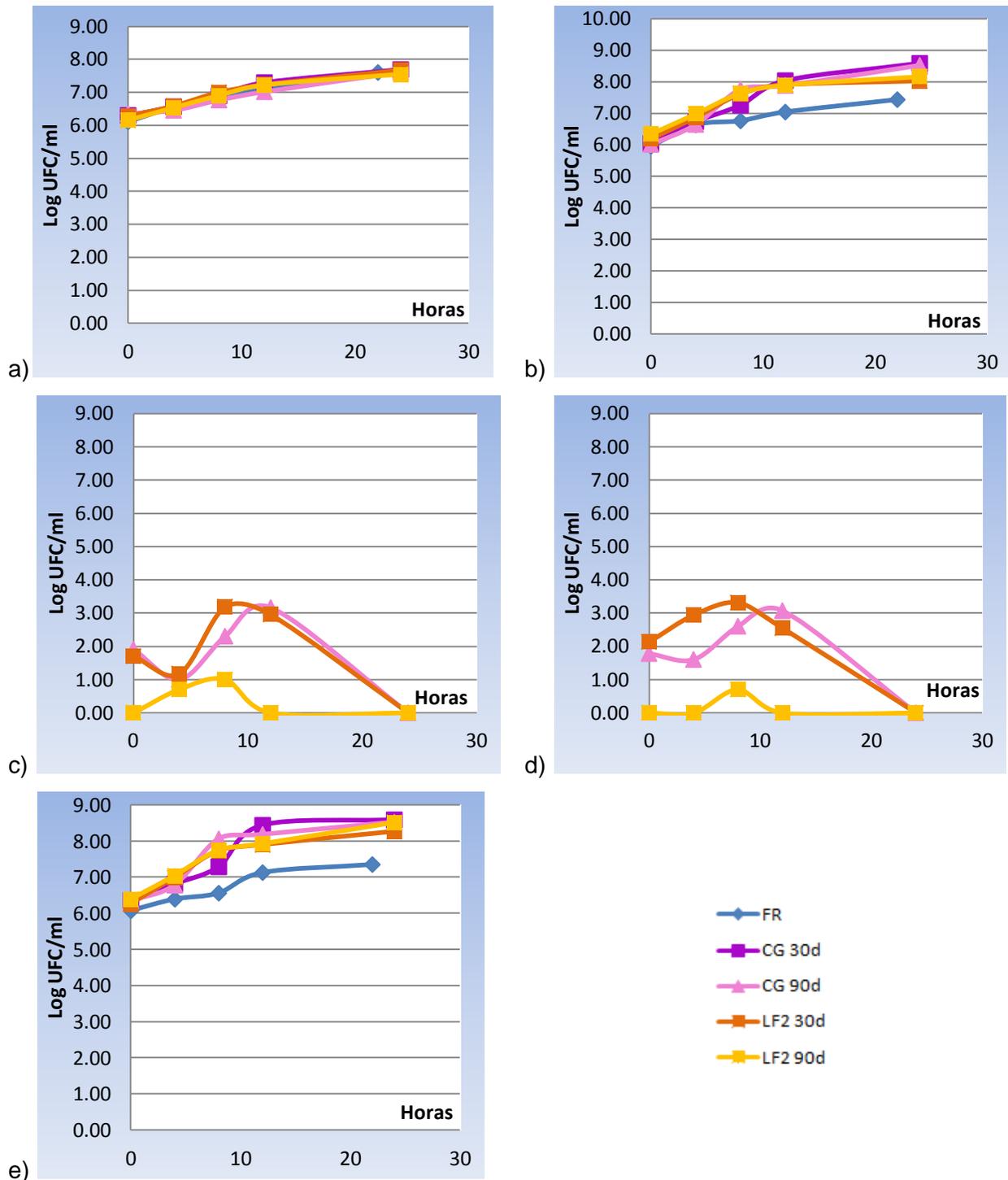


Figura 21. Fermentación. Efecto del método de conservación de la semilla de pulque. en el crecimiento microbiano durante la fermentación del aguamiel; A) Levaduras b) Bacterias ácido lácticas c) Enterobacterias d) Coliformes totales e) Mesófilos aerobios. FR= Semilla control, CG= Semilla congelada y LF= Semilla Liofilizada; 30 y 90 días de almacenamiento

Por otro lado, dado que hubo contaminación de enterobacterias y coliformes en la fermentación con semilla congelada a los 90 días y liofilizada 30 días, se observó un desarrollo de estas bacterias durante la fermentación.

Respecto a las enterobacterias, tanto con la semilla congelada 90d y la liofilizada 30d, se observa un descenso de medio orden de magnitud del tiempo 0 a las 4 horas de fermentación (1.75 a 1.2 log₁₀ UFC/ml), y entre los tiempos 4 y 8 horas un incremento en dos órdenes de magnitud (1.2 a 3.2 log₁₀ UFC/ml), pasando las 8 horas se da el descenso hasta prácticamente no detectarse al final de la fermentación.

Para la fermentación con la semilla liofilizada 90d, también hubo un aumento de estas bacterias de las 4 a 8 horas hasta alcanzar 1.0 log₁₀ UFC/ml, desde las 12 horas ya no se detectaron.

Y en el caso de las coliformes también se observa un aumento entre las 4 y 8 horas de aproximadamente 1.5 orden de magnitud, de 2.05 a 3.25 log₁₀ UFC/ml con la semilla congelada 90d y 1.75 a 3.1 log₁₀ UFC/ml con la semilla liofilizada 30d.

Prácticamente no se detectaron coliformes en la fermentación con la semilla liofilizada 90d, y que apenas se detectan 0.75 log₁₀ UFC/ml entre las 4 y 8 horas de fermentación.

10.2.3.2 Efecto del método de conservación en la fermentación, sobre el pH y °Brix.

Como se observa en la figura 22, la disminución del pH durante la fermentación es similar entre todos los tratamientos de la semilla. Resalta por ejemplo que utilizando las semillas liofilizadas y la semilla congelada a los 30 días de almacenamiento, el descenso de pH es un poco más rápido desde las 8 hasta las 12 horas de fermentación, comparados con la semilla control y la semilla congelada 90 días. Sin embargo, a las 24 horas de fermentación todos los tratamientos terminan con pH similares entre 3.5 y 4.0.

Para los °Brix (figura 23) se observa un comportamiento de consumo muy similar para todos los tratamientos evaluados, pero para las 24 horas, tanto la fermentación con semilla congelada 90 días y liofilizada 90 días el consumo sólo es de 4.5 °Brix aproximadamente, que sería 1°Bx menos respecto a las semilla control y a las semillas almacenadas únicamente por 30 días.

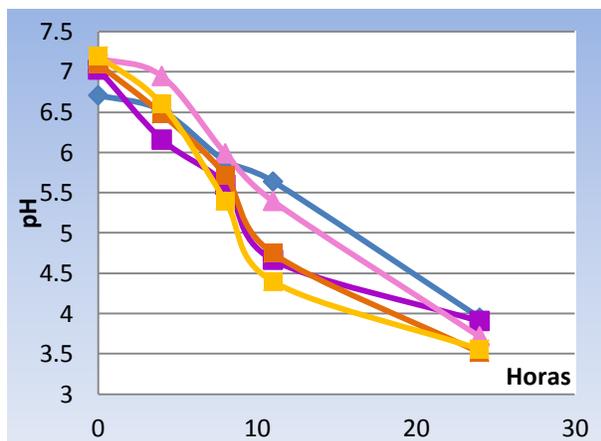


Figura 22. Fermentación. Efecto del método de conservación de la semilla. Cambios en el pH utilizando semillas conservadas y almacenadas 30 y 90 días.

—●— FRN2 —■— CG N1 30d —▲— CG2 t90d —■— LF2 30d —■— LF2 90d

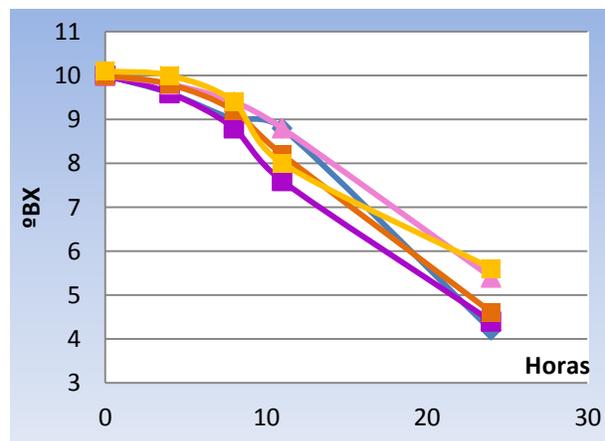


Figura 23. Fermentación. Efecto del método de conservación de la semilla. Cambios en el contenido de sólidos totales utilizando semillas conservadas y almacenadas 30 y 90 días.

—●— FRN2 —■— CG N1 30d —▲— CG2 t90d —■— LF2 30d —■— LF2 90d

Por lo anterior, se puede decir que durante el almacenamiento después 90 días, los microorganismos empiezan a perder su capacidad para degradar los carbohidratos, o puede que también la viabilidad de los microorganismos esté disminuyendo, y si hay menos células por tanto hay menor consumo de carbohidratos.

10.2.3.3 Efecto del método de conservación de la semilla en la fermentación, sobre los carbohidratos reductores.

En todos los tratamientos se observa un comportamiento de campana de “Gauss”, es decir, al principio hay pocos azúcares reductores, pero posteriormente se van produciendo a lo largo de la fermentación a partir de carbohidratos más complejos como la sacarosa, al final de la misma estos disminuyen ya que la velocidad con la que se consumen es mayor con la que se producen. Los resultados se presentan en la figura 24.

En el caso de la fermentación con semilla FR, se observa que a diferencia de las semillas liofilizadas, en las cuales no hay tanta producción de estos azúcares. Partiendo de 10.30 g/L se producen 36.59 g/L a las 12 horas de fermentación, y curiosamente a las 24 horas de fermentación no consume todos estos azúcares quedando en 18.53 g/L. Este comportamiento puede ser debido por la razón antes mencionada, esta semilla no fue reactivada como las demás, y por tanto, puede que la actividad enzimática para liberar estos azúcares a partir de la sacarosa u otros carbohidratos, esté disminuida.

Para las fermentaciones con semilla CG, se observa un comportamiento similar a FR, hay una producción de azúcares reductores a las 12 horas de fermentación (39.10 g/L a los 30 días de almacenamiento y 43.97 g/L a los 90 días de almacenamiento). Al término de la fermentación se presenta mayor consumo de estos azúcares por parte de la semilla CG 90d, bajándolos hasta 3.6 g/L frente a los 12.12 g/L que no se consumen utilizando la semilla CF 30d.

