



**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**DIVERSIDAD Y DINÁMICA MICROBIANA DURANTE LA PRODUCCIÓN DE  
PULQUE FERMENTADO USANDO UN REACTOR SEMICONTINUO Y  
MEMBRANAS DE MICROFILTRACIÓN**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS: PRODUCTOS NATURALES Y ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**I.Q. CONCEPCIÓN CALDERÓN GARCÍA**

**DIRECTOR:**

**DRA. PAULA CECILIA GUADARRAMA MENDOZA**

**CO-DIRECTOR:**

**DR. ROGELIO VALADEZ BLANCO**

**HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA. MARZO 2023**

Este trabajo se realizó en las instalaciones de los Laboratorios de Productos Naturales y Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, bajo la dirección de la Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza y el Dr. Rogelio Valadez Blanco. El trabajo experimental de Biología Molecular se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de Macromoléculas de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la supervisión de la Dra. Edith Ponce Alquicira. Se contó con el apoyo de beca de manutención número 1080629, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Parte de los resultados se presentaron en el XXIII Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, XII Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, XIX Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular, en la modalidad de cartel, organizado por el Colegio Mexicano de Ingenieros Bioquímicos AC, del 6 al 8 de abril de 2022, realizado en Bahías de Huatulco, Oaxaca.

**A la mujer más noble que he podido conocer:  
Eusebia Chávez M. (\*Agosto 1934 – Junio 2020 †)  
Mamá Eu.**

**A mí, por mi fortaleza y dedicación.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca, por permitirme crecer de manera profesional y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

A mis directores de tesis la Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza y al Dr. Rogelio Valadez Blanco, por aceptarme como parte del laboratorio, por la confianza brindada para llevar a cabo este proyecto y por todo el conocimiento brindado dentro y fuera de la institución, muchas gracias.

A la Dra. Edith Ponce Alquicira, gracias por todo el apoyo brindado durante mi estadía en la UAM Unidad Iztapalapa para la realización de este proyecto y sobre todo por el apoyo personal que me ha brindado. A la Dra. Carmen Juárez Castelán y la Mtra. Yesica Ruíz Ramírez por sus aportaciones al trabajo, muchas gracias.

A la Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez por su apoyo en la realización de este trabajo y las tutorías a lo largo de mis estudios, gracias.

A la Dra. Luz Hermila Villalobos Delgado, la Dra. Ludmila Elisa Guzmán Pantoja y la Mtra. Alma Yadira Salazar Govea, gracias por dedicar parte de su tiempo a la revisión de este trabajo.

A mis padres ya que gracias a ellos he podido llegar hasta donde estoy. Gracias por la disciplina, los valores, el apoyo y todo el amor que me brindan. Esto es también un logro de ustedes, los amo mucho.

A mi hermana, porque a pesar de la distancia y la poca comunicación sé que siempre podré contar contigo, al igual que tú conmigo. Gracias por no dejarme sola en momentos difíciles. Te amo infinitamente.

A mis compañeros y amigos Angie, Rubí, Juqui, Jess, por todo lo compartido, apoyo brindado y anécdotas compartidas.

A todas las personas que de alguna u otra forma han estado conmigo, me han brindado consejos, apoyo y compañía, ya que siempre es bien recibo.

A quien camina en este momento conmigo, gracias por compartir conmigo toda tu experiencia, por enseñarme a ser una mejor persona, por apoyarme en todo y quererme como solo tú lo sabes hacer.

