



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

**“ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LA CINÉTICA DE
FERMENTACIÓN POR LOTES DE AGUAMIEL (*Agave salmiana*)”**

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

HERNÁNDEZ CHAGOLLA PEDRO

ASESOR: DR. JORGE YÁÑEZ FERNÁNDEZ

México, D. F. Mayo de 2009.



AGRADECIMIENTOS:

A DIOS POR QUE ME HA DEJADO CUMPLIR UNA DE MIS METAS Y POR TODO LO QUE HE APRENDIDO DE LA VIDA HASTA HOY.

A MIS PADRES GLORIA Y PEDRO POR SU APOYO INCONDICIONAL Y HABER CONFIADO EN MI.

A ISABEL Y PABLO, MIS HERMANOS Y A MIS DEMÁS FAMILIARES QUE ESTUVIERON A MI LADO EN TODO ESTE TIEMPO.

A TODOS MIS AMIGOS, COMPAÑEROS Y PROFESORES QUE COMPARTIERON UNA AULA DE CLASE Y QUE DIRECTA O INDIRECTAMENTE LES APRENDÍ ALGO DURANTE ESTOS CUATRO AÑOS.

A TODOS AQUELLOS CON LOS QUE COMPARTÍ MOMENTOS DE FELICIDAD, RISAS Y ENOJOS, PARA LOS QUE PENSARON QUE NO SE PODÍA Y PARA LOS QUE SIEMPRE TUVIERON CONFIANZA EN ESTE SUEÑO QUE HOY CUMPLIMOS.

POR ESTO Y POR LO OTRO... A LOS QUE ESTÁN Y A LOS QUE FALTARON... POR LAS QUE FUERON Y LAS QUE VIENEN... SÓLO ME QUEDA DECIRLES ¡SALUD!...

En memoria de Betito.

PEDRO



SECRETARÍA
DE
EDUCACIÓN PÚBLICA

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA



México., D. F., a 31 de octubre de 2008.
Of. No. SA-UPIBI-1104/08

HERNANDEZ CHAGOLLA PEDRO
7º SEMESTRE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA EN ALIMENTOS
Presente.

Comunico a usted, que como resultado de la evaluación del Comité de Proyecto Terminal, con esta fecha queda registrado su proyecto terminal en la modalidad de "PROYECTO DE INVESTIGACION" denominada "ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LA CINÉTICA DE FERMENTACIÓN POR LOTES DE AGUAMIEL (*Agave salmiana*)" bajo la dirección interna Dr. Jorge Yañez Fernandez.

De cumplir con las condiciones que abajo se indican, será acreditada la opción curricular de titulación. Asimismo me permito recordarle que el trabajo experimental deberá concluir en el octavo semestre y entregar el informe técnico final, de conformidad con los lineamientos que para tal fin establezca el Comité mencionado.

CONDICIONES

- 97. Permanecer en la misma opción y actividad en el Proyecto Terminal I, II, III.
- 98. Obtener una calificación igual o superior a 8.0 en Proyecto Terminal I, Proyecto Terminal II y Proyecto Terminal III.
- 99. Cumplir con el 90% de asistencia a las actividades asignadas.
- 100. Cumplir con los demás requisitos que se fijan en el programa de estudios de la asignatura.

ATENTAMENTE.
"LA TÉCNICA AL SERVICIO DE LA PATRIA"

ING. YESICA MA. DOMÍNGUEZ GALICIA
SUBDIRECTORA ACADÉMICA.



INSTITUTO POLITÉCNICO
UNIDAD PROFESIONAL
INTERDISCIPLINARIA DE
BIOTECNOLOGÍA
DIRECCIÓN ACADÉMICA

c.c.p. Departamento de Control Escolar.



ÍNDICE TEMÁTICO:

AGRADECIMIENTOS	ii
OFICIO DE ACEPTACIÓN	iii
ÍNDICE TEMÁTICO	iv
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	vi
RESUMEN.	viii
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. El maguey	1
1.1.1. Nombre científico	2
1.2. El aguamiel	3
1.2.1. Especificaciones	4
1.3. El pulque	4
1.4. Viscosidad característica del pulque	5
1.4.1. Exopolisacáridos bacterianos	5
1.4.1.1. Cápsulas y limos	6
1.5. Proceso de fermentación del aguamiel	7
1.5.1. Fermentación alcohólica	8
1.5.2. Fermentación láctica	10
1.6. Bacterias responsables de la fermentación	11
1.6.1. Bacterias mesofílicas aeróbias	12
1.6.2. Bacterias ácido lácticas	12
1.6.2.1. <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	13



1.6.3. Levaduras	14
1.6.3.1. Clasificación e identificación de las levaduras	15
1.6.4. <i>Zymomonas</i>	16
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. OBJETIVOS.	17
3.1. Objetivo general	17
3.2. Objetivos particulares	17
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	18
4.1. Obtención de las muestras	19
4.2. Caracterización de la materia prima	19
4.3. Aislamiento de microorganismos y determinaciones microbiológicas	19
4.4. Cinética microbiana	20
4.5. Determinación de densidad relativa	20
4.6. Determinación de °Brix	21
4.7. Determinación de pH	22
4.8. Determinación de acidez total	23
4.9. Determinación de extracto seco (sólidos totales) y cenizas	23
4.10. Determinación de proteínas en aguamiel	23
4.11. Extracción del polisacárido	24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	26
6. CONCLUSIONES.	39
7. RECOMENDACIONES.	39
8. REFERENCIAS.	40



ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS:

FIGURA 1. <i>Agave salmiana</i> . -----	2
FIGURA 2. Maguey raspado-----	3
TABLA 1. Especificaciones físicas y químicas del aguamiel -----	4
FIGURA 3. Estructura química del dextrano -----	7
FIGURA 4. Ruta metabólica de las levaduras en la fermentación -----	9
FIGURA 5. Ruta metabólica de las bacterias del ácido láctico-----	11
FIGURA 6. Imagen microscópica de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> -----	14
FIGURA 7. Secuencia experimental -----	18
TABLA 2. Conteo de microorganismos en el aguamiel-----	26
FIGURA 7. Bacterias ácido lácticas en agar APT-----	26
FIGURA 8. Levaduras en agar PDA -----	26
TABLA 3. Descripción morfológica de los microorganismos presentes en el aguamiel--	27
TABLA 4. Propiedades fisicoquímicas determinadas al aguamiel-----	28
TABLA 5. Resultados obtenidos para muestras de aguamiel-----	30
FIGURA 8. Comparativo entre los distintos parámetros de 3 muestras de aguamiel-----	31
TABLA 6. Incremento de la viscosidad en distintos lotes de aguamiel -----	31
TABLA 7. Resultados obtenidos para 3 muestras de aguamiel estéril inoculado con el microorganismo aislado-----	32
FIGURA 9. Variación del pH con respecto al tiempo -----	33
FIGURA 10. Variación de °Bx con respecto al tiempo-----	34
FIGURA 11. Variación de la densidad relativa con respecto al tiempo -----	35
FIGURA 12. Variación de la viscosidad con respecto al tiempo-----	36



FIGURA 13. Cinética de crecimiento microbiano -----	37
FIGURA 14. Aguamiel estéril -----	37
FIGURA 15. Aguamiel fermentado -----	37
TABLA 8. Rendimiento -----	38
FIGURA 16 a. Polisacárido precipitado -----	38
FIGURA 16 b. Polisacárido precipitado -----	38
FIGURA 17. Polisacárido seco -----	38



“ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LA CINÉTICA DE FERMENTACIÓN POR LOTES DE AGUAMIEL (*Agave salmiana*)”

RESUMEN:

En este estudio, se llevó a cabo la caracterización las bacterias que intervienen durante la fermentación de pulque, una bebida alcohólica tradicional proveniente del maguey. El trabajo incluyó la extracción de la savia del maguey (el aguamiel) que se utilizó como sustrato para el aislamiento de bacterias ácido-lácticas, mesofílicas aerobias y levaduras.

El aguamiel; es un líquido blancuzco, ligeramente turbio, de olor a maguey y sabor dulce que se obtiene después de raspar la copa o cajete del maguey pulquero y constituye el sustrato fermentable para obtener el pulque (Norma Técnica Estatal NTE-SAGEH-001/2006).

El pulque, es una bebida de color blanco, que contiene alcohol con un promedio de 4.26%, no clarificada y de consistencia hilante, resultante de la fermentación del aguamiel obtenido del maguey pulquero (Norma Técnica Estatal NTE-SAGEH-001/2006).

La fermentación del aguamiel la llevan a cabo microorganismos como *Lactobacillus acidophilus*, α -*Proteobacteria*, *Acetobacter malorum* y *Zymomonas mobilis* los cuales metabolizan la glucosa y sacarosa, abundantes en el aguamiel, produciendo alcohol etílico y anhídrido carbónico (Escalante, Giles, Hernández, Córdova, López, Gosset & Bolívar 2008).



1. INTRODUCCIÓN.

La vida del ser humano ligada al maguey data de más de 10,000 años. Si bien no se sabe con exactitud de donde surge esta planta los científicos han determinado la región de Mesoamérica como la cuna del maguey, en especial la meseta del Anáhuac.

El maguey se utilizó durante mucho tiempo como material de construcción de chozas, como alimento para el hombre y el ganado, como recipiente para bebidas y alimentos, como combustible, pegamento y papel, como abono orgánico, sin olvidar su uso en la medicina tradicional como analgésico cicatrizante y desinflamatorio y finalmente como un don divino por lo cual nuestros antepasados lo adoraron. Por todo ello el maguey, junto con el maíz y el frijol, participan en la consolidación de varias culturas importantes en América Latina.

El maguey se raspa diariamente para producir aguamiel, una vez que los magueyes comienzan a producir aguamiel, entonces se prepara la barrica para la semilla del pulque.

Durante la conversión de aguamiel a pulque se lleva a cabo la síntesis de un polisacárido (exopolisacárido) de origen microbiano que proporciona la viscosidad característica al pulque.

1.1. El maguey:

Es una planta oriunda de México que pertenece a las Amarilidáceas y al género de los Agaves. De las casi doscientas especies conocidas del género *Agave*, sólo algunas producen aguamiel para la obtención de pulque, *Agave salmiana* Otto ex Salm, *A. mapisaga* Trel, *A. atrovirens* Kart ex Salm, *A. ferox* Koch, *A. hookeri* Jacobi, *A. americana* L. De éstas el maguey manso (*A. atrovirens*) es la mas importante de las especies pulqueras (García, Quintero & López 2005; Hinke, N. 2007).



1.1.1. Nombre científico.

Agave salmiana. Perteneciente a la familia *Agavaceae*, es una especie robusta, monocotiledónea, mediana a grande, presenta un tallo pequeño a grueso, con raíz fibrosa revestida de escamas, en general forma rosetas de 1.5 – 2 m de alto y con el doble de ancho, su roseta mide de 80 - 120 cm de grosor, son carnosas y macizas, verdes a grisáceas, profundamente convexas en la base, cóncavas hacia arriba, con espina terminal pungente de aproximadamente 5 - 8.5 cm de largo y con abundantes espinas marginales; son largas, acanaladas, simples, enteras, más o menos lanceoladas, con el ápice agudo de color verde oscuro; la longitud de las hojas es según variedades; la prefoliación es central, la yema central alcanza casi toda la longitud de la planta; las yemas laterales nacen cerca del suelo; la inflorescencia es paniculada, robusta, de 6 - 8 m de altura, con 15 – 24 pedúnculos laterales; el escapo floral con brácteas carnosas y suculentas (Guillot, O. D. & Van Der Meer, P. 2008; Cortés, Z. L. & Basurto, P. F. 2005).