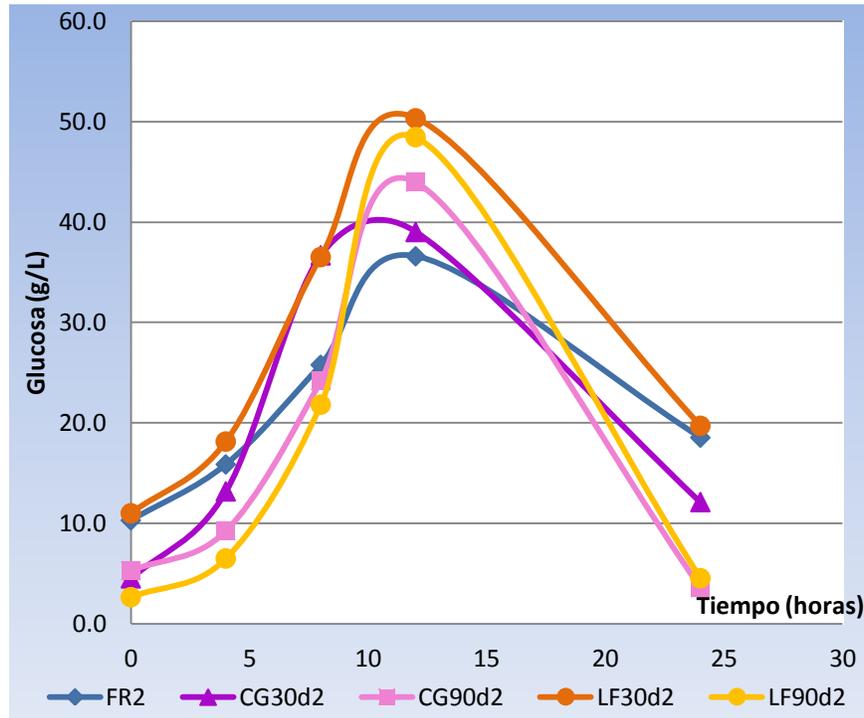


Figura 24. Resultados de los carbohidratos reductores medidos durante la fermentación del aguamiel empleando semillas sometidas a distintos tratamientos de conservación. FR= Semilla control, CG= Semilla congelada y LF= Semilla Liofilizada; 30 y 90 días de almacenamiento

En las fermentaciones con la semillas liofilizadas, se observó que produjeron la mayor cantidad de azúcares reductores. A las 12 horas de fermentación, con la semilla LF 30d se habían producido 50.32 g/L y con la semilla LF 90d 48.45 g/L.

Se puede pensar por lo anterior, que los microorganismos liofilizados tienen mayor capacidad para degradar la sacarosa u otros carbohidratos y liberar azúcares reductores, ya sea por parte de *Leuconostoc spp.* con la enzima dextranasa que libera fructosa para producir desxtranas (García 2004), o debido a las levaduras que como ya se mencionó anteriormente hidrolizan la sacarosa y liberan estos azúcares, sin embargo, es algo que se debería corroborar con otros tipos de análisis.

10.2.3.4 Efecto del método de conservación de la semilla en la fermentación, sobre los carbohidratos totales.

Basándose en los resultados de la Figura 25, se observa que el consumo de carbohidratos totales, en los que se incluyen la sacarosa principalmente y todas aquellas fructanas del tipo Inulina, levanas, fructo-oligosacaridos (FOS), etc, es muy similar para todas las fermentaciones con las semillas conservadas y semillas control. Lo que aprecia a notar observando las pendientes de las curvas, es que los microorganismos de las semillas FR, CG 30d y LF 30d, consumen ligeramente más rápido estos azúcares, que sus semejantes almacenadas 90 días, lo que hace pensar que a los 90 días de almacenamiento hay un pequeño descenso en la capacidad de degradar azúcares por parte de los microorganismos conservados por ambos métodos.

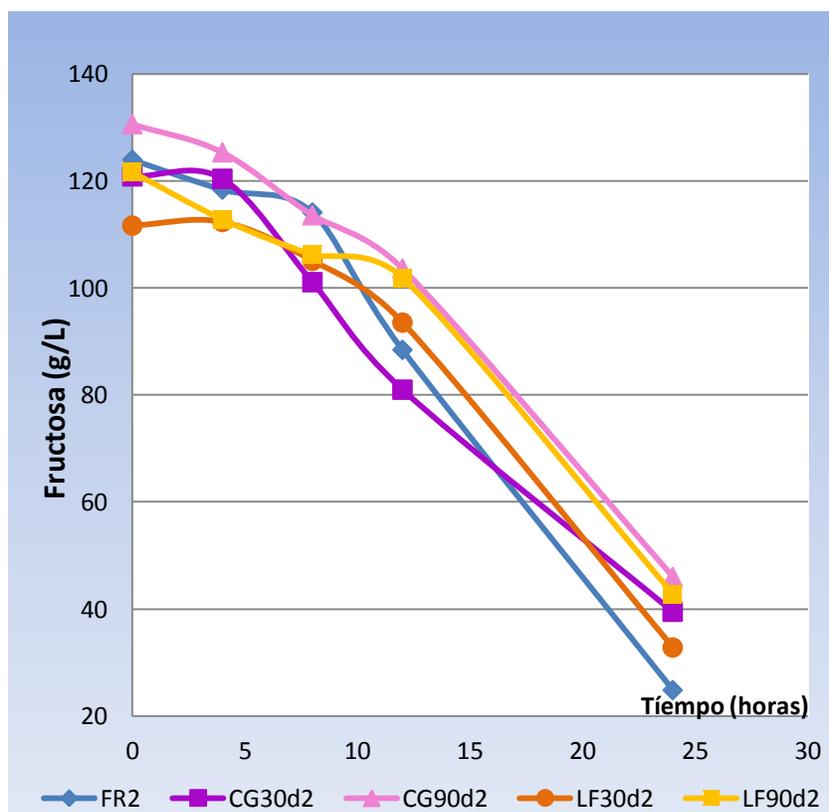


Figura 25. Resultados de los carbohidratos totales medidos durante la fermentación del aguamiel empleando semillas sometidas a distintos tratamientos de conservación. FR= Semilla control, CG= Semilla congelada y LF= Semilla Liofilizada; 30 y 90 días de almacenamiento

Por otro lado como se observa en la tabla 15, hay menor consumo neto de estos azúcares en las fermentaciones con las semillas liofilizadas (78.8 g/L), sin embargo, la diferencia respecto a las semillas congeladas no es tan grande (81.4) y puedes que estadísticamente no la haya.

Tabla 15. Consumo de carbohidratos totales durante las fermentaciones con semillas sometidas a métodos de conservación. FR= Semilla control, CG= Semilla congelada y LF= Semilla Liofilizada; 30 y 90 días de almacenamiento.

Semilla	Azúcares totales iniciales g/L	Azúcares totales finales g/L	Consumo g/L
FR	123.99	24.84	99.15
CG 30d	120.89	39.50	81.40
CG 90D	132.21	46.01	86.20
LF 30d	111.67	32.80	78.86
LF 90 d	121.67	42.83	78.84

10.2.3.5 Efecto del método de conservación de la semilla en la fermentación, sobre la producción de etanol.

Respecto a los resultados de producción de etanol se observan en la figura 26 algunas comparaciones entre los distintos métodos de conservación y el tiempo en el que fueron almacenados respecto a los resultados de la fermentación con la semilla sin tratamiento. A continuación se menciona cada caso.

Para el inciso a), se observa el efecto del tiempo de almacenamiento utilizando semillas conservadas por congelación, lo que primero se aprecia es la menor cantidad de etanol que se obtiene con la semilla congelada respecto a la fresca, 3.27 y 4.13 %v/v respectivamente (disminuye 0.86%v/v con el tratamiento).

También se observa que después de 90días de almacenamiento, la capacidad de la semilla para producir etanol disminuye aún más comparado a los 30días, 3.27 %v/v para CG 30d y 2.88 %v/v para CG 90d (disminuye 0.39 %v/v pasados de 60días).

Este mismo efecto se observa con la liofilización de la semilla (inciso b), solo que en este caso el descenso de la liofilización de 30 días de almacenamiento a 90días de almacenamiento es mayor que en el mismo periodo de tiempo con la congelación, disminuye de 3.29 a 2.33 %v/v de etanol (un descenso de 1.4%).

Para el caso de los incisos c y d, se observa que con ambos métodos de conservación se obtiene cantidades similares de etanol a los 30 días de almacenamiento, 3.27 para CG 30d y 3.29 %v/v para LF 30d. Sin embargo, a los 90 días de almacenamiento, la semilla congelada proporciona un mayor rendimiento de etanol en comparación con la semilla liofilizada (2.88 y 2.33 %v/v respectivamente). Esto último sustenta que la liofilización presenta un efecto negativo con la sobrevivencia de las levaduras y/o capacidad de las mismas para producir etanol.

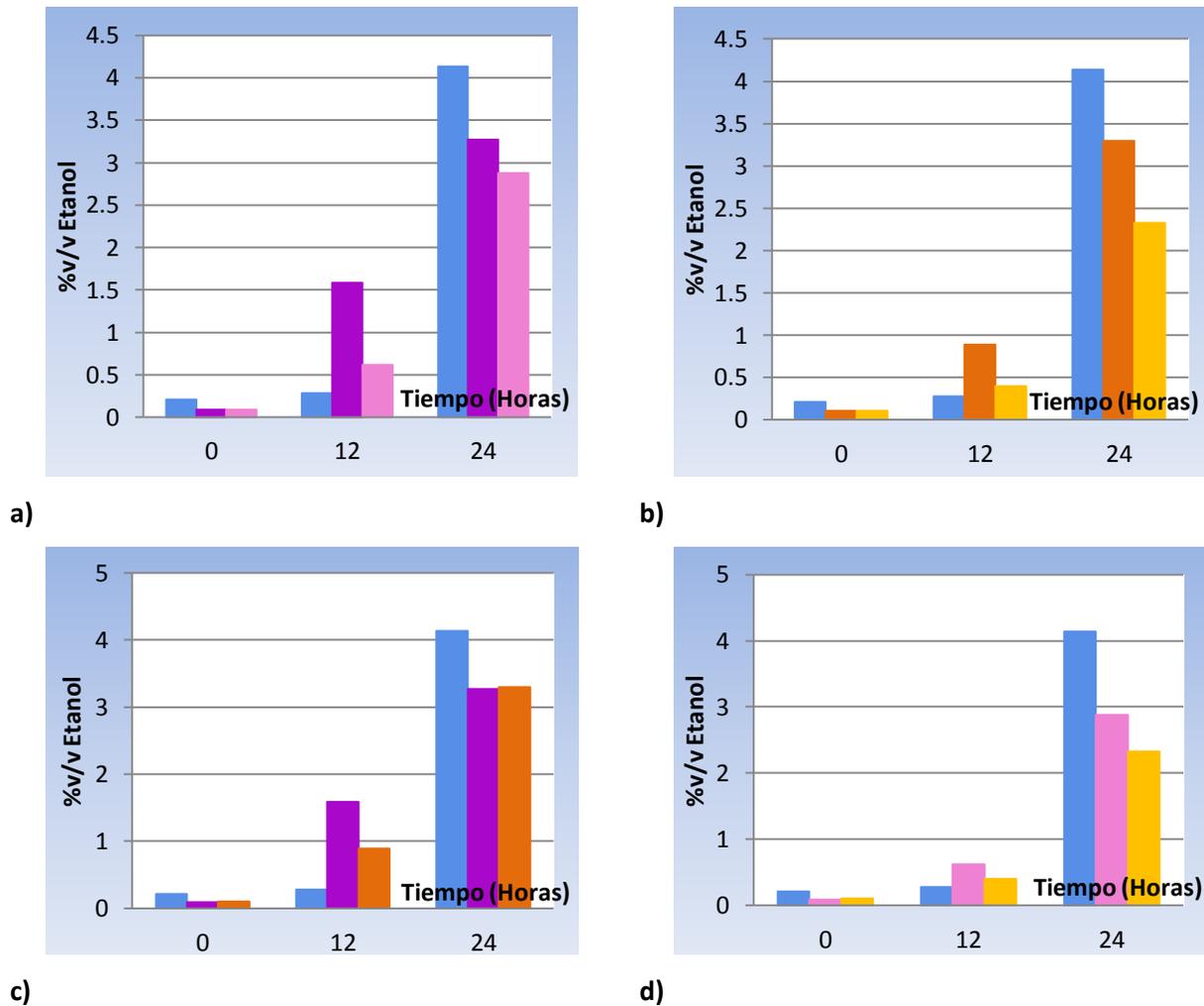


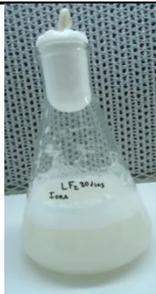
Figura 26. Resultados de producción de etanol durante de fermentaciones inoculadas con semillas conservadas. a) Efecto de la congelación durante el periodo de almacenamiento 30 y 90 días. b) Efecto de la liofilización durante el periodo de almacenamiento 30 y 90 días. c) Comparación entre la congelación y liofilización a los 30 días de almacenamiento d) Comparación entre la congelación y liofilización a los 90 días de almacenamiento. FR= Semilla control, CG= Semilla congelada y LF= Semilla Liofilizada; 30 y 90 días de almacenamiento.

