



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Desarrollo de una bebida con potencial efecto simbiótico a partir de azúcares presentes en plantas de agave y *Leuconostoc citreum*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

I.BQ. Nadia Maturano Ramírez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Agustín López-Munguía Canales  
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Leobardo Serrano Carreón  
Instituto de Biotecnología, UNAM  
Dr. J. Adelfo Escalante Lozada  
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Octubre, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Tecnología Enzimática del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía Canales.

La evaluación sensorial estuvo a cargo de la Dra. Patricia Severiano Pérez y se realizó en el Laboratorio 4D del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM.

El proyecto fue financiado por la UNAM con el apoyo de CONACyT con la beca no. 333685 y el proyecto del Programa de Estímulos a la Innovación no. 198044 de CONACyT

A mis padres y hermano

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia que siempre ha estado ahí, apoyándome de todas las maneras en que se puede brindar apoyo a alguien, para realizar este y otros proyectos. A mi madre por recordarme que “tirar la toalla”, nunca es una opción; a mi padre y hermano por hacerme sentir que sin importar cuántos años tenga vagando, Veracruz siempre será “mi casa”.

Al Dr. Agustín López-Munguía y a su grupo de trabajo por darme la oportunidad de formarme como maestra en ciencias dentro de su laboratorio.

A las maravillosas personas que encontré ahí, y que fueron como parte de mi familia por más de dos años. A Arlen Peña “Arleka”, Enrique Raga “Kikito”, Liliana Medina “gigi”, Helena Méndez, Francisco Vera “BB”, Jaime Porras “Jefe”, Jorge Ríos “Nenu”, Domingo Rivera “Domi” y Esmeralda Cuevas, por haberme recibido desde un principio con cariño y hacer de mi estancia en Cuernavaca, una experiencia de aprendizaje personal mucho más allá de lo académico.

A Aurelia Ocampo “Aus”, por ser un ejemplo de superación y un recordatorio constante de que “querer es poder” y a Judith Uribe por consentirnos y aguantarnos.

A la Dra. Clarita Olvera Carranza por su apoyo académico y personal, y por enseñarme a “hablar Agustín” sin morir en el intento.

A la M. en C. María Elena Rodríguez Alegría por el apoyo técnico brindado durante el desarrollo del proyecto.

Al T.L. Fernando González Muñoz por el apoyo técnico brindado para realizar los análisis cromatográficos necesarios para el desarrollo del proyecto.

A Celeste Medina, Yajaira Ceballos, Nora Trigo, Saúl Freyre, Lucero Figueroa, Karina Díaz, Nelly Rojas, Mónica Zamora y Andrea Carpinteyro, los que no importando los años siguen siendo parte de mi vida, y han estado presentes desde que muchos de los proyectos ahora llevados a cabo eran meras ideas.

---

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	6
2. GENERALIDADES.....	8
2.1. Plantas de agave.....	8
2.1.1. Aprovechamiento de la planta.....	9
2.1.2. Carbohidratos de reserva en la planta.....	11
2.1.3. Composición fisicoquímica de azúcares presentes en piña de agave. ....	12
2.2. Aguamiel: Modelo de referencia. ....	14
2.3. Prebióticos, Probióticos y Simbióticos. ....	17
2.4. <i>Leuconostoc</i> spp. ....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. HIPÓTESIS .....	28
5. OBJETIVOS .....	28
5.1. Objetivos particulares. ....	28
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
6.1. Caracterización de muestras de aguamiel. ....	29
6.2. Caracterización de inulina de agave (agavinas). ....	31
6.3. Caracterización del crecimiento y productos de la fermentación de <i>Leuconostoc citreum</i> CW28 en diferentes medios de cultivo. ....	32
6.3.1. Condiciones de estudios preliminares de estabilidad del producto de la fermentación de <i>L. citreum</i> CW28.....	38
6.3.2. Evaluación sensorial del producto de fermentación de <i>L. citreum</i> CW28.....	38
6.4. Análisis cromatográficos. ....	40
6.5. Cuantificación indirecta de fructanas. ....	42
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	44
7.1. Caracterización de muestras de aguamiel. ....	44
7.1.1. Estabilización de muestras de aguamiel para análisis .....	44
7.1.2. Evolución de pH del aguamiel durante su acumulación en la planta .....	45
7.1.3. Evolución de carbohidratos presentes en aguamiel durante su acumulación en la planta	46
7.1.4. Análisis cualitativo y cuantitativo de productos de fermentación en aguamiel durante su acumulación. ....	52
7.1.5. Cuantificación de proteína total en aguamiel.....	54

---

7.2.	Caracterización de carbohidratos presentes en agavina comercial .....	55
7.2.1.	Determinación de azúcares fermentables en agavina comercial. ....	56
7.2.2.	Determinación indirecta de fructanas en agavina comercial. ....	58
7.3.	Fermentación de <i>Leuconostoc citreum</i> CW28. ....	61
7.3.1.	Crecimiento de <i>L. citreum</i> CW28 en medio Lm. ....	62
7.3.2.	Formulación de medios de cultivo con agavinas. ....	64
7.3.1.	Actividad enzimática. ....	67
7.3.2.	Fermentación de <i>L. citreum</i> en medios de cultivo formulados con agavinas....	69
7.3.3.	Caracterización del polímero producido por <i>Leuconostoc citreum</i> CW28 en el medio formulado. ....	78
7.3.4.	Composición final del producto de fermentación de <i>L. citreum</i> CW28 en medio Agavinas muy bajo nitrógeno (MBN) y bajo nitrógeno (BN). ....	79
7.3.5.	Evaluación sensorial del producto de fermentación de <i>L. citreum</i> CW28. ....	85
7.3.6.	Estudios preliminares de estabilidad del producto de fermentación de <i>L. citreum</i> CW28. ....	91
8.	CONCLUSIONES .....	95
9.	REFERENCIAS .....	97
10.	ANEXOS.....	106
10.1.	Composición de pulque. A. Especies de agave, estados donde se produce y consorcio microbiano reportado en muestras de pulque. Tomado de Lappe y col. (2008). 106	
10.2.	Composición de agavina comercial reportada por Agaviótica S.A. de C.V. ( <a href="http://www.agaviotica.com/productos3.html">http://www.agaviotica.com/productos3.html</a> ) .....	107
10.3.	Composición de medios de cultivo para evaluar la presencia de microorganismos. ....	107
11.	APÉNDICES.....	108
11.1.	Cálculo de biomasa .....	108
11.2.	Balance de consumo de sustrato durante la fermentación de <i>L. citreum</i> . ....	108
11.3.	Rendimientos teóricos de productos de fermentación .....	109



---

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de carbohidratos en base seca de piñas de agave de diferentes edades.....	13
Tabla 2. Consorcio microbiano identificado por varios autores en muestras de aguamiel.....	15
Tabla 3. Composición fisicoquímica de aguamiel reportada por varios autores .....	16
Tabla 4. Composición del medio Lm .....	32
Tabla 5. Descriptores de bebidas fermentadas y orden de evaluación.....	39
Tabla 6. Programas de elución empleados para la determinación de perfil de carbohidratos.....	42
Tabla 7. Valores de pH en muestras de aguamiel a diferentes tiempos de acumulación en la planta.....	45
Tabla 8. Concentración de fructosa, glucosa y sacarosa en muestras de aguamiel a diferentes tiempos de acumulación en la planta determinado por HPLC .....	47
Tabla 9. Contenido de azúcares promedio de dos lotes de agavina comercial (HPLC) .....	57
Tabla 10. Composición de medios de cultivo Agavinas muy bajo nitrógeno (MBN) y Agavinas bajo nitrógeno (BN).....	67
Tabla 11. Comparación de la actividad enzimática en medio Lm, Agavinas MBN y BN .....	68
Tabla 12. Resumen de los principales parámetros evaluados en la fermentación de <i>L. citreum</i> CW28 en diferentes medios de cultivo.....	75
Tabla 13. Composición promedio de 6 cultivos del producto de fermentación de <i>L. Citreum</i> CW28 en medio Agavinas BN.....	82
Tabla 14. Características comunes presentes en aguamiel, pulque y el producto de fermentación de <i>L. citreum</i> .....	84
Tabla 15. Correlación entre los atributos de apariencia y textura en el producto de fermentación evaluado .....	87
Tabla 16. Matriz de correlación entre variables originales y componentes de retención.....	88

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de compuestos de inulina.....	12
Figura 2. Estructura de agavinas propuestas por Mancilla y López (2006).....	12
Figura 3 Esquema general de la composición y efectos en la salud de las bacterias predominantes en heces fecales humanas.....	19
Figura 4. Mecanismos generales de acción de pre y probióticos, de acuerdo a De Vrese y Schrezenmeir (2008) y Steed y Macfarlane (2009).....	22
Figura 5. Representación esquemática del flujo de carbono y energía a través de las rutas metabólicas centrales de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , modificado de Dols y col. (1997).....	25
Figura 6. Representación esquemática general de las reacciones catalizadas por una enzima con actividad inulosacarasa.....	26
Figura 7. Especies seleccionadas para muestreo de aguamiel a) <i>A. aff. americana</i> L. b) <i>A. salmiana</i> Otto ex Salm-Dyck, c) <i>A. americana</i> L.....	30
Figura 8. Almacenamiento del producto de fermentación de <i>L. citreum</i> en medio Agavinas para ensayos de estabilidad.....	38
Figura 9. Cromatografía en capa fina de azúcares en muestras recolectadas de aguamiel a diferentes tiempos de acumulación.....	46
Figura 10. Cromatograma por HPLC de azúcares reductores de aguamiel de <i>A. americana</i> L. 12 h de acumulación, en el que se observa un compuesto no cuantificado, además de fructosa (F) y glucosa (G).....	49
Figura. 11. Contenido de fructosa, glucosa, sacarosa y FOS a diferentes tiempos de acumulación de aguamiel en 3 especies de agave pulquero.....	50
Figura 12. Perfil de carbohidratos analizados por HPAEC-PAD en muestras de aguamiel a 12 h de raspado de tres especies de plantas de agave.....	51
Figura 13. Productos de fermentación cuantificados en muestras de aguamiel recolectadas a 2, 5 y 12 h de acumulación de 3 especies de agave pulquero.....	53

---

Figura 14. Cuantificación de proteína total en muestras de aguamiel de 3 especies de agave pulquero evaluadas a 2, 5 y 12 h de acumulación en la planta.....	54
Figura 15. Placa obtenida por TLC de agavina comercial.....	57
Figura 16. Perfiles por HPAEC-PAD en muestras de agavina vs estándar de monosacáridos y FOS .	59
Figura 17. Determinación de GP de agavina comercial por HPAEC-PAD mediante comparación con estándar de inulina de achicoria de alto peso molecular.....	59
Figura 18. Comparación de perfil de azúcares observados en agavina comercial y <i>A. tequilana</i> weber.....	60
Figura 19. Composición promedio de dos lotes de agavina comercial analizados por triplicado.....	61
Figura 20. Curva de crecimiento de <i>L. citreum</i> CW28 en el cultivo de activación en medio Lm a 30°C y 200 rpm (- Log UFC/mL, *DO).....	63
Figura 21. Cinética de crecimiento y producción de inulina en la fermentación de <i>L. citreum</i> CW28 en medio Lm a 30°C y 200 rpm (- Log UFC/mL, ■ glucosa, ▲ sacarosa, ● inulina).....	63
Figura 22. Cinética de crecimiento a 30°C, y 200 rpm de <i>L. citreum</i> CW28 en medio Agavinas MBN (×) y medio Lm (-).....	70
Figura 23. Cinética de consumo de sustrato y producción de inulina de <i>L. citreum</i> CW28 en medio Agavinas MBN a 30°C, 200 rpm (◆ fructosa ■ glucosa, ▲ sacarosa, ● inulina).....	71
Figura 24. Cinética de consumo de sustrato y producción de inulina de <i>L. citreum</i> CW28 en medio Agavinas BN con concentración inicial de células “baja” a 30°C y 200 rpm (- Log UFC/mL, ◆ fructosa ■ glucosa, ▲ sacarosa, ● inulina).....	73
Figura 25. Evolución de pH y ácidos orgánicos en la fermentación de <i>L. citreum</i> CW28 en medio Agavinas BN con concentración inicial de células “baja” a 30°C y 200 rpm (○pH, ◇ác. láctico△ etanol, □ ác. Acético).....	73
Figura 26. Cinética de consumo de sustrato y producción de inulina de <i>L. citreum</i> CW28 en medio Agavinas BN con concentración inicial de células “alta” a 30°C y 200 rpm (- Log UFC/mL, ◆ fructosa ■ glucosa, ▲ sacarosa, ● inulina) .....	74

---

Figura 27. Evolución de pH y ácidos orgánicos en la fermentación de <i>L. citreum</i> CW 28 en medio Agavinas BN concentración inicial de células “alta” a 30°C y 200 rpm (○pH, ◇ác. láctico△ etanol, □ ác. acético).....	74
Figura 28. Síntesis de inulina durante el cultivo de <i>L. citreum</i> en medio Agavinas BN durante 10 h de cultivo, determinado por cromatografía de permeación en gel.....	79
Figura 29. Perfil de fructanas de agave incluidas en la formulación del medio Agavinas BN durante el cultivo de <i>L.citreum</i> . Análisis por HPAEC-PAD.....	80
Figura 30. Perfil sensorial del producto de <i>L. citreum</i> CW28 en medio Agavinas BN.....	86
Figura 31. Resultados del ACP para los atributos sensoriales del producto de fermentación de <i>L. citreum</i> CW28 en medio Agavinas BN.....	86
Figura 32. Resultados del ACP para los atributos sensoriales de bebidas fermentadas.....	89
Figura 33. Estudio de estabilidad. Análisis de la evolución de carbohidratos y otros metabolitos durante el almacenamiento del cultivo de <i>L. citreum</i> por 17 días a 5±1 °C.....	92
Figura 34. Estudio de estabilidad. Análisis de la evolución de la viabilidad de las células de <i>L. citreum</i> durante el almacenamiento por 17 días a 5±1° C.....	93

---

## RESUMEN

Diversos autores confieren propiedades nutricionales a bebidas tradicionales fermentadas dentro de las que destacan el pulque y el pozol. Estas bebidas son elaboradas a partir de productos vegetales característicos de la civilización mesoamericana como son los agaves y el maíz. Los productos que contienen azúcares de agave son ricos en inulinas de bajo peso molecular, a las que se atribuye un efecto prebiótico. Por otro lado, en ambos procesos fermentativos participa una población de bacterias lácticas dentro de las que destacan diversos microorganismos a los que podría atribuirse el carácter probiótico. Hasta la fecha, la producción de estas bebidas es artesanal, empleando materias primas y procesos de producción no estandarizados, por lo que están limitadas al consumo local.

El objetivo de este desarrollo es la elaboración de una bebida con características funcionales a partir de un cultivo de la bacteria ácido láctica *Leuconostoc citreum*, azúcares de agave y sacarosa, entre otros componentes. La bacteria *L. citreum*, se encuentra presente de manera natural en alimentos fermentados de diversa índole. En particular, la cepa de *L. citreum* empleada fue aislada del pozol y tiene, entre otras, la característica de producir inulina de alto peso molecular al llevar a cabo una fermentación láctica en un medio de cultivo con sacarosa. La inulina producida por la bacteria le confiere a la bebida propiedades de fibra dietética, mientras que los azúcares de agave, en las que predominan fructosacáridos de menor peso molecular que actúan como prebióticos. Se logró cultivar a escala laboratorio la bacteria *L. citreum* en condiciones de cultivo en las que la producción de inulina bacteriana se ve favorecida, conteniendo además otros productos del metabolismo de *L. citreum* como el ácido láctico. La bebida desarrollada incluye características nutricionales de bebidas tradicionales fermentadas, como el *pulque* y *pozol*, con la ventaja de ser un proceso reproducible.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

El empleo de alimentos fermentados como parte de la dieta es bien conocido desde hace siglos por varias culturas. De acuerdo a Steinkraus (1995), el proceso de fermentación cumple roles fundamentales en los alimentos como el enriquecimiento de la dieta (diversidad de sabores, aromas y texturas) y la preservación de grandes cantidades de alimento. Los alimentos fermentados son también fuente de nutrimentos, ya sea inherentes a las materias primas o que son sintetizados durante el proceso, tales como proteínas, amino ácidos esenciales, ácidos grasos y vitaminas, entre otros.

El consumo de alimentos fermentados tradicionales en México como pozol (bebida fermentada de maíz y cacao) y el pulque (bebida obtenida de la fermentación de aguamiel obtenido de plantas de agave) en épocas prehispánicas no se limitaba solo a cuestiones nutrimentales. En el caso del pulque, también se empleaba en ceremonias y se le reconocían propiedades medicinales para combatir enfermedades y padecimientos del sistema digestivo principalmente (Fuentes 2006; Monterrubio, 2007). Actualmente, los usos comerciales más comunes de plantas de agave consisten en emplear la piña o mezontle como materia prima para la obtención de bebidas alcohólicas, aprovechando el contenido de azúcares de reserva de la planta (fructanas). Los azúcares que dan lugar a la fermentación alcohólica, provienen de la transformación de fructanas a azúcares simples por métodos industriales como hidrólisis ácida, cocción, extracción (Ávila y col., 2009; Waleckx y col., 2008), o artesanales (hidrólisis enzimática endógena).

Las fructanas forman parte de la dieta humana debido a su presencia en un abundante número de plantas comestibles como la cebolla, el puerro, los cereales, el ajo, algunas frutas y el agave. De acuerdo a su estructura, las fructanas pueden clasificarse como de tipo inulina, levana o como series mezcladas altamente ramificadas conocidas como neoseries. A pesar de su solubilidad en agua, dado el tipo de enlaces presentes, las

---

fructanas no pueden ser hidrolizadas en el tracto digestivo de mamíferos por lo que se consideran como fibra dietética de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de salud en materia alimentaria (NOM-043-SSA2-2005). Al no ser hidrolizadas en el tracto digestivo, las fructanas, llegan intactas al tracto intestinal donde son parcialmente hidrolizadas y fermentadas selectivamente por la microbiota nativa benéfica, por lo que son consideradas como prebióticos.

El aprovechamiento de las fructanas presentes en las plantas de agave es la base del proceso tradicional de obtención de aguamiel para la elaboración de pulque. Existen pocos estudios relativos al proceso mediante el cual la inulina de las piñas se transforma en azúcares libres y fructooligosacáridos (FOS) durante el proceso de producción de aguamiel. Ésta información puede ser útil en el desarrollo de bebidas con valor nutricional a partir de componentes de plantas de agave. Por otro lado, en el proceso fermentativo del aguamiel para la obtención de pulque, intervienen diversas bacterias ácido lácticas que acidifican el aguamiel por la producción de ácidos orgánicos y dan lugar a exopolisacáridos (Sánchez y Hope, 1953), estos exopolisacáridos (EPS), pueden ser de diferentes tipos (dextrana, levana y/o inulina), dependiendo del tipo de glicosiltransferasas presentes en las bacterias que participan en el proceso. Ésta actividad de los microorganismos, junto con la producción de etanol y ácidos orgánicos confiere al pulque sus características organolépticas particulares y sus propiedades nutrimentales. Un hecho a destacar es que las bacterias lácticas en buena medida permanecen en el pulque y probablemente tengan un papel probiótico (Campos, 2010; Cervantes y Pedroza, 2007).

En nuestro grupo de trabajo se ha estudiado ampliamente a la bacteria *Leuconostoc citreum* cepa CW28 que sintetiza inulina a partir de sacarosa (Olivares y col., 2002), y que aunque fue aislada del pozol. Esta bacteria se encuentra comúnmente

---

presente en el aguamiel y el pulque (Escalante y col., 2008). En el presente proyecto se propone analizar las características fisicoquímicas y perfil de fructanas presentes en el aguamiel y extraídas de las piñas del agave. Esta información será la referencia para el desarrollo de un proceso de fermentación que permita aprovechar las fructanas y FOS presentes en la planta de agave en un proceso controlado, al mismo tiempo que se confiera al producto algunos de los beneficios de los productos derivados de la fermentación que tiene lugar en el pulque, evitando la fermentación alcohólica. El objetivo es desarrollar un proceso a escala laboratorio que resulte en un producto fermentado con potencial efecto simbiótico empleando la bacteria ácido láctica *L. citreum* evitando la presencia de levaduras que llevan a cabo principalmente una fermentación de tipo alcohólica.

## **2. GENERALIDADES**

### **2.1. Plantas de agave.**

El Agave pertenece a la familia *Agavaceae* y se encuentran particularmente distribuidas en zonas áridas y semiáridas. Tienen un metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) por el que realizan la captación de CO<sub>2</sub> durante la noche, para mantener al mínimo la pérdida de agua por exposición a altas temperaturas durante el día (Kluge y Ting, 1978). Producen fructanas como principal producto fotosintético. La maduración de las plantas se infiere por la presencia de inflorescencias que aparecen en las plantas al llegar a la edad entre los 6 a 12 años según la especie, por lo que de manera general se considera 8 años el tiempo promedio para la maduración de la planta (Escalante y col., 2011; Hinke, 1997; Ortiz y col., 2008).



---

Desde épocas prehispánicas los agaves han tenido gran significado cultural y religioso así como muy diversas aplicaciones comerciales. Su uso como fuente de alimento (aguamiel), para la producción de bebidas alcohólicas (pulque), como fuente de fibras (henequén) y como abono era común en las culturas precolombinas de Mesoamérica (Monterrubio, 2007).

En México existen alrededor de 200 especies de agave, entre las cuales destacan *A. salmiana*, *A. atrovirensare*, *A. mapisaga*, *A. americana* para la producción de pulque, *A. potatorum* y *A. angustifolia* en la producción de mezcal y *A. tequilana* Weber variedad azul para la producción de tequila (Ortiz y col., 2008; Peña y col., 2004). *A. tequilana* Weber var. azul, es la única empleada en la producción de tequila debido a la denominación de origen de esta bebida, lo que limita su producción a municipios de los estados de Guanajuato, Michoacán, Tamaulipas y Nayarit y en todo el estado de Jalisco, por lo que agave plantado fuera de estos municipios y estados no puede ser empleado para la producción de tequila. Esto deja un nicho de oportunidad para el aprovechamiento de plantas de esta variedad, así como el de otras especies de agave actualmente no aprovechadas. Lo mismo sucede con las denominaciones de origen existentes para mezcal y sotol.

### **2.1.1. Aprovechamiento de la planta.**

La producción de pulque a partir del aguamiel producido en piñas de agave se ha dado en México desde tiempos prehispánicos. Sin embargo, a partir de la segunda mitad del siglo pasado la producción y el consumo se vieron notablemente disminuidos por varios factores entre los que destacan la pérdida de cultivos, la falta de una tecnología eficiente para su producción una baja demanda (Escalante y col., 2011) y la introducción de otras bebidas alcohólicas como la cerveza. El pulque, es considerado por algunos más que una bebida, como alimento dado su alto valor nutricional (ver Anexo 10.1) e incluso como sustituto de agua en zonas donde ésta es escasa o de mala calidad (Sánchez, 1993), aunque

---

este planteamiento debe tomarse con la reserva que amerita el caso de una bebida alcohólica.

Actualmente la producción de pulque se da en pequeña escala de manera artesanal en estados de la región central de México como Estado de México, Querétaro, Puebla y Michoacán (Escalante y col., 2011) y de manera industrializada se produce a partir de aguamiel pasteurizado y un inóculo de *Z. mobilis ssp. mobilis*, y *S. cerevisiae* el cual se enlata y exporta (Lappe y col., 2008). En el mercado local, el producto enlatado no ha tenido aceptación entre los consumidores habituales de la bebida, debido a que al contener solo dos especies del consorcio microbiano que se encuentran en el pulque, no se logran reproducir las propiedades organolépticas del producto original. El aguamiel y el pulque, a diferencia de las bebidas alcohólicas destiladas como el tequila y el mezcal, mantienen características que les confieren la propiedad de actuar como prebióticos. La mayor dificultad en el aprovechamiento industrial de los azúcares presentes en el aguamiel, estriba en la susceptibilidad a la fermentación de esta savia. Sin embargo, una opción para resolver este problema podría ser la extracción directa de los azúcares de la planta, sin pasar por el proceso de elaboración de aguamiel.

Éste es el caso de extractos de piña de agave con un alto contenido de azúcares que pueden ser aprovechados, vía procesos fermentativos, para el desarrollo de productos con valor nutricional alternativos a la producción de bebidas alcohólicas.

En el caso de la producción de bebidas alcohólicas destiladas, como el tequila, los azúcares presentes en la piña de agave son hidrolizados completamente a azúcares simples, perdiendo su valor nutricional. Estos azúcares simples son empleados como fuente de carbono para la fermentación alcohólica (Waleckx y col., 2008). Uno de los objetivos centrales del diseño de una bebida de valor funcional, es conservar los azúcares complejos presentes en plantas de agave, los cuales tienen valor nutricional, reduciendo al máximo

---

los mono y disacáridos, ya que estos aumentan el valor calórico. También es deseable evitar la presencia de microorganismos responsables de la fermentación alcohólica.

### **2.1.2. Carbohidratos de reserva en la planta.**

Los azúcares de reserva en las plantas de agave se componen de diferentes grupos de fructanas. Mismas que se construyen a partir de la sacarosa mediante diversas actividades enzimáticas del tipo fructosiltransferasa (FFT). En el 2007, Ávila y col., reportaron la caracterización molecular de una FFT con actividad sacarosa:sacarosa 1 fructosiltransferasa (SST) en *Agave tequilana* Weber var. azul con alta afinidad por sacarosa como sustrato. La reacción con SST inicia la síntesis de fructanas catalizando la transferencia de un residuo fructosilo de una molécula de sacarosa (donadora) a otra molécula de sacarosa (aceptora). El resultado de la transferencia es la formación del trisacárido 1-kestosa. Otras actividades FFT son necesarias para la síntesis de carbohidratos de reserva en la planta (Ávila y col., 2007). Ejemplo de estas actividades enzimáticas son, la 1-FFT (fructana:fructana 1 fructosiltransferasa) que lleva a cabo la elongación de la cadena de fructana en la posición  $\beta$  2-1 y la 6-SFT (sacarosa:fructana 6-fructosiltransferasa), que ramifica la fructana en la posición  $\beta$  2-6.

De manera general, las fructanas se distinguen por el tipo de enlace entre las unidades de fructosa y la posición de la unidad de glucosa proveniente del aceptor inicial para construir la cadena de fructosacáridos. De acuerdo a Arrizon y col. (2010), Mancilla y López (2006) y Waleckx y col. (2008), en plantas de agave se encuentran series de inulinas (tipo de enlace  $\beta$ 2-1, Figura 1), levanas (tipo de enlace  $\beta$ 2-6) y neoserias de fructanas (mezclas complejas altamente ramificadas) denominadas agavinas (Figura 2).

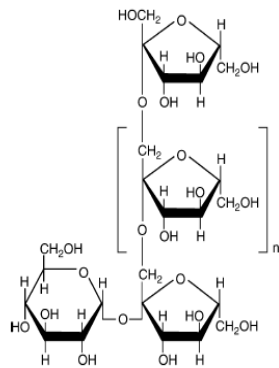


Figura 1. Estructura química de compuestos de inulina.

Neofructans (Agavins)

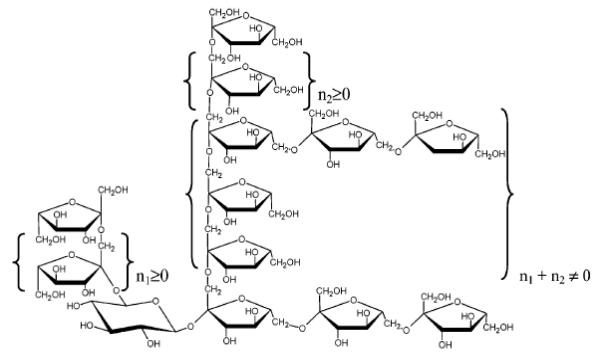


Figura 2. Estructura de agavinas propuestas por Mancilla y López (2006).

Estas estructuras están presentes en diferentes grados de polimerización (GP), el GP se refiere al número de unidades incorporadas a un oligómero o polímero.

Cuando estas fructanas tienen un GP igual o menor a 10, se denominan fructooligosacáridos (FOS). Los FOS son parte del contenido de sacáridos reportados en el aguamiel y en la piña de agave (Mancilla y López, 2006; Martínez, 1999; Mellado y López, 2012; Méndez, 1999; Ortiz y col., 2008), los cuales son reconocidos por su capacidad prebiótica, que se describe en la sección 2.4.

### 2.1.3. Composición fisicoquímica de azúcares presentes en piña de agave.

En la Tabla 1 se muestra la composición de carbohidratos de agave reportados por varios autores. Se observa que cuando la planta es más joven, el contenido de azúcares totales es menor. Conforme la planta madura, el contenido de azúcares totales y fructanas aumenta. La edad de la planta se reporta a partir del trasplante de los hijuelos. Al momento del trasplante la planta puede tener ya de 1 a 3 años (Arrizon y col., 2010).

**Tabla 1. Composición de carbohidratos en base seca de piñas de agave de diferentes edades cultivadas en varias regiones del país.**

	<b>Especie Edad Región</b>	<b>Azúcares totales (%p/p)</b>	<b>Fructosa (%p/p)</b>	<b>Glucosa (%p/p)</b>	<b>Sacarosa (%p/p)</b>	<b>Fructanas (%p/p)</b>	<b>GP mayoritario</b>
<b>Mellado y López (2012) % p/p en base seca</b>	<i>A. tequilana</i> weber var. azul 2 años Jalisco	40.7	1.97	1.41	3.93	32.8	6
	<i>A. tequilana</i> weber var. azul 6 años Jalisco	71.5	1.22	0.47	1.73	67.9	16
	<i>A. tequilana</i> weber var. azul 7 años Jalisco	74.2	1.17	0.43	1.41	71	23
<b>Mancilla y López (2006) % p/p en base seca</b>	<i>A. tequilana</i> 6 años Jalisco	90	11	2	4	73	18
	<i>A. tequilana</i> 6 años Gto	60	6	1	6	47	7
	<i>A. angustifolia</i> 6 años Sonora	51	2	2	11	36	13
	<i>A. angustifolia</i> 6 años Oaxaca	61	8	0	1	51	32
<b>Arrizon y col. (2010) %p/p en base húmeda</b>	<i>A. tequilana</i> 2 años Jalisco	4.3	1.5			2.8	4-11
	<i>A. tequilana</i> 6.5 años Jalisco	12.7	0.3			12.4	ND

GP = grado de polimerización; ND = no determinado.

