

TESIS DEFENDIDA POR
Mildred Clohé Herrera Solórzano
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. Patricia Esther Lappe Oliveras
Director del Comité

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro
Miembro del Comité

Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida
Miembro del Comité

Dr. Jaime Färber Lorda
Miembro del Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
*Coordinador del programa del posgrado en
Biotecnología Marina*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

22 de Agosto del 2008

I.1. Historia del pulque

El pulque es la bebida alcohólica más antigua de México según lo atestiguan vestigios arqueológicos. El pulque se obtiene por fermentación del aguamiel, que es la savia azucarada de varias especies de magueyes pulqueros pertenecientes al género *Agave*. Es probable que los otomíes fueran los primeros en elaborarlo hacia el año 2000 a. C. (Martín del Campo, 1938). En regiones áridas era utilizado como sustituto de agua.

Según el Códice Boturini los aztecas, durante su migración al Valle de México, descubrieron el maguey y comenzaron a producir pulque entre los años 1172 y 1291 d. C. (Gonçalves de Lima, 1978; García-Mendoza, 1998). Para esta civilización el pulque era principalmente una bebida ceremonial. Los sacerdotes lo consumían en todas las festividades para estar en comunión con los dioses; se ofrecía como estímulo a las víctimas que iban a ser sacrificadas, los guerreros recibían una ración diaria de esta bebida como recompensa a su labor: Se permitía que consumieran pulque las personas de edad avanzada, por no formar parte de la comunidad productiva, las mujeres embarazadas y en etapa de lactancia (para aumentar la producción de leche), y los enfermos por las propiedades terapéuticas de la bebida.

Los aztecas, como civilización dominante en el altiplano, ejercían un estricto control en el consumo del pulque, al grado que la embriaguez era castigada con muerte (Gentry, 1982; Godoy et al. 2003; Loyola-Montemayor, 1956).

En los inicios de la época colonial el pulque pasó de ser una bebida ceremonial a ser una bebida popular cuyo consumo fue promovido por los españoles. Entre los siglos XVII y XVIII existían en Hidalgo y Tlaxcala, y en algunas regiones de Puebla, Querétaro, Morelos y Michoacán grandes

haciendas pulqueras dedicadas al cultivo del maguey y a la elaboración de la bebida, actividades que se suspendieron durante el movimiento de la independencia (1810-1821) y se reiniciaron hasta la culminación del movimiento armado. En 1867 con la introducción de las líneas del ferrocarril que conectaron los llanos de Apan, en donde se elaboraba el pulque de mejor calidad, con los principales centros de consumo de la bebida como México, Puebla, Pachuca y Tlaxcala, la producción de la bebida se incrementó significativamente. A finales del siglo XIX estas actividades de explotación de los magueyes y producción de pulque alcanzaron su mayor apogeo convirtiéndose en una actividad sumamente lucrativa, naciendo así una nueva clase económica y social llamada por Vasconcelos “la aristocracia del pulque” (Gobierno del Estado de Hidalgo y Museo de Culturas Populares, 1988). A principios del siglo XX, durante el gobierno de Porfirio Díaz, la producción de pulque comenzó a decaer debido, principalmente, a la introducción de la cerveza, bebida que se hizo popular entre los consumidores de pulque. Durante el gobierno de Lázaro Cárdenas (1934-1940) se establecieron campañas en contra del pulque, ya que era considerada una bebida antihigiénica, por la adulteración a la que era sometida cuando se introducía a la ciudad de México después de pasar por las aduanas de Pantaco, Cuauhtepac y Ticoman. Los vendedores incrementaban el volumen del pulque adicionándole agua (algunas veces no potable), azúcares y gomas (Gobierno del Estado de Hidalgo y Museo de Culturas Populares, 1988). Debido a la baja en el consumo de pulque los cultivos de maguey comenzaron a ser sustituidos por los de cebada, por ser más redituables.

En 1960 por órdenes del Presidente Adolfo López Mateos se creó el Patronato del Maguey, con el objetivo de impulsar el crecimiento y explotación del maguey, lo que incluía la optimización en la producción higiénica y envasado del pulque, y darle otros usos a los agaves pulqueros.

En la actualidad no se ha logrado recuperar la popularidad del pulque. Es consumido regularmente por comunidades indígenas del altiplano, y

eventualmente por la población mestiza y la de inmigración reciente para acompañar la comida tradicional. En el mercado urbano solo se vende en las ya casi desaparecidas pulquerías; sin embargo recientemente se han realizado muchos esfuerzos por rescatarla por lo que se promueve en restaurantes de comida mexicana y en festivales gastronómicos. Se han realizado campañas para promocionarla entre la gente joven con el fin de que le tomen gusto a esta bebida ancestral. Además del pulque natural, se elaboran los curados, que se preparan adicionando al pulque blanco semillas (avena, cebada), nueces (piñón, avellana, nuez), frutas (manzana, piña, limón, naranja, coco, tuna, mango, durazno, ciruela, maracuya, guayaba, higo, zarzamora) y hortalizas (apio, perejil, cilantro, berro, alfalfa, pepino) maceradas antes de ser ingerido.

I.2 El agave

Los agaves o magueyes pertenecen a la familia de las Agaváceas; son originarios de México y su uso se remonta a la época prehispánica (10,000 – 8,000 años a.C.). Están adaptadas para crecer en zonas montañosas, frías y de climas secos, en suelos pobres con escasas precipitaciones así como en terrenos pedregosos, planos y barrancas; juegan un importante papel ecológico ya que evitan la erosión de los suelos (Cervantes, 2002; Lappe et al., 2006.).

El maguey es considerado como el árbol de las maravillas por la diversidad de usos que se le dan. Su domesticación probablemente inició hace 3,500 años a.C. Los indígenas utilizaban todas las partes de la planta con distintos fines. Como material de construcción empleaban las pencas y quiotes, para hacer su vestimenta usaban la espina terminal a la que quedaba unida la fibra vascular; a partir de las raíces y espinas fabricaban diversos utensilios como escobas, cepillos y clavos; de las hojas obtenían fibra que utilizaban en la fabricación de cuerdas, costales, telas; y como alimento empleaban el aguamiel (del cual elaboraban miel y pulque), el quiote, las flores y la piña (Gentry, 1982; Cervantes, 2002). La obtención de bebidas alcohólicas es el uso más importante que se le ha dado a los agaves. Entre las bebidas no destiladas están el pulque y el vino de mezcal, obtenidos por la fermentación del aguamiel y del jugo dulce de las piñas o cabezas cocidas; entre las destiladas destacan

el mezcal, el tequila y la bacanora entre otras, elaborados por destilación de los mostos fermentados extraídos de las piñas cocidas de diversas especies de *Agaves* (Bruman, 2000; Gentry, 1982).

1.2.1 El agave pulquero

Las principales especies de agave utilizadas en la elaboración del pulque son: *Agave salmiana* var. *salmiana* Otto ex Salm-Dyck (maguey manso o maguey verde), *A. mapisaga* Trelease (maguey de mano larga o maguey mexicano), *A. atrovirens* Karw (maguey blanco). Estas especies crecen en zonas áridas y semiáridas, en suelos arenosos, someros, pobres o fértiles, bien drenados y en terrenos con poca pendiente, en latitudes que van de 1230 a 2500 m, con temperaturas medias anuales de 13.6 y 17.8°C y precipitaciones de 335 a 1000 mm. Se encuentran distribuidos en el Estado de México, Querétaro, Puebla, Tlaxcala e Hidalgo y en menor proporción en los estados de Veracruz, Oaxaca y Zacatecas (Cervantes, 2002; Gentry, 1982; Mexican Pulque, Lappe et al. 2008 in Steinkraus 3^a ed; Lappe-Oliveras y Moreno-Terrazas, 200X).

1.2.2. Azúcares presentes en los agaves pulqueros

Estudios realizados por Sánchez-Marroquín y Hope (1953) en agaves de 8 años de edad mostraron que los principales carbohidratos contenidos en estas plantas son sacarosa, glucosa, pequeñas cantidades de gomas y manitol. Los estudios de López et al. (2003) señalan que los principales carbohidratos de almacenamiento en los tallos de los agaves son fructanos, oligómeros o polímeros con residuos de β -fructofuranosil, solubles en agua, sintetizados a partir de la sacarosa presente en la vacuola. Funcionan como moléculas almacenadoras de energía, que están involucradas en el desarrollo vegetativo y en el proceso de osmorregulación de estas plantas. Los fructanos representan el 60% del total de los carbohidratos solubles presentes en todas las especies de agaves. Se clasifican de acuerdo a su grado de polimerización (GP) que va de 3-60 o más. Los de bajo GP (<10) son los fructooligosacáridos, y los de alto GP (>10) son las inulinas (Ortiz-Basurto et al. 2008). La inulina es

un oligofructano con enlaces $\beta(2\rightarrow1)$, y constituye el carbohidrato de reserva de *A. tequilana*, *A. americana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens* y *A. salmiana*. Las especies de agaves presentan diferencias en cuanto a la distribución de otros carbohidratos solubles como sacarosa, fructosa y glucosa, lo que se debe a las características ambientales que prevalecen en las regiones en donde son cultivadas (Mancilla-Margalli y López, 2006).

I.3. Elaboración del pulque

El agave pulquero requiere de 8 a 10 años de edad para alcanzar el estado de madurez y producir el brote floral. El primer paso en la producción de pulque es la *castración* o corte del primordio floral dejando una cavidad en el tallo denominada *cajete*. El agave capado se deja reposar de 6 a 12 meses para que las hojas centrales maduren y se incremente el contenido de azúcares del aguamiel. Posteriormente se procede a *picar* y *raspar* la cavidad para destruir los residuos del pedúnculo floral, abrir los vasos para permitir que el aguamiel fluya y se acumule en el cajete. El *tlachiquero* succiona el aguamiel con un calabazo perforado (*Lagenaria siceraria*) llamado *acocote*, y lo deposita en barriles de madera (castañas) o de plástico. Cuando se recolecta todo el aguamiel se raspa el cajete con un cuchillo cóncavo denominado *ocaxtle* para mantener los vasos abiertos y permitir que la savia fluya. La extracción del aguamiel se lleva a cabo 2 o 3 veces al día, en la mañana y en la tarde, dependiendo de la estación del año. Se recolectan de 6 a 8 litros de aguamiel en cada extracción. De cada agave se extraen de 200 a 1000 L de aguamiel lo que depende de la variedad del agave y de las condiciones de cultivo (Loyola-Montemayor, 1956; Ruvalcaba-Mercado, 1983; Granados-Sánchez, 1993). El aguamiel recolectado se transporta a los *tinacales*, lugar en donde se lleva a cabo la fermentación en tinas abiertas de piel, madera, mampostería o de fibra de vidrio (Loyola-Montemayor, 1956; Ramírez et al., 2002)

La fermentación del aguamiel no se inicia en el tinacal; desde que la savia se acumula en el cajete los microorganismos que aparecen en la pared de la cavidad, o los que son inoculados a través del polvo, vectores como

insectos (*Drosophila spp.*) o instrumentos de raspa, picazón y succión, inician dicho proceso, el que se activa fuertemente al adicionarle la *semilla* o *xinaxtli*. La semilla se elabora con aguamiel tipo I (10-15 L), el cual se deposita en una tina tapada y se deja fermentar hasta que termina la fermentación alcohólica y se inicia la acética, lo que se reconoce por la formación de una capa espesa en la superficie llamada zurrón. El tiempo de elaboración de la semilla depende de la temperatura y estación del año. Cuando la semilla esta lista se le adiciona gradualmente aguamiel tipo I y se deja fermentar, a esta preparación se le denomina *pie de cuba* el que se empleará como inóculo para producir el pulque comercial en una segunda tina de fermentación, agregando aguamiel tipo II en proporción (v/v). La fermentación concluye cuando el pulque presenta las características sensoriales y el grado alcohólico que lo distinguen. El tiempo requerido depende del estado de madurez de la semilla, de la calidad del aguamiel, de la temperatura y de la estación del año. Una vez obtenido el pulque se coloca en barriles para su pronta comercialización antes que comience su acidificación y putrefacción. La vida de anaquel del pulque es de 1 a 3 días. En su elaboración se llevan a cabo 5 tipos de fermentaciones sucesivas: láctica, alcohólica, viscosa, acética y pútrida (Lappe y Moreno-Terrazas, 2008; Loyola-Montemayor, 1956; Lappe et al., 2006; Ramírez et al. 2002).

I.4. Industrialización del pulque

Desde 1900, la empresa *Expendedora de Pulques S. A.* de Apan, Hidalgo, inició los esfuerzos por industrializar el pulque. Entre los años de 1935 y 1955 aparecieron en el mercado varias marcas de pulque envasado bajo los nombres *Crespomel*, *Miel-Mex*, *Neutle Herradura*, *Xóchitl* y *Jícara*. Estos dejaron de producirse debido a su elevado precio, poca demanda y a que las botellas se rompían al no lograr detener la fermentación (Loyola-Montemayor, 1956). En 1963 Sánchez-Marroquín y colaboradores, bajo el patrocinio del Patronato Nacional del Maguey, desarrollaron un proceso para producir, a nivel de planta piloto, pulque con aguamiel pasteurizada (8° Brix, pH 6-7) inoculado con cultivos puros de *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* subsp.

mobilis para la fermentación alcohólica, *Lactobacillus spp.* (homo y heterofermentadores) para la fermentación láctica, y *Leuconostoc mesenteroides* var. *mesenteroides* como agente de la viscosidad. Posteriormente este proceso fue implementado a escala industrial en 3 plantas localizadas en los estados de Hidalgo, Tlaxcala y Querétaro, para producir 50,000L diarios de pulque enlatado. El nombre comercial del producto fue *Magueyín*. Debido a los problemas técnicos que presentaba el producto envasado y a su elevado costo el pulque industrializado dejó de producirse, y en 1981 las tres plantas fueron cerradas (Steinkraus, 1997, Lappe et al., 2008).

En 1994 Del Razo desarrolló un proceso para producir pulque a partir de aguamiel pasteurizado inoculado con cultivos puros de *S. cerevisiae*, bacterias ácido lácticas y *Z. mobilis subsp. mobilis*. El pulque obtenido se envasa en latas de aluminio al alto vacío lo que prolonga su vida de anaquel. Mensualmente produce alrededor de 300,000 latas, de las cuales el 98% se exporta a Estados Unidos, Alemania y Ucrania. Además del pulque natural produce curados de fresa, piña-coco, mango, guanábana, guayaba, limón y maracuya (Del Razo, 2004; El Empresario, 2008).

I.5. Composición química del aguamiel y del pulque

En 1863 Río de la Loza realizó los primeros estudios sobre la composición química del aguamiel y del pulque. El aguamiel es la savia de los agaves, es un líquido azucarado, incoloro o amarillento con olor herbáceo. Los compuestos más abundantes en el aguamiel son: azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa), proteínas, gomas y sales minerales (Tabla I) por lo que es un sustrato apto para la producción de etanol. La norma mexicana NMX-V-022-1972 clasifica el aguamiel en tipo I y tipo II. El tipo I es el aguamiel de mejor calidad (el más limpio y con mayor contenido de azúcares); con él que se elabora la semilla y el pie de cuba (Tabla II). El tipo II se refiere a cualquier otro tipo aguamiel, y se utiliza en la producción de pulque comercial (Tabla II).

Tabla I.- Composición química del aguamiel

Características y compuestos % materia seca	Autores	
	a	b
Densidad (g/L)	1.049	---
Acidez	0.068	---
Fructosa	---	32.4
Glucosa	0.012	26.5
Sacarosa	9.5	8.8
Fructo-oligosacáridos	---	10.2
Goma	0.6	---
Proteínas	0.8	3.0
Extractos	12.2	---
Cenizas	0.5	3.3
Aminoácidos libres	---	0.26

Fuente: a) Loyola-Montemayor (1956); b) Ortiz-Basurto et al. (2008)

Tabla II.- Clasificación y especificaciones del aguamiel según la norma oficial mexicana NMX-V-022-1972.

Especificaciones	Tipo I		Tipo II
	Mínimo	Máximo	Mínimo permitido
Grado refractométrico (refractómetro de inmersión) a 20°C	5	7	4.5
Índice de refracción (refractómetro de inmersión) a 20°C	59	100	27
pH	6.6	7.5	4.5
Acidez total (ácido láctico) mg/100 ml.	0.90	1.03	4
Reductores totales (glucosa) g/100 ml.	8	12	6
Reductores directos (glucosa) g/100 ml.	2	3	3
Gomas (glucosa) g/100 ml.	2	6	0.20
Proteínas g/100 ml.	0.3	0.6	0.1
Cenizas g/100 ml.	0.3	0.43	0.18

El pulque es una bebida alcohólica con 4 a 7° GL, blanca lechosa, viscosa y ligeramente ácida. Varios autores han estudiado la composición química de diferentes tipos pulque (Tabla III). Los compuestos más importantes de la bebida son: sales minerales, gomas, proteínas, aminoácidos y vitaminas del complejo B y vitamina C.

Tabla III.- Composición química de diferentes muestras de pulque

Características %	Tipos de pulque			
	Pulque ^a	Pulque tradicional ^b	Pulque planta piloto ^c	Pulque Industrializado ^d
Densidad	1.0	-	1.01	-
Humedad		98.3	-	97.7
Grado alcohólico	7.9	-	-	6
Acidez total	0.4	-	0.28	-
Acidez volátil	0.12	-	-	-
Sacarosa	0.04	-	-	-
Gomas	0.66	-	0.40	-
Proteínas	0.35	0.37	0.35	0.40
Extracto seco	1.65	-	-	-
Cenizas	0.13	0.24	0.28	0.24
Carbohidratos	0.00	0.08	-	11.8

Fuentes: ^aMorton-Gómez (1925)

^bInstituto de Nutriología (1952) apud Loyola-Montemayor (1959)

^cSánchez Marroquín (1979) y ^dDel Razo (2004)

Los productores clasifican el pulque tradicional en: blanco o fino y tlachique. El blanco es aquel que se produce con aguamiel tipo I y el tlachique es el que se prepara con aguamiel tipo II (Mexican pulque, 200X). La norma oficial mexicana NMX-V-037-1972 clasifica al pulque manejado a granel en y tipo I y II. El primero es el pulque de semilla y el de puntas (pie de cuba), y el segundo es el pulque comercial (Tabla IV).