FR N2 CG N1 30d CG 2 t90d LF 2 30d LF 2 90d

10.2.3.6 Efecto sobre las propiedades sensoriales.

Un punto muy importante son las propiedades sensoriales de las bebidas obtenidas al final de las fermentaciones. A pesar de que no se realizó una evaluación sensorial formal de las diferentes fermentaciones, a continuación se presenta una descripción subjetiva de la bebida, que si bien no es un análisis estadístico, proporciona una idea general del producto final.

Tabla 16. Descripción sensorial de las fermentaciones con la semilla fresca, congelada y liofilizada.

Atributo / Fermentación	FR (sin tratamiento)	CG (congelada)	LF (liofilizada)
Apariencia	<ul style="list-style-type: none"> • Turbio • Color: Blanco • Viscoso pero no hilante • Espumoso 	<ul style="list-style-type: none"> • Turbio • Color: Blanquecino • Viscoso pero no hilante • Muy espumoso 	<ul style="list-style-type: none"> • Turbio • Color: Blanco • Poco viscoso • Espumoso
Aroma	<ul style="list-style-type: none"> • Mantequilla (diacetilo) • Aroma afrutado • Poco picoso 	<ul style="list-style-type: none"> • Pequeña nota afrutada • Pequeña nota a un solvente • Picoso 	<ul style="list-style-type: none"> • Aroma afrutado • Picoso
Sabor	<ul style="list-style-type: none"> • Efervescente • Acido • Poco Astringente • Sensación a fresco • Sensación alcohólica 	<ul style="list-style-type: none"> • Muy efervescente • Acido • Astringente • Ligeramente amargo • Poco alcohol 	<ul style="list-style-type: none"> • Efervescente • Ácido • Poco dulce • Astringente • Poco alcohol
Imagen			

Dado que no existe un perfil sensorial definido para el pulque, sólo se harán notar las peculiaridades encontradas. Como se observa en la tabla 16, la fermentación inoculada con semilla congelada presentó aromas como a solventes y un sabor ligeramente amargo, estas dos características hacían poco agradable la bebida, además mayor producción de CO₂ y acidez (metabolismos característico de microorganismos heterofermentativos y levaduras, mientras tanto, el liofilizado era más agradable en cuanto aromas y sabor, pero presentaba menor contenido de CO₂, y viscosidad. Esto último puede deberse a que hay menor presencia o actividad por parte de las levaduras para producir CO₂ y de algunas bacterias heterofermentativas productoras de dextranas como *Leuconostoc spp.*

10.3 INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL, INOCULANDO UN SEMILLA CONSERVADA JUNTO CON UNA CEPA DE *S. cerevisiae* AISLADA DEL PULQUE.

Con el único objetivo de incrementar el porcentaje de etanol en fermentaciones de aguamiel a nivel laboratorio, se intenta incrementar la cantidad de levaduras en la fermentación, adicionando una cepa del género *S. cerevisiae* previamente aislada del pulque.

Es por tanto que se aislaron y conservaron 110 colonias de levaduras de la fermentación con aguamiel del Estado de México. Se consideraron las que morfológicamente fueran color blanco, opaco, circulares y que fueran relativamente grandes, además que microscópicamente fueran forma ovoide (típico de las levaduras).

10.3.1 Identificación de levaduras por el método PCR-RFLP (ITS 1-ITS 4).

De las fermentaciones donde se modificó la concentración de azúcares en el aguamiel, se aislaron 110 colonias de levaduras, de las cuales se seleccionaron cuatro colonias que crecidas en caldo YM, tenían fuerte aroma a alcohol, estas colonias provenían de los tiempos finales de la fermentación con el aguamiel a 8°Bx. Dichas cepas se sometieron a un proceso de identificación con el fin de obtener una cepa del género *S. cerevisiae*, permitieran producir mayor etanol.

Se hizo un análisis de restricción (PCR-RFLP) o también llamado polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. Para ello se amplificó la región ITS 1-ITS 4 (espaciadores internos transcritos) de la unidad transcripcional donde se agrupan los genes ribosomales de la levaduras.

En la figura 27 se muestran los resultados de la reacción de PCR a partir de colonia para las cuatro cepas seleccionadas. Las condiciones de reacción y corrida del gel de electroforesis se muestran en el punto 9.4.2.3.

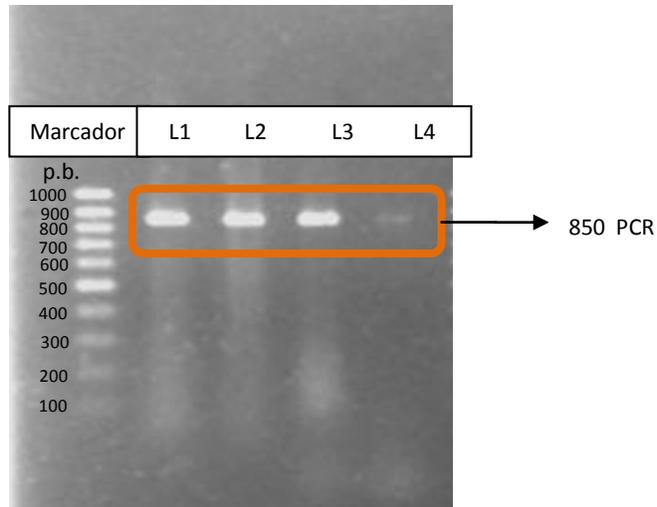


Figura 27. Reacción de PCR del gen ITS1- ITS4 para cuatro cepas de levaduras (L 1-4) aisladas de una fermentación de aguamiel a 8°Bx. Gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X a 100V durante 50 min y teñido con bromuro de etidio

Como se observa en la figura 27, las cuatro cepas presentaron el mismo patrón de bandas, alrededor de 850pb, Fernández (2000) reporta que para la cepa de *S. cerevisiae* una banda del mismo peso. Desafortunadamente la cantidad de DNA en la L4 es muy poca y quizá sea insuficiente para la reacción con enzimas de restricción.

En la figura 28 se observa el DNA digerido con la enzima de restricción Hinf1. Aparentemente para las 4 levaduras, se observa el mismo patrón de bandas, salvo por la levadura L4 que no se alcanzan a distinguir sus bandas a 120 pb, debido principalmente a la baja concentración de DNA que se colocó en el gel.

En todos los casos se observa una banda gruesa entre los 360 y 380pb, lo más seguro es que son dos fracciones de DNA que tiene un peso molecular muy similar. En general mediante el empleo de esta enzima de obtuvo el siguiente patrón (375+360+115 pb = 850pb). Fernández (2000) reportan 3 fragmentos (375+365+110pb) para el grupo, *Saccharomyces sensu stricto* que comprende a las especies *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus*.

Comparando con la base de datos yeast-id.com se determinaron las cepas como *S. cerevisiae* con un 90% de identidad con el uso únicamente de la enzima Hinf1, para asegurar la identificación se recomienda utilizar en más de una enzima de restricción o la secuenciación directamente.

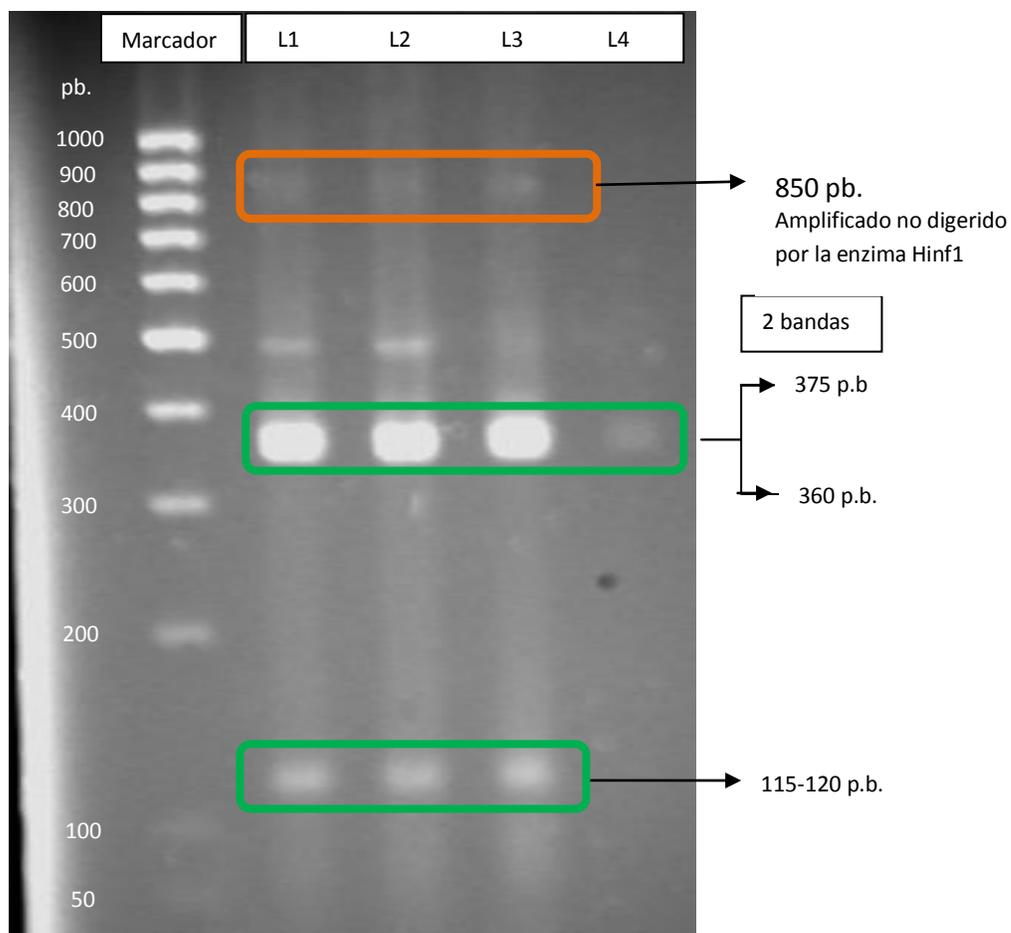
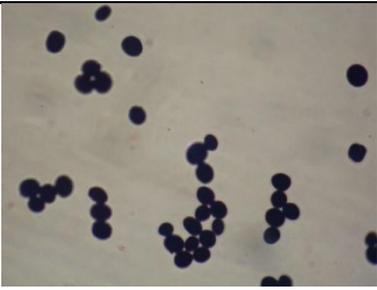


Figura 28: Separación de los fragmentos obtenidos con el uso de la enzima Hinf1 para cuatro cepas de levaduras (L 1-4) aisladas de una fermentación de aguamiel a 8ºBx. Gel de agarosa al 3%, 80V durante 2 horas y teñido con bromuro de etidio. De color naranja se aprecian las bandas que representan la parte del DNA sin digerir con la enzima, de color verde se observan los patrones de bandas que correspondientes al género *Saccharomyces spp.*

10.3.2 Caracterización de la cepa *S. cerevisiae*.

Antes de la caracterización se seleccionó una de las 4 cepas previamente identificadas. Al realizar una tinción de Gram se observó que la cepa L3 presentaba más homogeneidad en las células, respecto al tamaño y forma, y que al reactivarla en el medio de cultivo líquido presentara mayor densidad óptica. Es así por lo cual se seleccionó la L3. A continuación se describen sus características coloniales y microscópicas (tabla 17).