---

Dependiendo de su aplicación, la edad de la planta debe ser un factor a considerar, ya que la composición de azúcares fermentables y GP de fructanas varían durante el cultivo de la planta (Arrizon y col., 2010; Mellado y López, 2012). La edad de las plantas empleadas para producir bebidas alcohólicas se encuentra entre los 7-12 años. Se observa también variación en la composición de agavinas entre plantas de la misma especie pero cultivadas en diferentes regiones (Mancilla y López, 2006).

## **2.2. Aguamiel: Modelo de referencia.**

En este trabajo se tomó el aguamiel como modelo de referencia para el diseño de una bebida fermentada, formulada a partir de azúcares de agave. Los elementos que componen el aguamiel (agua, azúcares fermentables, FOS, proteína, vitaminas) provienen totalmente de la planta. En el aguamiel se llevan a cabo de manera natural procesos fermentativos realizados, principalmente, por bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras. La fermentación del aguamiel ocurre por una diversidad de microorganismos que fueron incorporados durante la acumulación, extracción manejo o almacenamiento del mismo (Escalante y col., 2008), dando origen al pulque.

De acuerdo con la norma mexicana NMX-V-022-1972, el aguamiel es un jugo que se obtiene mediante el raspado previo del cajete o cavidad central del maguey pulquero, teniendo como atributos el ser un líquido traslúcido ambarino de olor y sabor característicos que se aprecian mediante prueba de catado.

El proceso de producción de aguamiel actualmente sigue siendo artesanal y consiste de varias etapas, empezando con el capado de la planta realizando cortes en el pedúnculo floral. Después de un periodo de 4 a 6 meses se realiza el raspado de la piña para formar una cavidad donde comenzará a fluir el aguamiel. Se realiza la recolección por succión bucal cada 12 h del aguamiel que se acumula en la cavidad y se realiza nuevamente el

raspado para evitar que la planta cicatrice manteniendo el flujo de aguamiel. La producción de aguamiel en la planta se puede extender de 3 a 6 meses y posteriormente la planta muere (Hinke, 1997; Martínez, 1999; Ortíz y col., 2008).

El proceso de capado de la planta, la recolección de aguamiel y las condiciones ambientales en las que se desarrolló la planta, resultan en la variabilidad en la cantidad de azúcares presentes en el mismo (Martínez, 1999). Lo cual dificulta el realizar un proceso industrializado que emplee aguamiel como materia prima que cumpla estándares de calidad e higiene. La fermentación del aguamiel comienza de manera espontánea desde la acumulación en la planta debido a la presencia de organismos nativos que incluyen principalmente, levaduras y BAL, productoras de ácidos orgánicos, etanol y exopolisacáridos (Escalante y col., 2004).

En la Tabla 2 se muestra el consorcio microbiano identificado de forma recurrente en el aguamiel de diversos orígenes geográficos está constituido principalmente por *Lactobacillus* spp., *L. mesenteroides*, *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces* spp (Cervantes y Pedroza, 2007; Escalante y col., 2008).

**Tabla 2. Consorcio microbiano identificado por varios autores en muestras de aguamiel**

<b>Reportado por:</b>	<b>Cervantes y Pedroza (2007)</b>	<b>Sánchez y Hope (1953)</b>	<b>Escalante y col. (2008)</b>
<b>Consortio microbiano identificado</b>	<i>Zymomonas</i> sp, <i>Lactobacillus</i> sp <i>Saccharomyces</i> sp.	<i>Lactobacillus</i> sp, <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> , <i>leuconostoc</i> <i>Dextranicum</i> , <i>Saccharomyces</i> Carbajali, <i>Pseudomonas</i> Lindneri	<i>Leuconostoc citreum</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. kimchi</i> , <i>Erwinia rhapontici</i> , <i>Enterobacter</i> sp, <i>Acinetobacter</i> <i>radioresistens</i>

Las actividades enzimáticas endógenas en las plantas de agave de tipo fructosiltransferasa, hidrolasa e invertasa, son necesarias para dar lugar a los FOS (Wang y Nobel, 1998). Los FOS, junto con glucosa, fructosa y sacarosa constituyen los carbohidratos presentes en el aguamiel. En la Tabla 3 se muestra un resumen de la composición fisicoquímica de aguamiel recolectado de diferentes regiones reportado por varios autores.

**Tabla 3. Composición fisicoquímica de aguamiel reportada por varios autores**

Reportado por:	Cervantes y Pedroza(2007)	Ortiz y col. (2008)	Sánchez y Hope (1953)	Escalante y col. (2008)
<b>Procedencia de la muestra</b>	Tlaxcala	Puebla	ND	Morelos
<b>Especie de la planta</b>	ND	<i>A. mapisaga</i>	ND	ND
<b>pH</b>	ND	4.7	7.0	6.0
<b>Etanol</b>	0.26 -0.39%v/v	ND	0 g/L	4.34 mM C (0.052g/L) <sup>2</sup>
<b>Ác láctico</b>	ND	ND	0.018 g/L	46.95mM C (0.56 g/L) <sup>2</sup>
<b>Ác acético</b>	ND	ND	ND	30.48mM C (0.37g/L) <sup>2</sup>
<b>Azúcares totales</b>	25 g/L	78% p/p <sup>1</sup>	20 g/L	ND
<b>Fructosa</b>	ND	32.4 % p/p <sup>1</sup>	ND	533.35 mM hexosa (96.1 g/L) <sup>3</sup>
<b>Glucosa</b>	ND	26.5 % p/p <sup>1</sup>	2.4 g/L	83.53 mM hexosa (15 g/L) <sup>3</sup>
<b>Sacarosa</b>	ND	8.8 % p/p <sup>1</sup>	7.6 g/L	410.16 mM hexosa (73.9 g/L) <sup>3</sup>
<b>Fructanas</b>	ND	10.2 % p/p <sup>1</sup>	ND	ND
<b>GP de fructanas</b>	ND	3-6	ND	ND
<b>Proteína</b>	3.7 g/L	3.0 % p/p <sup>1</sup>	0.17 g/L	ND
<b>Aminoácidos</b>	ND	0.26% p/p <sup>1</sup>	ND	ND
<b>Cenizas</b>	ND	3.0 % p/p <sup>1</sup>	0.31 g/L	ND
<b>Nitrógeno</b>	ND	ND	0.06 g/L	ND

ND= no determinado

1 Determinado en base seca

2 mM de carbono calculado con un peso molecular de 12 g/mol

3 mM de equivalentes de hexosa calculado con un peso molecular de 180.16 g/mol



---

Como se observa en la Tabla 3, existe variabilidad entre el contenido de azúcares totales, proteína, etanol y pH de muestras de aguamiel, lo que confirma la heterogeneidad del aguamiel obtenido entre lugares de cultivo. Esto dificulta el empleo de aguamiel como materia prima para procesos industriales que vayan más allá del carácter local que guarda la producción de pulque. Reproducir las características del aguamiel y pulque a nivel laboratorio o industrial es complicado debido a la necesidad del conjunto de actividades enzimáticas propias de la planta, además de que, para emular la fermentación fielmente se requiere contar con el consorcio microbiano involucrado en la fermentación espontánea (Tabla 2). Los microorganismos presentes contribuyen al valor nutricional mediante la síntesis de metabolitos secundarios y polisacáridos (Lappe, y col., 2008; Sánchez, 1993).

Con el fin de buscar alternativas que permitan aprovechar los FOS presentes en las variedades de agave que se cultivan en el país, se propone formular un medio de fermentación a partir de azúcares de agave, que reproduzca algunas de las características del pulque y aguamiel, pero con un control microbiológico más estricto y limitado a un solo microorganismo. Se seleccionó la bacteria *Leuconostoc citreum*, ya que es una bacteria láctica, productora de inulina, naturalmente presente en productos tradicionales fermentados, incluidos el pulque, el aguamiel y el pozol (Escalante y col., 2008; Olivares y col., 2002).

### **2.3. Prebióticos, Probióticos y Simbióticos.**

El interés sobre la manipulación de la microbiota intestinal se origina por el efecto que la composición de ésta puede ejercer en la salud del hospedero (positivo o negativo). Dicha manipulación se enfoca en mantener preferencialmente una comunidad bacteriana que incluya bifidobacterias y lactobacilos, lo que se puede lograr mediante la ingesta de compuestos específicos, conocidos como prebióticos, que favorecen el crecimiento de

---

estas bacterias (Andersson, 2001; Buddington, 2009; Gibson y col., 1995; Gibson y col., 2004; Hori, 2010; Quigley, 2010, Roberfroid, 2010).

**Prebiótico:** Las primeras definiciones consideraban a los prebióticos como ingredientes alimenticios no digeribles que afectan beneficiosamente al hospedero estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un limitado número de especies que residen en el colón (Gibson y Roberfroid, 1995). Ejemplo de éstos son oligosacáridos y polisacáridos, incluyendo aquellos considerados como fibra dietética. Sin embargo, no todos los oligosacáridos pueden considerarse como prebióticos, por lo que una definición más adecuada es: ingredientes alimenticios no digeribles por el hospedero que tienen un efecto benéfico a través de su metabolismo selectivo en el tracto intestinal (Gibson y col., 2004). Existen criterios que deben cumplirse para considerar a un ingrediente alimenticio como prebiótico, como la resistencia a la acidez gástrica y a la hidrólisis enzimática y absorción gastrointestinal. También deben ser fermentables por la microbiota intestinal, estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de microorganismos asociados con el bienestar del hospedero (Gibson y col., 2004).

Algunos de los ingredientes alimenticios que están reconocidos como elementos que cumplen estos criterios son FOS, galactooligosacáridos y lactulosa (Gibson y col., 2004). Los FOS tienen efecto sobre las dinámicas de población en el intestino favoreciendo el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias (Bosscher, 2009). La inulina y FOS presentes en plantas de agave también tienen probado efecto prebiótico (Ávila y col., 2011; Allsop y col., 2013; Bosscher, 2009; De Vrese y Schrezenmeir, 2008).

El intestino grueso es por mucho la región más colonizada del tracto digestivo, ya que contiene hasta  $10^{12}$  bacterias por gramo de intestino (Gibson y Roberfroid, 1995). Los microorganismos patógenos presentes pueden ser responsables de varias enfermedades

mientras que los organismos benéficos participan en procesos de fermentación que tienen como producto ácidos grasos de cadena corta, vitaminas, entre otros elementos que pueden tener un efecto en la salud del huésped (De Vrese y Schrezenmeir, 2008; Gibson y Roberfroid, 1995; Steed y Macfarlane, 2009). En la Figura se muestra una representación de los efectos en la salud por microorganismos presentes en el intestino.

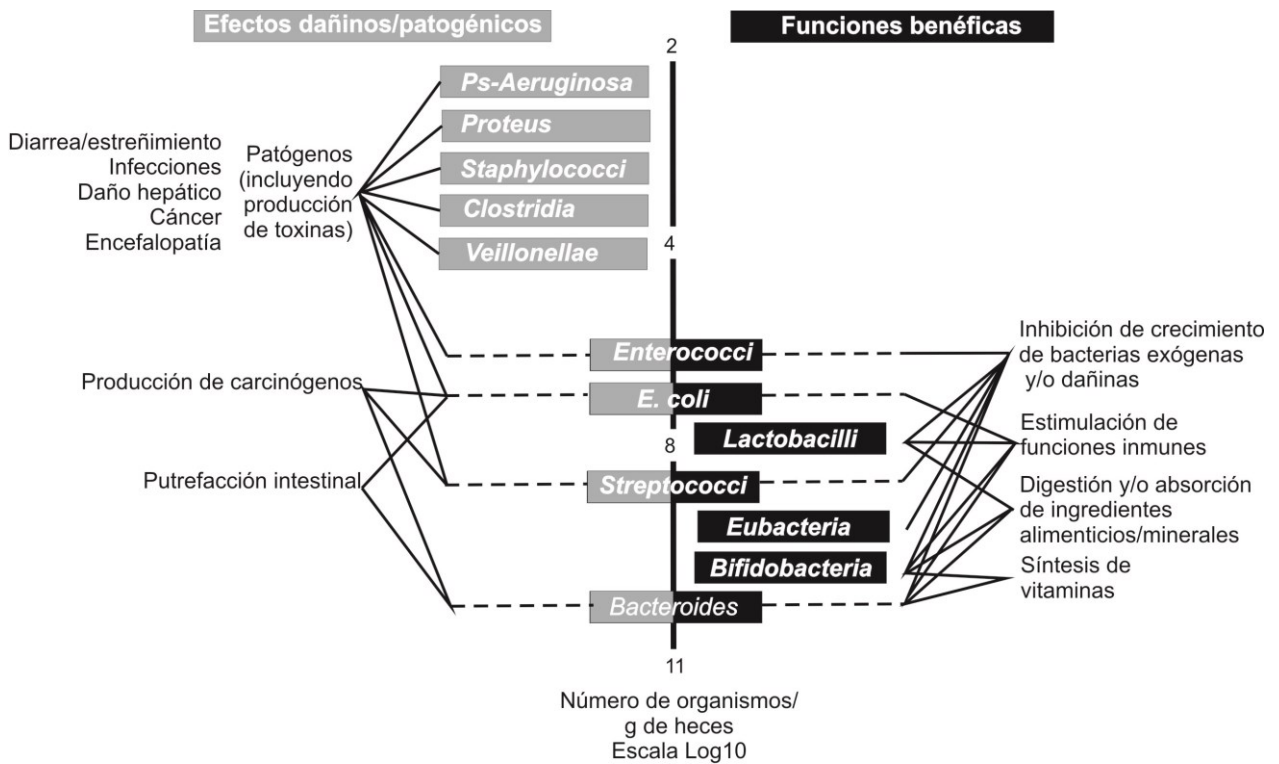


Figura 3. Esquema general de la composición y efectos en la salud de las bacterias predominantes en heces fecales humanas. La figura muestra el número aproximado de los diferentes géneros. Las bacterias son generalmente divididas en dos grupos que pueden tener efectos dañinos o patogénicos, aquellos que tienen efectos benéficos y los que pueden tener ambos. Modificado de Gibson y Roberfroid (1995).

De manera general se consideran como probióticos las bacterias que tienen funciones benéficas. Algunas definiciones de probióticos son:

---

**Probiótico:** Productos que incluyen microorganismos viables que al ser administrados en dosis que lleguen al intestino en estado activo, son capaces de ejercer un efecto positivo en la salud del huésped (De Vrese y Schrezenmeir, 2008).

En 1908, Metchnikoff en la publicación “La prolongación de la vida”, ya mencionaba que el consumo de lactobacilos presentes en el yogurt disminuía la presencia de bacterias productoras de “toxinas” en el intestino (De Vrese y Schrezenmeir, 2008). El concepto de probiótico fue introducido formalmente en 1953 por W. Kollath, y aunque por años se han realizado investigaciones al respecto, muchos de los efectos específicos atribuidos a la ingesta de probióticos permanecen débilmente sustentados científicamente y el poder realizar afirmaciones de su efecto en la salud (*Health Claims*) no es sencillo debido a la complejidad del microambiente gastrointestinal y el limitado conocimiento sobre las cerca de mil especies que pueden tener un impacto potencial en la microecología del tracto gastrointestinal (Klaenhammer y Kullen, 1999). Otra agravante es que muchos de estos estudios se enfocan a unas cuantas especies y los efectos benéficos se atribuyen por interés comercial casi siempre a una cepa en particular, mientras que este efecto *in vivo* probablemente se debe a la acción concertada de un amplio grupo de microorganismos (Buddington, 2009; Tuohy y col., 2003). Sin embargo el estudio y desarrollo de alimentos funcionales, la producción de probióticos y prebióticos tiene un gran potencial a nivel comercial (Klaenhammer y Kullen, 1999), así como la posibilidad de generar productos que mejoren el estado de salud general de quien los consume.

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe cumplir uno o varios de los siguientes criterios (Allsopp y col., 2013; Ávila y col., 2011; De Vrese y Schrezenmeir, 2008; Klaenhammer y Kullen 1999).

- 
- Libres de efectos patogénicos /tóxicos.
  - Presentes en el tracto intestinal de personas sanas.
  - Tolerancia al pH ácido.
  - Tolerancia a las sales biliares y enzimas digestivas.
  - Adherencia a las superficies epiteliales.
  - Producción de sustancias antimicrobianas.
  - Inmunoestimulación.
  - Antagonismo contra microorganismos patógenos.
  - Actividad anticancerígena.
  - Disminución de duración e incidencia de diarrea.
  - Mantenimiento de la integridad de la mucosa.

**Simbiótico:** La combinación de elementos probióticos y prebióticos puede resultar en alimentos que por sus propiedades y características nutricionales puedan clasificarse como alimentos funcionales con efectos benéficos a la salud (Gibson y Roberfroid, 1995). A la combinación sinérgica de estos elementos se le conoce como simbióticos (De Vrese y Schrezenmeir, 2008). Una definición más completa de un simbiótico es: “mezcla de probióticos y prebióticos que tienen un efecto benéfico en el huésped mejorando la supervivencia e implantación en el tracto gastrointestinal de microorganismos vivos presentes en suplementos alimenticios” (Andersson y col., 2001).

La ingesta de prebióticos como FOS, inulina, galactooligosacáridos, entre otros, en presencia de bacterias probióticas, se vincula a diferentes respuestas en el tracto gastrointestinal. Estos efectos reportados por varios autores se resumen en la Figura 4.

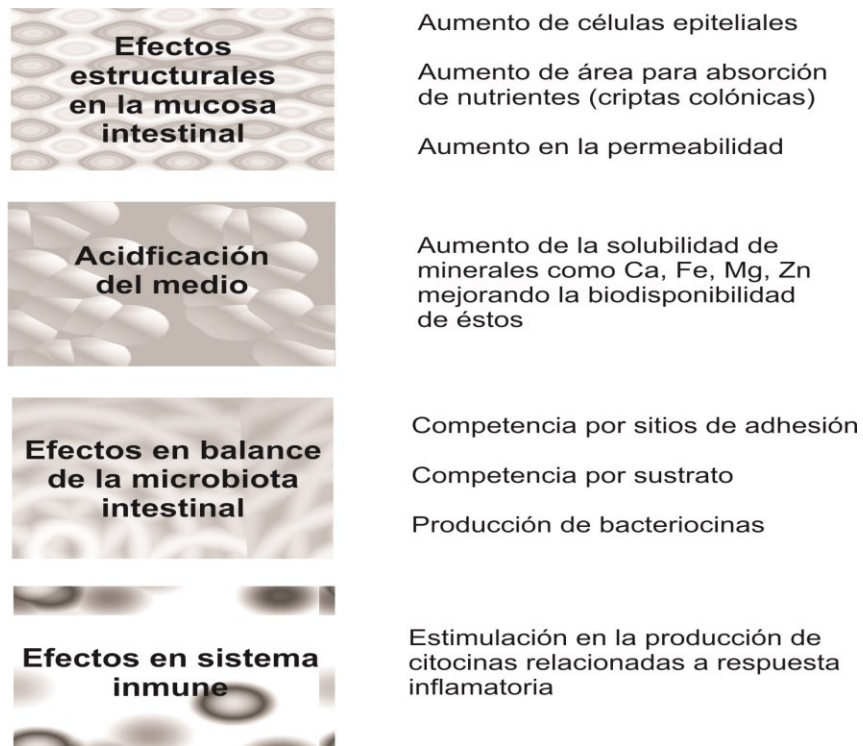


Figura 4. Mecanismos generales de acción de pre y probióticos, de acuerdo a De Vrese y Schrezenmeir (2008) y Steed y Macfarlane (2009)

Bacterias del género *Leuconostoc*, reportan actividades relacionadas a los mecanismos mostrados en la Figura 4. *L. mesenteroides*, ha sido reportada como un microorganismo inductor de mediadores de respuesta inmune (citocinas), lo que mejora las respuestas tipo Th1 relacionadas a alergias y prevención de infecciones respiratorias (Kekkonen y col., 2008). *L. mesenteroides* y *L. gelidum* también tienen reportada actividad antimicrobiana por la producción de péptidos tóxicos contra otras bacterias conocidos como bacteriocinas, que tiene efecto contra cepas patógenas como *Listeria monocytogenes* (Martinez y Martinis, 2006).

---

*Leuconostoc citreum* KM20 aislado de Kimchi (alimento fermentado tradicional coreano) se encuentra reportado como un microorganismo con efecto anti cancerígeno y actividad antimicrobiana (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 2005).

#### **2.4. *Leuconostoc* spp.**

Se sabe que las bacterias del género *Leuconostoc* se encuentran presentes durante las primeras etapas de la fermentación de aguamiel (Escalante y col., 2008). Una de estas especies, *Leuconostoc citreum*, ha sido seleccionada para éste trabajo, primeramente por las siguientes características:

- Las bacterias ácido lácticas (BAL) Gram positivas, que no forman esporas y son mesófilos, es decir crecen entre los 10 y 30°C a pH 6.5 (Lonvaud, 1999; Hemme y Foucaud, 2004).
- Son organismos GRAS (*Generally Recognized As Safe*, por sus siglas en inglés), es decir, generalmente reconocidos como seguros por la *Federal Drug Administration* de Estados Unidos (Hemme y Foucaud, 2004).
- Las BAL pueden estar presentes de manera natural o ser adicionados como iniciadores de cultivo en quesos madurados, conservas, productos lácteos y bebidas tradicionales como pulque y pozol (Escalante y col., 2008; Hemme y Foucaud, 2004; Lonvaud, 1999; Olivares y col., 2002).
- Muchas de las especies de *Leuconostoc* son conocidas como productoras de exopolisacáridos (EPS) de glucosa y fructosa (Hemme y Foucaud, 2004; Olivares y col., 2003). Estos polímeros por lo general alcanzan altos peso moleculares que se encuentran entre los 100-3000 KDa (Ortíz, 2004; Patel y col., 2012; Vijayendra y

---

Sharath, 2008). La presencia de EPS es responsable de la viscosidad en el pulque y otros productos fermentados (Olivares y col., 2003; Patel y col., 2012).

- Son productores de bacteriocinas (Hemme y Foucaud, 2004; Martínez y Martinis, 2006).

Especies del género *Leuconostoc* como *L. citreum*, *L. mesenteroides* y *L. kimchi* representan aproximadamente el 36% de los organismos detectados como iniciadores de la fermentación en muestras de aguamiel (Escalante y col., 2008). Para el presente proyecto, se decidió emplear el microorganismo *L. citreum* CW28 para realizar una fermentación en un medio formulado teniendo como referencia la composición de aguamiel.

En la Figura 5 se muestran las principales rutas metabólicas de *Leuconostoc mesenteroides*, la cual se considera representativa del metabolismo de *Leuconostoc* spp. Los principales productos metabólicos producidos son: ácido láctico, ácido acético, etanol y EPS. Los exopolisacáridos (EPS) son unidades repetidas de azúcares producidas extracelularmente por BAL, que aportan textura y viscosidad a una variedad de alimentos fermentados (Patel y col., 2012), como el pulque, pozol, quesos, entre otros.

Las bacterias pertenecientes al género *Leuconostoc* son frecuentemente confundidas entre sí por sus características morfológicas y pruebas bioquímicas. Los primeros reportes sobre la descripción bioquímica de *L. citreum* corresponden al trabajo de Farrow y Collins. (1989), originalmente la cepa se identificó como *Leuconostoc mesenteroides* y posteriormente por pruebas de homología de ADN fue clasificado como *Leuconostoc citreum* (Farrow y Collins, 1989). El nombre se debe a la pigmentación verdosa que produce el microorganismo. La cepa CW28 de *L. citreum* utilizada en la realización del presente trabajo fue aislada del pozol por la Dra. C. Wachter de la Facultad de Química de la UNAM. Se identificó inicialmente como *L. mesenteroides* (API 50-CH), posteriormente, en



nuestro grupo de trabajo, se re-clasificó como *L. citreum* por análisis de rARN 16S (Olivares y col., 2002).

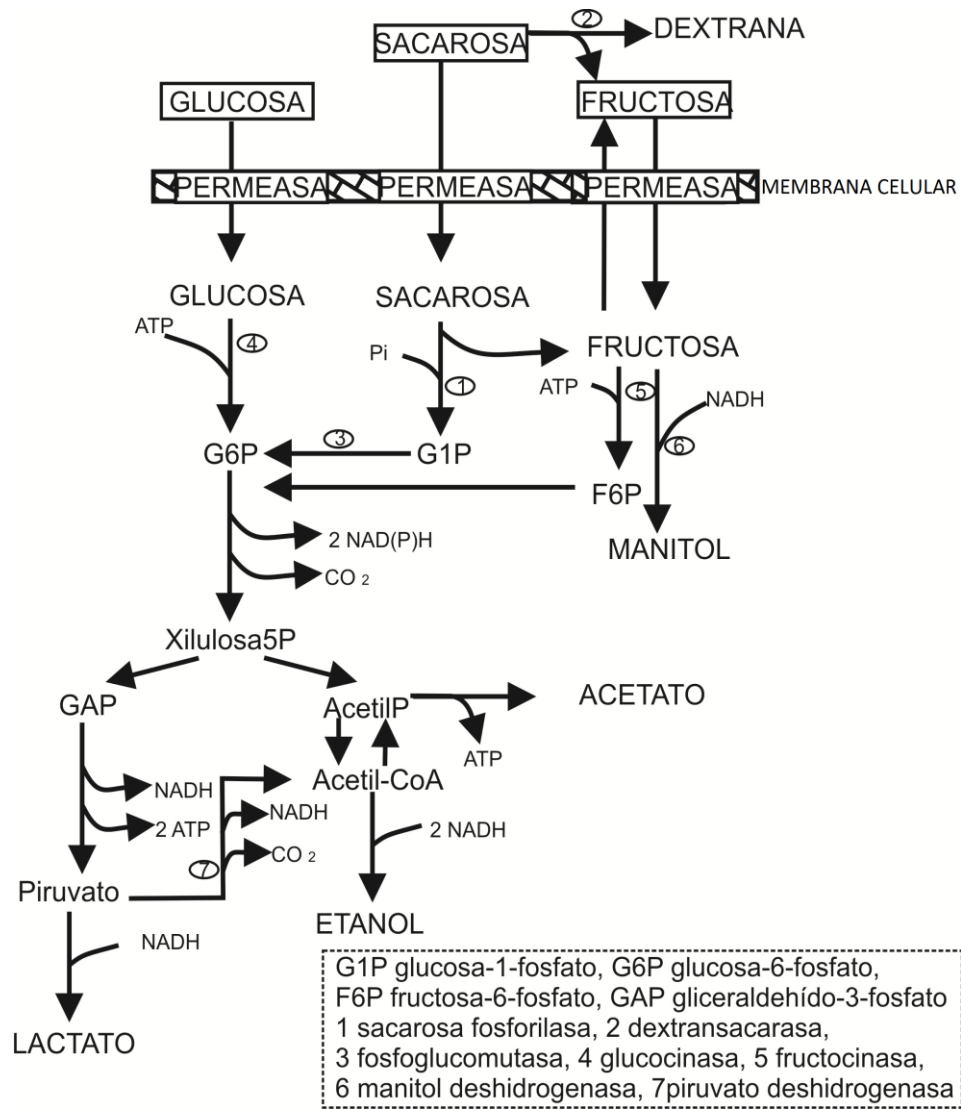


Figura 5. Representación esquemática del flujo de carbono y energía a través de las rutas metabólicas centrales de *Leuconostoc mesenteroides*, modificado de Dols y col. (1997).

La gran mayoría de bacterias pertenecientes a *Leuconostoc* spp., son productores de EPS de tipo dextrana (polímero de glucosa) o levana. Sin embargo *Leuconostoc citreum* CW28, tiene una enzima fructosiltransferasa (FTF) de 170 KDa, que se encuentra anclada a

---

la pared celular con actividad inulosacarasa. Esta enzima es altamente específica para la síntesis de inulina de alto peso molecular (Olivares y col., 2003). Las enzimas FTF son capaces de catalizar la transferencia de un residuo de fructosa proveniente de una molécula de sacarosa a una cadena de fructana en crecimiento, resultando en la síntesis de polímero de alto peso molecular. Los únicos reportes de bacterias con actividad inulosacarasa son para *Leuconostoc citreum* CW28 y *Streptococcus mutans* (Olivares y col., 2002).

El producto de la reacción de transferencia es polímero de inulina lineal de alto peso molecular con enlaces glicosídicos del tipo  $\beta$ 2-1. Tiene una actividad enzimática óptima a pH 6.5 y 30°C. Existen reportes de que no se encuentra actividad enzimática FTF al crecer el microorganismo en glucosa y/o fructosa (Olivares y col., 2002).

