



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN Y CONSERVACIÓN DE INÓCULOS
TRADICIONALES PARA LA PRODUCCIÓN DE PULQUE**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

RICARDO MANRIQUE DORRONSORO



MÉXICO, D.F.

2013



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesor: Olga del Carmen Velázquez Madrazo
VOCAL:	Profesor: María del Carmen Wachter Rodarte
SECRETARIO:	Profesor: Martha Giles Gómez
1er. SUPLENTE:	Profesor: Francisco Ruiz Terán
2° SUPLENTE:	Profesor: Norma Angélica Camacho de la Rosa

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Laboratorio 324, Edificio “E”, Departamento de alimentos y Biotecnología,
Facultad de Química, UNAM**

Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte
Asesor del tema

Biol. Ma. Teresa Flores Espinosa
Supervisor técnico

Ricardo Manrique Dorronsoro
Sustentante

RECONOCIMIENTOS

El proyecto de tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Wachter Rodarte en el laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología en el conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece a Nekutli ® S.A. de C.V. y al Ing. Manuel Cruz por su apoyo para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Isabel Gracia, que llevó a cabo la administración del proyecto.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por ser mi segunda casa y permitirme vivir los mejores años de mi vida.

A las Dras. María del Carmen Wachter Rodarte y Gloria Díaz Ruiz y a la Bióloga María Teresa Flores Espinoza por su asesoramiento teórico y técnico en la elaboración del proyecto.

A la Dra. Carmen Belloch (España) por su asesoramiento técnico.

A la M. en C. Laurel Elidé Fabila Ibarra por su asesoría técnica en el manejo del equipo KODAK Image Station y el Software Diversity Data Base.

A Ana Luisa Javier López por su asesoramiento técnico en DGGE.

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A los compañeros de los laboratorios L312, L313 y L321 por permitirme usar sus instalaciones cuando fue necesario.

A todos mis compañeros y amigos del L324 del departamento de Alimentos y Biotecnología del Conjunto E de la Facultad de Química.

DEDICATORIAS

A mis padres y mi hermano por su apoyo incondicional.

A mis tías Maggie y Angelines por permitirme vivir en sus casas durante la carrera.

A mis compañeros del L324, especialmente a Karina, por el apoyo que me brindaron.

A todos mis amigos de la facultad y a los "Chacmols and the Spending Band", por los buenos tiempos.



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 ANTECEDENTES.....	3
2.1 MAGUEY, AGUAMIEL Y PULQUE.....	3
2.2 HISTORIA DEL PULQUE.....	7
2.3 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL PULQUE.....	9
2.3.1 TRADICIONAL.....	9
2.3.2 INDUSTRIAL.....	11
2.4 SEMILLA DE PULQUE.....	13
2.5 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	14
2.5.1 CONGELACIÓN.....	14
2.5.2 LIOFILIZACIÓN.....	15
2.6 TÉCNICAS UTILIZADAS EN LA MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS.....	17
2.6.1 CONTEO DE MICROORGANISMOS.....	17
2.6.2 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	18
2.7 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR UTILIZADAS EN ALIMENTOS.....	19
2.7.1 PCR-DGGE.....	21
2.7.1.1 Pasos previos al DGGE.....	21
2.7.1.2 DGGE.....	21
2.7.1.3 Aplicación de DGGE en alimentos fermentados.....	24
3 JUSTIFICACIÓN.....	28
4 HIPÓTESIS.....	29
5 OBJETIVO.....	30
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	30
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	30



6	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	31
7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
7.1	MUESTREO.....	34
7.2	MICROBIOLOGÍA TRADICIONAL.	34
7.2.1	CONTEO DE MICROORGANISMOS.....	34
7.2.2	AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS.	36
7.3	CONSERVACIÓN POR CONGELACIÓN.....	36
7.4	CONSERVACIÓN POR LIOFILIZACIÓN.	36
7.5	CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DESPUÉS DE LOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN. 37	
7.6	EVALUACIÓN DE LAS SEMILLAS Y EL EFECTO DE LOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN MEDIANTE PCR-DGGE.....	38
7.6.1	EXTRACCIÓN DE ADN.	38
7.6.2	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	40
7.6.3	ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE (DGGE).	42
7.6.3.1	Elaboración del gel con gradiente perpendicular al campo eléctrico.....	42
7.6.3.2	Separación de los productos de PCR mediante la técnica de DGGE.	42
7.6.3.3	Análisis de los geles de DGGE.....	43
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
8.1	CARACTERIZACIÓN DE LA SEMILLA.....	45
8.2	CUANTIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS EN EL MOMENTO DE SU RECEPCIÓN EN AL LABORATORIO (T ₀).	47
8.3	EFECTO DE LA CONGELACIÓN COMO MÉTODO DE CONSERVACIÓN DE LA SEMILLA.	49
8.4	EFECTO DE LA LIOFILIZACIÓN COMO MÉTODO DE CONSERVACIÓN DE LA SEMILLA.	57
8.5	COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN.....	61
8.6	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	62
8.7	DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE BANDAS DE DGGE DE LAS CINCO SEMILLAS EN EL TIEMPO 0, LAS MUESTRAS DE CONSERVACIÓN DE SEMILLA 5 Y LA FERMENTACIÓN DE AGUAMIEL CON ESTA ÚLTIMA.	66
8.7.1	EXTRACCIÓN DE ADN.	66
8.7.1.1	Semillas 1, 2, 3, 4 y 5 tiempo 0.	66
8.7.1.2	Muestras de semilla 5 conservada por congelación y liofilización.	67
8.7.1.3	Muestras de fermentación de aguamiel con la semilla 5.	68
8.7.2	AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN V3 DEL GEN RIBOSOMAL 16S MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	69
8.7.2.1	Semillas 1, 2, 3, 4 y 5 tiempo 0.	70
8.7.2.2	Conservación de la semilla 5 en congelación y liofilización.	72



8.7.2.3	Fermentación de aguamiel con la Semilla 5.....	73
8.7.3	SEPARACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR MEDIANTE DGGE.....	74
8.7.3.1	Determinación del gradiente de desnaturalizante óptimo para la separación de los productos de PCR.....	74
8.7.3.2	Identificación de bandas.....	75
8.7.3.3	Análisis de los perfiles electroforéticos.....	78
8.7.3.3.1	Semillas 1, 2, 3, 4 y 5.....	79
8.7.3.3.2	Conservación de la semilla 5.....	80
8.7.3.3.3	Fermentación de aguamiel con semilla 5.....	82
8.7.3.4	Análisis de índices ecológicos.....	86
8.7.3.4.1	Semillas 1, 2, 3, 4 y 5.....	86
8.7.3.4.2	Conservación de la semilla 5.....	87
8.7.3.4.3	Fermentación de aguamiel con semilla 5.....	88
9	<u>CONCLUSIONES.....</u>	90
10	<u>PERSPECTIVAS.....</u>	91
11	<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	92
12	<u>ANEXOS.....</u>	99
12.1	MEDIOS DE CULTIVO.....	99
12.2	RESULTADOS CEP T ₀	99
12.3	RESULTADOS CEP CONGELACIÓN.....	100
12.4	RESULTADOS CEP LIOFILIZACIÓN.....	101
12.5	AGUA EXTRAÍDA DE LIOFILIZACIÓN.....	102
12.6	VALORES DE ABSORBANCIA DE LAS MUESTRAS DE ADN.....	102
12.7	VALORES DE ABSORBANCIA DE LAS MUESTRAS DE PRODUCTOS DE PCR.....	104
12.8	ABREVIATURAS.....	106



ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. (A) <i>AGAVE ATROVIRENS</i> , (B) <i>AGAVE MAPISAGA</i> , (C) <i>AGAVE SALMIANA</i> (GARDENER, 2011).	4
FIGURA 2. ESTADOS PRODUCTORES DE PULQUE EN MÉXICO.	4
FIGURA 3. PULQUE NATURAL (VELARDE, 2009).	6
FIGURA 4. MAYÁHUEL, DIOSA MEXICANA DEL MAGUEY (TORRENTERA, 2009).	7
FIGURA 5. PROCESO TRADICIONAL DE ELABORACIÓN DEL PULQUE.	10
FIGURA 6. DIAGRAMA DE FLUJO GENERAL DE LA PRODUCCIÓN TRADICIONAL DEL PULQUE.	10
FIGURA 7. ALGUNAS MARCAS DE PULQUE COMERCIAL.	12
FIGURA 8. DIAGRAMA DE FASES DEL AGUA (LEVINE, 2005).	16
FIGURA 9. TÉCNICA DE DGGE (DÍAZ Y WACHER, 2003).	23
FIGURA 10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL SEGUIDA DURANTE EL ESTUDIO.	31
FIGURA 11. BIDONES DE PLÁSTICO CON DIFERENTES LOTES DE SEMILLA. (A) LOTES 1 Y 2, (B) LOTE 5.	32
FIGURA 12. SEMILLA 5. (A) CONGELADA, (B) LIOFILIZADA.	33
FIGURA 13. TÉCNICA UTILIZADA PARA CUENTA EN PLACA DE MICROORGANISMOS.	34
FIGURA 14. METODOLOGÍA EMPLEADA PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN DEL PULQUE.	40
FIGURA 15. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL), LEVADURAS, COLIFORMES Y ENTEROBACTERIAS DE 5 LOTES DE SEMILLA EN EL MOMENTO DE SU RECEPCIÓN EN EL LABORATORIO.	47
FIGURA 16. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL), LEVADURAS, COLIFORMES Y ENTEROBACTERIAS DE LA SEMILLA 1 CONGELADA A -20 °C, DURANTE 90 DÍAS.	50
FIGURA 17. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL), LEVADURAS, COLIFORMES Y ENTEROBACTERIAS DE LA SEMILLA 1 CONGELADA A -65 °C, DURANTE 90 DÍAS.	51
FIGURA 18. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL), LEVADURAS, COLIFORMES Y ENTEROBACTERIAS DE LA SEMILLA 2 CONGELADA A -20 °C, DURANTE 90 DÍAS.	52
FIGURA 19. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL), LEVADURAS, COLIFORMES Y ENTEROBACTERIAS DE LA SEMILLA 2 CONGELADA A -65 °C, DURANTE 90 DÍAS.	53
FIGURA 20. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL), LEVADURAS, COLIFORMES Y ENTEROBACTERIAS DE LA SEMILLA 5 CONGELADA A -65 °C, DURANTE 92 DÍAS.	56
FIGURA 21. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) Y LEVADURAS DE LA SEMILLA 3 LIOFILIZADA, DURANTE 2 DÍAS.	58
FIGURA 22. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) Y LEVADURAS DE LA SEMILLA 5 LIOFILIZADA, DURANTE 2 DÍAS.	59
FIGURA 23. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL), LEVADURAS, COLIFORMES Y ENTEROBACTERIAS DE LA SEMILLA 5 LIOFILIZADA, DURANTE 92 DÍAS.	59
FIGURA 24. ASPECTO DE LAS SEMILLAS 3 Y 5 LIOFILIZADAS SIN Y CON LECHE DESCREMADA COMO PROTECTOR, RESPECTIVAMENTE. (A) SEMILLA 3, (B) SEMILLA 5.	61
FIGURA 25. CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) Y LEVADURAS EN LA SEMILLA 5 EN EL TIEMPO 0 (ANTES DE LOS TRATAMIENTOS), CONGELACIÓN Y LIOFILIZACIÓN, AL INICIO Y DESPUÉS DE 3 MESES DEL TRATAMIENTO.	62
FIGURA 26. EJEMPLO DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) AISLADAS DE LA SEMILLA 5.	65
FIGURA 27. EJEMPLO LEVADURAS AISLADAS DE LA SEMILLA 5.	65
FIGURA 28. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DEL ADN EXTRAÍDO DE LAS MUESTRAS DE SEMILLAS 1 Y 2.	67
FIGURA 29. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DEL ADN EXTRAÍDO DE LAS MUESTRAS DE ADN EXTRAÍDO DE LA SEMILLA 5 EN CONSERVACIÓN.	68



FIGURA 30. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1% DEL ADN EXTRAÍDO DE LAS MUESTRAS DE LA FERMENTACIÓN DEL AGUAMIEL CON LA SEMILLA 5.....	69
FIGURA 31. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 2% DE PRODUCTOS DE PCR DE LAS MUESTRAS DE SEMILLAS 1 Y 2 TIEMPO 0.....	71
FIGURA 32. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 2% DE PRODUCTOS DE PCR DE LAS MUESTRAS DE SEMILLA 5 TIEMPO 0.....	72
FIGURA 33. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 2% DE PRODUCTOS DE PCR DE LAS MUESTRAS DE CONSERVACIÓN SEMILLA 5.....	73
FIGURA 34. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 2% DE PRODUCTOS DE PCR DE LAS MUESTRAS DE FERMENTACIÓN DEL AGUAMIEL CON LA SEMILLA 5.....	74
FIGURA 35. ELECTROFORESIS EN GEL CON GRADIENTE DESNATURALIZANTE PERPENDICULAR (DGGE) REALIZADO CON TODAS LAS MUESTRAS DE LAS TABLAS 31-33 (ANEXO 12.7).....	75
FIGURA 36. PERFILES DE DGGE DE FRAGMENTOS DE LA REGIÓN V3 DEL GEN RIBOSOMAL 16S AMPLIFICADOS DE 5 MUESTRAS DE SEMILLA, 4 MUESTRAS DE CONSERVACIÓN Y 3 MUESTRAS DE FERMENTACIÓN.....	76
FIGURA 37. DENDOGRAMA CONSTRUIDO A PARTIR DEL MÉTODO UPGMA PARA LAS MUESTRAS DE LAS 5 SEMILLAS ANTES DE SU CONSERVACIÓN, DE LOS PATRONES DE BANDAS OBTENIDOS A PARTIR DEL COEFICIENTE DE SIMILITUD DE DICE.	80
FIGURA 38. PERFILES DE DGGE DE FRAGMENTOS DE LA REGIÓN V3 DEL GEN RIBOSOMAL 16S AMPLIFICADOS DE 5 MUESTRAS DE SEMILLA.....	83
FIGURA 39. PERFILES DE DGGE DE FRAGMENTOS DE LA REGIÓN V3 DEL GEN RIBOSOMAL 16S AMPLIFICADOS DE LAS MUESTRAS DE SEMILLA 5 EN CONSERVACIÓN.....	84
FIGURA 40. PERFILES DE DGGE DE FRAGMENTOS DE LA REGIÓN V3 DEL GEN RIBOSOMAL 16S AMPLIFICADOS DE LAS MUESTRAS DE FERMENTACIÓN DE AGUAMIEL CON LA SEMILLA 5.....	85
FIGURA 41. DIVERSIDAD DE BACTERIAS DETECTADAS EN LAS DIFERENTES SEMILLAS ANTES DE SU CONSERVACIÓN.....	86
FIGURA 42. DOMINANCIA DE BACTERIAS DETECTADAS EN LAS SEMILLAS ANTES DE SU CONSERVACIÓN.	87
FIGURA 43. DIVERSIDAD DE BACTERIAS DETECTADAS EN LAS MUESTRAS DE CONSERVACIÓN DE LA SEMILLA 5 EN CONGELACIÓN Y LIOFILIZACIÓN.....	87
FIGURA 44. DOMINANCIA DE BACTERIAS DETECTADAS EN LAS MUESTRAS DE CONSERVACIÓN DE LA SEMILLA 5 EN CONGELACIÓN Y LIOFILIZACIÓN.....	88
FIGURA 45. DIVERSIDAD DE BACTERIAS DETECTADAS EN LAS MUESTRAS DE FERMENTACIÓN DE AGUAMIEL CON LA SEMILLA 5, TIEMPOS 0, 12 Y 24 HORAS.....	88
FIGURA 46. DOMINANCIA DE BACTERIAS DETECTADAS EN LAS MUESTRAS DE FERMENTACIÓN DE AGUAMIEL CON LA SEMILLA 5, TIEMPOS 0, 12 Y 24 HORAS.....	89



ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1. COMPOSICIÓN MEDIA DEL AGUAMIEL DE TRES PLANTAS DE <i>A. MAPISAGA</i> EN PERIODO DE COSECHA (ORTIZ-BASURTO, 2008).	5
TABLA 2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PULQUE Y DEL AGUAMIEL (LÓPEZ-MUNGUÍA <i>ET AL.</i> , 2004).	6
TABLA 3. COMPAÑÍAS PRODUCTORAS DE PULQUE ENLATADO Y EMBOTELLADO EN MÉXICO (BANCOMEXT, 2007).	12
TABLA 4. ESTIMACIÓN DEL PORCENTAJE DE BACTERIAS CULTIVABLES EN DIVERSOS HÁBITATS, CUANTIFICACIÓN COMO UFC (AMANN <i>ET AL.</i> , 1995).	20
TABLA 5. ALGUNOS EJEMPLOS DE APLICACIONES DE DGGE EN ALIMENTOS FERMENTADOS.	25
TABLA 6. PROCEDENCIA Y MES DE LLEGADA DE LOS 5 LOTES DE SEMILLA UTILIZADOS EN EL ESTUDIO.	32
TABLA 7. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN ESTUDIADOS EN 5 LOTES DE SEMILLA.	33
TABLA 8. CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS E INTERVALO DE SENSIBILIDAD PARA LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.	35
TABLA 9. SECUENCIA DE LOS CEBADORES EMPLEADOS PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S POR PCR (AMPE <i>ET AL.</i> , 1999).	41
TABLA 10. CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S. (AMPE <i>ET AL.</i> , 1999).	41
TABLA 11. CONCENTRACIÓN DE LOS REACTIVOS EN LA PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL 16S.	41
TABLA 12. CARACTERÍSTICAS DE 5 LOTES DE SEMILLA ANALIZADOS: PROCEDENCIA, TEMPERATURA (T), PH Y SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES (°Bx). ND: NO SE DETERMINÓ.	45
TABLA 13. CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LOS 5 LOTES DE SEMILLA: OLOR, COLOR, TEXTURA Y SABOR. DETERMINADOS POR 3 ESTUDIANTES DE LABORATORIO.	46
TABLA 14. MORFOLOGÍA CELULAR DE LAS CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS (BAL) AISLADAS DE LA SEMILLA 5 ANTES DE SU CONSERVACIÓN (INICIAL) Y DESPUÉS DE SER CONGELADA Y LIOFILIZADA.	64
TABLA 15. MORFOLOGÍA COLONIAL DE LAS CEPAS DE LEVADURAS AISLADAS DE LA SEMILLA 5 ANTES DE SU CONSERVACIÓN (INICIAL) Y DESPUÉS DE SER CONGELADA Y LIOFILIZADA.	64
TABLA 16. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA CUENTA EN PLACA.	99
TABLA 17. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA AISLAMIENTO.	99
TABLA 18. RESULTADOS DE CEP DE 5 LOTES DE SEMILLA TIEMPO 0.	99
TABLA 19. CUENTAS DE LOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS EN LA SEMILLA 1 ALMACENADA A -20 °C DURANTE 90 DÍAS.	100
TABLA 20. CUENTAS DE LOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS EN LA SEMILLA 1 ALMACENADA A -65 °C DURANTE 90 DÍAS.	100
TABLA 21. CUENTAS DE LOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS EN LA SEMILLA 2 ALMACENADA A -20 °C DURANTE 90 DÍAS.	100
TABLA 22. CUENTAS DE LOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS EN LA SEMILLA 2 ALMACENADA A -65 °C DURANTE 90 DÍAS.	100
TABLA 23. CUENTAS DE LOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS EN LA SEMILLA 5 ALMACENADA A -65 °C DURANTE 92 DÍAS.	101
TABLA 24. RESULTADOS CEP SEMILLA 3 CONSERVADA POR LIOFILIZACIÓN DURANTE 2 DÍAS.	101
TABLA 25. RESULTADOS CEP SEMILLA 5 CONSERVADA POR LIOFILIZACIÓN DURANTE 2 DÍAS.	101
TABLA 26. CUENTAS DE LOS DIFERENTES GRUPOS MICROBIANOS EN LA SEMILLA 5 CONSERVADA MEDIANTE LIOFILIZACIÓN DURANTE 92 DÍAS.	101
TABLA 27. AGUA EXTRAÍDA DE SEMILLAS 3 Y 5.	102



TABLA 28. VALORES DE ABSORBANCIA DEL EXTRACTO DE ADN DE LAS SEMILLAS 1, 2, 3, 4 Y 5 TIEMPO 0.	102
TABLA 29. VALORES DE ABSORBANCIA DEL EXTRACTO DE ADN DE SEMILLA 5 EN CONSERVACIÓN DEL TIEMPO 0 AL 5.....	103
TABLA 30. VALORES DE ABSORBANCIA DEL EXTRACTO DE ADN DE LA FERMENTACIÓN DE LA SEMILLA 5..	104
TABLA 31. VALORES DE ABSORBANCIA DE PRODUCTOS DE PCR DE SEMILLAS 1, 2, 3, 4 Y 5 TIEMPO 0.....	104
TABLA 32. VALORES DE ABSORBANCIA DE PRODUCTOS DE PCR DE SEMILLA 5 CONGELADA Y LIOFILIZADA.	105
TABLA 33. VALORES DE ABSORBANCIA DE PRODUCTOS DE PCR DE FERMENTACIÓN DE AGUAMIEL CON SEMILLA 5.....	105
TABLA 34. ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.....	106
TABLA 35. ABREVIATURAS PARA LAS CLAVES DE LAS MUESTRAS DE EXTRACCIÓN DE ADN Y PCR.	106



1 INTRODUCCIÓN.

Las especies del género *Agave* se usan para producir bebidas fermentadas, como el pulque y destiladas como el tequila y los mezcales. El pulque, una bebida prehispánica, no destilada, es la más tradicional; debido a su importancia histórica, religiosa, social, médica y económica, es, dentro de las bebidas tradicionales, una de las más estudiadas desde diferentes puntos de vista (Gonclaves de Lima, 1990).

Los agaves viven en un medio semidesértico y entre sus hojas, llamadas pencas, se almacenan las sustancias nutritivas que le permiten sobrevivir en un medio hostil. En México se han usado como alimento, para la producción de bebidas alcohólicas, como sustituto del agua, producción de ropa y en medicina herbal.

A la savia del maguey se le denomina aguamiel, y es un líquido color ámbar, transparente, con olor herbáceo especial y un sabor dulce agradable. Por fermentación de éste se obtiene el pulque, que es una bebida alcohólica, blanca y viscosa. Se produce en el centro del país, principalmente en los estados de: México, Tlaxcala, Hidalgo, Querétaro, Puebla, Morelos, San Luis Potosí y en el Distrito Federal (Lappe *et al.*, 2008). Como inóculo se utiliza una “semilla” de pulque, que es el producto obtenido del aguamiel de primer grado de calidad y que se prepara para lograr la microbiota natural óptima que determina una correcta fermentación.

La fermentación tradicional del aguamiel para la obtención del pulque es muy compleja, ya que participan una gran cantidad de microorganismos, de manera que para obtener un producto de buena calidad es necesario mantener un equilibrio entre éstos. Si se controla la composición microbiológica del inóculo empleado, el pulque obtenido con ella tendrá una calidad constante.

La tradición del consumo de pulque se encuentra en vías de extinción ante la proliferación de nuevas y diversas bebidas. Se está perdiendo la costumbre de consumir pulque, ya que los jóvenes de las zonas productoras prefieren consumir otro tipo de bebidas. Una alternativa sería modificar la bebida tradicional, para



producirla con características aceptables por los consumidores actuales. Además, existe una demanda muy grande por parte de los mexicanos que se encuentran trabajando fuera del país, sobre todo en Estados Unidos.

Es necesario, entonces, desarrollar un proceso para la obtención de pulque bajo condiciones controladas y para esto debe desarrollarse también el proceso para la propagación y el mantenimiento de la semilla o inóculo tradicional que sirva para la producción de pulque en condiciones controladas.

El objetivo general de este trabajo es estudiar la composición microbiológica de la semilla para proponer un método de estandarización de la misma y con esto lograr una fermentación de calidad constante, Para esto se pretende: determinar la cantidad de levaduras, bacterias ácido lácticas (BAL), coliformes y enterobacterias presentes en 5 lotes de semilla; conocer el efecto de la congelación a -20 y -65 °C así como el de la liofilización en la sobrevivencia de estos grupos microbianos; y finalmente, detectar mediante la técnica PCR-DGGE si existen cambios en los patrones de bandas entre las diferentes semillas.



2 ANTECEDENTES.

2.1 Maguey, aguamiel y pulque.

El maguey es una planta monocotiledónea que pertenece al orden de las Amarilidáceas; se clasifica dentro de la familia *Agavaceae* y del género *Agave*; la palabra agave debe su origen a la voz griega *agavé* - admirable; se cultivó sobre todo en gran parte del altiplano central y su núcleo central fueron las tierras altas de Mesoamérica y las laderas de los cerros (Sierra, 2005).

Generalmente el maguey tiene un promedio de vida de doce años y su producción se realiza a través de la plantación de los mecuates o hijuelos, o mediante la siembra por semilla. Los primeros nacen de la raíz de la planta adulta, la que bien desarrollada puede producir entre 10 y 12 renuevos durante su vida (Sierra, 2005).

En México existen más de cien variedades de maguey, pero la que se cultivaba en la parte central del altiplano era la que producía el pulque que bebían los nahuas. Se produce en la mayoría de las entidades de Puebla, en algunos pueblos de Tlaxcala e Hidalgo, especialmente en Calpulalpan y Apan, en varias regiones del Distrito Federal y del Estado de México, incluyendo lo que comprende el mezquital (Valle de Toluca, zona norte y noreste del valle), Tenayuca, Texcoco, Teotenango, Teotihuacán, Tlapacoya, Chimalhuacán, etc. (Sierra, 2005).

El maguey usado en la elaboración del pulque comprende las siguientes especies del género *Agave*: *A. atrovirens*, *A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. ferox*, *A. hookeri* y *A. americana*. Los primeros 3 son los que más se utilizan (Figura 1). Estas variedades crecen en zonas semiáridas y templadas, suelos pobres, con lluvias escasas e irregulares (López-Munguía *et al.*, 2004).

Los principales estados productores de pulque son (Figura 2): Estado de México, Tlaxcala, Hidalgo, Querétaro, México D.F., Puebla, San Luis Potosí y Morelos (López-Munguía *et al.*, 2004).

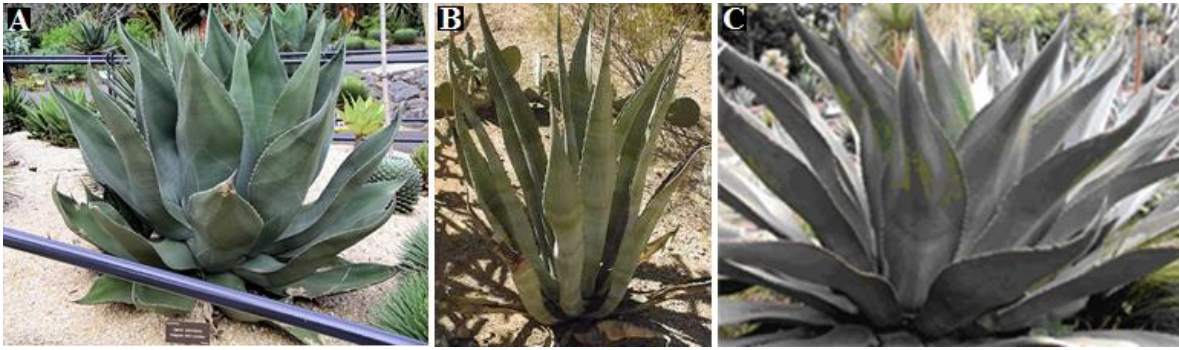


Figura 1. (A) *Agave atrovirens*, (B) *Agave mapisaga*, (C) *Agave salmiana* (Gardener, 2011).



Figura 2. Estados productores de pulque en México.

La materia prima utilizada es el aguamiel, que es la savia del maguey. Es un líquido color ámbar, translúcido, con olor herbáceo especial y un sabor dulce agradable. Éste contiene azúcares que servirán como sustrato para la fermentación. En un estudio realizado con aguamiel obtenido de *A. mapisaga*, también conocido como maguey manso, se determinó que contiene principalmente fructosa y glucosa (Tabla 1); además, contiene calcio, fósforo, vitamina C, etc. (Tabla 2). Las concentraciones varían durante el año, debido sobre todo a la presencia o ausencia de lluvias (López-Munguía *et al.*, 2004).

En la norma mexicana NMX-V-022-1972 se clasifica el aguamiel en dos tipos: El tipo I, que se refiere al producto de mayor limpieza (libre de insectos y otros



contaminantes) y con alto contenido de azúcares; y el tipo II, que incluye todos los otros tipos de aguamiel.

Tabla 1. Composición media del aguamiel de tres plantas de *A. mapisaga* en periodo de cosecha (Ortiz-Basurto, 2008).

Componente	Peso Medio % (en materia seca)
Fructosa	32.4 ± 3.9
Glucosa	26.5 ± 2.7
Sacarosa	8.8 ± 6.5
Fructo-oligosacáridos	10.2 ± 5.7
Aminoácidos libres	0.26 ± 0.05
Proteína	3.0 ± 0.6
Cenizas	3.3 ± 0.8

En la norma mexicana NMX-V-037-1972, el pulque se define como una bebida fermentada de bajo contenido alcohólico, no clarificada, de color blanco, ácida, de aspecto viscoso elaborada mediante el empleo como substrato fermentable del aguamiel obtenido del maguey pulquero. Tiene un pH de ~3.4 y un contenido alcohólico de ~45 g/L de etanol. Su composición se muestra en la tabla 2. Se clasifica en dos tipos: el tipo I incluye el pulque de semilla (cultivo iniciador) y el pie de cuba; y el tipo II que se refiere al pulque comercial.

El pulque es conocido por sus propiedades nutritivas, incluso en algunos pueblos se les da a los niños como sustituto de la leche (Ramírez, 2007). En la tabla 2 se muestra su composición química junto con la del aguamiel. Se observa que el



pulque tiene más proteína y fósforo que el aguamiel y menos cenizas, calcio, riboflavina, niacina y vitamina C.

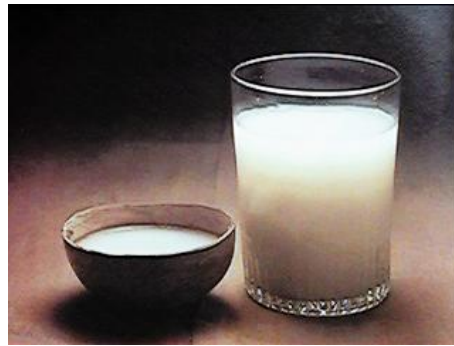


Figura 3. Pulque natural (Velarde, 2009).

Tabla 2. Composición química del pulque y del aguamiel (López-Munguía *et al.*, 2004).

Componente	Pulque	Aguamiel
Proteína (g/100g)	0.44	0.3
Cenizas (g/100g)	0.2	0.4
Calcio (mg/100g)	10	20
Fósforo (mg/100g)	10	9
Fierro (mg/100g)	0.7	-
Tiamina (mg/100g)	0.02	0.02
Riboflavina (mg/100g)	0.03	0.04
Niacina (mg/100g)	0.3	0.4
Vitamina C (mg/100g)	6.2	6.7



2.2 Historia del pulque.

El *Agave salmiana*, *A. mexicana* o *A. atrovirens*, que se designaba *tlacametl* o *teometl* es la variedad que abundaba en Tenochtitlán y sus alrededores, de donde se extraía el pulque que se utilizaba en las ceremonias de los nahuas (Sierra, 2005). Las propiedades que poseía el maguey, convertían a la planta en algo sagrado, se deificaba y convertía en la diosa: Mayáhuel (Figura 4).

El pulque es probablemente la bebida alcohólica mexicana más tradicional, más allá del tequila y del mezcal (Lappe *et al.*, 2008). En el México antiguo, esta bebida estaba presente tanto en la vida diaria, como en rituales religiosos y de guerra (Gonclaves de Lima, 1978). Los aztecas clasificaban al pulque en 3 tipos: *metoctli*, *iztaoctli* y *teoctli*. Además, se le denominaba *polihuhquioctli* al pulque descompuesto con mal olor y sabor.



Figura 4. Mayáhuel, Diosa mexicana del Maguey (Torretera, 2009).

Cuando cayó el imperio azteca el pulque perdió su importancia religiosa, pero la mantuvo como suplemento alimenticio y sustituto del agua (Gonclaves de Lima, 1990; Lappe y Ulloa, 1993). La bebida se volvió profana y se introdujo a las ciudades, principalmente la Ciudad de México (Gobierno del Estado de Hidalgo y Museo Nacional de Culturas Populares, 1988).



Durante el siglo XIX era la bebida predilecta de muchos mexicanos (ricos y pobres, jóvenes y adultos) y podía encontrarse en las mesas de la mayoría de los hogares del país. Para el inicio del siglo XX, era común toparse con alguna pulquería en las ciudades y pueblos de México (Ramírez, 2007).