Tabla IV.- Clasificación y especificaciones del pulque según la norma oficial mexicana NMX-V-037-1972 de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

Especificaciones	Tipo I		Tipo II	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Grado refractométrico (refractómetro de inmersión) a 20°C	32	345	25	---
Índice de refracción (refractómetro de inmersión) a 20°C	1.3390	1.3406	1.3365	1.3380
pH	> 3.7	4.2	3.5	4.0
Acidez total (ácido láctico) g/100 ml.	0.40	0.75	0.40	0.70
Reductores totales (glucosa) g/100 ml.	0.10	0.80	0.20	0.50
Grado alcohólico % de alcohol por volumen	6	9	4	6

I.5.1. Características del pulque elaborado en planta piloto

Sánchez-Marroquín (1977) determinó los cambios que presentaban en el aguamiel pasteurizado inoculado con cultivos puros de *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* subsp. *mobilis*, *Lactobacillus spp.* (homo y heterofermentadores) y *L. mesenteroides* var. *mesenteroides* fermentado en planta piloto (Tabla V). Observó la disminución en el contenido de sólidos solubles, de sacarosa, y en el pH, y el incremento en el contenido de ácido láctico y de etanol. Analizó también las propiedades químicas del pulque tradicional y del elaborado en planta piloto (Tabla VI); y observó que las diferencias más significativas eran el mayor contenido de etanol, de ácido acético y de azúcares reductores en el pulque tradicional (Steinkraus, 1997).

Tabla V.- Cambios ocurridos durante la fermentación del aguamiel pasteurizado inoculado con cultivos puros de bacterias y levaduras.

Determinaciones	Aguamiel pasteurizado	Producto final
°Brix	11.0	6.0
Gravedad específica	1.042	0.978
pH	7.0	4.6
Índice de refracción a 20°C	--	1.338
Acidez total (ácido láctico g/100ml)	0.018	0.348
Azúcares reductores directos (g/100ml)	2.40	0.06
Azúcares reductores totales (g/100ml)	10	0.48
Sacarosa (g/100ml)	7.6	0.42
Gomas (g/100ml)	0.60	0.33
Proteína cruda (g/100ml)	0.17	0.17
Residuos secos (g/100ml)	15.29	2.88
Cenizas (g/100ml)	0.31	0.29
Etanol (°G.L. a 20°C)	0.00	5.43
Alcoholes superiores (alcohol amílico)	--	0.51
Acidez volátil (ácido acético) unidades	--	0.02

Fuente: Sánchez-Marroquín (1977); Steinkraus (1997)

Tabla VI.- Comparación de las propiedades químicas del pulque tradicional y del pulque de planta piloto.

Análisis	Pulque tradicional (g/100ml)	Pulque de planta piloto (g/100ml)
Etanol	2.9-6.5	4.1-5.1
Acido acético	0.2-1.9	0.07-0.10
Acido láctico	0.02-1.3	0.06-1.22
Aceites	0.07-0.21	0.01-0.05
Acidez total	0.001-0.96	0.04-1.25
Azúcares reductores	0.1-2.3	0.05-0.15
Ésteres (mg/100ml)	0.06-21.6	0.04-22.1
Viscosidad (cps)	1.20-5.30	3.10-5.10

Fuente: Sánchez-Marroquín (1977); Steinkraus (1997)

I.6. Valor nutricional del aguamiel y del pulque

La importancia nutricional del aguamiel y del pulque radica en su contenido de vitaminas (del complejo B y vitamina C), minerales y aminoácidos (AA) esenciales (lisina y triptófano) (Steinkraus, 1997). En la tabla VII se presenta el contenido de estos compuestos en muestras de pulque tradicional e industrializado observándose que es muy similar. Para los consumidores habituales el pulque es un complemento importante de su dieta diaria, que por ser a base de maíz es deficiente en estos compuestos. El consumo de pulque disminuye la deficiencia de hemoglobina y de ferritina, ya que favorece la absorción de hierro en presencia de ácido ascórbico y etanol (Backstrand et al. 2001; Cook et al. 1995).

Ortiz-Basurto et al. (2008) estudiaron el contenido de AA en aguamiel de *A. mapisaga*. La concentración total de AA es de 0.3 g/L (0.26% de materia seca). Además determinaron la presencia de AA neurotransmisores (exitadores e inhibidores). El contenido de AA en el pulque elaborado de manera tradicional, en planta piloto y el industrializado es muy similar (Tabla VIII).

Tabla VII.- Contenido de vitaminas y minerales en pulque estudiado por diferentes autores.

Componente (mg/100ml)	Autores						
	Pulque Hidalgo ^a	Pulque tlachique ^a	Pulque ^b	Pulque envasado ^c	Pulque tradicional ^d	Pulque Planta piloto ^d	Pulque Industrial ^e
Vitaminas							
Ácido ascórbico	6.2	4.6	5.1	2.7	---	---	5.1
Biotina	---	---	---	---	0.02	0.02	---
Niacina	0.30	0.15	0.35	0.41	0.28	0.37	0.35
Piridoxina	---	---	---	---	0.02	0.03	---
Riboflavina	0.02	0.02	0.03	0.01	0.03	0.03	0.03
Minerales							
Calcio	10	10	11	11.5	---	---	11
Fósforo	10.0	5.0	6.0	34.5	---	---	6.0
Hierro	0.7	---	0.7	0.64	---	---	0.7

Fuentes: ^aCravioto et al. (1951), ^bInstituto de Nutriología (1952) apud Loyola-Montemayor (1959), ^cMassieu et al. (1959), ^dSánchez-Marroquín (1977), ^eNéctar del Razo (2004).

Tabla VIII.- Contenido de aminoácidos en aguamiel, pulque tradicional, pulque elaborado en planta piloto y pulque industrializado.

Aminoácido	% mg			
	Aguamiel ^c	Pulque tradicional ^a	Pulque planta piloto ^a	Pulque Industrial ^b
Esenciales				
Arginina	0.038	0.002-0.003	0.006-0.009	
Lisina	0.025	0.002-0.004	0.005-0.010	0.008-0.016
Fenilalanina	0.22	0.002-0.006	0.009-0.011	---
Isoleucina	0.014	---	---	---
Leucina	0.013	0.005-0.008	0.006-0.009	---
Valina	0.012	0.002-0.004	0.004-0.006	---
Triptófano	0.01	0.001-0.004	0.008-0.010	0.003-0.009
Metionina	< 0.01	0.001-0.002	0.003-0.007	---
No esenciales				
Serina	0.024	---	---	---
Prolina	0.020	---	---	---
Treonina	0.019	0.003-0.005	0.005-0.007	---
Alanina	0.01	---	---	---
Tirosina	0.012	0.016-0.034	0.026-0.038	---
Histidina	0.01	---	---	---
Neurotransmisores				
Glutamina (AE)	0.021	0.009-0.023	0.038-0.041	---
Aspargina (AE)	0.015	0.013-0.017	0.011-0.035	---
Glicina (AI)	0.001	---	---	---
GABA (AI)	0.026	---	---	---

AE= aminoácido excitador AI= aminoácido inhibidor

GABA= ácido γ-aminobutírico

Fuente: ^a Sánchez-Marroquín (1977), ^b Del Razo (2004) y ^c Ortiz-Basurto et al. (2008)

El pulque es consumido por mujeres durante el periodo de gestación y lactancia, ya que incrementa la producción de leche y ayuda al desarrollo psicomotor del niño, debido al contenido de triptófano, vitamina C y vitaminas del complejo B los cuales son precursores de varias neuro-hormonas (Chávez et al., 1998).

Además, el aguamiel y el pulque poseen actividad prebiótica por su alto contenido de fructanos, los que al no ser digeridos en el estómago se acumulan en el colon, en donde promueven el desarrollo de bacterias ácido lácticas y levaduras que actúan como agentes probióticos (Wang y Nobel, 1998; Lappe et al., 2006, Ortiz-Basurto et al., 2008).

I.7. Propiedades terapéuticas

Desde la época prehispánica el pulque fue utilizado para el tratamiento de: dispepsias, dolor de estómago, anemia, anorexia, astenia, vértigo, neuralgias, dolores de cabeza, infecciones urinarias, tifo, pitiriasis, diurético y antidiarreico (De la Cruz y Badiano, 1964; Benavente, 1963; Clavijero, 1978). Actualmente la conseja popular lo sigue recomendando para el tratamiento de alguno de estos síntomas aunque desde el punto de vista científico su eficacia no ha sido comprobada.

I.8. Concepto de levaduras

El término levadura deriva del latín “levere” que significa levantar o crecer, o del griego “zestos” que significa hervir. Estos términos se asocian con las características que representan la fermentación de la cerveza y del pan llevada a cabo por estos microorganismos. (Phaff et al. 1978) Los primeros indicios de la utilización de las levaduras datan del 7000 a.C. con la producción de cerveza en Sumeria. En el año 3500 a.C. en Egipto ya se elaboraba el pan y la cerveza, y en Asiria se producía vino; en México se elaboraba pulque hacia el año 2000 a.C.; en el año 100 a.C. existían alrededor de 250 panaderías en Roma (Martín del Campo, 1938; Kurtzman y Fell, 1998).

Las levaduras son hongos unicelulares que no constituyen una entidad taxonómica real; sus teleomorfos se clasifican en los *phyla* Ascomycota y Basidiomycota del reino Fungi. Incluyen más de 800 especies, clasificadas en 100 géneros. A pesar de que han sido aisladas de una gran variedad de hábitats tanto terrestres como acuáticos, algunas están restringidas a la fuente original de donde fueron aisladas (Kurtzman y Fell, 1998).

I.8.1. Metabolismo

Las levaduras son organismos facultativos, lo que les permite crecer en condiciones aerobias y anaerobias. En condiciones aerobias presentan metabolismo oxidativo, transformando los azúcares en dióxido de carbono (CO₂) y agua para producir energía e incrementando rápidamente su biomasa (1g levadura/4g azúcar). Bajo condiciones anaeróbicas su metabolismo se vuelve fermentativo, reducen los azúcares a etanol, CO₂ y energía, sin embargo su rendimiento disminuye (1g levadura/100g azúcar) ya que el 75% de la energía producida se pierde en forma de calor. El tipo de metabolismo que las levaduras llevan a cabo depende de su especie y de las condiciones en que se desarrollan. A bajas concentraciones de glucosa (menos del 1%) y en presencia de aireación las levaduras llevan a cabo el metabolismo aerobio, sin embargo a altas concentraciones de glucosa y aun en presencia de oxígeno llevan a cabo el metabolismo fermentativo (Phaff et al. 1978; Mesas y Alegre 1999).

I.8.2. Macro y micromorfología

Las levaduras generalmente forman colonias de diferentes colores y texturas. Su forma y dimensión celular es diversa; pueden ser esféricas, ovals, elípticas, cilíndricas, lo cual depende de diversos factores, como el sustrato en el que viven y la edad. Muchas especies tienen un teleomorfo ascomicético, algunas basidiomicético.

I.8.3. Fisiología

La mayoría de las levaduras son mesófilas porque su crecimiento óptimo está entre los 20 y 25°C, también las hay sicrófilas que crecen entre 4 y 15° C y otras toleran temperaturas más elevadas llamadas termófilas (> 55°C), lo que depende del hábitat del que fueron aisladas (Kurtzman y Fell, 1998). Su pH óptimo de crecimiento se encuentra entre 4.5-6.5, aunque algunas especies pueden crecer a pH de 3.0 y otras a valores superiores de 8.0 (Phaff et al. 1978).

I.8.4. Reproducción

Su reproducción puede ser asexual (vegetativa) o sexual. La asexual se realiza por gemación o fisión. Cuando se reproducen por gemación, la célula madre desarrolla una yema o brote llamada célula hija; ésta crece hasta alcanzar un tamaño similar al de la madre y se separa, aunque ambas pueden quedar unidas formando cadenas de células llamadas pseudomicelio. Algunas levaduras desarrollan filamentos largos con septos, los que constituyen el micelio verdadero. Cuando se reproducen sexualmente generan ascas y ascosporas, o basidios y basidiosporas, las cuales no quedan confinadas dentro de un cuerpo fructífero (Kurtzman y Fell, 1998)

I.8.5. Hábitat

El hábitat de las levaduras usualmente es rico en carbohidratos simples, son ambientes altamente húmedos o líquidos, pueden ser ácidos o alcalinos y con nutrientes complejos, por lo que son encontradas frecuentemente en los tejidos de las plantas en estado de descomposición, así como en raíces, frutos, tallos, flores, líquidos en fermentación y sustratos azucarados. También pueden habitar en sustratos no azucarados como las levaduras basidiomicetes descubiertas en lagos de la Antártica. Un gran número de levaduras viven como simbiosis con animales, especialmente insectos siendo éstos sus principales vectores de dispersión; algunas pueden ser patógenas o saprobias (Madigan et al., 2004).

I.9. Concepto de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son gram positivas, pueden ser cocos o bacilos, no formadores de esporas, usualmente no poseen movilidad y ocasionalmente son reductores de nitrato (Hames y Hertel, 2006). No pueden generar ATP mediante un gradiente de protones debido a que no poseen cadena respiratoria, solo obtienen ATP mediante la fermentación de carbohidratos.

Las bacterias lácticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, este grupo está compuesto por 12 géneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*.

Las BAL son ampliamente utilizadas en procesos de fermentación en la industria alimenticia para la obtención de vinos, yogurt, queso, chorizos, cervezas, sauerkraut y kimichi.

I.9.1. Fisiología

La mayoría de las bacterias lácticas son mesófilas, sin embargo algunas pueden crecer a temperaturas inferiores a 5°C y otras a 45°C. Su pH óptimo de crecimiento se encuentra en intervalos de 4.0-4.5, aunque algunas crecen a pH de 3.2 y otras en valores tan altos como 9.2. Necesitan aminoácidos preformados, vitaminas del grupo B, bases púricas y pirimidicas, son ligeramente proteolíticas y lipolíticas (Jay, 2002), no solo crecen en glucosa si no también en fructosa, galactosa, manosa, sacarosa y pentosas (Müller, 2001).

I.9.2. Hábitat

Las BAL pueden ser aisladas de suelos, plantas, productos de desecho, alimentos procesados así como de la cavidad oral y tracto intestinal de

humanos y animales. El éxito de su distribución se debe a que el ácido láctico que producen baja el pH del medio e impide el crecimiento de otras bacterias.

I.10. Fermentación en levaduras y BAL

I.10.1. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es una reacción anaerobia en la cual los azúcares se degradan a alcohol y dióxido de carbono, en donde las levaduras son los principales microorganismos responsables, aunque también las bacterias pueden llevarla a cabo (Vázquez y Dacosta, 2007). La mayoría de los jugos de frutas y sustratos azucarados son fermentados por levaduras silvestres presentes en ellos. A partir de estas fermentaciones naturales se han aislado levaduras para la producción de bebidas alcohólicas a nivel industrial (Bautista-Justo et al., 2001).

Para que los azúcares puedan ser metabolizados por las levaduras primero deben ser transportados al interior de la célula, ya sea por la toma directa del azúcar (difusión facilitada) como en el caso de maltosa y lactosa; si se trata de un azúcar complejo, primero deberá de ser hidrolizado para posteriormente ser transportado uno o todos los productos de la hidrólisis a través de la membrana celular, melibiosa y sacarosa son ejemplos de azúcares complejos (Figura 1) (Stewart, 1983).

Una vez que los monosacáridos se encuentran dentro de la célula son fermentados a etanol y CO₂. La glucosa es metabolizada a piruvato por medio de la ruta Embden Meyerhof Parnas (EMP, Figura 2a) o glucólisis, posteriormente el piruvato es reducido a etanol y CO₂ (Figura 2b), (Nelson y Cox, 2000). Aunque la glucosa es la principal fuente de azúcar para esta ruta, otros azúcares como manosa, fructosa y galactosa también pueden entrar en la vía glucolítica. La manosa y la fructosa son transportadas dentro de la célula y fosforiladas por acción de una *hexoquinasa* en la posición 6. Como la fructosa-6-P es un intermediario de la glucólisis, entra directamente a la ruta EMP. La manosa-6-P se convierte a fructosa-6-P por la *fosfomanosa isomerasa*.

Saccharomyces cerevisiae fermenta glucosa y sus epímeros así como la sacarosa; algunas cepas pueden fermentar maltosa y galactosa. El pH que favorece la fermentación en esta especie es de 4.5.

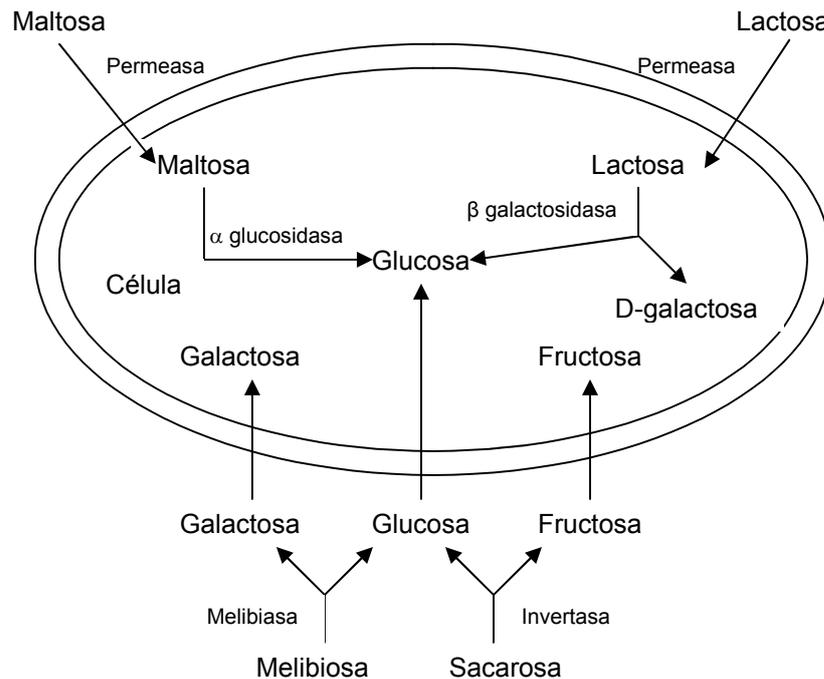


Figura 1.- Transporte de los azúcares por *Saccharomyces* y especies relacionadas (Stewart, 1983).

En las fermentaciones alcohólicas realizadas espontáneamente no se deben a la acción de una sola especie de un microorganismo, si no que es el resultado de la acción combinada de varios grupos microbianos que crecen simultáneamente o se suceden a lo largo de la fermentación (Mas et al., 2002).