De manera general, una enzima con actividad inulosacarasa, cataliza la siguiente reacción (Figura 6):

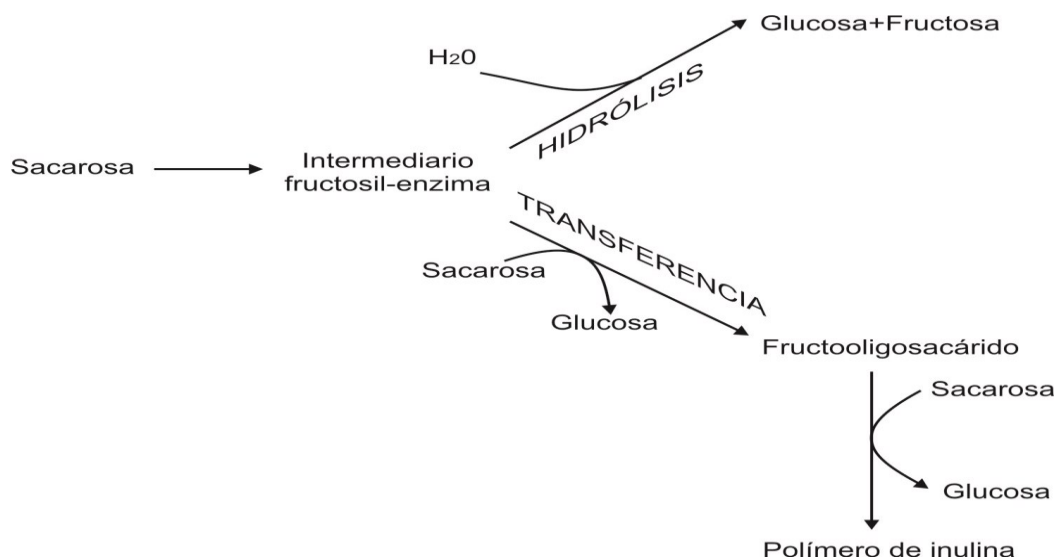


Figura 6. Representación esquemática general de las reacciones catalizadas por una enzima con actividad inulosacarasa (de acuerdo a Vergauwen y col., 2003).

---

*L. citreum* forma parte del consorcio microbiano presente en las primeras etapas de fermentación de aguamiel. Por lo que es factible emplear este microorganismo para llevar a cabo una fermentación controlada en un medio que incluya azúcares de agave y sacarosa. De la fermentación por la BAL *L. citreum* CW28 en un medio de cultivo formulado con azúcares de agave enriquecido con sacarosa como fuente de carbono, se espera obtener productos típicos del metabolismo como: EPS de tipo inulina, ácido láctico, ácido acético, manitol y etanol (Figura 5).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Con la creciente conciencia del consumidor sobre la relación entre la microbiota intestinal y su bienestar general, el mercado para los prebióticos y probióticos es cada vez más atractivo, por lo que el desarrollo tecnológico de productos nutricionales que puedan ofrecer beneficios a quien los consume constituye un nicho de oportunidad.

En México existe una variedad de bebidas fermentadas tradicionales que se elaboran artesanalmente y cumplen con varios de los criterios necesarios para considerarlos como de valor nutricional (aguamiel, pulque, pozol, entre otros). Sin embargo, por la naturaleza de su manufactura, particularmente la del pulque, son productos difícilmente estandarizables para su producción y control de calidad a escala industrial. Es por esto que el presente proyecto propone reproducir algunas de las características presentes en el aguamiel y el pulque (FOS, fibra dietética, ácidos orgánicos, entre otros), con el fin de desarrollar un proceso de fermentación en condiciones controladas, tanto en la formulación del medio de cultivo, como del microorganismo, que eventualmente pueda ser escalada a nivel industrial.

---

## 4. HIPÓTESIS

- Es posible obtener una bebida con potencial efecto simbiótico a partir de una formulación inspirada en el aguamiel que contenga fructanas de agave y sacarosa empleando como inóculo *Leuconostoc citreum* CW28 para llevar a cabo una fermentación ácido láctica.

## 5. OBJETIVOS

- Obtener una bebida láctica fermentada con propiedades prebióticas y probióticas empleando la bacteria ácido láctica *Leuconostoc citreum* cepa CW28 y un medio formulado a partir de sacarosa y azúcares de agave.

### 5.1. Objetivos particulares.

- Caracterizar y comparar el contenido y perfil de azúcares presentes en el aguamiel, y los azúcares presentes en extracto de plantas de agave.
- Formular un medio para la fermentación de *L. citreum* CW28 que incluya azúcares presentes en plantas de agave y sacarosa teniendo como referencia al aguamiel.
- Determinar las condiciones óptimas de crecimiento y cinética de producción de EPS de *L. citreum* CW28 en la formulación propuesta.
- Caracterizar el crecimiento y producción de metabolitos resultantes del cultivo de *L. citreum* CW 28 en el medio formulado.
- Evaluar las propiedades organolépticas de la bebida formulada.
- Realizar estudios preliminares de estabilidad de la bebida.

---

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se dividió en 3 partes:

- a) Caracterización de muestras de aguamiel.
- b) Caracterización de agavina comercial.
- c) Diseño y caracterización del proceso de elaboración de la bebida obtenida del cultivo de *L. citreum* en un medio basado en aguamiel.

### 6.1. Caracterización de muestras de aguamiel.

El muestreo se llevó a cabo en el municipio de Huitzilac, Morelos (altitud 2550 m, temperatura anual promedio de 11.8°C). Se eligieron tres especies de agave pulquero abundantes en la región, con una edad aproximada entre 10 y 12 años, pertenecientes a especies de agave pulquero (tradicionalmente empleadas para la producción de aguamiel). La recolección se llevó a cabo en plantas que se encontraban entre 1-2 meses de producción de aguamiel. De acuerdo a Ortíz y col. (2008), el volumen de producción varía de acuerdo al tiempo y es entre 1-2 meses cuando se produce el mayor volumen (aproximadamente 4 L por día). La recolección de las muestras se llevó a cabo en el mes de octubre, después de al menos 3 días sin lluvia. Las tres especies seleccionadas (Figura 7) fueron clasificadas por el el Dr. Abisaí J. García Mendoza (comunicación personal) como:

- a) *Agave aff. americana* L. (Maguey “melón”).
- b) *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (Maguey “verde”).
- c) *Agave americana* L. (Maguey “blanco legítimo”).



Figura 7. Especies seleccionadas para muestreo de aguamiel a) *A. aff. americana* L. b) *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck, c) *A. americana* L.

Se llevó a cabo un análisis preliminar de muestras recolectadas de la manera usual a las 12 horas de acumulación de aguamiel realizada por los agricultores. Posteriormente, se realizó un segundo muestreo para la caracterización de muestras de aguamiel recolectado en frascos estériles a las 2, 5 y 12 horas de acumulación de aguamiel en el cajete de la planta, se tomó como tiempo cero el raspado del cajete. Se analizaron las muestras de cada planta y tiempo por separado.

Para cada tiempo de acumulación (2, 5 y 12 h) de las tres especies de plantas se determinaron valores de pH y cuantificación de FOS, azúcares, ácidos orgánicos y proteína. Todos los análisis se realizaron por duplicado para cada tiempo de acumulación de aguamiel, tomando ambas muestras de una sola planta para cada especie. La medición de pH se realizó en el sitio con tiras reactivas (Merck) y posteriormente en laboratorio empleando un potenciómetro a 20°C (MetroHM 827).

Se adicionó en el sitio 0.02% p/v de azida de sodio<sup>1</sup> como agente antimicrobiano en todas las muestras, excepto la empleadas para la medición de pH. Todas las muestras se congelaron en el sitio y se transportaron al Laboratorio 03 del Instituto de

---

<sup>1</sup> Compuesto que inhibe la actividad citocromo oxidasa.

---

Biotecnología, UNAM. Las muestras se descongelaron a 4°C y se centrifugaron a 3709 rcf a 4°C por 30 min (centrífuga Beckman Coulter rotor cónico C0650). Se tomó el sobrenadante, se aumentó la concentración de azida de sodio a 0.04% p/v y se congeló a -20°C hasta su análisis.

Se evaluó la presencia de crecimiento microbiano en las muestras con azida de sodio, realizando siembras en cajas Petri con 50µL de cada muestra en medios sólidos LB, MRS y R5 (Anexo 10.3), incubándolas a 30°C por al menos 24 horas.

Se determinó la concentración y perfil de FOS, azúcares fermentables y productos comunes de fermentación, por medio de análisis cromatográficos (TLC; HPLC y HPAEC-PAD) que se describen en la sección 6.4.

Se determinó el contenido de proteína total en muestras de aguamiel a partir de una curva de albúmina sérica bovina. Se tomaron 400µL de aguamiel a una dilución 1/20 en agua destilada, se adicionaron 100 µl de reactivo de Bradford, dejando reaccionar por 12 min. La reacción se lee a 595 nm en espectrofotómetro (Beckman DU650).

## **6.2. Caracterización de inulina de agave (agavinas).**

Se analizó el producto Fructagave (polvo) producido por la empresa Agaviótica S.A. de C.V. con sede en Monterrey, Nuevo León. Este producto se comercializa como ingrediente para la industria alimentaria. El análisis se realizó por triplicado en dos lotes comerciales (PR111123TL y PR130729AM). Los análisis consistieron en pruebas de solubilidad, porcentaje de humedad, contenido de azúcares libres, FOS, perfil de carbohidratos, y contenido de proteína.

---

La solubilidad de agavina comercial se evaluó por la presencia de sedimento al mezclar la sustancia en agua a 30°C a concentraciones de 100, 125, 200 y 400 g/L.

El porcentaje de humedad se determinó por diferencia entre el peso inicial y final de 2 g de muestra empleando una estufa a 60°C (Precision Scientific Inc.) hasta alcanzar el peso constante de la muestra.

Se determinó el contenido de proteína total a partir de una curva de albúmina bovina. Se tomaron 400µL de una solución de agavina a una concentración de 125 g/L, se adicionaron 100 µl de reactivo de Bradford, dejando reaccionar por 12 min. Las lecturas se realizaron a 595 nm en espectrofotómetro (Beckman DU650).

### 6.3. Caracterización del crecimiento y productos de la fermentación de *Leuconostoc citreum* CW28 en diferentes medios de cultivo.

La cepa de *Leuconostoc citreum* CW28 fue tomada del cepario del laboratorio 03 del IBT (*L. citreum* CW28/10). Se realizó la activación del liofilizado en medio *Leuconostoc* (medio Lm, Tabla 4), empleado para la caracterización de la inulosacarasa de *L. citreum* (Ortíz, 2004).

Tabla 4. Composición del medio Lm

	Componente	Concentración (g/L)
Fuente de carbono	Sacarosa	20
Fuente de nitrógeno	Extracto de levadura <sup>1</sup>	20
Amortiguador	Fosfato di potásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	20
	pH del medio (ajustado con HCl)	6.9
Sales	Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0.2
	Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O)	0.05



---

	Componente	Concentración (g/L)
	Sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0.1
	Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0.1
	Cloruro de sodio (NaCl)	0.1

1 Extracto de levadura de BD Nutrients

Para realizar las pruebas de fermentación en diferentes medios de cultivo a formularse, se produjeron reservas del microorganismo en medio Lm, empleando 500 µL de cultivo en fase exponencial (DO entre 5.5 y 6.5) + 500 µL de glicerol estéril al 80%. Estos se almacenaron a -20°C hasta su uso en un tiempo no mayor a 20 días.

Todas las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces estériles Erlenmeyer de 250 mL de capacidad con 50 mL de cultivo y tapón de algodón, con una agitación de 200 rpm y a 30°C en incubadora New Brunswick Scientific. En todos los cultivos se empleó como control de esterilidad un matraz con el medio empleado (sin inóculo).

Para todas las fermentaciones se llevaron a cabo dos pasos, uno de “activación” en el cual se creció el microorganismo en medio Lm, empleando como inóculo 1% (v/v) de glicerol al 40% de *L. citreum*. Una vez alcanzada una a DO<sub>600nm</sub> entre 5.5-6.5, que equivale a 0.8 a 3x10<sup>8</sup> UFC/mL (fase exponencial) o 7.5-8.5, que equivale 0.8 a 8x10<sup>9</sup> UFC/mL (fase estacionaria). Éste cultivo se empleó como inóculo al 2% (v/v) de la fermentación en medio formulado con agavinas. Las mediciones de DO se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Beckman DU650 en diluciones adecuadas para realizar la medición en un rango entre 0.1 y 0.9.

La caracterización del cultivo de *L. citreum* se realizó en diferentes medios formulados, evaluando los siguientes parámetros:

- Acidificación del medio (pH).

- 
- Concentración de células (cuentas viables y biomasa en peso seco).
  - Consumo de sustrato
  - Actividad enzimática total (reacción de hidrólisis + reacción de transferencia)
  - Producción de polímero de inulina.
  - Producción de ácidos orgánicos y etanol.

Las mediciones de pH y cuentas viables se realizaron de manera inmediata a la toma de muestra en todos los casos, para el resto de los análisis se tomó 1mL de cultivo el cual se centrifugó a 21,130 rcf por 5 minutos (centrífuga Eppendorf 5424), se tomó el sobrenadante y se microfiltró en filtros para jeringa de 0.2 $\mu$ m con membrana de nylon (Cronus 4mm o Titan3 17mm). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

**Acidificación del medio (pH):** las mediciones de pH se realizaron a 25°C con un potenciómetro MetroHM 827, previamente calibrado con solución estándar pH 4 y 7.

**Concentración de células: cuentas viables y peso seco:** la determinación de cuentas viables se realizó empleando diluciones adecuadas de tal manera que la cuenta se realizará en cajas estadísticamente representativas (entre 25 y 250 colonias por caja) de medio Lm con agar al 2%. Todas las cuentas se realizaron al menos por duplicado. Las cajas se incubaron a 30°C en incubadora Boekel Industries Inc. por un periodo de 24- 48 h.

Para la determinación de Biomasa por peso seco, se tomaron 50 mL de cultivo en medio Lm y medios formulados con agavinas y se centrifugaron las células a 3709 rcf, 5°C por 15min (centrífuga Beckman Coulter rotor cónico C0650). Las células se lavaron 3 veces resuspendiendo el pellet en agua destilada y concentrando el volumen de la muestra 5 veces. Se empleó un equipo de secado Brainweigh MB 301 con resistencia y balanza

---

OHAUS integrada. El equipo se operó a una intensidad de 12, hasta alcanzar el peso constante de la muestra (aproximadamente 50 min).

Se empleó la Ecuación 1 para normalizar los valores de concentración de células obtenidos por cuentas viables respecto al peso seco y realizar los balances correspondientes. Se dividió el valor de biomasa en peso seco (mg/mL) entre la concentración de células obtenida por cuentas viables (UFC/mL).

$$\frac{\text{Peso seco } \left( \frac{\text{mg biomasa}}{\text{mL}} \right)}{\text{Cuentas viables } \left( \frac{\log \text{ UFC}}{\text{mL}} \right)} = \frac{\text{mg biomasa}}{\log \text{ UFC}}$$

Ecuación 1

**Actividad enzimática:** la actividad enzimática total (reacción de transferencia + reacción de hidrólisis) expresada en unidades (U) de una glicosiltransferasa, se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de fructosa o glucosa por minuto. Una medida indirecta de la actividad enzimática total es la concentración de azúcares reductores (AR) (fructosa y glucosa) liberados al medio en un determinado tiempo de reacción.

La determinación de actividad enzimática se llevó a cabo con las células de dos cultivos independientes de *L. citreum* en fase estacionaria, previamente lavadas en buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5, en presencia de 100 g/L de sacarosa a un volumen de reacción de 600 μL. La reacción de liberación de AR totales se realizó a tiempos iniciales (0, 2, 5, 7 y 10 min). La medición de AR se realizó de manera indirecta por la absorbancia a 540 nm (espectrofotómetro Beckman DU650) en presencia de ácido 3,5 dinitrosalisílico (DNS) de

acuerdo al método reportado por Sumner y Howell (1934), obteniendo por regresión lineal la pendiente de la liberación de AR respecto al tiempo de reacción.

Se empleó como curva patrón una solución estándar de fructosa, donde se midió las absorbancias a 540 nm correspondientes a diferentes concentraciones de fructosa (0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/mL). Se obtuvo por regresión lineal, la pendiente de la curva patrón de fructosa (mL/mgAR). Se determinó la velocidad inicial ( $vi$ ) a partir de la liberación de AR con la Ecuación 2.

$$vi \left( \frac{\text{mg AR}}{\text{min} * \text{mL}} \right) = \frac{\text{Pendiente del experimento} \left( \frac{1}{\text{min}} \right)}{\text{Pendiente curva patrón} \left( \frac{\text{mL}}{\text{mg AR}} \right)}$$

Ecuación 2

Para reportar la actividad total en U/mL, la  $vi$  se expresó como actividad (Ecuación 3)

$$U/mL \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} * \text{mL}} \right) = vi \times \frac{1\text{molAR}}{180000\text{mgAR}} \times \frac{1 \times 10^6 \mu\text{mol}}{1\text{mol}} \times \frac{\text{mL de reacción}}{\text{mL de cultivo}} \times \text{dilución}$$

Ecuación 3

Ya que la actividad inulosacarasa está asociada a la célula (Ortíz, 2004), es importante tener aproximadamente la misma concentración de células en los cultivos evaluados para comparar la actividad enzimática en los diferentes medios. Ya que no se alcanzó la misma concentración de células en todos los medios de cultivo evaluados, la actividad enzimática se normalizó tomando la actividad enzimática (U/mL) por el Log del

---

número de cuentas viables por mL de cultivo (Log UFC/mL), expresándose como U/Log UFC.

Se calculó la velocidad de reacción expresada como la velocidad de consumo de sustrato (sacarosa consumida por litro en un minuto), a la que se le llamó  $V_{max}$ . De esta forma, es posible calcular el tiempo de reacción requerido para consumir una determinada concentración de sacarosa, empleando la siguiente ecuación:

$$t = \frac{S_0 X - K_m \ln(1 - X)}{v_{max}}$$

Ecuación 4

Donde  $S_0$  = sustrato inicial (mol/L)

$K_m$  asociada a células = 66 mM<sup>2</sup>

$X$  = fracción de sustrato consumido

$V_{max}$  = mol sacarosa consumida /L min

**Caracterización del peso molecular y cuantificación del polímero producido por *L. citreum*:** para la caracterización del peso molecular del polímero se genera una curva estándar de peso molecular empleando estándar comercial. Para la cuantificación de la concentración de polímero se realiza una curva de calibración empleando como estándar una solución al 1% de inulina de *L. citreum* secada por aspersion producida en el 2009 a escala piloto en el Instituto de Biotecnología, UNAM. El análisis se realiza por HPLC (sección 6.4).

---

<sup>2</sup> Reportada por Ortiz (2004).

---

### 6.3.1. Condiciones de estudios preliminares de estabilidad del producto de la fermentación de *L. citreum* CW28.

Una vez alcanzada la fase estacionaria del cultivo, se tomaron 25 mL del producto de la fermentación de *L. citreum* en medio formulado con agavinas, se trasvasaron en condiciones estériles a frascos de vidrio de 50 mL con tapón de silicón y cinturón metálico y se almacenaron a una temperatura de  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ . El análisis se llevó a cabo por triplicado. Se tomó como tiempo cero el último punto muestreado del cultivo en fase estacionaria y se tomaron muestras a los 17 días de almacenamiento, a las muestras de estabilidad se les realizó determinación de pH a  $25^\circ\text{C}$  (potenciómetro MetroHM 827), concentración de inulina, fructosa, glucosa, sacarosa, ácido láctico, ácido acético y etanol por análisis cromatográficos (sección 6.4) y concentración de células por cuentas viables.



Figura 8. Almacenamiento del producto de fermentación de *L. citreum* en medio Agavinas para ensayos de estabilidad

### 6.3.2. Evaluación sensorial del producto de fermentación de *L. citreum* CW28.

Se llevó a cabo una evaluación sensorial de la formulación final del cultivo (Medio Agavinas BN), el análisis se realizó en menos de 24 h después del término de la fermentación. El producto se mantuvo a  $4^\circ\text{C}$  hasta su análisis. El análisis fue realizado por

---

un panel de expertos en las instalaciones de la Facultad de Química de la UNAM en el Departamento de Alimentos y Biotecnología bajo la dirección de la Dra. Patricia Severiano Pérez con la siguiente metodología.

En la evaluación de las muestras participaron 15 jueces entrenados en metodología sensorial descriptiva y con experiencia en evaluación de bebidas fermentadas (Iñigo, 2013), con un rango de edad de 21-24 años (16% hombres y 84 % mujeres).

Se llevó a cabo un Análisis de Componentes Principales (ACP), que pretende representar un conjunto amplio de variables en un número reducido de dimensiones llamadas componentes principales. Estos componentes son combinaciones de las variables originales, por lo que una representación gráfica permite observar la relación entre las variables (Ibañez y Barcina, 2000).

Se generaron 14 atributos, 6 de apariencia, 2 de olor y 6 de *flavour* (Tabla 5).

**Tabla 5. Descriptores de bebidas fermentadas y orden de evaluación**

<b>Apariencia</b>	<b>Olor<sup>1</sup></b>	<b>Flavour<sup>1</sup></b>
1.Burbujeante	7.Agrio	9.Dulce
2.Homogeneidad	8.Ácido	10.Ácido
3.Formación de película		11.Agrio
4.Color		12.Cítrico
5.Viscosidad		13.Astringente
6.Precipitación		14.Resabio ácido

1 Se evaluaron además otros olores y resabios (gustos), sin embargo para el análisis de ACP se tomaron solo los descriptores que aparecían en todas las muestras.

---

**Análisis Estadístico:** Se utilizó el programa estadístico FIZZ calculations, 2.3 (Biosystemes 2007, Couternon, Francia). Todas las pruebas que se aplicaron a los jueces fueron por medio de cuestionarios electrónicos. Los datos se analizaron mediante ANOVA a dos vías (jueces y muestras). Para conocer en que atributos existía diferencia estadísticamente significativa entre las muestras, se realizó una prueba de comparación múltiple de medias (DMS) tomando un valor de  $p \leq 0.05$ . El análisis de los datos fue realizado por ACP utilizando una matriz de covarianza. Todas las muestras fueron evaluadas en una escala de 1-9.

#### **6.4. Análisis cromatográficos.**

El análisis cualitativo de carbohidratos se realizó por cromatografía en capa fina (TLC), se empleó como fase móvil una mezcla de ácido acético 42%; cloroformo 12%; etanol 42%; agua 4%. En placas con soporte de aluminio (Machery-Nagel 10cm) aplicando 0.5  $\mu$ L de cada muestra. Se realizó el revelado con  $\alpha$ -naftol aplicado por aspersion y activado con calor (80°C). La cuantificación de carbohidratos, inulina, ácidos orgánicos y etanol, se realizó cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Las fases móviles se prepararon con reactivos grado HPLC se y degasificaron con helio. Todos los análisis se realizaron previa estabilización del equipo, las muestras inyectadas fueron centrifugadas a 21,130 rcf por 5 minutos y semicofiltraron con filtros para jeringa de 0.2  $\mu$ m membrana de nylon (Cronus 4mm o Titan3 17mm).

- Cuantificación de carbohidratos (fructosa, glucosa y sacarosa): se empleó un equipo de cromatografía marca Waters 717 con detección por índice de refracción con una columna Prevail Carbohydrate ES 5 $\mu$ m (Grace) a un flujo isocrático de 1 mL/min de



---

acetonitrilo:agua (70:30) a 30°C. se empleó como estándar soluciones de los tres azúcares a una concentración de 10 y 2 g/L cada uno.

- Caracterización y Cuantificación de inulina de alto peso molecular: se empleó un equipo de cromatografía Ultimate 3000 marca DIONEX, con detección por índice de refracción. Se emplearon dos columnas de Ultrahydrogel en tándem, (Waters WAT011545 y WAT011530) con un flujo isocrático de 0.8 mL/min de nitrato de sodio a una concentración de 8.5 g/L y 30°C. Como estándar de la caracterización de peso molecular, se empleó una curva de tiempos de retención, construida con muestras de polímero de dextrana comercial (Polymer Standard Service, USA) de varios pesos moleculares (11,600; 23,800; 48,600; 148,000; 273,000; 410,000; 668,000 Da). Para la cuantificación de inulina producida, se empleó como estándar una solución de inulina de *L. citreum* secada por aspersion al 1%.
- Cuantificación de productos de ácidos orgánicos y etanol: se empleó un equipo de cromatografía Ultimate 3000 marca DIONEX, con detección por índice de refracción y UV a 210 nm. Se usó columna para ácidos orgánicos Aminex HPX-87H (Biorad) con un flujo isocrático de 0.5mL/min de ácido sulfúrico 0.5 mM a 50°C. Caracterización del perfil de carbohidratos: se usó cromatografía de intercambio aniónico de alta eficiencia acoplada a pulsos amperométricos (HPAEC-PAD) con detector electroquímico ED50 (Dionex) y una columna para análisis de carbohidratos PA200 (Dionex).

En la Tabla 6 se detallan las condiciones de los programas de elución empleados.

**Tabla 6. Programas de elución empleados para la determinación de perfil de carbohidratos por HPAEC-PAD**

	<b>PROGRAMA 1</b>	<b>PROGRAMA 2</b>
<b>Gradiente</b>	99%A,+1%B (0-0.5min), 80%A+20%B (1-25 min), 20%A+80%B (25.5-85min)	99%A,+1%B (0-0.5min), 55%A+45%B (1-50 min)
<b>Re-equilibrio de columna</b>	99%A+1%B (85.5-95.5 min)	99%A+1%B (51-61min)
<b>Flujo de elución</b>	0.5 mL/min	0.5 mL/min
<b>Fase A</b>	Hidróxido de sodio 150mM a partir de solución al 50% p/p <sup>1</sup>	
<b>Fase B</b>	Acetato de sodio 500mM/hidróxido de sodio 150mM a partir de solución al 50% p/p. <sup>1</sup>	

<sup>1</sup> El cálculo se realiza con una densidad de 1.53 g/mL para la solución de NaOH al 50%

### 6.5. Cuantificación indirecta de fructanas.

La cuantificación de fructanas, se realizó de manera indirecta por diferencia entre la concentración de glucosa y fructosa libres, y la concentración de glucosa y fructosa totales después de hidrolizar completamente las fructanas presentes en aguamiel y agavinas. La reacción de hidrólisis se realizó por triplicado a 60°C, pH 5.2, por 15 h, empleando la enzima comercial Fructozyme (Novozymes Corp.), a concentraciones de 1% v/v para muestras de aguamiel y 0.15% v/v para agavinas. Se cuantificó por HPLC la concentración de fructosa, glucosa y sacarosa, expresada en mmol/L, de las muestras antes y después de la reacción de hidrólisis. La concentración de fructanas se determina con la Ecuación 5:

$$FOS \left( \frac{mmol}{L} \right) = (F_t - F_l - F_s) + (G_t - G_l - G_s)$$

Ecuación 5

Donde: Ft = fructosa total después de hidrólisis (mmol/L)

Fl = fructosa libre antes de hidrólisis (mmol/L)

---

Fs = equivalentes de fructosa provenientes de la sacarosa inicial (mmol/L)

Gt = glucosa total después de hidrólisis (mmol/L)

Gl = glucosa libre antes de hidrólisis (mmol/L)

Gs = equivalentes de glucosa provenientes de la sacarosa inicial (mmol/L)

Se determinó el GP promedio aparente de las fructanas presentes en aguamiel y agavinas con la siguiente ecuación reportada por Waleckx y col. (2008), el cálculo se realizó en g/L.

$$\text{GP promedio aparente} = \frac{F \text{ total} - F \text{ inicial} - 0.52 S \text{ inicial}}{G \text{ total} - G \text{ inicial} - 0.52 S \text{ inicial}} + 1$$

Ecuación 6

Donde F= fructosa

G= glucosa

S= sacarosa

---

## 7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 7.1. Caracterización de muestras de aguamiel.

Se llevaron a cabo dos recolecciones de muestras de aguamiel producido por las 3 especies seleccionadas: *Agave salmiana* Otto-ex Salm Dyck, *Agave aff. Americana* L y *Agave americana* L. La primera recolección fue realizada por los agricultores, de la manera acostumbrada, es decir, a las 12 horas de acumulación de aguamiel en la panta. En estas muestras se comprobó que la fermentación del aguamiel se encontraba avanzada al realizar la recolección. Esto se pudo inferir, ya que en los tres casos el pH se encontraba alrededor de 4. Se confirmó por HPLC, la presencia de ácidos orgánicos derivados de la fermentación, la baja concentración de sacarosa y la ausencia de FOS. Se concluyó que estas muestras no eran adecuadas para el estudio. Se llevó a cabo una segunda recolección de aguamiel a tiempos más cortos de acumulación en la planta (2, 5 y 12 h) para observar la evolución de las azúcares presentes. El tiempo se contó a partir del momento del raspado de la planta. Se observó un volumen de aguamiel entre 200 a 500 mL a las 2 horas de iniciada la medición, hasta 2 L a las 12 h. La producción estimada de aguamiel fue de 4 L/día, lo que coincide con lo reportado por Ortiz-Basurto (2008).

#### 7.1.1. Estabilización de muestras de aguamiel para análisis

Para evitar que el crecimiento microbiano continuara en las muestras de aguamiel empleadas en la caracterización fisicoquímica (segunda recolección), se empleó azida de sodio como agente antimicrobiano, éste se adicionó en el sitio de recolección a una concentración de 0.02% p/v, de acuerdo a lo reportado por Ortíz y col. (2008). Esta concentración no fue suficiente para mantener controlada la actividad microbiana en el aguamiel, ya que se observó crecimiento en caja Petri en al menos 2 de los 3 medios sólidos empleados (LB, MRS y R5) en las muestras tomadas de las 3 plantas. Por esta razón, se aumentó la concentración de azida de sodio a 0.04% p/v en todas las muestras,

se confirmó por plaqueo en los medios sólidos LB, MRS y R5, que ésta concentración fue suficiente para evitar el crecimiento microbiano en muestras de aguamiel. De acuerdo a Hartman y col. (2008), una concentración de azida de sodio entre 0.02 y 0.04% suele ser suficiente para actuar como agente bactericida.

### 7.1.2. Evolución de pH del aguamiel durante su acumulación en la planta

La acidificación del aguamiel puede deberse a la presencia de ácidos láctico y acético, lo que se relaciona con actividad microbiana presente en el cajete de la planta, por lo que la evolución de pH puede ser indicativo de actividad microbiana. Por esta razón, se monitoreó la evolución del pH del aguamiel de las tres especies muestreadas, a diferentes tiempos de acumulación (Tabla 7).