Los magueyes se reproducen principalmente, por los hijuelos que se desarrollan en la base del tallo de la planta madre, o bien por las semillas que produce la floración; ésta, que ocurre solamente una vez en la vida de un maguey y es el irremediable anuncio de su muerte (Guel, L. J. M. & Rodríguez, L. M. 2000).



FIGURA 1. *Agave salmiana*.



1.2. El aguamiel:

Es un líquido blancuzco, ligeramente turbio, de olor a maguey y sabor dulce (7-14° Baumé) que se obtiene después de raspar la copa o cajete del maguey pulquero y además de ser rico en carbohidratos y proteínas constituye el sustrato fermentable para obtener el pulque.

El aguamiel presenta un pH promedio cercano a la neutralidad (6.8) con un porcentaje de humedad elevado (86%) y una proporción de sólidos solubles de 10.85 °Brix. El contenido de proteína soluble es de 5.3%. La sacarosa es el azúcar que está presente en mayor proporción, aunque hay otros polisacáridos compuestos por glucosa y fructosa como los oligofruetosacáridos y polifruetosacáridos (Norma Técnica Estatal NTE-SAGEH-001/2006; Flores, Mora & Romero 2008).

La cantidad de aguamiel que producen los magueyes varía de una planta a otra, y también va cambiando a lo largo de la explotación. Durante los primeros días la producción es escasa, pero va aumentando hasta llegar a alrededor de 5 litros al día; después se inicia un descenso en la cantidad de líquido hasta que la planta muere. El periodo productivo dura entre noventa y ciento veinte días. Durante este tiempo se puede obtener de cada maguey entre 270 y 420 litros de aguamiel (Hinke, N. 2007)



FIGURA 2. Maguey raspado.



1.2.1. Especificaciones.

Según la Norma Mexicana NMX-V-022-1972, el aguamiel se clasifica en dos tipos, con un solo grado de calidad los cuales son el tipo I y el tipo II, cuyas especificaciones se indican en la TABLA1.

TABLA 1. Especificaciones físicas y químicas del aguamiel:

ESPECIFICACIONES	TIPO I		TIPO II
	MÍNIMO	MÁXIMO	MENOR DE:
pH	6.6	7.5	4.5
Densidad grados Baumé (Be)	5	7	4.5
Índice de refracción con el refractómetro de inmersión a 20°C	59	100	27
Sólidos totales g/100 ml	13	17	7
Azúcares reductores totales (en glucosa) g/100 ml	8	12	6
Azúcares reductores directos (en glucosa) g/100 ml	2	3	3
Gomas (en glucosa) g/100 ml	2	6	0.20
Proteínas mg/100 ml	300	600	100
Cenizas mg/100 ml	300	430	180
	NO MAYOR DE:		
Acidez mg/100 ml (como ácido láctico)	0.90	1.03	4.00

1.3. El pulque:

Es una bebida alcohólica tradicional de color blanco, que contiene alcohol con un promedio de 4.26%, no destilada ni clarificada y de consistencia hilante, resultante de la fermentación de la savia conocida como aguamiel que se extrae de varias especies de maguey pulquero como el *Agave salmiana* (Norma Técnica Estatal NTE-SAGEH-001/2006).

Esta bebida se produce actualmente y se consume principalmente en los estados centrales de México. Para su producción, el aguamiel fresco reunido se transporta a barriles grandes abiertos dónde tiene lugar la fermentación. El proceso se acelera por la adición de una porción



de pulque previamente producido y el tiempo de fermentación varía de unas horas hasta una noche (Escalante, A., et al. 2008).

La síntesis y el volumen del alcohol son los parámetros principales que determinan el grado de fermentación. El proceso es estático y se realiza bajo condiciones no asépticas; por consiguiente, las poblaciones de microorganismos involucradas en la fermentación se obtienen naturalmente durante la acumulación de aguamiel en el maguey y que se incorporan durante la recolección, transporte, inoculación y manipulación (Escalante, A., et al. 2008).

1.4. Viscosidad característica del pulque:

El desarrollo de viscosidad se debe a la formación de un exopolisacárido bacteriano (EPS) constituido fundamentalmente de unidades de azúcar, que es producido por diversos microorganismos (García, Monteoliva & Ramos. 2002; Baselga, R. & Albizu, I. 2006).

1.4.1. Exopolisacáridos bacterianos:

Los exopolisacáridos bacterianos son biopolímeros constituidos fundamentalmente por unidades glucídicas, producidos por diversos microorganismos tales como *Leuconostoc mesenteroides*, *Acetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras; se localizan en el exterior de la célula microbiana (García, R. R., et al. 2002; Schlegel, H. G. 1997).

Desde el punto de vista de la biosíntesis de los exopolisacáridos se pueden diferenciar dos mecanismos: 1. Los dextranos y los levanos se forman a partir de disacáridos mediante enzimas extracelulares. 2. La composición de la mayoría de los exopolisacáridos es independiente del sustrato de las células (Schlegel, H. G. 1997).



Dentro del potencial biotecnológico de estos polímeros se encuentra su uso como espesantes y gelificantes por su propiedad de formar líquidos espesos con el agua, la leche o cualquier alimento que contenga agua. Se agrupan así dentro de los denominados hidrocoloides (García, R. R, *et al.* 2002).

Cápsulas y limos:

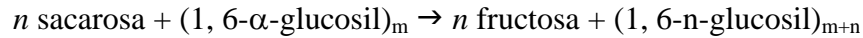
Sobre las paredes celulares de muchas bacterias se depositan capas de un material muy rico en agua: cápsulas y limos. A pesar que estas capas no son vitales para las bacterias, el disponer de una cápsula hace que algunas bacterias patógenas sean resistentes a la fagocitosis e incrementa su virulencia (Schlegel, H. G. 1997).

Cápsulas. La mayoría de las cápsulas están compuestas por polisacáridos (*Streptococcus mtzans*, *Streptococcus salivarius*, *Xanthomonas*, corinebacterias) que contienen, además de glucosa: aminoazúcares, ramnosa, ácido 2-ceto-3-desoxigalactónico, ácidos urónicos de los azúcares y ácidos orgánicos como el pirúvico y el acético. Las cápsulas de algunas especies de *Bacillus* (*B. anhracis*, *B. subtilis*) son de polipéptidos, en primer lugar de ácido poliglutámico (Schlegel, H. G. 1997).

Limos. Muchas sustancias capsulares se ceden al entorno en forma de limos. Ocasionalmente las cápsulas pueden separarse de la superficie celular por agitación u homogeneización de una suspensión bacteriana, y entonces se pueden extraer del medio de cultivo como limos (Schlegel, H. G. 1997).

Cuando el medio de cultivo contiene sacarosa, muchos microorganismos forman limos de una forma más acusada. Un ejemplo conocido lo ofrece *Leuconostoc mesenteroides* (conocido en las azucareras como “Froschlaichbacterium”), una bacteria heterofermentativa del ácido

láctico, que transforma en poco tiempo las disoluciones de azúcar de caña en gelatina, compuesta por dextrano. Esta transformación tiene lugar fuera de la célula y está catalizada por una *hexosiltransferasa*, la *dextranosa* (Schlegel, H. G. 1997).



El dextrano es un polisacárido en el que la α -D-glucosa se une por enlaces 1,6 (1, 6- α -glucano). Las cadenas paralelas están entrelazadas. El dextrano se utiliza como sustituto del plasma sanguíneo, para elevar la viscosidad de disoluciones acuosas y como base de los geles de dextrano (sephadex) (Schlegel, H. G. 1997).

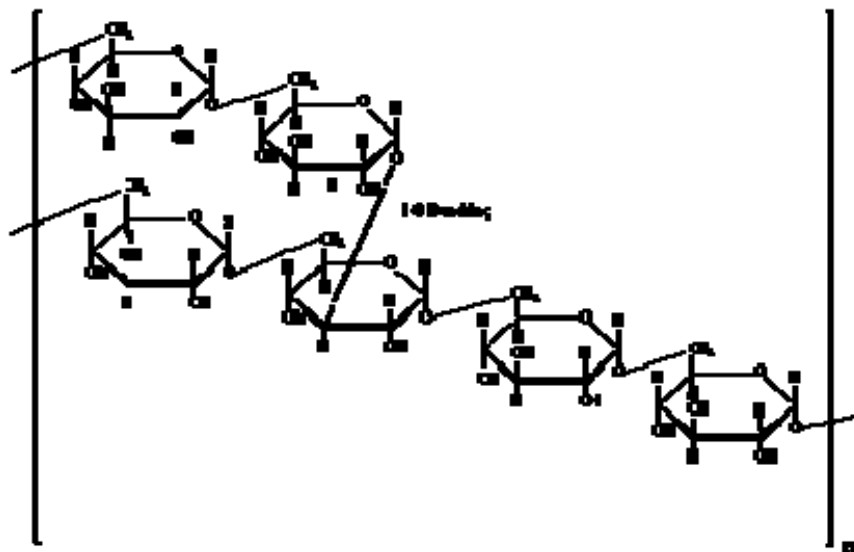


FIGURA 3. Estructura química del dextrano.

1.5. Proceso de la fermentación del aguamiel:

El pulque se fermenta a una temperatura ambiente de 20°C en el laboratorio aún en tiempos de calor o en tiempos de frío. Para eso se necesita que una persona que conozca el procesamiento de este producto mantenga siempre esa temperatura de 20°C o



aproximadamente entre 18 - 22°C. Si sube la temperatura el pulque toma un sabor desagradable, se agria (se acelera el proceso de fermentación hasta la producción de ácido acético) y si baja la temperatura no tiene cuerpo se vuelve aguado y lo dulce no se le quita tan fácil (la fermentación es más lenta y no se lleva a cabo la síntesis del exopolisacárido) (Madrigal, G. S. 1999).

Durante la fermentación láctica del aguamiel (rico en glucosa), los *Lactobacillus* asimilan el 53% de los azúcares presentes, produciendo ácido láctico, expresado como acidez fija. La concentración óptima de azúcar para su crecimiento se encuentra entre el 10 %. (Sánchez, M. A, & Hope, P. H. 1953).

1.5.1. Fermentación alcohólica:

El etanol es uno de los productos de la fermentación de los azúcares más abundante entre los microorganismos. Los principales productores de alcohol son levaduras, sobre todo cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras, al igual que los hongos, son organismos de respiración aeróbica; en ausencia de aire fermentan los carbohidratos a etanol y anhídrido carbónico. El alcohol aparece también como producto principal o secundario de la fermentación de hexosas o pentosas en muchas bacterias anaeróbicas y aeróbicas facultativas.