I.11. Tolerancia al etanol en levaduras

La tolerancia al etanol en las levaduras no solo está relacionada con la diferencia entre especies, si no también involucra la influencia de factores fisiológicos y ambientales. Altas concentraciones de etanol intracelular inhiben la actividad enzimática de la ruta de EMP, principalmente de la hexocinasa y de la alfa-glicerofosfato dehidrogenasa, sin embargo, el efecto de altas concentraciones de etanol extracelular es menor. A mayor temperatura y concentración de etanol se incrementa la intolerancia. Las especies de los géneros *Candida*, *Kloeckera*, *Hansenula* y *Pichia* son intolerantes a altas concentraciones de etanol siendo más activas al inicio de la fermentación. Para que los efectos inhibitorios del etanol disminuyan es necesario que la célula lo excrete con rapidez; la presencia de residuos linoleil en la membrana plasmática facilita su excreción. A temperaturas superiores a los 35°C se inhibe la excreción del etanol por la célula.

Las levaduras pueden clasificarse en 3 grupos de acuerdo a su producción y tolerancia al etanol: Levaduras de poder alcohológeno bajo, presentan poder fermentativo bajo, toleran hasta 4-5% vol. de alcohol, levaduras de poder alcohológeno medio-alto, dominan cuando se superan los 4-5% vol. de alcohol; y las levaduras de elevado poder alcohológeno son aquellas que predominan cuando la fermentación alcanza entre 10-11% vol. de alcohol (Collado, 2001). Las especies de levaduras que se han encontrado al inicio de la fermentación del aguamiel son *C. lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *Candida rugopelliculosa*, *Pichia carsoni*, *P. guilliermondii*, *P. membranifaciens* y *K. marxianus* (Morton-Gómez, 1925; Ruiz Oronoz, 1953; Herrera y Ulloa, 1975; Lappe et al. 1989; Herrera y Calderón-Villagómez, 1991; Estrada-Godina et al., 2001; Lappe et al., 2006). Conforme el grado alcohológeno aumenta las levaduras que tienen menor tolerancia al etanol, como las mencionadas, son desplazadas por aquellas que soportan más altas concentraciones de etanol, como *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *Candida valida*, *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspora delbrueckii* (Sánchez-Marroquín y Hope, 1953; Herrera y Calderón-Villagómez, 1991, Estrada-Godina et al., 2001) sin embargo, *K. marxianus* posee grado alcohológeno medio-alto

por lo que se puede encontrar en las siguientes etapas de la fermentación (Mesas y Alegre, 1999).

I.12. Fermentación ácido láctica

De acuerdo con su metabolismo las bacterias ácido lácticas se dividen en 2 grupos, homofermentativas y heterofermentativas, los cuales se basan en los productos finales de la fermentación de la glucosa. Las homofermentativas producen ácido láctico como único producto final de la fermentación de la glucosa, teniendo un rendimiento de 2 moles de ácido láctico y 2 moles de ATP por mol de glucosa metabolizada. Poseen las enzimas aldolasa y hexosaisomerasa, usan la vía glucolítica de EMP para metabolizar la glucosa a piruvato (figura 1) y posteriormente este es reducido a ácido láctico (figura 3a). Los géneros homolácticos son: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*. Las heterofermentativas son las BAL que producen 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol, 1 mol de CO₂ y 1 mol de ATP por mol de glucosa metabolizada. No utilizan la vía de EMP para la degradación de la glucosa debido a que no poseen las enzimas aldolasa y hexosaisomerasa, pero sí fosfoacetolasa; la vía metabólica que emplean es la de las pentosas fosfato en donde se obtiene como producto final pentosa-5-fosfato la cual es disociada en 1 mol de gliceraldehído-3-fosfato y 1 mol de acetilfosfato. El gliceraldehído-3-fosfato, como es un intermediario de la segunda fase de la ruta de EMP, entra a este ciclo para metabolizarse a ácido láctico y el acetilfosfato se reduce a etanol (Figura 3b). Los géneros obligatoriamente heterofermentativos son: *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* y *Lactobacillus*. Los lactobacilos homolácticos acidifican más rápido el medio y los heterolácticos son más importantes que los homolácticos para producir componentes del sabor y del aroma tales como acetaldehído y diacetilo (Jay, 2002).

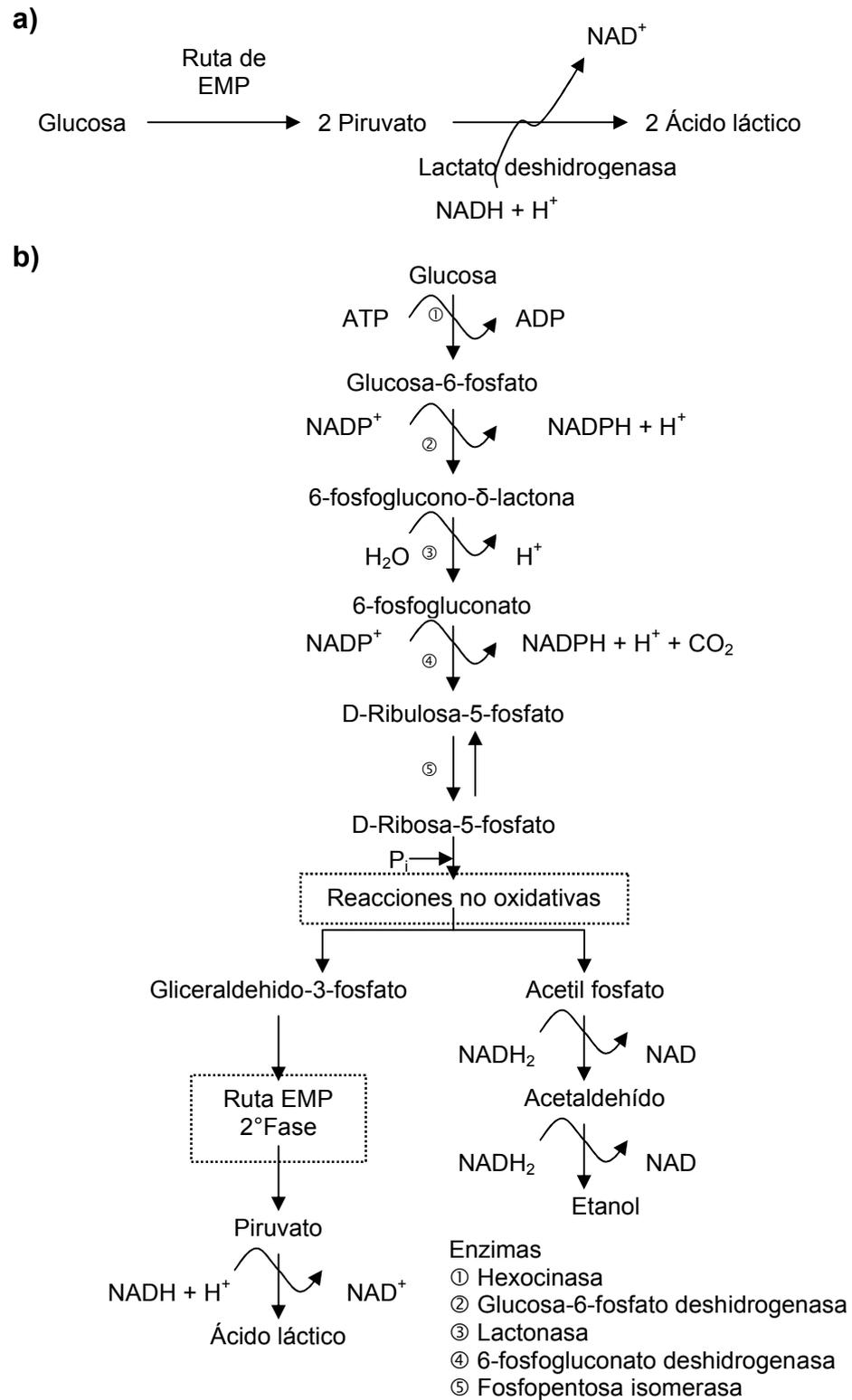


Figura 3.- Rutas metabólicas para la producción de ácido láctico en bacterias. a) Reducción del piruvato a ácido láctico en las BAL homofermentativas. b) Ruta de las pentosas fosfato utilizado por las BAL heterofermentativas para metabolizar la glucosa en ácido láctico y etanol.

I.13. Formación de componentes del sabor

Además de la producción de etanol, durante la fermentación existen otras reacciones secundarias que aportan metabolitos y en gran medida contribuyen al sabor y aroma final de la bebida como: glicerol, ésteres, terpenos, alcoholes superiores entre otros (Figura 4). Estas reacciones se llevan a cabo al principio de la fermentación (Mesas y Alegre, 1999; Mas et al., 2002).

En las bebidas destiladas provenientes de agave como el tequila y el mezcal los compuestos volátiles más abundantes son ésteres, aldehídos, cetonas, terpenos, y ácidos orgánicos. Estudios realizados con cepas nativas de levaduras provenientes de agave demostraron que sintetizan mayor cantidad de componentes volátiles que aquellas que provienen de sustratos como de cerveza, vinos y panificación (Cedeño, 1995; López, 1999). Las levaduras no *Saccharomyces* producen monoterpenoles en vino como resultado de la actividad enzimática de la β -glucosidasa y en menor proporción *S. cerevisiae*. Esta actividad se detectó en *Kloeckera africana* y *Candida magnolia* aisladas de tequila y mezcal respectivamente, por lo que es probable que especies no *Saccharomyces* aisladas de bebidas provenientes de agave produzcan estos compuestos volátiles (Fiore et al. 2005).

Los componentes volátiles que se han detectado en pulque tradicional y el elaborado en planta piloto son alcoholes superiores y ésteres. Entre los más abundantes se encuentran el acetato etílico y el alcohol isoamílico (Tabla IX), los cuales contribuyen al aroma y sabor de la bebida (Steinkraus, 1997).

Tabla IX.- Componentes volátiles en pulque

Componente	Concentración (ppm)
Acetato etílico	121
Alcohol n-propílico	13
Alcohol isobutílico	22
Alcohol amílico	19
Alcohol isoamílico	76

Fuente: Sánchez-Marroquín (1977); Steinkraus (1997)

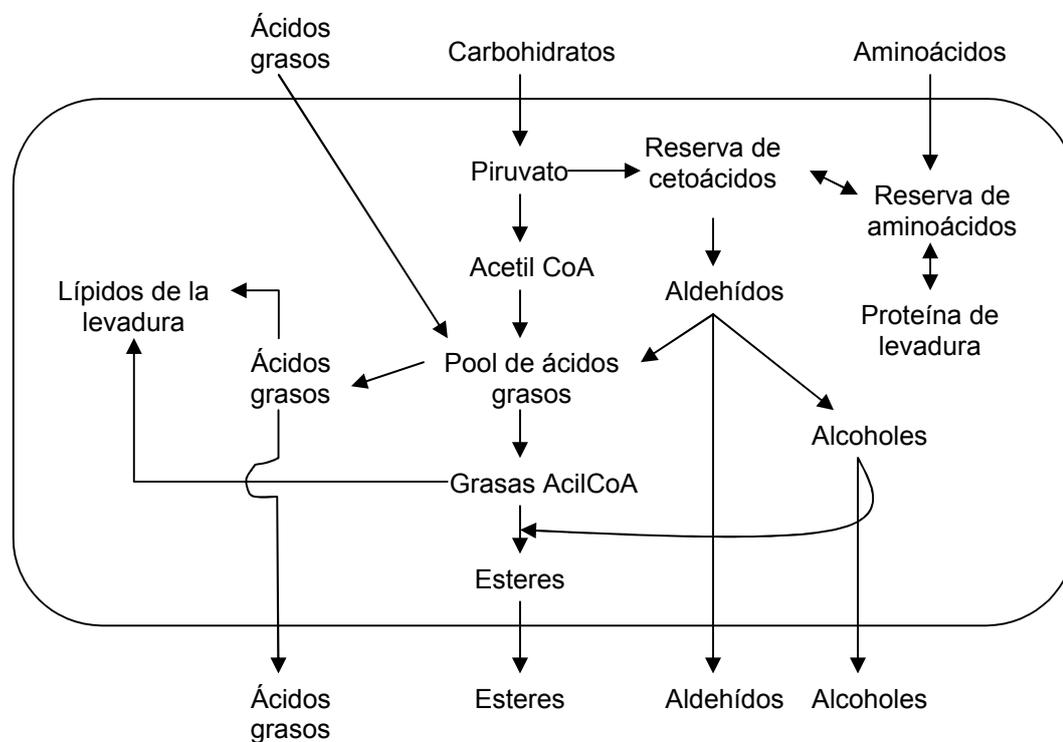


Figura 4.- Esquema general de la formación de los principales componentes volátiles por *Saccharomyces* spp. (Watson, 1983).

La composición final de compuestos volátiles presentes en la bebida depende de las cepas utilizadas para elaborarla y de factores como composición del sustrato, temperatura, cantidad de inóculo, oxígeno disuelto (Watson, 1983), así como ubicación geográfica del cultivo y edad de los agaves (López, 2001).

I.14. Estimulación de las BAL por las levaduras en la fermentación alcohólica.

En la fermentación de bebidas alcohólicas las BAL pueden contribuir en la calidad del producto final (propiedades organolépticas y nutricionales) aunque también en su descomposición y esto dependerá de las interacciones entre las BAL y las levaduras presentes (Gobbetti, 1998; Hames y Hertel, 2006). En la fermentación alcohólica de las melazas el crecimiento de las BAL es fuertemente estimulada por la presencia de levaduras, debido a que éstas hidrolizan los azúcares complejos del sustrato, como la sacarosa en glucosa y fructuosa, y las BAL metabolizan preferentemente estos monómeros (Essia Ngang et al. 1992).

I.15. Efectos benéficos de las levaduras y BAL en los alimentos

Las BAL poseen fuertes efectos inhibitorios en el crecimiento y producción de toxinas de otras bacterias, esta actividad antagonista puede ser resultado de: a) competencia por los nutrientes del medio, b) reducción en el potencial redox, c) reducción del pH debido a la producción de ácido láctico y ácido acético, d) producción de metabolitos primarios inhibitorios como peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y diacetil, e) producción de agentes antimicrobianos como bacteriocinas y antibióticos. Todas estas propiedades y en especial la combinación de ellas pueden ser usadas para alargar la vida de anaquel del producto y otorgar efectos benéficos en la salud del consumidor (Karovičova et. al., 2003).

Los beneficios en la salud que poseen las BAL como prebióticos son: interferencia de patógenos, exclusión y antagonismo, inmunoestimulación e inmunomodulación, actividad anticarcinogénica y antimutagénica, disminución en los síntomas relacionados con la intolerancia a la lactosa, mantenimiento del buen estado del tracto vaginal/urinario, reducción de la presión sanguínea en personas hipertensas, disminución en la incidencia y duración de la diarrea y mantenimiento en la integridad de la mucosa (Klaenhammer, 2000).

Algunas levaduras del género *Saccharomyces* poseen actividad específica contra varios patógenos entéricos, sin embargo son mejor conocidas como probióticos. *Saccharomyces boulardii* y *S. cerevisiae* son utilizadas como probióticos debido a que liberan poliaminas, las cuales estimulan la reparación de las células intestinales y de la mucosa del colon, por lo cual fungen como agentes terapéuticos en el tratamiento de diarrea y colitis (Kalpana y Gandhi, 2006).

I.16. Objetivos

I.16.1. Objetivo general

Aislamiento e identificación polifásica de levaduras y bacterias ácido lácticas de aguamiel, pulque y semilla

I.16.2. Objetivos específicos

- 1.- Aislamiento e identificación de levaduras y bacterias ácido lácticas de aguamiel, pulque y semilla.
- 2.- Identificación morfo-fisiológica y molecular de los aislados de levaduras.
- 3.- Identificación molecular de los aislados de bacterias ácido lácticas.
- 4.- Conservación de los aislados de levaduras y bacterias ácido lácticas.
- 5.- Determinación de la concentración de ácido láctico, ácido acético y etanol.

II.1. Microbiología del pulque

Los primeros estudios microbiológicos del pulque fueron realizados por Río de la Loza en 1864. En la Tabla X se presentan en forma cronológica los principales estudios microbianos realizados en aguamiel y pulque.

Los estudios realizados por Sánchez-Marroquín y colaboradores los condujeron a determinar como microorganismos esenciales en la fermentación del pulque a: *L. mesenteroides* var. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* var. *dextranicum*, *Lactobacillus* spp., *Z. mobilis* subs. *mobilis* y *S. cerevisiae*.

Durante la primera etapa de la fermentación del aguamiel las bacterias *L. mesenteroides* var. *mesenteroides* y *L. mesenteroides* var. *dextranicum* llevan a cabo la síntesis de dextranas lo que confiere la viscosidad del pulque; incrementan la acidez (7.4-6.5) y producen CO₂ favoreciendo las condiciones de anaerobiosis para el desarrollo de *Lactobacillus* homo y heterofermentativos, como *Lactobacillus plantarum* y *L. brevis*, los cuales producen más ácido láctico incrementando la acidez del pulque e inhibiendo el crecimiento de las especies de *Leuconostoc* y de bacterias patógenas por la producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas. Estas condiciones crean un ambiente apropiado para el desarrollo de las especies productoras de etanol: *S. cerevisiae* y *Z. mobilis* subsp. *mobilis*, esta última también produce ácido láctico, acetilmetilcarbinol y gomas (Sánchez-Marroquín y Hope, 1953; Steinkraus, 1997).

Se han identificado otras levaduras no *Saccharomyces* que probablemente juegan un papel importante en la fermentación del aguamiel como *Candida* spp., *Candida lusitanae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia guillermondii* y *Torulaspora delbrueckii*, que además de producir etanol sintetizan otros metabolitos

secundarios que repercuten en el perfil sensorial de la bebida (Sánchez-Marroquín y Hope, 1953; Steinkraus, 1997; Swings & De Ley, 1977).

Estrada-Godina y colaboradores (2001) aislaron e identificaron levaduras killer de aguamiel y pulque. Las levaduras killer identificadas fueron: *K. marxianus* en aguamiel; *Candida valida* y *K. lactis* en pulque. Un aislado de *S. cerevisiae* no mostró actividad killer, pero si resistencia a otras levaduras killer, su tolerancia al etanol también fue alta (> 10% v/v). Este aislado ha sido utilizado para la producción industrial de pulque y de vino blanco y tinto.

Escalante et al. (2004) utilizando técnicas moleculares (amplificación y secuenciación del gen 16S ADNr) identificaron las bacterias presentes en 3 muestras de pulque. Las especies identificadas fueron: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Microbacterium arborescens*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Acetobacter pomorium*, *Gluconobacter oxydans* y *Hafnia alvei*, las cuales se detectaron por primera vez en esta bebida. Las especies de *Lactobacillus* predominaron en un 80.97% en las muestras de pulque. Setenta y ocho clones mostraron menos del 95% de similitud con las secuencias existentes en el GenBan, por lo que probablemente representen nuevas especies de bacterias para la ciencia.