**Tabla 7. Valores de pH en muestras de aguamiel a diferentes tiempos de acumulación en la planta**

Especie	Acumulación (h)	pH en sitio
<i>Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck</i>	2	8
	5	8
	12	6
<i>Agave aff. americana L</i>	2	8
	5	8
	12	5
<i>Agave americana L.</i>	2	8
	5	7
	12	5

El valor de pH de 8 observado en las tres plantas a las 2 horas de acumulación fue mayor al reportado en la literatura para muestras de aguamiel (Tabla 3), lo que puede ser debido a que usualmente el aguamiel se colecta a las 12 horas de acumulación en planta y para ese momento ya se han sufrido modificaciones debido a actividad microbiana. No existen reportes del valor del pH al inicio del proceso de acumulación. Se observó que el

valor de pH permanece prácticamente sin cambios durante las primeras 5 h, lo que puede indicar que la actividad microbiana es menor al principio de la acumulación. El pH, entre 6 y 5, registrado a las 12h, se encuentra en el rango reportado por Sánchez y Hope (1953), Escalante y col. (2008) y Ortiz y col. (2008).

### 7.1.3. Evolución de carbohidratos presentes en aguamiel durante su acumulación en la planta

Se determinó la presencia de azúcares simples y FOS en aguamiel a diferentes tiempos de acumulación, para evaluar su transformación entre el tiempo que comienza a fluir el aguamiel en la planta y su recolección. En la Figura 9 se muestra un análisis cualitativo por cromatografía en capa fina (TLC).

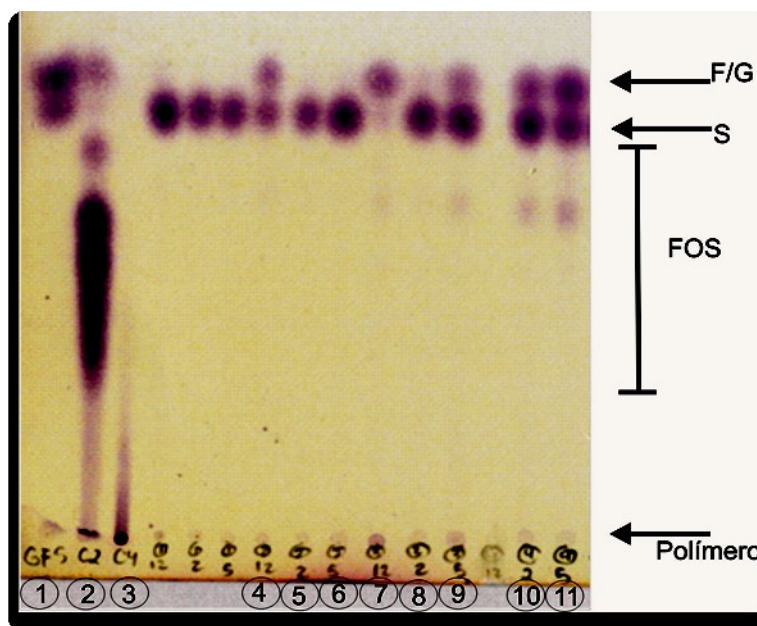


Figura 9. Cromatografía en capa fina de azúcares en muestras recolectadas de aguamiel a diferentes tiempos de acumulación. 1) Estándar de Glucosa, fructosa, sacarosa. 2) Estándar de Oligofructosa P95 Orafti (GP 3-8). 3) Estándar de Inulina HP Orafti (GP 23-60). 4,5,6) Aguamiel de *A. salmiana Otto ex Salm Dyck* 12, 2, 5 h. 7,8,9) Aguamiel de *A. aff americana L.* 12, 2,5 h. 10, 11) Aguamiel de *A. americana L.* 2 y 5 h

Estos resultados confirmaron la presencia de sacarosa en las muestras de las tres especies, la presencia de monosacáridos se observa en todas las muestras, excepto para aguamiel de *A. salmiana Otto ex Salm Dyck* a 2 y 5 h. Por ésta metodología sólo se observa la presencia de FOS en las muestras de las plantas *A. aff. Americana* y *A. americana L.* En ningún caso se observó la presencia de polímero. En Tabla 8 se muestra la cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa mediante HPLC, donde se puede constatar que el contenido inicial de sacarosa (2 h) en el aguamiel de las tres plantas se encuentra entre 42 y 58 g/L. Las concentraciones de glucosa y fructosa se encuentran entre 1.5 y 10 g/L. Existe una diferencia significativa en el contenido de los tres azúcares analizados entre las muestras de aguamiel recolectadas de *A. americana L.* respecto a las otras dos especies.

**Tabla 8. Concentración de fructosa, glucosa y sacarosa en muestras de aguamiel a diferentes tiempos de acumulación en la planta, determinada por HPLC**

Tiempo (h)	Fructosa (g/L)	Glucosa (g/L)	Sacarosa (g/L)
<b><i>A. salmiana Otto ex Salm-Dyck</i></b>			
2 h	1.57 ±0.77	1.69 ± 0.37	41.84 ± 4.53
5 h	1.28 ± 0.54	1.43 ± 0.22	43.58 ± 2.25
12 h	4.81 ±0.18	2.81 ± 0.09	23.09 ±0.54
<b><i>A. aff americana L</i></b>			
2 h	1.73 ±0.58	2.07 ± 0.27	47.16 ± 2.83
5 h	7.13 ±0.79	6.60 ± 0.35	31.55 ± 1.77
12 h	11.49 ±0.85	8.60 ± 0.25	4.44 ± 0.80
<b><i>A. americana L.</i></b>			
2 h	10.24 ± 2.66	5.90 ± 2.75	57.65 ± 6.41
5 h	17.24 ± 5.49	14.54 ± 4.45	43.22 ± 9.98
12 h	21.93 ± 1.78	13.43 ± 1.07	9.13 ± 0.54

Conforme avanza el tiempo de acumulación (12 h) se observó un consumo de sacarosa, que va del 45% en el caso del *A. salmiana Otto ex salm Dyck* al 90% para *A. aff americana L.* Dado que existe un aumento de los azúcares reductores en todas las muestras, el consumo de sacarosa y liberación de azúcares reductores puede explicarse

---

tanto por actividad enzimática de la planta como por actividad por parte del consorcio microbiano presente. Ortíz y col. reportaron en el 2008 la presencia de inulinasas e invertasas en muestras de aguamiel sin poder adjudicar su origen a la actividad de la planta o a actividad microbiana.

Los valores de fructosa, glucosa y sacarosa reportados en aguamiel son heterogéneos y varían dependiendo de la especie y región de cultivo (Tabla 3). A pesar de que las 3 plantas se encontraban en las mismas condiciones geográficas y ambientales, el aguamiel de *A. americana* L. fue el de mayor contenido de azúcares fermentables de las plantas evaluadas, sin embargo ésta concentración de sacarosa es menor a la concentración de 73.9 g/L (410.16 mM de hexosa) reportada por Escalante y col. (2008) para aguamiel recolectado en la misma zona (Huitzilac, Morelos).

En el análisis cromatográfico de las muestras de aguamiel recolectadas, se observó un compuesto, adicional a la fructosa, glucosa y sacarosa, mostrado en la

Figura 10. Es probable que se trate de un producto de fermentación o hidrólisis, ya que la concentración de este compuesto aumenta con el tiempo de acumulación. Si bien este compuesto no fue cuantificado, tiene un tiempo de retención por cromatografía que coincide con un estándar de manitol (6.5 minutos). El manitol se encuentra reportado como producto de fermentación en cultivos con *L. citreum* por actividad de una manitol deshidrogenasa (Ortíz y col., 2004).



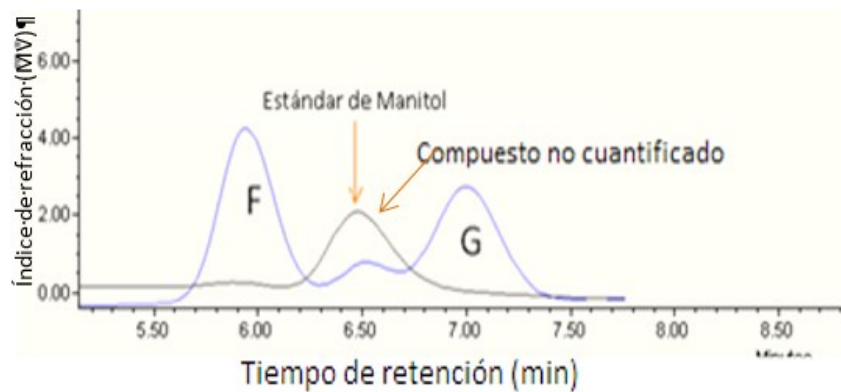


Figura 10. Cromatograma por HPLC de azúcares reductores de aguamiel de *A. americana* L. 12 h de acumulación, en el que se observa un compuesto no cuantificado, además de fructosa (F) y glucosa (G).

Una vez determinada la concentración de fructosa, glucosa y sacarosa por HPLC, se realizó la hidrólisis completa por tratamiento enzimático de las muestras de aguamiel, con el fin de cuantificar el contenido de FOS.

La concentración de FOS determinada incluye la glucosa incorporada, cantidad que usualmente se desprecia en polímeros de alto peso molecular, cuya composición mayoritaria son residuos fructosilo y la concentración de glucosas terminales es mínima. En el caso de los FOS con GP bajos (3-6), la glucosa incorporada puede ser relevante, ya que, entre menor sea el GP de los FOS presentes, mayor será la cantidad total de residuos glucosilos terminales incorporados.

Cabe mencionar que el analito que coincide con el tiempo de retención del manitol, mostrado en la

Figura 10, no sufre alteraciones con el proceso de hidrólisis enzimática. La concentración de FOS, se muestra conjuntamente con las concentraciones de glucosa, fructosa y sacarosa en la Figura. 11 para diferentes tiempos de acumulación en la planta.

En la Figura. 11, se observó que el aguamiel producido por el agave pulquero conocido comúnmente como “blanco legítimo” (*A. americana L.*) es el que presenta mayor concentración de FOS, y en general de azúcares totales, comparado con las otras dos especies muestreadas.

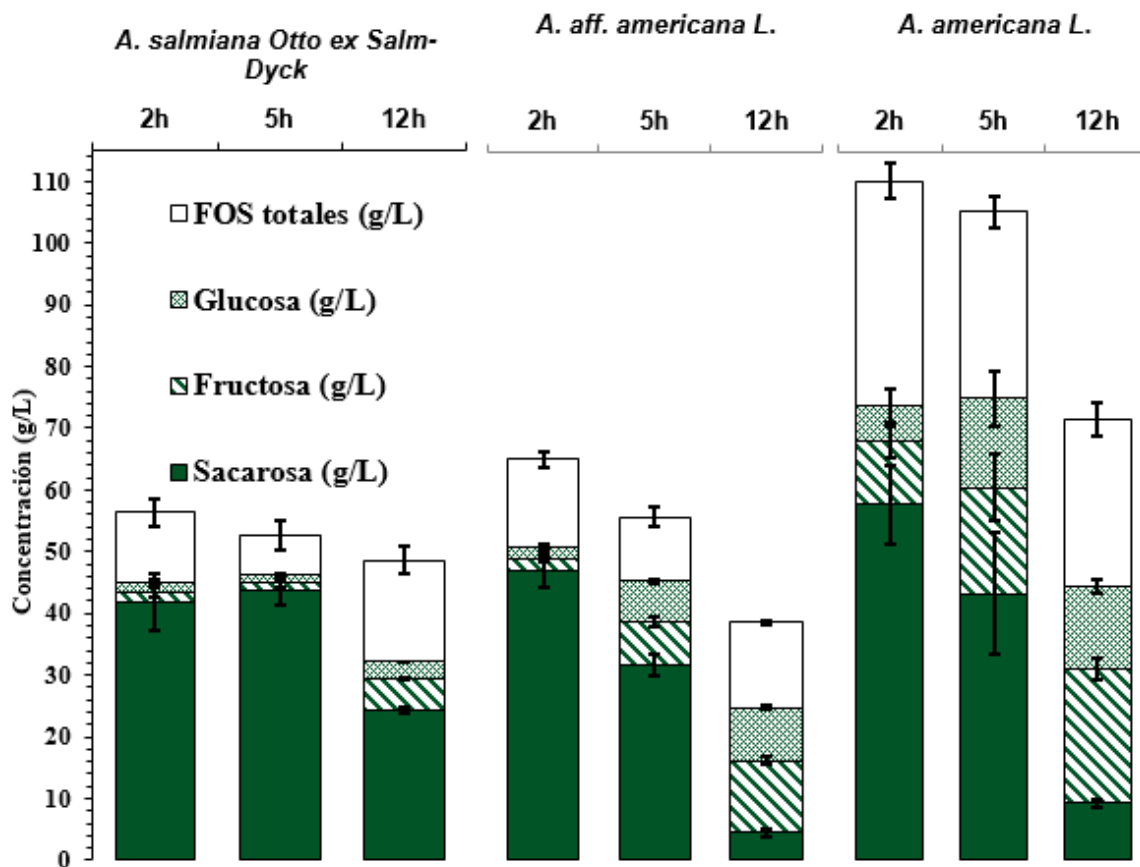


Figura. 11. Contenido de fructosa, glucosa, sacarosa y FOS a diferentes tiempos de acumulación de aguamiel en 3 especies de agave pulquero.

La concentración de FOS no sufrió cambios drásticos durante la acumulación, es decir que la concentración de FOS del aguamiel permanece aparentemente constante durante su acumulación en la planta. En las plantas de agave, las fructanas se encuentran en forma de productos de una amplia distribución pesos moleculares (Arrizon y col.,

2010; López y col., 2003; Mancilla y López, 2006; Mellado y López, 2012). Estas fructanas sufren transformaciones enzimáticas durante el proceso de producción de aguamiel y/o acumulación en la planta, dando como origen fructanas con un GP entre 3-5 (Bhatia y Nandra, 1979). En la TLC realizada en muestras de aguamiel (Figura 9), se observó la presencia de monosacáridos, disacáridos y FOS. Se determinó el perfil de carbohidratos presentes en el aguamiel de una manera más fina, por la técnica de HPAEC-PAD (Figura 12). Se compararon las muestras de aguamiel con un estándar de monosacáridos y FOS con un GP de 3 a 5. En el aguamiel de las tres especies de agave pulquero muestreadas, el GP observado se encuentra entre 3 y 5, la mayoría de señales se observaron alrededor de un GP 3. En ningún caso se observaron componentes que eluyan después de los 10 min, lo que confirma la ausencia de polímero. El GP encontrado en las muestras y la ausencia de polímero coincide con lo reportado por Ortiz y col. (2008)

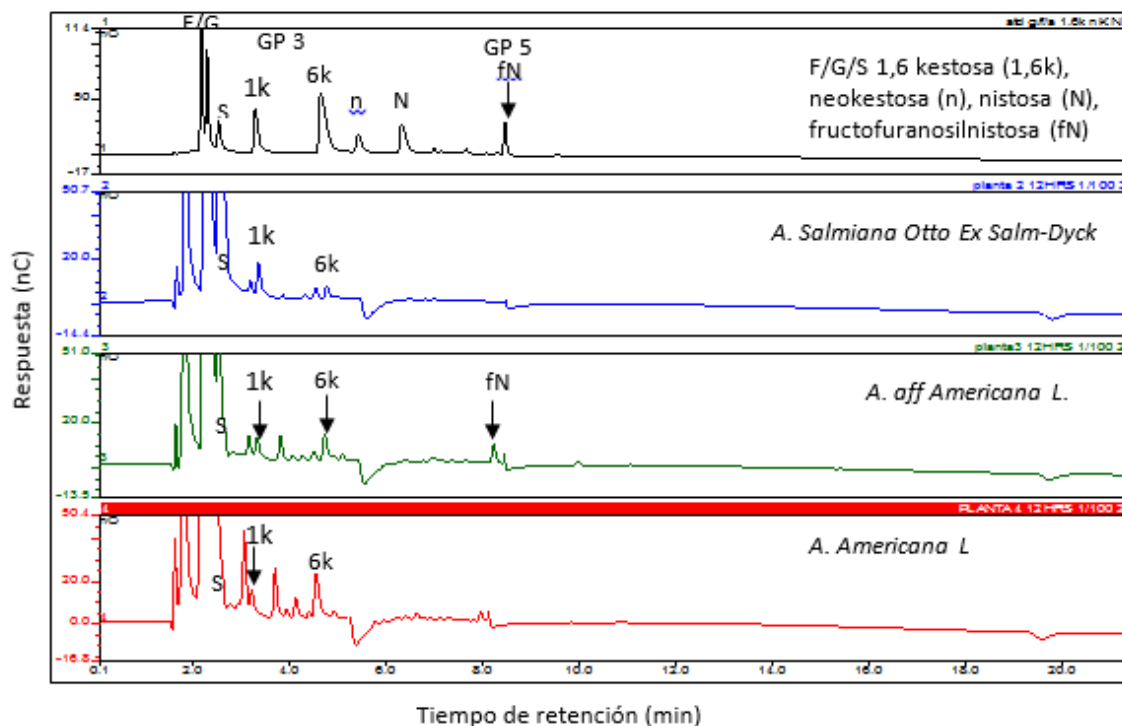


Figura 12. Perfil de carbohidratos analizados por HPAEC-PAD en muestras de aguamiel a 12 h de raspado de tres especies de plantas de agave pulquero.

---

#### **7.1.4. Análisis cualitativo y cuantitativo de productos de fermentación en aguamiel durante su acumulación.**

La acidificación y consumo de sacarosa en el aguamiel durante su acumulación en la planta, es indicativo de un proceso de fermentación. Por esto, se decidió analizar la presencia de ácidos orgánicos y etanol por HPLC (Figura 13), que son productos comunes de fermentación en bacterias ácido lácticas y levaduras, las cuales se reportan como parte mayoritaria del consorcio microbiano presente en aguamiel (Escalante y col., 2004; Escalante y col., 2008). Se observó la presencia de ácido láctico, ácido acético y etanol en todas las muestras de aguamiel muestreadas. A las 12 h de acumulación, además de estos productos de fermentación, se observó la presencia de ácido propiónico, sin embargo, la concentración de éste ácido se encontró por debajo del límite de cuantificación por HPLC. En la Figura 13 se muestra la evolución de las concentraciones de ácido láctico, ácido acético y etanol con respecto al tiempo de acumulación de las 3 especies de plantas.

El aguamiel presentó desde las 2 h de acumulación, concentraciones de etanol, ácido láctico y acético (Figura 13). Confirmando que, a pesar de los esfuerzos por tomar muestras “frescas”, se llevan a cabo de manera espontánea modificaciones en el aguamiel desde que este empieza a fluir en el cajete de la planta.

Se observó que aunque las plantas de las tres especies se encontraban en la misma área geográfica, condiciones ambientales, y tiempo de capado, las concentraciones de productos de fermentación alcanzadas a las 12 h de acumulación de aguamiel son variadas, posiblemente debido a la composición específica de los consorcios microbianos presentes en cada planta. De las muestras recolectadas, el aguamiel de *Agave aff. Americana L.* es el que presentó mayor contenido de etanol, con un valor de 7.68 g/L para las 12 h de acumulación. Las concentraciones encontradas de etanol en las tres plantas a todos los tiempos de acumulación fue mayor al reportado por Cervantes y

Pedroza (2007), Escalante y col. (2008) y Sánchez y hope (1953). La concentración de etanol en aguamiel y pulque se relaciona con la presencia de levaduras. Lappe y col. (2008) reportaron cómo la relación de BAL y levaduras se va modificando conforme pasa el tiempo de fermentación de aguamiel a pulque, relacionándose directamente con un aumento en la concentración de etanol y una disminución de azúcares fermentables.

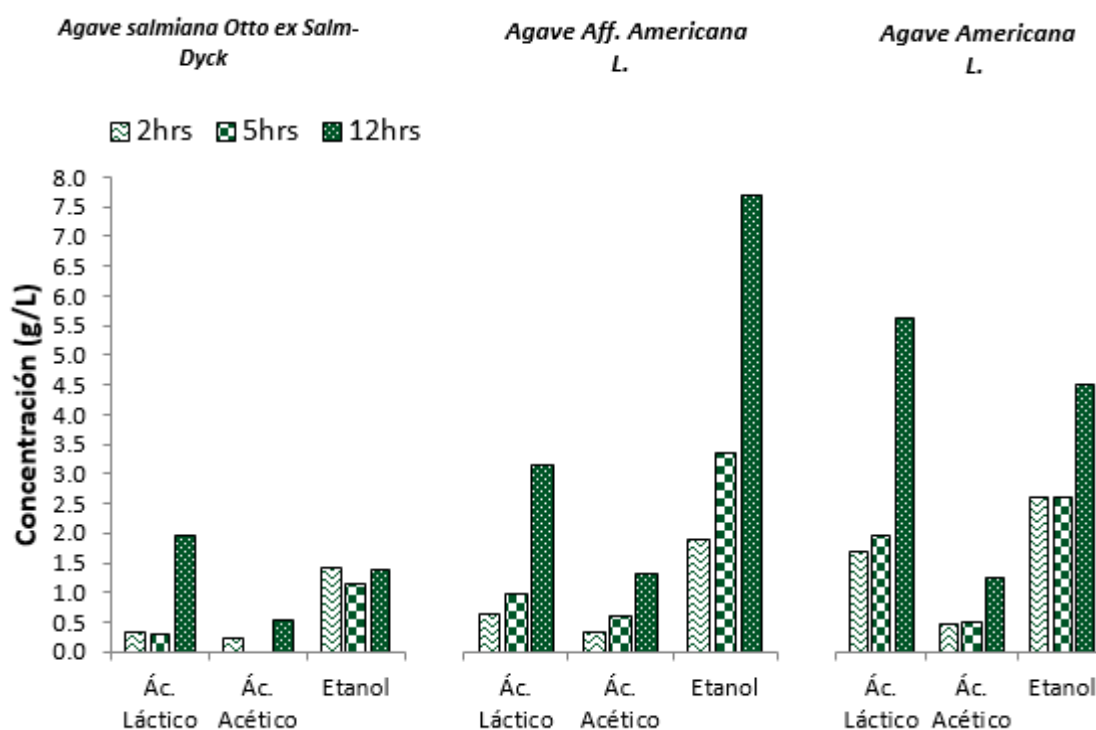


Figura 13. Productos de fermentación cuantificados en muestras de aguamiel recolectadas a 2, 5 y 12 h de acumulación de 3 especies de agave pulquero.

Las concentraciones de ácido láctico cuantificadas a las 2 h de acumulación para *A. salmiana otto ex salm Dyck* y *A. aff. Americana L* (0.35-0.65 g/L), fueron similares al valor de 0.56 g/L reportado por Escalante y col. (2008). El ácido acético cuantificado a las 2 h en las tres especies de agave muestreadas, fue de 0.24 a 0.48 g/L, lo que es cercano al valor de 0.37 g/L reportado por Escalante y col. (2008).

### 7.1.5. Cuantificación de proteína total en aguamiel

Ya que el aguamiel es el medio natural que da lugar a la producción de pulque, es de esperarse que además de fuentes de carbono contenga fuentes de nitrógeno, como proteína, que soporten el crecimiento microbiano, por lo que se determinó la cantidad de proteína total y los cambios en la concentración respecto al tiempo de acumulación de aguamiel en el cajete. Los resultados se muestran en la Figura 14.

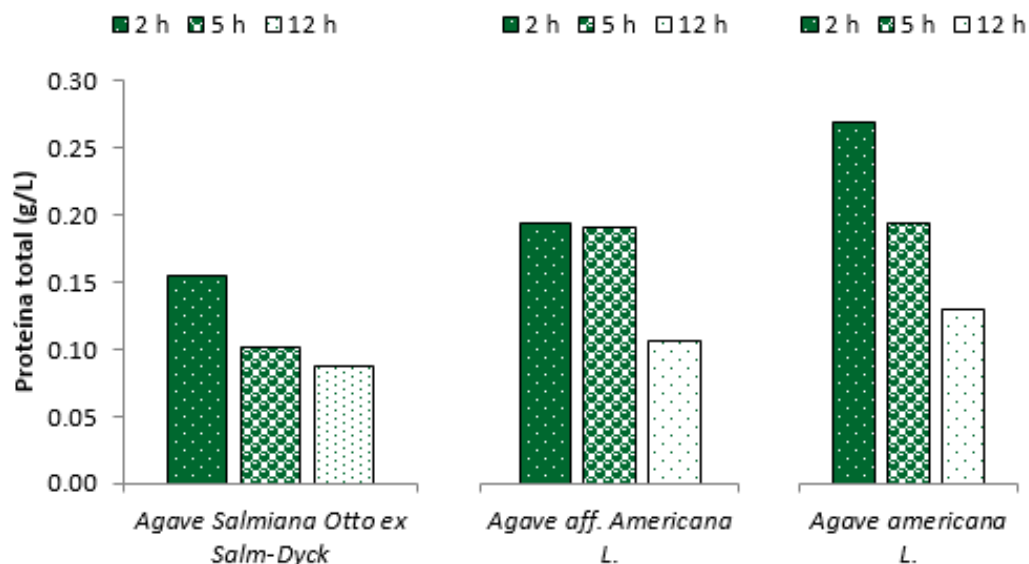


Figura 14. Cuantificación de proteína total en muestras de aguamiel de 3 especies de agave pulquero evaluadas a 2, 5 y 12 h de acumulación en la planta.

En las tres plantas se observó la disminución de proteína total, conforme avanza el tiempo de acumulación (Figura 14). Lo anterior puede ser resultado del crecimiento microbiano presente que incluye varias especies de bacterias y levaduras (Cervantes y Pedroza, 2007; Escalante y col., 2008, Lappe y col., 2008; Sánchez y Hope, 1953), o también puede ser indicativo de que la proteína no fluye de manera constante durante el tiempo de acumulación.

---

Durante las 12h de acumulación de aguamiel en el cajete, se registró la disminución de sacarosa y proteína total, y el aumento de productos de fermentación, atribuibles a actividad microbiana, confirmando que bajo las condiciones actuales de producción, el uso de aguamiel como sustrato de un proceso de fermentación estandarizable, no es viable dada su fermentación espontánea, la baja productividad (4 L/día por planta), derivada del tiempo necesario para su acumulación y recolección, y la variedad de factores ambientales involucrados en su calidad, cantidad y composición. Existe un producto comercial denominado “Aguamiel orgánico” de la empresa Villa de Patos, en la que se logra obtener el aguamiel microbiológicamente estable, sin embargo a escala laboratorio no fue posible lograrlo. Es por esto que se exploraron otras posibilidades para realizar la formulación de la bebida con fructanas obtenidas de la piña de agave, también disponible comercialmente.

## **7.2. Caracterización de carbohidratos presentes en agavina comercial**

Aunque el aguamiel es un atractivo medio para la formulación de un proceso fermentativo, la inestabilidad inherente al proceso de obtención limita su aplicación. En este sentido, el uso directo de los azúcares del agave, extraídos industrialmente, resulta atractivo considerando que su extracción es inmediata y en principio podrían emplearse sin la modificación que sucede en el proceso de acumulación del aguamiel. Una vez extraídos son sometidos a procesos de secado, por lo que son estables y poco susceptibles de contaminación, además de que se encuentran disponibles comercialmente. Debido a sus características, los azúcares de agave tienen uso potencial como elemento prebiótico (Urías y col., 2008; Márquez y col., 2013) y pueden ser incluidos en una formulación alimenticia. Se realizó el análisis de los principales componentes presentes en inulina de agave (agavina), comercializada por la empresa Agaviótica, S.A de CV como ingrediente para la industria alimentaria. El análisis se realizó por triplicado de dos lotes comerciales.

---

Considerando que la agavina, es el componente prebiótico a emplearse en la formulación para obtener la bebida propuesta, se realizaron determinaciones de humedad, solubilidad, concentración y perfil de carbohidratos y proteína total presentes.

Se midió la humedad por secado a peso constante, presente en muestras de agavina comercial, obteniéndose 0.0667 g de agua/g muestra, lo que equivale a un 6.67% de humedad en la muestra, este resultado se encuentra en el rango de humedad reportado por la empresa Agaviótica S.A de C.V de  $5 \pm 2 \%$  (Anexo 10.2).

Se determinó la solubilidad a 30 C. Se encontró que la agavina es suficientemente soluble para emplearla en concentraciones de hasta 200 g/L.

#### **7.2.1. Determinación de azúcares fermentables en agavina comercial.**

De acuerdo a lo reportado por López y col. (2003), Mancilla y López (2006) y Mellado y López (2012), las agavinas de diferentes especies de agave, se conforman de fructanas con GP entre 3-30. La distribución de GP en agavinas es mayor que la presente en muestras de aguamiel, donde solo se detectaron monosacáridos, disacáridos y FOS con un rango de GP entre 3-5 (Figura 12). Se analizaron cualitativamente los azúcares presentes en agavina comercial mediante TLC (

Figura 15), donde se constata la presencia de fructosa, glucosa, sacarosa y fructanas de diversos GP incluyendo polímero de inulina. Se observó que el componente mayoritario son fructanas con un GP mayor a 8 y un bajo contenido de monosacáridos. Se determinó con el uso de HPLC, la concentración de fructosa, glucosa, sacarosa (Tabla 9) y el contenido de fructanas por hidrólisis completa presente en dos lotes de agavina comercial analizados por triplicado.



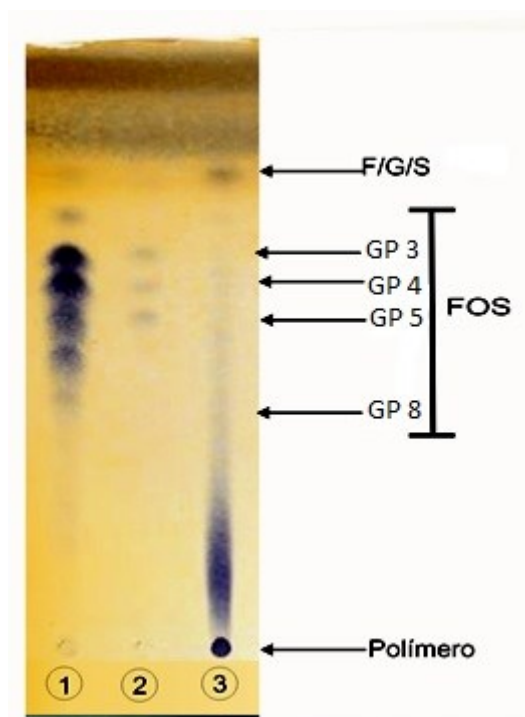


Figura 15. Placa obtenida por TLC de agavina comercial. 1) Estándar comercial de Oligofructosa P95 Orafti (GP 3-8). 2) Mezcla oligosacáridos (GP 3-5). 3) Agavina comercial.