## RESUMEN

El pulque es una bebida alcohólica ancestral tradicional mexicana que data de la época prehispánica. La UNESCO en el 2010 incluyó esta bebida en la Lista del Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad. Sin embargo, el pulque ha pasado por diversas etapas críticas, principalmente asociadas a una concepción negativa hacia la bebida, esto debido a que su proceso de producción no es aséptico. En este trabajo se estableció un sistema de fermentación semicontinuo con recambios secuenciales cada 24 h en condiciones estériles y se emuló la producción de pulque artesanal utilizando como sustrato aguamiel esterilizado mediante el uso de membranas de microfiltración, para su posterior inoculación con pulque semilla. Al pulque semilla que fue utilizado como inóculo, al aguamiel utilizado como sustrato, a los recambios productos del reactor y al producto final de la fermentación se les realizaron pruebas fisicoquímicas: acidez total (%A.T.), °Brix, grados de alcohol (°G.L), sólidos totales (%S.T.), pH, azúcares totales, azúcares reductores, así como, los parámetros de color utilizando el espacio de color CIE L\*a\*b\*. Adicionalmente, se realizó una evaluación sensorial de análisis descriptivo comparativo. Se estudió la población de microorganismos bacterias ácido lácticas (MRS), *Leuconostoc* (APT modificado) y levaduras (APD) mediante el empleo de los medios selectivos. Las colonias aisladas del pulque semilla y del proceso de fermentación semicontinuo se identificaron por la secuenciación del gen ARNr 16S en el caso de las bacterias y de la región ITS en el de levaduras, así como, por medio de la técnica de espectrometría de masas MALDI Biotyper®. Por otra parte, se realizó la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) para observar la diversidad y dinámica de los microorganismos durante la fermentación. El proceso de microfiltración para la esterilización del aguamiel no afectó sus atributos, debido a que permitió conservar las características fisicoquímicas. El pulque semilla presentó la mayoría de las características fisicoquímicas idóneas según lo establecido por el DOF, presentó crecimiento en todos los medios de cultivo, con mayor crecimiento en los medios APD y APT ( $10^8$  UFC/mL). El tiempo de fermentación para llegar al estado cuasi-estacionario fue de 6 y 8 días para el reactor 1 y reactor 2, respectivamente. Los productos finales alcanzaron concentraciones de los grupos de microorganismos estudiados mayores o similares que el pulque semilla. Los microorganismos cultivables pudieron ser identificados como: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lentilactobacillus diolivorans*, *Lactobacillus uvarum*, *Liquorilactobacillus capillatus*, *Fructilactobacillus sanfranciscensis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Además, la técnica de PCR-DGGE permitió conocer que conforme transcurría la fermentación la diversidad de microorganismos disminuía. En cuanto a las características sensoriales, los panelistas concordaron que se logró obtener un producto con características sensoriales similares a las del pulque semilla, e incluso con una percepción de mejora en los parámetros de aroma, efervescencia y amargor. La producción de pulque en un reactor semicontinuo en condiciones asépticas se logró exitosamente, ya que se evitó la variación durante el proceso de fermentación y a su vez se conservó la microbiota autóctona del pulque semilla. En esta investigación se empleó el proceso de microfiltración para la esterilización del aguamiel utilizado como sustrato, así como, la aplicación de espectrometría de masas MALDI Biotyper® y PCR-DGGE, dichas técnicas no se han indicado en la literatura hasta el momento en la producción de esta bebida.

# CONTENIDO

RESUMEN .....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XVI
1. INTRODUCCIÓN.....	19
2. ANTECEDENTES .....	20
2.1. GENERALIDADES DEL PULQUE .....	20
2.1.1. HISTORIA.....	20
2.1.2. IMPORTANCIA NUTRICIONAL Y POTENCIAL PROBIÓTICO.....	21
2.1.3. PRODUCCIÓN DE PULQUE EN MÉXICO.....	24
2.2. PROCESO ARTESANAL DE PRODUCCIÓN DE PULQUE .....	25
2.2.1. AGAVE PULQUERO Y PROCESO DE CAPADO .....	25
2.2.2. OBTENCIÓN DE AGUAMIEL.....	26
2.2.3. OBTENCIÓN DEL INÓCULO INICIAL O SEMILLA.....	27
2.2.4. PRODUCCIÓN DE PULQUE .....	28
2.3. PRINCIPIOS DE INGENIERÍA DE FERMENTACIONES .....	29
2.3.1. ETAPAS DE CRECIMIENTO MICROBIANO.....	30
2.3.2. PARÁMETROS IMPORTANTES DEL PROCESO .....	30
2.3.3. TIPOS DE PROCESOS DE FERMENTACIÓN.....	31
2.4. PROBLEMAS DE LA CALIDAD DEL PULQUE Y ESTRATEGIAS PARA SU ASEGURAMIENTO .....	33
2.5. PROCESOS DE FERMENTACIÓN ASÉPTICA.....	37
2.6. FUNDAMENTOS DE LOS PROCEOS DE MEMBRANAS DE MICROFILTRACIÓN .....	38
2.7. PROCESOS DE FERMENTACIÓN EN EL PULQUE Y SU MICROBIOTA .....	41
2.7.1. FERMENTACIÓN ÁCIDO-LÁCTICA.....	41
2.7.2. FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA .....	42
2.7.3. FERMENTACIÓN VISCOSA.....	42
2.8. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS Y DE CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS .....	43
2.8.1. MÉTODOS DEPENDIENTES DEL CULTIVO .....	43