A pesar de que las investigaciones microbiológicas del pulque llevan más de un siglo, se requieren más estudios, utilizando las nuevas técnicas moleculares de identificación, para conocer la compleja biota presente en esta bebida ancestral.

Tabla X.- Estudios microbiológicos realizados en aguamiel y pulque.

Año	Autores	Resultados de los estudios
1864	Río de la Loza	Primera observación microscópica del pulque, descripción de especies de bacterias y levaduras
1870	Barragán	Identificación de aislados de <i>Cryptococcus spp.</i>
1874	Guerrero y Viciera	Descripción de <i>Cryptococcus spp.</i>
1891	Segura	Detección y descripción de <i>Leuconostoc spp.</i>
1884	Lobato	Transformación de aguamiel y de pulque por <i>Cryptococcus spp.</i>
1892	Altamirano	Indicó la suspensión de bacterias en el mucílago del pulque
1896	Gaviño	Aislamiento de <i>Torula sp.</i> , de una levadura rosa, y de las bacterias <i>Bacillus viscosus</i> , <i>Bacterium aceti</i> , <i>Cladothrix sp.</i> , <i>Micrococcus cinnabareus</i> , <i>M. translucidus</i> , <i>M. luteus</i> , <i>M. roseus</i> , y <i>Sarcina sp.</i>
1901	Gaviño	Describió la bacteria <i>Bacterium aceti</i> y la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae agavica</i>
1901	Carbajal	Informó del aislamiento de las bacterias <i>M. luteus</i> , <i>M. translucidus</i> , <i>B. aceti</i> , <i>Torula rosada</i> , <i>Bacillus viscosus (B. subtilis)</i> y de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae agavica silvestre (=S. cerevisiae)</i> , a la que consideró el principal microorganismo fermentativo
1916	Cordero	Obtuvo aislados de las levadura <i>Pichia</i> y <i>Saccharomyces</i> , los que fueron identificados por Guilliermond
1917	De Maria Campos	Obtuvo nuevos aislados de <i>Pichia</i> y <i>Saccharomyces</i>
1924	Lindner	Aisló <i>Thermobacterium mobile (Pseudomonas lindneri)</i> , ambos considerados actualmente sinónimos de <i>Zymomonas mobilis</i>
1925	Morton-Gómez	Describió el aislamiento de las bacterias <i>Bacillus acidificans (=Lactobacillus delbrueckii)</i> , <i>B. xylinus</i> , <i>Diplobacter viscosus</i> , <i>Leuconostoc sp.</i> , <i>Sarcina corrosa</i> , <i>S. major</i> , <i>S. minor</i> , <i>Streptococcus corrosus</i> , y <i>Granulobacter amyloalcoholic.</i> , de los mohos <i>Aspergillus glaucus</i> , <i>Mucor mucedo</i> , <i>Penicillium glaucum</i> , y de las levaduras <i>Oidium lactis (=Geotrichum candidum)</i> , <i>Pichia agave</i> y <i>Saccharomyces agave</i>
1926	Lindner	Identificó <i>Bacterium iridescens</i> , <i>B. vermiforme</i> , <i>B. xylinum</i> , y dos bacterias mucoides
1926	Pacheco	Realizó el primer análisis higiénico del pulque
1928	Lindner	Detectó <i>Bacillus acidificans longissimus</i> , <i>Streptococcus sp.</i> , <i>G. amyloalcoholicum</i> , <i>Pediococcus minor (Sarcina menor)</i> <i>Pediococcus major (Sarcina major)</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> y <i>Streptococcus spp.</i>
1930	Lindner	Estableció la sinonimia entre <i>Bacillus viscosus</i> y <i>Streptococcus corrosus</i> , y describió las especies <i>Streptococcus aguameli major</i> , <i>S. aguameli minor</i> y <i>Thermobacterium iridescens Thermobacterium mobile</i> , y <i>Granulobacter amyloalcoholicum</i>
1931	Fernández Tagle	Presentó un estudio de las vitaminas del pulque, y consideró a <i>Leuconostoc mesenteroides</i> como el microorganismo responsable de la fermentación viscosa. Aisló las levaduras <i>Pichia agave</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. cerevisiae vini (= S. cerevisiae)</i> , <i>Torula mucilaginoso (=Rhodotorula mucilagnosa)</i> , y <i>T. rosada</i>
1932	Varela	Describió <i>Bacillus esterificans</i> , <i>Escherichia wekanda</i> , <i>E. formica</i> , y <i>Saccharomyces anginae</i> , y realizó un estudio higiénico del pulque

Tabla X.- Estudios microbiológicos realizados en aguamiel y pulque (continuación).

1932	Sánchez Marroquín	Describió varias especies de <i>Leuconostoc and Cellulomonas</i>
1932	Sánchez Martínez	Registro el aislamiento de especies de <i>Cellulomonas</i> y de <i>Leuconostoc pierofricti</i>
1938	Nieto y Maecke	Aisló <i>Lactobacillus patonii</i> de aguamiel y pulque
1940	Nieto y Maecke	Determinación de la sinonimia de <i>Leuconostoc viscosum</i> con <i>Streptococcus corrosus</i> (= <i>S. viscosus</i>) aislada por Carbajal (1901)
1936 1938a 1938b 1940 1941 1942a 1942b	Ruiz Oronoz	Estudió las levaduras del pulque y describió nuevas especies: <i>Saccharomyces carbajalii</i> (= <i>S. cerevisiae</i>), <i>Pichia barraganii</i> (= <i>P. membranifaciens</i>), <i>Torulopsis hydromelitis</i> (= <i>Candida parapsilosis</i>), <i>T. aquamellis</i> y <i>Rhodotorula incarnata</i>
1942 1948	Sánchez Marroquín y Arciniega; Sánchez Marroquín et al.	Realizaron el estudio microbiano y metabólico del pulque. Describieron las especies <i>Leuconostoc dextranicum</i> y <i>L. mesenteroides</i> , como parte de la biota natural del pulque. Además identificaron las especies de levaduras <i>Endomycopsis sp.</i> (= <i>Saccharomycopsis sp.</i>), <i>Pichia sp.</i> , <i>Torulopsis sp.</i> (= <i>Candida sp.</i>), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> (= <i>S. cerevisiae</i>), <i>S. pastorianus</i> , <i>S. carlsbergensis</i> (= <i>S. pastorianus</i>), y publicaron ocho artículos en una serie titulada <i>Microbiología del pulque</i>
1948	Quinard	Identificó varias especies de <i>Lactobacillus</i>
1953	Brechtel	Estudió la bacteriología del aguamiel y del pulque, y describió las especies <i>Micrococcus candidus</i> , <i>M. roseus</i> , <i>M. ruizii</i> , <i>Sarcina flava</i> y <i>Bacillus teres</i>
1962	Sánchez Marroquín	Publicó una revisión sobre los estudios microbiológicos del pulque estudios realizados a lo largo de 92 años. En este trabajo el registra la sinonimia de tres nuevas especies descritas por Ruiz Oronoz: <i>S. carbajalii</i> (= <i>S. cerevisiae</i>), <i>P. barragnii</i> (= <i>P. membranifaciens</i>), <i>T. hydromelitis</i> (= <i>Candida parapsilosis</i>)
1972	Herrera et al.	Informaron del proceso de fijación de nitrógeno por microorganismos presentes en el pulque, los que no fueron identificados
1973	Ulloa and Herrera	Aislaron <i>Kloeckera corticis</i> var. <i>pulquensis</i> (= <i>K. apiculata</i>) de pulque en estado de fermentación activa
1977	Sánchez Marroquín	Determinó los microorganismos esenciales durante el proceso de fermentación del pulque: varias especies de <i>Leuconostoc</i> , principalmente <i>L. mesenteroides</i> (= <i>L. mesenteroides</i> var. <i>mesenteroides</i>), y <i>L. dextranicum</i> (= <i>L. mesenteroides</i> var. <i>dextranicum</i>), especies de lactobacilos homo y hetero fermentativos, <i>Zymomonas mobilis</i> (= <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i>), y la levadura <i>S. cerevisiae</i>

Tabla X.- Estudios microbiológicos realizados en aguamiel y pulque (continuación).

1977	Swings and De Ley	Consideraron a <i>Z. mobilis subsp. mobilis</i> como el microorganismo responsable de la fermentación del pulque
1976-1982	Ulloa y Herrera	Aislaron <i>Candida parapsilosis</i> y <i>P. membranaefaciens</i> (= <i>P. membranifaciens</i>)
1989	Lappe et al.	Informaron del aislamiento de <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgarius</i> (= <i>K. marxianus</i>), <i>Pichia carsonii</i> (= <i>Debaryomyces carsonii</i>), and <i>Candida guilliermondii</i> de diversas muestras de pulque
1991	Herrera and Calderón Villagómez	Aislaron <i>Candida colliculosa</i> , <i>Candida rugopelliculosa</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i> (= <i>K. lactis</i>), <i>S. cerevisiae</i> race <i>aceti</i> (= <i>S. cerevisiae</i>), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> race <i>globosus</i> (= <i>S. bayanus</i>), de pulque, y de pulque curado con avena
2001	Estrada Godina et al.	Aislaron <i>Candida lusitanae</i> , <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgaricus</i> (= <i>K. marxianus</i>), <i>S. cerevisiae</i> race <i>capensis</i> (= <i>S. cerevisiae</i>) de aguamiel, y las especies <i>Candida valida</i> , <i>S. cerevisiae</i> race <i>chevalieri</i> (= <i>S. cerevisiae</i>), and <i>S. cerevisiae</i> race <i>capensis</i> (= <i>S. cerevisiae</i>) de diversas muestras de pulque

Fuentes: Del Río (1947), Ruiz Oronoz (1953), Herrera (1953), Gonçalves de Lima (1978; 1990), Lappe y Ulloa (1993).

III.1. Muestreo

Las muestras para realizar el presente estudio se obtuvieron en marzo del 2007 en la población de Santa Mónica, estado de Hidalgo,. Las muestras analizadas fueron cuatro: aguamiel joven, aguamiel viejo, pulque y semilla. Las muestras de aguamiel se extrajeron de 2 plantas de *A. salmiana*. El aguamiel se consideró



Figura 5.- Lugar en donde se almacena el pulque (tanque de lado izquierdo) y semilla (tanque de lado derecho), ambos expuestos al ambiente.

joven o viejo de acuerdo con el tiempo que había transcurrido desde que se inició el raspado del cajete y la obtención del aguamiel (el joven con menos de 10 días de haber sido raspado; el viejo con un tiempo superior al mencionado). Los agaves de los cuales se extrajo el aguamiel eran rapados dos veces por día, a las 4 de la mañana y 3 de la tarde. Las muestras de aguamiel estudiadas se obtuvieron al medio día y se extrajeron con una jeringa de acero inoxidable previamente esterilizada

El pulque muestreado tenía 7 días de fermentación, y estaba contenido en un tanque de plástico abierto (Figura 5). La semilla tenía 18 meses de haber sido adquirida por el productor, con una persona de la misma localidad. La cantidad de semilla que se utiliza para inocular nuevos tanques es reemplazada por aguamiel de la mejor calidad. Las muestras de pulque y semilla se extrajeron por succión oral con un acocote, ya que el productor no permitió la utilización de una jeringa metálica. Todas las muestras tomadas fueron de 400ml; se vaciaron en frascos de vidrio estériles de 500ml de capacidad y se mantuvieron en hielo durante su transporte al laboratorio de Micología del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

El muestreo para el aislamiento e identificación de las BAL se realizó en el mes de octubre del 2007 y se siguió el mismo procedimiento que para las levaduras. No se obtuvo aguamiel joven debido a que la temporada de lluvias prevalecía en la región.

III.2. Aislamiento de las levaduras y obtención de cultivos axénicos

Para llevar a cabo el aislamiento de las levaduras, las muestras se homogenizaron y se realizaron diluciones decimales seriadas. Las diluciones se prepararon en botellas con 90 ml de agua-peptonada-agar (peptona 0.1%, tween 0.5%, agar 0.02%) y 10 ml de muestra. Las diluciones utilizadas fueron: para el aguamiel joven de $1/10^2$ - $1/10^4$, para el aguamiel viejo de $1/10^4$ - $1/10^6$, para el pulque de $1/10^7$ - $1/10^9$, y para la semilla de $1/10^7$ - $1/10^9$. Alícuotas de 0.1ml de las diferentes diluciones, se sembraron por triplicado, por el método de extensión en superficie en placas de medio de extracto de malta-extracto de levadura agar (EMELA)(extracto de malta 3g, extracto de levadura 3g, peptona 5g, glucosa 10g, agar 20g, agua 1000ml) acidificado a pH 3.5 con ácido clorhídrico (Lachance et al., 1988) y de rosa de Bengala-dicloran-cloranfenicol-agar (RBDCA, Difco, EUA). Las placas se incubaron durante 48 horas a 30° C. Se cuantificaron las unidades formadoras de colonias, y se seleccionaron las colonias de levaduras con macromorfología diferente, las que se resembraron por el método de estrías múltiples en los medios mencionados hasta la obtención de cultivos axénicos, lo que se verificó por observación al microscopio.

III.3. Identificación morfo-fisiológica (tradicional) de las levaduras

La identificación de los aislados de levaduras se realizó conforme a la metodología de Yarrow (1998); con el fin de acortar el tiempo requerido para la realización de las pruebas se utilizaron las galerías API32C de BioMérieux (Lyon, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. El resto de las pruebas requeridas en la metodología de Yarrow (1998) (Tabla XI) se realizaron en forma manual. Para la identificación preliminar de los aislados los resultados obtenidos en las galerías API32C se analizaron con la base de

datos de BioMeriux. Los resultados de las pruebas sugeridas por Yarrow (1998) y los obtenidos en las galerías API32C se introdujeron a la base de datos del CBS (Centraal Bureau voor Schimmelculture) y los resultados de la identificación se corroboraron con las diagnósis consignadas en los tratados de Barnett (2000), Kurtzman y Fell (1998).

III.4. Identificación genotípica de las levaduras

III.4.1. Extracción del ADN genómico, amplificación del dominio D1/D2 del gene 26S ADNr

La extracción de ADN genómico se realizó de acuerdo con la metodología de Tapia-Tussell et al. (2006). La reacción de amplificación del dominio D1/D2 del gene 26s ADNr se realizó utilizando los iniciadores universales NL1 (5' GCA-TAT-CAA-TAA-GCG-GAG-GAA-AAG 3') y NL4 (5'GGT-CCG-TGT-TTC-AAG-ACG-G 3') (O'Donnell, 1993), los reactivos y cantidades utilizados para cada reacción se enlistan en la tabla XII. La reacción de PCR se realizó en un termociclador modelo 2720 (Applied Biosystems, Foster City, California) siguiendo el programa que se muestra en la tabla XIII. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% marcado con bromuro de etidio, corrido a 100 volts por 20 min en buffer TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) al 0.5X.

Tabla XI.- Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas consideradas para la identificación de las levaduras (Yarrow, 1998).

I. Características morfológicas	II. Características fisiológicas y bioquímicas
<p>A. Macromorfología o características culturales de los aislamientos</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Crecimiento en medio líquido GELP, formación de película o de anillo 2. Crecimiento en medio sólido GELPA, desarrollo de colonia gigante para observar textura, color, superficie, elevación y margen <p>B. Micromorfología</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Características de las células vegetativas <ol style="list-style-type: none"> a) morfología en medio sólido GELPA b) morfología en medio líquido GELP c) formación de seudomicelio y micelio verdadero en placa de Dalmau en PDA 2. Características de la reproducción asexual o vegetativa en los medios GELPA, EMA 3. Características de la reproducción sexual <ol style="list-style-type: none"> a) Proceso de formación de ascas y ascosporas b) características de las ascas y ascosporas en GWA, FWA y McClaryA 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Utilización de compuestos de carbono <ol style="list-style-type: none"> a) fermentación de 7 carbohidratos b) asimilación de 38 compuestos de carbono 2. Asimilación de compuestos de nitrógeno <ol style="list-style-type: none"> a) cadaverina b) creatina c) D-glucosamina d) etilamina e) lisina f) nitrato de potasio g) nitrito de sodio 3. Resistencia al antibiótico cicloheximida (100 y 1000 ppm) 4. Crecimiento en medios de alta presión osmótica <ol style="list-style-type: none"> a) tolerancia a 50% de glucosa b) 10% NaCl / 5% glucosa 5. Crecimiento a 37 y 45°C en GELP 6. DBB reacción al azul de diazonio 7. Hidrolisis de urea

Abreviaturas:

GELPA (glucosa-extracto de levadura-peptona-agar): glucosa 20 g, extracto de levadura 5g, peptona 10 g, agar 20 g, agua 1000 ml; **GELP(glucosa-extracto de levadura-peptona):** glucosa 20 g, extracto de levadura 5g, peptona 10 g; **PDA (papa-dextrosa-agar):** infusión de 300 g de papa blanca pelada y cortada en cuadros en 1000 ml de agua, filtrada, más 20 g de glucosa y 20 g de agar, aforada a 1000 ml; **GWA (Gorodkova-agar):** glucosa 1g, peptona 10 g, cloruro de sodio 5 g, agar 20 g, agua 1000 ml; **FWA (Fowell-agar):** acetato de sodio 5g, agar 20 g, agua 1000 ml; **EMA (extracto de malta-agar):** extracto de malta 20 g, peptona 1 g, glucosa 20 g, agar 20 g, agua 1000 ml; **McClaryA (McClary-agar):** glucosa 1 g, cloruro de potasio 1.8 g, acetato de sodio 8.2 g, extracto de levadura 2.5 g, agar 15 g, agua 1000 ml

Tabla XII.- Reactivos y cantidades utilizados en la reacción de amplificación PCR del gene 26S ADNr.

Reactivos	1 Reacción μ l
Buffer PCR 10x	5
MgCl ₂ (50mM)	2
dNTPs (2.5mM)	4
Iniciador NL1 (10 pmol/ μ L)	2.5
Iniciador NL4 (10 pmol/ μ L)	2.5
Taq polimerasa (5 u/ μ l)	0.20
ADN (50ng/ μ l)	5
Agua destilada	28.8
Volumen total	50

Tabla XIII.- Programa de PCR para amplificar el dominio D1/D2 del gene 26S ADNr.