**Tabla 9. Contenido de azúcares promedio de dos lotes de agavina comercial (HPLC)**

	Fructosa g/g	Glucosa g/g	Sacarosa g/g
<b>Agavina (Agaviotica SA de CV)</b>	0.0228 ± 0.008	0.0045 ± 0.003	0.0090 ± 0.005

El contenido de mono y disacáridos fue muy bajo, lo que coincide con lo observado por TLC. Aunque las concentraciones de mono y disacáridos reportados en extractos de agave son muy variables, en general, para plantas con una edad entre 7 y 10 años se reportan contenidos de éstos azúcares de alrededor de 2% (Mellado y López, 2012). De estos tres azúcares, el más relevante para la formulación de la bebida es la sacarosa, ya que es indispensable para que *L. citreum*, produzca inulina.

---

### 7.2.2. Determinación indirecta de fructanas en agavina comercial.

En la TLC realizada con agavina comercial (Figura 15), se observó la presencia tanto de FOS como de polímero, por lo que en la cuantificación se incluyeron a los azúcares de ambos grupos en el término fructanas.

Una vez determinada la concentración inicial de fructosa, glucosa y sacarosa, se llevó a cabo la hidrólisis completa a fructosa y glucosa mediante hidrólisis enzimática. La cantidad promedio de fructanas cuantificada fue de  $0.88 \pm 0.1$  g/g de muestra.

La cantidad de fructosa total después de hidrólisis completa de la muestra (0.88 g/g), es 20 veces mayor a la cantidad de glucosa total (0.044g/g), lo que resulta consistente con el hecho de que se trata de estructuras compuestas principalmente por moléculas de fructosa. Se determinó el perfil de carbohidratos por HPAEC-PAD (Figura 16), comparando la agavina comercial con un estándar de FOS con GP de 3-5 y estándar comercial con GP menor a 10. En la Figura 17, se compara la muestra con un estándar comercial de inulina de alto peso molecular obtenida de raíces de achicoria. Se identificó la presencia de 1kestosa, neokestosa, nistosa y fructofuranosilnistosa en la muestra de agavina comercial. Estos FOS son comúnmente reportados en azúcares extraídos de plantas de agave de diferentes especies y edades (López y col., 2003; Mancilla y López, 2006; Arrizon y col., 2010; Mellado y López, 2012). Se evaluó la distribución y el máximo GP en muestras de agavina comparándola con un estándar de Inulina HP de la marca Orafiti® (GP aproximado de 23-60), encontrándose un GP aproximado de 2 a 30. El GP promedio aparente calculado con la Ecuación 6, fue de 25. Este valor es indicativo de que la mayor concentración de residuos fructosilo se encuentra en las estructuras de mayor GP que corresponden a polímero. El GP determinado en agavina comercial es consistente con lo reportado por Mancilla y López (2006) y Mellado y López (2012).

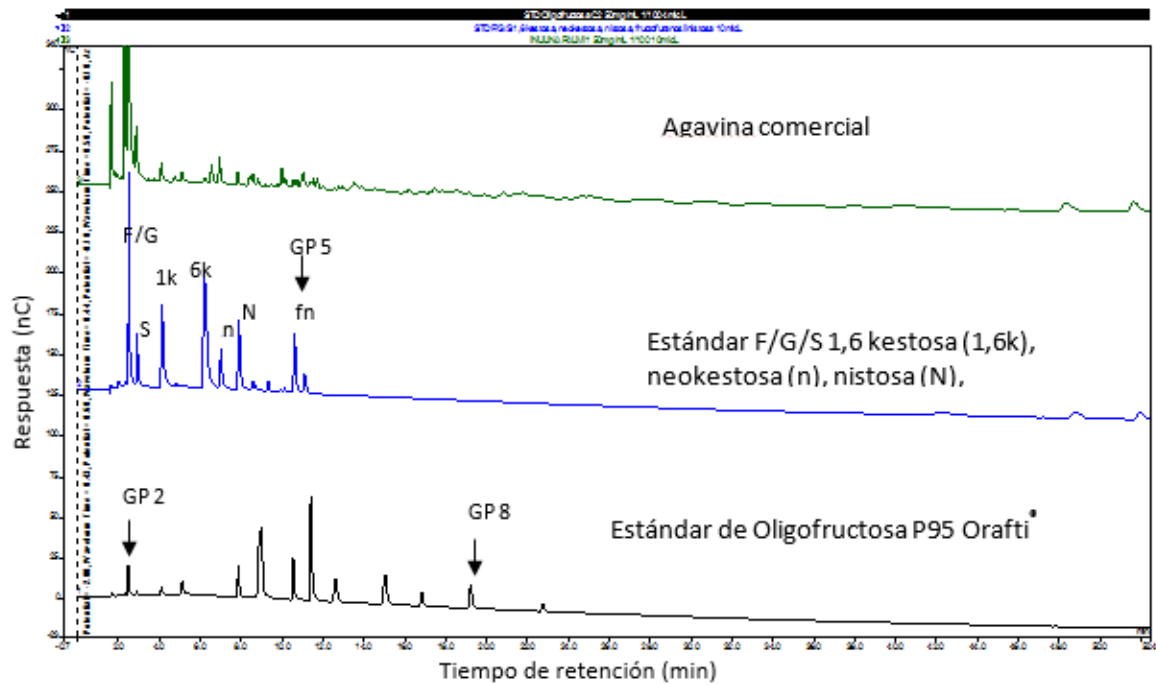


Figura 16. Perfiles por HPAEC-PAD en muestras de agavina vs estándar de monosacáridos y FOS

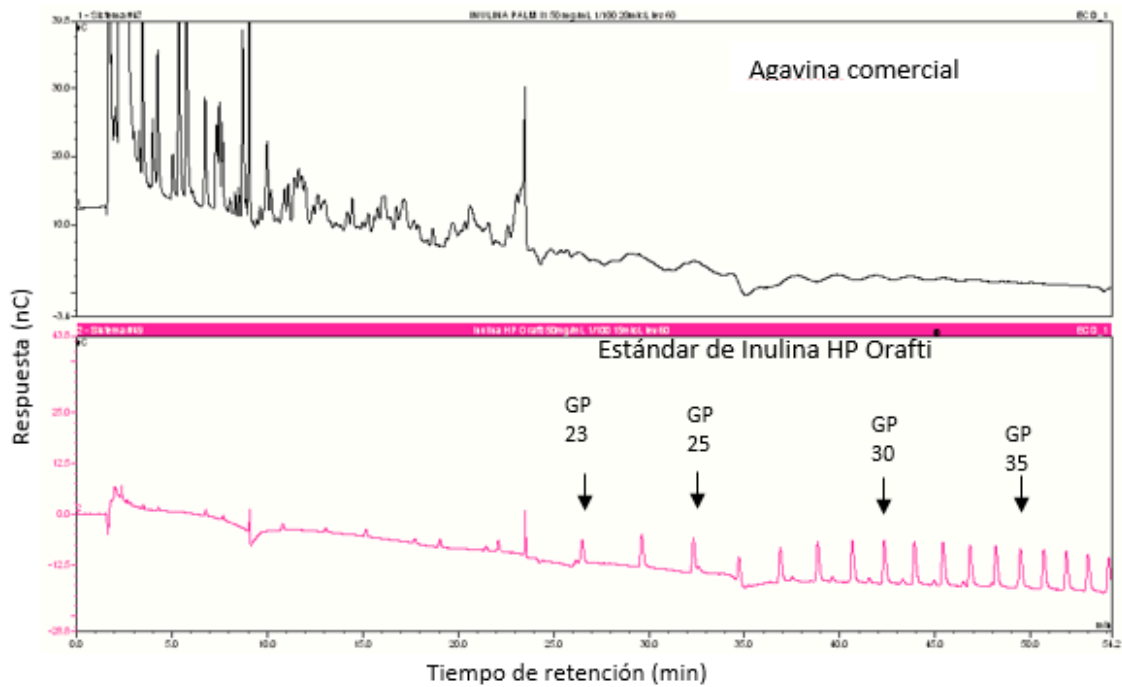


Figura 17. Determinación de GP de agavina comercial por HPAEC-PAD mediante comparación con estándar de inulina de achicoria de alto peso molecular

---

También se comparó el perfil de agavina comercial con el perfil de agavina de *Agave tequilana* weber extraída con agua caliente a 70°C por 2 h y secada por aspersión obtenida en el laboratorio de tecnología enzimática del IBT-UNAM por A. Fernández y N. Galicia en el 2010 (Figura 18). Se observó que los perfiles de carbohidratos de ambas muestras coinciden.

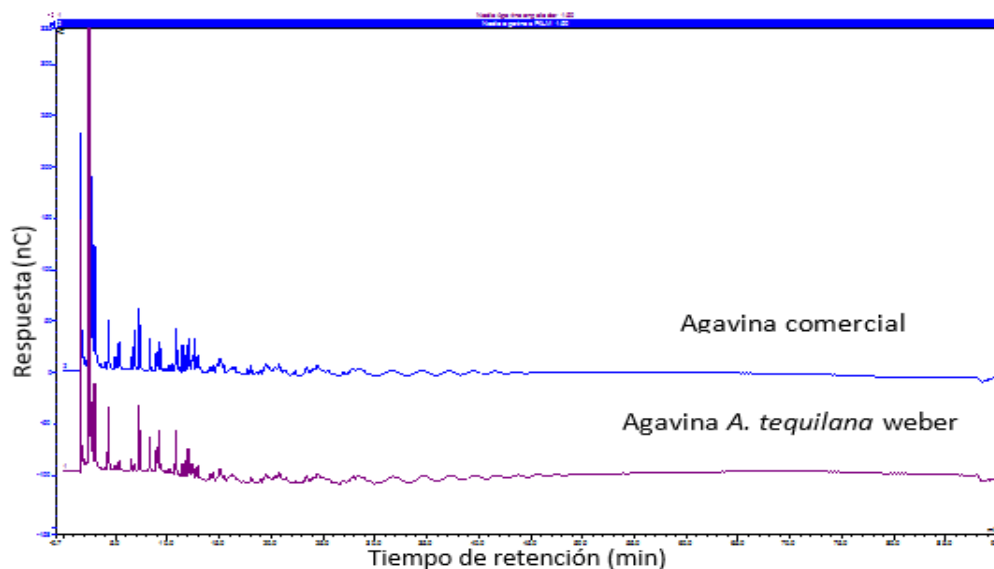


Figura 18. Comparación de perfil de azúcares observados en agavina comercial y *A. tequilana* weber.

Además de los azúcares presentes, se determinó el contenido de proteína total en las muestras agavina comercial, para evaluar el aporte de esta materia prima como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo para la fermentación. Se determinó que el producto contiene 0.03% p/p de proteína total.

En la Figura 19 se presenta un resumen de los principales elementos que componen las muestras de agavina comercial. La concentración total de azúcares (fructosa, glucosa, sacarosa, FOS y polímero) representa el 92% de la composición total de la muestra, de las cuales la mayoría son fructanas (FOS + polímero). La composición mostrada coincide con lo reportado por la empresa Agaviótica S.A de C.V. (Anexo 10.2).

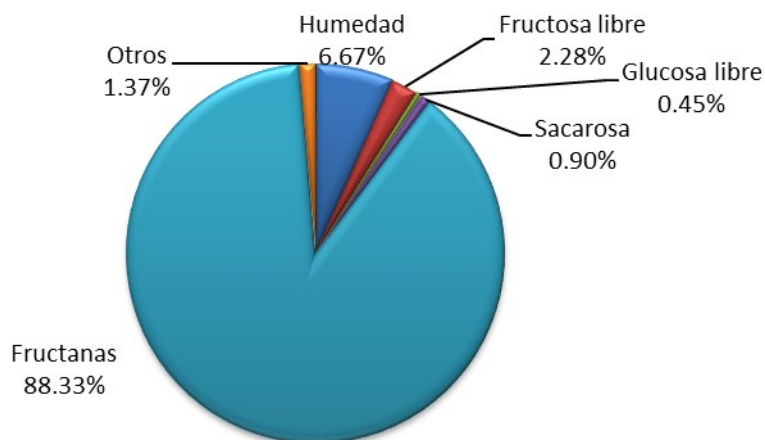


Figura 19. Composición promedio de dos lotes de agavina comercial analizados por triplicado.

### 7.3. Fermentación de *Leuconostoc citreum* CW28.

El objetivo de este proyecto es obtener una bebida fermentada pre y probiótica, empleando agavinas y sacarosa como parte de un medio de fermentación con la BAL *L. citreum*. El elemento prebiótico lo aportan las agavinas incluidas en el medio de cultivo y el polímero de inulina producida por la actividad inulosacarasa de *L. citreum* CW28 en presencia de sacarosa. El elemento potencialmente probiótico es el propio microorganismo.

Las densidades poblacionales de BAL en productos fermentados reportadas en la literatura, así como las señaladas en productos comerciales con probióticos, se encuentran entre  $10^6$  y  $10^{12}$  UFC/mL (Anteneh y col., 2011; Kekkonen y col., 2008; Sungsoo y Terry, 2010). Para este desarrollo se consideró deseable alcanzar una densidad poblacional del microorganismo por arriba de  $10^8$  UFC/mL.

---

Ya que el objetivo es obtener una bebida para consumo humano a partir de la fermentación de *L. citreum*, las concentraciones de los componentes de medios de cultivo, como sales, deben encontrarse en concentraciones mínimas, ya que pueden impactar negativamente las propiedades organolépticas del producto. Previo a el desarrollo de un medio mínimo para la fermentación de *L. citreum*, se tomó como referencia el comportamiento del microorganismo sin restricciones en medio *Leuconostoc* (medio Lm).

### **7.3.1. Crecimiento de *L. citreum* CW28 en medio Lm.**

Como referencia, se caracterizó la cinética de crecimiento, consumo de sustrato y producción de polímero en medio Lm (Tabla 4), empleado para la producción y caracterización de la enzima inulosacarasa de *L. citreum* (Ortíz, 2004).

Primeramente se llevó a cabo un cultivo de activación, que se empleó como inóculo para la fermentación. En la Figura 20 se muestra la evolución de la concentración de células de *L.citreum* en medio Lm expresada en DO y cuentas viables (Log UFC/mL).

En la Figura 21 se muestra la cinética de crecimiento, consumo de sustrato y producción de inulina de alto peso molecular en la fermentación de *L. citreum* CW28 a 30°C, 200 rpm y pH 6.9 en medio Lm. Se observó que la fuente de carbono (sacarosa), se agota completamente desde las 5 horas de fermentación, iniciando la fase estacionaria. La glucosa liberada al medio como resultado de la actividad inulosacarasa, también fue consumida.

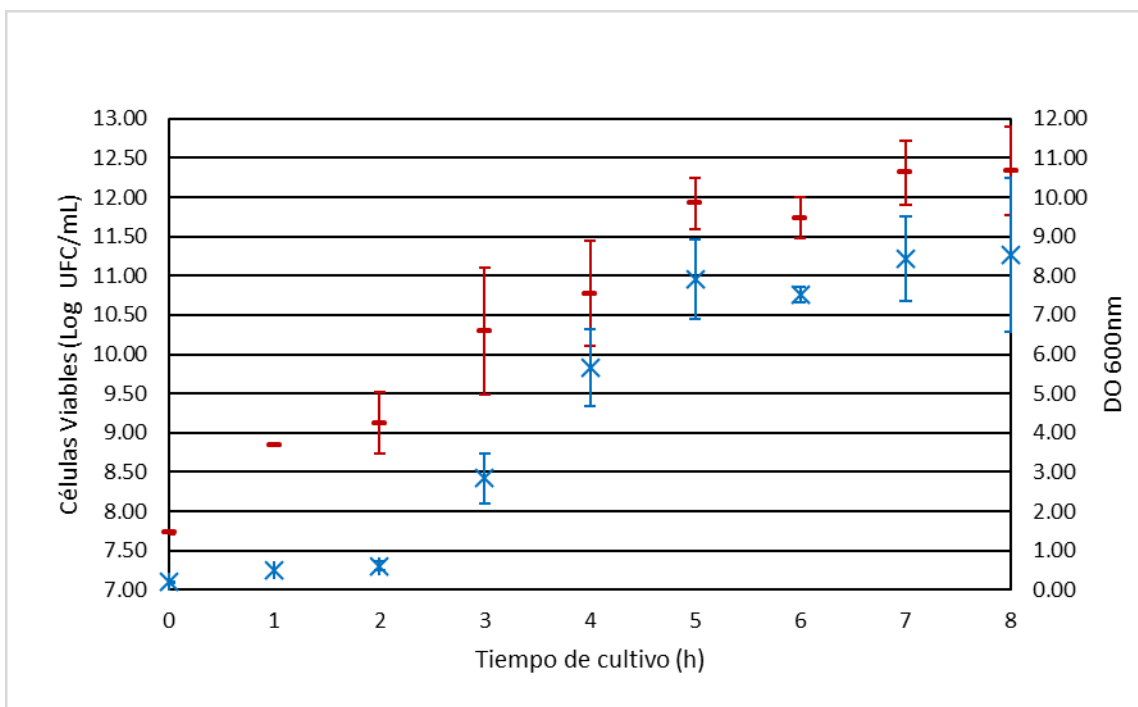


Figura 20. Curva de crecimiento de *L. citreum* CW28 en el cultivo de activación en medio Lm a 30°C y 200 rpm (- Log UFC/mL, \*DO).

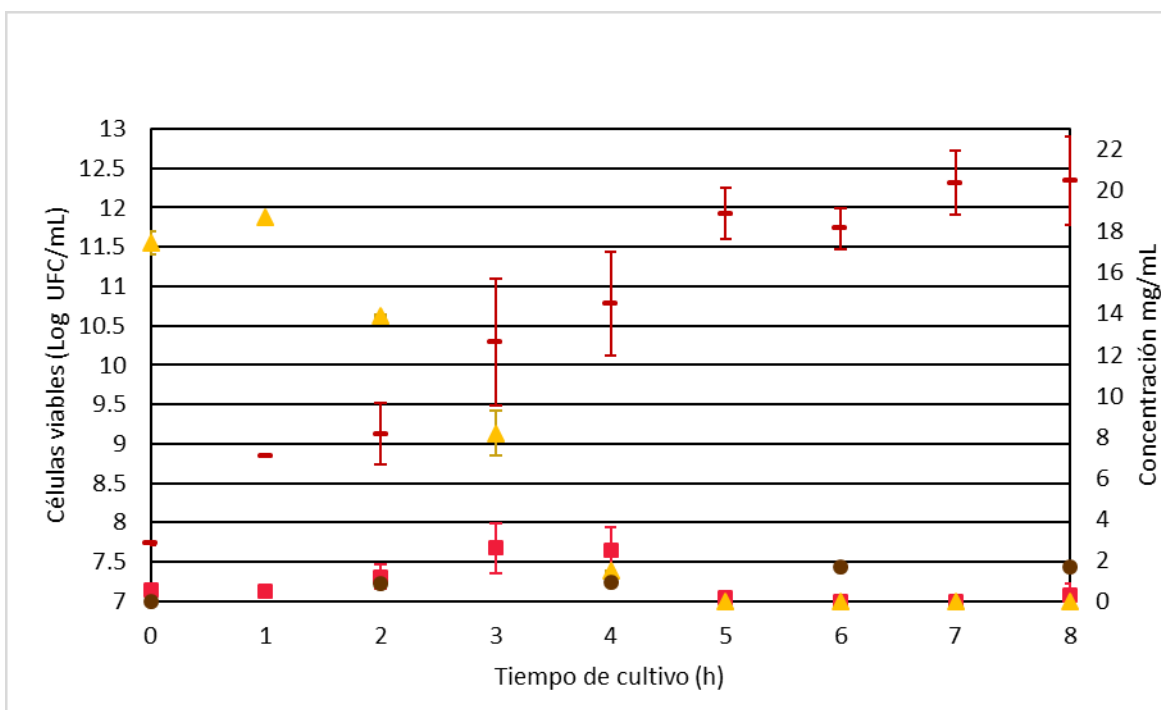


Figura 21. Cinética de crecimiento y producción de inulina en la fermentación de *L. citreum* CW28 en medio Lm a 30°C y 200 rpm (- Log UFC/mL, ■ glucosa, ▲ sacarosa, ● inulina).

---

La concentración inicial de células en el cultivo fue de  $5.4 \times 10^7$  UFC/mL, al término de la fermentación se alcanzaron  $3 \times 10^{12}$  UFC/mL. La cantidad de células generada se calculó con la

Ecuación 7 (ver Apéndice 11.1) y fue de 4 g células/L, mientras que la concentración de polímero determinada por HPLC, fue de 1.64 g/L, siendo la biomasa, el producto mayoritario de la fermentación. El pH del medio disminuyó de 6.9 a 5.03, lo que indica la producción de ácidos orgánicos (no cuantificados).

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) obtenida en medio Lm, fue de  $0.09\text{h}^{-1}$ , con una  $\mu_{\text{max}}$  de 0.47. La actividad enzimática total (hidrólisis + transferencia) determinada en medio Lm fue de 0.94 U/mL. Este valor es similar a la actividad de 0.89 U/mL, reportada por Ortíz en el 2004.

El microorganismo en medio Lm es capaz de crecer en concentraciones suficientes ( $10^{12}$  UFC/mL), tomando como referencia el rango establecido de células viables para este tipo de productos. Los metabolitos resultado de la fermentación incluyen ácidos orgánicos, que resultan en la acidificación del medio, e inulina de alto peso molecular. Es deseable una mayor producción de inulina, ya que funciona como fibra dietética en una formulación alimenticia.

### **7.3.2. Formulación de medios de cultivo con agavinas.**

Para la composición de medios mínimos se tomó como referencia aspectos básicos definidos por el medio Lm y el aguamiel, como la concentración de sacarosa y la presencia de azúcares de agave. La formulación se realizó incluyendo los siguientes elementos:



---

Inulina de agave (agavina): la agavina empleada en la formulación, es comercializada por la empresa Agaviótica S.A. de C.V. como ingrediente para la industria alimentaria. Se determinó la solubilidad a 30 C, la cual es la temperatura óptima de crecimiento de *L. citreum*. Se encontró que la agavina es suficientemente soluble para emplearla en concentraciones de hasta 200 g/L. Sin embargo, la concentración de agavinas se fijó en 100 g/L de cultivo. De acuerdo a la composición de agavina comercial (Figura 19), 100 g/L de agavina equivale a 8.8 g de fructanas/100 mL. Esta concentración es cercana a la cantidad de carbohidratos no digeribles, considerada como bien aceptada por la mayoría de consumidores de 10 g/porción (Coussement, 1999).

Fuente de carbono: La sacarosa es la fuente de carbono propuesta para soportar el crecimiento deseado del microorganismo y la reacción de transferencia para producir inulina microbiana. El medio de fermentación se complementó con 20 g/L de sacarosa, para obtener una concentración final de aproximadamente  $21 \pm 1$  g/L de sacarosa, considerando la sacarosa presente en 100 g/L de agavinas, la cual es de aproximadamente 1 g/L.

Fuente de nitrógeno: Se limitó la fuente de nitrógeno, en los medios de cultivo formulados como estrategia para limitar el crecimiento del microorganismo y así disminuir la cantidad de sacarosa destinada para la producción de biomasa. Esto incrementaría la sacarosa disponible para la síntesis de inulina de alto peso molecular mediante la reacción enzimática de la inulosacarasa de *L. citreum*. En un cultivo preliminar se empleó únicamente sacarosa (20 g/L) y agavinas (100 g/L), pero no se observó crecimiento alguno, ya que la única fuente de proteína era la que provenía de la agavina comercial adicionada, la cual contiene 0.03 g de proteína total por cada 100g.

Como fuente de nitrógeno para el cultivo, se empleó extracto de levadura (Bacto Yeast Extract de BD nutrients). Se definieron dos condiciones limitantes de nitrógeno para

---

el medio de cultivo, denominadas Agavinas Muy Bajo Nitrógeno (MBN) y Agavinas Bajo Nitrógeno (BN).

La condición MBN se formuló con 0.4 g extracto de levadura/L. La concentración mínima de extracto de levadura se estableció tomando como referencia las concentraciones de proteína total observadas en aguamiel de 0.15 a 0.3 g/L (Figura 14). La concentración de extracto de levadura de la condición BN se formuló con 0.9 g de extracto de levadura/L y se estableció con base en los resultados obtenidos con la condición MBN. La concentración de extracto de levadura en los medios Agavinas MBN y BN, representan respectivamente 1/50 y 1/22 veces la concentración de extracto presente en el medio Lm.

Sales: Las sales empleadas en las formulaciones MBN y BN son las mismas empleadas en el medio Lm, sólo que en menores concentraciones. Se usaron las relaciones 1/50 y 1/22 veces la concentración de sales presentes en medio Lm. las relaciones 1/50 y 1/22 son las mismas empleadas para limitar la proteína en los medios con agavinas.

Amortiguador: Para evitar que el pH del medio disminuya considerablemente durante la fermentación y la inulosacarasa de *L. citreum*, con pH óptimo de 6.5, deje de ser activa, se adicionó buffer de fosfatos pH 6.0 para una concentración final de 150 mM a las formulaciones MBN y BN. El pH del medio obtenido fue de  $6.4 \pm 0.1$ .

Concentración inicial de células: Se evaluaron dos condiciones de concentración inicial de células para la fermentación, denominadas “baja concentración de células” ( $0.8$  a  $3 \times 10^8$  UFC/mL) y “alta concentración de células” ( $0.8$  a  $8 \times 10^9$  UFC/mL).

La composición de las formulaciones resultantes se muestra en la Tabla 10. Los parámetros empleados para evaluar el proceso y la composición del medio más

conveniente para la bebida fermentada fueron: la concentración de células viables (UFC/mL), el consumo de sustrato, la concentración de inulina de alto peso molecular y la acidificación del medio. En la Tabla 12 se muestra un resumen de los resultados obtenidos en las formulaciones MBN y BN.

**Tabla 10. Composición de medios de cultivo Agavinas muy bajo nitrógeno (MBN) y Agavinas bajo nitrógeno (BN)**

	Medio Agavinas MBN	Medio Agavinas BN
Componente	Concentración (g/L)	
Sacarosa	20	20
Agavinas	100	100
Extracto de levadura	<b>0.4</b>	<b>0.9</b>
Fosfato di potásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.4	0.9
Buffer fosfatos 6.0	150mM	150mM
pH del medio	6.4 ± 0.1	6.4 ± 0.1
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0.004	0.009
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O)	0.001	0.002
Sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0.002	0.005
Sulfato de manganeso (MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O)	0.002	0.005
Cloruro de sodio (NaCl)	0.002	0.005

### 7.3.1. Actividad enzimática.

Con el fin de verificar si los cambios realizados en la formulación de los medios impactaba la actividad inulosacarasa de *L. citreum*, se determinó la actividad enzimática (U/mL) en los medios de cultivo evaluados (Lm, Agavinas MBN y BN). Dado que en los medios evaluados se alcanzan diferentes concentraciones celulares al final del cultivo (UFC/mL), y la inulosacarasa se encuentra anclada a la pared celular, se normalizó el valor de actividad enzimática total, dividiendo la actividad obtenida en 1 mL de cultivo (U/mL) entre la concentración de células presentes en 1 log UFC/mL, obteniendo la actividad enzimática expresada como U/Log UFC. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11. Comparación de la actividad enzimática en medio Lm, Agavinas MBN y BN determinada en dos cultivos independientes para cada medio**

	<b>Medio Lm Reportado por Ortiz (2004)</b>	<b>Medio Lm</b>	<b>Agavinas MBN</b>	<b>Agavinas BN</b>
<b>Act. enzimática (U/mL)</b>	0.89	0.94	0.15	0.27
<b>DO</b>	7.00	6.96	2.40	3.31
<b>UFC/mL</b>	6.03E+11	2.018E+12	9.23E+09	9.31E+12
<b>U/log UFC</b>	<b>0.08</b>	<b>0.08</b>	<b>0.02</b>	<b>0.02</b>

En la Tabla 11 se observa que la actividad enzimática total (hidrólisis + transferencia) en medio Lm determinada (0.08 U/Log UFC) reproduce lo reportado por Ortiz (2004), mientras que la actividad enzimática en los medios formulados con agavinas, fue cuatro veces menor que en el medio Lm. No se observó diferencia entre las variantes limitadas en nitrógeno MBN y BN.

Es interesante notar que durante la fermentación en los medios Agavinas MBN y BN se producen concentraciones de 2 y 3 veces mayor a la inulina producida en medio Lm, esto a pesar de que la actividad enzimática en medio Lm es mayor a la determinada en los medios MBN y BN. Esto es indicativo de que la estrategia de limitar el crecimiento, y por tanto el consumo de sacarosa para la generación de biomasa, efectivamente aumentó la disponibilidad de sustrato para la reacción enzimática.

La disminución en la actividad enzimática total en los medios MBN y BN comparada con el valor obtenido en medio Lm, puede deberse a que al disminuir la concentración de extracto de levadura empleado en el medio, también se limitaron factores de crecimiento como vitaminas y sales que pueden ser esenciales para la actividad enzimática. Una estrategia para aumentar la actividad enzimática en los medios con agavinas sería identificar la concentración necesaria de iones para mantener la actividad de 0.08 U/Log

---

UFC, y de esta manera poder lograr el consumo total de la sacarosa, aumentando la producción de inulina y disminuyendo los tiempos de fermentación.