La fermentación de la glucosa a etanol y anhídrido carbónico por las levaduras se realiza a través de la vía de la fructosa-bifosfato. La transformación de piruvato a etanol implica dos pasos. En el primero se descarboxila el piruvato por la *piruvato-descarboxilasa* (1) con participación de la tiaminapirufosfato, formándose acetaldehído; éste se reduce a etanol con NADH₂ mediante la *alcohol-deshidrogenasa* (2) (Schegel, H. G. 1992):

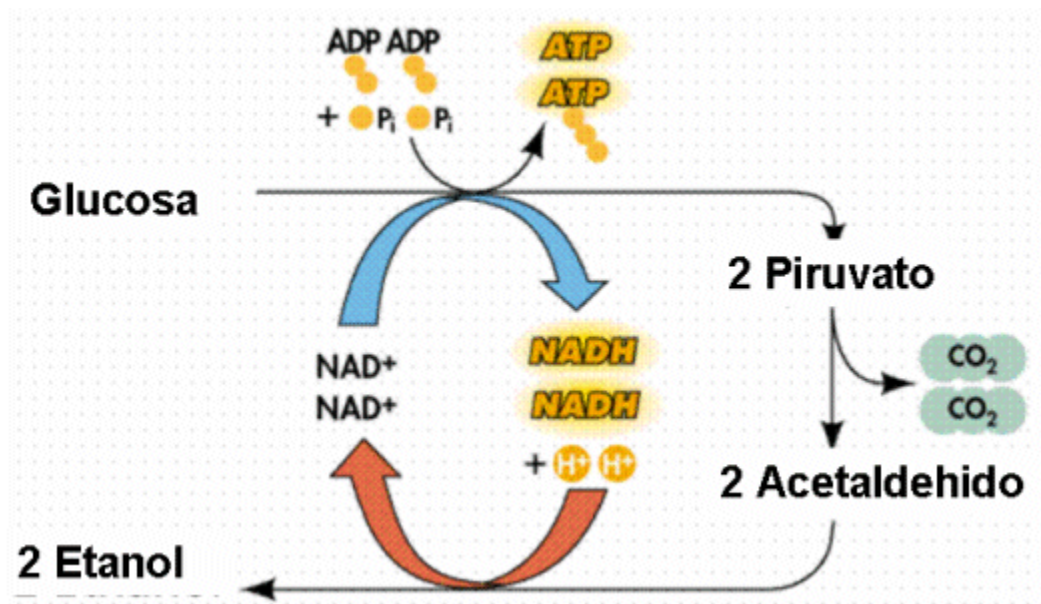


FIGURA 4. Ruta metabólica de las levaduras en la fermentación.

A partir del pulque, se aisló en México una bacteria bacilar, de flagelación polar, móvil, capaz de producir etanol. Esta bacteria, *Zymomonas mobilis*, descompone la glucosa a través de la vía del 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato e hidroliza al piruvato mediante la *piruvato-descarboxilasa* hasta acetaldehído y CO₂. El acetaldehído se reduce a etanol. Etanol, anhídrido carbónico y pequeñas cantidades de ácido láctico son los únicos productos de fermentación (Schegel, H. G. 1992).

Las bacterias lácticas heterofermentativas como *Leuconostoc mesenteroides* forman alcohol a través de una vía totalmente distinta. La glucosa se descompone mediante los primeros pasos de la vía de la pentosa-fosfato hasta pentafosfato. La *fosfoacetolasa* actúa sobre la xilulosa-5-fosfato (Schegel, H. G. 1992):





El acetilfosfato así formado se reduce mediante la *acetaldehído-deshidrogenasa* y la *alcohol-deshidrogenasa* hasta etanol. El otro producto de escisión, el gliceraldehído-3-fosfato, se reduce a lactato a través del piruvato (Schegel, H. G. 1992).

1.5.2. Fermentación láctica:

Las bacterias del ácido láctico se reúnen en la familia de las Lactobacteriáceas. A pesar de que el grupo morfológicamente se presenta como poco homogéneo, compuesto por bacilos cortos y largos, así como por cocos, es un grupo relativamente bien caracterizado fisiológicamente. Todos los pertenecientes a él son Gram positivos, no forman esporas (con la excepción de *Sporolactobacillus inulinus*) y son inmóviles (con excepciones). Para la obtención de energía dependen exclusivamente de los carbohidratos y excretan ácido láctico (lactato). En contraposición a las Enterobacteriáceas también productoras de lactato éstas son fermentadoras obligadas. A pesar de su ausencia, las Lactobacteriáceas pueden crecer con oxígeno atmosférico; son anaeróbicas pero aerotolerantes; una bacteria que crezca aeróbicamente sin *catalasa* es probablemente una bacteria del ácido láctico (Schegel, H. G. 1992).

A ellas pertenecen los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium* (Schegel, H. G. 1992).

Las bacterias lácticas homofermentativas forman ácido láctico puro o casi puro (90%). Descomponen la glucosa utilizando la vía de la fructosa-bifosfato, por lo tanto disponen de los enzimas necesarios incluyendo la *aldolasa* y transfieren el hidrógeno liberado en la deshidrogenación del gliceraldehído-3-fosfato hasta el piruvato (Schegel, H. G. 1992):

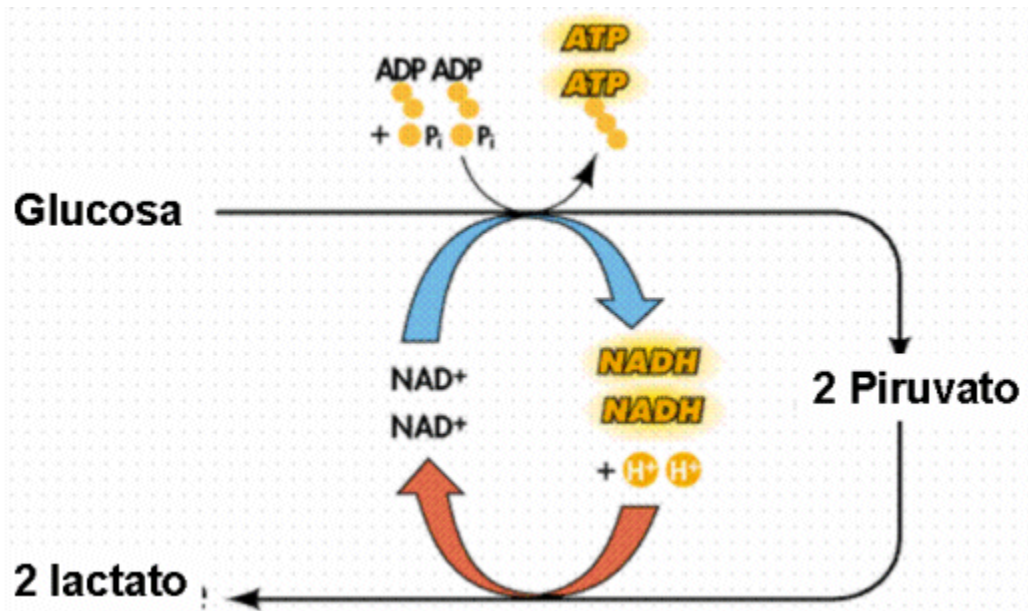


FIGURA 5. Ruta metabólica de las bacterias del ácido láctico.

1.6. Bacterias responsables de la fermentación:

La fermentación del aguamiel es una doble fermentación, una alcohólica y otra láctica que la llevan a cabo microorganismos como *Lactobacillus acidophilus*, α -*Proteobacteria*, *Acetobacter malorum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* los cuales metabolizan la glucosa y sacarosa, abundantes en el aguamiel, produciendo alcohol etílico y anhídrido carbónico (Escalante, A., et al. 2008).

Las bacterias del pulque fueron las primeras bacterias reportadas en llevar a cabo la fermentación alcohólica y láctica, capacidad que antes sólo se atribuía a hongos y levaduras (Escalante, A., et al. 2008).

Importantes microorganismos de uso industrial se aislaron de varias muestras de pulque, comprenden varias levaduras, como las productoras de etanol *Saccharomyces cerevisiae* y especies de *Kluyveromyces* productoras de inulinasa. Aislaron bacterias incluyendo la



productora del alcohol *Zymomonas mobilis* y la bacteria ácido láctica productora de dextrano *Leuconostoc mesenteroides*. Ellos, *S. cerevisiae*, *L. mesenteroides* y *Z. mobilis* han sido propuestos como los microorganismos esenciales para el proceso de fermentación del pulque (Escalante A., *et al.* 2008).

Más de 30 especies de cepas de bacterias y levaduras han sido identificadas en el pulque. Entre las bacterias se encuentran *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Sarcine* y *Bacillus*. Así como las *Zymomonas spp.* bacterias que aparentemente son las responsables del contenido de alcohol (4–5 %) y CO₂ (Rose, A. H. 1982).

1.6.1. Bacterias mesofílicas aerobias:

Dentro de las bacterias mesofílicas aerobias se incluyen a todos los microorganismos que muestran la capacidad para formar colonias visibles en las condiciones de ejecución de prueba (medio de cultivo, tiempo y temperatura de incubación) son bacterias viables que determinan el grado de exposición del agua a la contaminación por microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20 y 37 °C (Fernández, E. E. 2000; NOM-092-SSA1-2005).

1.6.2. Bacterias ácido lácticas:

Las bacterias ácido lácticas son organismos inmóviles, de forma bacilar o esférica, unidos por un conjunto de propiedades metabólicas y nutricionales poco corriente. Su nombre deriva del hecho de que sintetizan ATP a través de fermentaciones de carbohidratos que dan ácido láctico como principal producto final (Stanier, Ingraham, Wheelis & Painter 1996).



Las bacterias ácido lácticas son todas anaerobias aerotolerantes que crecen fácilmente sobre la superficie de medios sólidos expuestos al aire. Sin embargo son capaces de sintetizar ATP por respiración, lo cual es un reflejo de su incapacidad para sintetizar citocromos y otros enzimas que contengan grupos hemo. Los rendimientos del crecimiento en las bacterias ácido lácticas no son, por consiguiente, afectados por la presencia o ausencia de aire, constituyendo la descomposición fermentativa de los azúcares la fuente de ATP en ambas condiciones (Stanier, R. Y, *et al.* 1996).

Leuconostoc mesenteroides:

Leuconostoc spp. epífitas son bacterias de amplia propagación en el medio natural y que desempeñan un papel importante en varias fermentaciones industriales y de alimentos (Reiter & Oram 1982; Garvie 1986).

Leuconostoc mesenteroides, bacteria láctica heterofermentativa, aerobia facultativa, Gram positiva en forma de coco, que requiere de complejos factores de crecimiento y aminoácidos, genera alcohol a través de la descomposición de la glucosa mediante los primeros pasos de la vía de la pentosafosfato y sintetiza a partir de la sacarosa un exopolisacárido con enlaces α -(1,6) en la cadena principal y con ramificaciones en α -(1,3), α -(1,2) o α -(1,4) mediante la acción de una exoenzima glucosiltransferasa (la *dextran sacarasa*) (Schlegel, H. G. 1997; Badui, D. S. 2006).