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	12 min
40	94	1 min
	52	55 segundos
	72	2 min
1	72	8 min
	4	∞

Fuente: Kurtzman y Robnett (1998)

III.4.2. Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR se purificaron con el kit QIAquick (QIAGEN, Düsseldorf, Alemania). El ADN purificado se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% marcado con bromuro de etidio, corrido a 100 volts por 20 min en buffer TBE 0.5X.

III.4.3. Reacción de secuenciación y análisis de las secuencias

La reacción de secuenciación se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología con el kit Big dye terminador V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California). La reacción se realizó en un termociclador modelo 2720 (Applied Biosystems, Foster City, California) siguiendo el programa mostrado en la tabla XIV. Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit7 (Hall, 2007), se compararon con las existentes en el GenBank utilizando el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) y se

depositaron. Los números de acceso de cada una de ellas se presentan en la sección de resultados.

Tabla XIV.- Programa para la reacción de secuenciación

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
25	96	10 segundos
	50	5 segundos
	60	4 minutos

III.5. Tolerancia al Etanol

Se siguió la metodología de Lachance (1995), en medio líquido. Se inocularon alícuotas de 0.3 ml de una suspensión de células de cada uno de los aislados de levaduras en 5 ml de medio EMEL suplementado con 8% de glucosa y sin etanol. Los tubos ya inoculados se incubaron 24 horas a 30°C. A partir de estos cultivos se inocularon 0.5ml en tubos de ensayo que contenían 5ml de EMEL suplementado con 8% de glucosa y adicionados con 3-10% v/v de etanol absoluto con incrementos seriados del 1%. Los tubos inoculados se incubaron a 30°C durante 2 semanas, y el crecimiento se determinó por turbidez.

III.6. Aislamiento de las BAL

El aislamiento e identificación de las bacterias ácido lácticas se llevó a cabo en el laboratorio de Alimentos y Biotecnología en la Facultad de Química de la UNAM. Las muestras fueron homogenizadas y se prepararon diluciones decimales seriadas en viales con 4.5ml de solución salina al 0.85% y 0.5ml de muestra. Las diluciones utilizadas fueron: aguamiel de $1/10^3$ – $1/10^5$, pulque y semilla de $1/10^5$ – $1/10^8$. Se sembraron alícuotas de 0.1ml por extensión de superficie en placas con medio Man-Rogosa-Sharpe-agar (MRS, Oxoid, Inglaterra). Las placas se incubaron a 28°C, las de aguamiel y semilla durante 72 horas y las de pulque durante 5 días. Se seleccionaron colonias de bacterias con macromorfología diferente (tamaño, forma y color de la colonia) se sembraron por estría cruzada en placas de MRS y se incubaron durante 48

horas a 28°C. Se realizaron diluciones en solución salina (NaCl 0.85%) de las colonias obtenidas por estría cruzada y se sembraron por extensión de superficie en placas de MRS las que se incubaron durante 48 horas a 28°C. Las colonias aisladas se resembraron por estría cruzada en placas de MRS y se incubaron por 48 horas a 28°C. Una vez desarrolladas se observaron al microscopio para comprobar su pureza. Si la colonia observada no se encontraba pura se resembraba por estría cruzada hasta purificarla en medio MRS.

III.7. Identificación morfo-fisiológica de las BAL

Las cepas de BAL aisladas fueron identificadas por pruebas morfológicas (tinción de Gram) y fisiológicas (prueba de catalasa y galerías API50CHL de BioMérieux, Lyon, Francia). La tinción de Gram y prueba de catalasa se les realizó siguiendo la metodología de Harrigan (1976). Para la identificación preliminar se utilizó el software de BioMérieux.

III.8. Identificación genotípica de las BAL

III.8.1. Extracción de ADN

Las cepas se sembraron en tubos con 10 ml de medio líquido MRS y se incubaron durante 48 horas a 28°C. Los tubos se centrifugaron a 12, 000 rpm, se decanto el medio de cultivo y la biomasa concentrada en el fondo se paso a microtubos de 2ml, los que se centrifugaron a 14, 000 rpm durante 1 minuto; se descarto el sobrenadante y se agregaron 500µl de buffer TES (Tris-EDTA-NaCl a pH 8) a cada uno. El contenido de los tubos se mezcló por inversión, se les adicionaron 20µl de lisozima (20mg/µl, Sigma, EUA) y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se agregaron 8µl de pronasa (20mg/µl, Boehringer Ingelheim, Alemania) y 8µl de RNAasa (20mg/µl, Sigma, EUA) a cada uno, se agitaron vigorosamente por inversión y se incubaron a 65°C por 1 hora. Al término de este tiempo se les adicionaron 120µl de SDS (dodecilsulfato sódico) al 10%, se agitaron y se incubaron a 65°C durante 10 minutos. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se les agregaron 600µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1, Sigma, EUA), se agitaron

vigorosamente hasta formar una emulsión blanca, se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos, se formaron 2 capas, se extrajeron 500 µl de la primera, teniendo cuidado de no tomar de la segunda capa y se colocó en un microtubo limpio de 1.5ml, se le adicionó 1 ml de etanol al 70% a -20°C. Los tubos se agitaron suavemente y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos; se decanto el sobrenadante dejando solo el pellet, los tubos se colocaron boca abajo y se dejaron secar 24 horas a temperatura ambiente; una vez seco el pellet se les agregaron 40µl de agua destilada estéril y se calentaron a 65°C por 5 minutos para disolver bien el pellet. El ADN se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% marcado con bromuro de etidio que se corrió a 90 volts por 45 min en buffer TES 1X. El ADN se conservó en refrigeración a -10°C.

III.8.2. Reacción de amplificación del gene 16S ADNr y purificación

La reacción de amplificación del gene 16S ADNr se realizó con los iniciadores universales 3 (5' GTT-GCG-CTC-GTT-GCG-GGA-CT 3') y PA (5' AGA-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG 3'). Los reactivos y cantidades utilizados para cada reacción se encuentran en la tabla XV. La reacción se llevo a cabo en un termociclador Tpersonal (Biometra, Göttingen, Alemania); el programa utilizado se muestra en la tabla XVI. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% marcado con bromuro de etidio a 70 volts por 45 min en buffer TES 5X. Los productos de PCR se purificaron con el kit QIAquick (QIAGEN, Düsseldorf, Alemania).

Tabla XV.- Reactivos y cantidades utilizados en la reacción de amplificación de PCR del gene 16S ADNr

Reactivos	1 Reacción µl
Buffer PCR 10x	5
MgCl ₂ (25mM)	5
dNTPs	1
Oligo PA (200ng/µl)	0.5
Oligo 3 (58.2nmol)	0.5
Taq polimerasa (1u/µl)	1
ADN (50ng/µl)	2-3
Agua destilada	35-34
Volumen total	50

Tabla XVI.- Programa de PCR para amplificar el gene 16S del ADNr.

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	94	3
34	94	1
	65	1.30
	72	2
2	72	15

III.8.3. Reacción de secuenciación y análisis de las secuencias

La reacción de secuenciación y el análisis de secuencias se realizó en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología con el mismo protocolo seguido para las levaduras. Las secuencias se depositaron en el GenBank y los números de acceso de cada una de ellas se presentan en la sección de resultados.

III.9. Mantenimiento de cultivos puros en refrigeración y ultrarefrigeración

III.9.1. Conservación de levaduras

Los cultivos puros se conservaron por duplicado en tubos con 9 ml de agua destilada estéril a 4° C.

III.9.2. Conservación de BAL

Los cultivos puros se sembraron en tubos con 4 ml de medio líquido MRS y se incubaron durante 72 horas a 28°C, posteriormente se conservaron en medio semisólido APT (Difco, EUA) con 0.3% de agar bacteriológico (Oxoid, Inglaterra) y trazas de carbonato de calcio a 4°C. Para su mantenimiento en ultrarefrigeración las cepas puras se sembraron en 4 ml de medio líquido MRS y se incubaron durante 24 horas a 28°C. Después se tomó 1.2 ml del cultivo y se transfirieron a un criotubo con 0.3 ml de glicerol previamente esterilizado. Los criotubos se conservaron en un ultracongelador a -75°C.

III. 10. Detección de ácidos orgánicos y etanol

Todas las muestras obtenidas en el segundo muestreo se sometieron a análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la determinación de etanol, y ácidos láctico y acético, en el laboratorio de Análisis Químicos de la Universidad Iberoamericana. El equipo utilizado fue un cromatógrafo Waters modelo 2086 (Barcelona, España) equipado con un detector de índice de refracción, se utilizó una columna preempacada Polisper OAHY (300 x 6.5 mm) marca Merk (Nueva Jersey, E.U.A). Los estándares de ácido acético, ácido láctico y etanol fueron J.T. Baker grado analítico al 1%. El volumen de inyección de los estándares y de las muestras fue de 10 μ L con un tiempo de elusión de 25 minutos.

IV.1. Aislamiento e identificación de levaduras

De los diferentes sustratos estudiados no se obtuvieron unidades formadoras de colonias en las diluciones inicialmente trabajadas, por lo que se procedió a sembrar diluciones más concentradas. Se sembraron para el aguamiel joven y viejo las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , para el pulque y semilla las de 10^{-5} y 10^{-6} . Las unidades formadoras de colonias (ufc) obtenidas en cada dilución y sustrato se presentan en la tabla XVII.

Tabla XVII. Unidades formadoras de colonias (ufc/ml) de levaduras obtenidas en aguamiel joven, aguamiel viejo, pulque y semilla.

Dilución	UFC/ml	
	RBDCA	EMELA pH 3.5
Aguamiel joven		
10^{-2}	6.53×10^5	1×10^3
Aguamiel viejo		
10^{-1}	4×10^3	11×10^3
Pulque		
10^{-5}	5.33×10^8	3.44×10^8
Semilla		
10^{-5}	7.18×10^8	4×10^8

Tomando en consideración la morfología colonial en medio de EMELA, se seleccionaron 78 colonias de levaduras, las que se dividieron en 4 grupos según su macro y micromorfología. A 3 aislados de aguamiel joven, 7 de aguamiel viejo, 5 de pulque y 5 de semilla se les realizaron las pruebas de la galería API32C y las pruebas adicionales sugeridas por Yarrow (1998) cuyos resultados se presentan en la tabla XVIII. La identificación fenotípica y genotípica de los 20 aislados se muestra en la tabla XIX. Los 20 aislados identificados por ambas metodologías fueron: *K. marxianus* (14), *S. cerevisiae* (4), *Saccharomyces paradoxus* (1) y *C. lusitaniae* (1).

Tabla XVIII.- Resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas consideradas para la identificación de las levaduras.

Prueba	Clave del aislado																			
	1Km	2Km	3Km	4Km	5Km	6Km	7Cl	8Sp	9Km	10Sc	11Km	12Sc	13Km	14Sc	15Sc	16Km	17Km	18Km	19Km	20Km
Morfología																				
Forma de la célula	C	C	C	O	C	O	C	G	G	O	O	G	R	O	R	G	O	O	O	O
Gemación	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm	Gm
Seudomicelio	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Reproducción sexual	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Forma de ascosporas	Rn	Rn	Rn	Rn	R	Rn	nd	R	R	R	Rn	R	nd	nd	R	Rn	Rn	Rn	Rn	Rn
Fermentación																				
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Asimilación de compuestos carbonados																				
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
galactosa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
L-sorbosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Trehalosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
Melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Melezitosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
L-arabinosa	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-ribosa	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Km= *K. marxianus*
G= globosa

Sc= *S. cerevisiae*
R= redonda

Cl= *C. lusitaniae*
Rn= reniforme

Sp= *S. paradoxus*
nd= no determinada

C= cilíndrica
O= ovalada
Gm= gemación multipolar

Tabla XVIII.- Resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas consideradas para la identificación de las levaduras (continuación).

Asimilación	Clave del aislado																			
	1Km	2Km	3Km	4Km	5Km	6Km	7Cl	8Sp	9Km	10Sc	11Km	12Sc	13Km	14Sc	15Sc	16Km	17Km	18Km	19Km	20Km
L-ramnosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glucosamina	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetilglucosamina	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Glicerol	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
M-eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribitol ad	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
Galacitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
α -Metil-D-glucosa	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
D-gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-L-lactato	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Succinato	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Citrato	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
2-cetogluconato	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Arbutina	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Hexadecano	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-glucuronato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconolactona	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asimilación compuestos Nitrogenados																				
KNO ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
NaNO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etilamina	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Lisina	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Creatina	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Km= *K. marxianus*Sc= *S. cerevisiae*Cl= *C. lusitaniae*Sp= *S. paradoxus*

Continuación Tabla XVIII.- Resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas consideradas para la identificación de las levaduras (continuación).

Prueba	Clave del aislado																			
	1Km	2Km	3Km	4Km	5Km	6Km	7Cl	8Sp	9Km	10Sc	11Km	12Sc	13Km	14Sc	15Sc	16Km	17Km	18Km	19Km	20Km
CMAPO																				
50% glucosa	nd	nd	nd	-	nd	nd	-	-	Nd	-	nd	-	nd	-	-	nd	nd	nd	-	nd
10%NaCl / 5%Glucosa	nd	nd	nd	-	nd	nd	+	-	Nd	-	nd	-	nd	+	-	nd	nd	nd	-	nd
Temperatura																				
37°C	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
45°C	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+

Km= *K. marxianus*

Sc= *S. cerevisiae*

Cl= *C. lusitaniae*

Sp= *S. paradoxus*

CMAPO= crecimiento en medios de alta presión osmótica

nd= no determinada

Tabla XIX.- Identificación fenotípica y genotípica de los aislados de levaduras

			Identificación				
			Fenotípica		Genotípica		
Muestra	Clave del aislado	Especie	API32C % de similitud	CBS % de similitud	Especie	GenBank % de similitud	Número de acceso GenBank
Aguamiel joven	1Km	<i>K. marxianus</i>	99.6	100	<i>K. marxianus</i>	99	EU669463
	4Km	<i>K. marxianus</i>	99.9	100	<i>K. marxianus</i>	99	--
	20Km	<i>K. marxianus</i>	99.6	100	<i>K. marxianus</i>	99	--
Aguamiel vieja	5Km	<i>K. marxianus</i>	99.6	100	<i>K. marxianus</i>	99	--
	7Cl	<i>C. lusitaniae</i>	97.5	100	<i>C. lusitaniae</i>	99	EU669469
	9Km	<i>K. marxianus</i>	99.6	100	<i>K. marxianus</i>	99	--
	11Km	<i>K. marxianus</i>	99.6	100	<i>K. marxianus</i>	99	--
	13Km	<i>K. marxianus</i>	99.6	100	<i>K. marxianus</i>	99	EU669470
	16Km	<i>K. marxianus</i>	99.9	100	<i>K. marxianus</i>	99	--
Semilla	18Km	<i>K. marxianus</i>	99.3	100	<i>K. marxianu</i>	99	--
	3Km	<i>K. marxianus</i>	99.9	100	<i>K. marxianus</i>	99	EU669468
	8Sp	<i>S. cerevisiae</i>	99.6	100	<i>S. paradoxus</i>	99	EU669466
	12Sc	<i>S. cerevisiae</i>	99.8	100	<i>S. cerevisiae</i>	99	--
	15Sc	<i>S. cerevisiae</i>	99.8	100	<i>S. cerevisiae</i>	99	EU669467
19Km	<i>K. marxianus</i>	99.6	100	<i>K. marxianus</i>	99	--	
Pulque	2Km	<i>K. marxianus</i>	99.9	100	<i>K. marxianus</i>	99	EU669464
	6Km	<i>K. marxianus</i>	99.6	100	<i>K. marxianus</i>	99	--
	10Sc	<i>S. cerevisiae</i>	99.8	100	nd	--	--
	14Sc	<i>S. cerevisiae</i>	99.8	100	nd	--	--
	17Km	<i>K. marxianus</i>	99.9	100	<i>K. marxianus</i>	99	--

nd= no determinada

El aislado de *C. lusitanae* presentó un biotipo diferente al de la cepa CBS 6936 y al de la diagnosis de la especie (Barnett et al., 2000) ya que asimiló rafinosa, L-arabinosa, creatina y no desdobló la arbutina. Se identificaron 4 biotipos en los aislados de *K. marxianus* al compararlos con la cepa tipo CBS712 (Tabla XX) pero todos ellos se incluyeron dentro de la especie *K. marxianus* de acuerdo con la diagnosis de Barnett et al. (2000). Los 4 aislados de *S. cerevisiae* correspondieron a 3 biotipos. El biotipo 1 (15Sc) es igual al de la cepa tipo CBS71171, el biotipo 2 (12Sc) difirió en la asimilación de etilamina y L-lisina; el biotipo 3 (10Sc y 14Sc) difirió en la asimilación de rafinosa, citrato, y xilitol. El aislado de *S. paradoxus* difirió de la cepa tipo CBS432 en que no fermentó galactosa, no asimiló galactosa pero si D-ribosa +.

Tabla XX- Características de los biotipos de *K. marxianus*.

Sustrato	Clave del aislado	Biotipo	Forma de ascospora	Asimilación				Crecimiento °C	
				G	S	E	L	37	45
Yogurt	CBS712	1	Reniforme	+	+	+	+	+	+
Aguamiel Joven	1Km	1	Redonda	+	+	+	+	+	+
	4Km	1	Reniforme	+	+	+	+	+	+
	20Km	1	Reniforme	+	+	+	+	+	+
Aguamiel Viejo	5Km	2	Redonda	d	+	+	+	+	+
	9Km	3	Redonda	+	d	+	+	+	-
	11Km	3	Reniforme	+	d	+	+	+	-
	13Km	1	Reniforme	+	+	+	+	+	+
	16Km	3	Reniforme	+	d	+	+	+	-
	18Km	1	Reniforme	+	+	+	+	+	+
Pulque	2Km	2	Reniforme	d	+	+	+	+	+
	6Km	1	Reniforme	+	+	+	+	+	+
	17Km	4	Reniforme	-	+	+	+	+	+
Semilla	3Km	1	Reniforme	+	+	+	+	+	+
	19Km	1	Reniforme	+	+	+	+	+	+
	Barnett et al	2	Redondas Reniformes	+,d	+,d	+	+	+	+/-

G= glicerol S= succinato E= etilamina L= lisina

IV.2. Tolerancia al etanol

Los resultados de esta prueba se presentan en la Tabla XXI. El aislado que menor tolerancia presentó (4% vol) fue *C. lusitaniae* de aguamiel. Todos los aislados de *K. marxianus* toleraron hasta un 6% vol. de etanol, excepto el aislado 9Km de aguamiel viejo que toleró 5% v/v y los aislados 20Km y 18Km de aguamiel joven y viejo respectivamente que toleraron hasta 7% v/v de etanol. De *S. cerevisiae* los aislados 14Sc (pulque) y 15Sc (semilla) toleraron hasta un 7% (vol) de etanol; y los aislados 10Sc (pulque), 12Sc (semilla) y 8Sp (*S. paradoxus*, de semilla) toleraron hasta un 9% v/v de etanol. Las especies más tolerantes al etanol fueron *S. cerevisiae* (10Sc y 12Sc) y *S. paradoxus*. (8Sp). Se puede observar que hay diferencias entre los aislamientos de una misma especie con respecto a su tolerancia a etanol.