De acuerdo al cálculo de tiempo de reacción (Ecuación 4), con la actividad enzimática volumétrica obtenida en medio Agavinas BN de 0.27 U/mL, se requerirían 46 h de cultivo para consumir el 99% de la sacarosa presente en el medio. Esto sin contar los probables efectos de inhibición por los productos tanto de la reacción, como del metabolismo microbiano. Es por esto que aumentar el tiempo de fermentación no se tomó como estrategia para incrementar el consumo de sacarosa. La fermentación se detuvo al iniciar la fase estacionaria de crecimiento en todos los medios.

### **7.3.2. Fermentación de *L. citreum* en medios de cultivo formulados con agavinas**

#### **Fermentación de *L. citreum* CW28 en medio Agavinas MBN:**

El inóculo empleado para la fermentación se creció de acuerdo a las condiciones definidas en la sección 6.3. Se empleó una concentración inicial de células alrededor de  $10^8$  UFC/mL. La medición de DO se empleó como método indirecto de la concentración celular en el cultivo de activación. Para las fermentaciones evaluadas en medios formulados con agavinas, se cuantificó la concentración celular en UFC/mL, ya que la viabilidad celular es un aspecto clave en un producto probiótico.

Se comparó la cinética de crecimiento en medio Agavinas MBN, con la obtenida en medio Lm (Figura 22). Después de las 7 h de cultivo dejó de observarse cambios en la concentración celular y DO (datos no mostrados).

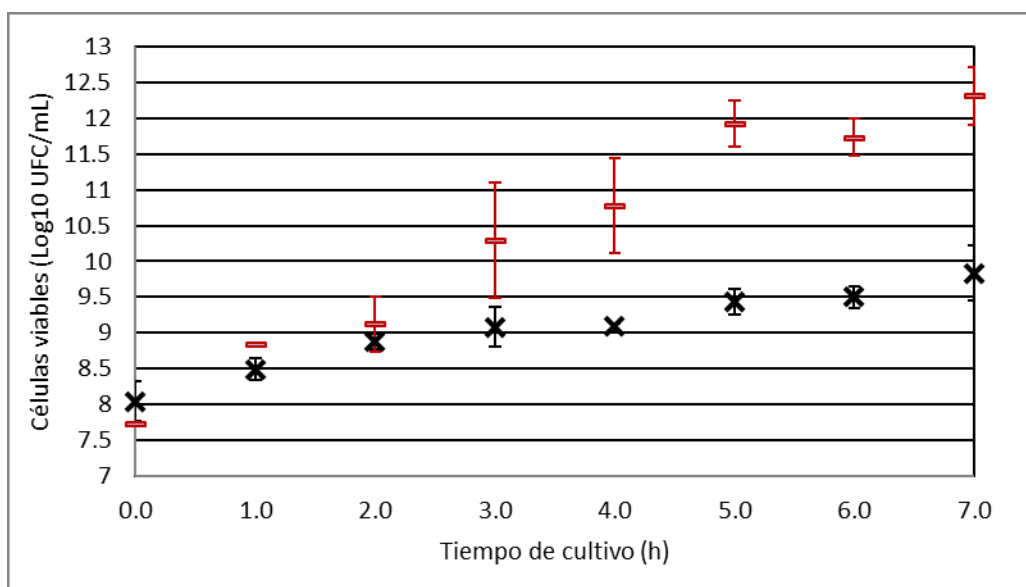


Figura 22. Cinética de crecimiento a 30°C, y 200 rpm de *L. citreum* CW28 en medio Agavinas MBN (x) y medio Lm (-)

Como se observa en la Figura 22, la fermentación en el medio Lm alcanzó valores de  $10^{12}$  UFC/mL, mientras que en el medio Agavinas MBN se llegó a concentraciones de  $10^9$  UFC/mL, lo que equivale a 1.5 mg células/mL (ver Apéndice 11.1). Hasta la segunda hora de cultivo, el comportamiento del crecimiento fue similar en los dos medios de cultivo, pero a partir de la tercera hora, el crecimiento en medio Agavinas MBN se vio limitado en crecimiento, presumiblemente debido a la limitación en la fuente de nitrógeno. El valor alcanzado en medio MBN de  $9 \times 10^9$  UFC/mL se encontró en el rango de cuentas viables establecido para este tipo de productos. También se evaluaron el consumo de sacarosa y la producción de inulina para definir cuál es la mejor opción. La cinética de consumo de sacarosa y producción de inulina de alto peso molecular se muestra en la Figura 23.

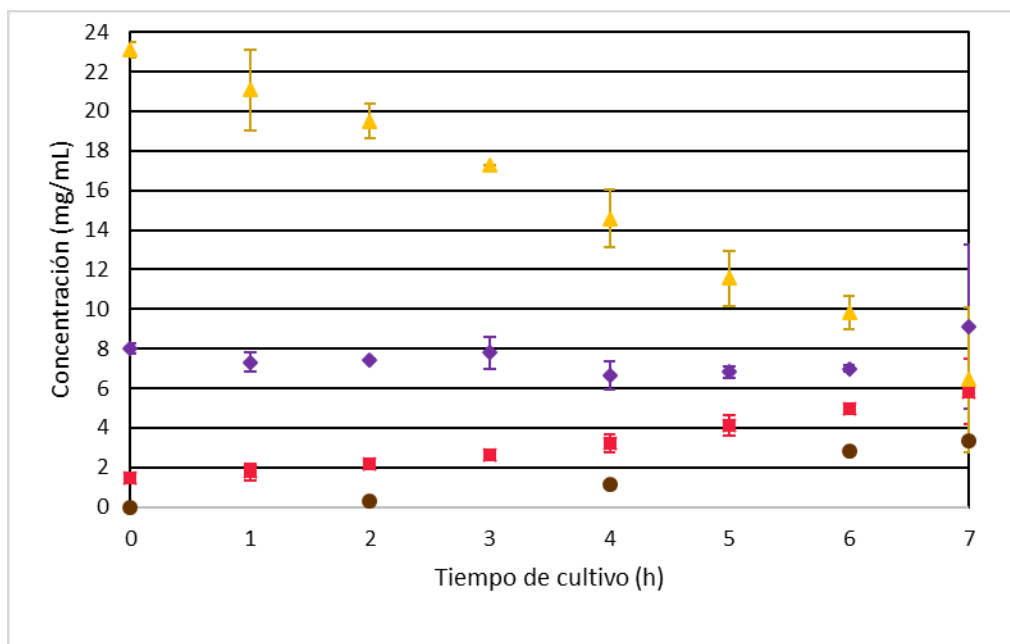


Figura 23. Cinética de consumo de sustrato y producción de inulina de *L. citreum* CW28 en medio Agavinas MBN a 30°C, 200 rpm (◆ fructosa ■ glucosa, ▲ sacarosa, ● inulina).

A diferencia del crecimiento del microorganismo en medio Lm (Figura 21), donde se agota la fuente de carbono, en el medio Agavinas MBN (Figura 23) sólo se logra el consumo del 63% de la sacarosa y se acumularon azúcares fermentables (glucosa y fructosa). Esto posiblemente debido a que en el medio MBN, la densidad de población alcanzada fue de 3 órdenes de magnitud por debajo de la concentración celular obtenida en medio Lm. Cabe destacar que la concentración de inulina promedio producida en medio Agavinas MBN fue de 3.8 g/L, lo cual representa más del doble que la inulina producida en medio Lm (1.64 g/L). El pH inicial de la fermentación fue de 6.4 y disminuyó hasta 5.5, la producción de ácido láctico alcanzó  $1.9 \pm 0.27$  g/L. Se detectó la presencia, por HPLC, de ácido acético y etanol, sin embargo las concentraciones presentes se encontraron por debajo del límite de cuantificación.

---

En resumen, en medio Agavinas MBN se produjo más de doble de inulina que la producida en medio Lm. la biomasa generada equivale a 0.4 veces el valor obtenido en medio Lm, sin embargo, la concentración celular alcanzada en medio MBN de  $10^9$  UFC/mL, se considera suficiente para un producto probiótico. La desventaja que presenta el medio MBN respecto al medio Lm, es que sólo se consumió el 63% de la sacarosa inicial. La presencia de sacarosa residual no es deseable, ya que resulta en una menor producción de inulina bacteriana y puede favorecer modificaciones del producto durante el almacenamiento. Se realizaron cambios a la formulación del medio Agavinas para aumentar el consumo de sacarosa en la fermentación.

#### **Fermentación de *L. citreum* CW28 en medio Agavinas BN:**

Se incrementó la concentración de extracto de levadura a 0.9 g/L y sales (medio Agavinas BN) para soportar una mayor concentración de células en el cultivo y así aumentar el consumo de sacarosa. Se evaluaron dos rangos de concentraciones iniciales de células en el cultivo. La primera entre 0.8 a  $3 \times 10^8$  UFC/mL (misma empleada en las fermentaciones en medio Lm y medio Agavinas MBN), que se denominó concentración de células “baja”, y otra con un orden de magnitud mayor, entre 0.8 a  $8 \times 10^9$  UFC/mL, que se denominó concentración de células “alta”. Se probaron ambas concentraciones con el fin de evaluar la condición en la que se consume mayor porcentaje de sacarosa. Las cinéticas de crecimiento celular, consumo de sacarosa, producción de inulina, ácidos orgánicos y etanol se muestran en las Figura 24 a Figura 27. En la Tabla 12 se incluye un resumen de los resultados obtenidos en los diferentes medios evaluados. Se muestra una comparación de la sacarosa consumida para la producción de biomasa e inulina en los diferentes medios evaluados (Apéndice 11.2).



### Medio Agavinas BN

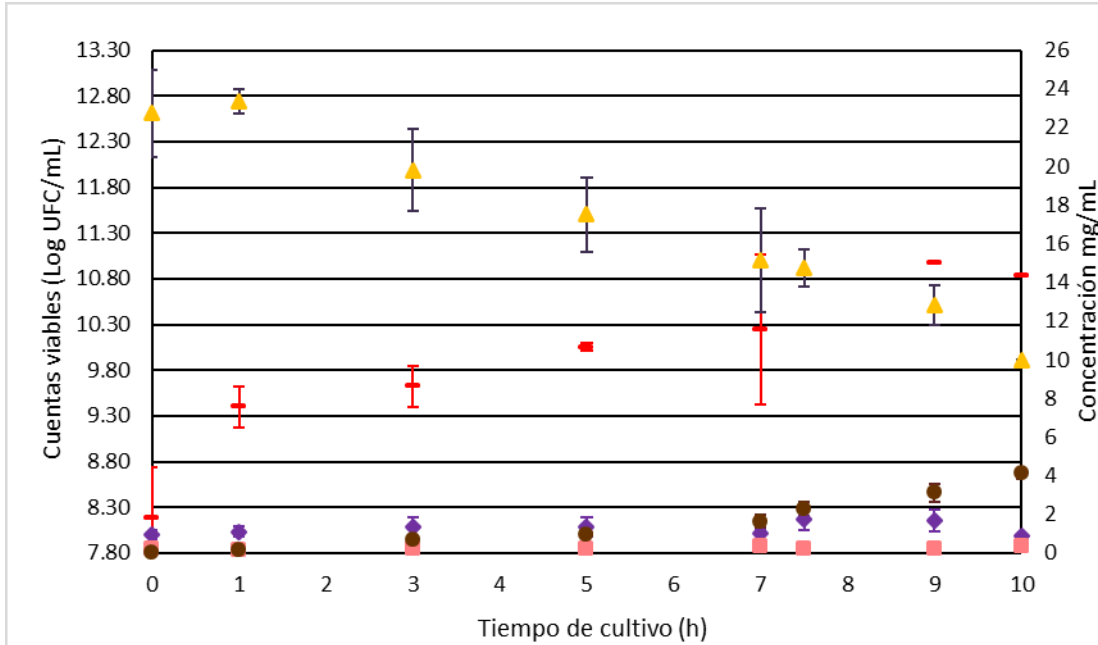


Figura 24. Cinética de consumo de sustrato y producción de inulina de *L. citreum* CW28 en medio Agavinas BN con concentración inicial de células “baja” a 30°C y 200 rpm (- Log UFC/mL, ◆ fructosa ■ glucosa, ▲ sacarosa, ● inulina)

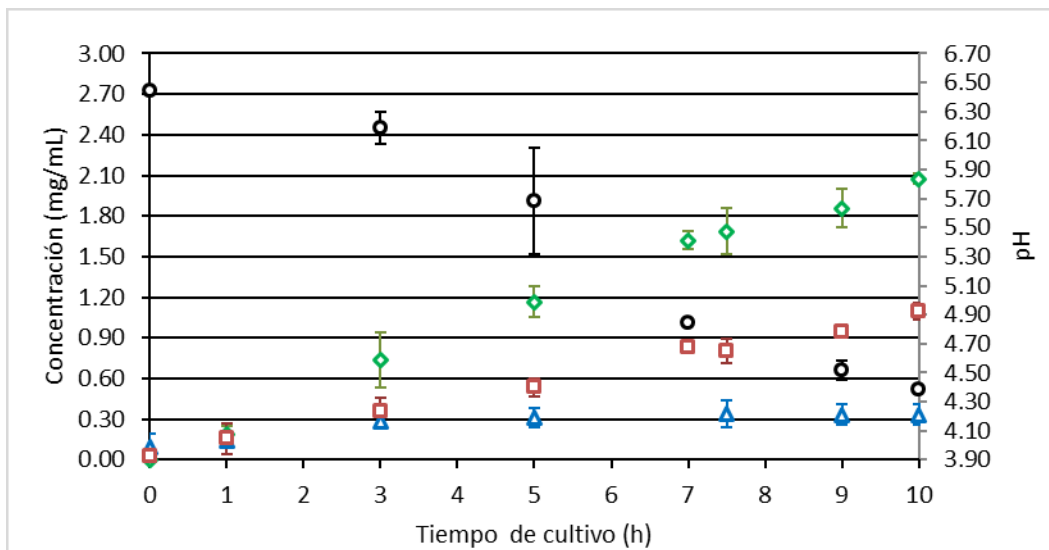


Figura 25. Evolución de pH y ácidos orgánicos en la fermentación de *L. citreum* CW28 en medio Agavinas BN con concentración inicial de células “baja” a 30°C y 200 rpm (○pH, ◇ác. láctico ▲ etanol, □ ác. Acético)

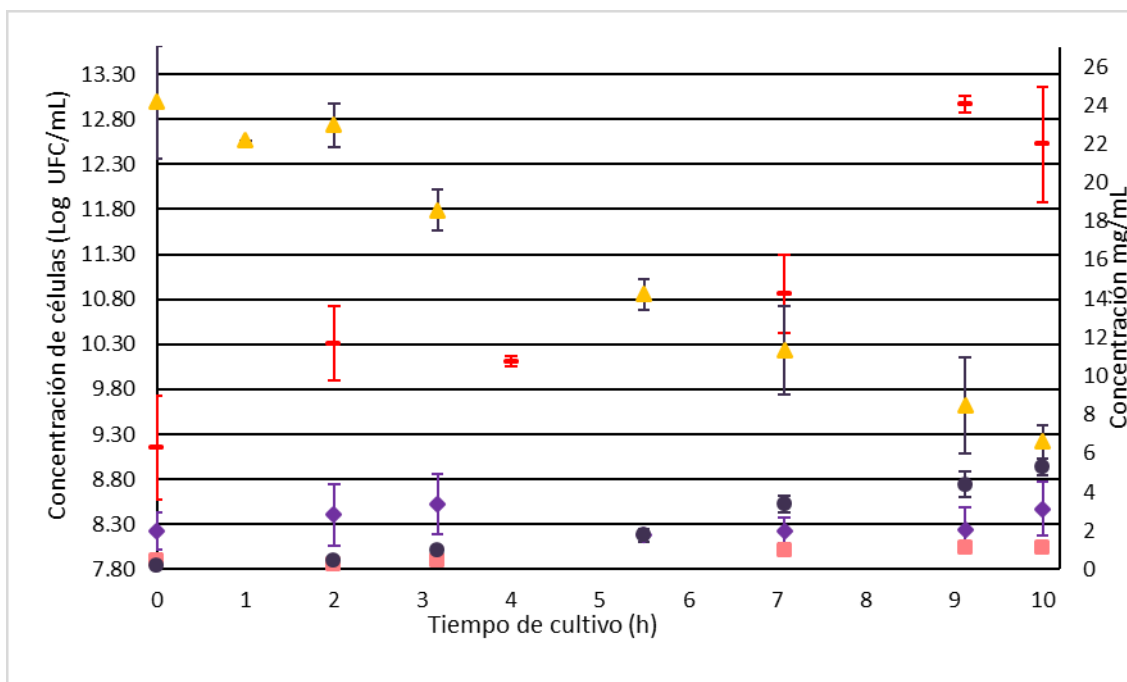


Figura 26. Cinética de consumo de sustrato y producción de inulina de *L. citreum* CW28 en medio Agavinas BN con concentración inicial de células “alta” a 30°C y 200 rpm (- Log UFC/mL, ◆ fructosa ■ glucosa, ▲ sacarosa, ● inulina)

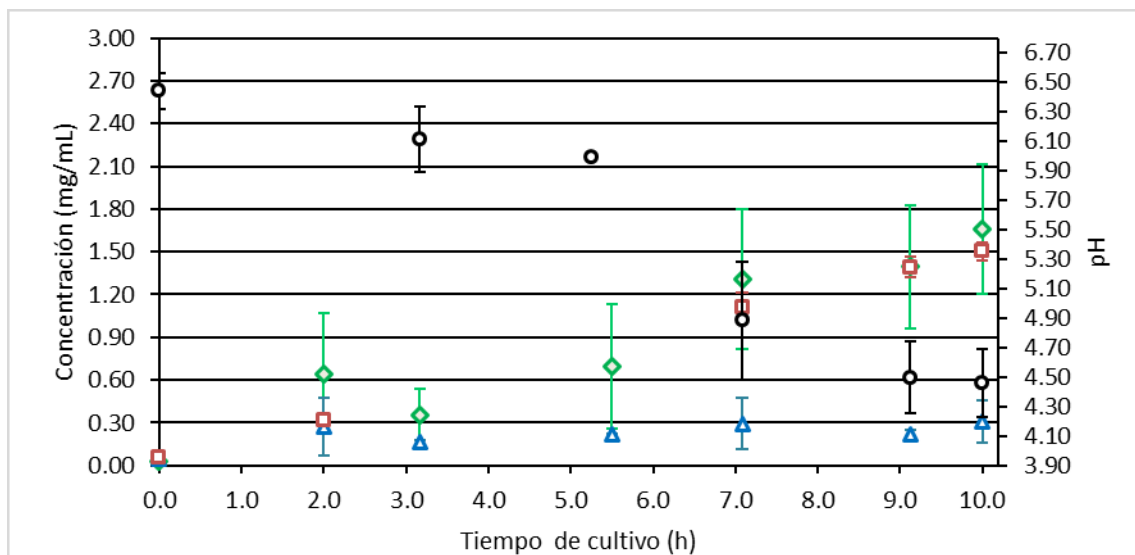


Figura 27. Evolución de pH y ácidos orgánicos en la fermentación de *L. citreum* CW 28 en medio Agavinas BN concentración inicial de células “alta” a 30°C y 200 rpm (○pH, ◆ác. láctico▲ etanol, □ác. acético)

Tabla 12. Resumen de los principales parámetros evaluados en la fermentación de *L. citreum* CW28 en diferentes medios de cultivo a 30°C y 200 rpm<sup>1</sup>.

Medio de cultivo	Sacarosa inicial (g/L)	Sacarosa consumida (%)	Biomasa producida (g/L)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Sacarosa consumida para producción de biomasa (g/L)	Inulina (g/L)	Sacarosa consumida para producción de inulina (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (g/L)	pH final
Lm	22±2	100	3.9	0.09	0.47	7.8	1.6 ± 0.1	3.2	ND	ND	NC	5.03 ± 0.1
Agavinas MBN		63	1.5	0.04	0.21	3.0	3.8 ± 0.1	7.6	1.4 ± 0.3	NC	NC	5.53 ± 0.2
Agavinas BN Concentración de células "baja"		56	2.2	0.03	0.29	4.4	4.1 ± 0.3	8.2	2.1 ± 0.0	1.1± 0.1	0.3± 0.1	4.39 ± 0.0
Agavinas BN Concentración de células "alta"		73	2.9	0.05	0.35	5.8	5.3 ± 0.4	10.6	1.7 ± 0.5	1.5± 0.1	0.3± 0.2	4.46 ± 0.2

1. Los cálculos correspondientes se muestran en la sección 11 APÉNDICES

ND =no determinado

NC = no cuantificable

---

Como se observa en la Tabla 12, la única condición en la que se consumió por completo la sacarosa fue en medio Lm, lo que está relacionado con la biomasa generada y los productos de fermentación. En los medios agavinas limitados en fuente de nitrógeno se generaron concentraciones menores de biomasa. Se logró favorecer la producción de inulina de alto peso molecular, en los medios formulados con agavinas (MBN y BN). En las fermentaciones realizadas en medio Agavinas BN con una concentración inicial de células alta, se obtuvo la mayor concentración de inulina bacteriana ( $5.3 \pm 0.4$  g/L). Ésta concentración equivale a más de 3 veces la concentración de inulina generada en fermentaciones con el medio Lm. Dols y col. (1997), reportan una producción de polímero de dextrana de 10.9 g/L y una concentración de biomasa generada de 1.8 g/L, al crecer en condiciones aerobias la cepa de *L. mesenteroides* NRRL B-1299 en 37.6 g/L (110 mM) de sacarosa inicial.

Las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ), determinadas en los medios evaluados, se encontraron entre los 0.03 y 0.09 h<sup>-1</sup>, las  $\mu$  y  $\mu_{\max}$  más altas se observaron en el crecimiento en medio Lm. Las  $\mu$  reportadas en la literatura para especies de *Leuconostoc* varían dependiendo de la cepa y carbohidratos empleados para soportar el crecimiento. Salou y col. (1994) reportan una  $\mu_{\max}$  de 0.05 y 0.11 h<sup>-1</sup> para el crecimiento de *L. oenos* en glucosa y fructosa, respectivamente. Dols y col. (1997) reportan una  $\mu_{\max}$  de 0.6 h<sup>-1</sup> para el crecimiento de *L. mesenteroides* en glucosa y fructosa, y de 0.98 h<sup>-1</sup> para el crecimiento en sacarosa.

Se determinó la concentración de fructosa y glucosa durante la fermentación de *L. citreum* CW28 en los medios MBN y BN, éstas concentraciones dependen del consumo de sacarosa y de la actividad de la inulosacarasa asociada al microorganismo. Las concentraciones de fructosa y glucosa permanecen aparentemente constantes durante el cultivo en ambos medios. Estas concentraciones son aparentes, ya que el microorganismo

---

puede emplear fructosa y glucosa como fuente de carbono (Cogan y Jordan, 1994; Dols y col., 1997; Hemme y Foucaud, 2004; Salou y col., 1994). Dols y col. (1997) y Salou y col. (1994), reportan un consumo preferencial de glucosa en especies de *Leuconostoc*, esto explicaría el que no se observe acumulación de glucosa libre en el medio, resultante de la reacción de transferencia de la inulosacarasa (Figura 24 y Figura 26).

Se evaluó la producción de metabolitos secundarios producidos por la fermentación de *L. citreum* en medios formulados con agavinas (MBN y BN), de los cuales el ácido láctico es el que se produce en mayor cantidad, con una concentración entre 1.5 a 2 g/L, seguido por la producción de ácido acético que alcanza una concentración entre 1 y 1.5 g/L en medio BN. Se observó una clara relación entre la producción de ácidos orgánicos y la disminución del pH de la fermentación en los medios evaluados.

Los ácidos láctico y acético se produjeron exponencialmente durante el cultivo de *L. citreum* en medio MBN y BN (Figura 25 y Figura 27). Sin embargo durante la fermentación en medio BN, se observó que el etanol parece producirse en una etapa temprana de la fermentación (durante las primeras 3 horas de cultivo) y permanece constante hasta el final del cultivo alcanzando una concentración máxima de 0.3 g/L. Es importante recordar que mantener la producción de etanol al mínimo es uno de los objetivos del proyecto. Dols y col. (1997), reportaron la producción de 4.5 g/L (50 mM) de ácido láctico, 4.2 g/L (70 mM) de ácido acético y 0.4 g/L (2 mM) de manitol durante la fermentación de *L. mesenteroides* al tener como sustrato 37.6 g/L (110 mM) de sacarosa en condiciones aerobias.

Con base en los resultados obtenidos se determinó que el medio Agavinas BN con una concentración inicial de células “alta” ( $0.8$  a  $8 \times 10^9$  UFC/mL) es la mejor opción para realizar la fermentación de *L. citreum*, ya que se obtiene la concentración de inulina más

---

alta ( $5.3 \pm 0.4$  mg/mL) y se consume 73% de la sacarosa inicial, además de que se obtiene una concentración de células viables en un rango de  $0.6-15 \times 10^{12}$  UFC/mL, la cual es suficiente considerando el rango requerido de bacterias en productos probióticos ( $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^{12}$  UFC/mL). De esta manera, se logra encontrar un balance entre la cuenta celular deseada y la producción de inulina.

En un esfuerzo por obtener un mayor consumo de sacarosa, se evaluaron otras concentraciones de sacarosa y pH del medio para la fermentación de *L. citreum* (datos no mostrados), sin embargo no se obtuvieron concentraciones de células o inulina mayores a las obtenidas en el medio Agavinas BN. El comportamiento de la sacarosa residual en el medio de fermentación, se evaluó durante el almacenamiento en refrigeración del producto de fermentación.

### **7.3.3. Caracterización del polímero producido por *Leuconostoc citreum* CW28 en el medio formulado.**

Se determinó el peso molecular de la inulina producida por *L. citreum* en medio Agavinas MBN, se empleó como estándar una curva de polímero de dextrana comercial (Polymer Standard Service USA). El peso molecular determinado fue de 2,684 KDa, el PM determinado de una muestra de Inulina de *L. citreum* producido en medio Lm en planta piloto en el 2009 fue de 2,750 KDa. De esta manera se confirmó que el polímero producido en el medio formulado con agavinas mantiene las mismas características que el producido en medio Lm. El valor reportado por Ortíz (2004) durante la caracterización de la inulosacarasa de *L. citreum* CW28 fue de 2,300 KDa.

En la Figura 28 se muestra la síntesis de polímero de inulina producida por *L. citreum* CW28 durante 10 h de cultivo en medio Agavina BN. La inulina, tiene un tiempo de retención de 14 min; los analitos con tiempo de retención mayor a 14 min,

corresponden a los productos de bajo peso molecular como FOS, monosacáridos y sacarosa presentes en la formulación del medio.

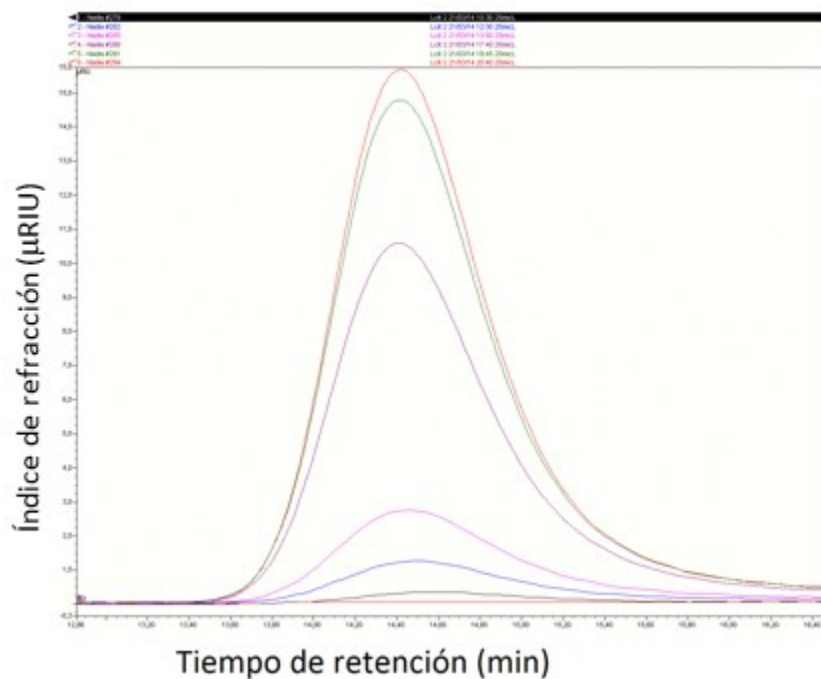


Figura 28. Síntesis de inulina durante el cultivo de *L. citreum* en medio Agavinas BN durante 10 h de cultivo, determinado por cromatografía de permeación en gel.

#### **7.3.4. Composición final del producto de fermentación de *L. citreum* CW28 en medio Agavinas muy bajo nitrógeno (MBN) y bajo nitrógeno (BN).**

Elemento prebiótico presente en el producto de fermentación, lo constituyen principalmente las fructanas de agave presentes en la inulina de agave comercial de la empresa Agaviótica, S.A. de C.V. La concentración promedio de fructanas de agave en la formulación de medios MBN y BN fue de 88 % de acuerdo a las determinaciones realizadas en el producto comercial (Figura 19).

Las estructuras de tipo inulina, como las fructanas de agave, son químicamente estables a condiciones de pH neutro o ligeramente ácido y temperatura ambiente. Su estabilidad se ve comprometida a pH ácidos (menores a 4), cuando se exponen a temperaturas arriba de 60°C (Glibowski y Bukowska, 2011). Aunque la temperatura de cultivo es de 30°C, se alcanzan pH cercanos a 4, al final de la fermentación. Por esta razón, y con el fin de asegurar la integridad de la estructura de las agavinas, se analizó el perfil de carbohidratos después de 9 h de cultivo de *L. citreum*. En la Figura 29 se muestra el perfil de las fructanas de agave durante el cultivo en medio Agavinas BN. Se observó que no existe cambio en el perfil o intensidad de las señales, por lo que la concentración y estructura de las fructanas de agave presentes en la formulación del medio permanecen estables. Se observó el mismo resultado para la fermentación en el medio MBN.