El pulque alcanzó su mayor auge durante el porfiriato, al ponerse en marcha los ferrocarriles, que lo transportaban a los principales centros urbanos de la República. Así, de la carga diaria que llegaba a la ciudad de México, 30% lo constituía esta bebida. En esta época existían entre 1200 y 1500 pulquerías en la capital. Sin embargo, existieron campañas en su contra por parte de la Iglesia Católica, el gobierno e intelectuales, manifestando que embrutecía a la población (Ramírez, 2007).

En 1913 vio su fin casi definitivo, pues Calles llevó a cabo campañas anti pulqueras. Con el reparto de tierras, en el periodo de Venustiano Carranza, se dividió la zona de Apan, donde estaban las haciendas pulqueras (Ramírez, 2007).

El declive del consumo sucedió al término de la Revolución. Para 1882, de todas las bebidas consumidas en México, 94 % era pulque, en 1929 el porcentaje se redujo a 58 %, y después de la Segunda Guerra Mundial fue de 48 % (Ramírez, 2007).

Actualmente el pulque persiste como bebida típicamente popular, y hasta hace poco se vendía solamente en pulquerías (Tovar, 2008). Su consumo varía con la edad y el tipo de consumidor, así como la ocasión ya sea en festividades o cultos. Para la población de bajos recursos, el pulque sigue siendo la bebida estimulante preferida y se sabe que forma parte importante de su dieta diaria, debido a su aporte de vitaminas y aminoácidos esenciales (Steinkraus, 1996; Ramírez *et al.*, 2004). Estudios especializados afirman que el pulque es una de las bebidas alcohólicas más completas y balanceadas, debido a sus niveles vitamínicos y energéticos (Peña-Espinosa, 2004; Martínez-Salvador *et al.*, 2005).

Considerando que el pulque es una bebida alcohólica, su consumo tiene los mismos riesgos asociados a la ingesta excesiva de cualquier bebida alcohólica no destilada; hasta el momento no hay efectos tóxicos reportados diferentes a los



relacionados con el consumo excesivo de cualquier bebida alcohólica. Desde mitades del siglo XX, varios autores han intentado correlacionar la alta incidencia de cirrosis y mortalidad en zonas rurales del centro del país con el consumo de pulque. Sin embargo, hay otros factores asociados con el consumo de la bebida, como la presencia de endotoxinas producidas por enterobacterias, la desnutrición de los consumidores o las pocas condiciones sanitarias con las que se produce el pulque, que incrementan la tasa de enfermedad (Narro-Robles *et al.*, 1992; Vargas *et al.*, 1998; Kershenovich, 1999).

2.3 Proceso de elaboración del pulque.

2.3.1 Tradicional.

Cuando el maguey tiene la edad adecuada (8 a 12 años de plantado), se observa un adelgazamiento en la base del “meyolote” (cogoyo o yema central) y se procede a efectuar la operación de “capado”. De no caparse, del cogoyo surge la flor. La cantidad y calidad de aguamiel que producirá la planta depende de un capado en el tiempo adecuado. El “tlachiquero” efectúa la operación que consiste en cortar con un cuchillo las púas laterales de las pencas hasta llegar al corazón, para después cortar éste y extraerle un trozo del extremo inferior (Figura 5a), que los campesinos llaman “huevo” (López-Munguía *et al.*, 2004).

El maguey se deja reposar hasta por 6 meses y se inicia entonces el “raspado” y extracción el aguamiel (Figura 5b). Éste es obtenido por succión con ayuda el “acocote” (fruto hueco y seco del calabazo con agujeros en ambos extremos). (López-Munguía *et al.*, 2004).

Después de la extracción, se raspa el fondo del tronco con un raspador de metal y se tapa el centro de la planta con pencas y piedras para proteger el jugo de la lluvia e insectos. Cada planta puede producir durante 6 meses, 2 veces al día, una cantidad diaria de 3 a 4 L de aguamiel, después de lo cual la planta muere. El aguamiel es vaciado en “castañas” o bidones de plástico para su transportación (López-Munguía *et al.*, 2004). De ahí se transporta al tinacal, que es el lugar donde se lleva a cabo la fermentación. Éste consta de tinas de madera en donde se vierte el aguamiel y es en este punto donde se agrega la semilla con el



propósito de acelerar la fermentación, que es espontánea (Figura 5e). Finalmente, pasadas varias horas o una noche se obtiene el pulque, que es transportado para su comercialización (Figura 5f).

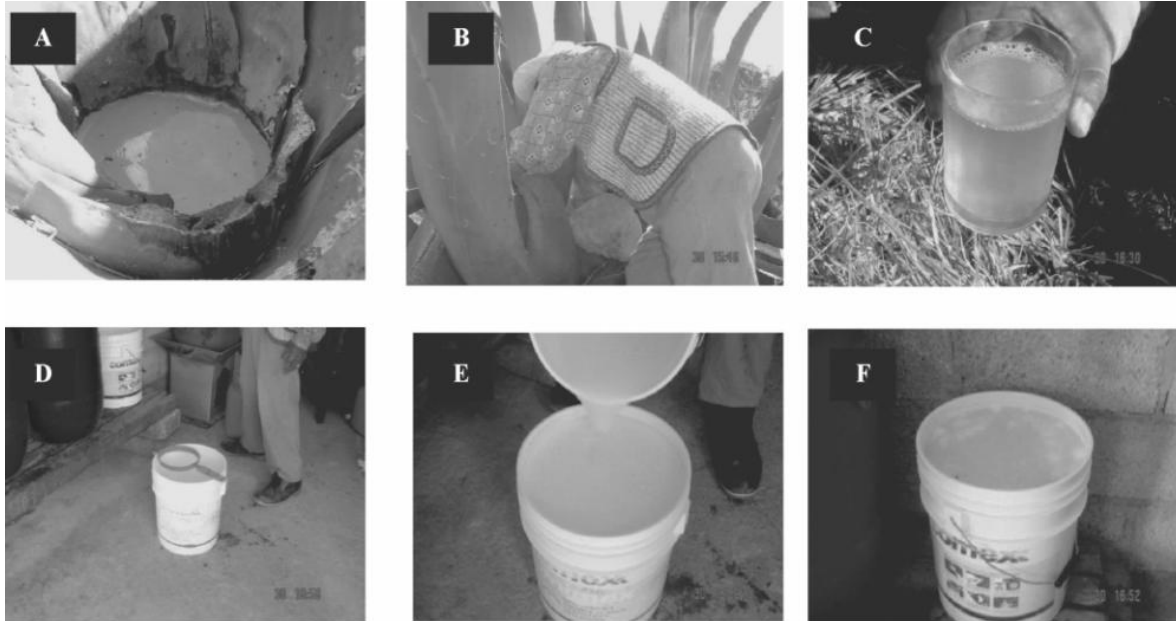


Figura 5. Proceso tradicional de elaboración del pulque. (A) Penca de maguey en producción, (B) raspado de la penca de maguey, (C) aguamiel obtenido de la penca, (D) preparación de la semilla, (E) mezcla de la semilla y aguamiel, (F) corrida o pulque maduro (Cervantes-Contreras *et al.*, 2007).

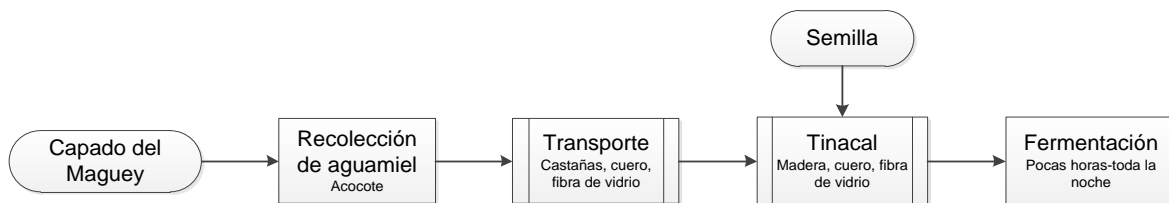


Figura 6. Diagrama de flujo general de la producción tradicional del pulque (Escalante *et al.*, 2004; Lappe *et al.*, 2008; López munguía *et al.*, 2004).

El proceso de elaboración se lleva a cabo en condiciones no asépticas. Esto es desde que el aguamiel está en el maguey expuesto a lluvias y animales; posteriormente, los recipientes con los que se extrae y transporta el aguamiel no son sometidos a ningún tipo de esterilización o desinfección, más allá de un lavado con agua y jabón; y finalmente, el tinacal y el lugar de almacenamiento



tienen condiciones no estériles. Por lo tanto, los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación son aquellos provenientes del aguamiel, junto con los incorporados en el proceso de recolección, transporte, inoculación y manipulación (Escalante *et al.*, 2004).

Durante la elaboración tienen lugar 3 procesos: fermentación alcohólica, fermentación ácida y producción de viscosidad. El primero es llevado a cabo por *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis*; el segundo, por *Lactobacillus* spp.; y el tercero por *Leuconostoc mesenteroides* (Lappe *et al.*, 2008).

2.3.2 Industrial.

Con el fin de evitar que esta bebida se pierda y para promover tanto su consumo como el cultivo del agave, es importante realizar estudios sobre su producción en condiciones controladas. Se iniciaron estudios sobre la industrialización del pulque desde los inicios del siglo XX, pero la primera planta piloto se montó en 1960. En esta época se desarrollaron tecnologías tendientes, entre otras cosas, a la estandarización del proceso de producción de pulque. Se utiliza como materia prima el aguamiel pasteurizado y se prepara un inóculo con un cultivo mixto iniciador de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* para la fermentación alcohólica, *Lactobacillus* spp. para la fermentación láctica y *L. mesenteroides* para la producción de viscosidad (Lappe *et al.*, 2008). La fermentación se lleva a cabo en tanques estériles con capacidad de 5 y 10 mil litros y se controla la temperatura entre 20 y 25 °C (López-Munguía *et al.*, 2004).

En la producción industrial de pulque se obtiene un producto estable, higiénico, de buena calidad y con larga vida de anaquel. Se envasa en botellas de vidrio o en latas de aluminio.

En el mercado el precio del pulque es bajo y muy variado. Además, el consumo de pulque fresco está disminuyendo considerablemente; sin embargo, el estudio de mercado que se tiene en relación al pulque envasado presenta mucha rentabilidad (Abundis-Vagas, 2007; BANCOMET, 2007). Con base en un estudio de mercado en Europa y Asia se ha llegado a la conclusión de que el pulque enlatado podría competir de manera exitosa en una representación innovadora que cumpla con



estándares de calidad mundial. (Colunga-García y May-Pat, 1993; Franco, 1995; BANCOMEXT, 2007).

En la actualidad existen 4 productores de pulque industrializado que se exportan al extranjero, principalmente a Estados Unidos de América (Tabla 3, Figura 7).

Tabla 3. Compañías productoras de pulque enlatado y embotellado en México (BANCOMEXT, 2007).

Marca	Compañía	Exportación
Hacienda 1881	Torre Grande	E.U.A., Alemania y Austria
Cool Passion	Poliqhui	E.U.A. y China
La lucha	Pulquemex	E.U.A.
Néctar del Razo	Néctar del Razo	E.U.A., Canadá y Ucrania



Figura 7. Algunas marcas de pulque comercial. (A) Néctar del Razo, (B) CoolPassion, (C) Hacienda 1881, (D) La lucha.



2.4 Semilla de pulque.

Para generar lo que se denomina semilla del pulque se realiza un proceso de fermentación, el cual inicia en el maguey, donde se encuentran microorganismos autóctonos como levaduras, BAL, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de exopolisacáridos (Cervantes-Contreras *et al.*, 2007). Sin embargo, se puede acelerar este proceso por la adición de un cultivo iniciador llamado “semilla”, “nana”, “madre” o “pie de cuba”, que es una porción de pulque previamente preparado, lo que disminuye el tiempo que tomará la fermentación espontánea, de más de dos semanas a 36 horas (López-Munguía *et al.*, 2004).

El cultivo iniciador se realiza con 10-15 L de aguamiel de la mejor calidad que se fermenta espontáneamente en un recipiente cerrado. Después de varios días, dependiendo de las condiciones ambientales y otros factores no controlables, termina la fermentación alcohólica y empieza la fermentación acética. En este punto se forma una capa espesa en la superficie, indicando que la semilla está lista para una segunda fermentación. Ésta se mezcla con un lote de 600-900 L de aguamiel tipo I a una concentración de 1-3 % y es fermentado hasta que el contenido de azúcares limite el crecimiento microbiano (pie de cuba). De aquí se toma el inóculo para mezclar con aguamiel regular para la producción de pulque en una proporción 1:1 (Lappe *et al.*, 2008).

La Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (SECOFI) en la Norma Mexicana (NMX-V-037-1972) define a la semilla de pulque como: *“el producto obtenido del empleo del aguamiel de primer grado de calidad y que se prepara para lograr una flora natural microbiana óptima que determina una correcta fermentación en la elaboración del pulque, y pudiendo agregarse las substancias que, aprobadas por la Secretaría de Salubridad y Asistencia, se destinen a favorecer el mejor crecimiento de los diversos microorganismos propios del aguamiel que intervienen en el proceso fermentativo”*.

La calidad de la semilla es esencial para una correcta fermentación y por lo tanto obtener un producto final con las características deseadas. Sin embargo, no existen muchos estudios sobre este inóculo, ya que los productores industriales



utilizan cultivos puros iniciadores y los productores rurales realizan el procedimiento de manera empírica. Por lo tanto, es necesario estudiar la composición microbiológica del inóculo para poder estandarizarlo y así controlar el proceso de fermentación.

2.5 Métodos de conservación de microorganismos.

Existen varios métodos para conservar los cultivos bacterianos y de levaduras. La refrigeración puede utilizarse para la conservación a corto plazo. Sin embargo, a largo plazo se utilizan la ultracongelación y la liofilización. La ultracongelación es un proceso por el cual se coloca un cultivo puro suspendido en un líquido que contiene un agente crioprotector (generalmente se utiliza glicerol) y se congela rápidamente a temperaturas que varían entre -50 y -95 °C (Tórtora, 2007). El cultivo puede descongelarse y cultivarse incluso varios años después. Para conservar los cultivos mediante liofilización, la suspensión se congela rápidamente y el agua se elimina por sublimación. El sólido resultante con los microorganismos sobrevivientes se puede conservar durante años. Desde un punto de vista comercial han sido desarrollados una gran variedad de metodologías para la liofilización de cultivos bacterianos. La mayoría de los estudios tienen relación con la producción de células deshidratadas de BAL por liofilización que incluyen varias especies de *Lactobacillus*, los cuales son utilizados en la industria de alimentos (Tórtora, 2007).

2.5.1 Congelación.

El almacenamiento en congelación a -18 °C no destruye totalmente los microorganismos presentes en los alimentos, aunque éstos sufran cierto daño por el choque térmico, el crecimiento de los cristales de hielo intracelulares y el aumento de concentración de los solutos en la fracción no congelada. El efecto depende de la rapidez de la congelación, del medio en el que se encuentren las bacterias y de la fase de crecimiento (en fase estacionaria la supervivencia es mayor). Para minimizar los efectos, se debe congelar la muestra con la mayor velocidad posible, favoreciendo así la formación de cristales de menor tamaño y forma redonda (Ordoñez *et al.*, 1998).



No todos los microorganismos tienen la misma sensibilidad a la congelación, dependiendo de la tolerancia de la actividad de sus sistemas enzimáticos y de la composición lipídica de su membrana a bajas temperaturas. Las esporas de bacterias y mohos son muy resistentes y, entre las células vegetativas, las bacterias Gram-positivas, especialmente los cocos Gram-positivos, son más resistentes que las Gram-negativas. Durante el almacenamiento en congelación la mayoría de las Gram-positivos apenas se ven afectadas. Generalmente la mayor tasa de destrucción bacteriana se observa inmediatamente tras la congelación, después se reduce notablemente y llega a estabilizarse durante largos períodos de tiempo. Por esto, aunque el número de sobrevivientes disminuya, la congelación es un método efectivo para mantener la viabilidad de las bacterias. Cuanto menor sea la temperatura de almacenamiento, mayor será la supervivencia de las bacterias (Ordoñez *et al.*, 1998).

La posibilidad de mantener la viabilidad de las bacterias con un adecuado control de la congelación hace que se emplee como método de conservación de los cultivos bacterianos para la elaboración de productos fermentados. Para conseguir la mínima destrucción de las bacterias es importante que la cristalización sea extracelular y que las bacterias se deshidraten parcialmente impidiéndose la nucleación intracelular, pero no lo suficiente como para que se reduzca su viabilidad. Existen sustancias llamadas agentes crioprotectores, como el dimetilsulfóxido, glicerol, clara de huevo, que ayudan a proteger los microorganismos durante el proceso de congelación. Estas sustancias tienen un bajo punto de congelación (menor a 0 °C), por lo que reducen la velocidad de congelación de los componentes de la célula microbiana (Hernández *et al.*, 2003; Ordoñez *et al.*, 1995).

2.5.2 Liofilización.

La liofilización, también denominada criodeshidratación, es un tipo especial de deshidratación por sublimación o transformación directa del hielo en vapor, sin pasar por el estado líquido. Para que ocurra esto, la temperatura y la presión parcial de vapor de agua han de ser inferiores a las del punto triple, es decir,



0.0099 °C y 610.5 Pa (Figura 8). Si en estas condiciones se aporta el calor latente de sublimación, unos 2.84 MJ/kg, el hielo se transforma directamente en vapor, sin llegar a fundirse (Ordoñez *et al.*, 1995).

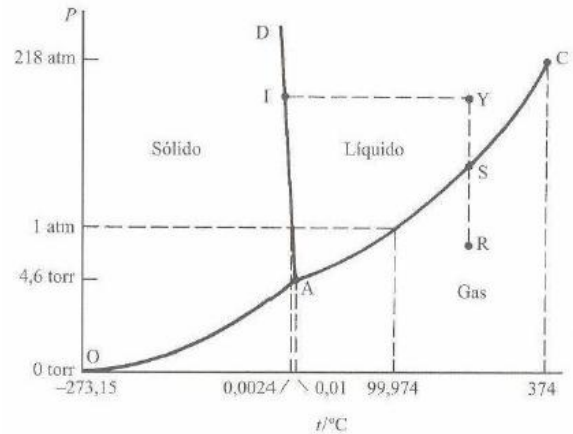


Figura 8. Diagrama de fases del agua (Levine, 2005).

El paso previo a la liofilización es la congelación de los productos. Tiene por objetivo transformar las soluciones acuosas de los alimentos en una mezcla de dos fases: una constituida por cristales de hielo y otra por la solución concentrada de los solutos. El tipo y velocidad de congelación tiene una gran repercusión en la estructura final del producto porque la distribución de los poros en él depende del tamaño y localización de los cristales de hielo formados. El proceso de congelamiento como tal es asociado con la pérdida de viabilidad de los cultivos. Para contrarrestar este fenómeno son utilizados generalmente crioprotectores, como es el caso de la leche descremada, que evitan el daño celular producido en la liofilización (Leiva-Guzmán, 2006).

Las características particulares de cada alimento determinarán las condiciones adecuadas. Para la liofilización de líquidos, por ejemplo, se favorece la congelación lenta para que el tamaño de los cristales sea grande y se forme con ellos una red cristalina; de esta forma la estructura porosa facilitará tanto el escape del vapor de agua durante la liofilización como su posterior rehidratación (Ordoñez *et al.*, 1995). En algunos líquidos el movimiento del vapor de agua es difícil porque al congelarse, tienen una estructura vítrea, como los jugos de fruta con un elevado



contenido de azúcares. En este tipo de productos es necesario formar canales por donde se pueda escapar el vapor de agua, ya sea congelándolos en forma de espuma, mezclándolos con sólidos o triturándolos tras su congelación (Ordoñez *et al.*, 1995).

2.6 Técnicas utilizadas en la microbiología de alimentos.

2.6.1 Conteo de microorganismos.

El cultivo de bacterias y el conocimiento de su velocidad de crecimiento son necesarios para el estudio de la fisiología microbiana. El crecimiento bacteriano depende de la capacidad de las células para multiplicarse. Éste se puede monitorear directamente por enumeración microscópica o electrónica, también se puede medir la biomasa por turbidimetría en cultivos líquidos. Sin embargo, estas metodologías incluyen a microorganismos viables y no viables, además de las células dañadas. Por lo tanto, si lo que interesa es cuantificar a los microorganismos activos, se puede evaluar el crecimiento mediante la enumeración de unidades formadoras de colonias o UFC, método que consiste en separar las células diluyéndolas, de tal manera que cada una se multiplique y forme una colonia (Koch, 2007). La técnica comúnmente utilizada es la cuenta en placa. Dependiendo del medio de cultivo, las condiciones de temperatura y la atmósfera nos permitirán seleccionar grupos de microorganismos que sean de interés en el estudio.

Una vez diluida la muestra, se transfiere al medio de cultivo utilizando una pipeta, posteriormente se distribuye la muestra de manera homogénea en la superficie del medio. Después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, se cuentan las UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de inocularla en el medio de cultivo (Camacho *et al.*, 2009).



2.6.2 Aislamiento de microorganismos.

Para poder trabajar con una especie determinada de un microorganismo es necesario tener un cultivo puro, el cual es aquél en el que sólo existe un tipo de microorganismos, descendientes de un solo individuo y de características idénticas (Velázquez, 2008). En la observación microscópica se deben observar células con apariencia similar, particularmente en el diámetro de las mismas y en la reacción de Gram. Sin embargo, hay excepciones, por ejemplo, hay células provenientes de un cultivo puro que pueden ser lisas o rugosas o puede variar la tinción de Gram (Teske *et al.*, 2007).

Para obtener un cultivo puro es necesario aplicar técnicas de aislamiento, como lo son la separación física de microorganismos o el uso de medios de cultivo selectivos, éstos son diseñados para crecer microorganismos con ciertas características. Por ejemplo resistencia a antibióticos; o bien para inhibir a un grupo de microorganismos, por ejemplo el verde brillante inhibe a las bacterias Gram-positivas (Teske *et al.*, 2007). Los medios se diseñan dependiendo del tipo de microorganismo que se quiere aislar. Sin embargo, la obtención de una colonia individual no siempre asegura su pureza, ya que las colonias pueden surgir tanto de una sola célula como de un agregado de ellas. Es conveniente el enriquecimiento con los medios selectivos, aunque también es importante utilizar medios no selectivos, ya que en éstos se pueden detectar más fácilmente los contaminantes.

Una vez aisladas las cepas de microorganismos, para conservarlas correctamente es necesario que el cultivo sea puro, evitando que se produzcan contaminaciones durante el proceso de conservación; que durante el tiempo de conservación sobrevivan las células, y por último, que estas células permanezcan genéticamente estables. Para verificar su pureza se hacen observaciones macroscópicas y microscópicas.

Una vez se verifica la pureza del cultivo, se conserva en ultra congelación (-70 °C) utilizando agentes crioprotectores como el glicerol.



2.7 Técnicas de biología molecular utilizadas en alimentos.

La biología molecular aplicada está avanzando mucho en los últimos años. Una de las ramas de esta disciplina se basa en desarrollar métodos moleculares para la identificación y el monitoreo de los microorganismos en ecosistemas naturales. La tendencia es hacia los métodos independientes de cultivo, ya que éstos evitan los problemas relacionados con el uso de medios selectivos para aislar microorganismos de muestras ambientales. Éstos han revelado que la diversidad microbiana es mucho mayor de lo que se había considerado (tabla 4), ya que más del 90 % de los microorganismos en ambientes naturales no han sido cultivados o no pueden ser cultivados usando técnicas tradicionales (Díaz y Wachter, 2003). Una razón de esto es la falta de conocimiento de las condiciones reales en las que las bacterias crecen en su hábitat natural y la dificultad para desarrollar medios que reproduzcan estas condiciones (Ercolini, 2003). Debido a esto se ha recurrido a técnicas moleculares que suplen o muchas veces complementan a las técnicas microbiológicas tradicionales.

En biología molecular se utilizan macromoléculas llamadas marcadores moleculares o cronómetros evolutivos. Son funcionalmente constantes, se encuentran distribuidas universalmente y sus secuencias son moderadamente conservadas en la mayoría de los organismos. Tienen regiones conservadas y regiones variables. Las primeras permiten la amplificación por PCR directamente de ADN “comunitario” que ha sido extraído directamente de una muestra ambiental, mientras que las segundas proporcionan una idea de la diversidad (Marsh y Nakatsu, 2007).

En procariontes, el ADNr 16S (~1500 nucleótidos) es el más utilizado, ya que las secuencias de los genes que codifican dicha unidad ribosomal, reflejan la relación evolutiva de los microorganismos (Woese, 1987). Por otra parte, el ARNr presenta secuencias firma u oligonucleótidos cortos que son únicas para cierto grupo de organismos. Con base en la secuencia de los genes ribosomales se definieron los tres dominios de la vida: Arquea, Bacteria y Eucaria. Las secuencias firma se encuentran generalmente en regiones bien definidas dentro de la molécula del ADNr 16S. Debido a que se trata de secuencias únicas para cada tipo de



organismo, son útiles para situar organismos desconocidos en el grupo filogenético principal que les corresponde (Marsh y Nakatsu, 2007).

Tabla 4. Estimación del porcentaje de bacterias cultivables en diversos hábitats, cuantificación como UFC (Amann *et al.*, 1995).

Hábitats	% de bacterias cultivables
Océanos	0.001-0.1
Agua dulce	0.25
Lagos mesotróficos	0.1-1
Aguas estuarinas no contaminadas	0.1-3
Lodos activados	1-15
Sedimentos	0.25
Suelos	0.3

Es necesario estudiar el ecosistema completo debido a que el crecimiento, la sobrevivencia y actividad de cualquier especie, pueden estar determinados por la presencia de otras especies (Díaz y Wachter, 2003). Para determinar la estructura de las comunidades microbianas presentes la estrategia es: aislar microorganismos y tipificarlos, utilizando técnicas moleculares como: polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción, amplificación aleatoria de ADN polimórfico, polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados, análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (RFLP, RAPD, AFLP, ARDRA; por sus siglas en inglés, respectivamente); o utilizar métodos independientes de cultivo como la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante o electroforesis en gel con gradiente de temperatura (DGGE, TGGE; por sus siglas en inglés, respectivamente). A partir de 1995 con los



trabajos de Amann *et al.*, los métodos para el análisis de las comunidades microbianas cambiaron considerablemente.

2.7.1 PCR-DGGE.

En los últimos años, las técnicas moleculares que incluyen huellas genéticas, han resultado un excelente método para comparar numerosas muestras. Las huellas de comunidades microbianas proveen un patrón de bandas o perfil que refleja la diversidad genética de la comunidad.

DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante) es quizás la técnica no dependiente de cultivo más utilizada en la obtención de huellas de comunidades microbianas. Se basa en la separación de amplicones de PCR del mismo tamaño pero diferente secuencia dependiendo de su perfil de desnaturalización diferencial de fusión, el cual depende del contenido de G-C. La técnica fue diseñada inicialmente para detectar mutaciones puntuales en el área de medicina humana, ya que presenta una confiabilidad de hasta el 99%; sin embargo, Muyzer la introdujo en 1993 al campo de la ecología microbiana.

Es una técnica muy versátil, se usa para estudiar la estructura de comunidades microbianas y su dinámica ante los cambios ambientales. Ha sido adaptada a muchos laboratorios como una herramienta útil, rápida y confiable que facilita la identificación de poblaciones individuales por análisis de hibridación con sondas específicas o por análisis de secuencias de bandas individuales (Bolaños, 2004).

2.7.1.1 Pasos previos al DGGE.

- a) Extracción y purificación del ADN de un cultivo o de una muestra microbiana natural (alimento, suelo, agua, sedimento, entre otras).
- b) Amplificación del ADN obtenido mediante la reacción en cadena de la polimerasa. En este paso, se usan cebadores correspondientes al grupo en estudio (levaduras, bacterias, etc.).

2.7.1.2 DGGE.

El principio de la técnica se basa en la separación y en la movilidad electroforética de un fragmento de ADN de doble cadena que conforme va migrando en el gel de



poliacrilamida se va deteniendo parcialmente de acuerdo a su secuencia nucleotídica. Lo anterior se logra porque los fragmentos de ADN contienen dominios con grados de desnaturalización (T_m) característicos, de manera que cuando se alcanza una determinada concentración de desnaturalizante, la molécula se funde parcialmente y deja de migrar en el gel (Figura 9). Los gradientes de fusión de esos dominios dependen de las variaciones en sus secuencias de bases, por lo que los fragmentos correspondientes a microorganismos diferentes tendrán diferentes posiciones en el gel (Muyzer y Smalla, 1998).

Se realiza un gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante de urea y formamida. El gradiente óptimo se determina empíricamente realizando una electroforesis con gradiente perpendicular al campo eléctrico. La electroforesis es llevada a cabo a temperatura y voltaje constantes por un tiempo determinado (Marsh y Nakatsu, 2007). Para evitar la disociación completa del fragmento de ADN de doble cadena que corre por el gel de DGGE, se debe colocar en uno de los extremos de los cebadores una secuencia de aproximadamente 40 nucleótidos de G+C conocida como grapa de GC (Fromin *et al.*, 2002).

En el análisis de DGGE, el patrón de bandas generado es considerado como una huella de la comunidad bacteriana, donde cada una de las bandas representa a un organismo diferente en la comunidad. Además, la intensidad de la banda muchas veces está relacionada directamente con la abundancia relativa del filotipo bacteriano presente en la muestra (Muyzer *et al.*, 1995; van Hannen *et al.*, 1999). Por lo tanto, para obtener la huella óptima de la comunidad es necesario probar varias condiciones de gradiente desnaturalizante.

No obstante, en estudios se menciona que al utilizar técnicas moleculares muy sensibles tales como el DGGE o TGGE se puede observar que en una sola banda de ADNr 16S haya más de dos especies de bacterias (van Hannen *et al.*, 1998; Sekiguchi *et al.*, 2001). Lo anterior se atribuye a principalmente a una micro variación producto de la incorporación de artefactos. Esto puede ocurrir por una variabilidad natural, por una introducción artificial proveniente de la amplificación



por PRC y/o por técnicas de clonación o por la presencia de copias de los genes que tienen pequeñas diferencias en sus secuencias.

En la interpretación de los perfiles en gels de DGGE, esto significa que una sola banda puede representar varias especies, o que una especie podría estar representada por un grupo de bandas. Este fenómeno está asociado con la heterogeneidad intraespecífica, que es el resultado de las múltiples copias de los genes del ARNr que involucran diferencias en su secuencia (cistrones que codifican al ARNr 16S con diferente secuencia en un solo genoma) (Dahllöf *et al.*, 2000). Se han propuesto técnicas para evitar el fenómeno de la heterogeneidad, como la de Dahllöf *et al.* (2000), quienes plantean utilizar el gen *rpoB* de la subunidad beta de la RNA polimerasa, de la cual parece sólo existe una copia por bacteria.

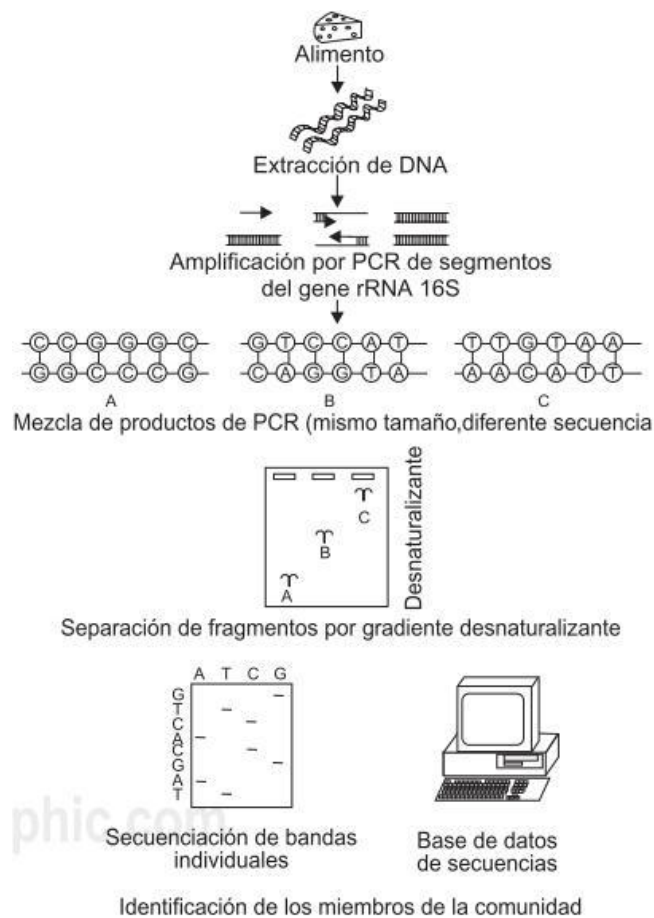


Figura 9. Técnica de DGGE (Díaz y Wachter, 2003).