Tabla XXI.- Resultados de la tolerancia al etanol

Fuente	Clave del aislado	Especie	% Etanol							
			3	4	5	6	7	8	9	10
Aguamiel Joven	1Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
	4Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
	20Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
Aguamiel Vieja	5Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
	7Cl	<i>C. lusitaniae</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
	9Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	-	-	-	-	-
	11Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
	13Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
	16Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
	18Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
Semilla	3Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
	8Sp	<i>S. paradoxus</i>	+	+	+	+	+	+	d	-
	12Sc	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	d	-
	15Sc	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
	19Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
Pulque	2Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
	6Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
	10Sc	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	d	-
	14Sc	<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
	17Km	<i>K. marxianus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-

d= crecimiento débil

IV.3. Aislamiento e identificación de BAL

No se obtuvieron colonias ufc de las diluciones 10^{-7} y 10^{-8} de pulque y de la dilución 10^{-7} de semilla como se esperaba. En el aguamiel se obtuvieron colonias de todas las diluciones trabajadas, del pulque y semilla en las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} . El tiempo de incubación promedio para las BAL es de 48 horas, sin embargo para el aguamiel y semilla el crecimiento de colonias no se vió hasta las 72 horas, y en el pulque hasta los 5 días. Se obtuvieron un total de 23 aislados de bacterias lácticas, se agruparon con base en el sustrato del que provenían y su micromorfología. A partir de estos criterios se seleccionaron 10 aislados, 6 de aguamiel, 2 de semilla y 2 de pulque para realizarles las pruebas de identificación correspondientes. Los resultados de las características macro y micromorfológicas así como las pruebas de catalasa y tinción de Gram se muestran en la tabla XXII. A 5 de los 10 aislados seleccionados se les realizaron las pruebas de la galería API50CHL y se identificaron como: *Lactobacillus paracasei paracasei*, *Leuconostoc mesenteroides mesenteroides var. dextranicum.*, *Leuconostoc citreum* y *Lactobacillus brevis* (Tabla XXIII). Para corroborar su identidad se realizó la secuencia de bases del gene 16S del ADNr. Las especies identificadas fueron: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc lactis*, *Acetobacter orientalis* y *Lactobacillus sp.* (Tabla XXIII).

Tabla XXII.- Características macro y micromorfológicas de los 10 aislados de bacterias lácticas

Cepa	Macromorfología	Micromorfología	Gram	Catalasa
1BI	Colonia chica, redonda, blanca	Bacilos cortos	+	-
8BI	Colonia mediana, redonda, blanca brillante	Bacilos en cadenas	+	-
10BI	Colonia mediana, redonda, amarilla	Bacilos gruesos	+	-
11BI	Colonia chica, redonda, amarilla	Bacilos cortos gruesos	+	-
16BI	Colonia grande, redonda, blanca	Bacilos cortos	+	-
17BI	Colonia grande, redonda, café transparente	Bacilos cortos	-	+
18BI	Colonia mediana, redonda, café	Bacilos largos	+	-
20BI	Colonia chica, redonda, café	Bacilos largos	+	-
30BI	Colonia grande, redonda, blanca grumosa	Bacilos largos	+	-
32BI	Colonia chica, redonda, blanca	Bacilos cortos	+	-

Tabla XXIII Resultados de la identificación de los 10 aislados de bacterias lácticas

Cepa	Sustrato	API50CHL	% de similitud	Secuenciación gene 16S del ADNr	% de similitud	Número de acceso GenBank
1BI	Aguamiel	<i>Lactobacillus paracasei paracasei</i>	86.7	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99	EU676339
8BI	Aguamiel	Nd	---	<i>Lactobacillus sp.</i>	98	EU676340
10BI	Aguamiel	Nd	---	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	99	EU676341
11BI	Aguamiel	<i>Leuconostoc mesenteroides mes./dext.</i>	98.7	<i>Leuconostoc citreum</i>	100	EU676342
16BI	Aguamiel	<i>Leuconostoc citreum</i>	85.5	<i>Leuconostoc citreum</i>	100	---
17BI	Aguamiel	Nd	---	<i>Acetobacter orientalis</i>	99	EU676343
18BI	Semilla	<i>Lactobacillus brevis</i>	86.9	<i>Lactobacillus sp.</i>	99	EU676344
20BI	Semilla	Nd	---	<i>Lactobacillus sp.</i>	99	---
30BI	Pulque	Nd	---	<i>Lactobacillus sp.</i>	99	EU676345
32BI	Pulque	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.9	<i>Leuconostoc lactis</i>	99	EU676346

nd= no determinada

IV. 4 Detección de ácidos orgánicos y etanol.

Los porcentajes de ácidos orgánicos y etanol que se detectaron en aguamiel, pulque y semilla se presentan en la tabla XXIV. El ácido láctico se detectó en todas las muestras estudiadas, mientras que el ácido acético solo se presentó en aguamiel y pulque. En pulque se detectó 6.6% de etanol y en semilla 3.2%.

Tabla XXIV.- Ácidos orgánicos y etanol detectados en aguamiel, pulque y semilla.

Componente	Aguamiel %	Pulque %	Semilla %
Acido láctico	0.08	0.1	0.04
Acido acético	0.07	0.03	---
Etanol	---	6.6	3.2

En el presente trabajo se realizó la identificación fenotípica y genotípica de levaduras y BAL aisladas de aguamiel, pulque y semilla. No se cuantificaron las ufc de BAL, pero de acuerdo con otros estudios estos microorganismos predominan ($8.0-15.0 \times 10^8$ ufc/ml) en el aguamiel y en las primeras fases de fermentación sobre las levaduras ($3.0-6.0 \times 10^6$ ufc/ml). Conforme avanza la fermentación la población de bacterias disminuye ($1.0-2.0 \times 10^8$ ufc/ml) mientras que la de las levaduras se incrementa ($2.5-3.0 \times 10^8$ ufc/ml) (Ruíz-Oronoz, 1953; Loyola-Montemayor, 1956). En este estudio el aguamiel joven presentó una cuenta total levaduras de 6.6×10^5 ufc/ml, y el aguamiel viejo de 4.0×10^3 ufc/ml, ya que el pH (6.6-7.5) que presentó este sustrato aún no es propicio para el óptimo crecimiento de estos microorganismos. En pulque y semilla la cuenta total de levaduras se incrementó a 5.3×10^8 y 7.2×10^8 ufc/ml, respectivamente. Esto probablemente se debió al incremento en la biomasa en las etapas iniciales de la fermentación, y a que la acidificación del sustrato^{2°} sustrato, debido a la fermentación láctica, favoreció el desarrollo de las levaduras.

La escasa carga de levaduras del aguamiel se pudo deber a factores fisicoquímicos (pH, temperatura) y climáticos (exceso de lluvia y frío), a la calidad del sustrato, es decir baja concentración de azúcares y de otros nutrientes que permiten el establecimiento y desarrollo de la microbiota; y a la presencia de compuestos tóxicos de origen vegetal o microbiano.

El único aislado de *C. lusitaniae* (7CI) se obtuvo del aguamiel. Esta especie fue aislada por primera vez en este sustrato por Estrada-Godina et al. (2001). Esta especie ha sido aislada de algunas cactáceas del sur de México, de agaves, de frutas y de mamíferos (Starmer et al. 2003). Forma parte de la comunidad de levaduras presente en las hojas y tejidos en descomposición de *A. tequilana* var. azul, pero no en las siguientes etapas de la elaboración del

tequila (Lachance, 1995). También ha sido aislada de la base de las hojas, de las piñas cocidas, del mosto (recién extraído y con pocas horas de fermentación) de henequén (*A. fourkroydes*) (Lappe et al. 2004), y del inóculo utilizado en la producción de mezcal de *A. salmiana* en San Luis Potosí (Escalante-Minakata et al. 2008). La cepa tipo con la que se comparó en la base de datos del CBS se aisló de la cáscara de cítricos y correspondió a un biotipo diferente el cual fermentó glucosa, fructosa y galactosa, lo que explica su presencia en aguamiel, sustrato en el que la glucosa y la fructosa son los azúcares más abundantes (Ortiz-Basurto et al. 2008). Presentó una tolerancia de 4% v/v de etanol, por lo que posee un poder alcohológico bajo, como se indica en la literatura (Margalith, 1981; Kunkee, 1984). Ello explica que sólo haya sido aislado en la etapa temprana de la fermentación del aguamiel. La máxima temperatura a la cual creció fue de 37°C, característica que le permite habitar en los tejidos en descomposición de agave y adaptarse a ambientes cálidos y secos.

Kluyveromyces marxianus fue aislada de las 3 muestras estudiadas y correspondieron a 7 biotipos diferentes. Se obtuvieron 14 aislados (9 de aguamiel, 3 de pulque y 2 de semilla) lo que corresponde al 70% del total de los aislados de levaduras obtenidos. La cepa tipo con la que se comparó en la base de datos del CBS fue aislada de yogurt. Esta especie está asociada a diversos sustratos lácteos, así como a vegetales encurtidos que han sido expuestos a fermentación láctica. Su existencia en pulque puede explicarse ya que esta bebida se obtiene por fermentación láctica-alcohólica-acética del aguamiel, y contiene una baja concentración de ácido láctico característica que se presenta en los encurtidos. Otros autores han aislado esta especie de aguamiel y de pulque (Lappe et al. 1989; Herrera y Calderón-Villagómez, 199X; Estrada-Godina et al., 2001); de las plantas, piñas cocidas, y en los mostos en diversas etapas de fermentación de *A. tequilana* var. azul y de *A. fourcroydes* (Lachance, 1995, Lappe et al. 2004; Pérez-Brito et al., 2007), y del inóculo para la elaboración de mezcal de *A. salmiana* (Escalante-Minakata et al. 2008). Es una especie con poder alcohológico variable, cuya tolerancia al etanol osciló

entre 5-7% v/v. Los aislados con mayor tolerancia (18Km y 20Km) presentaron ascas con ascosporas reniformes a diferencia de los aislados de *K. marxianus* encontrados por Pérez-Brito et al. (2007) que persistieron hasta el final de la fermentación de mostos de henequén los cuales presentaron ascosporas redondas. Es importante señalar que aquellos aislados que presentaron una tolerancia media y alta al etanol coexistieron tanto en el pulque como en la semilla con aislados de *S. cerevisiae* participando en etapas avanzadas de la fermentación. En lo que a su tolerancia a la temperatura se refiere los aislados estudiados crecieron a 45°C, con excepción de 9Km y 11Km cuya temperatura máxima de crecimiento fue de 37°C. En la literatura se registra que algunas cepas de *K. marxianus* toleran temperaturas mayores a 56°C, por lo que sería interesante determinar si los aislamientos que crecieron a 45°C son capaces de desarrollarse a temperaturas más altas (Pérez-Brito et al. 2007). Se pudo observar que entre mayor era la tolerancia al etanol la termo-tolerancia aumentaba, como fue encontrado por Fiore et al. (2005). Dichos autores señalan que probablemente las levaduras no *Saccharomyces* provenientes de agave pueden tener una estructura diferente en su membrana celular, lo que les permite tolerar altas concentraciones de etanol a temperaturas elevadas, por lo que sería deseable realizar estudios estructurales de la membrana celular de los aislados termo-tolerantes encontrados en el presente estudio.

Durante la primera etapa de fermentación las levaduras no *Saccharomyces* de los géneros *Candida*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Torulaspota* juegan un papel importante en la producción de componentes del sabor en vino y otras bebidas fermentadas (Fiore et al. 2005; Rojas et al. 2001). *K. marxianus* producen alcoholes y esteroides con aromas frutales en bebidas destiladas de agave (Wittmann et al. 2002; Escalante-Minakata, 2008), por lo que es posible que esta especie le confiera al pulque algunas de sus propiedades sensoriales. Otras especies de levaduras no *Saccharomyces* que se han aislado durante las primeras etapas de fermentación del aguamiel como: *Candida parapsilosis*, *Candida rugopelliculosa*, *K. apiculata*, *H. uvarum*, *Pichia carsoni*, *P. guillermondii*, *P.*

membranifaciens, y *T. delbrueckii* (Morton-Gómez, 1925; Ruiz Oronoz, 1953; Herrera y Ulloa, 1975; Lappe et al. 1989; Herrera y Calderón-Villagómez, 1991; Estrada-Godina et al. 2001) producen ésteres y alcoholes superiores por lo que al igual que *K. marxianus* contribuyan en el perfil sensorial del aguamiel joven y del pulque.

De los cuatro aislados de *S. cerevisiae* dos se aislaron de pulque y dos de semilla; y correspondieron a tres diferentes biotipos. Esta especie fue inicialmente aislada de pulque por Gaviño (1901) bajo el nombre de *Saccharomyces cerevisiae agavica*, después Ruíz-Oronoz (1936) la identificó como *Saccharomyces carbajali*, posteriormente Sánchez Marroquín (1977) estableció su sinonimia con *S. cerevisiae* y consideró a esta especie como la levadura más importante y esencial en la producción de pulque. Lappe et al. (1989), Herrera-Calderón-Villagómez (1991), Estrada-Godina et al. (2001) la aislaron de aguamiel y de pulque, distinguiendo 2 biotipos. Esta especie ha sido aislada de cerveza, vinos, frutos maduros y sus jugos, así como de los mostos recién extraídos y en todas las etapas de fermentación de bebidas destiladas de agave como tequila, mezcal y sotol (Lachance, 1995; Fiore et al. 2005). En su estudio sobre las comunidades de levaduras en la fermentación del tequila Lachance (1995) reconoció 4 biotipos de *S. cerevisiae*.

Los aislados 10Sc de pulque (biotipo 3, con maltosa -) y 12Sc de semilla (biotipo 2, maltosa +) presentaron la mayor tolerancia al etanol (9% v/v); los aislados 14Sc de pulque (biotipo 3) y 15Sc (biotipo 1) no asimilaron maltosa y su tolerancia a etanol fue menor. Estos datos son similares a los registrados por de Lachance (1995), quien señaló que las cepas de *S. cerevisiae* con mayor tolerancia al etanol (12% v/v) asimilaran la maltosa., y que aquellas que toleraban 9-11% v/v podían ser maltosa + o -. Las cepas de *S. cerevisiae* aisladas de pulque por Estrada-Godina et al. (2001) fueron más tolerantes al etanol (>10% v/v) que aquellas aisladas del aguamiel (10% v/v). Fiore et al. (2005) demostraron que los aislados de *S. cerevisiae* provenientes de agave eran más tolerantes al etanol que los provenientes de uva, lo que

probablemente se debe a la adaptación de las cepas al sustrato original del cual fueron aisladas. Los mostos fermentados de uva alcanzan un grado alcohólico de 4.5% y el pulque de 4 a 7%, y su temperatura de fermentación es de 26-29°C y de 30-37°C respectivamente, por lo que las levaduras de agave estaban mejor adaptadas a las condiciones en las que se realizaron los experimentos de tolerancia al etanol a 35°C. .. Existen factores que disminuyen esta tolerancia como altas temperaturas de fermentación, limitación de nutrientes y producción de metabolitos, e inhibición de la ATPasa en la membrana plasmática (Edwards et al. 1990; Rosa y Sa-Correia, 1992). La presencia de ácidos grasos insaturados, como el ácido oleico, en la estructura de la membrana celular juegan un papel importante en la tolerancia al etanol de *S. cerevisiae*, ya que disminuyen la fluidez de la membrana lo que contrarresta el flujo de etanol a través de ella (Kyung Man You et al. 2003).

Según la literatura *S. cerevisiae* muestra un crecimiento variable a 37°C; en el presente estudio sólo el aislado 14Sc creció a 45°C y su tolerancia fue 7% v/v de etanol, los aislados 10Sc y 12Sc crecieron a 37 y 30°C respectivamente y ambos presentaron la máxima tolerancia (9%v/v de etanol), y el aislado 15Sc presentó una temperatura máxima de crecimiento a 30°C y una tolerancia de 7% v/v. La alta tolerancia a la temperatura que mostraron estos aislados podría ser resultado de su adaptación a las condiciones climáticas (30-37°C) que prevalecen durante el día en la región del muestreo.

Saccharomyces cerevisiae produce terpenos, alcoholes superiores (alcohol isoamílico e isobutílico) y ésteres que influyen en el aroma del tequila y del vino (Pinal et al. 1997; Fiore et al. 2005; Orlic et al. 2007). Estos compuestos se han detectado en el pulque (Sánchez-Marroquín, 1977; Steinkraus, 1997) por lo que es probable que los aislados de *S. cerevisiae* influyan en las características aromáticas y sensoriales de la bebida.

Saccharomyces paradoxus se aisló únicamente de la semilla, y es registrada por primera vez para este sustrato. Esta especie ha sido aislada

frecuentemente de exudados de roble en Rusia y Holanda, de suelos ácidos en Dinamarca, suelos de Sudáfrica, de insectos, de mayonesa en descomposición, de uvas Chardonnay, y se considera que es un integrante de la comunidad de levaduras responsables de la fermentación natural del vino (Naumov, 1996; Barnett et al., 2000; Redžepović et al., 2002). Su estrecha analogía con *S. cerevisiae* en su secuencia de nucleótidos sustenta la hipótesis que *S. paradoxus* es el análogo natural de *S. cerevisiae*, ya que esta última se considera una especie domesticada que está presente en casi todos los procesos fermentativos en los que el hombre ha intervenido (Vaughan-Martini, 1989; Vaughan-Martini y Martini, 1987, 1998). La máxima temperatura de crecimiento de esta especie fue 35°C con una tolerancia al etanol del 9% v/v, lo que explica su presencia en la semilla.

Durante la elaboración de vinos Chardonnay *S. paradoxus* produce alcoholes superiores y componentes aromáticos como alcohol isoamílico, isobutanol, 2-fenil-etanol, hexanol, 1-propanol, acetato etílico, en menor cantidad en comparación con *S. cerevisiae*. Los vinos obtenidos en Croacia con cepas autóctonas de *S. paradoxus* son de igual o mejor calidad que los elaborados con cepas comerciales de *S. cerevisiae* (Orlic et al. 2007). En el caso del pulque *S. paradoxus* podría ser tan importante como *S. cerevisiae* en la fermentación del aguamiel, por lo que debería realizarse un estudio encaminado a la detección de esa especie en la materia prima, en los insectos que visitan la cavidad del agave, así como en las diversas fases de elaboración de la bebida.