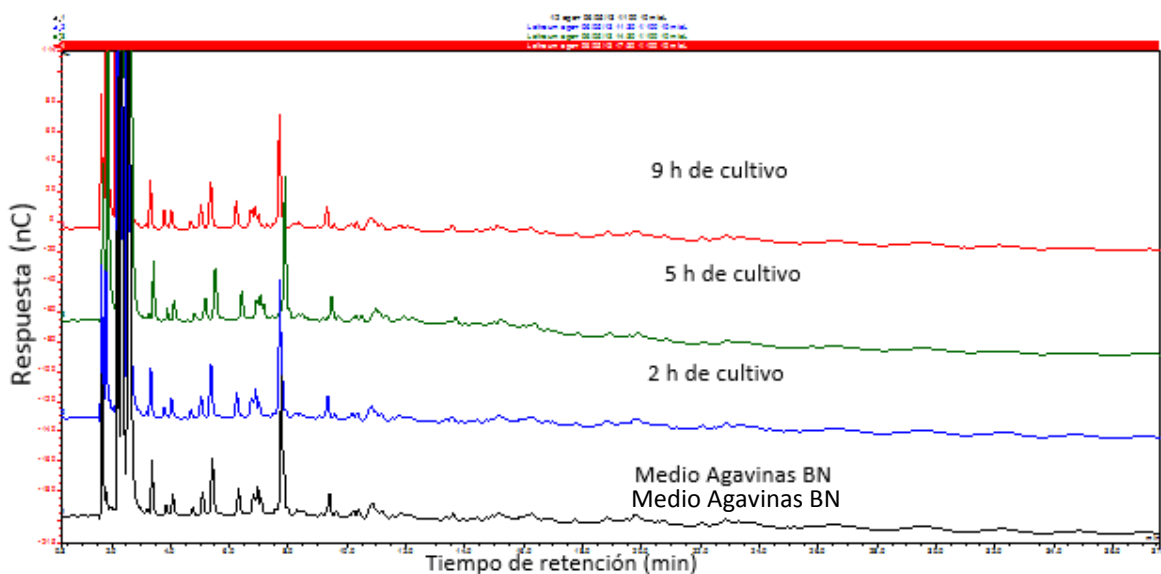


Figura 29. Perfil de fructanas de agave incluidas en la formulación del medio Agavinas BN durante el cultivo de *L.citreum*. Análisis por HPAEC-PAD

Cabe mencionar que aunque las fructanas de agave no son fermentables por *Leuconostoc citreum*, en estudios realizados en el laboratorio de Tecnología enzimática del IBT-UNAM, se comprobó que la agavina puede ser empleada como fuente de carbono



---

para soportar el crecimiento de microorganismos probióticos propios de la microbiota intestinal como *B. longum*, *B. infantis*, *B. bifidum* y *Lactobacillus sp.* (Díaz y Olvera, 2011).

El otro elemento presente en la formulación que aporta un efecto benéfico al consumidor, es la inulina de alto peso molecular sintetizada por *L. citreum* CW28 durante la fermentación; la inulina (ya sea vegetal o bacteriana) se considera como fibra dietética (NOM-043-SSA2-2005), de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, se recomienda ingerir 25 g/día. En este sentido, 100 mL del producto de fermentación equivalen a 9.3 g de fibra soluble total (fructanas de agave + Inulina bacteriana), lo que representa una ingesta del 37% del valor diario recomendado. El aporte calórico de FOS y polímero de inulina es de 1.5 Kcal/g, el que es menor al valor reportado para carbohidratos fermentables por mamíferos, como glucosa y fructosa, que aportan aproximadamente 4 Kcal/g (Roberfroid, 1999).

La presencia de ácidos orgánicos de cadena corta como ácido láctico y ácido acético, está relacionada con propiedades organolépticas de alimentos fermentados, además de que previene la contaminación por otros microorganismos potencialmente patógenos (Alakomi y col., 2000). En el producto de fermentación de *L. citreum* CW28 en medio BN, se obtuvieron concentraciones entre 1.5 y 2 g/L de ácido láctico y acético además de 0.3 g/L de etanol. Además de ácido láctico, acético y etanol, también se identificó manitol en el producto de fermentación, éste se produce como resultado de la actividad de una manitol deshidrogenasa presente en el metabolismo de *L. citreum* (Dols y col., 1997; Ortíz, 2004). La concentración de manitol producida al final de la fermentación no fue determinada debido a problemas metodológicos, ya que la señal de manitol se superpone con la señal de glucosa, por lo que es posible identificarlo pero no cuantificarlo. El empleo de manitol como edulcorante está permitido en alimentos y bebidas no alcohólicas (NOM-086-SSA1-1994), además de que por tener un bajo aporte calórico

puede ser incluido en productos para diabéticos (Hemme y Foucaud, 2004), por lo que su presencia no representa un problema para la composición del producto final.

El pH promedio obtenido al final del cultivo fue de 4.46, mientras que el pH deseable para productos de este tipo, de acuerdo con la norma “Productos lácteos fermentados y acidificados” (NOM-185-SSA1-2002) debe ser menor a 4.4. Sin embargo, es necesario evaluar si el valor obtenido al final de la fermentación sufre cambios durante el almacenamiento del producto. En la Tabla 13 se muestra la composición final del medio obtenido después del cultivo de *L. citreum* en medio Agavinas BN

**Tabla 13. Composición promedio de 6 cultivos del producto de fermentación de *L. Citreum* CW28 en medio Agavinas BN.**

Componente	Concentración
Sacarosa	6.6 ±0.8 g/L
Fructosa	3.1 ± 1.4 g/L
Glucosa	1.1 ± 0.2 g/L
Fructanas de agave	88 ±10 g/L
Inulina de alto peso molecular	5.3 ±0.4 g/L
<i>Leuconostoc citreum</i>	0.6-15 x10 <sup>12</sup> UFC/mL <sup>1</sup>
Ácido láctico	1.7 ±0.5 g/L
Ácido acético	1.5 ± 0.1 g/L
Etanol	0.3 ± 0.1 g/L
pH	4.46 ± 0.2

<sup>1</sup> La concentración final de células, expresada en cuentas viables se encontró en un rango entre 0.6-15 x10<sup>12</sup> UFC/mL, con una concentración promedio de 6.8 x10<sup>12</sup> UFC/mL

En la Tabla 14 se muestra una comparación de las concentraciones de metabolitos obtenidas en el producto de fermentación de *L. citreum* en medio Agavinas BN, el aguamiel recolectado durante la primera etapa de este proyecto y los valores reportados en la literatura para aguamiel y pulque. Como se observa en la Tabla 14, se cumplió el objetivo de que el producto de la fermentación de *L. citreum* en medio formulado con

---

agavinas comparte varias características con el aguamiel y el pulque. La concentración de células al final de la fermentación de *L. citreum* CW28 en medio BN, fue de  $10^{12}$  UFC/mL, ésta concentración fue mayor a la concentración de BAL reportadas en aguamiel y pulque (Escalante y col., 2008; Lappe y col., 2008), pero menor a la concentración total de microorganismos presentes en aguamiel ( $10^{14}$  UFC/mL) y pulque ( $10^{16}$  UFC/mL), que incluye además de BAL, a las levaduras (Lappe y col., 2008). Sin embargo, la concentración celular obtenida en medio BN, se encuentra en el rango adecuado para una bebida de este tipo.

La concentración de fructanas en el producto de fermentación en medio BN fue de más del doble de las encontradas en aguamiel. Además de la concentración, hay diferencias en términos del GP de los carbohidratos presentes. En el caso del aguamiel, las estructuras presentes tienen un GP entre 3-6, correspondiente a FOS (Ortíz y col., 2008). El producto de fermentación de *L. citreum* en medio formulado con agavinas, contiene una combinación de FOS, polímero de bajo peso molecular (GP de 3-30) e inulina de alto peso molecular de origen bacteriano (2,684 kDa). La concentración de ácido láctico obtenida en la fermentación con *L. citreum* en medio BN (1.7 g/L), fue similar a la concentración reportada por Escalante y col. (2008) en muestras de pulque (1.27 g/L) y a la determinada en el presente trabajo en muestras de aguamiel a 2 horas de acumulación de *Agave Americana* (1.70 g/L), mientras que la concentración de ácido acético en la fermentación en medio BN de 1.5 g/L, fue más cercana a la reportada en pulque por Escalante y col. (2008), que a la del aguamiel. El pH de 4.5 obtenido al final del cultivo de *L. citreum* en medio BN, es similar al reportado en la literatura para pulque y aguamiel (Ortíz y col., 2008; Lappe y col., 2008).

**Tabla 14. Características comunes presentes en aguamiel, pulque y el producto de fermentación de *L. citreum*.**

	UFC/mL (BAL)	UFC/mL (Levaduras)	Fructanas	Inulina de alto peso molecular (g/L)	Ác. láctico (g/L)	Ác. acético (g/L)	Etanol (g/L)	pH
<b>Aguamiel</b> <sup>1</sup>	3.2-15.0 x10 <sup>8</sup>	0.3-6.0 x10 <sup>6</sup>	10.2% p/p (GP 3-6)	Ausente	0.56	0.37	0.05	4.7-7.4
<b>Aguamiel (2 h)</b> <sup>2</sup>	ND	ND	11.2-36.4 g/L (GP 3-5)	Ausente	0.35-1.70	0.24-0.48	1.40-2.63	8.0
<b>Pulque</b> <sup>3</sup>	1.0-2.0 x10 <sup>8</sup>	0.1-3.0 x10 <sup>8</sup>	ND	ND	1.27	1.30	11.27	4.3
<b>Fermentación en medio Agavinas BN</b>	0.6-15 x10 <sup>12</sup>	Ausente	88.3 ± 10 g/L (GP 3-30)	5.3 ± 0.4	1.7 ± 0.5	1.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1	4.5 ± 0.2

GP = grado de polimerización

ND= no determinado

1 Valores reportados por Escalante y col., 2008; Ortíz y col., 2008 y Lappe y col., 2008.

2 Valores determinados en el presente trabajo sección 7.1 ver Figura. 11 a Figura 13 y Tabla 7

3 Valores reportados por Escalante y col., 2008 y Lappe y col., 2008.

---

La síntesis de etanol es inevitable, dado el metabolismo de *L. citreum*. Sin embargo, la concentración de etanol en el producto de fermentación de *L. citreum* CW28 en medio BN, fue de 5 a 10 veces menor a la determinada en muestras de aguamiel recolectadas a 2 horas de acumulación en las tres variedades de agave estudiadas, y casi 50 veces menor a la reportada en pulque (Escalante y col., 2008), donde se lleva a cabo principalmente, una fermentación alcohólica. Con estos resultados se logró el objetivo de desarrollar una fermentación preferencialmente ácido láctica, donde la fermentación alcohólica fue mínima. De los resultados obtenidos se concluyó que el producto de fermentación de *L. citreum* CW28 en medio formulado con agavinas, cumple con algunas de las características típicas de una bebida ácido láctica fermentada elaborada de manera tradicional, así como con los objetivos específicos planteados en este proyecto.

#### **7.3.5. Evaluación sensorial del producto de fermentación de *L. citreum* CW28.**

En la Figura 30 se muestran los resultados de la evaluación sensorial de la fermentación de *L. citreum* CW28 en medio Agavinas BN realizado por jueces expertos en el análisis sensorial de este tipo de bebidas. En estos resultados se observa primeramente que no hubo diferencia significativa entre los duplicados de la muestra evaluada, para ninguno de los atributos lo que indica la reproducibilidad de los datos, lo que da confianza en la reproducibilidad de los resultados.

El gráfico del análisis de componentes principales (ACP) mostrado en la Figura 31, explicó un 63.4% de la variabilidad de la muestra, que está correlacionada positivamente con los atributos cítrico, resabio ácido, astringente, burbujeante, y color en el componente 1 y con agrio, precipitado, formación de película y viscosidad en el componente 2.

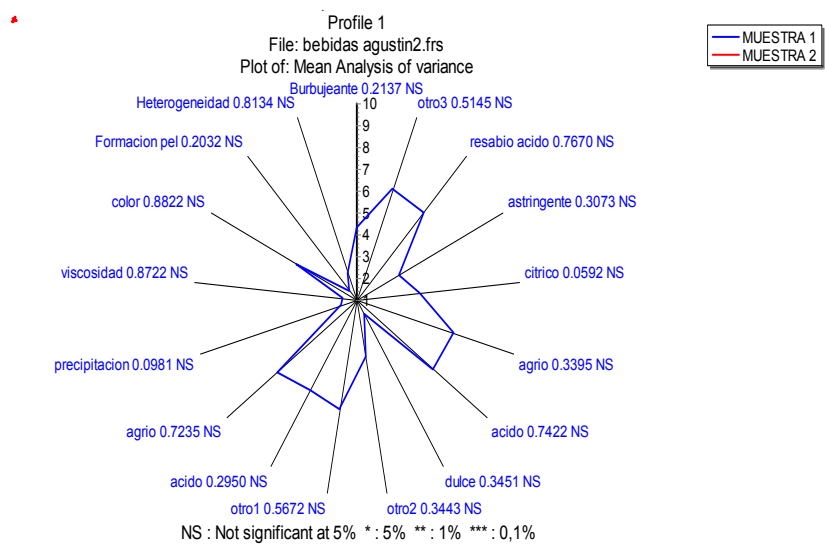


Figura 30. Perfil sensorial del producto de *L. citreum* CW28 en medio Agavinas BN.

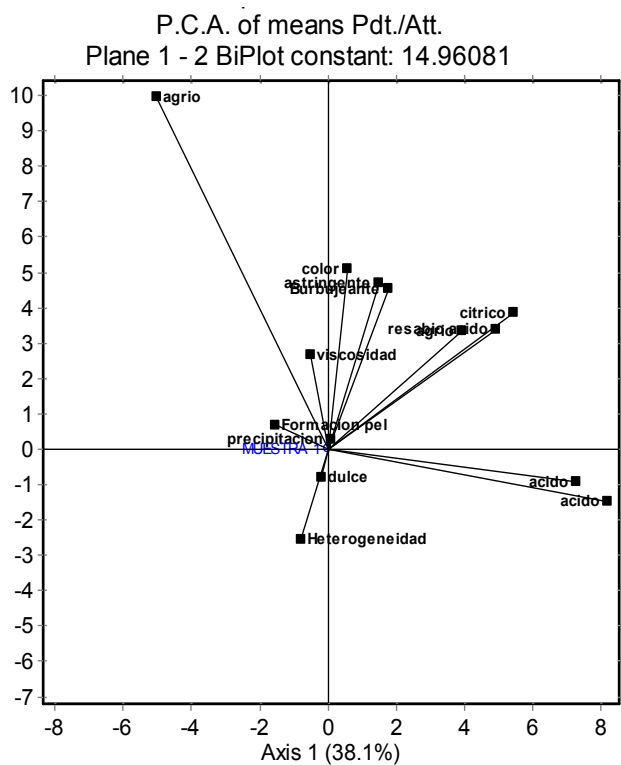


Figura 31. Resultados del ACP para los atributos sensoriales del producto de fermentación de *L. citreum* CW28 en medio Agavinas BN

Para poder conocer las características que presenta la muestra en estudio con respecto a otras bebidas fermentadas con probióticos se comparó con el ACP de 4 muestras comerciales, analizadas previamente por el mismo jurado. Los resultados se muestran en la Tabla 15, en donde se reportan los porcentajes de cada componente de la evaluación. Se obtuvieron un total de 8 componentes principales de los 14 atributos evaluados por ACP. El primer componente (CP1) explica un 49.9% de la varianza original y el segundo componente (CP2) explica un 21.1%. Si observamos en la columna de acumulado el primer plano factorial (componente 1\* componente 2), se explica un 71.1% de las características de la muestra, es decir que el olor ácido y flavour agrio son los atributos que definen al producto. Si se toma en cuenta como criterio de retención de componentes aquellos cuyo valor propio (*Eigenvalue*) es superior a la unidad, el ACP considera a los primeros siete componentes, conteniendo un acumulado de 96.7% de la varianza original. Esto quiere decir que con 7 atributos es posible describir sensorialmente al medio de cultivo en un 96.7%.

**Tabla 15. Correlación entre los atributos de apariencia y textura en el producto de fermentación evaluado**

No. ACP	Valor Propio (Eigenvalues)	Valor de contribución (%)	Frecuencia acumulada (%)
1	17.45128	36.19	36.19
2	13.15405	27.28	63.46
3	6.10376	12.66	76.12
4	3.82274	7.93	84.05
5	2.88174	5.98	90.02
6	2.02605	4.2	94.23
7	1.19432	2.48	96.7
8	0.62182	1.29	97.99
9	0.40334	0.84	98.83
10	0.30762	0.64	99.47
11	0.14175	0.29	99.76
12	0.06675	0.14	99.9
13	0.04272	0.09	99.99

La Tabla 16 presenta la matriz de correlación entre variables originales y componentes retenidos. Se observa que la primera columna (CP1) los coeficientes importantes son para formación de película, olor agrio y ácido, *flavour* ácido, agrio, astringente y resabio ácido. En la segunda columna (CP2) en apariencia: heterogéneo, formación de película, olor ácido y resabio ácido.

**Tabla 16. Matriz de correlación entre variables originales y componentes de retención**

Variable	Axis 1	Axis 2
	EigenV.	EigenV.
Burbujeante	-0.17444	-0.43950
Heterogéneo	0.13876	0.40599
Formación de película	0.26246	0.37923
Color	0.12574	-0.22668
Viscosidad	0.11816	0.26348
Precipitación	0.07888	-0.18055
Agrio	-0.30516	-0.00177
Ácido	-0.30019	0.46211
<i>Flavour</i> dulce	0.17785	-0.09562
<i>Flavour</i> ácido	-0.42500	-0.19625
<i>Flavour</i> agrio	-0.41754	0.00255
<i>Flavour</i> cítrico	-0.14701	0.03875
<i>Flavour</i> astringente	-0.24994	0.09888
Resabio ácido	-0.43762	0.26888

Se realizó la evaluación de componentes del producto de fermentación de *L. citreum* en medio Agavinas BN (muestra 1) junto con 4 muestras de producto comercial (muestras 2-5). En la Figura 32 se observa la gráfica de ACP que explica el 71.1% de variabilidad de las muestras, presentando similitudes las muestras 3, 4 y 5, siendo diferentes de las muestras 1 y 2. La muestra 3 presenta heterogeneidad, formación de película y viscosidad como los atributos de mayor peso, las 4 y 5 el color, *flavour* dulce y



precipitación como atributos distintivos. Por otro lado, la muestra 2 fue burbujeante con resabio ácido, *flavour* ácido y agrio y olor agrio y la muestra de estudio (muestra 1) se caracteriza por tener olor ácido, *flavour* agrio y astringente, cítrico, resabio ácido y bajo dulzor.

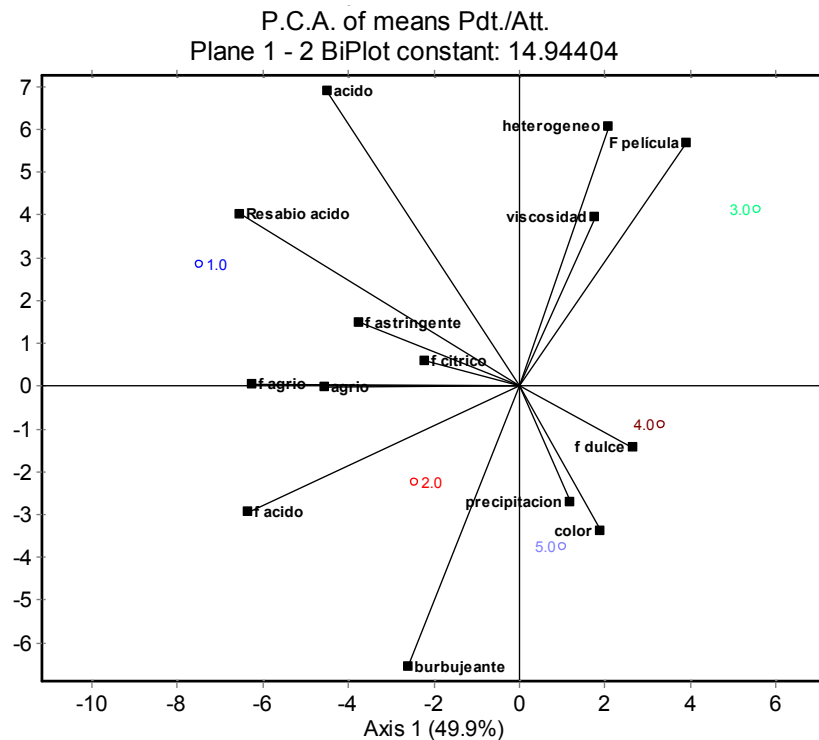


Figura 32. Resultados del ACP para los atributos sensoriales de bebidas fermentadas  
1=Muestra en estudio, 2 a 5= Producto comercial

Se realizó la evaluación del nivel de agrado del producto de fermentación de *L. citreum* en medio Agavinas BN, comparándolo con muestras de bebidas comerciales. La evaluación la realizó el grupo de análisis sensorial de la Dra. P. Severiano (Facultad de Química UNAM). El estudio se realizó con 100 consumidores habituales de bebidas fermentadas (90% de los participantes), 35% de ellos con un nivel socioeconómico alto A/B, siendo el 50% de un nivel socioeconómico medio determinado de acuerdo al

---

cuestionario AMAI para el nivel socioeconómico (AMAI, 2009)<sup>3</sup>. Se utilizó una escala hedónica de 9 puntos que van desde “me disgusta extremadamente” (1) hasta “me gusta extremadamente” (9). La muestra 1 fue el producto de la fermentación de *L. citreum* en medio BN y las muestras 2-5 fueron muestras comerciales. Los resultados mostraron que la muestra 3 obtuvo la calificación de “ni me gusta ni me disgusta”, la muestra 4 de “me disgusta poco” mientras que la muestra 2 no gustó. La muestra 1 (producto de fermentación de *L. citreum* CW28) se ubicó en el estudio de preferencia como “me disgusta”.

Los atributos que más importancia tuvieron en el nivel de agrado fueron el sabor, el dulzor y la consistencia (Iñigo, 2013). Los cuales no se encuentran presentes en la bebida fermentada obtenida con *L. citreum*. El objetivo de la evaluación sensorial del producto de fermentación es considerar los resultados obtenidos para posteriormente realizar una reformulación del producto con la intención de incluir las características organolépticas más aceptadas en los consumidores de bebidas fermentadas.

Como se menciona en la evaluación, los atributos predominantes en el producto de fermentación son olor ácido, *flavour* agrio y astringente, cítrico, resabio ácido y bajo dulzor, siendo predominante el elemento ácido, el cual puede ser contrarrestado adicionando un elemento cítrico a la formulación, otra de las características que agradan en este tipo de productos es el dulzor, el cual es bajo en el medio de cultivo de *L. citreum*. Se propone incluir algún endulcorante de bajo contenido calórico y que no sea incorporado a las rutas metabólicas del microorganismo *L. citreum* para no afectar la estabilidad del producto.

---

<sup>3</sup> Consulta 04/02/13

---

### **7.3.6. Estudios preliminares de estabilidad del producto de fermentación de *L. citreum* CW28.**

Se evaluó el comportamiento de carbohidratos, ácidos orgánicos, etanol, acidificación del medio y la viabilidad del microorganismo, entre el término del cultivo y hasta los 17 días de almacenamiento del producto de fermentación de *L. citreum* a una temperatura de almacenamiento entre 4-6 °C (Figura 33 y Figura 34). La evaluación se realizó en cultivos en medio Agavinas BN con una concentración inicial de células “alta” (entre 0.8 a 8 x10<sup>9</sup> UFC/mL).

En la Figura 33, se muestra que durante las primeras dos semanas de almacenamiento en refrigeración del producto de fermentación, la sacarosa residual se consumió prácticamente por completo. Su consumo va acompañado de un aumento en la concentración de inulina, es decir, que la actividad residual de la inulosacarasa continúa transformando la sacarosa que no se consumió al final del cultivo en inulina. También se observó un ligero aumento en la concentración de ácido, acompañada de una ligera disminución de pH (Figura 34). En análisis de estabilidad preliminares (datos no mostrados) se observó que una vez agotada la sacarosa residual (después de las primeras dos semanas), no se observan cambios en la composición de azúcares, ácidos orgánicos o pH en un tiempo de almacenamiento de 30 días.

El otro parámetro en el que se observaron cambios importantes durante el almacenamiento del producto, además del consumo de sacarosa, es en la viabilidad de las células, ya que durante los 17 días de almacenamiento se perdió alrededor de la mitad de las células viables (Figura 34). Sin embargo, el producto aún se encuentra en el límite inferior de concentración de células necesaria de acuerdo con los estándares que definen comercialmente a un producto probiótico (10<sup>6</sup> – 10<sup>12</sup> UFC/mL).

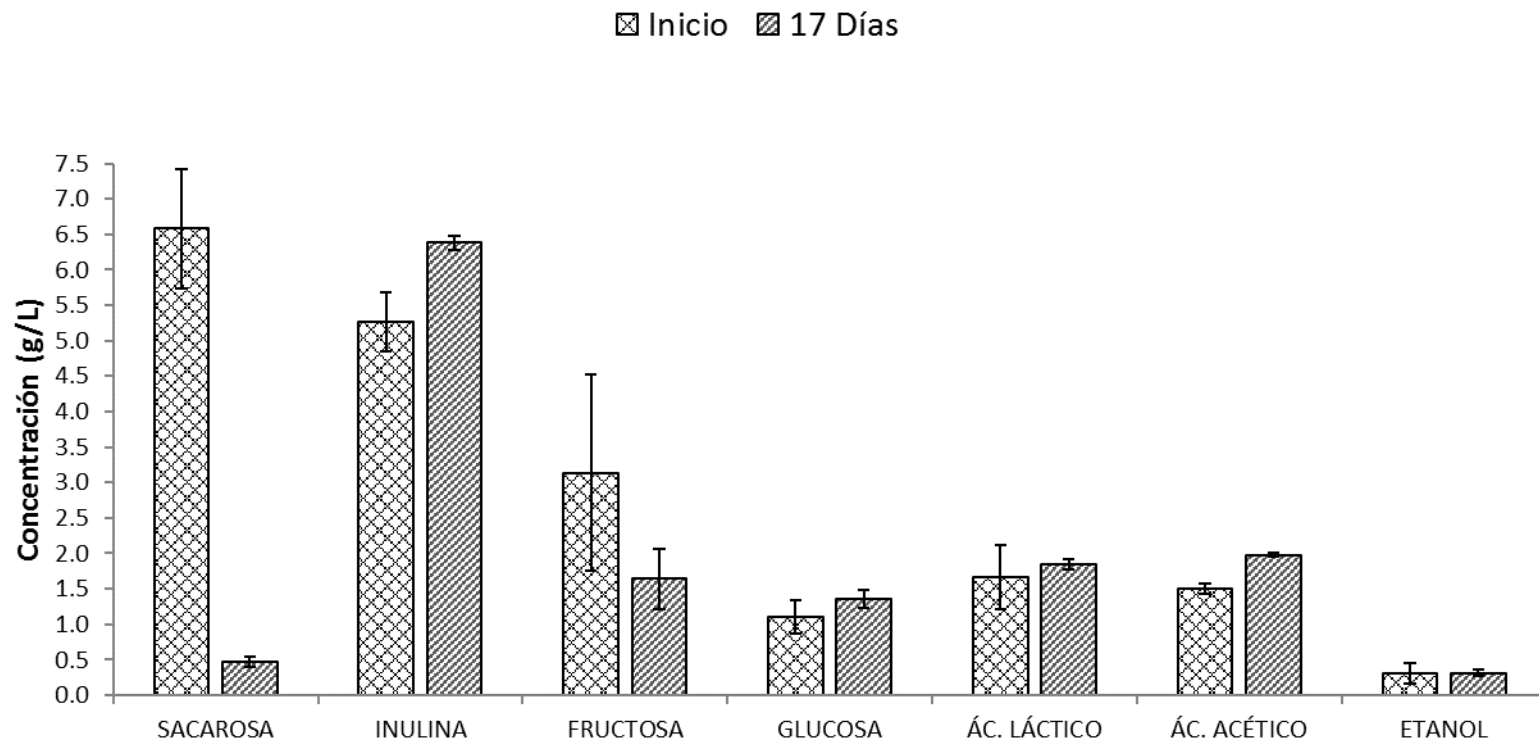


Figura 33. Estudio de estabilidad. Análisis de la evolución de carbohidratos y otros metabolitos durante el almacenamiento del cultivo de *L. citreum* por 17 días a  $5 \pm 1$  °C.

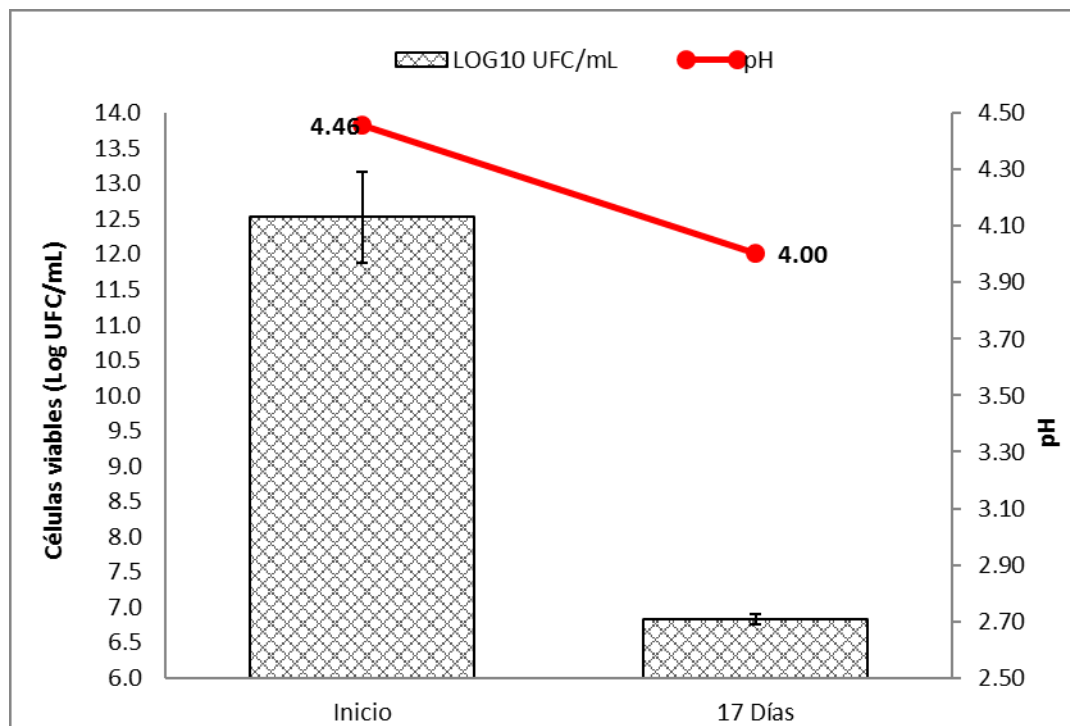


Figura 34. Estudio de estabilidad. Análisis de la evolución de la viabilidad de las células de *L. citreum* durante el almacenamiento por 17 días a  $5\pm 1^\circ\text{C}$ .