Tabla 17. Características, macroscópicas y microscópicas de la cepa L3, Identificada como *S. cerevisiae*.

Descripción macroscópica	Descripción microscópica
Colonias medianas, blancas, opacas circulares, elevación convexa y textura cremosa. En medio líquido floculaban con facilidad.	Células ovoides de mediano tamaño, Oscuras con la tinción de Gram, Algunas presentan germinación en los extremos.
	

Para conocer su capacidad para producir biomasa en aguamiel, se realizó una cinética de crecimiento, midiendo pH y °Bx. (figura 29). Como se observa en dicha cinética, el microorganismo se inocula en el orden de 6.15 Log₁₀ UFC/ml, presenta una etapa de latencia de las 8 horas donde el pH baja de 8 a 6. A partir de las 8 hasta las 12 horas presenta una primera fase exponencial, aumentando 1 orden de magnitud sus cuentas, el pH se mantiene y los °Brix bajan lentamente de 9 a 7.

De las 12 horas hasta las 20 horas presenta una fase estacionaria, probablemente debido a que se agotó una fuente de carbono, muy probablemente sacarosa, esto se nota al observar que los grados Brix comienzan a bajar rápidamente.

Una vez pasadas las 20 horas la cepa toma una segunda fase exponencial, seguramente por que comenzó a consumir otra fuente de carbono (tal vez un FOS o inulina), es aquí cuando los °Brix disminuyen radicalmente de 5 a 3, el pH baja situándose en 5.

A las 32 horas se observa el máximo crecimiento a un valor de 9.78 Log₁₀ UFC/ml. En este punto los grados Brix bajan a 2.8, al no haber más fuente de carbono disponible la levadura comienza a disminuir su cuenta. A las 40 horas la levadura alcanza su segunda fase estacionaria manteniéndose con cuentas de 7.5 Log₁₀ UFC/ml durante 8 horas más que se detuvo el monitoreo. Ya no se observaron cambios en el pH y grados Brix.

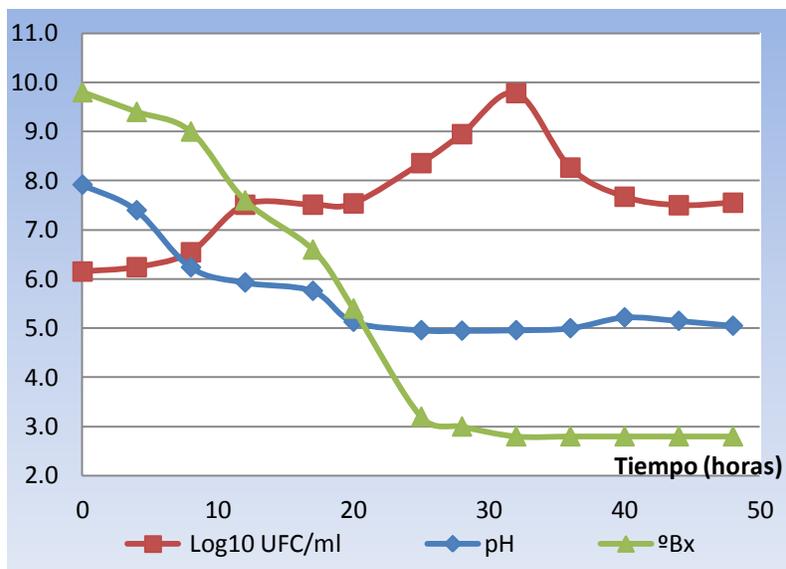


Figura 29. Cinética de crecimiento de cepa L3 de *S. cerevisiae* en aguamiel 10°Bx , así como cambios en el pH y °Brix. Fermentación a 30°C e inóculo al 10% v/v.

También se cuantificó el etanol producido durante la cinética, en la figura 30 se muestran los resultados obtenidos. Como se puede observar el etanol se empieza a producir más rápidamente a partir de las 12 horas de crecimiento en la cepa L3 (de 1.05 a 4.1 %v/v). A partir de las 24 horas en adelante, la producción ya no es tan grande y se mantienen los niveles después de las 36 horas de la cinética en 4.7 %v/v.

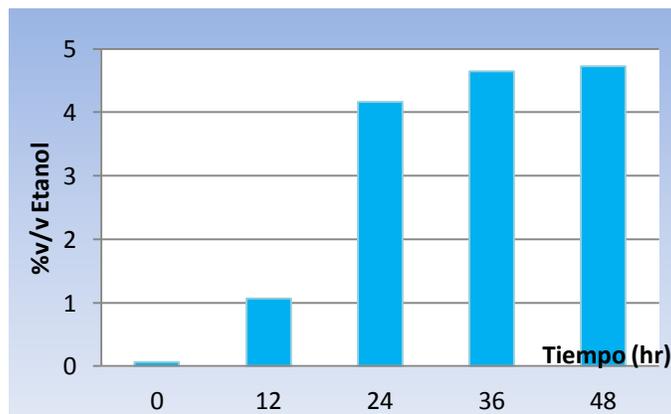


Figura 30. Producción de etanol durante la cinética de crecimiento de la levadura L3. Fermentación con aguamiel a 10°Bx a 30°C e inóculo al 10% v/v.

Dado que existe una gran disminución en los niveles de sólidos totales de tiempo cero a las 24 horas de fermentación, y observando que la mayor producción de etanol se lleva a cabo a partir de las 12 horas de crecimiento, se prosiguió a realizar una fermentación dejando crecer primero 12 horas a esta cepa en aguamiel ajustado a 10°Brix.

Pasado este tiempo, se inoculó el aguamiel con la semilla conservada por congelación, la cual fue la que presentó mayor producción de etanol.

10.3.3 Fermentación conjuntando un inóculo de semilla conservada por congelación y una cepa de levadura identificada como *S. cerevisiae*.

Como se mencionó anteriormente, se inoculo el aguamiel con la cepa L3 al 10%v/v y se dejó crecer a 30°C en un matraz sin aeración durante 12 horas. Durante ese tiempo no se determinó otro grupo microbiano salvo las levaduras ya que los demás microorganismos se adicionaron a partir de las 12 horas. En la figura 31 se observan los resultados de crecimiento para los grupos microbianos principales y en la figura 32 se aprecian las variaciones de pH y °Brix durante la fermentación.

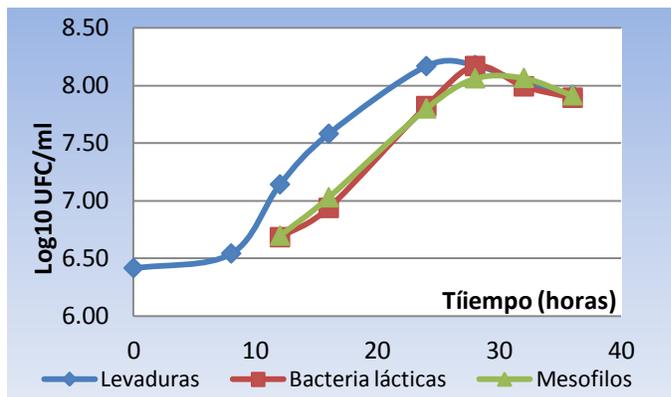


Figura 31. Curvas de crecimiento de la fermentación con la cepa L3 y la semilla CG (congelación).

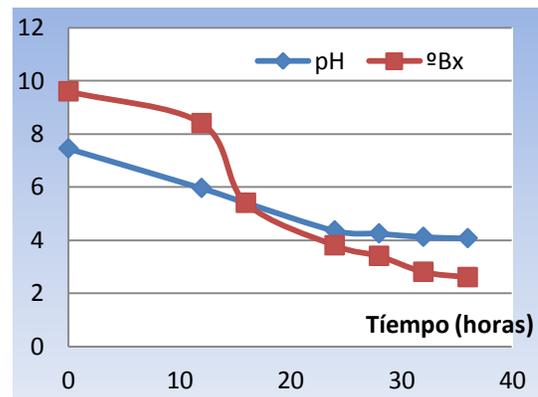


Figura 32. Monitoreo de pH y Brix, durante la fermentación con la cepa L3 y la semilla CG (congelación).

Como se observa en la figura 31, las levaduras presentan una fase lag del tiempo cero hasta las 8 horas de fermentación (son inoculadas con 6.41 Log₁₀ UFC/ml), a partir de este tiempo comienza su fase exponencial.

Cabe señalar que las cuentas de levaduras a partir de las 12 horas constituyen tanto las levaduras de la cepa *S. cerevisiae* como las que aporta la semilla congelada.

La semilla CG es inoculada a las 12 horas, nótese que tanto las bacterias lácticas como los mesófilos aerobios no presentan fase lag, sino pasan directo a fase exponencial, eso es debido a la reactivación previa de la semilla congelada (son inoculados en el orden de 6.68 Log₁₀ UCF/ml).

Las levaduras alcanzan su máximo desarrollo a las 24 horas de que dio inicio la fermentación (8.17 Log₁₀ UFC/ml). Mientras tanto las bacterias lácticas y mesófilos aerobios alcanzan su máximo desarrollo después de las 28 horas de crecimiento, con cuentas muy similares a las levaduras. Aunque no ha sido durante toda la fermentación, salvo al inicio como al final de la misma, se han mantenido cantidades similares de levaduras y bacterias, solo en la fase exponencial había cerca de medio orden de magnitud más levaduras que bacterias.

A partir de las 28 horas de fermentación se observa una reducción de todos los grupos microbianos, a este tiempo los grados Brix son de 3.2, ya muy bajos para que continúe el crecimiento, y el pH disminuye hasta 4 (el promedio reportado para el pulque), a este pH ya comienzan a disminuir de bacterias no tan tolerantes a la acidez (Figura 32).

Respecto a la producción de azúcares reductores (Figura 33), se observan que los resultados son semejantes comparados con las fermentaciones de las semillas congeladas (hubo una producción de 39 g/L en su punto máximo), sin embargo, al haber mayor cantidad de microorganismos y que el tiempo de fermentación se prolongó 12 horas más para dar tiempo al desarrollo de bacterias lácticas, los azúcares reductores como los totales descendieron prácticamente a 0 (2 y 8g/L respectivamente).