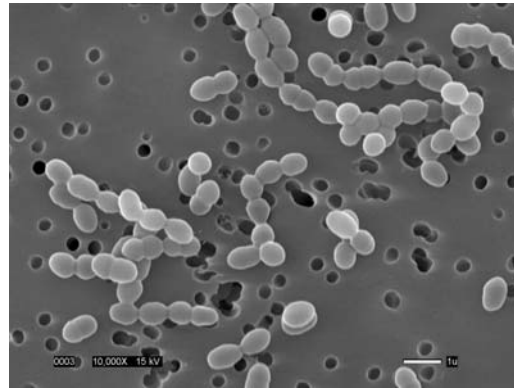


FIGURA 6. Imagen microscópica de *Leuconostoc mesenteroides*.

En condiciones microaerófilas, la fermentación heteroláctica se lleva a cabo. Glucosa y otras hexosas se convierten en cantidad equimolar de D-lactato, etanol y CO₂ a través de una combinación de las vías hexosa monofosfato y pentosa fosfato (Demoss et al 1951; Garvie 1986; Gottschalk 1986). Otras vías metabólicas incluyen la conversión de citrato a diacetilo y acetoina (Cogan *et al.* 1981) y la producción de dextranos y levanos de la sacarosa (Alsop, 1983; Broker 1977).

1.6.3. Levaduras:

Las levaduras pertenecen al género de los hongos que no son filamentosos y son, por lo general, organismos unicelulares, y se presentan en formas muy variadas, desde las esféricas, ovoides y elipsoidales, a las cilíndricas, que pueden ser muy alargadas y aun filamentosas que se multiplican formando yemas (Stanier R. Y, *et al.*, 1996). Estas formas, aunque diversas según las especies, son lo bastante características para ser base de clasificación (Schaufler, H. W. 2006).

La forma de reproducción asexual típica en sentido de las levaduras es la gemación; raramente se efectúa la multiplicación por división transversal (división binaria). Las células



resultantes de la gemación pueden permanecer unidas formando un pseudomicelio o bien pueden separarse completamente unas de otras. Las ascósporas se forman en un asca desnuda procedente ya sea de un cigoto o de una célula vegetativa (Schaufler, H. W. 2006).

Los miembros de la familia endomicetáceas forman además de células aisladas por gemación un micelio. En el género *Endomycopsis* se encuentran juntas hifas, células en gemación y ascas con ascósporas. En *Endomyces lactis* (también llamado *Geotrichum candidum* y *Oospora lactis*) las hifas se convierten en artrósporas, esto es, en células hifales autónomas (Schegel, H. G. 1992).

Clasificación e identificación de las levaduras:

Las levaduras pertenecen al Reino Fungi y dentro de él a la división Eumicota que agrupa a los hongos verdaderos. En esta división, las levaduras se incluyen en 2 de las 5 subdivisiones de los Eumicetos, la Ascomycotina representada por las levaduras capaces de producir ascosporas, llamadas por ello esporógenas, y la Deuteromycotina representadas por las levaduras incapaces de formar esporas llamadas no esporógenas. Los géneros de las levaduras esporógenas englobados todos ellos en la familia Saccharomycetaceae, se distribuyen en 3 subfamilias.

Los principales criterios utilizados para la clasificación e identificación de las levaduras son los siguientes:

- 1.- Producción de ascosporas.
- 2.- Aspecto de las células vegetativas: forma, tamaño, color, inclusiones.
- 3.- Forma de reproducción asexual.
- 4.- Producción de micelio.



- 5.- Forma de película en medio líquido.
- 6.- Color de la colonia.
- 8.- Propiedades fisiológicas: producción de ácido, actividad ureásica.
- 9.- Caracterización bioquímica:
 - Fermentación de glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa y rafinosa.
 - Crecimiento en 18 sustratos carbonados:
 - Pentosas: D-xilosa, L-arabinosa, D-ribosa, L-ramnosa.
 - Hexosas: D-glucosa.
 - Disacáridos: sacarosa, maltosa, celobiosa, trehalosa, lactosa.
 - Trisacáridos: rafinosa.
 - Polisacáridos: almidón.
 - Alcoholes: eritriol, ribitol, D-manitol, inositol.
 - Ácidos orgánicos: ácido succínico, ácido cítrico.
 - Asimilación de nitratos.
 - Crecimiento en medio con vitaminas.

1.6.4. *Zymomonas*:

Las bacterias del género *Zymomonas* tienen flagelos polares y son bacilos Gram negativos que aparecen en materiales vegetales en fermentación. Al igual que las bacterias entéricas, son anaerobios facultativos, con capacidad tanto respiratoria como fermentativa. Sin embargo, la fermentación de azúcares característica de *Zymomonas* es única y distingue claramente a estas bacterias de las del grupo entérico. Solamente pueden fermentar glucosa, fructosa y sacarosa, que son convertidas en cantidades equimolares de etanol y CO₂ (Stanier, R. Y, *et al.* 1996).



2. JUSTIFICACIÓN:

- Debido a que el aguamiel es una bebida milenaria en México es importante su estudio para identificar microorganismos productores de mucílago (polisacáridos) y así poder establecer un mecanismo las variables fisicoquímicas controlables sistemático de un proceso artesanal, con la finalidad de obtener un proceso de fermentación que pueda ser controlado inicialmente a nivel laboratorio y en un futuro a nivel piloto.

3. OBJETIVOS:

3.1. Objetivo General:

- Aislar e identificar el comportamiento de los microorganismos durante el proceso de fermentación de aguamiel.

3.2. Objetivos Particulares:

- Caracterizar las propiedades fisicoquímicas de las muestras de aguamiel.
- Aislar los microorganismos involucrados en el proceso de fermentación del aguamiel.
- Identificar el género y especie del o de los microorganismo(s) aislados.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL:

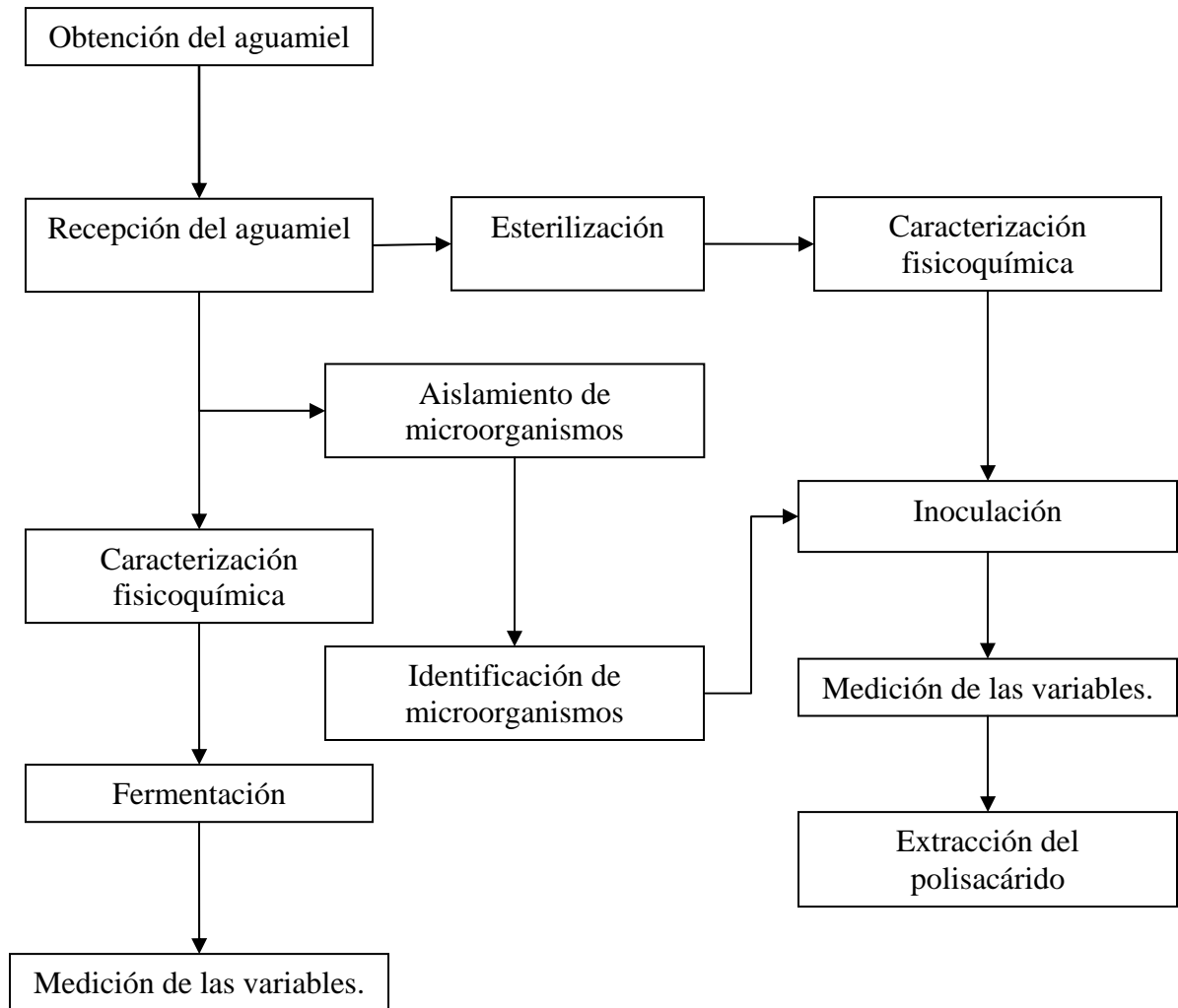


FIGURA 7. Secuencia experimental.

❖ Materiales y métodos:

4.1. Obtención de las muestras de Aguamiel y análisis de fermentación:

Las muestras de aguamiel fresco fueron obtenidas de cabezas de maguey pulquero, manso o de la montaña (*Agave salmiana*) provenientes del municipio de Nopaltepec Estado de México, con una edad promedio de la planta de 9 años, se pusieron en recipientes de vidrio estériles y transportaron al laboratorio. Se llevaron a cabo fermentaciones en recipientes de



vidrio estériles, supervisando la temperatura y pH de las muestras, después de un determinado tiempo de fermentación (t_0), (t_1), (t_2) [h]. El contenido de azúcares, el etanol, y la concentración de ácido se determinó en todas las muestras.

4.2. Caracterización de la materia prima (aguamiel):

Se determinó densidad, pH, índice de refracción, sólidos solubles (°Brix) y acidez, de acuerdo a las especificaciones establecidas en la Norma Mexicana NMX-V-022-1972 y mediante la metodología indicada en las normas de referencia de ésta. Los análisis efectuados a las muestras de aguamiel, se realizaron por triplicado.

La determinación de humedad se realiza por destilación del agua, combinada con un disolvente inmiscible como xileno, tolueno o benceno. El contenido de proteínas y cenizas se realizará utilizando los métodos recomendados por la Norma Mexicana NMX-V-029-1972 y la Norma Mexicana NMX-V-017-S-1981 respectivamente.