En resumen, la sacarosa que no es consumida durante el tiempo de cultivo es consumida durante el almacenamiento del producto de fermentación con subsecuentes cambios en la concentración de los productos de fermentación y pH.

Una opción para obtener un producto estable (que no sufra modificaciones) es realizar una etapa de “maduración” del producto, en la que durante un determinado tiempo se almacene a una temperatura controlada para permitir que se agote la fuente de carbono y lograr la estabilidad del producto, ya que como se mencionó, una vez agotada la sacarosa residual no se registran cambios en la composición. Otra opción es agregar algún tipo de conservador o agente protector.

---

Es importante tomar en cuenta medidas para disminuir la pérdida de viabilidad de las células durante el almacenamiento del producto. El uso de agentes protectores como trehalosa, betaína, manitol, leche descremada, lactosa, gomas, polisacáridos, entre otros, está reportado en circunstancias en las que la viabilidad de microorganismos se ve comprometida por procesos mecánicos o fisicoquímicos, como liofilización, secado y descongelamiento (Carvalho y col., 2004; Berner y Viernstein, 2006; Bigetti, 2012). Es por esto que el empleo de agentes de este tipo podría constituir una estrategia para disminuir la pérdida de la viabilidad de *L. citreum* durante el tiempo de almacenamiento.

---

## 8. CONCLUSIONES

El aguamiel como materia prima es atractivo por su valor nutrimental. Sin embargo, es poco estable desde el punto de vista microbiológico. Se realizó un estudio a diferentes tiempos de acumulación de aguamiel en la planta de agave, que permitió definir algunos de los cambios que se suceden durante el proceso de almacenamiento de aguamiel, previo a la recolección para la producción de pulque. Estos datos permiten un diseño más real de bebidas que tiendan a imitar el proceso que se da durante la producción de pulque.

Se caracterizó y demostró que la inulina de agave (agavina) es una opción factible para emplearse como elemento prebiótico en formulaciones basadas en la composición del aguamiel y su proceso fermentativo, con el objetivo de desarrollar bebidas para consumo humano.

Se diseñó un medio mínimo de cultivo que incluye agavina en la composición y en el que se logró el crecimiento de *L. citreum* en concentraciones adecuadas para evaluar su efecto probiótico, además de la síntesis de inulina bacteriana de alto peso molecular.

El producto de fermentación de *L. citreum* en el medio formulado cumple con algunas de las características típicas de bebidas fermentadas elaboradas de manera artesanal conteniendo ácido láctico y acético, con la ventaja de una mínima concentración de etanol.

Los objetivos delimitados en el proyecto se cumplieron: la producción de un medio de cultivo base para elaborar una bebida formulada con azúcares de agave, es tecnológicamente viable. Sin embargo, es necesaria una reformulación del producto para incluir los elementos que hagan a la bebida más agradable para su consumo, tomando en

---

cuenta los atributos sensoriales deseables en este tipo de productos y tomando las medidas necesarias para mantener la viabilidad del microorganismo durante el almacenamiento.

Es necesario realizar los estudios correspondientes para analizar los efectos potencialmente probióticos del microorganismo *L. citreum* CW28 empleado en la formulación. Estos análisis incluyen ensayos de resistencia a pH ácidos y sales biliares, efecto en la producción de citosinas y producción de bacteriocinas contra microorganismos patógenos. También es necesaria la reformulación del producto para incluir algún agente protector que ayude a mantener la viabilidad de *L. citreum* CW28 durante el almacenamiento. Por último, incluir elementos que hagan más aceptable las características organolépticas del producto tomando en cuenta los resultados del análisis sensorial realizado.



---

## 9. REFERENCIAS

Alakomi, H.-L., E. Skyttä, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala, I. M. Helander, (2000). "Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane." Applied and Environmental Microbiology **66**(5): 2001-2005.

Allsopp, P., S. Possemiers, D. Campbell, I. S. Oyarzábal, C. Gill, I. Rowland. (2013). "An exploratory study into the putative prebiotic activity of fructans isolated from *Agave angustifolia* and the associated anticancer activity." Anaerobe **22**: 38-44.

AMMAI. (2009). "Cuestionario para niveles socioeconómicos." <http://www.more.com.mx/recursos/herramientas/cuestionarioAmai>.

Andersson, H., N. G. Asp, A. Bruce, S. Roos, T. Wadström, A. E. Wold. (2001). "Health effects of probiotics and prebiotics A literature review on human studies." Food & Nutrition Research. **45**: 58-75

Anteneh, T., T. Mehari, M. Ashenafi. (2011). "Evaluation of the *in vitro* and *in vivo* probiotic qualities of lactic acid (LAB) recovered from locally fermented products." International Journal of Probiotics and Prebiotics **6**(2): 101-108.

Arrizon, J., S. Morel, A. Gschaedler, P. Monsan. (2010). "Comparison of the water-soluble carbohydrate composition and fructan structures of *Agave tequilana* plants of different ages." Food Chemistry (122): 123-130.

Ávila, A., C. Olvera, E. Rudiño, G. I. Cassab, J. Nieto, A. López-Munguía. (2007). "Molecular characterization of sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) from *Agave tequilana* Weber var. azul." Plant Science **173**(4): 478-486.

Ávila, A., X. Rendón, C. Olvera, F. González, S. Capella, A. Peña, A. López-Munguía (2009). "Enzymatic Hydrolysis of Fructans in the Tequila Production Process." J. Agric. Food Chem. (57): 5578–5585.

---

Ávila, A., N. Galicia, M. E. Rodríguez, C. Olvera, A. López-Munguía. (2011). "Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans." Food Chemistry **129**(2): 380-386.

Bhatia, I. S. y K. S. Nandra (1979). "Studies on fructosyl transferase from *Agave americana*." Phytochemistry **18**(6): 923-927.

Berner, D. y H. Viernstein (2006). "Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying." Scientia Pharmaceutica **74**: 137-149.

Bigetti Guergoletto, K., Ed. (2012). Dried Probiotics for Use in Functional Food Applications. Food Industrial Processes – Methods and Equipment, InTech.

Bosscher, D. (2009). "Fructan Prebiotics Derived from Inulin." Prebiotics and Probiotics Science and Technology. D. Charalampopoulos and R. A. Rastall, Springer New York: 163-205.

Buddington, R., Ed. (2009). Using Probiotics and Prebiotics to Manage the Gastrointestinal Tract Ecosystem. Prebiotics and Probiotics Science and Technology, Springer

Campos, I. (2010). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas del pulque con capacidad probiótica. Facultad de química. México, D.F., UNAM. **Química de alimentos**: 88.

Carvalho, A. S., J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata, P. Gibbs. (2004). "Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria." International Dairy Journal **14**(10): 835-847.

Cervantes M. y A. M. Pedroza. (2007). "El pulque características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopía Raman." NOVA – Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. **5**(8):101-212.

Cogan, T. M. y K. N. Jordan (1994). "Metabolism of *Leuconostoc* Bacteria." Journal of Dairy Science **77**(9): 2704-2717.

Coussement, P. A. A. (1999). "Inulin and Oligofructose: Safe Intakes and Legal Status." The Journal of Nutrition (supplement): S1412-S1417. De Vrese M. y J. Schrezenmeir, Eds. (2008). "Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics." Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Springer: 279

---

Díaz, M. y C. Olvera. (2011). "Capacidad prebiótica de Fructooligosacáridos de hidrólisis ácida de agavina en *Bifidobacterias* y *Lactobacillus*." Cuernavaca, Morelos, IBT-UNAM.

Dols, M., W. Chraibi, M. Remaud-Simeon, N. D. Lindley. P. F. Monsan. (1997). "Growth and Energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during Metabolism of Various Sugars and Their Consequences for Dextranucrase Production." Applied and Environmental Microbiology **63**(6): 2159–2165

Escalante, A., M. E. Rodríguez, A. Martínez, A. López-Munguía, F. Bolívar, G. Gosset. (2004). "Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis." FEMS Microbiology Letters **235**(2): 273-279.

Escalante, A., M. Giles, G. Hernández, M. S. Córdova, A. López-Munguía, G. Gosset, F. Bolívar. (2008). "Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach." International Journal of Food Microbiology (124): 126-134

Escalante A., M. Giles, G. Esquivel, V. Matus, R. Moreno, A. López-Munguía, P. Lappe. (2011). "Pulque fermentation." Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology. Y. H. Hui y E. Ö. Evranuz, CRC Press: 691-706.

Farrow J. A., R. R. Facklam, M. D. Collins. (1989). "Nucleic Acid Homologies of Some Vancomycin-Resistant *Leuconostocs* and Description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. nov." International Journal of Systematic Bacteriology **39**(3): 279-283.

Fuentes, E. L. (2006). "Los enemas prehispánicos como instrumentos para aplicar probióticos." Temas de ciencia y tecnología **10**(29): 17-26.

Gibson, G. R. y M. B. Roberfroid. (1995). "Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics." The Journal of Nutrition **125**(6): 1401-1412.

Gibson, G. R. H. M. Probert, J. B. Loo, R. A. Rastall, M. B. Roberfroid. (2004). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics." Nutrition Research Reviews(17): 259–275.

---

Glibowski, P. y A. Bukowska. (2011). "The Effect of pH, Temperature and heating time on inulin chemical stability." Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. **10**(2): 189-196.

Hartman, P. A., G. W. Reinbold, D. S. Saraswat. (1966). Media and Methods for Isolation and Enumeration of the Enterococci. Advances in Applied Microbiology. W. U. Wayne, Academic Press. **Volume 8**: 253-289.

Hemme, D. y C. Foucaud (2004). "Leuconostoc, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods." International Dairy Journal(14): 467–494.

Hinke, N. (1997). "Breve léxico del maguey." Ciencias **46**: 26-29.

Hori, T. (2010). Probiotics: Recent Human Studies using *Lactobacillus casei* strain Shirota. Handbook of Prebiotics and Probiotics ingredients. S. Sungsoo y E. Finocchiaro, CRC Press: 193-205.

Ibañez, F. C. y Y. Barcina. (2000). "Análisis sensorial de los alimentos. Métodos y Aplicaciones." Barcelona, Springer-Verlag Iberica.

Iñigo, O. N. J. (2013). "Evaluación del perfil sensorial de bebidas lácteas fermentadas." Facultad de Química, UNAM. Licenciatura.

Kekkonen, R. A., E. Kajasto, M. Miettinen, V. Veckman, R. Korpela, I. Julkunen. (2008). "Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. cremoris and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN- $\gamma$  production." World Journal of Gastroenterology **14**(8): 1192-1203.

Klaenhammer, T. R. y M. J. Kullen (1999). "Selection and design of probiotics." International Journal of Food Microbiology **50**(1–2): 45-57.

Kluge, M. y I. P. Ting (1978). Introduction. Crassulacean Acid Metabolism, Springer Berlin Heidelberg. **30**: 1-2.

Kollath, W. (1953). "Ernährung und Zahnsystem". Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift **8**: 7-16

---

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (2005). Microorganism *Leuconostoc citreum* KM20 having enhanced anticancer effect and antimicrobial activity which is useful as starter for producing functional kimchi, medicines and probiotics for stabilizing intestinal flora. WIPO. Korea.

Lappe, P., R. Moreno, J. Arrizón, T. Herrera, A. García, A. Gschaedler. (2008). "Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages." FEMS Yeast Research **8**(7): 1037-1052.

Lonvaud A. (1999). "*Leuconostoc*". Food Microbiology Encyclopedia. Academic Press.

López, M. G., N. A. Mancilla, G: Mendoza. (2003). "Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul." J. Agric. Food Chem., **51**(27): 7835-7840.

Mancilla N. A. y López M. G. (2006). "Water-Soluble Carbohydrates and Fructan Structure Patterns from Agave and Dasylirion Species." J. Agric. Food Chem.(54): 7832-7839.

Márquez A. L., R. M. Camacho, M .Arriaga, E. Padilla-Camberos, M. Reinhart, J. L. Blasco y M. González. (2013). "Effects of *Agave tequilana* fructans with different degree of polymerization profiles on the body weight, blood lipids and count of fecal *Lactobacilli/Bifidobacteria* in obese mice." Food Funct. **4**: 1237–1244.

Martínez del Campo, M. G. (1999). "Determinación, cuantificación e hidrólisis de inulina en el aguamiel de agave pulquero, *Agave atrovirens*." Facultad de Química, UNAM. Licenciatura.

Martinez, R. y E. Martinis (2006). "Effect of *Leuconostoc mesenteroides* 11 bacteriocin in the multiplication control of *Listeria monocytogenes* 4b." Ciênc. Tecnol. Aliment Campinas **26**(1): 52-55

Mellado, E. y M. G. López (2012). "Fructan Metabolism of Agave tequilana Weber Blue Variety along its Developmental Cycle in the Field." J. Agric. Food Chem. **60**(47): 11704-13

---

Méndez, M.D. (1999). "Acumulación de fructanas en *Agave tequilana* weber var. azul cultivado en campo". Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. **Maestría en Alimentos**: 91

Monterrubio, A. L., Ed. (2007). "Las haciendas pulqueras de México." Colección posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México.

NMX-V-022-1972, "Aguamiel. Hydromel. NORMAS MEXICANAS." Dirección general de Normas.

NOM-043-SSA2-2005, "Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación." Secretaría de Salud.

NOM-086-SSA1-1994, "Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales." Secretaría de Salud.

NOM-185-SSA1-2002, "Productos y servicios. Mantequilla, cremas, producto lácteo condensado azucarado, productos lácteos fermentados y acidificados, dulces a base de leche. Especificaciones sanitarias." Secretaría de salud.

Olivares V., C. Wachter, S. Le Borgne, .A. López-Munguía. (2002). "Characterization of a cell-associated inulosucrase from a novel source: A *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pozol, a fermented corn beverage of Mayan origin." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **28**(2): 112-117.

Olivares, V., A. López Munguía, C. Olvera (2003). "Molecular characterization of inulosucrase from *Leuconostoc Citreum*: a fructosyltransferase within a Glucosyltransferase." Journal of bacteriology **185**(12): 3606-3612.

Ortíz, M. E. (2004). "Caracterización y aplicación de la inulosacarasa de *Leuconostoc citreum* CW28." Ingeniería celular y Biocatálisis. Cuernavaca, México, Instituto de Biotecnología, UNAM. **Maestro en ciencias**: 55.

---

Ortiz, M. E., V. Olivares, A. López-Munguía. (2004). "Biochemical Properties of Inulosucrase from *Leuconostoc citreum* CW28 Used for Inulin Synthesis." Biocatalysis and Biotransformation **22**(4): 275-281.

Ortiz, R. I., G. Pourcelly, T. Doco, P. Williams, M. Dornier, MP. Belleville. (2008). "Analysis of the Main Components of the Aguamiel Produced by the Maguey-Pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the Harvest Period." Journal of Agricultural and Food Chemistry **56**(10): 3682-3687.

Patel, S., A. Majumder, A. Goyal. (2012). "Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria." Indian Journal of Microbiology **52**(1): 3-12.

Peña, A., L. Díaz, A. Medina, C. Labastida, S. Capella, Santiago, L.E. Vera. (2004). "Characterization of three Agave species by gas chromatography and solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1027**(1–2): 131-136.

Quigley, E. M. M. (2010). "Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota." Pharmacological Research **61**(3): 213-218.

Quintero, R. (1990). Ingeniería Bioquímica, Editorial Alhambra Mexicana. 1ª ed., 2ª reimp.: 333.

Roberfroid, M. B. (1999). "Caloric Value of Inulin and Oligofructose." The Journal of Nutrition (Nutritional and Health Benefits of Inulin and Oligofructose): 1436S-1437S.

Roberfroid, M., G. R. Gibson, L. Hoyles, A. L. McCartney, R. Rastall, I. Rowland, D. Wolvers, B. Watzl, H. Szajewska, B. Stahl, F. Guarner, F. Respondek, K. Whelan, V. Coxam, Veronique, M.J. Davicco, L. Léotoing, Y. Wittrant, N.M. Delzenne, P. D. Cani, A. M. Neyrinck, A. Meheust. (2010). "Prebiotic effects: metabolic and health benefits." British Journal of Nutrition **104**(SupplementS2): S1-S63.

Salou, P., P. Loubiere, A. Pareilleux. (1994). "Growth and Energetics of *Leuconostoc oenos* during Cometabolism of Glucose with Citrate or Fructose." Applied and Environmental Microbiology **60**(5): 1459-1466.

---

Sánchez, A. y P. H. Hope (1953). "Agave Juice, Fermentation and Chemical Composition Studies of Some Species." Journal of Agricultural and Food Chemistry **1**(3): 246-249.

Sánchez, D. G. (1993). Los agaves en México. México Universidad Autónoma de Chapingo. 252 p.

Steed, H. y S. Macfarlane (2009). "Mechanisms of Prebiotic Impact on Health." Prebiotics and Probiotics Science and Technology. D. Charalampopoulos and R. A. Rastall, Springer.

Steinkraus, K. H. (1996). Handbook of Indigenous Fermented Foods, Marcel Decker Inc. 2ª Ed.: 776.

Sumner, J. B. y S. F. Howell (1934). "A method for determination of saccharase activity." Journal of Biological Chemistry **108**(1): 51-54.

Sungsoo, S. y E. T. Finocchiaro. Eds. (2010). Handbook of prebiotics and probiotics ingredients CRC Press: 435.

Tuohy, K. M., H. M. Probert, C. W. Smejkal, y G. R. Gibson. (2003). "Using probiotics and prebiotics to improve gut health." Drug Discovery Today **8**(15): 692-700.

Urías, J. E., P. D, Cani, E. Delmeé, A. M. Neyrinck, M. G. López, y N.M. Delzenne. (2008). "Physiological effect of dietary fructans extracted from *Agave tequilana* Gto. and *Dasyilirion* spp." British Journal of Nutrition **99**: 254-261.

Vergauwen, R., A. Van Laere, W. Van Den Ende. (2003). "Properties of Fructan:Fructan 1-Fructosyltransferases from Chicory and Globe Thistle, Two Asteracean Plants Storing Greatly Different Types of Inulin." Plant Physiology, **133**: 391–401.

Vijayendra, S. V. N. y R. S. Sharath Babu (2008). "Optimization of a new heteropolysaccharide production by a native isolate of *Leuconostoc* sp. CFR-2181." Letters in Applied Microbiology **46**(6): 643-648.



---

Waleckx, E., A. Gschaedler, B. Colonna-Ceccaldi, P. Monsan. (2008). "Hydrolysis of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul during the cooking step in a traditional tequila elaboration process." Food Chemistry **108**(1): 40-48.

Wang, N. y P. S. Nobel (1998). "Phloem Transport of Fructans in the Crassulacean Acid Metabolism Species *Agave deserti*." Plant Physiology **116**: 709–714.

## 10. ANEXOS

### 10.1. Composición de pulque. A. Especies de agave, estados donde se produce y consorcio microbiano reportado en muestras de pulque. Tomado de Lappe y col. (2008).

Beverage	Type of beverage	Agave species	Substrate	States of production	Functional microbiota	Fermentation products	References
Pulque	Nondistilled	<i>A. atrovirens</i> <i>A. mapisaga</i> <i>A. salmiana</i>	Sap	México Tlaxcala Hidalgo Querétaro México DF Puebla Morelos San Luis Potosi	In spontaneous fermentation homo and heterofermentative LAB ( <i>Lactobacillus</i> spp., <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i> , <i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> ), <i>Zymomonas mobilis</i> ssp. <i>mobilis</i> , non- <i>Saccharomyces</i> ( <i>Candida</i> spp., <i>C. parapsilosis</i> , <i>Clavispora lusitanae</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Pichia</i> spp., <i>Torulaspota delbrueckii</i> ) and <i>Saccharomyces</i> ( <i>S. bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. paradoxus</i> ) yeasts. In industrialized process a mixed culture starter ( <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Z. mobilis</i> ssp. <i>mobilis</i> and <i>S. cerevisiae</i> ) with or without <i>Leuconostoc</i> species	Ethanol, organic acids, dextrans, vitamins, amino acids, fusel oil, esters, aldehydes	Lappe & Ulloa (1993), Steinkraus (1997), Ramírez et al. (2004)

### B. Composición de aminoácidos y vitaminas presentes en aguamiel y diferentes tipos de pulque. Tomado de Lappe y col. (2008).

Essential compounds	Pulque types				
	Agave sap*	Traditional pulque <sup>†</sup>	Traditional pulque <sup>‡</sup>	Pilot plant pulque <sup>‡</sup>	Industrialized pulque <sup>§</sup>
Amino acids (mg 100 mL <sup>-1</sup> )					
Lysine		16.2	3.0	7.5	12.0
Tryptophane		2.7	2.5	9.0	6.0
Hystidine		4.7	4.0	1.0	–
Phenylalanine		11.2	6.5	7.5	–
Leucine		10.5	4.0	6.0	–
Threonine		6.4	1.5	5.0	–
Methionine		0.7	3.0	5.0	–
Valine		6.6	2.5	7.5	–
Arginine		10.9	2.5	3.2	–
Tyrosine			3.0	7.5	
Vitamins (mg 100 mL <sup>-1</sup> )					
Thiamine	0.06	0.02	0.02	0.02	0.02
Riboflavin	0.02	0.025	0.02	0.03	0.03
Niacin	0.45	0.32	0.28	0.37	0.35
Pyridoxine	–	–	0.02	0.03	–
Biotine	–	–	0.02	0.02	–
Ascorbic acid	9.0	5.6	–	–	5.1

Source: \*Cravioto et al. (1951).

<sup>†</sup>Massieu et al. (1949, 1959) and Loyola-Montemayor (1956).

<sup>‡</sup>Sánchez-Marroquín (1977).

<sup>§</sup>Del Razo (2004).

**10.2. Composición de agavina comercial reportada por Agaviótica S.A. de C.V.**

**(<http://www.agaviotica.com/productos3.html>)**

Características Generales	
Humedad	5.0% (+/- 2%)
Sustancia Seca	95.0% (+/- 2%)
Cenizas	0.10% (+/- 0.05%)
Carbohidratos totales	94.90% (+/- 1%)
• Inulina / FOS	90.02% (+/- 2%)
• Fructuosa	2.20% (+/- 1%)
• Glucosa	0.63% (+/- 1%)
• Sacarosa	2.05% (+/- 1%)
<b>Grasa</b>	Ausente
<b>Colesterol</b>	Ausente
<b>Calorías</b>	1.5 Kcal/g

**10.3. Composición de medios de cultivo para evaluar la presencia de microorganismos.**

Medio LB: triptona 10 g/L; extracto de levadura 5 g/L; cloruro de sodio 10 g/L; 2% agar. pH 7.0

Medio MRS (Difco Lactobacilli MRS Broth): peptona de proteosa No. 3 10g/L; extracto de res 10 g/L; extracto de levadura 5 g/L; dextrosa 20 g/L; polisorbato 80 1g/L; citrato de amonio 2 g/L; acetato de sodio 5 g/L; sulfato de magnesio 0.1 g/L; sulfato de manganeso 0.05 g/L; fosfato de dipotásico 2g/L; 2% agar. pH 6.5

Medio R5: sulfato de potasio 0.25 g/L; cloruro de magnesio 10.12 g/L; glucosa 10 g/L; cas-aminoácidos 0.1g/L; extracto de levadura 5g/L; tris base 5.73 mL; cloruro de zinc 0.0008 g/L; cloruro de hierro 0.004 g/L; cloruro o sulfato de cobre 0.0002 g/L; cloruro de manganeso 0.0002 g/L; borato de sodio 0.0002g/L; fosfato de potasio monobásico 0.0125 g/L; cloruro de calcio 0.68 g/L; L-prolina 0.75 g/L.; hidróxido de sodio 1N 0.05 %. 2% agar. pH 7.2

---

## 11. APÉNDICES

### 11.1. Cálculo de biomasa

Por peso seco de células de *L. citreum* lavadas. Se determinó que 1 log UFC = 0.85 ± 0.07 mg de biomasa. Esta relación se empleó para realizar la conversión entre células viables (log UFC/mL) y biomasa en mg/mL. La biomasa generada durante la fermentación se calcula con la Ecuación 7.

$$\text{Biomasa generada} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \text{Biomasa final} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) - \text{Biomasa inicial} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)$$

Ecuación 7

Donde:

$$\text{Biomasa final} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \text{células finales} \frac{\log \text{ UFC}}{\text{mL}} \times 0.85 \frac{\text{mg biomasa}}{\log \text{ UFC}}$$

$$\text{Biomasa inicial} \left( \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \text{células iniciales} \frac{\log \text{ UFC}}{\text{mL}} \times 0.85 \frac{\text{mg biomasa}}{\log \text{ UFC}}$$

### 11.2. Balance de consumo de sustrato durante la fermentación de *L. citreum*.

La fuente de carbono de la fermentación es sacarosa, hay que tomar en cuenta que la fermentación de *L. citreum* es heterofermentativa, es decir se produce una variedad de productos, principalmente: inulina, ácido láctico, ácido acético, etanol y biomasa. De tal manera que el balance de sacarosa expresado matemáticamente es el siguiente:

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{dx}{dt} \frac{1}{Y_{x/s}} + \frac{di}{dt} \frac{1}{Y_{i/s}} + \frac{de}{dt} \frac{1}{Y_{e/s}} + \frac{dl}{dt} \frac{1}{Y_{l/s}} + \frac{da}{dt} \frac{1}{Y_{a/s}} + m \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde:  $\frac{dx}{dt} = \text{sacarosa consumida} \left( \frac{\text{g}}{\text{L}} \right)$

---

$$\frac{dx}{dt} = \text{biomasa producida} \left( \frac{g}{L} \right); Y_{x/s} = \text{Rendimiento de biomasa} = 0.5$$

$$\frac{di}{dt} = \text{inulina producida} \left( \frac{g}{L} \right); Y_{i/s} = \text{Rendimiento de inulina}$$

$$\frac{ds}{dt} = \text{etanol producido} \left( \frac{g}{L} \right); Y_{e/s} = \text{Rendimiento de etanol}$$

$$\frac{dl}{dt} = \text{ácido láctico producido} \left( \frac{g}{L} \right); Y_{l/s} = \text{Rendimiento de ácido láctico}$$

$$\frac{da}{dt} = \text{ácido acético producido} \left( \frac{g}{L} \right); Y_{a/s} = \text{Rendimiento de ácido acético}$$

$m = \text{Coeficiente de mantenimiento}$

La concentración de sacarosa consumida para la producción de biomasa e inulina se determinó con las siguientes ecuaciones:

$$-\frac{ds}{dt} \text{ inulina} = \frac{di}{dt} \frac{1}{Y_{i/s}} \quad \text{Ecuación 9}$$

$$-\frac{ds}{dt} \text{ biomasa} = \frac{dx}{dt} \frac{1}{Y_{x/s}} \quad \text{Ecuación 10}$$

### 11.3. Rendimientos teóricos de productos de fermentación

Ya que el polímero de inulina se compone principalmente de residuos fructosilo (es decir, el equivalente a una molécula de fructosa menos una molécula de agua que se pierde al realizar la polimerización). Por cada mol de sacarosa consumida se incorpora 1 mol de fructosa. El peso molecular (PM) del residuo fructosilo es 162 g/mol y el PM de la

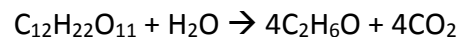
---

sacarosa es 342 g/mol, por lo que el rendimiento teórico sería el siguiente de acuerdo a la estequiometría de la reacción:

$$Y_{i/s} = \frac{162 \text{ g fructosa incorporada a polimero}}{342 \text{ g sacarosa consumida}} = 0.5$$

Ecuación 11

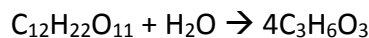
Rendimiento teórico de etanol de acuerdo a la estequiometría de la reacción de consumo de sacarosa:



Sí una molécula de sacarosa más agua producen 4 moléculas de etanol, entonces

$$Y_{e/s} = \frac{4 (PM_{etanol})}{PM_{sacarosa+H_2O}} = \frac{4(46 \frac{g}{mol})}{360 \text{ g/mol}} = 0.5 \quad \text{Ecuación 12}$$

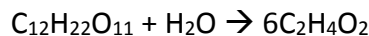
Rendimiento teórico de ácido láctico de acuerdo a la estequiometría de la reacción de consumo de sacarosa:



Sí una molécula de sacarosa más agua producen 4 moléculas de ácido láctico, entonces

$$Y_{l/s} = \frac{4 (PM_{ácido láctico})}{PM_{sacarosa+H_2O}} = \frac{4(90 \frac{g}{mol})}{360 \text{ g/mol}} = 1 \quad \text{Ecuación 13}$$

Rendimiento teórico de ácido acético de acuerdo a la estequiometría de la reacción de consumo de sacarosa:



Sí una molécula de sacarosa más agua producen 6 moléculas de ácido acético, entonces

$$Y_{a/s} = \frac{6 (PM_{ácido acético})}{PM_{sacarosa+H_2O}} = \frac{6(60 \frac{g}{mol})}{360 \text{ g/mol}} = 1 \quad \text{Ecuación 14}$$