También se observa que el consumo de carbohidratos totales presenta un comportamiento similar de consumo de azúcares comparado con las fermentaciones sin la adición de levadura, la única diferencia fue que en este caso, los azúcares totales se consumieron casi en su totalidad debido a que se prolongó el tiempo de fermentación hasta las 36 horas (Figura 33).

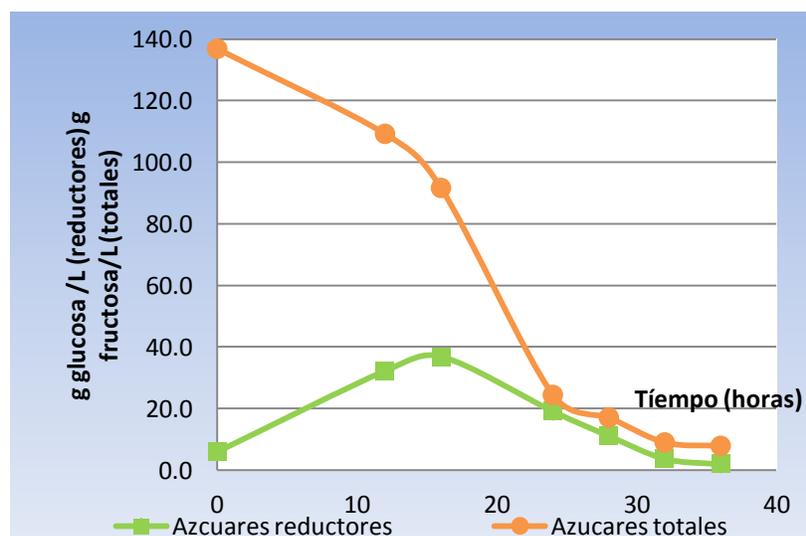


Figura 33. Comportamiento de los carbohidratos totales y reductores durante la fermentación con la cepa L3 y la semilla CG (congelación).

Finalmente se realizó una comparación de la producción de etanol, entre todas las fermentaciones que utilizaron semillas congeladas, la semilla control e incluyendo esta última fermentación. Los resultados se muestran en la Figura 34.

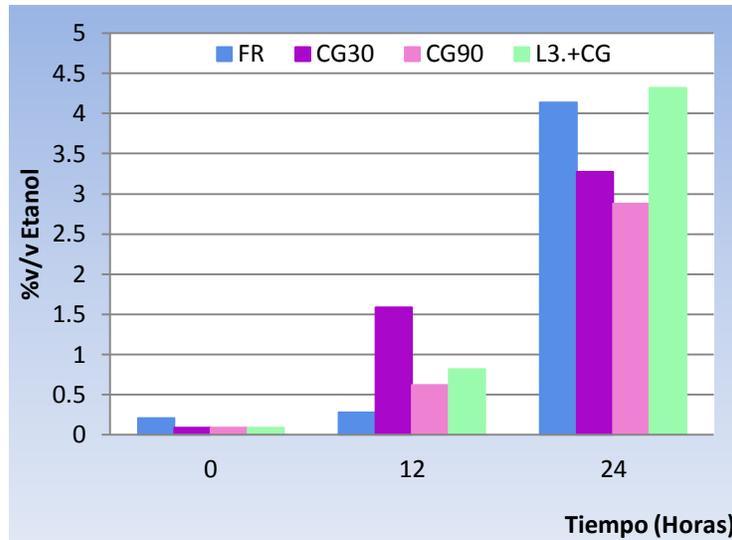


Figura 34. Comparación de la producción de etanol en las distintas fermentaciones donde se utilizó semilla congelada y semilla control. FR = sin tratamiento, CG30 = congelación 30días, CG90 = congelación 90 días, L3CG = cepa L3 y semilla sometida a congelación.

Como se puede observar en la figura 34, el realizar la fermentación utilizando una semilla conservada con una levadura, incrementa en valores similares a la cantidad de etanol que se obtiene con semilla natural y sin tratamiento (4.25 para L3+CG y 4.15 %v/v para FR). Esta sería una alternativa para incrementar los niveles de etanol obtenidos a nivel laboratorio, y a su vez lograr desarrollar un proceso controlado cuyo producto de fermentación satisfaga a sus consumidores, por lo que sería necesario realizar un estudio sensorial formal de las bebidas obtenidas.

11. CONCLUSIONES

Ajustando el contenido de sólidos (°Brix) en el aguamiel de 8 a 10, no representa una mejoría impactante para el desarrollo de todos los grupos microbianos, y producción de etanol. Es por ello que es suficiente el uso de un aguamiel con 8°Bx.

Con el fin de eliminar los coliformes y las enterobacterias presentes en el aguamiel, fue necesario incrementar la temperatura de pasteurización de 70 a 75°C.

Es sabido que la microbiota del pulque es muy variable y que dicha proporción modifica las características finales del producto. Se observó que el tipo metabolismo de los microorganismos presentes en las semillas sometidas a métodos de conservación también fue variable y que dependía del método utilizado, por consiguiente, las bebidas se percibieron sensorialmente diferentes al final de la fermentación.

Someter la semilla a congelación y liofilización para su conservación, impacta negativamente en la capacidad de las levaduras para producir etanol durante la fermentación (3.3% v/v de etanol promedio utilizando ambos métodos), en comparación con los resultados de etanol producido con la semilla sin tratamiento (4.2 % v/v).

Conservar las semillas por el tratamiento de secado elimina la totalidad de las levaduras, por ende no hay producción de etanol, también este método disminuye un ciclo logarítmico las bacterias ácido lácticas.

Se observó que la sobrevivencia de los microorganismos así como la capacidad para consumir azúcares se ve ligeramente disminuida a partir de los 90 días de almacenamiento para todos los métodos de conservación de semilla utilizados.

La semilla liofilizada almacenada por 3 meses presentó una mayor actividad para la degradación de carbohidratos que la congelada en el mismo periodo de tiempo, pero menor capacidad para producir etanol. Es posible que esto último se deba a la menor sobrevivencia de levaduras durante del almacenamiento (aprox. 1.0 log₁₀ UFC/ml menos).

De acuerdo con los resultados de producción de etanol y conteo de microorganismos, se seleccionó el método de congelación como el mejor para conservar microorganismo, sin embargo no se descarta el uso de la liofilización ya que se observó que el pulque obtenido a partir de esta semilla es más agradable sensorialmente y similar al natural pero con bajo contenido alcohólico y viscosidad.

Existe la posibilidad de preparar un inoculo conjuntando una cepa de *S. cerevisiae* y la semilla conservada por congelación, que permite compensar el etanol que no se produce con la semilla por sí sola. Además se observó que el comportamiento de la fermentación con este inoculo es similar en cuanto al pH final y en el consumo de azúcares reductores y totales, comparado con la fermentación control y es mejor para el desarrollo de los grupos microbianos dando cuentas alrededor de 10^9 UFC/ml

El etanol producido adicionando la levadura es similar al que se obtiene con la semilla natural y sin tratamientos. Un punto negativo de utilizar este inoculo es que toma 12 horas más para que se lleve a cabo la fermentación, y que se necesita más material para su preparación. Y a pesar de que se aplicó directamente una levadura productora de etanol en la fermentación, no se alcanzó el objetivo de obtener un bebida con 6%v/v de etanol dado que se obtuvo como máximo 4.7% v/v de etanol.

12. PERSPECTIVAS

Modificar los procedimientos y condiciones de conservación de la semilla, o/y modificar cantidad de crioprotector empleado, para ver si hay mayor producción de etanol durante una fermentación.

Ensayar modificando las condiciones del tratamiento de secado para ver si da mayor viabilidad sobre los microorganismos.

Seguir probando el preparar inóculos conjuntando semilla de pulque con otra fuente de microorganismos o cepas puras, donde se modifiquen las condiciones de fermentación para producir mayor cantidad de etanol.

Profundizar en el estudio de la microbiota presente en el pulque, por lo que es necesario identificar principalmente las bacterias lácticas y las levaduras que se desarrollan al inicio durante y al final de la fermentación del aguamiel.

13. ANEXOS.

ANEXO 1 Normatividad y especificaciones de calidad de la materia prima.

Tabla 18: Clasificación del aguamiel de acuerdo a las especificaciones de calidad de la norma Mexicana NMX-V-022- 1972 (AGUAMIEL).

ESPECIFICACIONES	TIPO I		TIPO II
	Min	Max	Menor de:
pH	6.6	7.5	4.5
Densidad g/cm ³	1.035	1.05	1.030
Índice de refracción con refractómetro de inmersión a 20°C	59	100	27
Sólidos totales g/100ml	13	17	7
Azúcares reductores totales (en glucosa) g/100 ml	8	12	6
Azúcares reductores directos (en glucosa) g/100 ml	2	3	3
Gomas (en glucosa) g/100 ml	2	6	0.02
Proteínas mg/100 ml	300	600	100
Cenizas mg/100 ml	300	430	180
Acidez mg/ 100 ml (como ácido láctico)	-----	1.03	4.00

Tabla 19: Clasificación del pulque de acuerdo a su etapa de elaboración (Norma Mexicana NMX-V-037- 1972 (PULQUE)).

ESPECIFICACIONES	TIPO I (Semilla y puntas)		TIPO II Pulque comercial	
	Min	Max	Min	Max
Índice de refracción con refractómetro de inmersión a 20°C	1.339	1.3406	1.3365	1.3380
pH	>3.7	4.2	3.5	4.0
Acidez mg/ 100 ml (como ácido láctico)	0.40	0.75	0.40	0.70
Azúcares reductores totales (en glucosa) g/100 ml	0.10	0.80	0.20	0.50
Grado alcohólico, % alcohol por volumen.	6.0	9.0	4.0	6.0

ANEXO 2. Medios de cultivo.

a) Composición de los medios de cultivo.

- AEM (Agar Extracto de malta).
BD Difco™ Malt Extract Agar
Maltosa 12.75g, Dextrina 2.75g, Glicerol 2.35 g, Peptona 0.78, Agar 15.0g.
- MRS (Agar MRS para Lactobacilos).
BD Difco™ MRS Agar. Fórmula para preparar un litro.
Peptona proteosa No.3 10.0g; Extracto de carne 10.0g; Extracto de levadura 5.0g; Dextrosa 20.0g; Polisorbato 80 1.0g; Citrato de amonio 2.0g; Acetato de sodio 5.0g; Sulfato de magnesio 0.1g; Sulfato de manganeso 0.05g; Fosfato dipotásico 2.0g; Agar bacteriológico 15.0g.
- ACP (Agar cuenta en placa).
BD Difco™ Standard Methods Agar. Fórmula para preparar un litro.
Digerido pancreático de caseína 5.0g, Extracto de levadura 2.5g, Dextrosa 1.0g, Agar 15.0g.
- VRBA (Agar Bilis rojo violeta para Coliformes totales).
BD Difco™ Violet Red Bile Agar. Fórmula para preparar un litro.
Extracto de levadura 3.0g; Peptona 7.0g; Sales biliares No.3 1.5g; Lactosa 10.0; Cloruro de sodio 5.0g; Agar bacteriológico 15.0g; Rojo neutro 0.03g; Cristal violeta 0.002g.
- VRBGA (Agar Bilis rojo violeta glucosado para Enterobacterias).
Extracto de levadura 3.0g; Peptona 7.0g; Cloruro de sodio 5.0g; Sales biliares No. 3 1.5g; Glucosa 10.0g; Rojo neutro 0.03g; Cristal violeta 0.002g; Agar 12.0g.
- GELPA (Agar glucosa, peptona, extracto de levadura).
Fórmula para preparar un litro.
Glucosa 20g; Extracto de levadura 5.0g; Peptona bacteriana 1.0g; Agar 15.0g.
- YM (Agar para Hongos y levaduras).
Difco™ Cultivation of Yeast, Molds and other Aciduric microorganisms. Fórmula para un litro. Extracto de levadura 3.0g, Extracto de malta 3.0g, Peptona 5.0g, Dextrosa 10.0g, Agar 15.0g.