Existen varios trabajos en los que se menciona que cuando se trabaja con mezclas de ADN de comunidades complejas, es muy común que se presente el fenómeno de amplificación preferencial, ya que las moléculas de ADN presentes que sirven como templado, en su mayoría no son homogéneas (Wintzingerode *et al.*, 1997). En la mayoría de los casos la amplificación preferencial está en función de la selección de cebadores, del número de ciclos de replicación y del contenido de G + C en el fragmento de ADN a amplificar. Los genes que tienen un alto contenido de G + C, tienen poca eficiencia para disociarse y con ello dificultan su amplificación, por su parte, los genes con bajo contenido de G + C se disocian fácilmente pudiendo presentar una amplificación preferencial sobre los anteriores.

Se trata de una metodología rápida, simple, sensible y reproducible. Sirve para realizar estudios preliminares de diversidad microbiana como antecedente para un estudio posterior más detallado; comparar comunidades microbianas en muestras tomadas de diferentes sitios de un mismo tipo de ecosistemas; comparar una misma comunidad a lo largo del tiempo o en presencia de diferentes condiciones ambientales; y también se puede detectar e identificar microorganismos no cultivables (Bolaños, 2004).

Sin embargo, existen algunas desventajas, como lo son el alto costo del equipo; pueden ser necesarios varios estudios preliminares antes de obtener la huella genética óptima de una comunidad; los cebadores son más caros pues llevan grapa de GC; sólo pueden separarse fragmentos pequeños, de hasta 500 pb; falta de información filogenética; dificultad de separar fragmentos que difieren en 2 o 3 bases; co-migración de fragmentos de ADN; subestimación de la diversidad microbiana; y dificultad para extraer bandas para su identificación.

2.7.1.3 Aplicación de DGGE en alimentos fermentados.

La primera aplicación de PCR-DGGE en microbiología de alimentos fue reportada por Ampe *et al.*, en 1999, que publicó un trabajo relacionado con la distribución de microorganismos en el pozol. Se identificaron bacterias ácido lácticas secuenciando fragmentos de ADN a partir de perfiles de DGGE obtenidos después de la extracción directa de ADN de muestras de pozol y la amplificación de la



región variable V3 del gen 16S ADNr. Combinando los resultados del análisis de perfiles de DGGE, hibridación con 16 ARNr y la detección de productos de fermentación, se obtuvo información de los posibles papeles biológicos de los tipos de microorganismos presentes en el pozol y el desarrollo de la fermentación.

En los últimos años se han realizado estudios para identificar bacterias lácticas, levaduras y hongos aislados de alimentos utilizando la técnica de DGGE (Tabla 5). Se considera un método sensible y rápido, que permite monitorear los cambios en las comunidades microbianas durante la fermentación de alimentos.

Tabla 5. Algunos ejemplos de aplicaciones de DGGE en alimentos fermentados.

Fecha	Alimento de estudio	Referencia
2011	“Tayohounta”	Chadare <i>et al.</i>
2011	Cacao	Papalexandratou <i>et al.</i>
2012	Salsa de soya	Tanaka <i>et al.</i>
2012	Tibicos	Hsieh <i>et al.</i>
2012	“Fen-Daqu”	Zheng <i>et al.</i>
2012	“Douchi”	Chen <i>et al.</i>
2012	“Daqu”	Xiu <i>et al.</i>

Xiu *et al.* (2012) estudiaron la diversidad de los microorganismos presentes en: el moldeado, la maduración y el secado del Daqu, un cultivo iniciador y sustrato en la elaboración de Maotai, una bebida alcohólico-espirituosa china, mediante PCR-DGGE. Se amplificó el 16S y 18S del ADNr utilizando PCR y PCR anidado, utilizando diferentes combinaciones de cebadores para bacterias, levaduras y



mohos; posteriormente, se analizaron los amplificadores mediante DGGE para identificar los constituyentes de las comunidades microbianas.

El Daqu es un cultivo mixto iniciador con denominación de origen, es abundante en microorganismos y enzimas que éstos producen. Se prepara con trigo y agua, se moldea en forma de tabiques, se fermenta por un mes y se seca por 3-4 meses, para su posterior utilización como inóculo. La microbiota proveniente del trigo, es detectable durante cada etapa del proceso de fermentación. No obstante, la estructura microbiana es diferente en los procesos de moldeado, maduración y secado. En la primera etapa, había un alto nivel de diversidad de la BAL y hongos. En la fase de maduración, se observó una reducción de la diversidad de los hongos y un aumento en la diversidad de los bacilos en las muestras maduras. En la etapa de secado, la diversidad de bacilos y hongos, especialmente bacterias productoras de ácido, se reduce drásticamente. Además, se detectó por primera vez en fermentaciones alcohólicas *Microbacterium testaceum*, *Cochliobolus* sp., *Thermoascus crustaceus* y cepas no cultivadas de *Lactococcus* sp.

Chen *et al.* (2012), utilizaron la técnica de PCR-DGGE por primera vez como un método efectivo de estudio de comunidades microbianas en diferentes muestras de Douchi. Se amplificó la región V3 del 16S del ADNr para bacterias; además, se utilizaron cebadores para *Bacillus* y mohos. El Douchi es un alimento tradicional Chino hecho a base de soya que se ha consumido por miles de años como una fuente importante de proteína y como sazonador; sin embargo, hay pocos estudios sobre su composición microbiológica. Las cuentas microbianas tuvieron diferencias significativas en las diferentes muestras de Douchi. A pesar de que los índices de diversidad de bacterias, *Bacillus* y mohos fueron de 79, 70 y 64%, respectivamente, algunos microorganismos predominaron en las diferentes muestras; por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas* sp., *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia farinose*. Además, se encontraron algunos patógenos como *Staphylococcus saprophyticus*, *Pantoea* sp., *Staphylococcus sciuri*, *Enterobacter* sp. y *Staphylococcus* sp. Esta información puede ser útil para mejorar la calidad del producto, reformar el proceso de elaboración, aumentar la vida de anaquel y el escalamiento del proceso de fermentación.



Tanaka *et al.* (2012), estudiaron por primera vez las comunidades involucradas en el proceso de elaboración de salsa de soya utilizando un método independiente del cultivo. La salsa de soya es un condimento tradicional producido por la fermentación de la soya y el trigo utilizando microorganismos. En este estudio, las comunidades microbianas implicadas en el proceso de fabricación de la salsa de soya se analizaron por PCR-DGGE. El perfil de DGGE de bacterias indicó que los microorganismos en el koji eran *Weissella cibaria*, *Staphylococcus gallinarum* y *Staphylococcus kloosii*. Además, se detectó *Tetragenococcus halophilus* en el puré durante la fermentación ácido-láctica. El perfil de DGGE de hongos indicó la presencia de *Aspergillus oryzae* y varias levaduras en el koji. En la fermentación, *Zygosaccharomyces rouxii* apareció en la etapa inicial, *Candida etchellsii* y *Candida versatilis* fueron detectadas en la etapa intermedia, y *Candida etchellsii* se detectó en la etapa final de fermentación. Estos resultados sugieren que las comunidades microbianas presentes durante la fabricación de salsa de soya cambian drásticamente a lo largo de su producción.

Finalmente podría mencionarse una aplicación, que de explotarse adecuadamente, podría aplicarse no sólo en el campo experimental, sino en el campo industrial. Se han reportado diversos estudios que permiten llevar a cabo con PCR-DGGE estudios de control de calidad en alimentos. Si se aplica la técnica a un molde de ADN extraído directamente de una matriz alimentaria, generará un perfil específico de cierto producto en cierto momento, dando las condiciones iniciales en que se utilizará esa matriz. La huella obtenida da una “imagen” de la microbiota del producto y esta puede ser tomada como una característica específica de ese alimento, así como otras propiedades bioquímicas, estructurales o sensoriales. Podría entonces emplearse como una herramienta para el monitoreo del control de calidad (Ercolini, 2004).



3 Justificación.

El pulque es la bebida alcohólica más tradicional de México. Sin embargo, su consumo ha sido sustituido por otras bebidas como la cerveza o el tequila. Esto se debe, principalmente, al desprestigio por parte de compañías cerveceras en los años 60's. Sin embargo, en la actualidad el pulque está retomando su popularidad entre los jóvenes, quienes prefieren ir a pulquerías en lugar de comprar el producto envasado.

Por lo tanto, si se conoce la composición microbiológica de la semilla y se estandariza el inóculo, se podrá realizar la fermentación de manera controlada, obteniendo un producto con características organolépticas similares a las del pulque tradicional. Para esto es necesario encontrar una manera adecuada de conservar la semilla para utilizarla en la producción industrial de pulque en lugar de cultivos puros iniciadores.

El resultado de esta investigación servirá como base para posteriores pruebas de conservación de la semilla, así como para comparar los resultados obtenidos con otros lotes que se analicen posteriormente.



4 Hipótesis.

La viabilidad de los microorganismos es conservada mediante congelación y liofilización; por lo tanto, un cultivo iniciador como es la semilla de pulque se podrá conservar con estos métodos y tenerla disponible en todo momento para usarla como inóculo en la producción de pulque.



5 Objetivo.

5.1 Objetivo general.

Estudiar la composición microbiológica de la semilla empleada en la elaboración de pulque para proponer un método de estandarización de la misma y lograr obtener una fermentación de calidad constante.

5.2 Objetivos particulares.

- Determinar la composición microbiológica de 5 lotes de semilla, por métodos tradicionales y moleculares.
- Conocer el efecto de la congelación a -20 y -65 °C así como la liofilización de la semilla en la sobrevivencia de la microbiota que la conforma.
- Determinar las diferencias entre los 5 lotes de semilla en las cuentas de BAL y levaduras.
- Determinar la cantidad de coliformes para estimar su calidad sanitaria.
- Detectar y analizar las diferencias generadas durante la conservación y fermentación en los patrones de bandas de los 5 lotes de semilla, generados mediante DGGE.



6 Estrategia Experimental.

Las muestras se recibieron en el laboratorio dentro de una hielera con hielos y se les determinó inmediatamente: temperatura, pH, sólidos solubles totales ($^{\circ}\text{Bx}$), color, olor, sabor y textura. Posteriormente, se obtuvo la muestra para extracción de ADN y se realizó el conteo de 4 grupos microbianos (levaduras, BAL, coliformes totales y enterobacterias). Finalmente, dependiendo el caso, se conservó la muestra en congelación y/o liofilización para posteriormente realizar la extracción de ADN y las cuentas de los microorganismos en cada tiempo de monitoreo. Se aislaron levaduras y BAL del lote 5 antes y después de cada tratamiento. A partir de las muestras de ADN se amplificó la región V3 del gen ADNr 16S y se analizaron mediante DGGE (Figura 10).

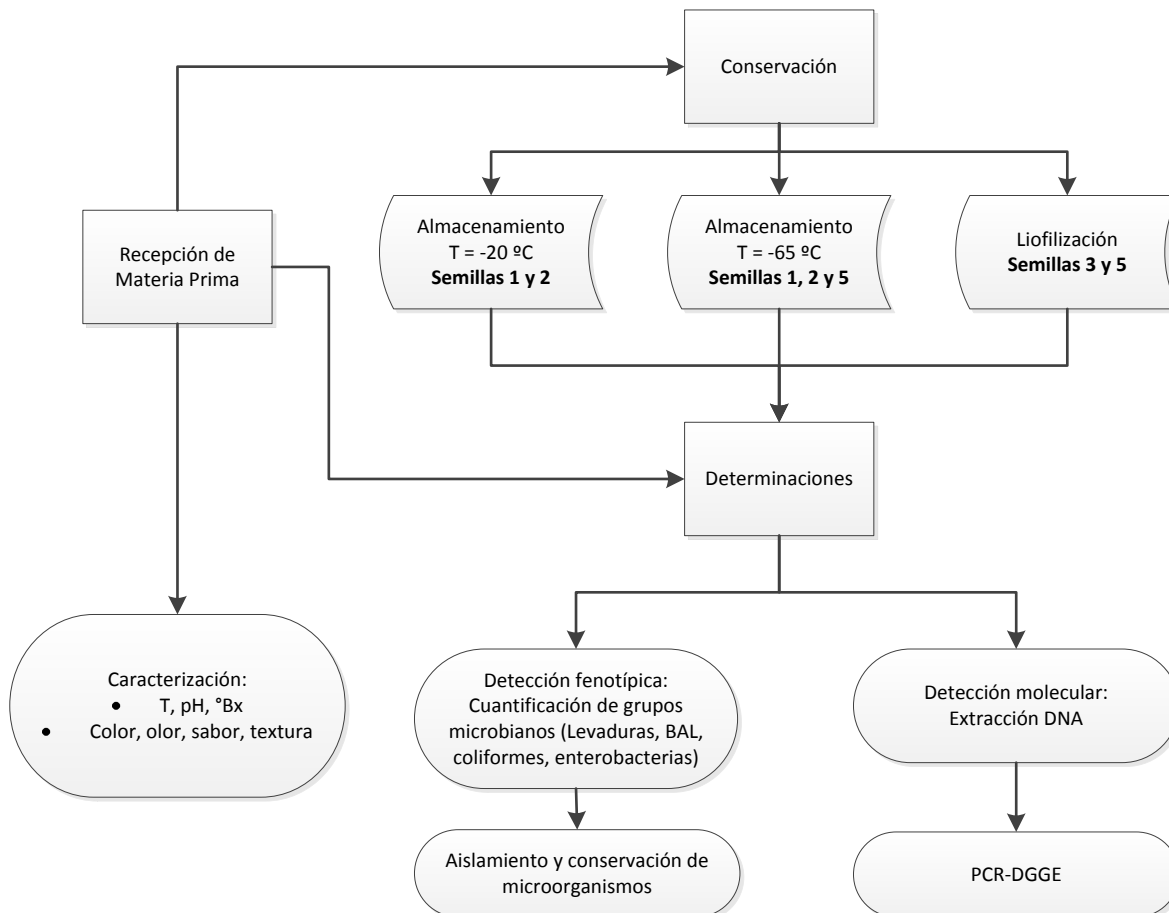


Figura 10. Estrategia experimental seguida durante el estudio.



7 Materiales y Métodos.

Se trabajó con 5 lotes de semilla: 2 del estado de Hidalgo y 3 del estado de México (Tabla 6). Las muestras llegaron al laboratorio en diferentes épocas del año, las semillas 1 y 2 se trabajaron simultáneamente, mientras que los demás lotes se trabajaron por separado. El número de lote indica el orden en que llegaron las muestras al laboratorio. Todos los lotes se recibieron en bidones de plástico dentro de una hielera con hielos (Figura 11).

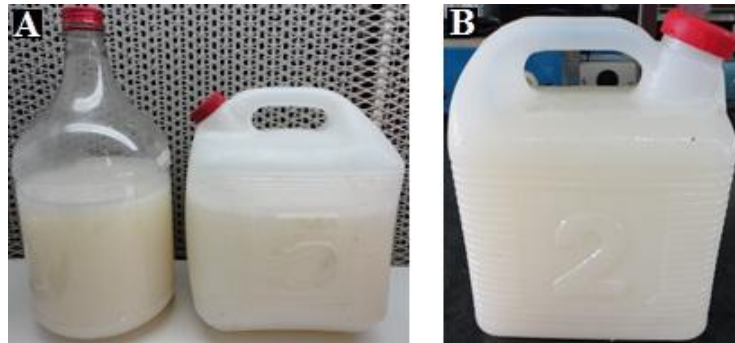


Figura 11. Bidones de plástico con diferentes lotes de semilla. (A) Lotes 1 y 2, (B) Lote 5.

Tabla 6. Procedencia y mes de llegada de los 5 lotes de semilla utilizados en el estudio.

Semilla	Procedencia	Mes de llegada
1	Ixmiquilpan, Hidalgo	Febrero
2	Ixmiquilpan, Hidalgo	Febrero
3	San Felipe del Progreso, Estado de México	Abril
4	San Felipe del Progreso, Estado de México	Junio
5	San Felipe del Progreso, Estado de México	Agosto



A los 5 lotes se les determinó el pH, el número de levaduras, BAL, coliformes y enterobacterias presentes y se extrajo el ADN de cada muestra, que se conservó a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posteriormente realizar la técnica PCR-DGGE.

Se probaron 2 métodos de conservación: congelación ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$) y liofilización (Figura 12). Las semillas 1 y 2 se congelaron a ambas temperaturas, la semilla 3 se liofilizó y la semilla 5 fue tratada con los dos métodos: congelación a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y liofilización (Tabla 7).

Finalmente, se evaluaron mediante PCR-DGGE las muestras correspondientes a cada lote de semilla, las muestras de conservación de la semilla 5 y muestras correspondientes a la fermentación del aguamiel con la misma semilla (Burgos, en preparación).

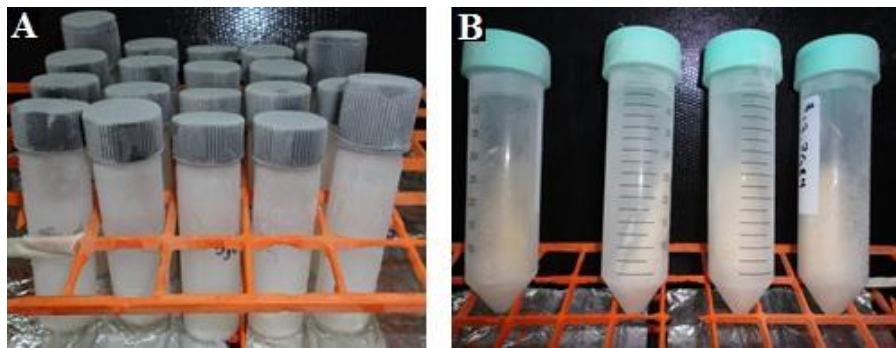


Figura 12. Semilla 5. (A) Congelada, (B) Liofilizada.

Tabla 7. Métodos de conservación estudiados en 5 lotes de semilla.

Semilla	Congelación ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)	Ultracongelación ($-65\text{ }^{\circ}\text{C}$)	Liofilización
1	✓	✓	x
2	✓	✓	x
3	x	x	✓
4	x	x	x
5	x	✓	✓

(✓) Se conservó con el tratamiento; (x) no se conservó.



7.1 Muestreo.

Una vez recibidos los bidones con la semilla de pulque se homogeneizaron manualmente agitando vigorosamente y se midió la temperatura utilizando un termómetro (*Bannan*; $-20-110^{\circ}\text{C}$). Se tomó una muestra de 200 mL, de aquí se tomó una gota con pipeta *Pasteur* para determinar los sólidos solubles totales ($^{\circ}\text{Bx}$) con un refractómetro (*Fisher*; $0-32\%$) y se midió el pH utilizando un potenciómetro (*Jenway 3020 pH Meter*), el cual se calibró antes de realizar cada determinación; además, se evaluaron las características sensoriales por 3 estudiantes de laboratorio. Posteriormente se procedió a tomar las muestras correspondientes a cuenta en placa (CEP). Finalmente, se tomaron las muestras para congelación y/o liofilización, según el caso.

7.2 Microbiología tradicional.

7.2.1 Conteo de microorganismos.

Se homogeneizó la muestra en el bidón manualmente agitando vigorosamente y se depositó en un vaso de precipitados estéril para facilitar su manejo. Posteriormente se tomaron 25 mL de muestra y se homogeneizaron con 225 mL de solución salina (0.85% p/v) estéril (10^{-1}). Se hicieron diluciones decimales seriadas tomando 0.5 mL y homogeneizándolo con 4.5 mL de solución salina. Se inocularon 100 μL de la dilución correspondiente por duplicado en cada medio de cultivo (Anexo I), se distribuyó de manera homogénea utilizando una varilla metálica triangular y se dejó absorber por 10 minutos (Figura 13). Finalmente se incubaron a la temperatura adecuada: BAL y levaduras a 30°C durante 48 y 72 horas, respectivamente; coliformes y enterobacterias a 37°C , durante 24 horas. Se contaron las colonias con características esperadas en cada medio (Tabla 8).

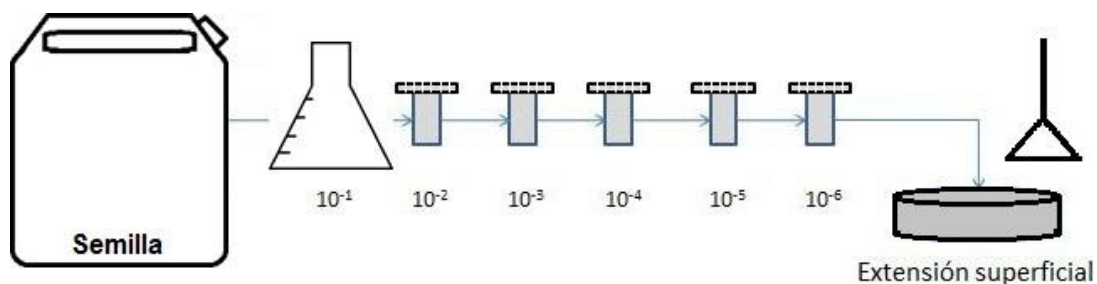


Figura 13. Técnica utilizada para cuenta en placa de microorganismos.



Tabla 8. Características de las colonias e intervalo de sensibilidad para los medios de cultivo utilizados.

Medio de cultivo	Grupo microbiano	Características de las colonias	Intervalo de sensibilidad de colonias por placa
MRS	Bacterias Ácido-Lácticas (BAL)	<ul style="list-style-type: none">• Colonias generalmente pequeñas, blanco-grisáceos, lisas y rugosas	25 a 250 colonias por placa
PDA	Levaduras	<ul style="list-style-type: none">• Las levaduras se observan como colonias de color crema o blanco.	10 a 150 colonias por placa
EMA	Levaduras	<ul style="list-style-type: none">• Las levaduras se observan como colonias de color crema o blanco.	10 a 150 colonias por placa
BRVA	Coliformes totales	<ul style="list-style-type: none">• Fermentadores de lactosa: colonias de color púrpura a rojo con o sin zona de precipitado.• No fermentadores de lactosa: Colonias incoloras o transparentes, puntiformes.	15 a 150 colonias por placa
BRVGA	Enterobacterias	<ul style="list-style-type: none">• Fermentadores de lactosa: colonias de color púrpura a rojo con o sin zona de precipitado.• No fermentadores de lactosa: Colonias incoloras o transparentes, puntiformes.	15 a 150 colonias por placa



7.2.2 Aislamiento y conservación de microorganismos.

Se aislaron microorganismos sembrando en medios de cultivo selectivos por medio de la técnica de estriado en cuadrante radial hasta asegurar el agotamiento del inóculo (Ramírez *et al.*, 2008). Se utilizó el medio GPY para levaduras y MRS para BAL (Anexo I).

Para verificar la pureza de los cultivos se realizó la tinción de Gram a ambos grupos microbianos y la prueba de catalasa únicamente a las BAL, la cual se esperaba fuera negativa. Se realizaron observaciones microscópicas con un aumento total de 1000X.

Las levaduras se conservaron tomando una asada de colonia pura y suspendiéndola en glicerol al 15%. Las BAL se sembraron en caldo MRS y posteriormente se tomaron 1200 µL y se depositaron en un tubo con 300 µL de glicerol. Ambas se congelaron a -65 °C para su conservación.

7.3 Conservación por congelación.

Las semillas 1 y 2 se congelaron sin el uso de agentes crioprotectores. Se homogenizó la muestra contenida en el bidón de plástico y se depositaron volúmenes de 25 mL en bolsas de plástico, las cuáles se congelaron a -20 °C en un congelador (*Whirpool*) y a -65 °C en un ultra congelador (*Puffer Hubbard IUF-75134BA*).

La semilla 5 se congeló de la siguiente manera: se centrifugaron 250 mL de muestra en una centrífuga (*Beckman J2-21M/E*) a 12000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante, se agregó solución salina (0.85% p/v) y se homogeneizó en vórtex a alta velocidad. Este procedimiento se repitió 3 veces. Finalmente se resuspendió el pellet llevando al volumen inicial utilizando glicerol al 7.5 % estéril. Se colocaron 9 mL en viales y se congelaron hasta su uso a -65°C en un ultra congelador (*Puffer Hubbard IUF-75134BA*).

7.4 Conservación por liofilización.

Se colocaron 10 mL de semilla 3 por triplicado en un vaso de precipitados estéril, se congeló utilizando hielo seco-acetona y posteriormente se colocó una



liofilizadora (*Labconco C105-14-394*) por 24 horas. Se colectó el liofilizado utilizando una espátula estéril, se pesó y se depositó en bolsas de plástico para su almacenamiento a -65°C en un ultra congelador (*Puffer Hubbard IUF-75134BA*).

La semilla 5 se liofilizó de la siguiente manera: se centrifugaron 250 mL de muestra en una centrífuga (*Beckman J2-21M/E*) a 12000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante, se agregó solución salina (0.85% p/v) y se homogeneizó en vórtex a alta velocidad. Este procedimiento se repitió 3 veces. Finalmente se resuspendió el pellet en el volumen inicial utilizando leche descremada estéril (*OXOID LP0031*), la cual fue reconstituida al 10% en agua destilada estéril. Se congeló colocando 10 mL en 10 tubos (*Falcon; 25 mL*), previamente pesados, de manera inclinada, se sometieron 30 minutos a 4°C , 30 minutos a -20°C y 1 hora a -65°C . Posteriormente se liofilizaron las muestras utilizando el mismo equipo y condiciones descritas previamente. Finalmente se pesaron las muestras y se almacenaron a -65°C , protegiéndolas de la luz con una bolsa de plástico negra.

Para determinar cuánta agua se extrajo de la semilla mediante liofilización, se pesaron las muestras en los tubos (*Falcon*) antes y después del tratamiento y se determinó la cantidad de agua sublimada por diferencia de masa.

7.5 Cuantificación de microorganismos después de los métodos de conservación.

Las muestras de semillas 1 y 2 se descongelaron durante una noche a 4°C . Se tomaron 10 mL y se mezclaron con 90 mL de solución salina (0.85% p/v) y posteriormente se tomaron 500 μL para hacer las diluciones seriadas.

Las muestras de semilla 5 se descongelaron las muestras a temperatura ambiente, posteriormente se tomaron 10 mL de dos viales y se mezclaron con 90 mL de solución salina 0.85%. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 3 horas para rehidratar las células y posteriormente se tomaron 500 μL para hacer las diluciones seriadas.

Para realizar el conteo de microorganismos de la semilla 3 liofilizada se reconstituyeron las muestras llevándolas a un volumen de 10 mL utilizando



solución salina (0.85% p/v) y posteriormente se tomaron 500 μ L para hacer las diluciones seriadas.

Las muestras de semilla 5 se reconstituyeron llevándolas a un volumen de 10 mL utilizando solución salina (0.85% p/v), se dejó reposar a temperatura ambiente por 3 horas para rehidratar las muestras y posteriormente se tomaron 500 μ L para hacer las diluciones seriadas.

7.6 Evaluación de las semillas y el efecto de los métodos de conservación mediante PCR-DGGE.

7.6.1 Extracción de ADN.

Se realizó la extracción de ADN directamente de la semilla utilizando un método químico-enzimático, adaptado de la metodología reportada por Ampe *et al.* (1999), para el pozol. Se extrajo de los 5 lotes de semilla, así como de las muestras de semilla 5 en conservación y de las muestras de fermentación de aguamiel con la semilla 5 (Burgos, en preparación).

Primero se preparó la muestra de la siguiente manera: se centrifugaron 20 mL en una centrífuga (*Beckman J2-21M/E*) a 12000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante, posteriormente se realizaron tres lavados del pellet con solución salina (0.85% p/v) estéril centrifugando entre cada uno y finalmente se resuspendió la muestra en 10 mL de amortiguador TES (Tris 0.5 M, EDTA 0.05 M, NaCl 0.05 M, pH 8). Se tomaron 1300 μ L de muestra en un microtubo de 1.5 mL y se hizo el tratamiento enzimático incubando en un termomixer (*Eppendorf Thermomixer confort*) de la siguiente manera: se añadieron 20 μ L lisozima (*Sigma-Aldrich; 20 mg/mL*) y 10 μ L mutanolisina (*Sigma-Aldrich; 1 U/mL*), y se incubó a 37 °C por 1h. Posteriormente, se añadieron 20 μ L proteinasa K (*Sigma-Aldrich; 1mg/mL*) y 10 μ L RNA'sa (*Sigma-Aldrich; 20 mg/mL*), y se incubó a 65 °C por 1h. El paso siguiente fue la adición de 120 μ L de SDS (10% p/v) y se incubó a 65 °C/10 min. Al término de este tiempo se enfrió la mezcla de reacción y se transfirieron 500 μ L a un microtubo nuevo. Se agregaron 300 μ L de NaCl 5M y 650 μ L de Fenol:Cloroformo:Isoamílico 25:24:1, pH 8.0, EDTA 1mM (*SIGMA P2069*). Se agitó vigorosamente por 30 segundos manualmente y 1 minuto en vórtex. A



continuación se centrifugó la muestra en microcentrífuga (*Hermle Z160M*) a 14000 rpm por 15 min.

Posteriormente se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un microtubo nuevo y se agregó 1 mL de Fenol:Cloroformo:Isoamílico (*SIGMA P2069*), y se agitó en un vórtex durante 30 segundos. Después se sometió a centrifugación durante 5 minutos a 5000 rpm y el sobrenadante se transfirió nuevamente a un microtubo limpio. Posteriormente se agregaron 700 μL de isopropanol, se agitaron suavemente y se incubaron durante 15 minutos a 10 °C en el refrigerador para favorecer la precipitación del ADN. Al término de este tiempo se centrifugó en microcentrífuga (14000 rpm/15 min), se retiró el sobrenadante con micropipeta y se realizó un lavado con 1 mL de etanol (70% v/v). Se volvió a centrifugar la muestra y se retiró el sobrenadante con pipeta. Se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente y finalmente se hidrató el ADN con 50 μL de agua destilada estéril incubando en termomixer a 60 °C por 1 hora (Figura 14). Finalmente se comprobó la calidad de la extracción de ADN de semilla mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) y amortiguador TBE [1X] (Tris 0.1 M, Borato 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 8), revelada con una solución de bromuro de etidio [5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$]. La imagen se capturó con el equipo *Kodak Image Station* y el programa *Carestream*.

Se midió la concentración del ADN en el espectrofotómetro UV-Visible (*Agilent 8453E*). Para esto fue necesario colocar en una celda de cuarzo (*Agilent*) 15 μL de la muestra de ADN, después la celda se colocó en el espectrofotómetro y se realizó la lectura a 260 y 280 nm; como blanco se utilizó agua destilada.

Para conocer la concentración de ADN fue necesario realizar la siguiente operación: la densidad óptica obtenida en el espectrofotómetro a 260nm se multiplicó por 5 debido al paso óptico de la celda y si se llevó a cabo una dilución, por el factor de dilución, después se sabe que 1 unidad de densidad óptica equivale a 50ng/ μL de ADN:

$$\text{Concentración de ADN } \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}} = \text{DO}_{260\text{nm}} \cdot 5 \cdot 50 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}$$



Para evaluar la pureza de la muestra fue necesario determinar la relación DO260nm/DO280nm, dónde se buscó que la relación fuese de 1.8 a 2.0 ya que a este valor la absorción es causada por los ácidos nucleicos (Sambrook *et al.*, 1989).

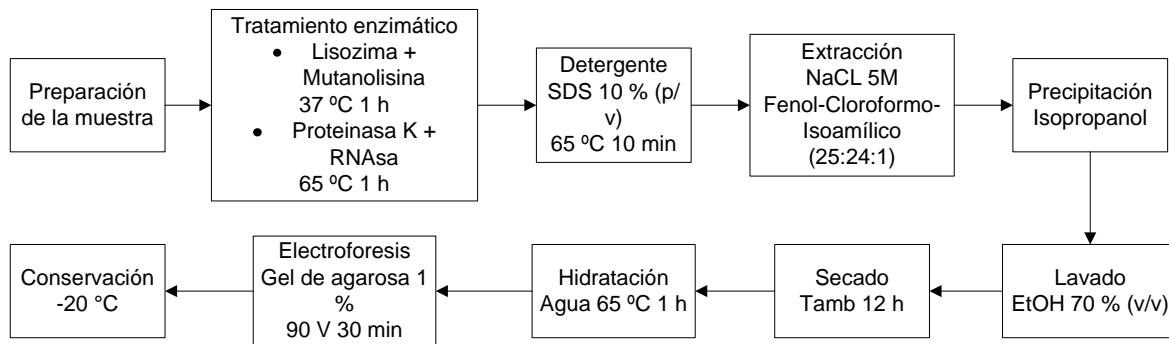


Figura 14. Metodología empleada para la extracción de ADN del pulque. Adaptado de Bolaños (2004).