Es importante señalar que durante este estudio varios aislados de *K. marxianus* y de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* coexistieron tanto en la fase final de la fermentación del pulque (2Km, 6Km, 17Km; 10Sc y 14Sc en pulque) como en semilla (3Km, 19Km y 8Sp, 12Sc y 15Sc), por lo que contrariamente a lo que se cita en la literatura las especies de *S. cerevisiae* no inhibieron el desarrollo de *K. marxianus* al final de la fermentación.

Las especies de BAL y bacterias acéticas identificadas en este trabajo son registradas por primera vez para aguamiel, pulque y semilla. Se obtuvieron seis aislados de *Lactobacillus*. de las tres muestras; los que se identificaron como: *L. paracasei* (1BI), *L. sanfranciscensis* (10BI), y *Lactobacillus sp.* (18BI y 20BI de semilla; 30BI de pulque) mostraron un 99% de similitud con un aislado de maíz ensilado (AF264701.2 GenBank), y el aislado 8BI de aguamiel presentó un 98% .con *L. mali* (AY681126.2 GenBank) aislada de vino (Rodas et al. 2005). Del género *Leuconostoc* se identificaron *L. citreum* (11BI y 16BI) en aguamiel y *L. lactis* (32BI) en pulque; del género *Acetobacter* únicamente se identifico *A. orientalis* (17BI) en aguamiel.

Lactobacillus paracasei es una de las BAL ampliamente utilizada como probiótico además posee la capacidad de fermentar inulina y oligofruktanos (Kaplan y Hutkins, 2003), mismos que se encuentran presentes en el aguamiel y pulque. Esta especie también ha sido aislada de vino (Rodas et al. 2005), y en quesos tradicionales de Marruecos, Serbia e Italia (Oquadghiri et al. 2005; Nikolic et al. 2008; Dolci et al. 2008). *L. sanfranciscensis* está involucrada en el proceso de fermentación de alimentos, y regularmente ha sido aislada de la masa ácida con la que se prepara el típico pan de San Francisco (Gobbetti, 1998; Hames y Hertel, 2006). Esta especie hidroliza maltosa aumentando la concentración de glucosa en el medio (Gobbetti, 1998).

Leuconostoc citreum y *L. lactis* en pulque son especies que producen dextranas, y probablemente como *L. mesenteroides* var. *mesenteroides* y *L. mesenteroides* var. *dextranicum* (Sánchez-Marroquín, 1977, Steinkraus, 1997) estén involucradas en la fermentación viscosa del pulque. *L. citreum* y *L. lactis* han sido aisladas de kimichi, queso tradicional de Marruecos (Oquadghiri et al. 2005) y de leches fermentadas tradicionales del sur de África y Egipto (Beukes et al. 2001; El-Baradei et al. 2008).

Todas las BAL identificadas en este trabajo son heterolácticas, que sintetizan diversos compuestos aromáticos que probablemente participan en el perfil sensorial del pulque.

Con respecto a los estudios químicos se puede mencionar que la concentración de ácido láctico detectado en aguamiel y pulque (<0.1%) es similar a la registrada por diversos autores (Morton-Gómez 1925; Loyola-Montemayor 1959; Sánchez-Marroquín 1977, 1979; norma oficial mexicana y NMX-V-037-1972). El grado alcohólico detectado en el pulque fue de 6.6%, lo que concuerda con lo señalado en la literatura. En semilla se detectó 0.04% de ácido láctico y 3.2% de etanol, cantidades que se encuentran por debajo de lo mínimo permitido por la norma NMX-V-022-1972 (0.40% de ácido láctico y 6% de etanol). Las bajas concentraciones de ambos productos en la semilla pudieron estar relacionadas con la edad de la misma (18 meses), con la calidad del aguamiel adicionado para aumentar el volumen y a las condiciones climáticas existentes en la zona.

A pesar que no se realizó un estudio de sucesión de levaduras y BAL durante la fermentación del aguamiel, se pudo observar la persistencia o el reemplazo de algunas especies, de los diversos grupos microbianos detectados en este estudio, durante todo el proceso de producción de pulque. Esto cuestiona la aseveración de que la fermentación del aguamiel se deba solo a la acción de: *L. mesenteroides* var. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* var. *dextranicum*, *Lactobacillus* spp., *Z. mobilis* subs. *mobilis* y *S. cerevisiae* como lo proponen Sánchez-Marroquín y colaboradores (Sánchez-Marroquín y Hope, 1953; Sánchez-Marroquín, 1962, 1967 y 1977) .

Es necesario realizar estudios microbianos durante todo el proceso de elaboración y fermentación de la bebida, utilizando técnicas microbiológicas dependientes e independientes del cultivo [electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) o electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE)] para tener un conocimiento integral de la microbiota total presente.

Ello con toda seguridad permitirá la identificación de nuevas especies tanto de bacterias como de levaduras, como fue encontrado por Escalante et al. (2004) en su estudio de la diversidad bacteriana en pulque mediante el análisis del gene 16S ADNr.

A medida que se conozca la función e interacción de los consorcios microbianos en la fermentación del aguamiel, se podrán elaborar inóculos que garanticen la obtención de una bebida estandarizada de buena calidad higiénica y con alto valor nutricional. Además al conocer las propiedades de los microorganismos podrá investigarse su posible aplicación en la elaboración de otras bebidas alcohólicas, así como en la obtención de compuestos con interés biotecnológico.

Capítulo VI**Literatura citada**

Backstrand, J. R., L. H. Allen, E. Martínez y G. Pelto. 2001. Maternal consumption of pulque, a traditional mexican alcoholic beverage: relationship to infant growth and development. *Public Health Nutrition*, 4(4): 883-891.

Barnett, J. A., R. W. Payne y D. Yarrow. 2000. *Yeast: Characteristics and identification*. University Press. Tercera edición. Cambridge, 1105pp.

Bautista-Justo, M., L. García-Oropeza , J. E. Barboza-Corona, L. A Parra-Negrete. 2001. El *Agave tequilana* weber y la producción de tequila. *Acta universitaria*. Universidad de Guanajuato. México, 11: 26-34

Benavente, T. 1963. *Historia de los indios de Nueva España*. Ed. Nacional. México, D. F., 295pp.

Beukes, E.M., B.H. Bester y J.F. Mostert. 2001. The microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, 63: 189-197.

Bruman, H. J. 2000. *Alcohol in Ancient Mexico*. The University of Utah Press, Salt Lake City, Utah, 224pp.

Cedeño, C. M. 1995. Tequila Production. *Critic. Rev. Biotech*, 15: 1-11.

Centraalbureau voor Schimmelculture (CBS), 2007. Base de datos para la identificación de levaduras, Holanda. Página web. <http://www.cbs.knaw.nl/>. Mayo 2007.

Cervantes, M. 2002. Los agaves. Página web: www.conafor.gob.mx/portal/docs/secciones/reforestacion/Fichas%20Tecnicas/Agave%20angustifolia.pdf

Chávez, A., H. Martínez, N. Guarneros, L. H. Allen y G. H. Pelto. 1998. Nutrition and psicomotor development during the first six months of life. *Salud Pública México*, 40(2): 111-118.

Clavijero, F. J. 1978. *Historia antigua de México*. Ed. Valle de México, México, D.F., 337pp.

Collado, E. 2001. Levaduras y la fermentación alcohólica. Página web: www.verema.net/opinamos/tribunal/articulos/levaduras02.asp. Enero 2007.

Cook, J. D., M. B. Reddy y R. F. Hurrell. 1995. The effect of red and white wines on non-heme-iron absorption in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61:800-804.

Cravioto, R. O., H. G. Massieu, J. Guzmán y J. Calvo de la Torre. 1951. Composición de alimentos mexicanos. *Ciencia, México*, 11: 129-156.

De la Cruz, M. y J. Badiano. 1964. *Libellus de medicinalibus indorum herbis*. Ed. IMSS, México, D.F. 211pp.

Del Razo. 2004. Página web: www.pulqueazteca.com. Febrero 2007.

Dixit, K. y D.N. Gandhi. 2006. Biotherapeutic properties of probiotic yeast *Saccharomyces* species in fermented dairy foods. *Dairy Science and Food Technology*. En línea: www.dairyscience.info/kalpna.htm. Junio 2008.

Dolci, P., V. Alessandria, G. Zeppa, K. Rantsiou y L. Cocolin. 2008. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25: 392-399.

Edwards, C. G., R. B. Beelman, C. E. Bartley y A. L. McConnell. 1990. Production of decanoic acids and other volatile compounds and the growth of yeasts and malolactic bacteria during vinification. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41: 48-56.

El-Baradei, G., A. Delacroix-Buchet y J.C. Ogier. 2008. Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 121: 295-301.

El empresario. 2008. Página web: www.elempresario.com.mx/casos/paginas/200817182821148.aspx. Enero 2008.

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

Escalante-Minakata, P., H. P. Blaschek, A. P. Barba de la Rosa, L. Santos y A. De León-Rodríguez. 2008. Identification of yeast and bacteria involved in the mezcal fermentation of *Agave salmiana*. *Letters in Applied Microbiology*, 1522: 1-5.

Essia Ngang, J. J., F. Wolniewicz, F. Letourneau y P. Villa. 1992. Stimulation of lactobacilli during alcoholic fermentation: action of sucrose hydrolysis by yeast. *Biotechnology Letters*, 14(8):741-746.

Estrada-Godina, A. R., A. E. Cruz-Guerrero, P. Lappe, M. Ulloa, M. García-Garibay y L. Gómez-Ruiz. 2001. Isolation and identification of killer yeasts from *Agave sap* (aguamiel) and pulque. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 557-560.

Fiore, C., J. Arrizon, A. Gschaedler, J. Flores y P. Romano. 2005. Comparison between yeasts from grape and agave musts for traits of technological interest. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21:1141-1147.

García-Mendoza, A. 1998. Con sabor a maguey: Guía de la colección nacional de Agaváceas y Nolináceas del Jardín Botánico, Instituto de Biología-Universidad Nacional Autónoma de México. Sistemas de Información Geográfica S. A. de C. V. México, D. F. 320pp.

Gaviño, A. 1901. Estudio higiénico bacteriológico del pulque. *Revista de Química y Anatomía Patológica Clínica de México*, 1(8): 246-251.

Gentry, H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. Tucson. 315pp.

Gobbetti, M. 1998. The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeast. *Food Science and Technology*, 9: 267-274.

Gobierno del Estado de Hidalgo y Museo Nacional de Culturas Populares. 1988. *El maguey: el árbol de las maravillas*. Instituto Nacional Indigenista, Secretaria de Educación Pública y Dirección General de Culturas Populares. México, D.F. 213pp.

Godoy, A., T. Herrera, y M. Ulloa. 2003. Más allá del pulque y el tepache. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Investigaciones Antropológicas. México, D.F. 125pp.

Gonçalves de Lima, O. 1978. *El maguey y el pulque en los códices mexicanos*. Fondo de Cultura Económica, México, D. F. 350pp.

Granados-Sánchez, D. 1993. *Los Agaves*. Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, México. 278pp.

Hall, T. (2007). BioEdit v 7.0.9.0 <http://www.mbio.nesu.edu/BioEdit/>. Septiembre 2007.

Hammes, W. P. y C. Hertel. 2006. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. *Prokaryotes*, 4:320-403

Harrigan, W. F. y M. E. McCane. 1976. *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*. Academia Press Inc. Londres. 760pp.

Herrera, T. y M. Ulloa. 1975. Reconsideraciones sobre dos trabajos anteriores para la identificación de *Kluyveromyces fragilis* y *Candida guilhermondii* en el pozol y de *Kloeckera apiculata* en el pulque. *Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología*, 9: 13-15.

Herrera, T. y A. Calderón-Villagómez. 1991. Yeast isolated from pulque, the traditional beverage of Mexico (natural or white pulque and oat cured pulque). *Revista Mexicana de Micología*, 7: 121-128.

Jay, J. M. 2002. *Microbiología moderna de los alimentos*. 4° ed. Acribia, Michigan. 345pp.

Kaplan, H. y W. Hutkins. 2003. Metabolism and fructooligosaccharides by *Lactobacillus paracasei* 1195. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4): 2217-2222.

Karovicôva, J. y Z. Kohajdová. 2003. Lactic acid-fermented vegetables juices. Palatable and wholesome foods. *Chemical Papers*, 59(2): 143-148.

Klaenhammer, T. R. 2000. Probiotic bacteria: today and tomorrow. *Journal of nutrition*, 130: 415S-416S.

Kunkee, R. E. 1984. Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiology*, 1: 315-332.

Kurtzman, C. P. y J. W. Fell. 1998. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 4th ed. Elsevier, Amsterdam. 1105pp.

Kurtzman, C. P. y C. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(4): 331-371.

Kyung Man You, C.L. Rosenfield y D. C. Knipple. 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(3): 1499-1503.

Lachance, M. A. 1995. Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68: 151-160.

Lachance, M. A., W. T. Starmer y H. J. Phaff. 1988. Identification of yeasts found in decaying cactus tissue. *Canadian Journal of Microbiology*, 34: 1025-1036.

Lappe, P., M. Ulloa y T. Herrera. 1989. Estudio de cinco especies de levaduras del pulque y comparación de la microbiota de esta bebida con las de otras semejantes del mundo. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica*, 50(1): 31-48.

Lappe, P. y M. Ulloa. 1993. Microbiología del pulque. En M. C. Wachter y P. Lappe (compiladoras). *Alimentos fermentados indígenas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.

Lappe, P., M. Ulloa, G. Arce-Rocha, M. Cáceres-Farfán, R. Tapia-Tussell, D. Pérez-Brito y A. Larqué. 2004. Isolation and identification of the mycobiota present in *Agave fourcroydes*. *Proceedings of the XI International Congress on Yeast, Yeast in science and technology the quest for sustainable development*, 15-20 agosto, Rio de Janeiro, Brasil.

Lappe, P., R. Moreno-Terrazas, T. Herrera, C. Wachter, F. Ruiz-Terán, M. Ulloa y A. B Lappe-Mansilla. 2006. Mexican Alcoholic Fermented Foods. En: Keith H. Steinkraus (ed). *Handbook of Indigenous Fermented Foods*, 3th ed. CRC Press, Boca Ratón, En prensa.

Lappe, P., R. Moreno-Terrazas, J. Arrizón, T. Herrera, A. García, A. Gschaedler. 2008. Yeast associated with the production of Mexican alcoholic and distilled *Agave* beverages. *FEMS Yeast Research*. En prensa.

Lappe, P. y R. Moreno-Terrazas. 2008. Pulque: bebida milenaria que persiste en la actualidad en: *Cultura etílica de México* (en prensa).

López, M. G. 1999. Tequila aroma. En: Shahidi. F. y Ho C-T (eds). *Flavor Chemistry of Ethnic Foods*. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York, 211-217 pp.

López, M. G. 2001. Una sinfonía de aromas. Avance y perspectiva. Volumen especial. *Biotechnología e ingeniería genética de plantas*. XX Aniversario de la Universidad de Irapuato, 20: 421-424.

López, M. G., N. A. Mancilla-Margali y G. Mendoza-Díaz. 2003. Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 51: 7835-7840.

Loyola-Montemayor, E. 1956. Industria del pulque. Departamento de Investigaciones industriales. Banco de México S.A. México D. F. 312pp.

Madigan, M. M., J. Martinko y J. Parker. 2004. Brock's Biology of Microorganisms. Pearson Prentice Hall. 10th ed. Illinois University, Carbondale. 754pp.

Mancilla-Margali, N. A. y M. G. López. 2006. Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyliirion* species. Journal of Agriculture Food Chemistry, 54: 7832-7839.

Margalith, P. Z. 1981. Flavor Microbiology. Charles C. Thomas, Springfield, IL. 431pp.

Martín del Campo, R. 1938. El pulque en el México precortesiano. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 9: 5-23.

Mas, A., M. J. Torija, G. Beltrán, M. Novo, N. Hierro, M. Poblet, N. Rozés y J. M. Guillamón. 2002. Selección de levaduras. Tecnología del vino. Universidad Rovira i Virgili. Terragona.

Massieu, H. G., R. O. Cravioto, G. Guzmán y B. H. Olivera. 1959. Contribución adicional al estudio de la composición de los alimentos mexicanos. Ciencia, México, 19: 53-66

Mesas, J. M. y M. T. Alegre. 1999. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. Ciencia y Tecnología Alimentaria, 2(4): 174-183

Morton-Gómez, M. 1925. Aprovechamiento industrial del maguey, México. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F.

Müller, V. 2001. Bacterial Fermentation. Encyclopedia of life sciences. John Wiley and Sons. Florida

Naumov, G. I. 1996. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. Journal of Industrial Microbiology, 17: 295-302.

Nelson, D. L. y M. M. Cox. 2000. Lehninger. Principles of Biochemistry. Worth Publisher, Tercera edición. New York., 1123pp.

Nikolic, M., A. Terzic-Vidojevic, B. Jovcic, J. Begovic, N. Golic y L. Topisirovic. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 162-170.

O'Donell, K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. En: D.R. Reynolds y J.W. Taylor (eds.). *The fungal holomorph: Mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. CAB International, Wallingford, UK.

Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M. y Belleville, M. P. 2008. Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Published on Web 04/23/2008.

Orlic, S., S. Redžepović, A. Jeromel, S. Herjavec y L. Iacumin. 2007. Influence of indigenous *Saccharomyces paradoxus* strains on Chardonnay wine fermentation aroma. *International Journal of Food Science and Technology*, 42: 95-101.

Ouadghiri, M., M. Amar, M. Vancanneyt y J. Swings. 2005. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters*, 251: 267-271.

Peana, A. T., M. D. L. Moretti, V. Manconi, G. Desole y D. Pippia. 1997. Antiinflammatory activity of aqueous extracts and steroidal saponins of *Agave americana*. *Planta Médica*, 63: 199-204.

Pérez-Brito, D., R. Tapia-Tussell, A. Quijano-Ramayo, A. Larqué-Saavedra y P. Lappe. 2007. Molecular characterization of *Kluyveromyces marxianus* strains isolated from *Agave fourcroydes* (Lem.) in Yucatan, México. *Molecular Biotechnology*, 37:181-186.

Phaff, H. J., M. W. Miller y E. M. Mrak. 1978. *The life of yeast*. Harvard University Press. 2nd ed. Cambridge, USA.