Tabla 20 Condiciones de estudio para la determinación del crecimiento los grupos microbiano.

Grupo Microbiano	Medio de cultivo	Condición de incubación	Intervalo de sensibilidad (UFC/placa).
Levaduras	Agar extracto de malta.	30° C / 48-72h	15-150
Bacterias ácido lácticas	MRS Agar	30°C / 24h	25-250
Mesofilos Aerobios	Agar cuenta en placa	30° C / 24h	25-250
Enterobacterias	Agar Bilis Rojo Violeta glucosado	37° / 24h	15-150
Coliformes totales	Agar Bilis Rojo Violeta	37° / 24h	15-150

ANEXO 3. Métodos y análisis.

a) Preparación del reactivo DNS.

Para preparar 100ml de solución

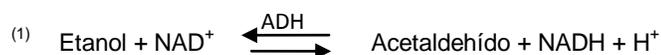
- ▶ Hidróxido de sodio (NaOH) 1.4g
- ▶ Ácido 3,5-Dinitrosalisílico 0.75g
- ▶ Tartrato de sodio y potasio 10.0g
- ▶ Fenol 0.54g
- ▶ Metabisulfito de sodio 0.59g

Se disuelven en agua destilada en el orden en que se enlistan y se deja reposar en frasco color ámbar 24h antes de usarlo.

b) Cuantificación de etanol (Bioanalysis for Ethanol/ food Analysis de Boehringer Mannheim A. / Biopharm-Roche S.).

Principio enzimático.

El etanol es oxidado a acetaldehído por nicotinamida-adenin dinucleotido (NAD⁺) y la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y posteriormente la oxidación de acetaldehído con la enzima aldehído deshidrogenasa (Al-DH). El NADH es determinado espectrofotométricamente a 340nm en celdas de cuarzo de volumen reducido. A continuación se muestran las reacciones involucradas.



Contenido del Kit

- Suspensión 1 (Frasco con 100ml). Buffer de difosfato de potasio, pH = 9,
- Suspensión 2 (Frasco con 1.6ml). Suspensión de ADH = 7000U.
- Enzima: (Frasco con 30 tabletas). Cada tableta contiene $\text{NAD}^+ = 4\text{mg}$; aldehído deshidrogenasa (Al-OH) = 0.8U.
- Solución control o estándar de etanol = 0.061 mg/ml (se usa sin diluir).

Tratamiento de las muestras.

Las muestras se trataron previamente del siguiente modo: primero se centrifugaron a 12000 rpm/15 min a 4°C, se separó el sobrenadante y el cual se calentó en tubos con tapa de rosca bien cerrados a 80°C por 15 min en un baño con el fin de la inactivación de las enzimas proteolíticas. Finalmente se utilizó el tratamiento enzimático, considerando que la concentración de las muestras para el método debe fluctuar entre 0.01 y 0.06 g/L, se realizaron diluciones 1/100.

Tabla 21. Diluciones respecto al contenido estimado de etanol en la muestra.

Estimación del contenido de etanol por litro de muestra.	Dilución (utilizar agua destilada).	Factor de dilución (F.D.)
Menor a 0.06g	-	1
0.06 - 0.6g	1 a 10	10
0.6 - 6.0g	1 a 100	100
6.0 - 60.0g	1 a 1000	1000

Procedimiento.

Disolver una tableta en 3 ml de la suspensión 1, esta es la mezcla de reacción. En la siguiente tabla se muestra el orden en que se mezclan los reactivos.

Tabla 22. Orden de la adición de los reactivos para la cuantificación de etanol.

Reactivo	Blanco	Estándar (0.058g/L)	Muestra
Mezcla de reacción	1.5ml	1.5ml	1.5
Agua	50µl	-	-
Estándar de etanol	-	50µl	-
Muestra (0.01-0.06g/L de etanol)	-	-	50µl
Mezclar y esperar 3min a temperatura ambiente, leer absorbancia A1			
Suspensión 2	25µl	25µl	25µl
Mezclar y esperar de 5 a 10 min a temperatura ambiente para que se complete la reacción, obtener A2			

Cálculos

$$C \text{ (g etanol/lit solución)} = \frac{V * MW}{\Delta * d * v * 2 * 1000} * \Delta A * F.D.$$

Donde:

- ▶ V = Volumen final (1.575ml).
- ▶ v = Volumen de la muestra o estándar (0.050ml).
- ▶ MW = Peso molecular del NADH (46.07 g/mol).
- ▶ d = Paso de la luz (1 cm).
- ▶ Δ = Coeficiente de extinción del NADH a 340nm (6.3 lt mol⁻¹ cm⁻¹).
- ▶ ΔA = A2- A1

Nota: Las muestras siempre deben permanecer cubiertas debido a la volatilidad del etanol. El espectro se ajusta a cero con el blanco a 340nm.

ANEXO 4. Tablas de resultados.

Tabla 23. Resultados de la fermentación ajustando el contenido de sólidos en el aguamiel pasteurizado a 8ºBx y 10ºBx, y aguamiel no pasteurizado a 10ºBx (Edo. de México). ND= No detectado.

Tratamiento	Tiempo (horas)	Grupo microbiano (log 10 UFC/ml)					Fisicoquímicos			Bioquímicos	
		Levaduras	Bacterias lácticas	Mesofilos	Enterobacterias	Coliformes totales	pH	ºBx	Azúcares reductores (g glucosa/lit)	Azúcares totales (g fructosa/lit)	Etanol (%v/v)
Aguamiel pasteurizado 8ºBX	0	5.778	5.708	5.996	2.643	2.230	5.155	7.9	37.029	58.6878	0.0147
	12	6.712	7.672	7.757	1.176	1.699	4.01	6.9	33.159	50.8397	0.3145
	24	7.114	7.683	7.628	1.176	ND	3.57	4.25	9.742	21.5907	2.4306
Aguamiel pasteurizado 10ºBX	0	5.767	5.653	5.987	1.698	1.813	5.155	10.1	42.294	73.1181	0.0244
	12	6.796	7.703	7.991	1.000	1.398	4.16	9.25	38.946	66.7468	0.6234
	24	7.117	7.820	7.635	ND	ND	3.645	5.65	10.768	29.1013	2.4659
Aguamiel No pasteurizado 10ºBX	0	5.462	6.200	6.484	4.704	4.478	4.25	9.5	12.916	63.3924	-----
	12	5.748	6.352	6.519	2.813	3.000	3.175	7.65	19.418	52.6751	-----
	24	5.829	6.176	6.301	2.000	3.000	3.12	5.1	6.703	25.5865	-----

Tabla 24. Comunidad microbiana de la semilla sometida a métodos de conservación y a diferentes periodos de almacenamiento. FR= Semilla control, CG= Semilla congelada, LF= Semilla Liofilizada y DH= Semilla seca; 30 y 90 días de almacenamiento. ND = No detectado.

Semilla	Grupo microbiano (log 10 UFC/ml)					Fisicoquímicos	
	Levaduras	Bacterias lácticas	Mesofilos	Enterobacterias	Coliformes totales	pH	°Bx
FR	6.95	7.41	7.38	ND	ND	3.93	4.00
CG 30d	7.52	7.23	7.55	ND	ND	3.96	2.50
CG 90d	7.75	7.31	7.77	2.13	2.04	4.20	3.20
LF 30d	7.53	7.35	7.6	2.15	2.00	4.15	4.00
LF 90d	6.77	7.57	7.77	1.17	1.17	4.18	4.40
DH	ND	6.73	5.49	4.34	4.33	4.72	5.50

Tabla 25. Resultados de la fermentación empleando semilla fresca, sin tratamiento. (Nanacamilpa, Edo. de Tlaxcala). ND = No detectado.

Tratamiento	Tiempo (horas)	Grupo microbiano (log 10 UFC/ml)					Fisicoquímicos		Bioquímicos		
		Levaduras	Bacterias lácticas	Mesofilos	Enterobacterias	Coliformes totales	pH	°Bx	Azucares reductores (g glucosa/lit)	Azucares totales (g fructosa/lit)	Etanol (%v/v)
FR Sin tratamiento (control)	0	6.11	5.95	6.07	ND	ND	6.71	10	10.30	123.99	0.21
	4	6.56	6.63	6.39	ND	ND	6.52	9.6	15.87	118.41	-----
	8	6.92	6.76	6.56	ND	ND	5.89	9.0	25.78	114.13	0.28
	12	7.08	7.04	7.13	ND	ND	5.64	8.8	36.59	88.45	-----
	24	7.60	7.43	7.35	ND	ND	3.95	4.2	18.54	24.84	4.13

Tabla 26. Resultados de la fermentación empleando semilla congelada y almacenada 30días (Nanacamilpa, Edo. de Tlaxcala). ND = No detectado.

Tratamiento	Tiempo (horas)	Grupo microbiano (log 10 UFC/ml)					Fisicoquímicos		Bioquímicos		
		Levaduras	Bacterias lácticas	Mesofilos	Enterobacterias	Coliformes totales	pH	°Bx	Azúcares reductores (g glucosa/l)	Azúcares totales (g fructosa/l)	Etanol (%v/v)
CG 30d Congelación / 30 días	0	6.30	6.04	6.37	ND	ND	7.03	10	4.53	120.89	0.09
	4	6.57	6.40	6.82	ND	ND	6.16	9.6	13.19	120.43	-----
	8	6.90	7.21	7.29	ND	ND	5.6	8.8	36.68	101.11	1.58
	12	7.38	7.40	8.44	ND	ND	4.67	7.6	39.01	81.01	-----
	24	7.69	8.40	8.59	ND	ND	3.91	4.4	12.12	39.50	3.27

Tabla 27. Resultados de la fermentación empleando semilla congelada y almacenada 90días (Nanacamilpa, Edo. de Tlaxcala). ND = No detectado.

Tratamiento	Tiempo (horas)	Grupo microbiano (log 10 UFC/ml)					Fisicoquímicos		Bioquímicos		
		Levaduras	Bacterias lácticas	Mesofilos	Enterobacterias	Coliformes totales	pH	°Bx	Azúcares reductores (g glucosa/l)	Azúcares totales (g fructosa/l)	Etanol (%v/v)
CG 90d Congelación / 90 días	0	6.35	6.01	6.34	1.90	1.78	7.17	10	5.28	132.21	0.09
	4	6.45	6.64	6.78	1.00	1.60	6.95	9.8	9.25	125.39	-----
	8	6.77	7.76	8.06	2.30	2.60	5.99	9.4	24.20	113.62	0.62
	12	7.02	7.88	8.18	3.16	3.07	5.4	8.8	43.98	103.64	-----
	24	7.62	8.52	8.53	ND	ND	3.72	5.4	3.60	46.01	2.88

Tabla 28. Resultados de la fermentación empleando semilla liofilizada y almacenada 30días (Nanacamilpa, Edo. de Tlaxcala). ND = No detectado.