7.6.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se amplificó la región V3 del gen ARNr 16S del ADN ribosomal presente en la semilla mediante la reacción de PCR. Se utilizaron los cebadores Agc338F y B518R (Tabla 9) para bacterias (Ampe *et al.*, 1999), con las condiciones y reactivos mostrados en las tablas 10 y 11, respectivamente, utilizando un termociclador (*Biometra Tpersonal*). Se usó como control negativo un tubo con todos los reactivos sin ADN.

Se visualizaron los productos de PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2 % (p/v) y amortiguador TBE [1X] (Tris 0.1 M, Borato 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 8), revelada con una solución de bromuro de etidio [5 µg/µL]. La imagen se capturó con el equipo *Kodak Image Station* y el programa *Carestream*. Se midió la concentración con un espectrofotómetro *Agilent UV-Vis 8453E*.



Tabla 9. Secuencia de los cebadores empleados para la amplificación del gen ribosomal 16S por PCR (Ampe *et al.*, 1999).

Cebador	Secuencia 5'-3'	Orientación
Agc338F	*ACT CTA CGG AGG CAG CAG	Hacia adelante
B518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Reversa

*Grapa de GC añadida al extremo 5' del primer, 5' CGC CCG CCG GGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG GG 3'.

Tabla 10. Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación del gen ribosomal 16S. (Ampe *et al.*, 1999).

Periodo	Temperatura/tiempo	# ciclos
Desnaturalización	94°C/5min	1
Desnaturalización	94°C/1 min	
Alineamiento	65°C/1 min	20
Extensión	72°C/3 min	
Desnaturalización	94°C/1 min	
Alineamiento	55°C/1 min	10
Extensión	72°C/3 min	
Extensión final	72°C/3 min	1
Enfriamiento	4°C	1

Tabla 11. Concentración de los reactivos en la PCR para la amplificación del gen ribosomal 16S.

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración
Albúmina 4 µg/µL	5	400 ng/µL
Amortiguador (10X)	5	1X
MgCl ₂ 25mM	5	2.5 mM
dNTP's (10mM)*	1	0.2 mM
Cebador Agc338F (1X)	1	25 pmol/µL
Cebador B518R (1X)	1	25 pmol/µL
Taq polimerasa (5U/µL)*,**	1	0.1 U/µL
ADN (aprox 10ng/µL)	5	1 ng/µL
Agua desionizada estéril	c.b.p. 50 µL	-

*Invitrogen, **Plarinum® Taq DNA polymerase high fidelity



7.6.3 Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE).

7.6.3.1 *Elaboración del gel con gradiente perpendicular al campo eléctrico.*

Con el fin de obtener el gradiente óptimo para la separación de los fragmentos amplificados, se elaboró un gel con gradiente desnaturalizante (0-100%) perpendicular al campo electroforético. La finalidad fue establecer el intervalo de desnaturalizante en el cual el producto de PCR forme una “S”, que represente la zona de desnaturalización del ADN.

El ADN total de las muestras de semilla previamente amplificado mediante la reacción de PCR, fue analizado por DGGE perpendicular usando el equipo *Dcode™ Universal Mutation Detection System (Biorad)* y siguiendo el procedimiento descrito primeramente por Muzyer *et al.* (1993).

La muestra fue depositada en un gel de poliacrilamida al 8% (p/v) utilizando un intervalo desnaturalizante de 0-100 % (p/v) y amortiguador TAE [1X] (Tris 0.04 M, Acetato 0.04 M, EDTA 1 mM, ph 8). El gradiente desnaturalizante estuvo formado por urea 7 M y formamida al 40 % (v/v). La electroforesis se realizó a una temperatura de 60 °C durante 2 h a 100 V. Posteriormente el gel se tiñó con el kit *Plus One DNA silverstaining (Pharmacia Biotech)*.

7.6.3.2 *Separación de los productos de PCR mediante la técnica de DGGE.*

Los productos de PCR de las muestras de cada uno de los diferentes lotes de semilla, las muestras generadas en la conservación de la semilla 5 y las muestras correspondientes a la fermentación del aguamiel utilizando la semilla 5, se corrieron en un gel de poliacrilamida al 8 % y con un gradiente desnaturalizante de 30-90 % (p/v) de urea 7M y formamida 40 % (v/v) usando el equipo *Dcode™ Universal Mutation Detection System (Biorad)*. La electroforesis se realizó a 85 V y 60 °C durante 17 h. Posteriormente los geles fueron teñidos con el kit *Plus One*



DNA silverstaining, de (*Pharmacia Biotech*). La imagen se capturó con el equipo *Kodak ImageStation* y el programa *Carestream*.

7.6.3.3 **Análisis de los geles de DGGE.**

Los geles de DGGE fueron analizados utilizando el programa *Diversity Database* (*Biorad*), versión 2.2 para Windows. Se digitalizaron las imágenes y se detectaron las bandas. Con el mismo programa se elaboraron los dendogramas que permitieron la interpretación del comportamiento de la comunidad microbiana y se obtuvo la intensidad de cada una de las bandas determinada como la altura del pico de la curva densitométrica y con esto fue posible obtener los siguientes parámetros ecológicos:

- Índice de riqueza (R):

Este índice se obtuvo por el conteo del número de bandas visibles para cada muestra.

- Coeficiente de similitud de Dice (SD):

Tiene como fin obtener la similitud entre la microbiota de las diferentes muestras y a partir de aquí fue posible la elaboración de dendogramas utilizando el software *Diversity Database* de *Biorad*, versión 2.2 para Windows. La ecuación empleada se muestra a continuación:

$$SD = \frac{2Nab}{Na + Nb}$$

Donde SD es el coeficiente de similitud de Dice, Na y Nb el número total de bandas en los carriles seleccionados, y Nab el número de bandas comunes entre los carriles a y b.

- Índice de diversidad (H):

Se obtuvo a partir del índice general de diversidad de Shannon-Weaver (H) y fue calculado a través de la siguiente ecuación:

$$H = - \sum P_i \log_2 P_i$$



P_i es la probabilidad de importancia, que se obtiene a partir de la altura de los picos de las curvas densitométricas:

$$P_i = \frac{n_i}{n_i}$$

Donde n_i es la altura del pico i en la curva densitométrica.

- Índice de dominancia (S):

El índice de dominancia de Simpson se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$S = \frac{1}{P_i^2}$$

Donde S es el índice de diversidad de Simpson y P_i es la proporción de individuos de la especie i en la comunidad.



8 Resultados y Discusión

8.1 Caracterización de la semilla.

Se analizaron 5 muestras de semilla, provenientes del estado de Hidalgo (Lotes 1 y 2) y del Estado de México (Lotes 3, 4 y 5). En la Tabla 12 se presentan algunos de los resultados preliminares. Las muestras se recibieron a una temperatura entre 4.5 y 5.0 °C; el pH varió entre 3.29 y 4.31; y los sólidos solubles totales (°Bx) entre 4.4 y 4.8. Estos parámetros indican, de manera indirecta, el grado de fermentación que tenían las muestras, ya que el pH disminuye debido a la producción de ácido láctico y otros metabolitos y los sólidos solubles totales (°Bx) disminuyen debido al consumo de azúcares fermentables por los microorganismos.

La mayoría de las muestras presentaron un color blanquecino, olor herbáceo, frutal y dos muestras olor fétido. La textura fue viscosa, líquida y espumosa y el sabor ácido con un resabio amargo (Tabla 13). Estos atributos fueron determinados por tres estudiantes de laboratorio.

Tabla 12. Características de 5 lotes de semilla analizados: procedencia, temperatura (T), pH y sólidos solubles totales (°Bx). ND: No se determinó.

Semilla	Procedencia	T (°C)	pH	°Bx
1	Ixmiquilpan, Hidalgo	5.0	4.27	ND
2	Ixmiquilpan, Hidalgo	4.9	4.31	ND
3	San Felipe del Progreso, Estado de México	4.7	3.90	4.8
4	San Felipe del Progreso, Estado de México	4.7	3.29	4.4
5	San Felipe del Progreso, Estado de México	4.5	3.37	4.6

Los valores de pH fueron similares en los 5 lotes de semilla. Sin embargo, los lotes provenientes de Ixmiquilpan tuvieron valores más elevados, arriba de 4.2. En las



semillas 1 y 2 también se detectó presencia de coliformes y enterobacterias (Figura 15), y olor fétido (Tabla 13).

En 1979 Sánchez-Marroquín señaló las características físicas y químicas del pulque común y del pulque fino (obtenido por fermentación espontánea del aguamiel). Señaló que el pH del pulque común debe estar entre 4.15 y 7.2, con un promedio de 5.30; mientras que el pulque fino tiene un pH de 3.9. Las semillas 1, 2 y 3 se encuentran dentro de estos valores y las semillas 4 y 5 tuvieron un pH menor. Esto es porque la semilla es producto de una fermentación entre 1 y 2 meses, a diferencia del pulque, que tiene una fermentación de días o incluso horas; esto hace que el pH de la semilla descienda a valores menores que los del pulque.

Tabla 13. Características sensoriales de los 5 lotes de semilla: olor, color, textura y sabor. Determinados por 3 estudiantes de laboratorio.

Semilla	Olor	Color	Textura	Sabor
1	Fétido, herbáceo	Blanquecino	Viscosa, líquida, espumosa	Ácido
2	Fétido, herbáceo, nota cítrica	Blanquecino	Líquida	Más ácido que S1
3	Herbáceo, frutal, no fétido	Blanquecino	Viscosa	Ácido, astringente, resabio amargo
4	Herbáceo, frutal, no fétido	Blanquecino	Viscosa	Ácido
5	Herbáceo, frutal, no fétido	Blanquecino	Viscosa	Ácido



Los lotes de semilla estudiados presentaron una variación considerable en sus características sensoriales, pH y °Bx (Tablas 12 y 13). Una semilla de buena calidad debe tener la microbiota necesaria para acelerar el proceso de fermentación, por lo tanto la uniformidad de de los componentes microbiológicos, pH y °BX de ésta es esencial para controlar la calidad de la bebida.

8.2 Cuantificación de los diferentes grupos microbianos en el momento de su recepción en al laboratorio (t_0).

En la figura 15 se muestran las cuentas microbianas de los diferentes lotes de semilla en el tiempo 0; es decir, las semillas en el momento de su recepción, antes de aplicar los métodos de conservación. A pesar de tener un origen distinto, las cuentas de BAL y de levaduras fueron similares en todos los lotes. Se encontraron valores entre 11×10^7 y 28×10^7 UFC/mL para BAL y entre 13×10^7 y 40×10^7 UFC/mL para levaduras (Tabla 18, Anexo 12.2).

En cuanto a coliformes y enterobacterias se refiere, se encontraron estos grupos microbianos en los lotes 1 y 2 únicamente (Figura 15), lo cual puede indicar una mala calidad sanitaria de la semilla. La cuenta de enterobacterias es mayor en la semilla 2 (76×10^3 UFC/mL) que en la semilla 1 (27×10^2 UFC/mL). Por el contrario, la cuenta de coliformes totales fue mayor en el lote 1 (14×10^5 UFC/mL) que en el lote 2 (10×10^4 UFC/mL) (Tabla 18, Anexo 12.2).

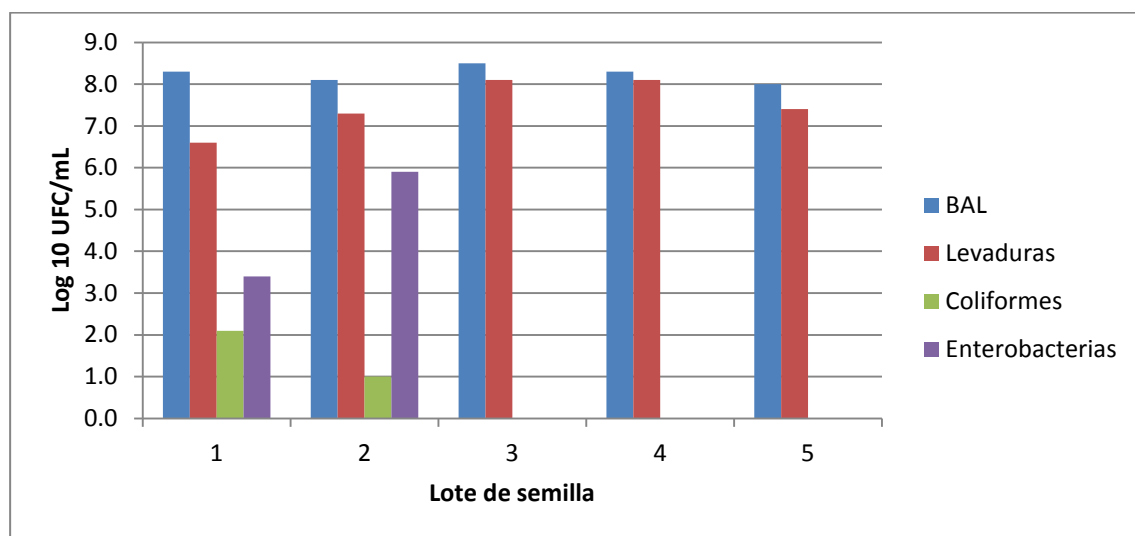


Figura 15. Concentración de bacterias lácticas (BAL), levaduras, coliformes y enterobacterias de 5 lotes de semilla en el momento de su recepción en el laboratorio.



Cervantes Contreras *et al.* (2007) estudiaron cuatro muestras de pulque en diferentes etapas de fermentación denominadas aguamiel, semilla, contrapunta y corrida, las dos últimas corresponden a pulque fermentado por 24 y 48 horas, respectivamente. Aislaron e identificaron un hongo levaduriforme, un cocobacilo Gram-negativo y un bacilo Gram-positivo pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* sp, *Zymomonas* sp, y *Lactobacillus* sp. Además, determinaron el contenido alcohólico por cromatografía de gases y espectroscopia Raman.

Comparando los resultados de este trabajo con los de Cervantes-Contreras *et al.* (2007), se observó que las cuentas de BAL y levaduras en las cinco semillas estudiadas son mayores a las cuentas obtenidas por dichos autores, quienes reportan cuentas de 17×10^1 UFC/mL para BAL y 30×10^3 UFC/mL para levaduras presentes en la semilla. Las diferencias pueden ser debido a que las muestras provienen de diferentes productores y en distintas épocas del año, por lo que podrían tener mayor o menor tiempo de fermentación. En el mismo estudio, en la etapa final de la fermentación, llamada corrida, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en ambos grupos con recuentos de 50×10^8 UFC/mL y 34×10^8 UFC/mL para levaduras y bacilos Gram-positivos. Estos valores son más cercanos a los que se obtuvieron para los 5 lotes de semilla en este trabajo, lo cual podría indicar que las semillas estudiadas se encontraban en una etapa de fermentación similar.

Las cuentas de BAL fueron mayores que las de levaduras en los 5 lotes de semilla (Figura 15), contrario a lo que Cervantes-Contreras *et al.* (2007) reportaron. Ruiz Oronoz (1953) y Loyola-Montemayor (1956), indican que la población inicial de levaduras es menor y se incrementa gradualmente durante la fermentación del pulque, predominando sobre las bacterias. No obstante, los lotes estudiados son de semilla y no de pulque. Éste es un cultivo mixto con una microbiota muy compleja, por lo que la cantidad de BAL y levaduras puede estar determinada por otros microorganismos presentes en la muestra.

Zayas (2012), utilizó los lotes 1, 2, 3 y 4 de semilla como inóculo en la fermentación de aguamiel pasteurizado. Una mezcla de los lotes 1 y 2 fue



inoculada en la fermentación con clave IXMI, mientras que a las fermentaciones correspondientes a las semillas 3 y 4 se les denominó EDO1 y EDO2, respectivamente. Además, se utilizó la mezcla de las semillas 1 y 2 que habían sido conservadas a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$, descongeladas y reactivadas en aguamiel, como inóculo en otra fermentación a la que se le asignó la clave COAH.

Se obtuvieron cuentas de BAL mayores que levaduras al inicio de la fermentación en todos los casos; sin embargo, al final de ésta las cuentas de levaduras fueron mayores en todos los casos, excepto la fermentación inoculada con semilla congelada. No obstante, el desarrollo de las levaduras sobre las BAL no se vio reflejado en el contenido de etanol del producto final, ya que se obtuvieron pulques con alrededor de 20 g/L de EtOH y la normatividad mexicana (NMX-V-037-1972) especifica un contenido de 4-6 % para pulque tipo II y 6-9 % para pulque tipo I, lo cual equivale a un rango de 32 a 73 g/L. Esto sugiere que con la semilla empleada o el proceso fermentativo realizado, aún no se logra incrementar el contenido alcohólico para tener un producto adecuado conforme a la normatividad.

8.3 Efecto de la congelación como método de conservación de la semilla.

La “semilla” o inóculo para la fermentación del pulque es un cultivo mixto que debe contener los microorganismos necesarios para fermentar el aguamiel y obtener el pulque. Los productores de esta bebida adquieren o elaboran las semillas y por experiencia saben distinguir una buena de una mala. Contar con una semilla adecuada es esencial para llevar a cabo una buena fermentación. Existen cultivos mixtos estables y otros que no lo son, de manera que cuando se cultivan se favorece el crecimiento de unos sobre otros. Se probaron entonces métodos de conservación de la semilla tal y como se recibió. Con base en los resultados obtenidos, se probaron también los métodos de conservación con un tratamiento previo de la muestra (lavados) y con el uso de agentes crioprotectores.



Con el objeto de conservar la composición de microorganismos de la semilla, los lotes 1 y 2 fueron congelados directamente (Figuras 16-19). Por otro lado, la semilla 5 se le adicionó glicerol como crioprotector. Como se observa en la figura 20, el uso del glicerol ayudó considerablemente a conservar los microorganismos presentes en la semilla, ya que se obtuvieron valores de 41×10^6 UFC/mL para levaduras y 79×10^6 UFC/mL para BAL, después de 92 días de almacenamiento (Tabla 23, Anexo 12.3).

En las semillas 1 y 2 congeladas a -20 y -65 °C, disminuyó el número de microorganismos sobrevivientes considerablemente. A -20 °C para ambas semillas no se obtuvo desarrollo de los grupos microbianos estudiados en los recuentos finales (sensibilidad del método: <10 UFC/mL) (Figuras 16 y 18). En la conservación a -65 °C, para la semilla 1 los recuentos finales tuvieron valores de 16×10^1 UFC/mL y 20×10^2 UFC/mL para levaduras y BAL, respectivamente. En el caso de la semilla 2 no se detectaron los grupos microbianos al paso de 90 días de almacenamiento (sensibilidad del método: <10 UFC/mL) (Figuras 17 y 19). A continuación se muestran las gráficas con las cuentas realizadas durante 3 meses, con su respectivo análisis.

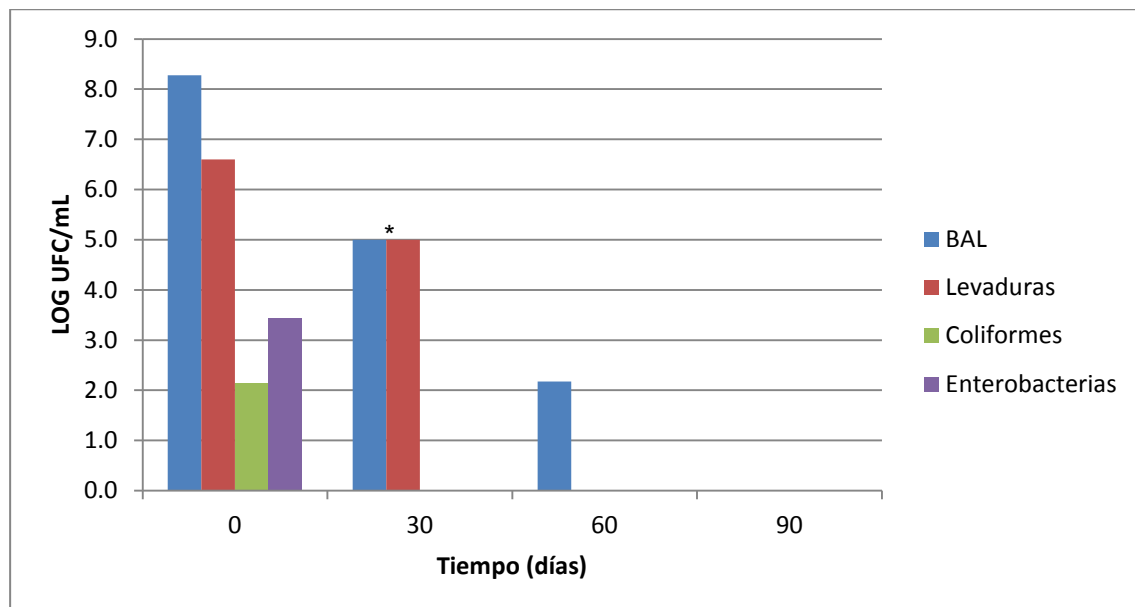


Figura 16. Concentración de bacterias lácticas (BAL), levaduras, coliformes y enterobacterias de la semilla 1 congelada a -20 °C, durante 90 días. * Valor estimado.



En la figura 16 se muestran las cuentas de los grupos microbianos de la semilla 1 almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 días. Se observa la disminución de los grupos microbianos con respecto al tiempo. Los valores iniciales (antes de congelar) fueron 19×10^7 , 40×10^5 , 14×10^5 y 27×10^2 UFC/mL para BAL, levaduras, coliformes y enterobacterias, respectivamente. Al paso de 30 días se observa una disminución de BAL y levaduras hasta $< 10 \times 10^4$ UFC/mL valor estimado (v.e.), ya que no hubo crecimiento en la dilución 10^{-4} , mientras que los coliformes y enterobacterias no se detectaron. Posteriormente, al paso de 60 días de almacenamiento, no se detectaron levaduras y las BAL disminuyeron a 16×10^1 UFC/mL. Finalmente, al paso de 90 días, no se detectó ningún grupo microbiano (Tabla 19, Anexo 12.3).

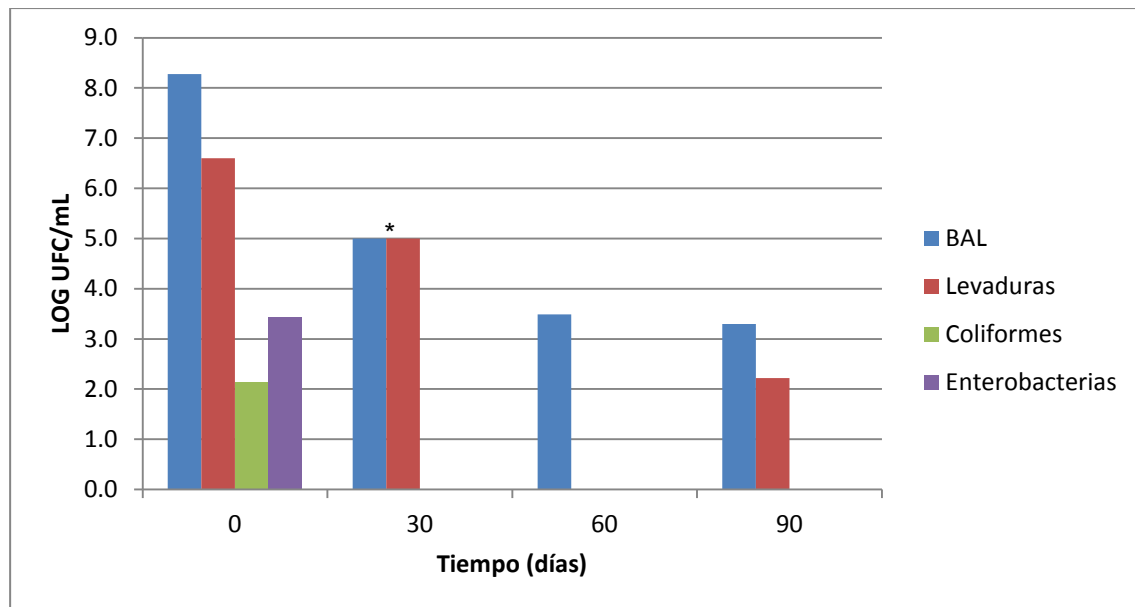


Figura 17. Concentración de bacterias lácticas (BAL), levaduras, coliformes y enterobacterias de la semilla 1 congelada a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 90 días. * Valor estimado.

En la figura 17 se muestran las cuentas de los grupos microbianos de la semilla 1 almacenada a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 90 días. Se observa la disminución de los grupos microbianos con respecto al tiempo. Los valores iniciales (antes de congelar) fueron 19×10^7 , 40×10^5 , 14×10^5 y 27×10^2 UFC/mL para BAL, levaduras, coliformes y enterobacterias, respectivamente. Al paso de 30 días se observa una



disminución de BAL y levaduras hasta $<10 \times 10^4$ UFC/mL v.e. (no hubo crecimiento en la dilución 10^{-4}), mientras que los coliformes y enterobacterias no se detectaron. Posteriormente, al paso de 60 días de almacenamiento, no se detectaron las levaduras y las BAL disminuyeron a 31×10^2 UFC/mL. Finalmente, las cuentas de levaduras y BAL fueron 16×10^1 y 20×10^2 UFC/mL, respectivamente (Tabla 20, Anexo 12.3). Se observó un crecimiento de levaduras, a pesar de que en el tiempo anterior no crecieron, lo cual indica que éstas se recuperaron después de 60 días de almacenamiento. Todas las muestras se manejaron de la misma manera, por lo que estos resultados se pueden deber a algún factor que no se consideró en este estudio.

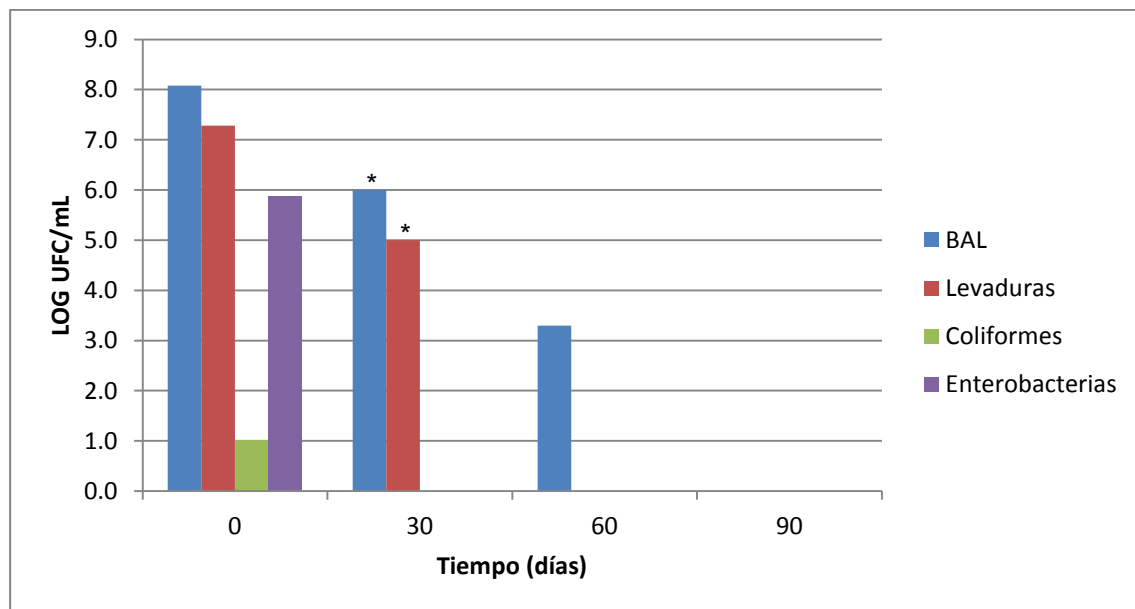


Figura 18. Concentración de bacterias lácticas (BAL), levaduras, coliformes y enterobacterias de la semilla 2 congelada a -20 °C, durante 90 días. * Valor estimado.

En la figura 18 se muestran las cuentas de los grupos microbianos de la semilla 2 almacenada a -20 °C durante 90 días. Se observa la disminución de los grupos microbianos con respecto al tiempo. Los valores iniciales (antes de congelar) fueron 19×10^7 , 40×10^5 , 14×10^5 y 27×10^2 UFC/mL para BAL, levaduras, coliformes y enterobacterias, respectivamente. Al paso de 30 días se observa una disminución de BAL y levaduras hasta 10×10^5 UFC/mL v.e. y $<10 \times 10^4$ UFC/mL



v.e. (no hubo crecimiento en la dilución 10^{-4}), respectivamente, mientras que los coliformes y enterobacterias no se detectaron. Posteriormente, al paso de 60 días de almacenamiento, no se detectaron levaduras y las BAL disminuyeron a 18×10^2 UFC/mL. Finalmente, al paso de 90 días, no se detectó crecimiento de ningún grupo microbiano (Tabla 21, Anexo 12.3).

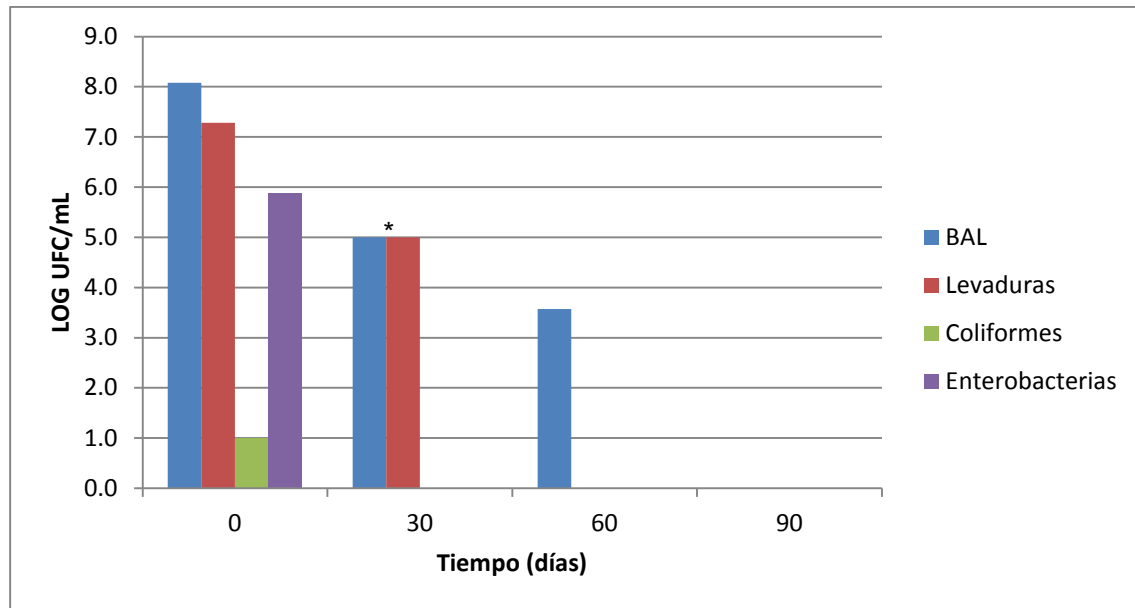


Figura 19. Concentración de bacterias lácticas (BAL), levaduras, coliformes y enterobacterias de la semilla 2 congelada a -65°C , durante 90 días. * Valor estimado.

En la figura 19 se muestran las cuentas de los grupos microbianos de la semilla 2 almacenada a -65°C durante 90 días. Se observa la disminución de los grupos microbianos con respecto al tiempo. Los valores iniciales (antes de congelar) fueron 19×10^7 , 40×10^5 , 14×10^5 y 27×10^2 UFC/mL para BAL, levaduras, coliformes y enterobacterias, respectivamente. Al paso de 30 días se observa una disminución de BAL y levaduras hasta $<10 \times 10^4$ UFC/mL v.e. (no hubo crecimiento en la dilución 10^{-4}), mientras que los coliformes y enterobacterias no fueron detectados. Posteriormente, al paso de 60 días de almacenamiento, no se detectaron levaduras y las BAL disminuyeron a 40×10^2 UFC/mL. Finalmente, al paso de 90 días, no se detectó crecimiento de ningún grupo microbiano (Tabla 22, Anexo 12.3).



Los grupos microbianos coliformes y enterobacterias no se detectaron en las dos semillas almacenadas a ambas temperaturas; mientras tanto, las levaduras y BAL sobrevivieron sólo en la semilla 1 almacenada a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero disminuyeron aproximadamente 4.4 y 5 ciclos logarítmicos, respectivamente; mientras que en la congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ no se detectaron estos grupos microbianos al paso de 3 meses. Esto se debe posiblemente a que a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ se congela la muestra en menor tiempo y la velocidad de nucleación de los cristales de agua es mayor, por lo tanto se forman cristales pequeños y de forma esférica, que dañan menos a las células en comparación con la congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el cual se forman cristales más grandes y en forma de aguja (Bello, 2000; Ordoñez *et al.*, 1998).