4.3. Aislamiento de microorganismos y determinaciones microbiológicas:

Se diluyeron 10 mL de cada muestra en 90 mL de agua peptonada estéril al 0.1% (BIOXON) y se realizaron diluciones en serie (hasta 10^{-12}). El crecimiento de las bacterias mesofílicas aerobias y bacterias ácido lácticas será determinado tomando 1ml de cada dilución y posteriormente sembrada en Agar Cuenta Estándar (BIOXON) y en Agar APT (DIFCO), respectivamente. Para obtener una vista general de las interacciones de los grupos microbianos diferentes involucrada en el proceso, nosotros decidimos incluir las cuentas de levaduras en nuestro análisis. Se tomó 1 ml de cada dilución y se sembró por duplicado en Agar Dextrosa y Papa (BIOXON) adicionado con ácido tartárico al 10% w/v como el agente antibacteriano.



Las determinaciones microbianas se realizaron por duplicado. Todas las placas se incubaron a 30°C, se supervisaron y se observó la apariencia de colonia a 1-3 días.

4.4. Cinética microbiana:

Se inocula en condiciones estériles en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de aguamiel pasteurizado con 10 mL de un cultivo de cada una de las bacterias aisladas (por separado).

Se homogeneiza cuidadosamente agitando el matraz e inmediatamente tomar una muestra de 5 mL con una pipeta estéril y vaciarla en una celda del espectrofotómetro. Esta muestra corresponderá al tiempo cero ($t=0$). De esta manera se tomarán muestras a las 0.5, 1, 2, 3, ..., 10 horas. Para el tiempo de 10 horas de incubación se tomarán 6 mL.

En la muestra de 10 horas además de evaluar la turbidez, se deberá poner 1 mL de cultivo en un matraz Erlenmeyer con 99 mL de agua peptonada estéril. Del matraz con la muestra diluida, hacer una serie de diluciones en tubos con 9 mL de agua peptonada estéril, hasta 10^{-12} .

Enseguida inocular con 1 mL de las últimas 3 diluciones en dos cajas de Petri con agar APT.

Cuantificar el número de UFC/mL de bacterias.

4.5. Determinación de densidad relativa:

El picnómetro se lava y se enjuaga con agua destilada, se seca en la estufa a 373 - 383 K (100 - 110°C) por una hora, se saca y se deja enfriar durante media hora, en el desecador, repetir la operación hasta que el picnómetro se encuentre a masa constante, este dato se registra como Mt.



Se llena totalmente el picnómetro con agua destilada, cuidando de evitar burbujas de aire, se lleva al refrigerador a una temperatura de 283 K (10°C), se saca del refrigerador y se le coloca el termómetro, limpiando muy bien todo el exterior del picnómetro y se deja que la temperatura suba poco a poco hasta alcanzar 288 K (15°C) teniendo cuidado de que el líquido desplazado no escurra por el capilar absorbiéndolo con un papel filtro, se pone el tapón, se determina su masa como M_a .

Se vacía el agua del picnómetro y se seca en la estufa por 30 min se saca y se deja enfriar a la temperatura ambiente. Se llena con la muestra y se lleva al refrigerador, a una temperatura inferior a 283 K (10°C), se saca del refrigerador y se le pone el tapón hasta que ajuste perfectamente.

Se lava con agua destilada el exterior del picnómetro, se seca y se espera a que llegue a 288 K (15°C) cuidando de que el líquido desplazado no escurra por el capilar absorbiéndolo con un papel filtro, se determina la masa como M_m . La masa de la muestra es $M_m - M_t$ contenida en el picnómetro (Norma Mexicana NMX-V-032-1980).

4.6. Determinación de °Brix:

Colocar el refractómetro en una posición tal que difunda la luz natural o cualquier otra forma de luz artificial, que pueda utilizarse para iluminación. Hacer circular agua a 293 K (20°C) a través de los prismas. Limpiar cuidadosamente con alcohol y éter de petróleo el refractómetro antes de hacer la lectura.

Para cargar el refractómetro abrir el doble prisma girando el tornillo correspondiente y poner unas gotas de muestra sobre el prisma, cerrar y ajustar finamente.



Verificar la exactitud del refractómetro con agua a 293 K (20°C) a esta temperatura, el índice de refracción del agua es de 1.3330, o bien utilizar la placa de cuarzo que viene con el equipo, usando bromonaftaleno, al leer hacer las correcciones necesarias.

Mover el brazo giratorio del aparato hacia delante y hacia atrás hasta que el campo visual se divida en dos partes, una luminosa y otra oscura. La línea divisoria entre esas dos partes, se le conoce como "línea margen". Ajustar la línea margen y leer directamente el por ciento de sólidos en la escala Brix.

Nota: Este método también incluye tanto a los refractómetros manuales (o portátiles), en los cuales únicamente se coloca la muestra y se observa a contraluz para tomar la lectura directamente; como a los refractómetros digitales en los cuales el mismo procedimiento anteriormente descrito en esta norma, se simplifica siguiendo las indicaciones específicas que para cada aparato proporciona el fabricante (Norma Mexicana NMX-F-103-1982).

4.7. Determinación de pH:

La determinación del pH se realizó con un potenciómetro marca Beckman y siguiendo el siguiente procedimiento:

Una muestra de 200 mL se pone en el vaso de precipitados de 250 mL, y con ayuda del agitador y barra magnética se agita moderadamente durante 2 a 3 minutos para eliminar el exceso de CO₂. A la muestra ya preparada se le determina directamente el pH en el potenciómetro. Se hace la corrección por temperatura, si es necesario (Norma Mexicana NMX-V-041-1972).



4.8. Determinación de acidez total:

En un matraz Erlenmeyer de 10 a 20 mL de muestra; se agregan 2 mL de fenolftaleína, y se titula con solución 0.1 N de hidróxido de sodio, hasta color rosado permanente (Norma Mexicana NMX-V-042-1972).

4.9. Determinación de extracto seco (sólidos totales) y cenizas:

A una temperatura de 293 K (20°C) se toman de 25 a 50 cm³ de la muestra, se transfieren a la cápsula que se encuentra a masa constante, se evaporan a sequedad en el baño maría se lleva la cápsula a la estufa a una temperatura de 363-368 K (90-95°C) durante 3 horas; se deja enfriar en el desecador y se determina su masa.

La cápsula que contiene el residuo del extracto seco se coloca en la mufla a una temperatura de 798 K (525°C) y se deja hasta obtener cenizas blancas, se saca la cápsula se enfría y se humedecen las cenizas con agua se secan en baño maría, luego en la parrilla y se recalcinan en la mufla a 798 K (525°C) hasta obtener masa constante. En el caso de bebidas alcohólicas con alto contenido de azúcares la determinación de cenizas se efectúa en la misma forma pero adicionando de 1 a 3 gotas de aceite de oliva antes de colocar la cápsula en la mufla a una temperatura de 798 K (525°C) (Norma Mexicana NMX-V-017-S-1981).

4.10. Determinación de proteínas en aguamiel:

Se colocan 100 mL de "aguamiel" exactamente medidos en el matraz de Kjendahl y evaporar casi a sequedad, añadir 10 g de sulfato de Potasio y 20 mL de ácido sulfúrico que bañe por las paredes del recipiente, agregar de 0.5 g de sulfato de Cobre o de Selenio agitar con cuidado mezclando perfectamente.



Colocar el matraz con el embudo en posición inclinada, en la estufa con digestor bajo una campana, calentar lentamente durante 20 a 30 minutos, elevar la temperatura poco a poco hasta que la espuma desaparezca y empiece la ebullición, continúe el calentamiento hasta que haya una total decoloración y la solución tenga un color verde tenue. Enfríe teniendo la seguridad de que la oxidación ha sido completa. Agregar 200 mL de agua y 50 mL de hidróxido de Sodio al 50%, quedando así una solución fuertemente alcalina.

Se agrega pedacería de zinc o perlas de vidrio, para evitar el borboteo durante la ebullición. Se conecta el matraz con la trampa y condensador, poniendo en la terminal de éste un matraz que contenga de 50 a 100 mL de ácido Clorhídrico 0.1 N con tres gotas de Rojo de Metilo, donde se recoge el Amoniacó que se desprende de la muestra.

El calentamiento se continúa hasta que hayan pasado las dos terceras partes de la solución. La punta del condensador debe llegar debajo de la superficie de la solución del ácido Clorhídrico para prevenir el escape de Amoniacó. El contenido del matraz receptor se titula con solución 0.1 N de hidróxido de Sodio. Efectúese una prueba en blanco (Norma Mexicana NMX-V-029-1972).

4.11. Extracción del polisacárido.

Para la extracción del polisacárido a partir del aguamiel inoculado con el microorganismo aislado se utiliza la técnica modificada de Bautista (1993) y Sharma (1998). Se toma una muestra de 100 mL del aguamiel fermentado y se le coloca alcohol etílico a 25 °C por 5 min. en una proporción de 2:1 con aireación constante para compactar el precipitado y posteriormente se filtra. El residuo sólido obtenido se coloca en una corriente de aire por 10 min. Posteriormente se lleva a secado en la estufa a 45 °C durante 48 h (Chaires, 2002).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Se encontró que el aguamiel utilizado para el aislamiento del o los microorganismos de interés contenía una cantidad considerable de bacterias y levaduras para llevarse a cabo la conversión de aguamiel a pulque, los resultados se muestran a continuación en las TABLAS 2 y 3. Como se puede observar en la FIGURA 7 hay mayor cantidad de bacterias ácido lácticas (LAB), por lo cual se podría decir que primero se lleva a cabo la fermentación láctica y después la alcohólica.

TABLA 2. Conteo de microorganismos presentes en el aguamiel.

Medio de Cultivo	UFC/mL
Agar Cuenta Estándar	30×10^6 de bacterias aerobias
Agar Dextrosa y Papa	10×10^4 de levaduras
Agar APT	48×10^6 de LAB



FIGURA 7. Bacterias ácido lácticas en agar APT



FIGURA 8. Levaduras en agar PDA.



TABLA 3. Descripción de la morfología colonial de los microorganismos presentes en el aguamiel.

Medio de Cultivo	Características de las colonias:
Agar Cuenta Estándar	Tamaño: 5 mm, forma circular, elevación convexa, margen entero, color blanco, superficie brillante, densidad opaca y de consistencia viscosa. Tamaño: 3 mm, forma circular, elevación plana, margen entero, color crema, superficie opaca, densidad opaca y de consistencia mantecosa. Tamaño: 2 mm, forma como huso, elevación elevada, margen entero, color beige, superficie opaca, densidad translúcida y de consistencia viscosa.
Agar Dextrosa y Papa	Levaduras de tamaño 3 mm, forma circular y algunas como huso, elevación pulvinada y convexa, margen entero, color blanco, superficie opaca y consistencia firme.
Agar APT	Bacteria Gram, con tamaño de 4 mm, forma circular, elevación plana y algunas convexas, margen entero, color beige, superficie brillante, densidad translúcida y de consistencia viscosa. Bacteria Gram, con tamaño de 2 mm, forma puntiforme, elevación elevada, margen entero, color beige, superficie brillante, densidad translúcida y de consistencia viscosa.

Con base en los resultados obtenidos en las determinaciones realizadas al aguamiel y tomando como referencia las especificaciones indicadas en la Norma Mexicana NMX-V-022-1972 el aguamiel utilizado como fuente de aislamiento y posteriormente como sustrato, se puede decir que es un aguamiel de Tipo I, los resultados se indican en la TABLA 4.