Tratamiento	Tiempo (horas)	Grupo microbiano (log 10 UFC/ml)					Fisicoquímicos		Bioquímicos		
		Levaduras	Bacterias lácticas	Mesofilos	Enterobacterias	Coliformes totales	pH	°Bx	Azúcares reductores (g glucosa/lit)	Azúcares totales (g fructosa/lit)	Etanol (%v/v)
LF 30d Liofilización / 30 días	0	6.28	6.19	6.26	1.70	2.13	7.1	10	11.01	111.67	0.11
	4	6.58	6.87	6.99	1.18	2.94	6.48	9.8	18.15	112.36	-----
	8	7.00	7.61	7.73	3.19	3.31	5.72	9.2	36.51	105.09	0.89
	12	7.23	7.90	7.90	2.95	2.54	4.75	8.2	50.32	93.55	-----
	24	7.68	8.02	8.26	ND	ND	3.52	4.6	19.71	32.80	3.30

Tabla 29. Resultados de la fermentación empleando semilla liofilizada y almacenada 90días (Nanacamilpa, Edo. de Tlaxcala). ND = No detectado.

Tratamiento	Tiempo (horas)	Grupo microbiano (log 10 UFC/ml)					Fisicoquímicos		Bioquímicos		
		Levaduras	Bacterias lácticas	Mesofilos	Enterobacterias	Coliformes totales	pH	°Bx	Azúcares reductores (g glucosa/lit)	Azúcares totales (g fructosa/lit)	Etanol (%v/v)
LF 90d Liofilización / 90 días	0	6.15	6.34	6.39	ND	ND	7.2	10.1	2.66	121.67	0.11
	4	6.53	6.98	7.04	0.70	ND	6.6	10	6.51	112.83	-----
	8	6.90	7.64	7.75	1.00	0.70	5.4	9.4	21.82	106.23	0.40
	12	7.22	7.90	7.93	ND	ND	4.4	8	48.45	101.89	-----
	24	7.54	8.16	8.51	ND	ND	3.56	5.6	4.54	42.83	2.33

Tabla 30. Cinética de crecimiento para la cepa L3, evaluando pH, °Bx y etanol,

Tiempo (horas)	Cinética de crecimiento (log 10 UFC/ml)		Fisicoquímicos		Bioquímicos
	cepa L3		pH	°Bx	Etanol (%v/v)
	Levaduras				
0	6.152		7.92	9.8	0.06
4	6.241		7.4	9.4	-----
8	6.544		6.24	9	-----
12	7.511		5.93	7.6	1.07
17	7.512		5.76	6.6	-----
20	7.538		5.13	5.4	-----
25	8.357		4.96	3.2	4.17
28	8.947		4.95	3	-----
32	9.782		4.96	2.8	-----
36	8.267		5	2.8	4.64
40	7.674		5.22	2.8	-----
44	7.501		5.15	2.8	-----
48	7.552		5.05	2.8	4.73

Tabla 31. Resultados de la fermentación utilizando la cepa L3 y la semilla conservada CG.

Tiempo (horas)	Grupo microbiano (log 10 UFC/ml)			Fisicoquímicos		Bioquímicos		
	Levaduras	Bacterias lácticas	Mesofilos	pH	°Bx	Azúcares reductores (g glucosa/lt)	Azúcares totales (g glucosa/lt)	Etanol (%v/v)
0	6.41	-----	-----	7.45	9.8	6.01	136.78	0.09
8	6.54	-----	-----	6.24	9.0	18.17	115.48	-----
12	7.14	6.69	6.68	5.96	8.4	32.18	109.17	0.82
16	7.58	7.03	6.94	5.41	5.4	36.80	91.60	-----
24	8.17	7.80	7.82	4.36	3.8	19.09	24.38	4.32
28	8.18	8.42	8.17	4.25	3.4	11.12	17.04	-----
32	8.02	8.06	7.99	4.12	2.8	3.73	8.95	-----
36	7.92	7.91	6.68	4.07	2.6	1.96	7.85	4.51

ANEXO 5: Curvas patrón azúcares reductores y totales.

Azúcares reductores.

Tabla 32 Valores de concentración de glucosa y absorbancia de la curva patrón de azúcares reductores para las fermentaciones con aguamiel Edo Mex. a 8°Bx y 10°Bx pasteurizado y 10°Bx no pasteurizado.

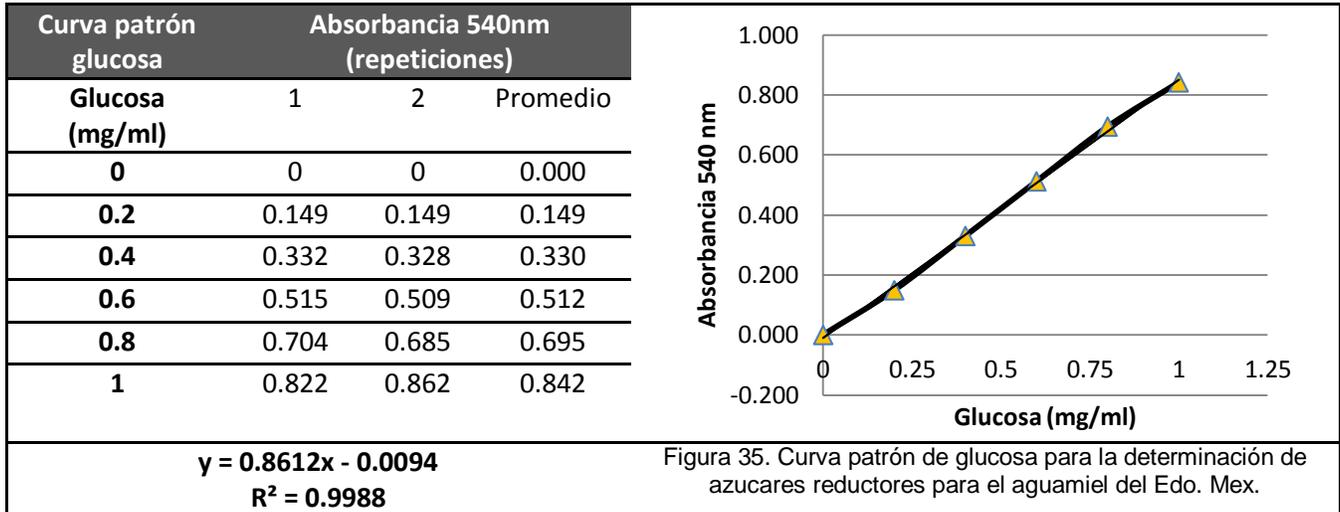
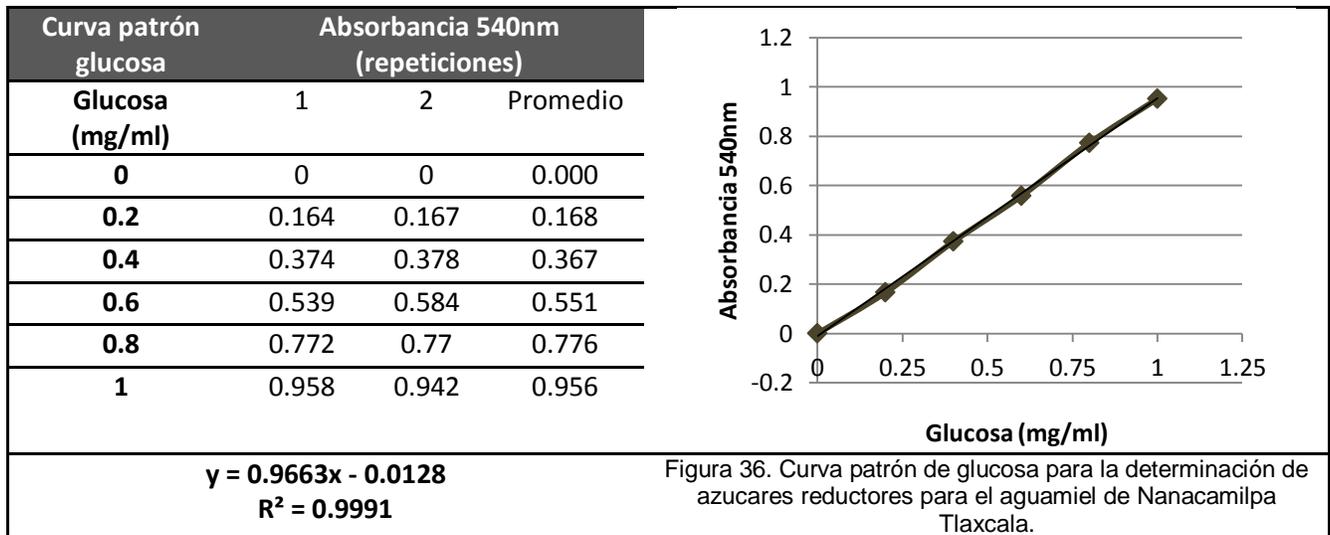


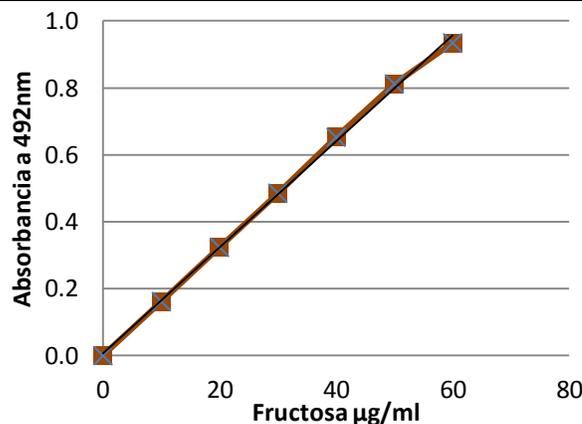
Tabla 33. Valores de concentración de glucosa y absorbancia de la curva patrón de azúcares reductores para las fermentaciones con aguamiel de Nanacamilpa Tlaxc.



Azúcares totales.

Tabla 34. Valores de concentración de fructosa y absorbancia de la curva patrón de azúcares totales para las fermentaciones con aguamiel Edo Mex. a 8°Bx y 10°Bx pasteurizado y 10°Bx no pasteurizado

Curva patrón fructosa Fructosa (µg/ml)	Absorbancia 540nm (repeticiones)			
	1	2	3	Promedio
60	0.938	0.932	0.892	0.935
50	0.824	0.801	0.78	0.813
40	0.675	0.631	0.718	0.653
30	0.424	0.467	0.566	0.486
20	0.337	0.311	0.334	0.324
10	0.163	0.168	0.156	0.162

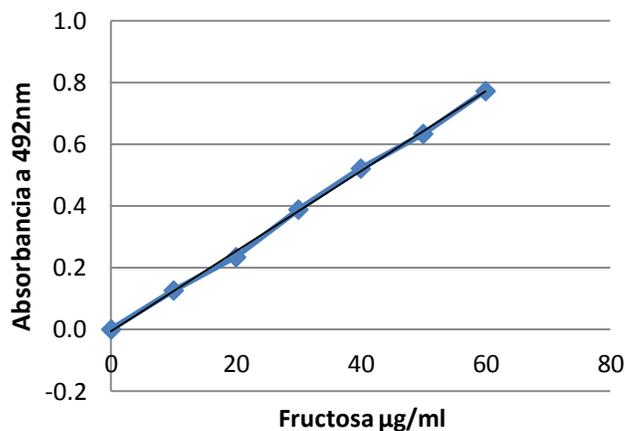


$y = 0.0158x + 0.0067$
 $R^2 = 0.9987$

Figura 37. Curva patrón de fructosa para la determinación de azúcares totales para el aguamiel del Edo. Mex.