Los resultados anteriores se vieron reflejados en la fermentación realizada con una mezcla de los lotes 1 y 2 almacenadas a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$, descongeladas y reactivadas en aguamiel (Zayas, 2012). Se observó que, tras descongelar las semillas conservadas a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$, mezclarlas y ser utilizadas como inóculo para la fermentación (COAH), no se detectó el crecimiento de levaduras en ningún punto de la fermentación, mientras que las bacterias lácticas (BAL) tuvieron cuentas finales de 62×10^7 UFC/mL; sin embargo, el pulque obtenido carecía de etanol y el pH final fue de 4.09, lo cual podría indicar que los microorganismos no realizaron la fermentación adecuadamente.

No hay estudios publicados sobre la congelación de la semilla de pulque y la sobrevivencia de sus componentes microbiológicos. Sin embargo, es posible comparar estos resultados con otras bebidas fermentadas, no destiladas, como el vino o la cerveza.

Maicas *et al.* (2000), estudiaron la conservación de cultivos iniciadores de *Oenococcus oeni* mediante congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y liofilización, utilizados para la producción de vino. Esta bacteria, originalmente llamada *Leuconostoc oenos*, realiza la fermentación maloláctica (transformación de ácido málico en ácido láctico y CO_2), la cual determina las características organolépticas finales del producto.



Estos cultivos conservados y reactivados en medios de cultivo generan un crecimiento de hasta 10^{10} UFC/mL, sin embargo, al ser inoculados en vino directamente, las células no se pueden reproducir y por lo tanto no realizan la fermentación maloláctica. Es necesario entonces realizar uno o más pasos de reactivación y adaptación al vino de estos cultivos para mejorar la sobrevivencia de las bacterias. El uso de un medio de precultivo adecuado como MP (Maicas *et al.*, 1999) reduce el tiempo de preparación de los cultivos iniciadores, ayuda a las células a sobrevivir después del almacenamiento, les permite que crezcan y realicen la fermentación maloláctica en el vino.

Tras conservar los cultivos de *O. oeni* por 1 año a -20 °C, los cultivos previamente congelados en medio de precultivo (MP), pero reactivados en medio para *L. oenos* o directamente en vino, tuvieron una sobrevivencia de hasta el 93 % de los microorganismos. Estos valores son muy elevados comparados con los obtenidos en este estudio; esto puede ser debido a que se trata de un cultivo puro conservado en un medio de cultivo sintético, a diferencia de la semilla, que es un cultivo mixto, conservado en su forma original.

Con base en estos resultados, se congeló la semilla 5 a -65 °C utilizando glicerol como crioprotector. Se obtuvieron recuentos, después de 3 meses de almacenamiento, con valores de 41×10^5 y 79×10^5 UFC/mL para levaduras y BAL, respectivamente (Tabla 23, Anexo 12.3). Las cuentas de levaduras disminuyeron menos de un ciclo logarítmico y las BAL 1.22 ciclos (Figura 20). Esto se debe a que el glicerol favorece la nucleación extracelular de los cristales de hielo, protegiendo a las células (Ordoñez *et al.*, 1998).

En la figura 20 se muestran las cuentas de los grupos microbianos de la semilla 5 almacenada a -65 °C durante 92 días. Se observa la disminución de los grupos microbianos con respecto al tiempo. Los valores iniciales (antes de congelar) fueron 11×10^7 UFC/mL y 25×10^6 UFC/mL para BAL y levaduras, respectivamente, mientras que los coliformes y enterobacterias no se detectaron. Al paso de 2 días se observa una disminución de BAL y levaduras hasta 80×10^6 y 13×10^6 UFC/mL, respectivamente. Posteriormente, al paso de 22 días de almacenamiento, las



cuentas fueron 41×10^6 y 13×10^6 UFC/mL, para BAL y levaduras, respectivamente. Esto significa que las levaduras no perdieron viabilidad en la muestra entre los 2 y 22 días de almacenamiento. Al paso de 36 días de almacenamiento, las cuentas fueron 13×10^6 y 10×10^6 UFC/mL, para BAL y levaduras, respectivamente. Posteriormente, al paso de 50 días de almacenamiento, las cuentas fueron 29×10^5 y 16×10^5 UFC/mL, para BAL y levaduras, respectivamente. Fue aquí donde se observó la mayor disminución en la viabilidad de los microorganismos (Figura 20). Al paso de 63 días de almacenamiento, las cuentas fueron 17×10^5 y 18×10^5 UFC/mL, para BAL y levaduras, respectivamente. Finalmente, después de 92 días, las cuentas de BAL y levaduras fueron 41×10^5 y 79×10^5 UFC/mL, respectivamente (Tabla 23, Anexo 12.3).

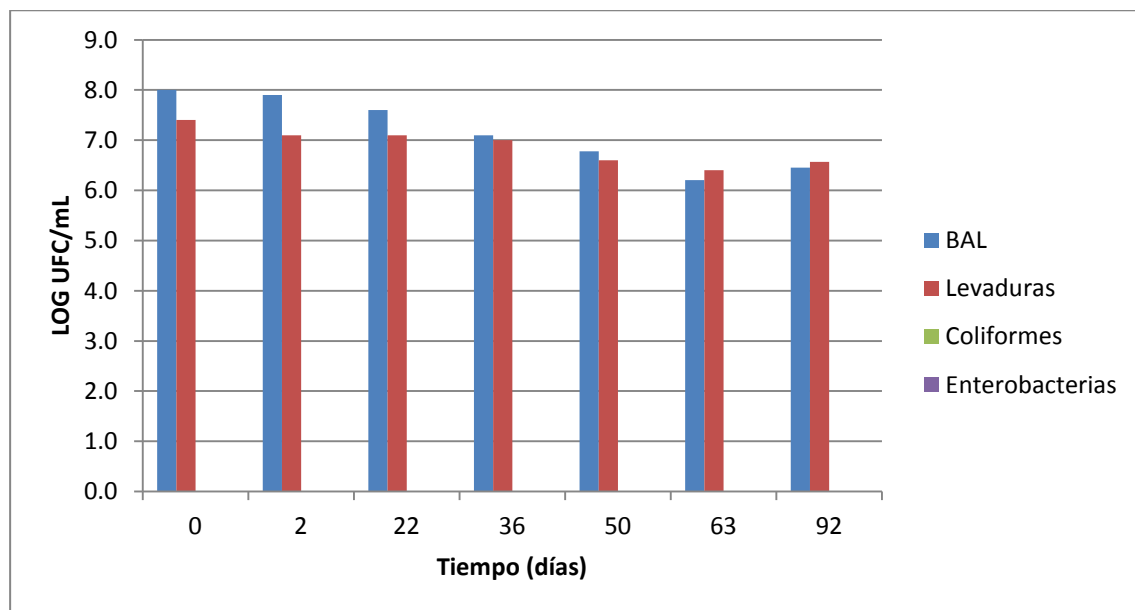


Figura 20. Concentración de bacterias lácticas (BAL), levaduras, coliformes y enterobacterias de la semilla 5 congelada a -65°C , durante 92 días.

A pesar de haber sobrevivido mayor cantidad de microorganismos con estas condiciones de almacenamiento, las cuentas disminuyen aproximadamente un ciclo logarítmico, lo cual significa que sobrevivió sólo el 10% de los microorganismos presentes. Estos valores son similares a los que obtuvieron



Maicas *et al.* (2000), cuando reactivaron las cepas de *Oenococcus oeni* en el mismo medio en el que se congelaron (medio MP). Por lo tanto, para incrementar la viabilidad de los microorganismos presentes en la semilla conservada y poderla utilizar como inóculo, se propone reactivar en algún medio de cultivo nutritivo antes de realizar la fermentación. Se podría utilizar caldo MRS para BAL y medio GPY líquido para levaduras.

8.4 Efecto de la liofilización como método de conservación de la semilla.

Al igual que con la congelación, se probó el método de liofilización para conservar los microorganismos de la semilla. Se liofilizaron las semillas 3 y 5. La primera se liofilizó directamente, sin el uso de un agente crioprotector y sin tratamiento previo de la muestra. Por otro lado, la semilla 5 se liofilizó realizando lavados con solución salina y utilizando leche descremada como protector. Aunque se trata de distintos lotes, como se observa en la figura 15, ambas semillas tienen cuentas similares antes de la liofilización: las cuentas de BAL son de 28×10^7 y 11×10^7 UFC/mL y las de levaduras son de 13×10^7 y 25×10^6 UFC/mL para la semilla 3 y 5, respectivamente.

El lote 3 se liofilizó tal y como se recibió en el laboratorio, obteniendo resultados poco favorables debido a que no se detectaron los grupos microbianos BAL, coliformes y enterobacterias; mientras que la concentración de levaduras presentes disminuyó 5.1 ciclos logarítmicos. La cuenta de levaduras después de liofilizar la semilla tres fue de 10×10^2 UFC/mL (Figura 21) (Tabla 24, Anexo 12.4).

Estos resultados no son favorables para la conservación de la semilla, por lo que se liofilizó el lote 5 realizando lavados con solución salina a la muestra y utilizando leche descremada como protector. De esta manera se logró conservar los microorganismos presentes en mayor proporción que en la semilla 3. Las cuentas después de liofilizar la semilla 5 fueron de 50×10^6 y 81×10^5 UFC/mL para BAL y levaduras, respectivamente (Tabla 25, Anexo 12.4). La cuenta de BAL disminuyó 0.3 ciclos logarítmicos, mientras que las levaduras 0.5 ciclos (Figura 22). Esto representa una sobrevivencia del 50.1 % de los microorganismos viables en BAL y



del 31.6 % en levaduras. A pesar de haber disminuido, siguen siendo cuentas mayores que las reportadas por Cervantes-Contreras *et al.* (2007), en semilla; por lo tanto, en cuanto a la concentración de biomasa, sería posible utilizarla como inóculo para la fermentación del aguamiel.

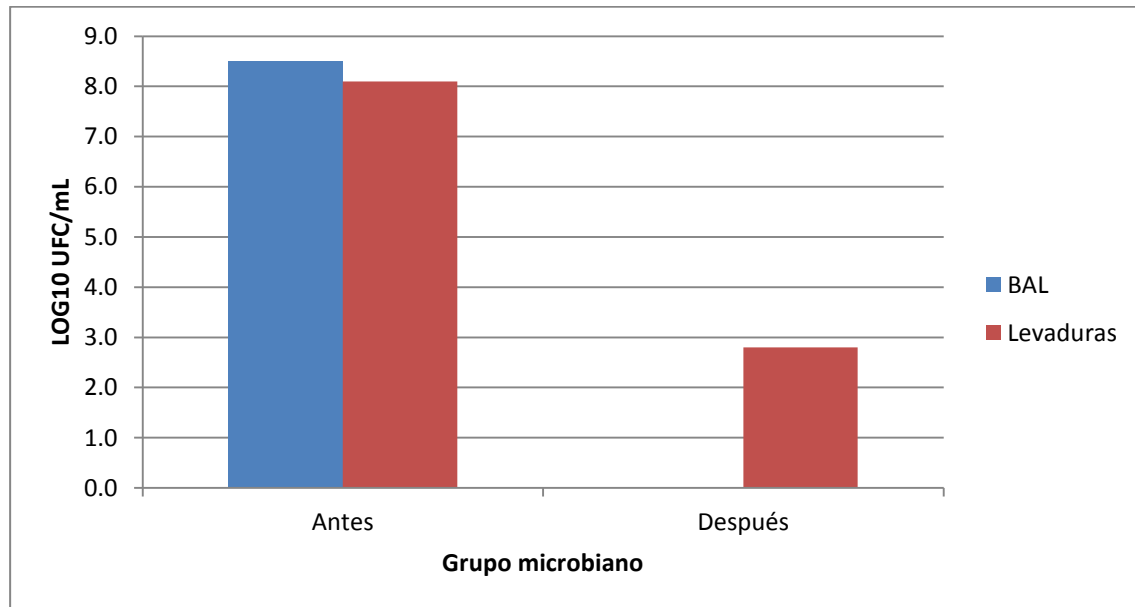


Figura 21. Concentración de bacterias lácticas (BAL) y levaduras de la semilla 3 liofilizada, durante 2 días. Antes, semilla sin liofilizar; después, semilla dos días después de la liofilización.

En el proceso de liofilización mueren células, pero las que sobreviven se conservan por mucho tiempo (Tórtora, 2007). Entonces, es importante identificar qué microorganismos sobreviven y si éstos pueden realizar la fermentación adecuadamente al ser utilizados como inóculo en la fermentación de aguamiel.

Se realizó el conteo de microorganismos de la semilla 5 durante 3 meses después de ser liofilizada, monitoreando aproximadamente cada 15 días (Figura 23). Hubo una reducción de 1.7 ciclos logarítmicos en levaduras y 1.0 en BAL entre el conteo, recién liofilizada la semilla y 90 días después.

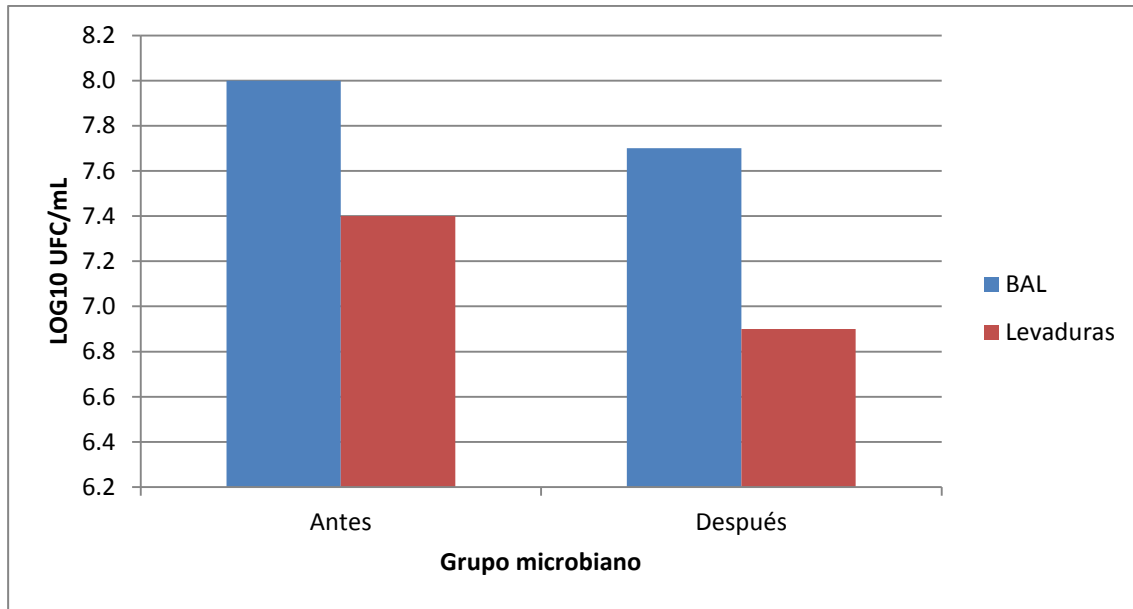


Figura 22. Concentración de bacterias lácticas (BAL) y levaduras de la semilla 5 liofilizada, durante 2 días. Antes, semilla sin liofilizar; después, semilla dos días después de la liofilización.

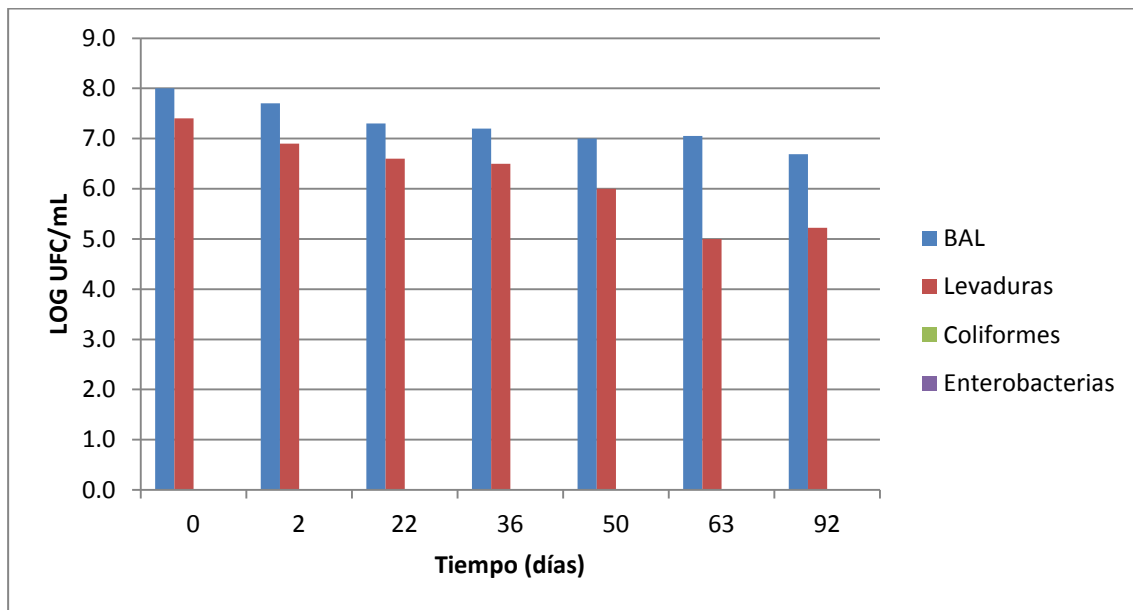


Figura 23. Concentración de bacterias lácticas (BAL), levaduras, coliformes y enterobacterias de la semilla 5 liofilizada, durante 92 días. Se utilizó leche descremada como protector.



En la figura 23 se muestran las cuentas de los grupos microbianos de la semilla 5 liofilizada durante 92 días. Se observa la disminución de los grupos microbianos con respecto al tiempo. Los valores iniciales (antes de liofilizar) fueron 11×10^7 , 25×10^6 para BAL y levaduras, respectivamente; mientras que los coliformes y enterobacterias no se detectaron. Al paso de 2 días se observa una disminución de BAL y levaduras hasta 50×10^6 y 81×10^5 UFC/mL, respectivamente. Posteriormente, al paso de 22 días de almacenamiento, las cuentas fueron 23×10^6 y 41×10^5 UFC/mL, para BAL y levaduras, respectivamente. Al paso de 36 días de almacenamiento, las cuentas fueron 16×10^6 y 30×10^5 UFC/mL, para BAL y levaduras, respectivamente. Posteriormente, al paso de 50 días de almacenamiento, las cuentas fueron 10×10^6 y 11×10^5 UFC/mL, para BAL y levaduras, respectivamente. Al paso de 63 días de almacenamiento, las cuentas fueron 11×10^6 y 11×10^4 UFC/mL, para BAL y levaduras, respectivamente. Finalmente, después de 92 días, las cuentas de BAL y levaduras fueron 17×10^4 y 50×10^5 UFC/mL, respectivamente (Tabla 26, Anexo 12.4).

Finalmente, se midió la cantidad de agua perdida durante el proceso de liofilización en las semillas 3 y 5. Estos valores fueron comparados con los valores de humedad reportados por Sánchez-Marroquín (1979), para 3 pulques diferentes: estado de Hidalgo, estado de México y pulque “Tlachique”, que es un pulque delgado y con bajo contenido alcohólico.

La humedad de la semilla 3 fue de $81.34 \pm 1.23\%$ de agua (Tabla 27, Anexo 12.5), valor que es más cercano al del pulque proveniente de Hidalgo (Sánchez-Marroquín, 1979). Esto significa que no tiene un alto contenido de humedad; sin embargo, las muestras de semilla 3 liofilizada quedaron con un aspecto gomoso, todavía húmedas (Figura 24), seguramente los polisacáridos extracelulares formados retienen el agua, que no está disponible para el crecimiento microbiano, por lo que puede que no se haya extraído toda el agua de la muestra. Esto también se vio reflejado en la concentración de BAL y levaduras presentes en la semilla 3 dos días después de liofilizar, ya que sobrevivió sólo el 0.000004% y 0.00005% , respectivamente.



En la semilla 5. Se extrajo mayor cantidad de agua: 90.30 ± 0.37 % (Tabla 25, Anexo 5), valor más cercano al pulque proveniente del Estado de México y al pulque Tlachique en el estudio de Sánchez-Marroquín (1979). Esto indica que las muestras tenían un mayor contenido de agua que en la semilla 3 y que se extrajo de manera eficiente (Figura 24). La concentración de BAL y levaduras presentes en la semilla 5 dos días después de liofilizar fue de 50×10^6 y 81×10^5 UFC/mL, respectivamente, lo que representa una sobrevivencia de 45.5% de BAL y 32.4% de levaduras.

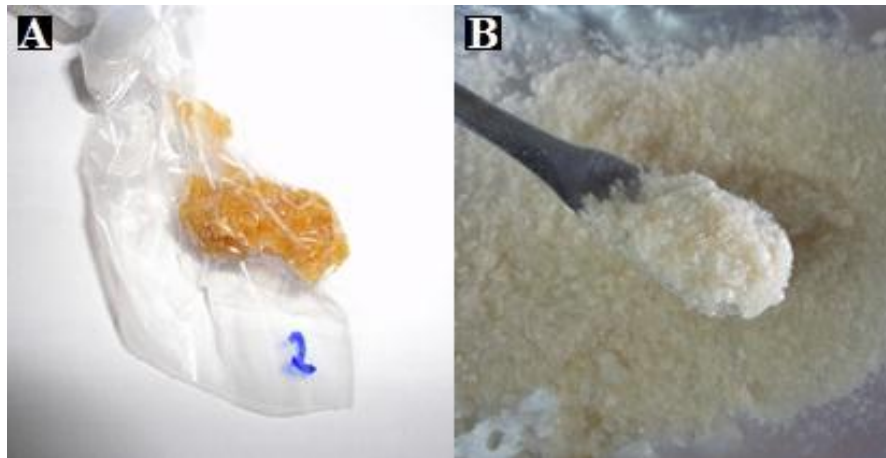


Figura 24. Aspecto de las semillas 3 y 5 liofilizadas sin y con leche descremada como protector, respectivamente. (A) Semilla 3, (B) Semilla 5.

8.5 Comparación de los métodos de conservación

A continuación se muestran las cuentas de la semilla 5 en el tiempo 0 (antes de los tratamientos) y después de aplicar los métodos de conservación (congelación y liofilización), al inicio del tratamiento y tres meses después (Figura 25).

Se puede observar que al inicio de ambos tratamientos, las cuentas de BAL disminuyen a 80×10^6 UFC/mL en congelación y a 50×10^6 UFC/mL en liofilización; mientras que las cuentas de levaduras disminuyen a 13×10^6 UFC/mL en congelación y a 81×10^5 UFC/mL en liofilización. Sin embargo, al paso de 90 días las cuentas de BAL fueron 29×10^5 y 50×10^5 UFC/mL; y las de levaduras fueron de 39×10^5 y 17×10^4 UFC/mL, en congelación y liofilización, respectivamente. Esto



representa una sobrevivencia de 2.6% de BAL y 15.6% de levaduras en congelación y 4.5% de BAL y 0.7% de levaduras en liofilización. Por lo anterior se concluye que las BAL se conservaron mejor en liofilización y las levaduras en congelación.

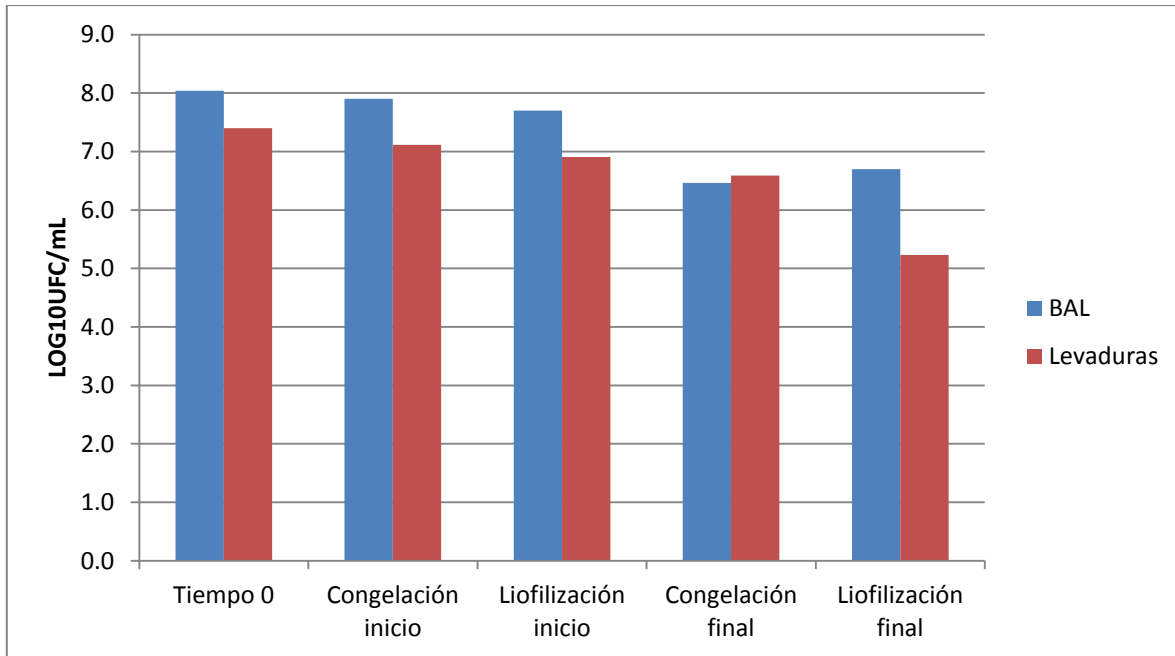


Figura 25. Concentración de bacterias lácticas (BAL) y levaduras en la semilla 5 en el tiempo 0 (antes de los tratamientos), congelación y liofilización, al inicio y después de 3 meses del tratamiento.

8.6 Aislamiento de microorganismos.

Se aislaron y purificaron un total de 100 cepas de BAL y levaduras del lote 5 de semilla. 20 cepas correspondientes al tiempo 0, antes de los métodos de conservación; 40 cepas de congelación, 20 al inicio del tratamiento y 20 después de 3 meses; y 40 cepas de liofilización, 20 al inicio del tratamiento y 20 después de 3 meses. De cada tiempo y tratamiento, se aislaron la misma cantidad de levaduras y BAL.

Se aislaron y purificaron 50 cepas de BAL (Tabla 14). Todas fueron Gram-positivas y catalasa-negativas. De las cuales, 7 fueron cocobacilos; 29, bacilos; y 14, bacilos largos. Se detectaron 2 morfologías coloniales principales: 1. Colonias



medianas, circulares, borde entero, convexas, cremosas, color blanco; y 2. Colonias chicas, puntiformes, borde crenado, planas, butirosas, color gris. Se confirmó la pureza de las cepas mediante morfología colonial, tinción de Gram, prueba de catalasa y mediante observaciones microscópicas (Figura 26).

Se aislaron y purificaron 50 cepas de levaduras (Tabla 15). De las cuales, 6 tienen tamaño pequeño; 27, mediano y 17, grande. Se detectaron 2 morfologías coloniales principales: 1. Colonias medianas (~4 mm de diámetro), circulares, borde entero, convexas, cremosas, brillosas; y 2. Colonias grandes (~8 mm de diámetro), circulares, borde entero, convexas, butirosas, opacas. Además se encontraron, en menor proporción, colonias chicas (~2 mm de diámetro), puntiformes, con elevación plana. Todas fueron resembradas hasta confirmar su pureza verificando que hubiera un solo tipo de colonia en el medio y observaciones microscópicas (Figura 27).

A las colonias aisladas se les asignó una clave de la siguiente forma (datos no mostrados): los aislados del tiempo 0 (antes de los tratamientos) contienen el número 0, seguido de las letras A-J para las levaduras y K-T para las BAL. A los aislados de las muestras en conservación se les asignó una clave de 3 caracteres: la letra C para congelación y L para liofilización; seguido del número 0, para el inicio del tratamiento o la letra F para los aislados del final del tratamiento; y finalmente, las letras A-J para las levaduras y K-T para las BAL.

Las cepas aisladas y purificadas fueron conservadas en glicerol como se describió en el capítulo 7, para su posterior identificación. Es posible que los aislados de BAL estén relacionados con los microorganismos detectados mediante DGGE en este estudio y a su vez, con las BAL identificadas previamente en el pulque: *Lactobacillus* spp., *L. brevis*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*, *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* (Lappe & Ulloa, 1993; Steinkraus, 1997; Ramírez *et al.*, 2004). Los aislados de levaduras podrían tratarse de especies de *Saccharomyces* como *S. bayanus*, *S. Cerevisiae* y *S. paradoxus*; y no-*Saccharomyces* como *Candida* spp., *C. parapsilosis*, *Clavispora lusitaniae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces*



lactis, *Pichia membranifaciens*, *Pichia* spp., y *Torulaspota delbrueckii* (Lappe & Ulloa, 1993; Steinkraus, 1997; Ramírez *et al.*, 2004). Sin embargo, hace falta su identificación por pruebas bioquímicas o por métodos moleculares.

Tabla 14. Morfología celular de las cepas de bacterias lácticas (BAL) aisladas de la semilla 5 antes de su conservación (inicial) y después de ser congelada y liofilizada.

Morfología	Inicial	Congelación	Liofilización
Cocobacilos	3	2	2
Bacilos	4	13	12
B. Largos	3	5	6
Total	10	20	20

Tabla 15. Morfología colonial de las cepas de levaduras aisladas de la semilla 5 antes de su conservación (inicial) y después de ser congelada y liofilizada.

Tamaño de colonia	Inicial	Congelación	Liofilización
Chica	0	1	5
Mediana	8	10	9
Grande	2	9	6
Total	10	20	20

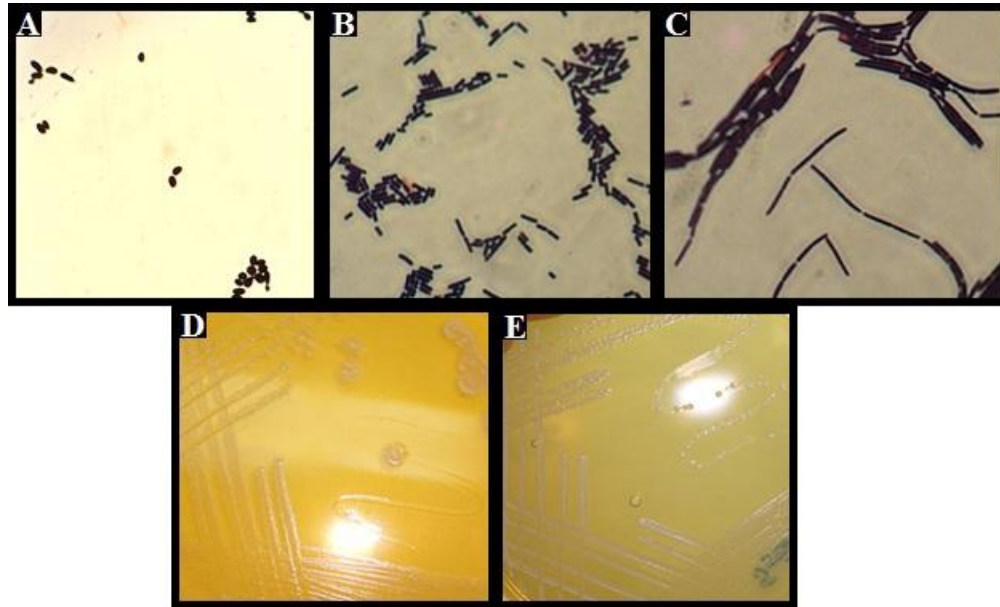


Figura 26. Ejemplo de bacterias lácticas (BAL) aisladas de la semilla 5 por agotamiento en medio MRS y observaciones microscópicas (tinción de Gram) con un aumento total de 1000X. (A) Cocobacilos, (B) bacilos, (C) bacilos largos, (D) colonias grandes, (E) colonias puntiformes.