TABLA 4. Propiedades fisicoquímicas determinadas al aguamiel.

#	pH	°Brix	Acidez mg/100mL (ácido láctico)	ρ Densidad relativa	ρ Densidad (Bé)	μ Viscosidad (cp)	Índice de refracción	Sólidos totales y Ceniza	Proteína (mg/100 mL)	ART g/100 mL (en glucosa)	ARD g/100 mL (en glucosa)
1	6.843	7.63	0.058	1.0422	5.737	1.484	1.349	13.01/400	342.375	10.15	1.57
SA	7	11	0.018	1.0420	5.713	-	1.371	15.29/310	170	10	2.4
FP	4.6	6	0.348	0.978	6.027	419	1.338	2.88/290	170	0.48	0.06

SA: aguamiel estéril

FP: producto final (pulque)

Comparando los resultados de la TABLA 4 (1) con los de (SA) que es lo reportado por Sánchez (1953), se puede observar que no hay mucha diferencia entre los valores obtenidos y los teóricos a excepción de los °Brix.

Durante la conversión de aguamiel a pulque naturalmente se midieron algunas variables como pH, acidez, °Brix, densidad relativa y viscosidad, para ver el comportamiento que tiene la fermentación natural del aguamiel y tener una alguna curva de tendencia aproximada para el aguamiel fermentado con el microorganismo aislado

Correlacionando las TABLAS 2 y 5 con la FIGURA 7, podemos decir que primero comienza la fermentación láctica ya que las bacterias ácido lácticas se encuentran en mayor cantidad que las levaduras; como era de esperarse el pH disminuye hasta un valor de 4 el cual es parecido con lo reportado en la TABLA 4 (FP) y nos indica que ahí se detienen las fermentaciones



TABLA 5. Resultados obtenidos para distintas muestras de aguamiel.

Muestra	Tiempo (h)	pH	°Brix	Acidez mg/100 mL (ácido láctico)	Densidad Relativa	Viscosidad (cp)
1	0	6.352	8.0	0.135	1.0523	1.6444
2		6.651	8.0	0.105	1.0520	1.6304
3		6.445	10.2	0.108	1.0388	1.7939
1	24	4.185	8.0	0.7875	1.0391	2.8125
2		4.191	7.0	0.720	1.0440	2.7948
3		4.649	9.5	0.878	1.0206	2.1852
1	36	4.077	8.0	0.825	1.0449	2.9747
2		4.092	7.0	0.795	1.0445	2.9023
3		4.626	8.5	1.091	1.0259	2.1767
1	48	4.018	7.0	0.96	1.0460	3.3097
2		4.029	7.0	0.975	1.0440	3.6348
3		4.576	8.4	1.4985	0.9475	2.3600
1	72	3.999	7.0	1.0575	1.0460	3.3846
2		3.995	7.0	1.08	1.0459	3.2804
3		4.570	8.2	1.518	0.9396	2.1852

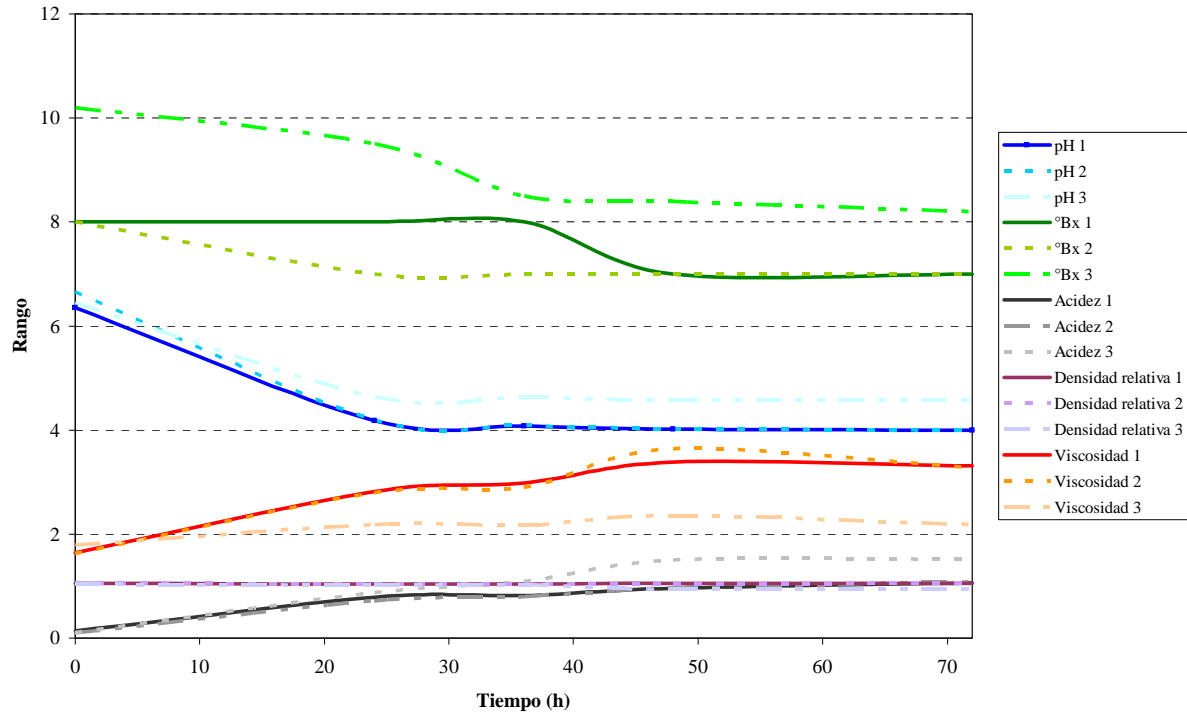


FIGURA 8. Comparativo entre los distintos parámetros de 3 muestras de aguamiel.

Ya aislado e identificado el microorganismo se llevaron a cabo pruebas de crecimiento (incremento de la viscosidad), inoculando aguamiel estéril con el microorganismo aislado, variando el contenido de sólidos solubles y obteniendo los resultados indicados en la tabla 6:

TABLA 6. Incremento de la viscosidad en distintos lotes de aguamiel.

°Brix	Incremento de la viscosidad
11.8	NO
11	NO
10.6	SÍ
10.4	SÍ
10	SÍ
9	NO
6	NO
5.6	NO



Durante la fermentación llevada a cabo por el microorganismo aislado se midieron varios parámetros, los resultados obtenidos se muestran en la TABLA 7, y en las FIGURAS 9 a 13.

TABLA 7. Resultados obtenidos para 3 muestras de aguamiel estéril inoculado con el microorganismo aislado.

t (h)	Muestra	°Bx	pH	$\rho_{relativa}$	μ (cp)	UFC/mL
0	A	10	7.8	1.0295	1.4777	15x10 ⁴
	B	10.4	6.0	1.0613	1.8495	22x10 ⁶
	C	10.6	6.0	1.0450	1.9431	18x10 ⁶
12	A	10	7.0	1.0377	1.4606	15x10 ³
	B	10.4	6.0	1.0350	1.7027	27x10 ⁶
	C	10.6	6.0	1.0443	1.8355	18x10 ⁶
24	A	10	6.0	1.0383	7.5473	15x10 ⁴
	B	10.4	4.5	1.0439	25.2750	48x10 ⁶
	C	10.6	5.0	1.0401	27.4120	83x10 ⁶
36	A	9.6	5.5	1.0158	25.9570	95x10 ⁵
	B	9.8	4.0	1.0405	29.3772	48x10 ⁶
	C	10.4	4.5	1.0369	31.5578	27x10 ⁶
48	A	9.8	5.0	1.0186	30.0700	53x10 ⁵
	B	10.2	4.0	1.0296	43.3289	14x10 ⁶
	C	10.8	4.0	1.0029	49.9154	11x10 ⁶
60	A	9.6	5.0	1.0263	45.1500	25x10 ⁵
	B	10	4.0	1.0385	67.5392	12x10 ⁶
	C	10.3	4.0	1.0318	61.4631	53x10 ⁵
72	A	9.4	4.5	1.0347	65.3692	90x10 ⁴
	B	10	4.0	1.0412	117.4843	51x10 ⁵
	C	10.2	4.0	1.0424	117.6303	45x10 ⁶
84	A	9.2	4.0	1.0320	117.5817	30x10 ⁴
	B	10	4.0	1.0439	33.8784	28x10 ⁵
	C	10.2	4.0	1.0443	53.3443	21x10 ⁵



En la FIGURA 9 se muestra la variación del pH con respecto al tiempo para el aguamiel estéril inoculado con el microorganismo aislado y se puede observar que el pH desciende hasta un valor de 4, lo cual nos indica que la bacteria aislada en el agar APT y sembrada en el medio realiza una disminución en el pH mediante la producción de ácido láctico dejándolo en un valor óptimo para el desarrollo de las levaduras y *Z. mobilis* para la posterior producción de alcohol por parte de estas.

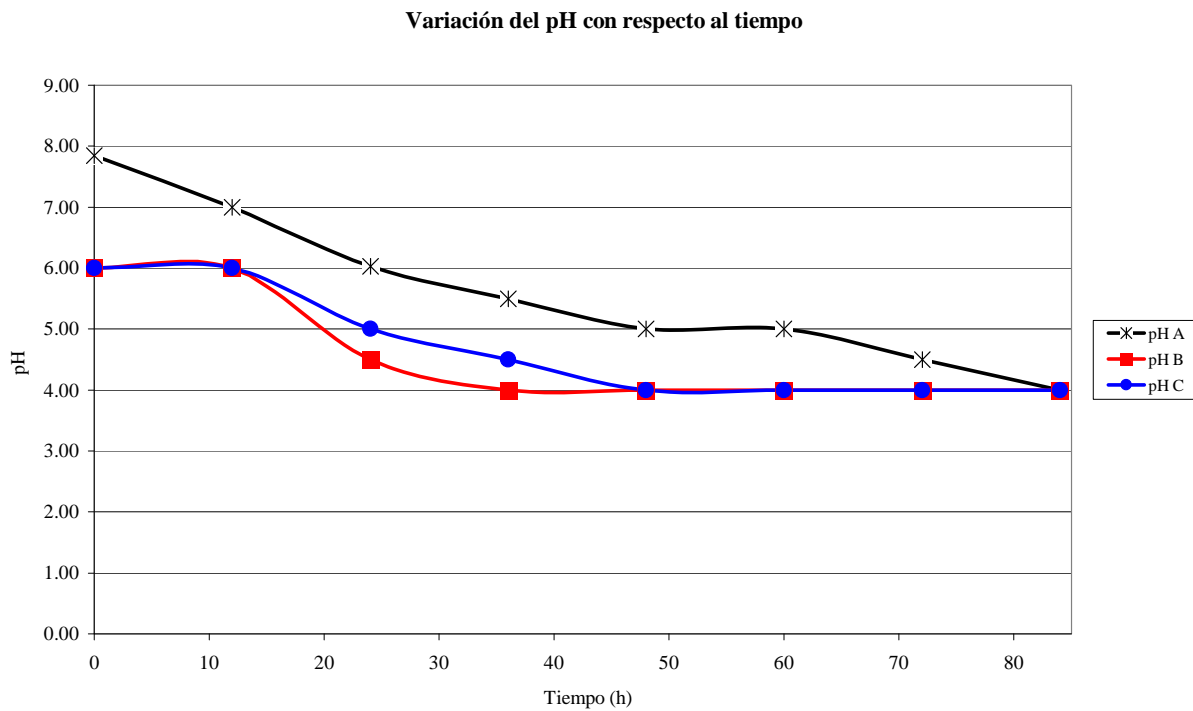


FIGURA 9. Variación del pH con respecto al tiempo.