Pinal, L., M. Cedeño, H. Gutiérrez y J. Álvarez-Jacobs. 1997. Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. *Biotechnology Letters*, 19: 45-47.

Ramírez-Rancaño, M. 2000. Ignacio Torres Adalid y la industria pulquera. Instituto de Investigaciones Sociales. Universidad Nacional Autónoma de México, Plaza y Valdés, México, D.F., 254pp.

Ramírez, J. F., A. Sánchez-Marroquín, M. M. Alvarez y R. Valyasebi. 2002. Industrialization of Mexican Pulque. En: Steinkraus K. Industrialization of Indigenous fermented foods. Marcel Dekker. Segunda edición.

Redžepović, S., S. Orlić, S. Sikora, A. Majdak y I. S. Pretorius. 2002. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. Letters in Applied Microbiology, 35: 305-310.

Rodas, A. M., S. Ferrer y I. Pardo. 2005. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55: 197-207.

Romano, P., C. Fiore, M. Paraggio, M. Caruso y A. Capece. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. International Journal of Food Microbiology, 86: 169-180.

Rosa, M. F. y Sa-Correia. 1992. Etanol tolerante and activity of plasma membrana ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microbiology and Technology. 14(1): 23-27.

Ruíz-Oronoz, M. 1953. Estudios realizados en México sobre levaduras. IV Centenario de la Universidad Nacional Autónoma de México (1551-1951). Memoria del Congreso Científico Mexicano, Volumen 6, Ciencias Biológicas, 127-149.

Ruvalcaba-Mercado, J. 1983. El maguey manso. Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, México, 269pp.

Sánchez-Marroquín, A. 1962. Aspectos metabólicos de las levaduras del pulque. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, 23: 1-20.

Sánchez-Marroquín, A. 1967. Estudio sobre la microbiología del pulque. XX. Proceso industrial para la elaboración técnica de la bebida. Revista Latinoamericana de Microbiología y Parasitología, 9: 87-90.

Sánchez-Marroquín, A. 1977. Mexican pulque, a fermented drink from *Agave* juice. Symposium on Indigenous Fermented Foods. Bangkok, Thailandia.

Sánchez-Marroquín, A. y P. H. Hope. 1953. Agave juice fermentation and chemical composition studies of some species. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 1:246-249.

SECOFI (1972a) NMX-V-022-1972.Hidromiel. Normas Mexicanas, Dirección General de Nomas. Diario Oficial Septiembre 26, México D. F.

SECOFI (1972b) NMX-V-037-SECOFI-1972. Pulque manejado a granle. Norma Oficial Mexicana Dirección General de Normas. Diario Oficial Septiembre 26, México D. F.

Starmer, W. T., R. A. Schmedicke y M. A. Lachance. 2003. The origin of the cactus-yeast community. *FEMS Yeast Research*, 3: 441-448.

Steinkraus, K. 1997. Mexican pulque. En: *Handbook of Indigenous Fermented Food*. 2nd. Mardel Dekker, Nueva York. 451pp.

Stewart, G. 1983. Yeast as an industrial microorganism and as an experimental eukaryote. Labatt Brewing Company. Ontairo, Canada, 293pp.

Swings, S. J. y J. De Ley. 1977. The biology of *Zymomonas*. *Bacterial Review*, 41(1): 85-91.

Tapia-Tussell, R., P. Lappe, M. Ulloa, A. Quijano-Ramayo, M. Cáceres-Farfán, A. Larqué-Saavedra y D. Pérez-Brito. 2006. A rapid and simple method for DNA extraction from yeast and fungi isolated from *Agave fourcroydes*. *Molecular Biotechnology*, 33:67-70.

Vaughan-Martini, A. 1989. *Saccharomyces paradoxus*, a newly separed species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex based upon nDNA/nDNA homologues. *Systematic and Applied Microbiology*, 12: 119-122.

Vaughan-Martini, A. y A. Martini. 1987. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53: 77-84.

Vaughan-Martini, A. y A. Martín. 1998. *Saccharomyces* Meyen ex Reess. En: C. P. Kurtzman y J. W. Fell (eds.). *The Yeast, A taxonomic Study*, 4th ed. Elsevier Science, Amsterdam, 358-372 p.

Wang N. y P. S. Nobel. 1998. Phloem transport of fructans in the crassulacean acid metabolism species *Agave deserti*. *Plant Physiology*, 116: 709-714.

Watson, D. 1983. *Distilling yeast*. Chivas Brothers. Escocia, 121pp.

Wittmann, C., M. Hans y W. Bluemke. 2002. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 19: 1351-1363.

Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast. En: C. P. Kurtzman y J. W. Fell (eds.). *The Yeast a Taxonomic Study*. 4th ed. Elsevier. Amsterdam, 1015pp.

RESUMEN de la tesis de **Mildred Clohé Herrera Sólorzano**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Julio 2008.

IDENTIFICACIÓN POLIFÁSICA DE LEVADURAS Y BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE AGUAMIEL, PULQUE Y SEMILLA.

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Ester Lappe Oliveras
Director de Tesis

El pulque es una bebida alcohólica que se obtiene por fermentación del aguamiel o savia de diferentes especies de agaves o magueyes pulqueros. El presente estudio tuvo como objetivos el aislamiento e identificación de levaduras y bacterias ácido lácticas presentes en muestras de aguamiel, pulque y semilla y la determinación de la concentración de ácido láctico (AL), ácido acético (AAc) y etanol (Et) en las muestras estudiadas. Los aislados de levaduras se identificaron por sus características fenotípicas (morfofisiológicas) y genotípicas (secuencia de pares de bases del dominio D1/D2 del gene 26S ADNr), y las bacterias ácido lácticas por la secuenciación del gene 16S ADNr. En total se obtuvieron 20 aislados de levaduras y 10 de bacterias ácido lácticas, los que para ambos grupos microbianos se identificaron en 4 especies. En aguamiel se identificaron las levaduras: *Candida lusitanae* (1) y *Kluyveromyces marxianus* (9), y las bacterias: *Lactobacillus paracasei* (1), *Lactobacillus sanfranciscensis* (1), *Lactobacillus sp.* (1), *Leuconostoc citreum* (2) y *Acetobacter orientalis* (1). En pulque *K. marxianus* (3), *Saccharomyces cerevisiae* (2), *Lactobacillus sp.* (1) y *Leuconostoc lactis* (1). En la semilla *K. marxianus* (2), *S. cerevisiae* (2), *S. paradoxus* (1) y *Lactobacillus sp.* (2). *K. marxianus* se aisló de las 3 muestras estudiadas y correspondió al 70% del total de los aislados, fue la especie más termo-tolerante (45°C), y toleró de 5-7% v/v de etanol. *S. cerevisiae* y *S. paradoxus* presentaron la mayor tolerancia al etanol (9%v/v). Las especies de *Lactobacillus* fueron las más abundantes de las bacterias (60%). *C. lusitanae*, *K. marxianus* y *S. cerevisiae* ya habían sido encontradas en aguamiel y en pulque, mientras que *S. paradoxus* es por primera vez aislada en esta bebida. En lo que respecta a las especies de bacterias ácido lácticas estas son identificadas por primera vez en los sustratos estudiados. En aguamiel se obtuvo 0.08% de AL y 0.07% de AAc; en pulque: 0.1% AL, 0.03% AAc y 6.6% de Et y en semilla: 0.04% de AL y 3.2% de Et.

Palabras clave: aguamiel, pulque, semilla, levaduras, bacterias ácido lácticas

ABSTRACT of the thesis presented by **Mildred Clohé Herrera Sólorzano** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, Mexico August 2008.

POLYPHASIC IDENTIFICATION OF YEAST AND LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM AGAVE SAP, PULQUE AND PULQUE STARTER

Pulque is an alcoholic beverage produced by fermentation of the mead or agave sap from several agave species or *magueys pulqueros*. The aimed of this study was the isolation and identification of yeast and lactic acid bacteria, as well as the quantification of lactic acid (AL), acetic acid (AAC) and ethanol (Et) present in agave sap, pulque and pulque starter. The yeast isolates were identified by phenotypic (morpho-physiological tests) and genotypic characteristics (sequence of the D1/D2 domain of 26S gene rDNA), and lactic acid bacteria by gene sequencing 16S rDNA. Altogether 20 yeast strains and 10 lactic acid bacteria strains were isolated. The species identified were: In agave sap the yeasts *Candida lusitanae* (1) y *Kluyveromyces marxianus* (9), and the bacteria *Lactobacillus paracasei* (1), *Lactobacillus sanfranciscensis* (1), *Lactobacillus sp.* (1), *Leuconostoc citreum* (2) and *Acetobacter orientalis* (1); in pulque *K. marxianus* (3), *Saccharomyces cerevisiae* (2), *Lactobacillus sp.* (1) and *Leuconostoc lactis* (1); and in the starter *K. marxianus* (2), *S. cerevisiae* (2), *S. paradoxus* (1) and *Lactobacillus sp.* (2). *K. marxianus* was isolated from all samples studied and represented the 70% of the total. All isolates were thermophilic growing at 45° C, and tolerated 5-7% v/v ethanol. *S. cerevisiae* and *S. paradoxus* presented the highest ethanol tolerance (9% v/v), and the maximum growth temperature was 37-45° and 30°C, respectively. The most abundant bacteria were *Lactobacillus* species (60%). *C. lusitanae*, *K. marxianus* and *S. cerevisiae* had previously been reported in agave sap and pulque., while *S. paradoxus*, all lactic acid bacteria are reported for the first time in pulque, as well as *Acetobacter orientalis* in agave sap. The concentrations of organic acids and ethanol were: in agave sap 0.08% AL and 0.07% AAC; in pulque 0.1% AL, 0.03% AAC and 6.6% Et; and in agave starter: 0.04% AL and 3.2% Et.

Keywords: agave sap, pulque, agave starter, yeast, lactic acid bacteria

Dedicatorias

A las cuatro personas más importantes en mi vida, mi mamá Areli, mi papá Guillermo, mi hermano Dafny y mi novio Roberto, por su amor, cariño, comprensión y apoyo incondicional.

A mis tíos y tías Alicia, Aarón, Alice y Roberto por su cariño y apoyo en los momentos más difíciles.

A toda mi familia que siempre me ha apoyado en todos los proyectos de mi vida.

Agradecimientos

A la Dra. Patricia Ester Lappe Oliveras por su asesoría, apoyo, confianza y dirección de este trabajo.

Al comité integrado por el Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro, Dr. Marcial Leonardo Lizárraga Partida y el Dr. Jaime Färber Lorda por la revisión de este trabajo.

A la Dra. Meritxell Riquelme Pérez por su apoyo en la culminación de este trabajo.

Al Dr. Facundo Márquez Rocha por las muestras proporcionadas de aguamiel, pulque y semilla.

A la Dra. Carmen Wachter Rodarte por su asesoría y por permitirme trabajar en el Laboratorio de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México para realizar el aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas, así como en la revisión de este trabajo.

A la Biol. Teresa Flores y a la Dra. Gloria Díaz por su apoyo y enseñanza en el aislamiento e identificación de las bacterias ácido lácticas.

A la Dra. Laura Márquez Valdelamar por su valiosa participación y enseñanza en la secuenciación de las levaduras y bacterias ácido lácticas.

Al Dr. Rubén Moreno Terrazas de la Universidad Iberoamericana por su apoyo en la detección los de ácidos orgánicos.

Al Dr. Teófilo Herrera por el apoyo y revisión de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio de micología: Biol. Adriana Espino del Castillo, Biol. Concepción León Cano, Biol. Victor y al Biol. Samuel Aguilar Ogario por su apoyo y amistad incondicional.

A la familia Espino del Castillo por abrirme las puertas de su casa y por apoyarme en la culminación de este trabajo.

A todos mis compañeros de maestría y de laboratorio Michelle, Johana, Ricardo, Omar, Tere, Beto, Sandra y Marisol por su amistad, apoyo y por los gratos momentos que compartimos.

CONTENIDO

	Página
Resumen español	i
Resumen inglés	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Tablas	viii
Capítulo I. Introducción	1
1.1. Historia del pulque.....	1
1.2. El agave.....	2
1.2.1. El agave pulquero.....	3
1.2.2. Azúcares presentes en los agaves pulqueros.....	4
1.3. Elaboración del pulque.....	4
1.4. Industrialización del pulque.....	6
1.5. Composición química del aguamiel y pulque.....	7
1.5.1. Características del pulque elaborado en planta piloto.....	10
1.6. Valor nutricional del aguamiel y del pulque.....	11
1.7. Propiedades terapéuticas.....	13
1.8. Concepto de levaduras.....	13
1.8.1. Metabolismo.....	14
1.8.2. Macro y micromorfología.....	14
1.8.3. Fisiología.....	15
1.8.4. Reproducción.....	15
1.8.5. Hábitat.....	15
1.9. Concepto de bacterias ácido lácticas.....	16
1.9.1. Fisiología.....	16
1.9.2. Hábitat.....	16
1.10. Fermentación en levaduras y BAL.....	17
1.10.1. Fermentación alcohólica.....	17
1.11. Tolerancia al etanol en levaduras.....	20
1.12. Fermentación ácido láctica.....	21
1.13. Formación de componentes del sabor.....	23
1.14. Estimulación de las BAL por las levaduras en la fermentación alcohólica.....	25

CONTENIDO (continuación)

	Página
I.15. Efectos benéficos de las levaduras y las BAL en los alimentos...	25
I.16. Objetivos.....	26
I.16.1. Objetivo general.....	26
I.16.2. Objetivos específicos.....	26
Capítulo II. Antecedentes.....	27
II.1. Microbiología del pulque.....	27
Capítulo III. Materiales y métodos.....	32
III.1. Muestreo.....	32
III.2. Aislamiento de las levaduras y obtención de cultivos puros.....	33
III.3. Identificación morfofisiológica (tradicional) de las levaduras.....	33
III.4. Identificación genotípica de las levaduras.....	34
III.4.1. Extracción del ADN genómico, amplificación del dominio D1/D2 del gene 26S ADNr.....	34
III.4.2. Purificación de los productos de PCR.....	36
III.4.3. Reacción de secuenciación y análisis de las secuencias	36
III.5. Tolerancia al etanol.....	37
III.6. Aislamiento de las BAL.....	37
III.7. Identificación morfo-fisiológica de las BAL.....	38
III.8. Identificación genotípica de las BAL.....	38
III.8.1. Extracción de ADN.....	38
III.8.2. Reacción de amplificación del gene 16S ADNr y purificación.....	39
III.8.3. Reacción de secuenciación y análisis de secuencias.....	40
III.9. Mantenimiento de cultivos puros en refrigeración y ultrarefrigeración.....	40
III.9.1. Conservación de levaduras.....	40
III.9.2. Conservación de BAL.....	40
III.10. Detección de ácidos orgánicos y etanol.....	41
Capítulo IV. Resultados.....	42
IV.1. Aislamiento e identificación de levaduras.....	42
IV.2. Tolerancia al etanol.....	48
IV.3. Aislamiento e identificación de las BAL.....	50
IV.4. Detección de ácidos orgánicos y etanol.....	52
Capítulo V. Discusión.....	53
Capítulo VI. Literatura citada.....	62

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>		Página
1	Transporte de los azúcares por <i>Saccharomyces</i> y especies relacionadas.	18
2	Ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). a) reacciones por las cuales la molécula de glucosa se metaboliza en 2 moléculas de piruvato. b) continuación de la ruta de EM en medio anaerobio lo cual lleva a la fermentación alcohólica en levaduras, hongos y algunas bacterias.	19
3	Rutas metabólicas para la producción de ácido láctico en bacterias. a) Reducción del piruvato a ácido láctico en las BAL homofermentativas. b) Ruta de las pentosas fosfato utilizado por las BAL heterofermentativas para metabolizar la glucosa en ácido láctico y etanol.	22
4	Esquema general de la formación de los principales componentes volátiles por <i>Saccharomyces</i> spp.	24
5	Lugar en donde se almacena el pulque (tanque azul) y semilla (tanque verde), ambos expuestos al ambiente.	32

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Composición química del aguamiel.	8
II	Clasificación y especificaciones del aguamiel según la norma oficial mexicana NMX-V-022-1972 de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.	8
III	Composición química de diferentes muestras de pulque	9
IV	Clasificación y especificaciones del pulque según la norma oficial mexicana NMX-V-037-1972 de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.	9
V	Cambios ocurridos durante la fermentación del aguamiel pasteurizado e inoculado con cultivos puros de bacterias y levaduras	10
VI	Comparación de las propiedades químicas del pulque tradicional y del pulque de planta piloto.	11
VII	Contenido de vitaminas y minerales en pulque estudiado por diferentes autores.	12
VIII	Contenido de aminoácidos en aguamiel, pulque tradicional, pulque elaborado en planta piloto y pulque industrializado	12
IX	Componentes volátiles en pulque	24
X	Estudios microbiológicos realizados en aguamiel y pulque	29
XI	Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas consideradas para la identificación de las levaduras.	35
XII	Reactivos y cantidades utilizados en la reacción de amplificación PCR del gene 26S ADNr.	36
XIII	Programa de PCR para amplificar el dominio D1/D2 del gene 26S ADNr.	36
XIV	Programa para la reacción de secuenciación.	37

LISTA DE TABLAS (Continuación)

Tabla		Página
XV	Reactivos y cantidades utilizados en la reacción de amplificación de PCR del gene 16S ADNr	39
XVI	Programa de PCR para amplificar el gene 16s del ADNr.	40
XVII	Unidades formadoras de colonias (ufc/ml) de levaduras obtenidas en aguamiel joven, aguamiel viejo, pulque y semilla.	42
XVIII	Resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas consideradas para la identificación de las levaduras.	43
XIX	Identificación fenotípica y genotípica de los aislados de levaduras.	46
XX	Características de los biotipos de <i>K. marxianus</i>	47
XXI	Resultados de la tolerancia al etanol.	49
XXII	Características macro y micromorfológicas de los 10 aislados de bacterias lácticas.	51
XXIII	Resultados de la identificación de los 10 aislados de bacterias lácticas.	51

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGIA MARINA**

**IDENTIFICACIÓN POLIFÁSICA DE LEVADURAS Y BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS AISLADAS DE AGUAMIEL, PULQUE Y SEMILLA.**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

MILDRED CLOHÉ HERRERA SOLÓRZANO

Ensenada, Baja California, México, Agosto del 2008.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Micología del Instituto de Biología y en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos de la Facultad de Química, ambos de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección de la Dra. Patricia Ester Lappe Oliveras, con el apoyo del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) y financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el número de beca 201481.