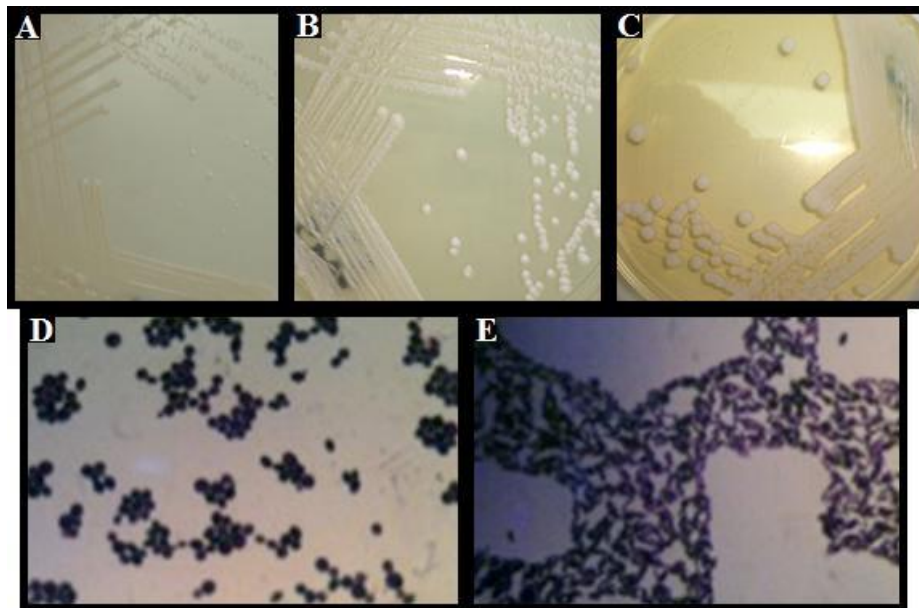


Figura 27. Ejemplo levaduras aisladas de la semilla 5 en medio GPYA y observaciones microscópicas (tinción de Gram), con aumento total de 1000X. (A) Colonias chicas, (B) colonias medianas, (C) colonias grandes, (D) levaduras con forma ovoidal, (E) levaduras con forma alargada.



8.7 Determinación del patrón de bandas de DGGE de las cinco semillas en el tiempo 0, las muestras de conservación de semilla 5 y la fermentación de aguamiel con esta última.

8.7.1 Extracción de ADN.

La extracción de ADN es el primer paso para realizar la técnica PCR-DGGE, a partir de éste se amplifica la región que se quiere estudiar de un grupo de microorganismos, para posteriormente separar los amplicones mediante DGGE. En las figuras 28-30 se observan las fotografías de los geles correspondientes a la electroforesis en gel de agarosa al 1% que se realizaron con las muestras de ADN extraído de los 5 lotes semilla al tiempo 0, así como de la semilla 5 conservada mediante congelación y liofilización y de muestras durante la fermentación de aguamiel usando esta semilla (Burgos, en preparación). Las bandas correspondientes al ADN son de alto peso molecular y deben ser bien definidas y sin barrido para descartar la posibilidad de que se haya degradado el material nucleico.

En las tablas 28-30 (Anexo 12.6) se muestran los valores de absorbancia a los valores de longitud de onda de 260, 280 y 230 nm de las mismas muestras. Se consideran cifras óptimas de pureza aquellas que presentan un cociente de abs 260/280 de 1.8-2.0, valores por debajo de 1.8, indican contaminación con proteínas, fracciones de membranas o fenol (Molina *et al.*, 2006). A continuación se muestran los resultados de las extracciones de las 5 semillas en el tiempo 0, de las muestras en conservación de semilla 5 y de las muestras de fermentación de aguamiel con la misma semilla.

8.7.1.1 Semillas 1, 2, 3, 4 y 5 tiempo 0.

Los valores de concentración varían entre 8.35 y 842.1 ng/ μ L. Los cocientes de absorbancia 260/280 variaron entre 1.21 y 1.85 (Tabla 28, Anexo 12.6). Éstos indican que las algunas de las muestras tienen un grado aceptable de pureza y otras no (Molina *et al.*, 2006); sin embargo, cuando se extrae ADN directamente de un alimento, los valores arriba de 1.5 son aceptables (Wintzingerode *et al.*, 1997). Dos muestras correspondientes a la semilla 4 tienen valores mayores a 1.8



y el resto, oscila entre 1.2 y 1.7. Entonces, se seleccionaron las muestras con clave 101, 201, 301, 403 y 501 para realizar la reacción en cadena de la polimerasa, ya que estas tuvieron un cociente 260/280 mayor a 1.5.

En la figura 28 se observa la fotografía del gel correspondiente a la electroforesis en gel de agarosa al 1% que se realizó con las muestras de ADN extraído de los lotes 1 y 2, se observa un ligero barrido en los carriles 2 y 4, que son las muestras cuya extracción se realizó a partir de la semilla suspendida en buffer de fosfatos, como se describe en Bolaños (2004). Por otro lado, los carriles 1 y 3 son los correspondientes a las mismas semillas pero se utilizó buffer TES para suspender las muestras, por lo tanto se escogió el segundo buffer para realizar las extracciones posteriores.

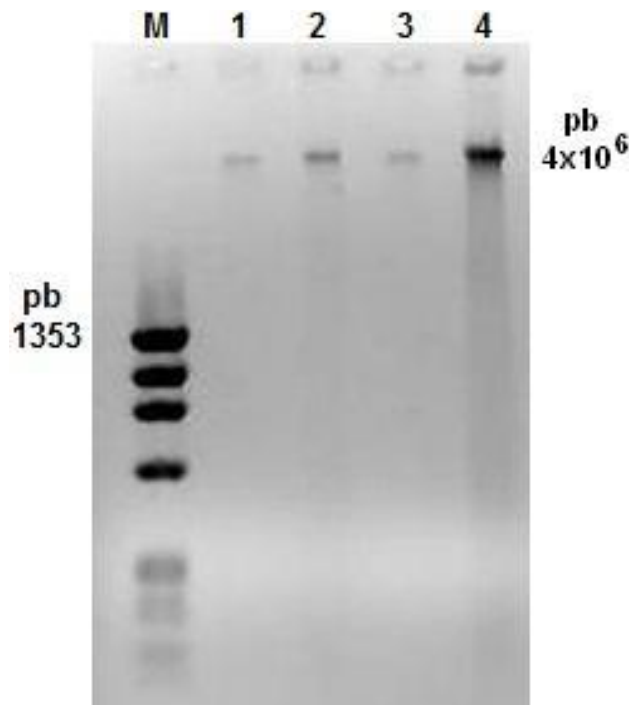


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído de las muestras de semilla corrido a 90 V por 30 min. Carriles: M: Marcador de peso molecular (*Invitrogen*; 1353 pb); 1 y 2: Semilla 1; 3 y 4: Semilla 2.

8.7.1.2 Muestras de semilla 5 conservada por congelación y liofilización.

En la tabla 29 (anexo 12.6) se muestran los valores de absorbancia del extracto de ADN de la muestra de semilla 5 del tiempo 0 al 5. El primero corresponde al



producto recién congelado o liofilizado y el tiempo 5 a 3 meses después. Los valores de concentración varían entre 18.33 y 571.05 ng/ μ L. Los cocientes de absorbancia 260/280 varían entre 0.11 y 1.81; y 260/230 entre 0.06 y 1.39. Esto indica la presencia de contaminantes, especialmente en la muestra con clave L11.

En la figura 29 se observa la fotografía del gel correspondiente a la electroforesis en gel de agarosa al 1% que se realizó con las muestras de ADN extraídas de la semilla 5 congelada y liofilizada, tiempos 0 y 1. Se observan bandas bien definidas sin barrido. Las más tenues corresponden a congelación tiempo 0 (Carriles 2 y 3). Sin embargo, se confirmó que estas muestras contienen ADN con concentraciones de 27.5 y 70.6 ng/ μ L, respectivamente.

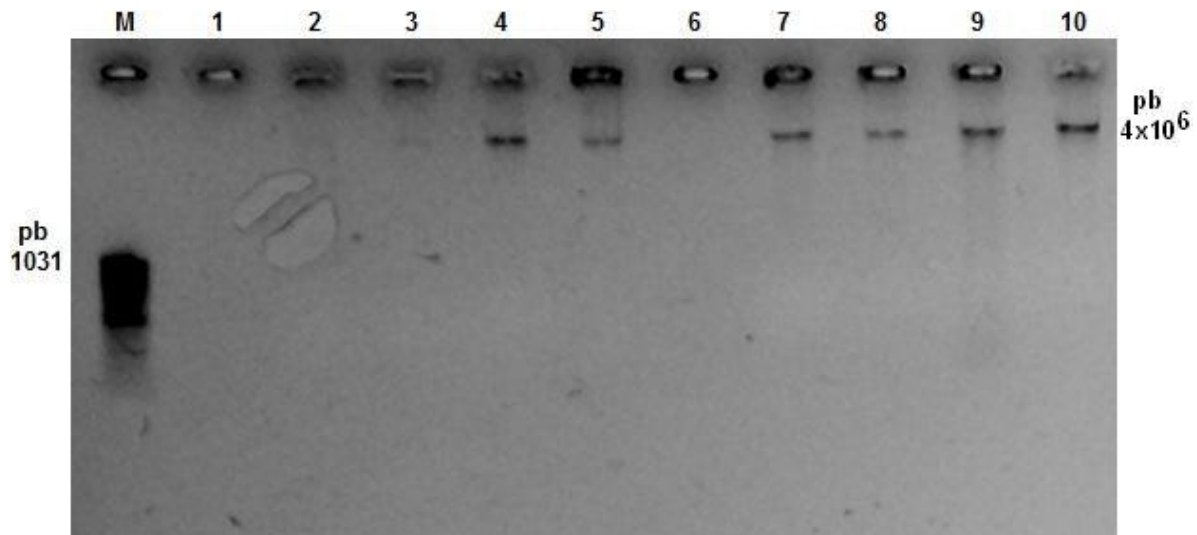


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído de las muestras de ADN extraído de la semilla 5 en conservación, corrido a 90 V por 30 min. Carriles: M: Marcador de peso molecular (*Fermentas*; 1 Kbp); 2 y 3: Congelación t0; 4 y 5: Liofilización t0; 7 y 8: Congelación t1; 9 y 10: Liofilización t1; 1 y 6: sin muestra.

8.7.1.3 Muestras de fermentación de aguamiel con la semilla 5.

En la tabla 30 (Anexo 12.6) se muestran los valores de absorbancia del extracto de ADN de la fermentación del aguamiel con la semilla 5 (Burgos, en preparación): tiempos: 0, 12 y 24 horas. Los valores de concentración varían entre 65.18 y 171.4 ng/ μ L. Los cocientes de absorbancia 260/280 varían entre 1.36 y 1.66; y 260/230 entre 1.05 y 1.47. Las mayores concentraciones de ADN corresponden al tiempo



24, ya que el número de microorganismos presentes es mayor. Todas las muestras presentan un grado de pureza aceptable.

En la figura 30 se observa la fotografía del gel correspondiente a la electroforesis en gel de agarosa al 1% que se realizó con las muestras de ADN extraídas de las muestras de fermentación de aguamiel con la semilla 5. Las bandas son bien definidas y de poca intensidad, a excepción del carril 3.

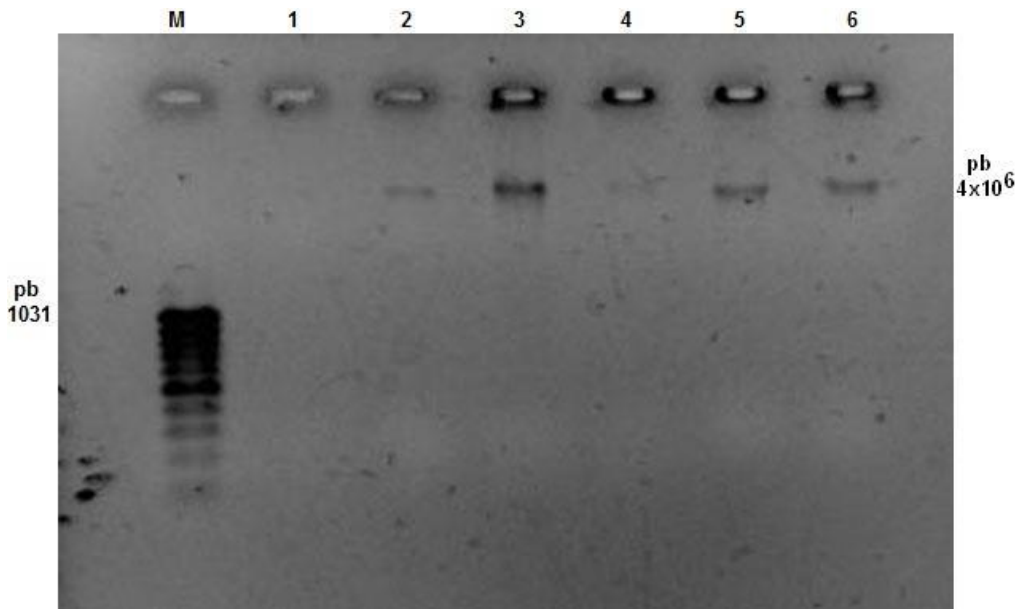


Figura 30. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN extraído de las muestras de la fermentación del aguamiel con la semilla 5, corrido a 90 V por 30 min. Carriles: M: Marcador de peso molecular (*Fermentas*; 1 Kbp); 1 y 2: Tiempo 0; 3 y 4: Tiempo 12; 5 y 6: Tiempo 24.

8.7.2 Amplificación de la región V3 del gen ribosomal 16S mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Una vez extraído el ADN de cada muestra, se realizaron reacciones de PCR para amplificar la región variable V3 del gen ribosomal 16S, usando cebadores para bacteria (Ampe *et al.*, 1999). Se amplificaron 15 muestras de ADN; 8 muestras del tiempo 0; 4 de conservación de semilla 5 y 3 muestras de fermentación de aguamiel con la semilla 5, tiempo 0, 12 y 24 horas. Se seleccionaron para la amplificación las muestras con clave 101, 201, 301 y 402 (Tabla 28, Anexo 12.6); correspondientes a las cinco semillas en el tiempo 0, las muestras con clave C02,



C21, L01 y L21 (Tabla 29, Anexo 12.6); correspondientes a la conservación de la semilla 5; y las muestras con clave F02, F122 y F241 (Tabla 30, Anexo 12.6), correspondientes a la fermentación del aguamiel con la misma semilla, debido a que son las muestras con mayor pureza y no estaba degradado el material nucléico.

En las figuras 31-34 se observan las fotografías correspondientes a la electroforesis en gel de agarosa 2 % que se realizó para confirmar que se hubieran obtenido los amplificados con el tamaño adecuado. Se hicieron los geles con los productos de PCR de los 5 lotes semilla al tiempo 0, con las muestras de conservación de la semilla 5 y de la fermentación de aguamiel con la misma semilla. Los amplificados esperados deben tener un peso de 205 pb. Entodas las reacciones se incluyó como control negativo un tubo sin templado de ADN, pero con los demás reactivos.

8.7.2.1 Semillas 1, 2, 3, 4 y 5 tiempo 0.

En la tabla 31 (Anexo 12.7) se muestran los valores de absorbancia de productos de PCR de los 5 lotes de semilla al tiempo 0. Los valores de concentración varían entre 326.5 y 758.6 ng/ μ L. Los cocientes de absorbancia 260/280 varían entre 1.68 y 1.75; y 260/230 entre 1.31 y 1.70. Los primeros indican un buen grado de pureza de las muestras.

En la figura 31 se observa la fotografía del gel correspondiente a la electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de PCR obtenidos de las semillas 1, 2, 3 y 4 del tiempo 0, las cuales corresponden al tamaño esperado (205pb). También se comprueba que no hubo contaminación en la reacción debido a que no se observan bandas en el control negativo (Carril 2).

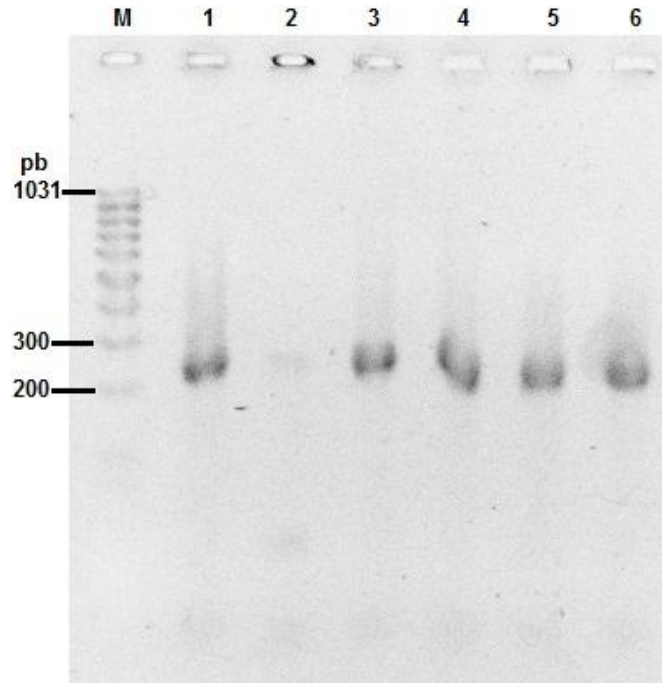


Figura 31. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR de las muestras de Semillas 1 y 2 tiempo 0, corrido a 70 V por 1 hora. Carriles: M: Marcador de peso molecular (*Fermentas*; 1 Kbp); 1: Control +; 2: Control -; 3, 4, 5 y 6: Semillas 1, 2, 3 y 5, respectivamente.

En la figura 32 se observa la fotografía del gel correspondiente a la electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de PCR obtenidos de la semilla 5 en el tiempo 0, las cuales corresponden al tamaño esperado (205pb). También se comprueba que no hubo contaminación en la reacción debido a que no se observan bandas en el control negativo (Carril 5). Se realizaron cuatro repeticiones, de las cuales la muestra 501 (Carril 1) corresponde a la banda mejor definida y sin ningún barrido; por lo tanto, esta muestra es la que se utilizó para DGGE.

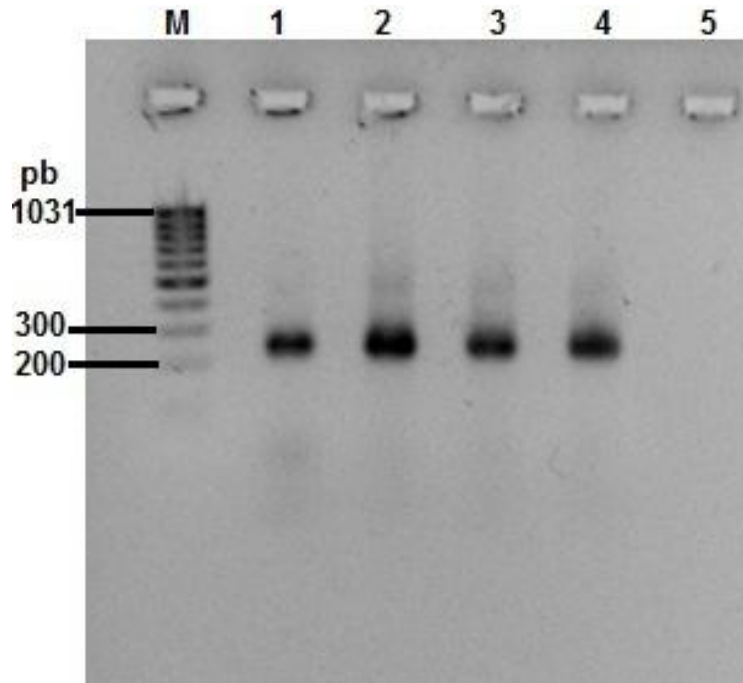


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR de las muestras de Semilla 5 tiempo 0, corrido a 70 V por 1 hora. Carriles: M: Marcador de peso molecular (*Fermentas*; 1 Kbp); 1-4: Semilla 5 tiempo 0; 5: Control negativo.

8.7.2.2 Conservación de la semilla 5 en congelación y liofilización.

En la tabla 32 (Anexo 12.7) se muestran los valores de absorbancia de productos de PCR de la muestra de semilla 5 que se conservó en congelación a $-65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y mediante liofilización. Las muestras corresponden al tiempo 0; es decir, inmediatamente después del tratamiento; y al tiempo 2 (34 días después). Los valores de concentración varían entre 295 y 344 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Estos valores son homogéneos debido a que se cargó la misma cantidad de ADN en cada tubo, tomando en cuenta los resultados de la tabla 28. Los cocientes de absorbancia 260/280 varían entre 1.65 y 1.70. Los cuales indican un buen grado de pureza de los productos de PCR.

En la figura 33 se observa la fotografía del gel correspondiente a la electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de PCR obtenidos de la conservación de la semilla 5, las cuales corresponden al tamaño esperado (205pb). También se



comprueba que no hubo contaminación en la reacción debido a que no se observan bandas en el control negativo (Carril 1).

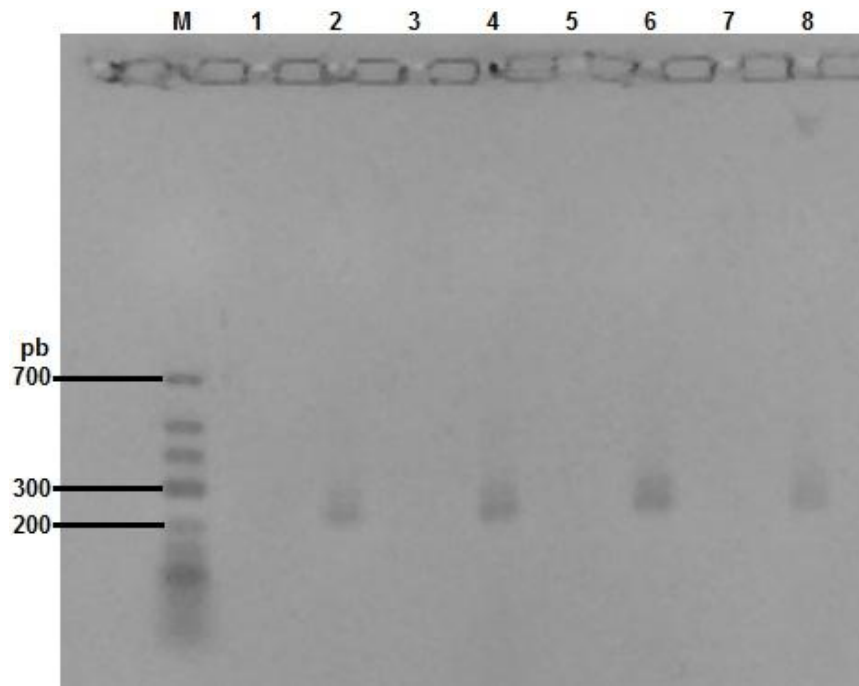


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR de las muestras de Conservación Semilla 5, corrido a 70 V por 1 hora. Carriles: M: Marcador de peso molecular (*Fermentas*; 700 pb); 1: Control negativo; 2 y 4, Semilla 5 congelada; 6 y 8: Semilla 5 liofilizada; 3, 5 y 7: sin muestra.

8.7.2.3 Fermentación de aguamiel con la Semilla 5.

En la tabla 33 (Anexo 12.7) se muestran los valores de absorbancia de productos de PCR de la fermentación de aguamiel con la Semilla 5. Los valores de concentración varían entre 485.1 y 497.3 ng/ μ L. Los cocientes de absorbancia 260/280 varían entre 1.77 (F02) y 1.78 (F241), los cuales indican un buen grado de pureza de las muestras.

En la figura 34 se observa la fotografía del gel correspondiente a la electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos de PCR obtenidos de la fermentación de aguamiel con la semilla 5, las cuales corresponden al tamaño esperado (205pb). También se comprueba que no hubo contaminación en la reacción



debido a que no se observan bandas en el control negativo (Carril 3). Se utilizó como control positivo ADN de la muestra con clave 501 (carril 2).

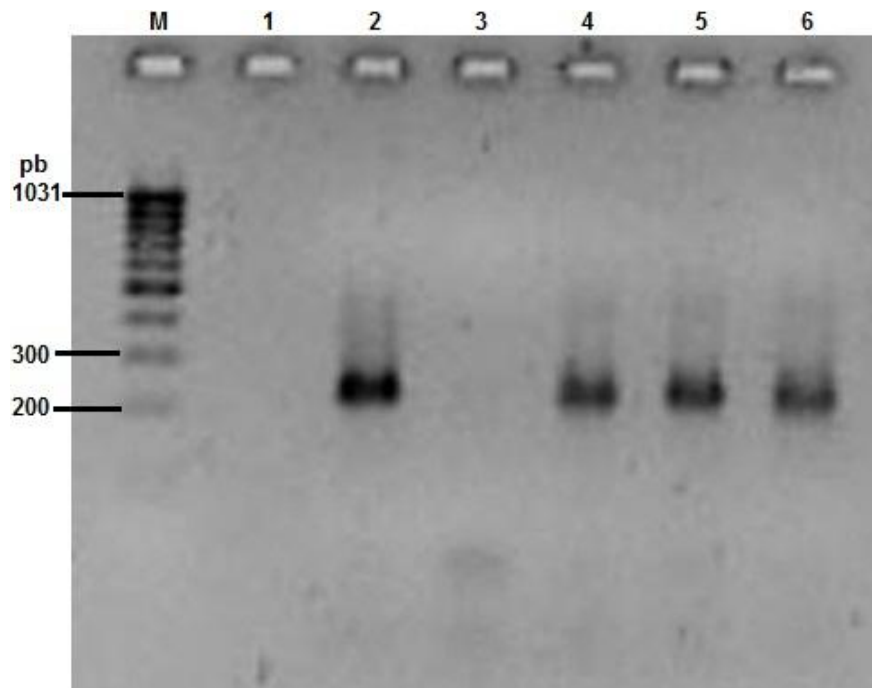


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR de las muestras de fermentación del aguamiel con la semilla 5, corrido a 70 V por 1 hora. Carriles: M: Marcador de peso molecular (*Fermentas*; 1Kbp); 2: Control +; 3: Control negativo; 4-6, Fermentación t0, t12 y t24, respectivamente; 1: sin muestra.

8.7.3 Separación de los productos de PCR mediante DGGE.

Los productos de PCR de cada muestra son una mezcla de los fragmentos de cada bacteria presente en la muestra. Para saber qué bacterias corresponden es necesario separarlos. Estos son del mismo tamaño, pero de diferente secuencia. Se utilizó la técnica de DGGE para efectuar la separación para lo cual, primero se debe determinar el gradiente óptimo para la separación de los fragmentos.

8.7.3.1 Determinación del gradiente de desnaturante óptimo para la separación de los productos de PCR.

Con el fin de establecer el intervalo adecuado de concentración de desnaturante para separar por DGGE los fragmentos de ADN, se realizó un gel perpendicular con gradiente de 0 a 100% con una mezcla de todos los productos



de PCR de las tablas 31-33 (Anexo 12.7), se cargaron 3 μg de cada muestra (Figura 35).

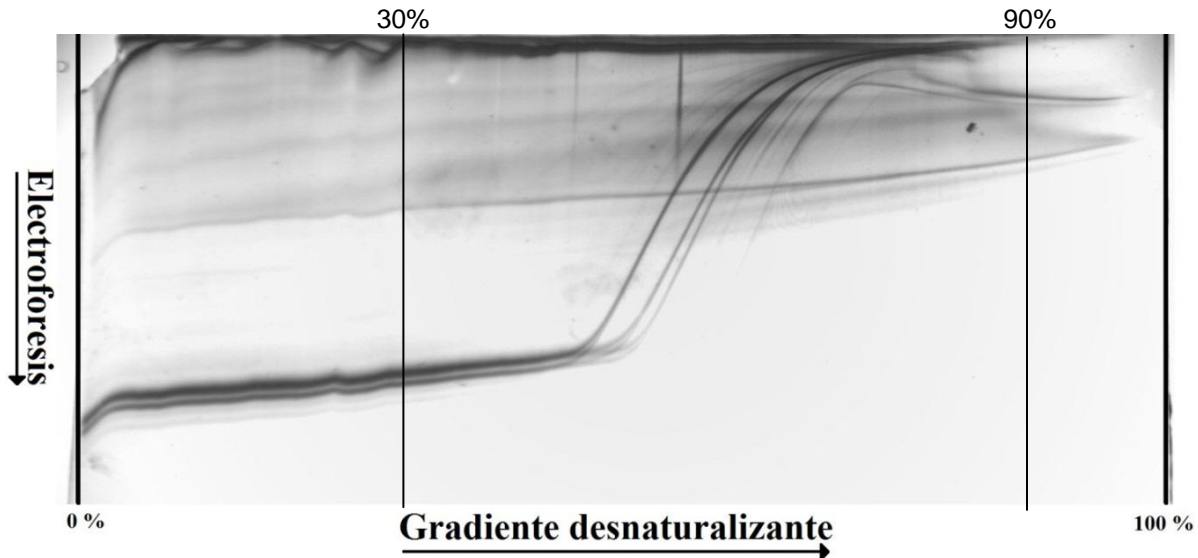


Figura 35. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante perpendicular (DGGE) realizado con todas las muestras de las tablas 31-33 (Anexo 12.7). Gel de poliacrilamida al 8% (p/v) utilizando un intervalo desnaturalizante de 0-100% (p/v) y amortiguador TAE [1X] (Tris 0.04 M, Acetato 0.04 M, EDTA 1 mM, ph 8). El gradiente desnaturalizante estuvo formado por urea 7 M y formamida al 40 % (v/v). La electroforesis se realizó a una temperatura de 60 °C durante 2 h a 100 V. Posteriormente el gel se tiñó con el kit *Plus One DNA silverstaining*, de *PharmaciaBiotech*.

En la figura 34 es posible apreciar que el intervalo de concentración en el que se logra la separación de productos de PCR oscila entre 30% y 90%. Estos son los valores de porcentaje de desnaturalizante con los que se trabajaron los gels paralelos realizados posteriormente.

8.7.3.2 Identificación de bandas.

En la figura 36 se muestra la imagen del gel de DGGE con gradiente desnaturalizante paralelo de 30 a 90 % realizado con las muestras con clave 101, 201, 301, 402 y 501 de la tabla 28, correspondientes a las 5 semillas en el tiempo 0; las muestras con clave C02, C21, L01 y L21, correspondientes a la conservación de la semilla 5; y las muestras con clave F02, F122 y F241, correspondientes a la fermentación del aguamiel con la misma semilla. Haciendo



consenso del gel analizado, se detectaron un total de 22 bandas, no todas presentes en todas las muestras analizadas.

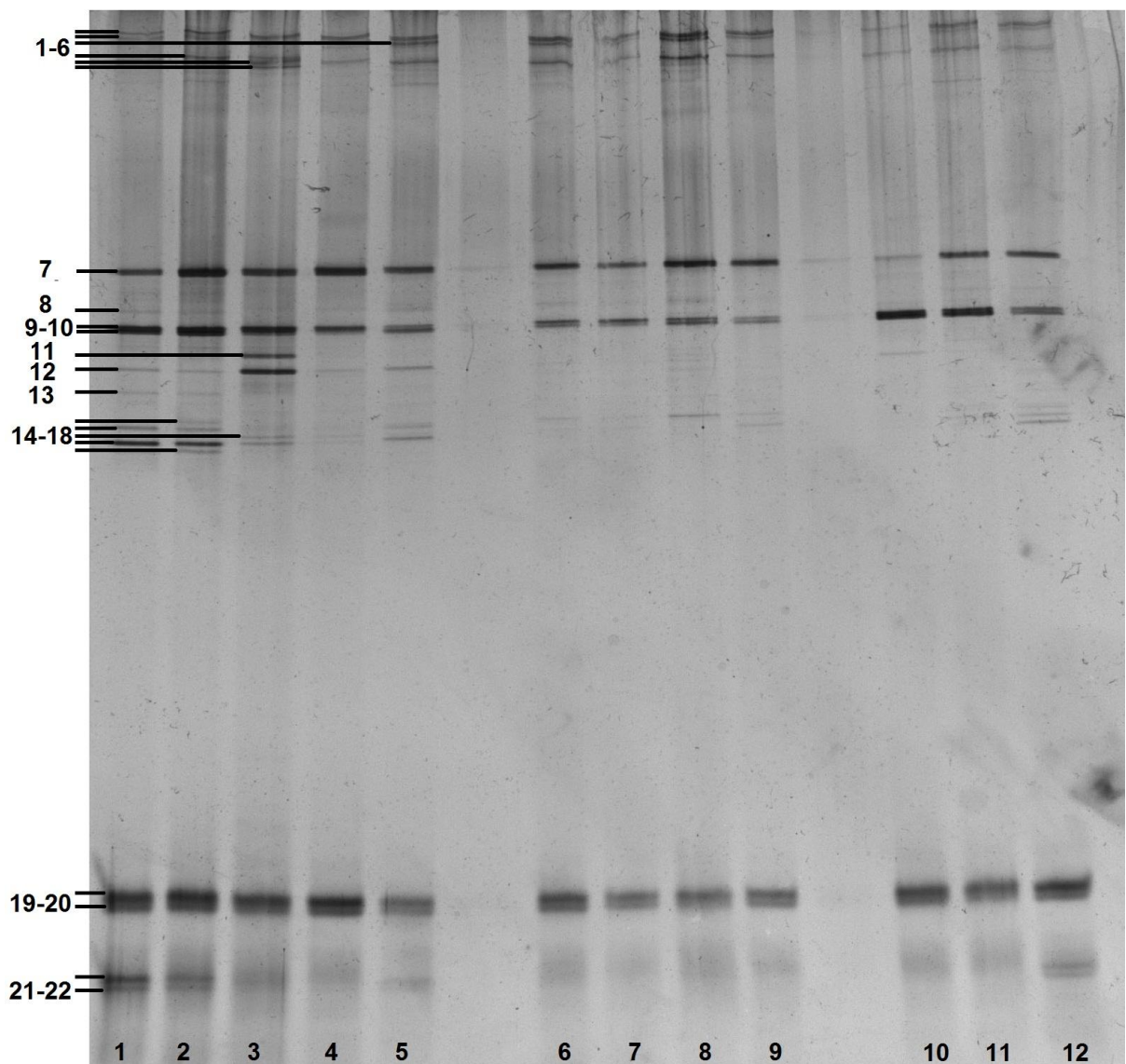


Figura 36. Perfiles de DGGE de fragmentos de la región V3 del gen ribosomal 16S amplificados de 5 muestras de semilla, 4 muestras de conservación y 3 muestras de fermentación. Carriles 1-5: semillas 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente; 6 y 7: semilla 5 en congelación tiempos 0 y 2, respectivamente; 8 y 9: semilla 5 en liofilización tiempos 0 y 2, respectivamente; 10-12: fermentación de aguamiel con semilla 5 tiempos 0, 12 y 24, respectivamente. Gel de poliacrilamida al 8% (p/v) utilizando un intervalo desnaturante de 30-90% (p/v) y amortiguador TAE [1X] (Tris 0.04 M, Acetato 0.04 M, EDTA 1 mM, ph 8). El gradiente desnaturante estuvo formado por urea 7 M y formamida al 40 % (v/v). La electroforesis se realizó a una temperatura de 60 °C durante 17 h a 80 V. Posteriormente el gel se tiñó con el kit *Plus One DNA silverstaining*, de *Pharmacia Biotech*.