Además de reducir el pH consumen sólo una porción de los sólidos solubles dejando una gran cantidad de nutrientes fermentables para la producción de etanol por parte de los otros microorganismos involucrados en la fermentación completa del pulque, este descenso en los °Brix se muestra en la FIGURA 10.

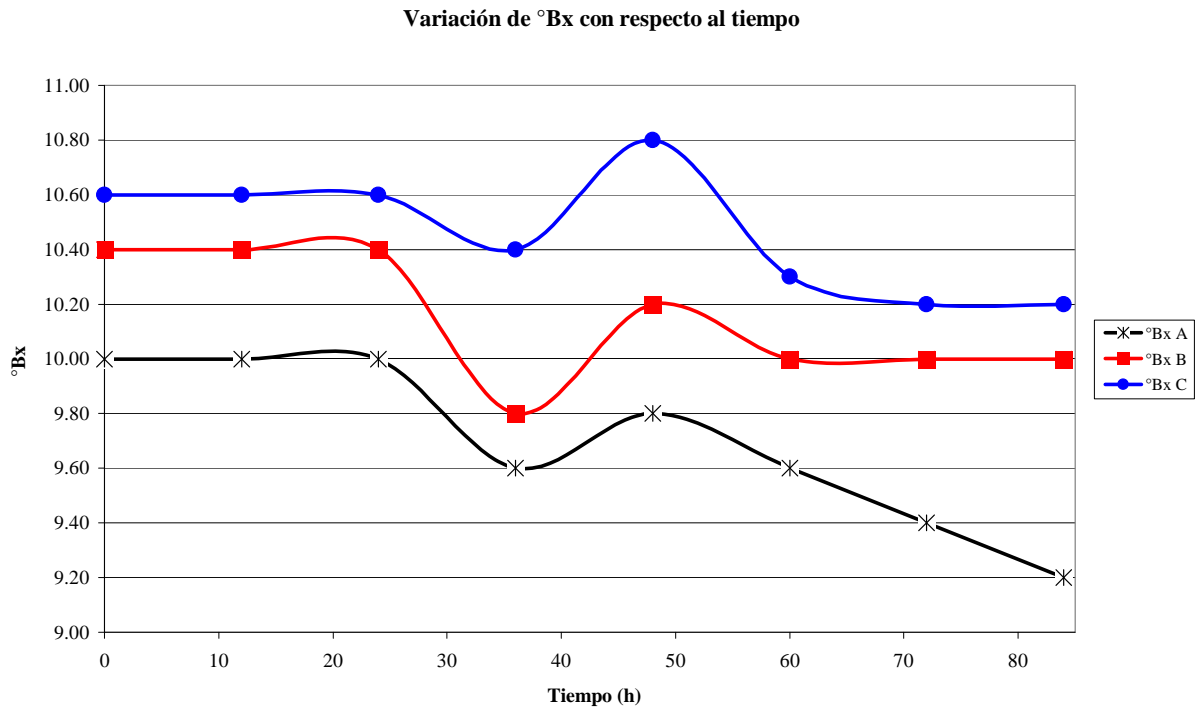


FIGURA 10. Variación de °Bx con respecto al tiempo.

La variación de la densidad durante la fermentación láctica realizada por la bacteria aislada se puede apreciar en la FIGURA 11, en la cual se observa que no hubo un cambio significativo en esta propiedad.

Variación de la densidad relativa con respecto al tiempo

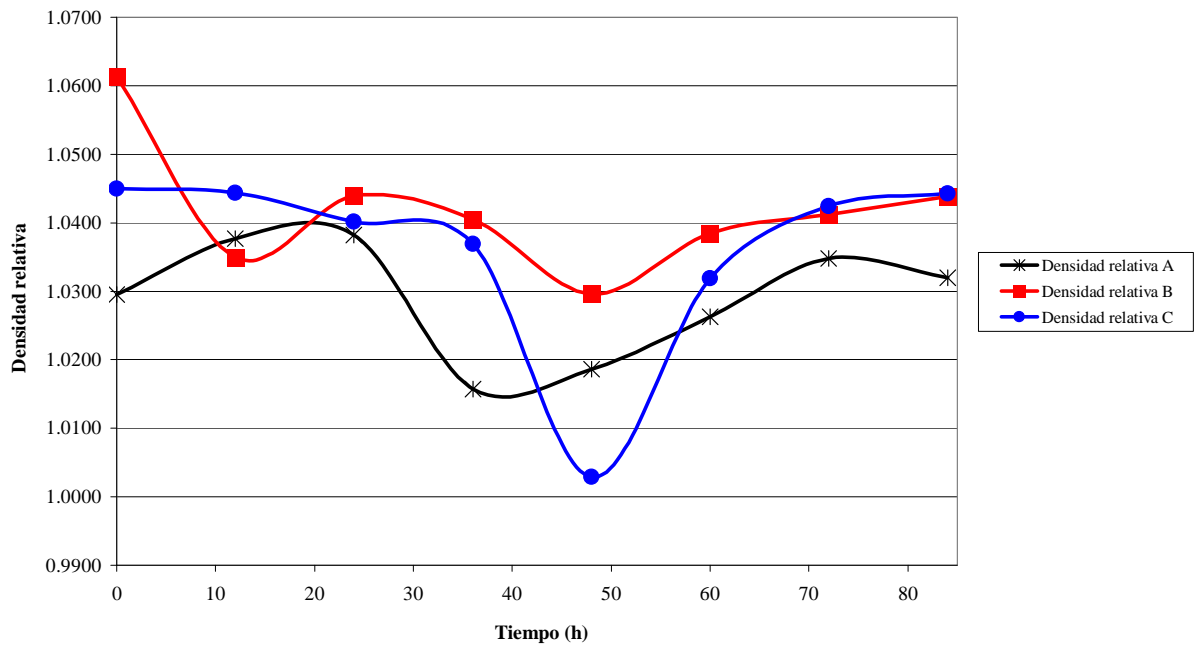


FIGURA 11. Variación de la densidad relativa con respecto al tiempo.

Además de la variación de pH, °Brix y densidad se presentó un cambio muy notorio en la consistencia del aguamiel estéril, ya que esta aumentó hasta un valor máximo aproximado de 117 cp después de 72 h y disminuyendo luego, este incremento se debe a que el microorganismo genera el polisacárido como protección a las condiciones donde se encuentra y al ya no necesitarlo por llegar a su fase de muerte el exopolisacárido queda disponible en el medio para ser extraído. Además de observarse este cambio en la FIGURA 12, esta sirve para inferir cuando poder detener la fermentación con el fin de obtener la mayor viscosidad permisible y posiblemente una cantidad superior de polisacárido.

Variación de la viscosidad con respecto al tiempo

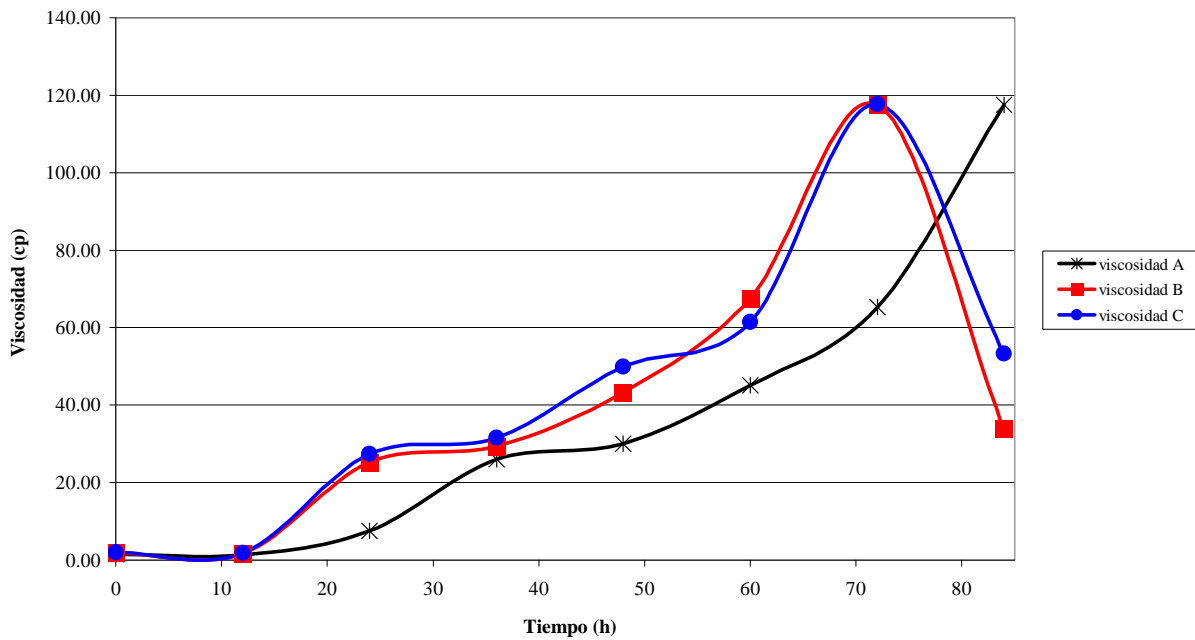


FIGURA 12. Variación de la viscosidad con respecto al tiempo.

En la FIGURA 13 se muestra la cinética de crecimiento del microorganismo aislado, en la cual se observa que el mayor crecimiento (fase Log) se presenta entre las 12 y 25 h y que en esta etapa se produce su mayor reproducción más no la mayor producción de polisacárido ya que las condiciones aún son favorables para su desarrollo. El crecimiento del microorganismo además se ve afectado por el contenido de sólidos solubles ($^{\circ}\text{Bx}$) y la temperatura, ya que se observó el no incremento en la viscosidad al modificar dichas variables, ya fuese aumentando o disminuyendo estas.

Mientras que en las FIGURAS 14 y 15 se observa el cambio en la coloración y consistencia entre el aguamiel estéril y el fermentado; va de un color café a uno amarillo huevo y de consistencia muy líquida a una muy viscosa.