Tabla 35. Valores de concentración de fructosa y absorbancia de la curva patrón de azúcares totales para las fermentaciones con aguamiel de Nanacamilpa Tlaxcala.

Curva patrón fructosa Fructosa (µg/ml)	Absorbancia 540nm (repeticiones)			
	1	2	3	Promedio
60	0.688	0.802	0.826	0.7720
50	0.486	0.712	0.702	0.6333
40	0.501	0.565	0.497	0.5210
30	0.37	0.397	0.398	0.3883
20	0.25	0.159	0.293	0.2340
10	0.133	0.132	0.113	0.1260



$y = 0.0129x - 0.0055$
 $R^2 = 0.9988$

Figura 38. Curva patrón de fructosa para la determinación de azúcares totales para el aguamiel de Nanacamilpa Tlaxcala.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Abundis V. (2007). Monografía de Agave pulquero. Secretaría de desarrollo Rural del Edo. de Puebla. Archivo Pulquero. pág 4-20.
- 2) Alvarado C. y col. (2006). Food-associated lactic acid bacteria with antimicrobial potential from traditional Mexican foods. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, pág 260-266.
- 3) Amores R. y col. (2004). Probióticos. *Revista Española de Quimioterapia*, (17) pág 113-139.
- 4) Badui D. (1996). *Química de Alimentos*. México D.F.: Alhambra Mexicana. pág 110-119.
- 5) BANCOMEXT. (2007). Banco Nacional de comercio exterior, S. N. C. Recuperado el 17 de octubre de 2011 from www.bancomext.com.
- 6) Berg J. y col. (2008). *Bioquímica*. Barcelona, España: Reverté, pág 447.
- 7) Bourgeois C. (1995). *Microbiología alimentaria*. Vol 2 Fermentaciones alimentarias. Madrid España: Acribia Editorial S.A. de C.V. pág 19-33, 309-325.
- 8) Cervantes C. y Pedroza R. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *NOVA, Publicación científica en ciencias Biomédicas*. IPN, (5) pág 135-146.
- 9) Cervantes R. (2002). Plantas de importancia económica en zonas áridas y semiáridas de México. México D.F., Ciudad Universitaria: Instituto de Geografía. pág 63-102
- 10) Chellapandian, M. y López-Munguía A. (1998). Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from 'pulque', a traditional Aztec alcoholic beverage. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, (21) pág 51–56.
- 11) Conçlaves de Lima, O. (1978). El maguey y el pulque en los codices mexicanos. México D.F.: Fondo de cultura económica, pág 273-7.
- 12) Coudray C. y col. (2003). Effects of inulin-type fructans of different chain length and type of branching on intestinal absorption and balance of calcium and magnesium in rats. *European Journal of Nutrition*, pág 91-98.
- 13) Cova C. (2010). Caracterización molecular de las cepas *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de la fermentación de mezcal, pulque y tequila. Ciudad Universitaria, Facultad de Química, pág 9-13, 27-29,.
- 14) Cravioto R. y col. (1951). Composición de Alimentos mexicanos. *Revista Ciencia XI* (5-6). Instituto de nutriología, pág 129-155.
- 15) Day J. y McLellan M. (1995). *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. New Jersey: Humana Press. Totowa. pág 25.

- 16) Déak T. (1996). Handbook of Food Spoilage Yeasts. Boca Ratón, Florida: CRC Press., pág 40.
- 17) Del Campo R. (1938). El pulque en el México precortesiano. Instituto de Biología. Ciudad Universitaria, México D.F. (9) pág 5-23.
- 18) Doelle H. y Greenfield P. (1985). The production of ethanol from sucrose using *Zymomona mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. (22) pág 411-415.
- 19) Enoplaneta. Todo lo referente al vino, espirituosas, cerveza, gastronomía. (05 de 02 de 2010). Recuperado el 05 de 08 de 2012, de <http://enoplaneta.blogspot.mx/2010/12/el-pulque-de-bebida-de-los-dioses.html>
- 20) Escalante A. y col. (2004). Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16s rDNA analysis. FEMS Microbiology Letters, (2) pág 273-279.
- 21) Escalante, A. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. International Journal of Food Microbiology. pág 136-134.
- 22) Fernández E. y col. (2001). Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques. International Journal of Food Microbiology. pág 1-10.
- 23) Farrel J. y Rose A. (1967). Temperature effects on microorganism. Ann. rev. Microbiology. (21) pág 101-120.
- 24) Favela T. (1993). Producción de alcohol por *Zymomona mobilis*. En García Garibay y López-Munguía, Biotecnología Alimentaria. Ciudad Universitaria México D.F. Limusa. pág 617-632.
- 25) Fennema, O. y Powrie W. (1973). Low temperature Preservation foods and living Matter. New York: Marcel Dekker, pág 67.
- 26) García Garibay, M. (1993). Producción de alcohol de *Zymomona mobilis*. En Biotecnología alimentaria. México D.F.: Limusa.
- 27) García Garibay & López-Munguía A. (2004). Bebidas alcohólicas no destiladas. En M. García Garibay, R. Quintero Ramírez, & A. López-Munguía Canales, Biotecnología Alimentaria. México D.F. LIMUSA. Cap. 8 pág 301-306.
- 28) Gómez A. y col. (2012). Acid and alcohol tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in pulque, a typical Mexican beverage. International Journal of Food Microbiology. pág 79-84.
- 29) Granados S. (1993). Los Agaves en México. México D.F.: Imprenta universitaria de I Universidad Autónoma de Chapingo. pág 252.

- 30) Guerrero G. (1985). El pulque. México D.F. Instituto Nacional de Antropología e Historia, Contrapuntos. pág 78-79.
- 31) Harrys y Petter. (1992). Food Gels. USA: Elsevier science Publishers. pág 16-28.
- 32) Hernández y col. (2002). Microbiología industrial. México D.F. EUNED. pág 19-22.
- 33) Herrea, T. (1993). Semblanza del estudio de la bebidas y de los alimentos fermentados mexicanos. En M. d. Wacher, & P. Lappe, Alimentos fermentados indigenas de México Cd Universitaria. pág 22-27.
- 34) Jay J. (2006). Microbiología Moderna de los Alimentos. Zaragoza España: Acribia 3era edición pág 150-155, 373-480.
- 35) Juarros E. (1993). Storage of stock cultures of filamentous fungi at -80°C .: effects of different freezing-thawing methods. Juarros, E., Tortajada, C., García, M.D. and Uruburu, F. "Storage of stock cultures of filament. Microbiología SEM. (9) pág 28-33.
- 36) Kandler O. (1983). Carbohydrate Metabolism in Lactic acid Bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. (49) pág 209-224.
- 37) Kaur N. y Gupta A. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. Journal of Biosciences. (27) pág 703-714.
- 38) Kirsop B. (1991). Maintenance of microorganisms and cultures cells. London: Academic Press. pág 29.
- 39) Lapage S. y Mitchell T. (1970). Culture collection and the preservation of bacteria. Methods in Microbiology. Vol. 3. London: Academic Press., pág 135-149.
- 40) Lappe O. y col. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. FEMS, pág 1037-1052.
- 41) Lappe O. Ulloa M. (1993). Microbiología del pulque. En P. Lappe, & M. d. Wacher R., Alimentos fermentados indigenas de México. México D.F. Ciudad Universitaria, pág 76-78.
- 42) Loyola Montemayor E. (1956). La industria del pulque. México D.F. Banco de México, Departamento de Investigaciones Industriales. pág 35-49.
- 43) Madigan, M. (2004). Brock, Biology of Microorganism. Prentice Hall, 249-268.
- 44) Martínez M. (2003). Producción de Etanol por *Zymomonas mobilis* a partir de aguamiel. Ciudad Universitaria. pág 9-16.
- 45) Nussinovitch A. (1997). Hidrocolloid Applications. Gum technology in de food and other industries. Londres: 4. Hidrocolloid Applications. pág 85-91.
- 46) Olvera C., López Munguía A. y Castillo E. (2007). Fructosiltransferasas, fructanas y fructosa. Biotecnología V14 CS3. pág 327-343.

- 47) Orberá, R. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Latinoamericana de Micología*, (21) pág 15-19.
- 48) Ortiz Basurto, R. (2008). Analysis of the Main Components of the Aguamiel produced by the Maguey-Pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , (56) pág 3682-3687.
- 49) Owens, J. D. (1993). Alimentos fermentados tradicionales: Generalidades y perspectivas. En M. d. Wachter, & P. Lappe, *Alimentos fermentados indigenas de México*. Cd. Universitaria, pág 17-23.
- 50) Rendón H. y col (2012). Effects of Different Sources of Fructans on Body Weight, Blood Metabolites and Fecal Bacteria in Normal and Obese non-diabetic and Diabetic Rats. *Plants Foods for Human Nutrition*. pág 64-70.
- 51) Reuter G. (1981). Psychrotrophic lactobacilli in meat products. En G. Roberts, & J. Hobbs, *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*. New York: Academic Press, pág 253-258.
- 52) Rogers P. y col. (1982). Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv Biochem Eng*, pág 23-37.
- 53) Sánchez Marroquín A. (1953). Fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agriculture Food and Chemistry* , (1) pág 246-249.
- 54) Sánchez Marroquin A. (1970). Investigaciones realizadas en la Facultad de Química de la UNAM tendientes a la industrialización del agave. *Revista de la sociedad química de México*, (14) pág 184.
- 55) Sánchez Marroquín A. (1979). Los agaves de México en la industria alimentaria. México D.F.: CEESTEM, Centro de Estudios Economicos y Sociales del Tercer Mundo.
- 56) Sánchez Marroquin A. (1977). Mexican pulque a fermented drink from Agave juice. *Symposium on Indigenous Fermented Foods*. Bangkok Tailandia, pág 15-20.
- 57) Steinkraus K. (1997). Mexican pulque. En K. Steinkraus, *Handbook of Indigenous Fermented Foods..* New York.: 2nd edn. Marcel Dekker Inc, pág 389–397.
- 58) Swing J. y Deley J. (1977). The Biology of *Zymomonas*. *Bacteriol. Rev.* (41) pág 1-48.
- 59) Tovar L. y Olivos M. (2008). Pulque, An Alcoholic Drink from Rural Mexico, Contains Phytase. Its in vitro Effects on Corn Tortilla. *Plants foods for Human Nutrition* , (63) pág 189-194.
- 60) Turismo en Nanacamilpa. (01 de 09 de 2011). Recuperado el 03 de 08 de 2012, de http://www.nanacamilpa.gob.mx/wb/Tlaxcala/nanacamilpa_el_pulque

- 61) Ulloa M. (1982). Estudio actual del conocimineto sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México. México D.F. Instituto de Biología UNAM. pág 145-173.
- 62) Villalpando I. (2004). Producción de Etanol por *Saccharomyces cerevisiae* de aguamiel bajo proceso controlado. México D.F. Facultad de Química, Ciudad Universitaria. pág 4 -13
- 63) Zarzoso E. Belloch y col. (1999). Identifiacition of yeast bye RFLP OF 5.85 rRNA gene and the two ribosomal internal . International Journal of Systematic Bacteriology, pág 329-337.
- 64) Zayas, J. D. (2011). Elaboración de pulque en condiciones controladas de laboratorio. México D.F.: Facultad de Química, Ciudad Universitaria. pág 5-7.