Es posible que las bandas 1-6 se traten de moléculas heterodúplex, que es cuando una molécula de cadena simple de ADN de un cromosoma se aparea con una molécula de cadena simple de otro cromosoma (Pierce, 2010). Los heterodúplex se forman a causa del emparejamiento erróneo y de la desnaturalización rápida en el gel, los cuales detienen el curso migratorio de estas moléculas. Por otro lado, las bandas 19-22 son borrosas y no están bien separadas, por lo que no se tomarán en cuenta para el análisis posterior.

Las bandas 7-18 se tomarán en cuenta para el análisis de los perfiles electroforéticos obtenidos de las cinco semillas, así como de la conservación de la semilla 5 y la fermentación del aguamiel con la misma semilla, ya que se utilizó aguamiel pasteurizado, por lo que la microbiota presente en las muestras analizadas proviene sólo del inóculo.

Xiu *et al.* (2012) estudiaron el *Daqu*, un cultivo mixto iniciador preparado a base de trigo utilizado en la producción de *Maotai*, un destilado chino hecho de sorgo fermentado. Se estudió la composición bacteriana utilizando la técnica PCR-DGGE en 3 etapas del proceso de elaboración de *Daqu*: moldeado, maduración y secado. El *Daqu* se fermenta por 1 mes después del moldeado, similar al tiempo que toma la preparación de la semilla. Se observó un total de 36 bandas correspondientes a 11 especies. Se aumentó la sensibilidad del método realizando PCR anidado previo al DGGE. De esta manera se observó mayor diversidad: 46 bandas correspondientes a 18 especies. Se pretende utilizar esta metodología para aumentar el número de bandas y especies detectadas en la semilla, ya que de esta manera se logra amplificar una cantidad considerable de ADN de los microorganismos presentes en menor proporción.

Para obtener resultados más precisos y comparables con otros estudios es necesario extraer el ADN de las bandas individuales, reamplificarlo mediante la PCR con los mismos cebadores pero sin grapa de GC, purificar los productos, secuenciar y comparar con bases de datos como la del NCBI.



8.7.3.3 Análisis de los perfiles electroforéticos.

El patrón de bandas generado es considerado como una huella de la comunidad bacteriana, donde cada una de las bandas representa a un organismo diferente. No obstante, en estudios se menciona que al utilizar técnicas moleculares muy sensibles tales como el DGGE o TGGE se puede observar que en una sola banda de ADNr 16S haya más de dos especies de bacterias (van Hannen *et al.*, 1998; Sekiguchi *et al.*, 2001). Lo anterior se atribuye a principalmente a una micro variación producto de la incorporación de artefactos. Esto puede ocurrir por una variabilidad natural, por una introducción artificial proveniente de la amplificación por PRC y/o por técnicas de clonación o por la presencia de copias de los genes que tienen pequeñas diferencias en sus secuencias (Bolaños, 2004).

En la interpretación de los perfiles en geles de DGGE, esto significa que una sola banda puede representar varias especies, o que una especie podría estar representada por un grupo de bandas. Este fenómeno está asociado con la heterogeneidad intraespecífica, que es el resultado de las múltiples copias de los genes del ARNr que involucran diferencias en su secuencia (cistrones que codifican al ARNr 16S con diferente secuencia en un solo genoma) (Dahllöf *et al.*, 2000). Para evitar este fenómeno, el mismo autor ha propuesto utilizar el gen *rpoB* de la subunidad beta de la ARN polimerasa, de la cual parece sólo existe una copia por bacteria.

Existen varios trabajos en los que se menciona que cuando se trabaja con mezclas de ADN de comunidades complejas, es muy común que se presente el fenómeno de amplificación preferencial, ya que las moléculas de ADN presentes que sirven como templado, en su mayoría no son homogéneas (Wintzingerode *et al.*, 1997). En la mayoría de los casos la amplificación preferencial está en función de la selección de cebadores, del número de ciclos de replicación y del contenido de G + C en el fragmento de ADN a amplificar. Los genes que tienen un alto contenido de G + C, tienen poca eficiencia para disociarse y con ello dificultan su amplificación, por su parte, los genes con bajo contenido de G + C se disocian fácilmente pudiendo presentar una amplificación preferencial sobre los anteriores.



8.7.3.3.1 Semillas 1, 2, 3, 4 y 5.

Las bandas 7, 9 10 y 12 se encuentran en todas las muestras y son de gran intensidad). La última es más intensa en la semilla 3, que en las demás. Esto muchas veces está relacionado directamente con la abundancia relativa del filotipo bacteriano presente en la muestra (Muyzer *et al.*, 1995; van Hannen *et al.*, 1999). Entonces, los microorganismos correspondientes a estas bandas podrían ser los más abundantes en las muestras analizadas; sin embargo, se tendría que analizar con otras pruebas.

Algunas bandas se observan en algunas muestras y en otras no. Las bandas 8 y 15 aparecen únicamente en las semillas 1, 2 y 5. Las bandas 13 y 18 aparecen sólo en las semillas 1 y 2. La banda 16 está en las semillas 3 y 5. La banda 17 se observa en la 1 2 y 3

Finalmente, hay bandas que se observan sólo en una muestra. La banda 14 es visible sólo en la semilla 2, mientras que la banda 11 está presente sólo en la semilla 3.

De acuerdo con los patrones de bandas obtenidos de las distintas semillas, se observa una agrupación de los perfiles electroforéticos de los lotes 1 y 2. Por otro lado, las semillas 3, 4 y 5 se agrupan, siendo las más parecidas las últimas dos (Figura 37). Estos resultados son lógicos ya que las primeras dos son del mismo productor de Ixmiquilpan, Hidalgo y las otras tres son del mismo productor del Estado de México, aunque se trabajaron en diferentes épocas del año.

Escalante *et al.* (2004) determinaron la diversidad bacteriana en pulque mediante la técnica ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) utilizando el gen ribosomal 16S. Observaron la dominancia de especies de *Lactobacillus* (80.97%) e identificaron por primera vez en el pulque las especies *Lactobacillus cepa ASF36* y *L. acidophilus*, las cuales forman parte de la microbiota del intestino en animales y humanos. Además, encontraron otras ya descritas como *Lactobacillus acetotolerans*, *L. hilgardii*, *L. kefir*, *L. plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Microbacterium ayudans* y *Hafnia alvei*.



Por otro lado, Lappe *et al.* (2008) describieron la microbiota del pulque, en donde se menciona que las bacterias presentes son *Lactobacillus spp.*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroides* y *Zymomonas mobilis ssp. mobilis*. Es probable que estos microorganismos correspondan a las bandas del gel de la figura 38.

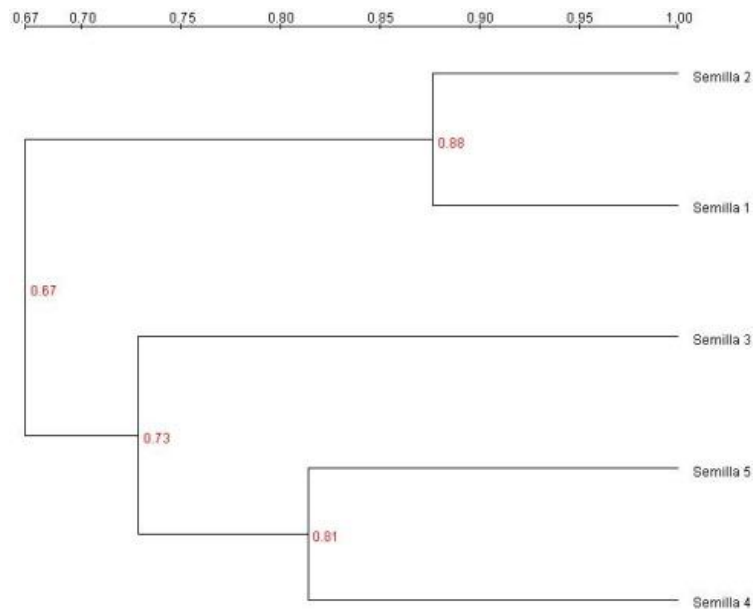


Figura 37. Dendrograma construido a partir del método UPGMA para las muestras de las 5 semillas antes de su conservación, de los patrones de bandas obtenidos a partir del coeficiente de similitud de Dice.

8.7.3.3.2 Conservación de la semilla 5.

En la figura 39 se muestra la imagen del gel de DGGE con gradiente desnaturante paralelo de 30 a 90 % realizado con las muestras de conservación de la semilla 5. Se monitorearon las muestras de congelación y liofilización recién realizado el tratamiento y al paso de 30 días.

Congelación:

En el perfil de DGGE de la semilla 5 recién congelada (tiempo 0) se observan 5 bandas (Carril 3). Las bandas 7, 9 y 10, correspondientes a la misma numeración



que en la figura 36, son de gran intensidad, mismas que aparecen en todas las muestras de semilla en el tiempo 0. Por otro lado, las bandas 8 y 15 disminuyen de intensidad con respecto a la semilla antes de congelar. La banda 12 presente en la semilla 5 (tiempo 0) desaparece con este método de conservación.

Al paso de 30 días en congelación (carril 4), las bandas 8 y 15 desaparecieron y la banda 7 disminuyó de intensidad. Esto indica que el ADN se pudo haber degradado durante la conservación, ya que, aunque disminuyó la viabilidad de microorganismos, con este método se extrae el ADN de microorganismos viables y no viables.

Liofilización:

En el perfil de DGGE de la semilla 5 recién liofilizada se observan un total de 5 bandas (Carril 5). Las bandas 7, 9, y 10 son de gran intensidad (carril 5), mismas que aparecen en todas las muestras de semilla en el tiempo 0. Por otro lado, las bandas 8 y 15 se ven muy tenues. La banda 12 presente en la semilla 5 (tiempo 0) desaparece con este método de conservación. Este perfil electroforético es muy similar al de la misma semilla recién congelada; sin embargo, la banda 15 es de mayor intensidad en la liofilización.

Al paso de 30 días (carril 6), la banda 8 desapareció y las bandas 9, 10 y 15 disminuyeron de intensidad. Esto indica que los microorganismos correspondientes a estas bandas, pudieron haber perdido su viabilidad con el paso del tiempo. No obstante, la banda 16 apareció después del tiempo transcurrido.

En resumen, las bandas 7, 9 y 10 aparecen tanto en congelación como en liofilización. Sin embargo, la intensidad es menor en el tiempo 2 (30 días) con respecto al tiempo 0. La banda 12 presente en la semilla 5 desaparece con ambos métodos de conservación. Las bandas 15 y 16 disminuyen de intensidad con los dos tratamientos con respecto a la muestra original.



8.7.3.3.3 Fermentación de aguamiel con semilla 5.

En la figura 40 se observan los perfiles de DGGE de las muestras correspondientes a la fermentación de aguamiel con la semilla 5, tiempos 0, 12 y 24 horas. Se observa un total de 7 bandas en los tres perfiles.

Las bandas 7, 9 y 10 están presentes, al igual que todas las muestras analizadas anteriormente. Sin embargo, éstas cambian de intensidad con el paso del tiempo. La banda 7 aumenta de intensidad con el desarrollo de la fermentación, mientras que en las bandas 9 y 10 disminuyen de intensidad al paso del tiempo. Esto podría indicar el desarrollo de algunos microorganismos y la desaparición de otros, a lo largo de la fermentación.

La banda 12 se observa al inicio de la fermentación (tiempo 0) y desaparece al tiempo 12, mientras que las bandas 15 y 16 aparecen sólo al final de la fermentación.

Estas bandas pueden estar relacionadas con los microorganismos descritos por Escalante *et al.* (2004) y Lappe *et al.* (2008), mencionados en la sección 8.7.3.3.1.

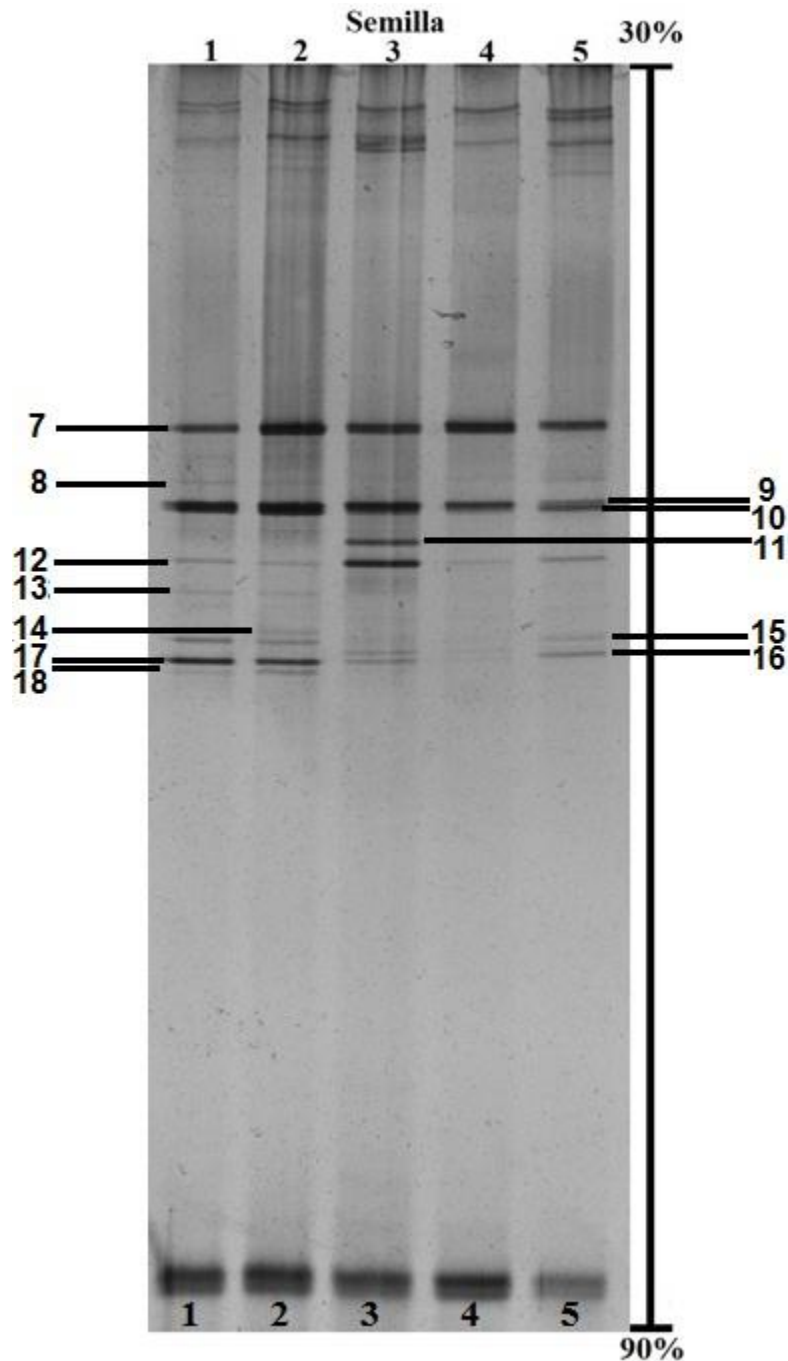


Figura 38. Perfiles de DGGE de fragmentos de la región V3 del gen ribosomal 16S amplificados de 5 muestras de semilla. Carriles: 1, semilla 1; 2, semilla 2; 3, semilla 3; 4, semilla 4; 5, semilla 5. Gel de poliacrilamida al 8% (p/v) utilizando un intervalo desnaturalizante de 30-90% (p/v) y amortiguador TAE [1X] (Tris 0.04 M, Acetato 0.04 M, EDTA 1 mM, ph 8). El gradiente desnaturalizante estuvo formado por urea 7 M y formamida al 40 % (v/v). La electroforesis se realizó a una temperatura de 60 °C durante 17 h a 80 V. Posteriormente el gel se tiñó con el kit *Plus One DNA silverstaining*, de *PharmaciaBiotech*.

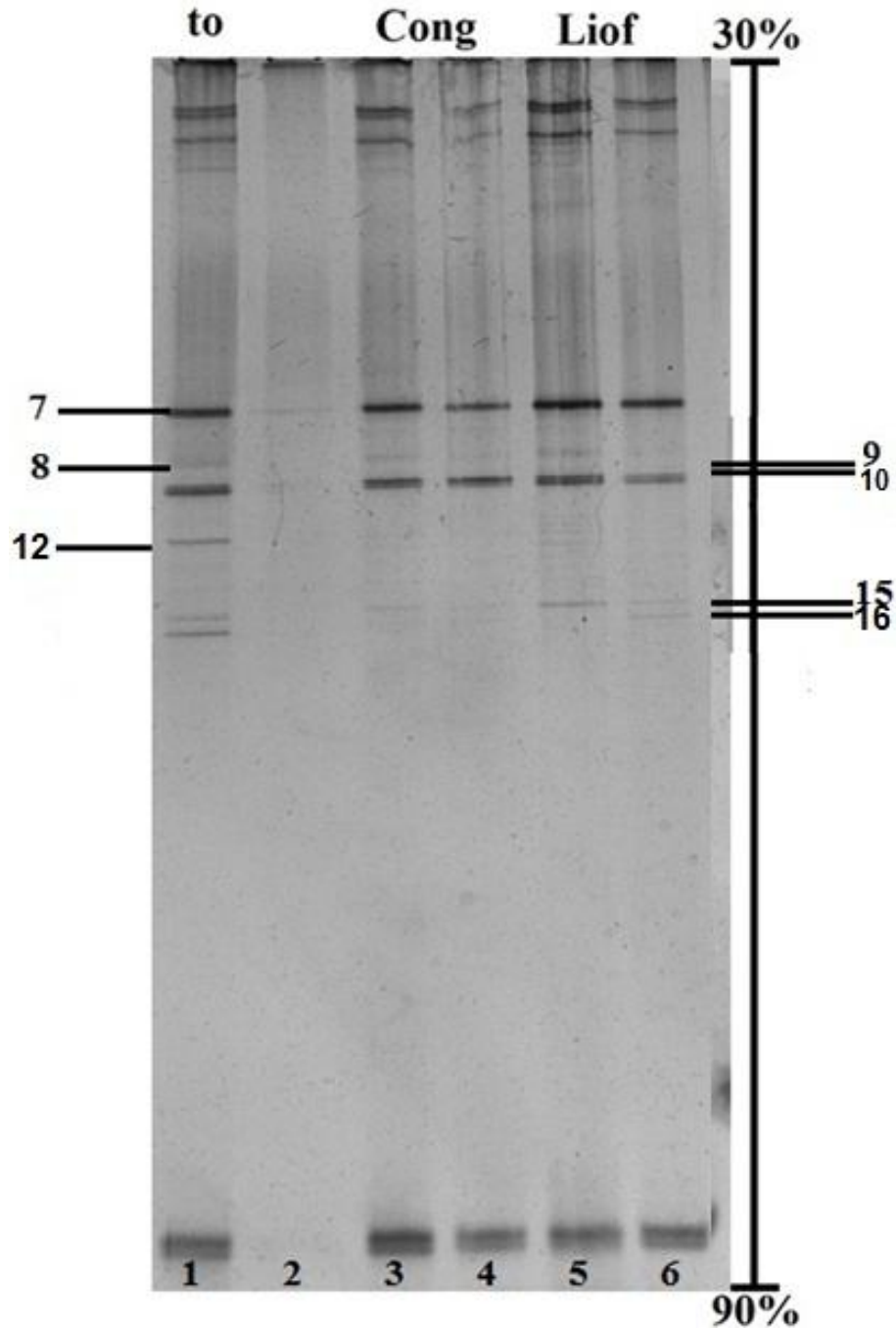


Figura 39. Perfiles de DGGE de fragmentos de la región V3 del gen ribosomal 16S amplificados de las muestras de semilla 5 en conservación. Carriles: 1, semilla 5 tiempo 0; 3-4, congelación S5; 5-6, liofilización. Gel de poliacrilamida al 8% (p/v) utilizando un intervalo desnaturalizante de 30-90% (p/v) y amortiguador TAE [1X] (Tris 0.04 M, Acetato 0.04 M, EDTA 1 mM, ph 8). El gradiente desnaturalizante estuvo formado por urea 7 M y formamida al 40 % (v/v). La electroforesis se realizó a una temperatura de 60 °C durante 17 h a 80 V. Posteriormente el gel se tiñó con el kit *Plus One DNA silverstaining*, de *PharmaciaBiotech*.

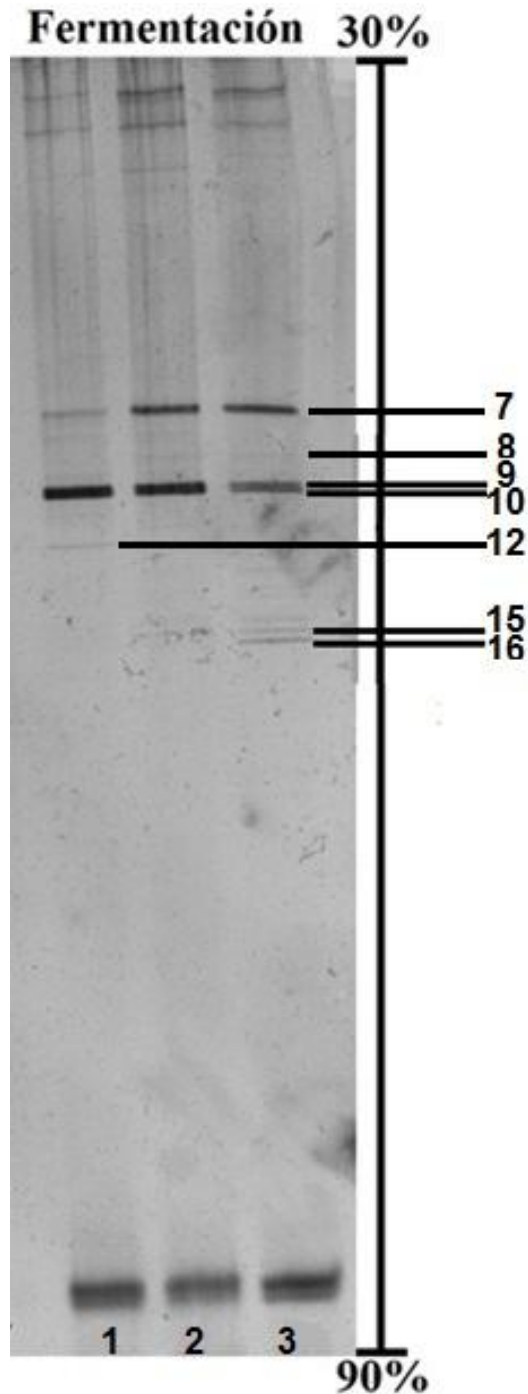


Figura 40. Perfiles de DGGE de fragmentos de la región V3 del gen ribosomal 16S amplificados de las muestras de fermentación de aguamiel con la semilla 5. Carriles: 1: tiempo 0, 2: tiempo 12, 3: tiempo 24. Gel de poliacrilamida al 8% (p/v) utilizando un intervalo desnaturalizante de 30-90% (p/v) y amortiguador TAE [1X] (Tris 0.04 M, Acetato 0.04 M, EDTA 1 mM, ph 8). El gradiente desnaturalizante estuvo formado por urea 7 M y formamida al 40 % (v/v). La electroforesis se realizó a una temperatura de 60 °C durante 17 h a 80 V. Posteriormente el gel se tiñó con el kit *Plus One DNA silverstaining*, de *PharmaciaBiotech*.



8.7.3.4 Análisis de índices ecológicos.

Los índices de diversidad y dominancia son índices matemáticos que han sido empleados para lograr describir la riqueza y distribución de especies en una comunidad, que ayudan junto con el análisis de patrones de bandas y dendogramas a describir el conjunto de poblaciones que pueden estar presentes en una comunidad microbiana (Pielou, 1975).

Dos índices han sido aplicados a estudios de diversidad, tales son el índice de diversidad de Shannon-Weaver y el índice de dominancia de Simpson descritos en 1949 y 1963, respectivamente y han sido introducidos al estudio de comunidades microbianas.

A continuación se describen los resultados obtenidos para las diferentes semillas, así como la conservación y fermentación de la semilla 5.

8.7.3.4.1 Semillas 1, 2, 3, 4 y 5.

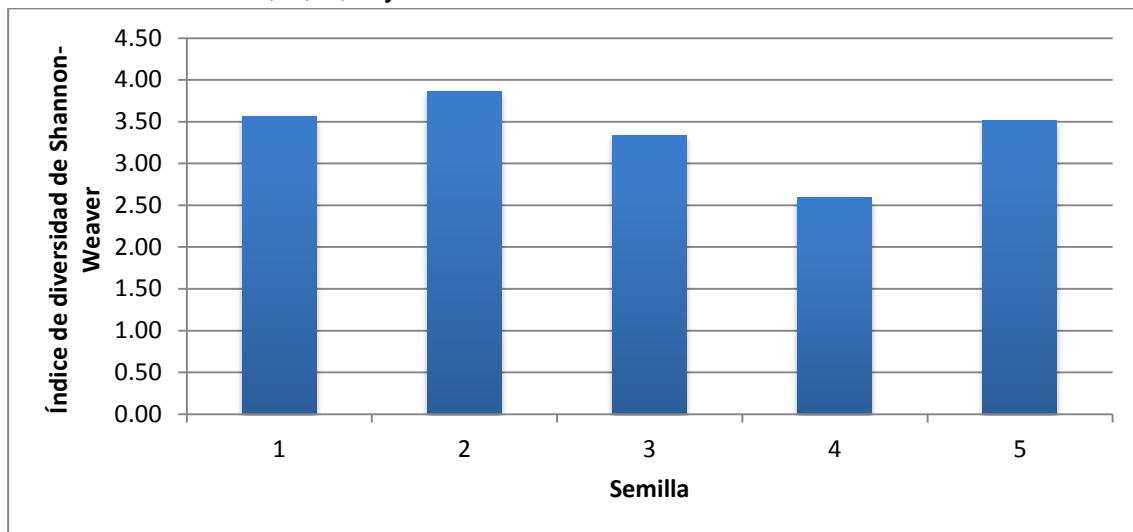


Figura 41. Diversidad de bacterias detectadas en las diferentes semillas antes de su conservación.

El índice de diversidad determinado para las cinco semillas se muestra en la figura 41. Se puede observar que las semillas 1 y 2 son las que tienen mayor diversidad, seguido de la semilla 5, la 4 y finalmente el lote 3.

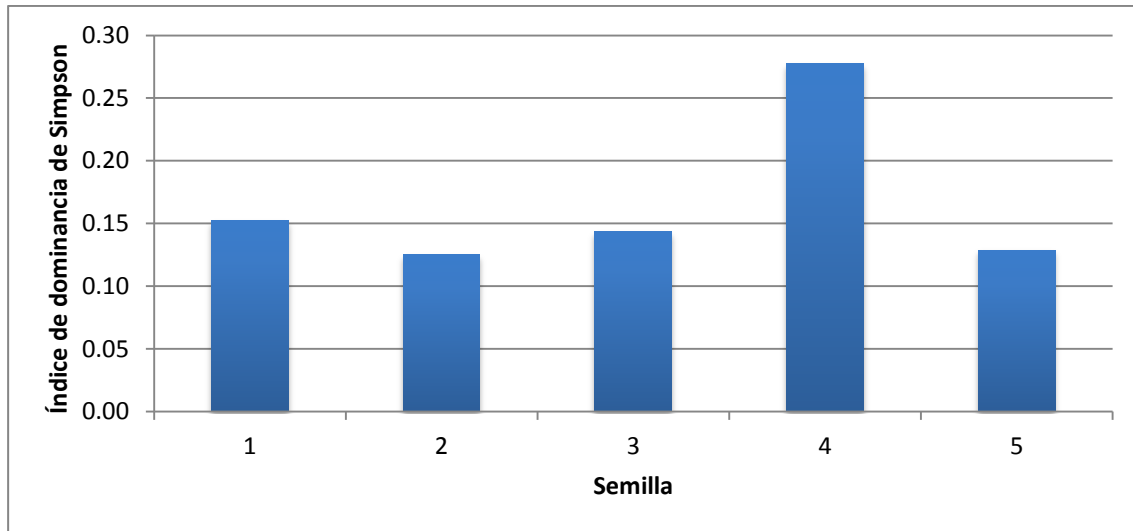


Figura 42. Dominancia de bacterias detectadas en las semillas antes de su conservación.

El índice de dominancia determinado para las cinco semillas se muestra en la figura 42. Se observa que este índice es inversamente proporcional al índice de diversidad.

8.7.3.4.2 Conservación de la semilla 5.

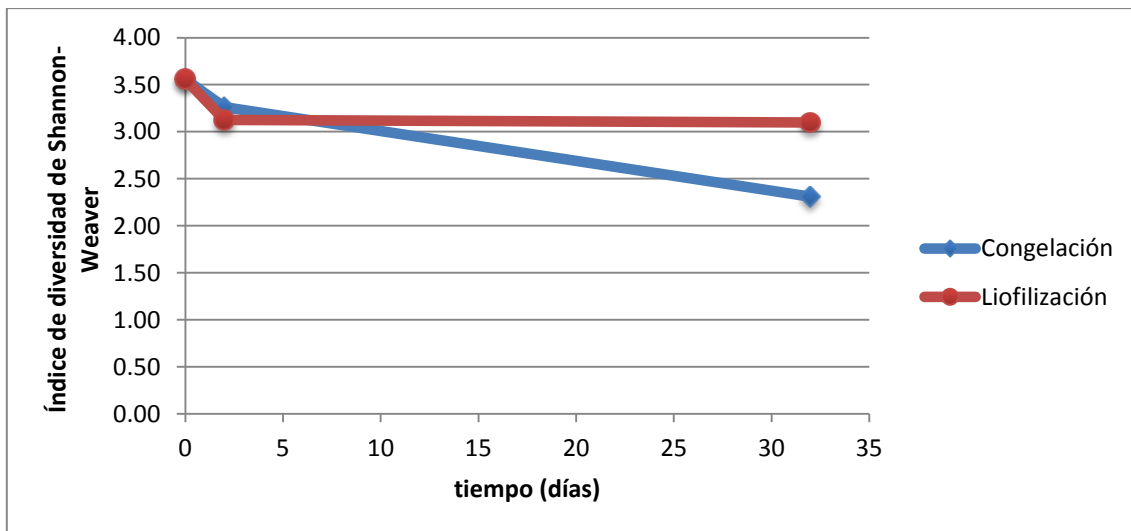


Figura 43. Diversidad de bacterias detectadas en las muestras de conservación de la semilla 5 en congelación y liofilización.

El índice de diversidad determinado para la conservación de la semilla 5 se muestra en la figura 43. Se puede observar una ligera disminución de este



parámetro al inicio de ambos tratamientos. Sin embargo, 30 días después el índice de diversidad de la semilla liofilizada permanece constante, mientras que en congelación disminuye.