Cinética de crecimiento microbiano

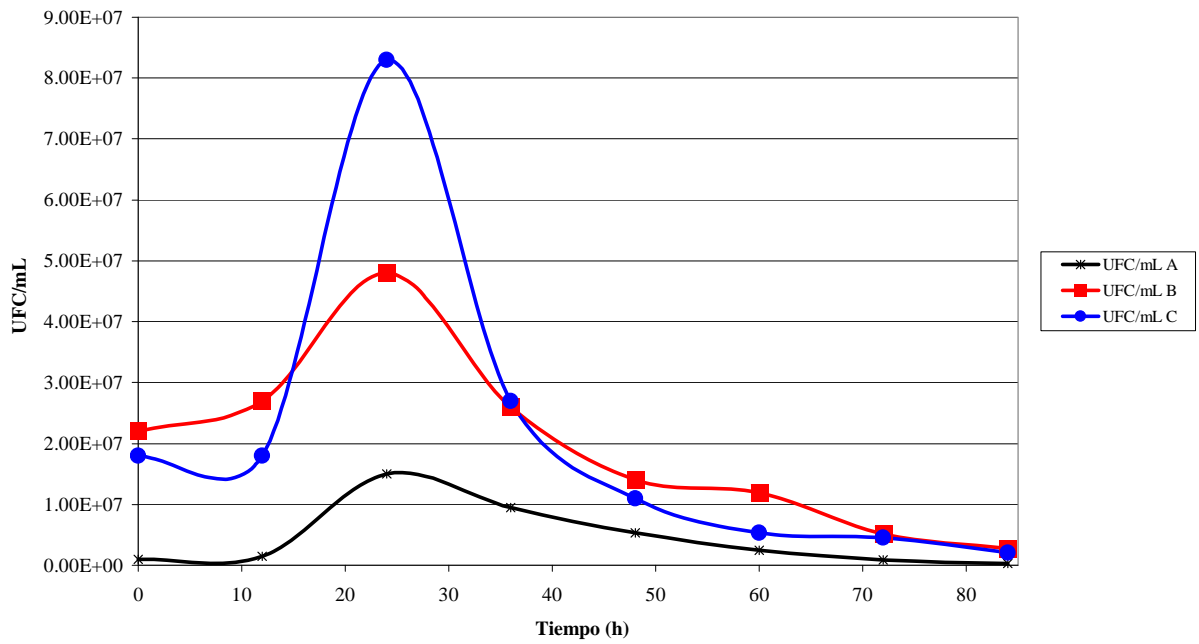


FIGURA 13. Cinética de crecimiento microbiano.



FIGURA 14. Aguamiel estéril.



FIGURA 15. Aguamiel fermentado

El rendimiento obtenido para la producción de polisacárido fue de 3.43 %, que es 25.4 % menor a lo reportado por Sánchez (1953), ya que él reporta una producción de 4.6 - 7.5 %, pero después de ser incubado a 23°C durante 24 h, lo cual deberíamos tomar en cuenta para analizar sí con estas condiciones se hace más eficiente la producción del polisacárido, los resultados se muestran en la TABLA 7.

TABLA 8. Rendimiento.

Teórico	A	B	C	Promedio
4.6-7.5 %	3.38 %	3.49 %	3.42 %	3.43 %
	(-) 26.5 %	(-) 24.2 %	25.6 %	(-) 25.4 %

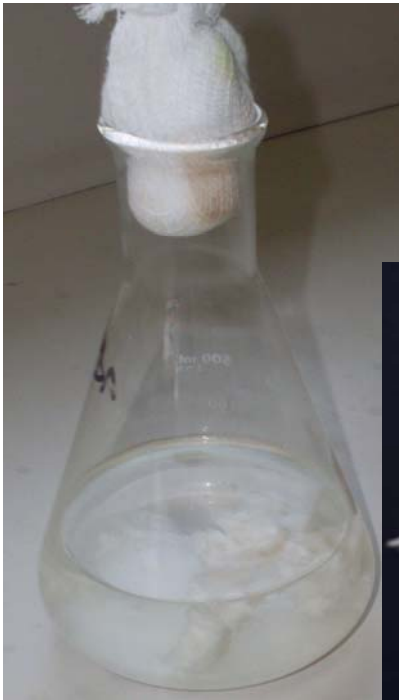


FIGURA 16 a. Polisacárido precipitado.



FIGURA 17. Polisacárido seco.



FIGURA 16 b. Polisacárido precipitado.



6. CONCLUSIONES:

- El aguamiel utilizado es del tipo I, con base en las especificaciones de la Norma Mexicana NMX-V-022-1972.
- El contenido de °Brix óptimo para el desarrollo del microorganismo aislado oscila entre 9.5 y 10.5.
- La concentración de azúcar influye de manera importante en el crecimiento del microorganismo y la producción del polisacárido.
- Se caracterizó al aguamiel como sustrato para el crecimiento del microorganismo aislado y la producción de un polisacárido.
- De acuerdo a pruebas preliminares con PCR, los resultados obtenidos en la fermentación y la literatura consultada, se cree que el microorganismo aislado es *Leuconostoc mesenteroides* el responsable de la consistencia viscosa propia del pulque.
- Se obtuvo un rendimiento de 3.43 % para la producción de polisacárido obtenido del aguamiel fermentado.

7. RECOMENDACIONES:

- Realizar pruebas confirmatorias de identificación del microorganismo por medio de PCR.
- Continuar pruebas de producción de polisacárido utilizando la bacteria aislada en otro sustrato rico en azúcares y alguna fuente de nitrógeno.
- Optimizar la producción y extracción de polisacárido controlando la temperatura, concentración de nutrientes así como el pH; además mediante el empleo complementario de algún otro método de separación.



- Caracterizar e identificar el polisacárido que se puede extraer del aguamiel por la acción de la fermentación con el microorganismo aislado.

8. REFERENCIAS:

1. Alsop, R. M. (1983). Industrial Production of Dextrans. *Progress in Industrial Microbiology*. Ed. M. E. Bushell. New York. pp 1-42.
2. Badui, S. D. (2006). Química de los Alimentos 4ª edición, ed. Pearson. México. pp. 349-351.
3. Broker, B. E. (1977). Ultra structural surface changes associated with dextran synthesis by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Bacteriol.* 131, 288-92.
4. Baselga, R. y Albizu, I., (2006). Exopolisacáridos Capsulares Bacterianos. Recuperado el 01 de septiembre de 2008, de <http://www.exopol.com/autovac/figuras/bc1.pdf>
5. Camacho, P. J., (2005); Plantas comestibles silvestres. Especies de mayor uso. IMSS, D.F., México; pp.48, 50.
6. Chaires, M. (2002). Aprovechamiento de polisacáridos de cáscara de tuna y de semilla de mezquite en la microencapsulación de oleorresinas de apio. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN. México. pp. 2-32
7. Cogan, T. M., O'Dowd, M. & Mellerick, D. (1981). Effects of Sugar on Acetoin Production from Citrate by *Leuconostoc lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 1-8.
8. Conzatti, C. (1981); Flora Taxonómica Mexicana (Plantas vasculares) 3ª edición, Ed. IPN-CENETI, México; pp 93.
9. Cortés, Z. L. y Basurto, P. F., (2005). *Agave salmiana*. Recuperado el 27 de agosto de 2008, de <http://www.ibiologia.unam.mx/gela/plantasp.html>.
10. Demoss, R. D., Bard, R. C. & Gunsalus, I. C. (1951). The mechanism of heterolactic fermentation: a new route of ethanol formation. *J. Bacteriol.* 62, 499-511.
11. Escalante, A., Giles G. M., Hernández, G., Córdova, A. M., López, M. A., Gosset, G. y Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 126-134.



12. Fernández, E. E. (2000), Microbiología e inocuidad de los alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro; México; p. 27.
13. Flores, M. A., Mora, E. R. y Romero, A. L. (2008). Evaluación fisicoquímica del aguamiel de tres variedades de maguey pulquero (*Agave spp*). Escuela Nacional de Ciencias Biológicas; México.
14. García, R. R, Monteoliva, S. M y Ramos, C. A. (2002). Estudio de aplicabilidad como aditivo alimentario de un nuevo exopolisacárido obtenido de *Paenibacillus jamilae*. *Ars Pharmaceutica*, 43:3-4; 149-157.
15. García, G. M., Quintero, R. R. y López, M. A. (2005). *Biotecnología Alimentaria*, Ed. Limusa, México, pp. 301-306.
16. Garvie, E. I. (1986). Genus *Leuconostoc*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Eds. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. Baltimore, MD: The Williams and Wilkins Co.
17. Gottschalk, G. 1986. *Bacterial Metabolism*. 2nd. Ed. New York: Springer-Verlag.
18. Guel, L. J. M. y Rodríguez, L. M. (2000). El maguey, Recuperado el 26 de mayo de 2008, de http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_reinos/flora/maguey/maguey.htm).
19. Guillot, O. D. y Van Der Meer, P. (2008), Una nueva cita de la especie *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck en la Comunidad Valenciana, 2: 19-23 (II-2008).
20. Hinke, N. (2007). Breve léxico del maguey. *Ciencias*, 87, 24-26. Recuperado el 26 de mayo de 2008 de: <http://www.ejournal.unam.mx/cns/no87/CNS087000004.pdf>
21. Madrigal, G. S. (1999). Fermentación del pulque. Recuperado el 13 de febrero de 2009, de <http://veneno.com/1999/v-29/serg-29.html>.
22. Norma Mexicana NMX-F-103-1982. Alimentos. Frutas y derivados. Determinación de grados Brix. Foods. Fruits and derivatives. Determination of degrees Brix. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
23. Norma Mexicana NMX-V-017-S-1981. Determinación de extracto seco y cenizas. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
24. Norma Mexicana NMX-V-022-1972. Aguamiel. Hydromel. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.



25. Norma Mexicana NMX-V-029-1972. Método de prueba para la determinación de proteínas en aguamiel. Proteins determination in hidroment. Test method. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
26. Norma Mexicana NMX-V-032-1980. Bebidas alcohólicas. Determinación de densidad relativa. Alcoholic beverages. Determination of density. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
27. Norma Mexicana NMX-V-041-1972. Método de prueba para la determinación de pH en pulque. pH determination in pulque. Test method. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
28. Norma Mexicana NMX-V-042-1972. Método de prueba para la determinación de acidez total en pulque. Total acidity determination in pulque. Test method. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas.
29. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
30. Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994 Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
31. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
32. Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
33. Norma Técnica Estatal NTE-SAGEH-001/2006, que establece las bases y mecanismos de control, que determinan los criterios y especificaciones para regular la protección, conservación, aprovechamiento sustentable, fomento, transporte y comercialización del maguey y sus derivados.
34. Reiter, B., & Oram, J. D. (1982). Nutritional Studies on Cheese Starter. 1. Vitamin and Amino Acid Requirements of Single Strain Starters. *J. Dairy Res.* 29, 63-68.
35. Rose, A. H. (1982). Fermented foods. Vol. 7. Academic Press. USA. pp. 26-27.
36. Sánchez, M. A, y Hope, P. H. (1953). Agave juice. Fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1 (3), 241-249.
37. Schaufler, H. W. (2005). Las Levaduras algo sobre ellas. Recuperado el 08 de junio de 2008, de <http://www.cervezas-argentinas.com.ar>



38. Schegel, H. G. (1997). Microbiología General. Ediciones Omega. Barcelona, España. pp. 183.
39. Stanier, R. Y, Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. y Painter, P. R. (1996). Microbiología, 2ª edición, Ed. Reverté. Barcelona, España. pp. 93-482.
40. Zamora, A. (2008). Levaduras. Recuperado el 11 de febrero de 2009, de <http://www.galeon.com/alezamora/aficiones1893538.html>