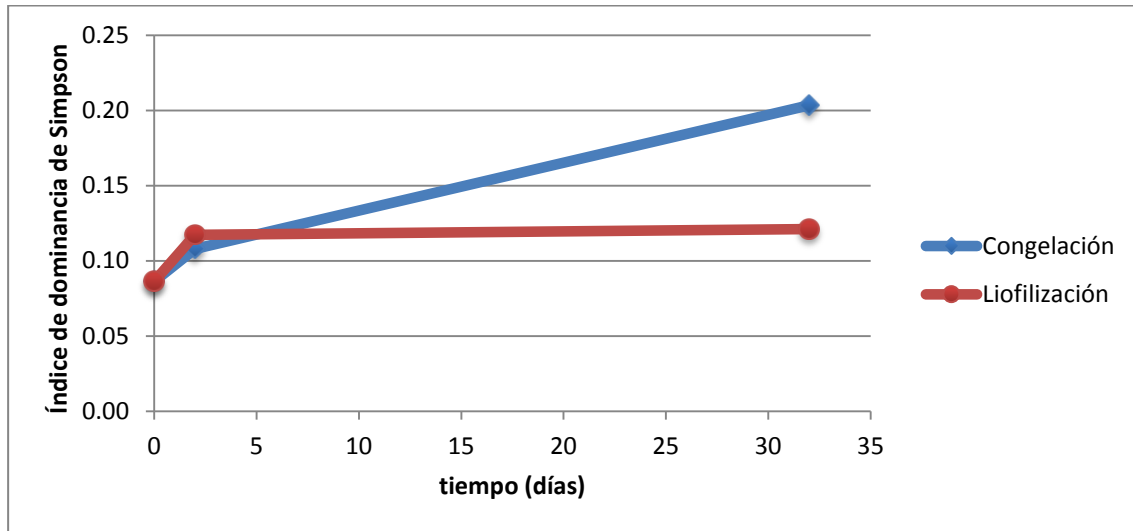


Figura 44. Dominancia de bacterias detectadas en las muestras de conservación de la semilla 5 en congelación y liofilización.

El índice de dominancia determinado para la conservación de la semilla 5 se muestra en la figura 44. Se observa que este índice es inversamente proporcional al índice de diversidad.

8.7.3.4.3 Fermentación de aguamiel con semilla 5.

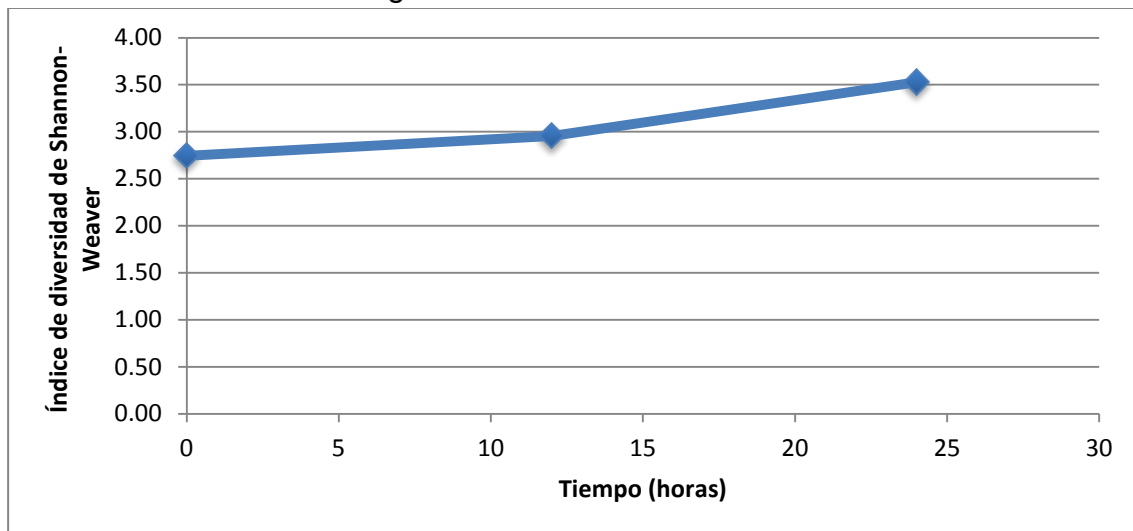


Figura 45. Diversidad de bacterias detectadas en las muestras de fermentación de aguamiel con la semilla 5, tiempos 0, 12 y 24 horas.



El índice de diversidad determinado para la fermentación de aguamiel con la semilla 5 se muestra en la figura 45. Se observa que este parámetro aumenta con respecto al tiempo de fermentación.

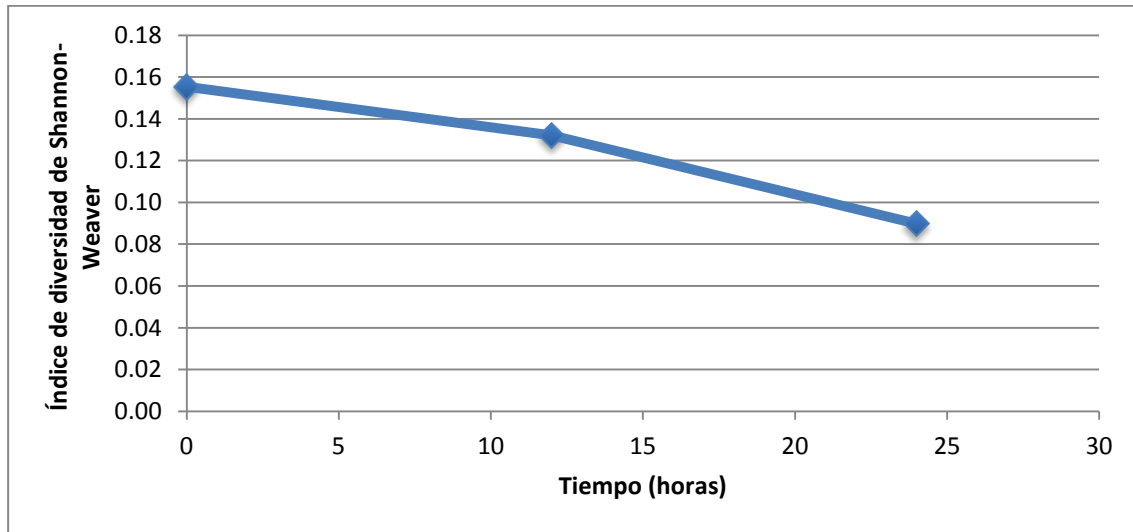


Figura 46 Dominancia de bacterias detectadas en las muestras de fermentación de aguamiel con la semilla 5, tiempos 0, 12 y 24 horas.

El índice de dominancia determinado para la fermentación de aguamiel con la semilla 5 se muestra en la figura 46. Se observa que este índice es inversamente proporcional al índice de diversidad.



9 Conclusiones.

- Se determinó la composición microbiológica de semillas por métodos tradicionales. Se determinó la cuenta de 4 grupos microbianos: levaduras, bacterias lácticas (BAL), coliformes y enterobacterias. Se observó que de estos 4, el que predomina son las BAL, ya que tienen una mayor cuenta inicial. Las semillas evaluadas contienen entre 11×10^7 y 28×10^7 UFC/mL de bacterias lácticas y entre 40×10^5 y 13×10^7 UFC/mL de levaduras.
- Las semillas 1 y 2 presentaron baja calidad sanitaria debido a la presencia de coliformes y enterobacterias. En los otros lotes no se encontraron estos grupos microbianos.
- De los lotes de semilla estudiados se concluye que el más adecuado para realizar la fermentación del aguamiel sería el lote 3, debido a que tiene las cuentas más elevadas de BAL y levaduras y no hay presencia de coliformes ni enterobacterias. Sin embargo, es necesario estandarizar la concentración de estos microorganismos para obtener una fermentación de calidad constante.
- Con los métodos de conservación probados (congelación, ultracongelación y liofilización) disminuye más del 50% la viabilidad de los microorganismos estudiados. Sin embargo, la ultracongelación a -65 °C con el uso de glicerol fue el más efectivo para conservar las levaduras, manteniéndose viables el 16%, mientras que la liofilización con el uso de leche descremada fue el más efectivo para conservar las BAL, manteniéndose viables el 5%, después de 3 meses de almacenamiento.
- Los lotes analizados presentan una mayor cantidad de BAL que de levaduras. Esta proporción es la misma después de la conservación.
- De acuerdo con los perfiles de bandas generados mediante el método DGGE, las semillas de diferentes orígenes fueron muy similares y durante el tiempo de conservación disminuyó la intensidad de algunas de ellas.



10 Perspectivas.

Identificar las bacterias y levaduras aisladas.

Se pretende probar con otros métodos de conservación de la semilla como el secado.

Analizar la diversidad de levaduras mediante DGGE.

Efectuar la secuenciación de las bandas individuales de los geles de DGGE, para identificarlas.

A partir de los aislados, realizar mezclas de éstos y determinar si existe amplificación preferencial de algún microorganismo.

Con el fin de caracterizar mas detalladamente la biodiversidad por DGGE sería recomendable utilizar el gen *rpoB* para complementar el estudio y probar PCR anidado de la región V3 del ADNr 16S.



11 Bibliografía

- Amann, R.I., Ludwig, W., & Schleifer, K.H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), 143-169.
- Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., & Guyot, J.P. (1999) Polyphasic study of spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, fermented maize dough, demonstrates traditional fermentations. *Applied Environmental Microbiology*, 65(12), 5464-5473.
- Bello, J. (2000). *Ciencia bromatológica. Principios generales de los alimentos*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos. P 411.
- Bolaños, S. (2004). *Variabilidad en la microbiota de diferentes muestras de pozol, determinada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)*. Tesis de maestría no publicada, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- Burgos, I. (En preparación). *Efecto del método de conservación del inóculo "semilla de pulque" y de la concentración de carbohidratos durante la fermentación del aguamiel*. Tesis de licenciatura no publicada, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. México: Facultad de Química, UNAM.
- Cervantes-Contreras, M., & Pedroza-Rodríguez, A. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopía *Raman*. *NOVA—Publicación científica en ciencias biomédicas*, 5(8), 135-146.
- Chadare, F.J., Jonkman, J., Wolkers-Roijackers, J., Nout, M.J.R., Hounhouigan, J.D., & Zwietering, M.H. (2011). Microbiota of Tayohounta, a fermented baobab flavour food of Benin. *African Journal of Biotechnology*, 10(69), 15607-15615.



- Chen, T., Jiang, S., Xiong, S., Wang, M., Zhu, D., & Wei, H. (2012). Application of denaturing gradient gel electrophoresis to microbial diversity analysis in Chinese Douchi. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2171-2176.
- Cilia V., B. Lafay y R. Christen. (1996). Sequence heterogeneities among 16S ribosomal RNA sequences, and their effect on phylogenetic analyses at the species level. *Molecular Biology and Evolution*, 13(3), 451-461.
- Dahllöf, I., Baillie, H., & Kjelleberg, S. (2000). rpoB-Based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Applied Environmental Microbiology*, 66(8), 3376-3380.
- Díaz, G., & Wachter, M.C. (2003). Métodos para el estudio de comunidades microbianas en alimentos fermentados. *Revista latinoamericana de microbiología*, 45(1), 30-40.
- Ercolini, D. (2003). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 297-314.
- Escalante, A., Rodríguez, M.E., Martínez, A., López-Munguía, A. Bolívar, F. & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235, 273-279.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Arango, M., & Rossi, P. (2002). Statical analysis of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, 11, 634-643.
- Gardener, T.R. (2011). *Agave*. Recuperado de <http://drought-tolerant-plants.com/agave/>.
- Gibello, A., Blanco, M.M., Domínguez, L., & Fernández-Garayzábal, J.F. (2001). *Utilización de la PCR para el diagnóstico en Ictiopatología*. Revista Aquatic, 15. Recuperado de <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=130>.



- Gobierno del Estado de Hidalgo y Museo Nacional de Culturas Populares. (1988). *El maguey: árbol de las maravillas*. Instituto Nacional Indigenista, Secretaría de Educación Pública y Dirección General de Culturas Populares, Mexico.
- Gonclaves de Lima, O. (1978). *El maguey y el pulque en los códices mexicanos*. México: Fondo de cultura económica.
- Gonclaves de Lima, O. (1990). *Pulque, balché y bajauarú*. México: Fondo de cultura económica.
- Hashsham, S.A. (2007). Culture techniques. En Reddy, C.A., Beveridge, T.J., Breznak J.A., Marzluf G.A., Schmidt T.M., & Snyder, L.R. (Eds.). *Methods for General and Molecular Microbiology*. 3a Ed. (pp. 270-285). American Society for Microbiology.
- Hsieh, H-H., Wang, S-Y., Chen, T-L., Huang, Y-L., & Chen, M-J. (2012). Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 73-81.
- Kershenovich, D. (1999). Endotoxinas y daño hepático. En: *Fundación de Investigaciones Sociales A. C. (FISAC). El pulque, la cultura y la salud*. México, DF: Cuadernos FISAC. p 29–37.
- Koch, A.L. (2007). Growth measurement. En Reddy, C.A., Beveridge, T.J., Breznak J.A., Marzluf G.A., Schmidt T.M., & Snyder, L.R. (Eds.). *Methods for General and Molecular Microbiology*. 3a Ed. (pp. 172-199). American Society for Microbiology.
- Lappe, P., & Ulloa, M. (1993). Microbiología del pulque. En Wachter, M.C. & Lappe, P. (Eds), *Alimentos fermentados indígenas de México* (pp. 75-80). México: UNAM, PUAL.
- Lappe, O.P., Moreno, T.R., Arrizó, G.J., & Herrera, S.T. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast research*, 8, 1037-1052.



- Leiva-Guzmán, M.A. (2006). *Materiales de referencia y comparaciones interlaboratorios. Herramientas para el control de calidad en laboratorios de ensayo*. Santiago de Chile: CENMA. P. 60.
- Levine, I.N. (2005). *Fisicoquímica*. Madrid, España: McGraw Hill. P. 274.
- López, A., García, G.M., Quintero R.R., & López-Munguía, C.A. (2004). *Biotecnología Alimentaria*. Madrid: Limusa. Pp. 301-306.
- Loyola-Montemayor. (1956). *La industria del pulque*. México, Banco de México, S.A., Departamento de investigaciones industriales, P. 348.
- Lozano, M.C. (2007). *Análisis de la diversidad de bacterias Gram-positivas presentes en aguamiel y en el inicio de la fermentación del pulque, por técnicas microbiológicas y moleculares*. Tesis de maestría no publicada, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- Maicas, S., Bardo, I., & Ferrer, S. (2000). The effects of freezing and freeze-drying of *Oenococcus oeni* upon induction of malolactic fermentation in red wine. *International Journal of Food Science and Technology*, 35. 75-79.
- Marsh, T.L., & Nakatsu, C.H. (2007). Analysis of microbial communities with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (TRFLP). En Reddy, C.A., Beveridge, T.J., Breznak J.A., Marzluf G.A., Schmidt T.M., & Snyder, L.R. (Eds.). *Methods for General and Molecular Microbiology*. 3a Ed. (pp. 909-951). American Society for Microbiology.
- Martínez-Salvador, M. (2010). Population structure of Maguey (*Agave salmiana* ssp. *Crassipina*) in Southeast Zacatecas, México. *Arid Land Research and Management*, 19, 101-109.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C.O., & Jannasch, H.W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology*, 164, 165-172.



- Muyzer, G., & Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperatura gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antoine van Leeuwenhoeck*, 73, 127-141.
- Narro-Robles J, Gutiérrez-Ávila H, López-Cervantes M, Borges G, & Rosovsky H. (1992). La mortalidad por cirrosis hepática en México II. Exceso de mortalidad y consumo de pulque. *Rev Sal Pub Mex*, 34, 388–405.
- Ordoñez, J.A., Cambrero, M.I., Fernández, L., García, M.L., García, G., De la Hoz, L., Selgas M.D. (1998). *Tecnología de los Alimentos. Volumen I: Componentes de los Alimentos y Procesos*. Madrid: Editorial Síntesis. Pp. 201-220, 297-307.
- Ortiz-Basurto, R.P. (2008). Analysis of the Main Components of the Aguamiel Produced by the Maguey-Pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the Harvest Period. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 3682-3687.
- Papalexandratou, Z., Vrancken, G., De Bruyne, K., Vandamme, P., & De Vuyst, L. (2011). Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28, 1326-1338.
- Peña-Espinosa, J.J. (2004). Consumo de Embriagantes en la Puebla del siglo XVIII. *Relaciones*, 25(098), 237-276.
- Pierce, B. (2010). *Genética: Un enfoque onceptual*. 3a ed. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, Pp. 336.
- Rantsiou, K., Comi, G., & Cocolin, L. (2004). The rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacteria population dynamics during food fermentations. *Food Microbiology*, 21, 481–487.
- Velázquez, O. (2008). Aislamiento de microorganismos. En R.M. Ramírez (Ed.), *Manual de prácticas de microbiología general* (pp. 129-139). Quinta edición. México. UNAM.
- Romero, T., & Elda, M. (2009). *Evaluación de reguladores de crecimiento vegetal en semillas y plántulas de agave pulquero (Agave atrovirens Karw.ex salm-*



- dyck*) y su implicación en un sistema de propagación. Tesis de maestría no publicada, Instituto Politécnico Nacional, Tlaxcala, México.
- Ruiz-Oronoz, M. (1953). Estudios realizados en México sobre las levaduras. *Memoria del congreso científico mexicano, IV Centenario de la Universidad de México (1551-1951), Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México*, 6, 127-149.
- Sánchez-Marroquín, A. (1979). *Los agaves de México en la industria alimentaria*. México, Centro de estudios económicos y sociales del tercer mundo.
- Sekiguchi, H., Tomioka, N., Nakahara, T., & Uchiyama, H. (2001). A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters*, 23, 1205-1208.
- Sierra, P. (2005). *El maguey, el pulque y sus deidades*. Tesis de maestría no publicada, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- Stainslaw, W. (1997). *La interpretación astronómica de los mitos*. Recuperado de <http://www.fundacion-jung.com.ar/forum/astronomiamitica.htm>.
- Steinkraus, K. (1996). *Handbook of Indigenous Fermented Foods*. 2da Ed. New York: Marcel Dekker. Pp. 389–397.
- Tanaka, Y., Watanabe, J., & Mogi, Y. (2012). Monitoring of the microbial communities involved in the soy sauce manufacturing process by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Food microbiology*, 31, 100-106.
- Teske, A., Cyponka, H., Hoh, J.G., & Krieg, N. (2007). Enrichment and isolation. En Reddy, C.A., Beveridge, T.J., Breznak J.A., Marzluf G.A., Schmidt T.M., & Snyder, L.R. (Eds.). *Methods for General and Molecular Microbiology*. 3a Ed. (pp. 215-269). American Society for Microbiology.
- Torrentera, F.O. (2009). Las leyendas de Oaxaca, un patrimonio empolvado. Recuperado de <http://ciudadania-express.com/2009/11/01/las-leyendas-de-oaxaca-un-patrimonio-empolvado/>.



- Tórtora, G.J., Funke, B.R., & Case, C.L. (2007). *Microbiology, an introduction*. 9^a ed. Pearson Education, Inc.
- Tovar L., Olivos, M., & GutiérrezE. (2008). Pulque, an alcoholic drink from rural Mexico, contains phytase, Its in vitro effects on corn tortilla. *Plant Foods Human Nutrition*, 63(4), 189-194.
- Van-Hannen, E.J., Gzward, P., van Agterveld, H.J., Gons, J.E., & Laanbroek, H.J. (1999). Changes in bacterial and eukaryotic community structure after mass lysis of filamentous cyanobacteria associated with viruses. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 795-801.
- Vargas, L.A., Aguilar, P., Esquivel, M.G., Gispert, M., Gómez, A., Rodríguez, H., Suárez, C., & Wachter, C. (1998). Bebidas de la Tradición. In: Muría, J.M., Ed. *Beber de tierra generosa. Historia de las bebidas alcohólicas en México*. México, D.F.: Fundación de Investigaciones Sociales AC. 249 p.
- Velarde, A. (2009). *El pulque, nectar de los dioses*. Recuperado de <http://quetranzalabanda.com/pulque/>.
- Wintzingerode, F., Gobel, U.B., & Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 213-229.
- Xiu, L., Guo, K., & Zhang, H. (2012). Determination of microbial diversity in Daqu, a fermentation starter culture of Maotai liquor, using nested PCR-DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2375-2381.
- Zayas, J.D. (2012). *Producción de pulque en condiciones controladas de laboratorio*. Tesis de licenciatura no publicada, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- Zheng, X-W., Yan, Z., Han, B-Z., Zwietering, M.H., Samson, R.A., Boekhout, T., & Nout, M.J.R. (2012). Complex microbiota of chinese “Fen” liquor fermentation starter (Fen-Daqu), revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, 31, 293-300..



12 Anexos.

12.1 Medios de cultivo.

Tabla 16. Medios de cultivo utilizados para cuenta en placa.

Medio de cultivo	Grupo microbiano	Marca	Presentación	No. Catálogo
PotatoDextrose Agar	Levaduras	Difco TM	500 g	213400
Agar Malta*	Levaduras	Sin marca	-	-
Lactobacilli MRS Agar	BAL	Difco TM	500 g	288210
Violet Red BileGlucose Agar	Enterobacterias	OXOID	500 g	CM0485
Violet Red Bile Agar	Coliformes	DifcoTM	500 g	211695

*Composición (g/L): Extracto de malta, 50; agar, 20.

Tabla 17. Medios de cultivo utilizados para Aislamiento.

Medio de cultivo	Grupo microbiano	Marca	Presentación	No. Catálogo
GPY*	Levaduras	Sin marca	-	-
Lactobacilli MRS Broth	BAL	Difco TM	500 g	288130

* Composición (g/L): Glucosa, 20; Extracto de levadura, 5; Peptona, 5; Agar, 15.

12.2 Resultados CEP t_0 .

Tabla 18. Resultados de CEP de 5 lotes de semilla tiempo 0.

Tiempo 0	Grupo microbiano (UFC/mL)				
	Semilla	BAL	Levaduras	Coliformes	Enterobacterias
1		19×10^7	40×10^5	27×10^2	14×10^5
2		12×10^7	19×10^6	76×10^3	10×10^4
3		28×10^7	13×10^7	<10 ve	<10 ve
4		22×10^7	14×10^6	<10 ve	<10 ve
5		11×10^7	25×10^6	<10 ve	<10 ve

ve: valor estimado.



12.3 Resultados CEP congelación.

Semilla 1

Tabla 19. Cuentas de los diferentes grupos microbianos en la Semilla 1 almacenada a -20 °C durante 90 días.

Semilla 1 T=-20 °C		Grupo microbiano (UFC/mL)		
tiempo (días)	BAL	Levaduras	Coliformes	Enterobacterias
0	19x10 ⁷	40x10 ⁵	27x10 ²	14x10 ⁵
30	10x10 ⁴	10x10 ⁴	<10 ve	<10 ve
60	16x10 ¹	<10 ve	<10 ve	<10 ve
90	<10 ve	<10 ve	<10 ve	<10 ve

Tabla 20. Cuentas de los diferentes grupos microbianos en la Semilla 1 almacenada a -65 °C durante 90 días.

Semilla 1 T=-65 °C		Grupo microbiano (UFC/mL)		
tiempo (días)	BAL	Levaduras	Coliformes	Enterobacterias
0	19x10 ⁷	40x10 ⁵	27x10 ²	14x10 ⁵
30	10x10 ⁴	10x10 ⁴	<10 ve	<10 ve
60	31x10 ²	< 10 ve	<10 ve	<10 ve
90	20x10 ²	16x10 ¹	<10 ve	<10 ve

Semilla 2

Tabla 21. Cuentas de los diferentes grupos microbianos en la Semilla 2 almacenada a -20 °C durante 90 días.

Semilla 2 T=-20 °C		Grupo microbiano (UFC/mL)		
tiempo (días)	BAL	Levaduras	Coliformes	Enterobacterias
0	12x10 ⁷	19x10 ⁶	76x10 ³	10x10 ⁴
30	10x10 ⁵	10x10 ⁴	<10 ve	<10 ve
60	18x10 ²	<10 ve	<10 ve	<10 ve
90	< 10 ve	<10 ve	<10 ve	<10 ve

Tabla 22. Cuentas de los diferentes grupos microbianos en la Semilla 2 almacenada a -65 °C durante 90 días.

Semilla 2 T=-65 °C		Grupo microbiano (UFC/mL)		
tiempo (días)	BAL	Levaduras	Coliformes	Enterobacterias
0	12x10 ⁷	19x10 ⁶	76x10 ³	10x10 ⁴
30	10x10 ⁴	10x10 ⁴	<10 ve	<10 ve
60	40x10 ²	<10 ve	<10 ve	<10 ve
90	<10 ve	<10 ve	<10 ve	<10 ve



Semilla 5

Tabla 23. Cuentas de los diferentes grupos microbianos en la Semilla 5 almacenada a -65 °C durante 92 días.

Semilla 5 T=-65 °C		Grupo microbiano (UFC/mL)		
tiempo (días)	BAL	Levaduras	Coliformes	Enterobacterias
0	11x10 ⁷	25x10 ⁶	<10 ve	<10 ve
2	80x10 ⁶	13x10 ⁶	<10 ve	<10 ve
22	41x10 ⁶	13x10 ⁶	<10 ve	<10 ve
36	13x10 ⁶	10x10 ⁶	<10 ve	<10 ve
50	79x10 ⁵	41x10 ⁵	<10 ve	<10 ve
63	17x10 ⁵	25x10 ⁵	<10 ve	<10 ve
92	29x10 ⁵	39x10 ⁵	<10 ve	<10 ve

12.4 Resultados CEP liofilización.

Semilla 3

Tabla 24. Resultados CEP Semilla 3 conservada por liofilización durante 2 días.

Semilla 3 Liofilización		Grupo microbiano (UFC/mL)		
tiempo (días)	BAL	Levaduras	Coliformes	Enterobacterias
0	28x10 ⁷	13x10 ⁷	<10 ve	<10 ve
2	<10 ve	60x10 ¹	<10 ve	<10 ve

Semilla 5

Tabla 25. Resultados CEP Semilla 5 conservada por liofilización durante 2 días.

Semilla 5 Liofilización		Grupo microbiano (UFC/mL)		
tiempo (días)	BAL	Levaduras	Coliformes	Enterobacterias
0	11x10 ⁷	25x10 ⁶	<10 ve	<10 ve
2	50x10 ⁶	81x10 ⁵	<10 ve	<10 ve

Tabla 26. Cuentas de los diferentes grupos microbianos en la semilla 5 conservada mediante liofilización durante 92 días.

Semilla 5 Liofilización		Grupo microbiano (UFC/mL)		
tiempo (días)	BAL	Levaduras	Coliformes	Enterobacterias
0	11x10 ⁷	25x10 ⁶	<10 ve	<10 ve
2	50x10 ⁶	81x10 ⁵	<10 ve	<10 ve
22	23x10 ⁶	41x10 ⁵	<10 ve	<10 ve
36	16x10 ⁶	30x10 ⁵	<10 ve	<10 ve
50	10x10 ⁶	11x10 ⁵	<10 ve	<10 ve
63	11x10 ⁶	11x10 ⁴	<10 ve	<10 ve
92	50x10 ⁵	17x10 ⁴	<10 ve	<10 ve



12.5 Agua extraída de liofilización.

Tabla 27. Agua extraída de semillas 3 y 5.

	Agua extraída (%)	
	Semilla 3	Semilla 5
Promedio	81.34	90.30
DS	1.23	0.37

12.6 Valores de absorbancia de las muestras de ADN.

Tabla 28. Valores de absorbancia del extracto de ADN de las semillas 1, 2, 3, 4 y 5 tiempo 0.

Muestra (Clave)	Abs (260 nm)	Abs (280 nm)	(260/280)	ng/μL
101	1.3953	0.9412	1.4825	348.8250
102	1.6217	1.1447	1.4167	405.4250
201	0.7689	0.5267	1.4598	192.2250
202	3.3684	2.0633	1.6325	842.1000
301	0.1082	0.0716	1.5112	27.0500
302	0.1046	0.0823	1.2710	26.1500
303	0.0334	0.0256	1.3047	8.3500
401	0.2153	0.1773	1.2143	53.8250
402	0.4055	0.2422	1.6742	101.3750
403	0.5039	0.2723	1.8505	125.9750
404	0.4571	0.2589	1.7655	114.2750
501	0.9613	0.5640	1.70	240.33
502	0.2800	0.1999	1.40	70.00
503	0.2197	0.1664	1.32	54.93
504	0.1869	0.1520	1.23	46.73

**Tabla 29.** Valores de absorbancia del extracto de ADN de semilla 5 en conservación del tiempo 0 al 5.

Muestra	Abs (260 nm)	Abs (280 nm)	Abs (230 nm)	(260/280)	(260/230)	ng/ μ L
C01	0.8189	0.6988	0.7788	1.17	1.05	204.73
C02	0.7892	0.5713	0.7503	1.38	1.05	197.30
L01	1.3418	1.1004	1.5490	1.22	0.87	335.45
L02	2.2842	1.7966	2.4081	1.27	0.95	571.05
C01	1.0733	0.7731	1.1189	1.39	0.96	268.33
C02	1.2840	0.8695	1.3031	1.48	0.99	321.00
L01	0.0808	0.7423	1.4219	0.11	0.06	20.20
L02	0.7787	0.5775	1.2080	1.35	0.64	194.68
C01	0.1100	0.0834	0.0828	1.32	1.33	27.50
C02	0.2824	0.2475	0.2530	1.14	1.12	70.60
L01	0.1095	0.0814	0.1402	1.35	0.78	27.38
L02	0.1238	0.0928	0.1652	1.33	0.75	30.95
C01	0.0733	0.0562	0.0529	1.30	1.39	18.33
C02	0.1147	0.0829	0.0890	1.38	1.29	28.68
L01	0.2127	0.1642	0.3126	1.30	0.68	53.18
L02	0.3021	0.2336	0.4465	1.29	0.68	75.53
C01	0.5441	0.3002	1.1026	1.81	0.49	136.03
C02	0.3447	0.1952	0.6896	1.77	0.50	86.18
L01	0.2719	0.1759	0.5113	1.55	0.53	67.98
L02	0.3466	0.2204	0.7134	1.57	0.49	86.65

**Tabla 30.** Valores de absorbancia del extracto de ADN de la fermentación de la semilla 5.

Muestra	Abs (260 nm)	Abs (280 nm)	Abs (230 nm)	(260/280)	(260/230)	ng/ μ L
F01	0.1251	0.0838	0.0852	1.49	1.47	31.275
F02	0.4561	0.2918	0.4359	1.56	1.05	114.025
F121	0.5064	0.3523	0.4063	1.44	1.25	126.6
F122	0.2607	0.1572	0.1732	1.66	1.51	65.175
F241	0.5964	0.3583	0.4380	1.66	1.36	149.1
F242	0.6856	0.5049	0.5636	1.36	1.22	171.4

12.7 Valores de absorbancia de las muestras de productos de PCR.

Tabla 31. Valores de absorbancia de productos de PCR de semillas 1, 2, 3, 4 y 5 tiempo 0.

Muestra	Abs (260 nm)	Abs (280 nm)	(260/280)	ng/ μ L
101	3.0344	1.8022	1.68	758.60
201	2.8392	1.6397	1.73	709.80
301	2.8735	1.6950	1.70	718.38
402	2.1805	1.2331	1.77	545.13
501	1.5526	0.8901	1.74	388.15
502	1.3050	0.7446	1.75	326.25
503	1.0694	0.6140	1.74	267.35
504	1.1356	0.6483	1.75	283.9



Tabla 32. Valores de absorbancia de productos de PCR de Semilla 5 congelada y liofilizada.

Muestra	Abs (260 nm)	Abs (280 nm)	(260/280)	ng/ μ L
CO2	1.2478	0.7430	1.68	311.95
C21	1.3796	0.8123	1.70	344.90
L01	1.2646	0.7644	1.65	316.15
L21	1.1801	0.7041	1.68	295.03

Tabla 33. Valores de absorbancia de productos de PCR de fermentación de aguamiel con Semilla 5.

Muestra	Abs (260 nm)	Abs (280 nm)	(260/280)	ng/ μ L
F02	1.972	1.1135	1.77	493.00
F122	1.9891	1.1215	1.77	497.28
F241	1.9404	1.093	1.78	485.10



12.8 Abreviaturas.

Tabla 34. Abreviaturas utilizadas en este trabajo.

BAL	Bacterias Ácido-Lácticas
Lev	Levaduras
CT	Coliformes Totales
Eb	Enterobacterias
ND	No se determinó
rpm	Revoluciones por minuto
mL	Mililitros
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
S1, S2, S3, S4, S5	Lotes de Semillas 1, 2, 3, 4 y 5
°Bx	Grados Brix
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Ve	Valor estimado
CEP	Cuenta en placa
Sm	Sensibilidad del método

Tabla 35. Abreviaturas para las claves de las muestras de extracción de ADN y PCR.

Lote	Tratamiento	Tiempo	Repetición
1, 2, 3, 4, 5	C, L, -	0, 1, 2, 3, 4, 5	1, 2, 3, 4