2.8.2	MÉTODOS INDEPENDIENTES DEL CULTIVO .....	47
3.	ESTADO DEL ARTE .....	49
3.1.	PROCESOS SEMICONTINUOS DE FERMENTACIÓN DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS .....	49
3.2.	PROCESOS DE ESTERILIZACIÓN EN FRÍO DE BEBIDAS USANDO MEMBRANAS DE MICROFILTRACIÓN .....	50
3.3	DINÁMICA MICROBIANA EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL PULQUE .....	51
4.	MARCO CONCEPTUAL DE LA TESIS.....	54
4.1.	JUSTIFICACIÓN.....	54
4.2.	ORIGINALIDAD .....	55
4.3.	OBJETIVOS .....	56
4.3.1.	OBJETIVO GENERAL.....	56
4.3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	56
4.3.3.	METAS.....	57
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
5.1.	RECOLECCIÓN DE LA SEMILLA Y DE AGUAMIEL.....	59
5.2.	MICROFILTRACIÓN DEL AGUAMIEL .....	60
5.3.	PRODUCCIÓN DE PULQUE EN UN REACTOR SEMICONTINUO A NIVEL PILOTO .....	61
5.4.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL PULQUE .....	62
5.4.1.	COLOR .....	62
5.4.2.	pH.....	63
5.4.3.	ACIDEZ TOTAL .....	63
5.4.4.	SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES (°BRIX).....	63
5.4.5.	DETERMINACIÓN DEL % DE ALCOHOL (ETANOL) .....	64
5.4.6.	SÓLIDOS TOTALES (S.T.).....	64
5.4.7.	AZÚCARES REDUCTORES .....	65
5.5.	ANÁLISIS SENSORIAL .....	66
5.6.	CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA PRESENTE EN EL INÓCULO Y DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL PULQUE POR REACTOR SEMICONTINUO.....	69
5.6.1.	MEDIOS DE CULTIVO PARA CONTEO Y AISLAMIENTO DE GRUPOS MICROBIANOS PRESENTES EN LAS MUESTRA .....	69

5.6.2.	CULTIVO DE MICROORGANISMOS .....	70
5.6.3.	CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MICROSCÓPICA DE LAS COLONIAS .....	70
5.6.4.	ENUMERACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS.....	71
5.6.5.	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CARACTERÍSTICOS.....	72
5.7.	CARACTERIZACIÓN GENÉTICA MICROBIANA POR MÉTODOS DEPENDIENTES DE CULTIVO.....	73
5.7.1.	EXTRACCIÓN DE ADN DE COLONIAS AISLADAS.....	73
5.7.2.	ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.....	75
5.7.3.	AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL GEN ARNr 16S Y DE LA REGIÓN ITS 75	
5.7.4.	SECUENCIACIÓN DE GENES .....	80
5.7.5.	IDENTIFICACIÓN GENÉTICA.....	80
5.7.6	ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI Biotyper®.....	80
5.8.	CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA POR MÉTODOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO.....	81
5.8.1.	EXTRACCIÓN TOTAL DE ADN .....	81
5.8.2.	PCR-DGGE.....	82
5.9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	84
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	85
6.1.	MICROFILTRACIÓN DE AGUAMIEL .....	85
6.1.1.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL AGUAMIEL.....	86
6.3.	CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y EFECTO DE LA ULTRACONGELACIÓN .....	92
6.4.	PRODUCCIÓN DE PULQUE EN UN REACTOR SEMICONTINUO .....	93
6.4.1.	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA .....	94
6.4.2.	CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA .....	102
6.4.3.	CARACTERIZACIÓN SENSORIAL .....	105
6.5.	CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA PRESENTE EN EL INÓCULO Y DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL PULQUE POR REACTOR SEMICONTINUO.....	109
6.5.1.	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CARACTERÍSTICOS.....	109
6.5.2.	EXTRACCIÓN DE ADN DE COLONIAS AISLADAS.....	114
6.5.3.	AMPLIFICACIÓN DEL GEN ARNr 16S Y REGIÓN ITS.....	115

6.5.4	DIGESTIÓN ENZIMÁTICA .....	116
6.5.5	PURIFICACIÓN DEL ADN .....	117
6.5.6	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y SECUENCIACIÓN GENÉTICA .....	118
6.5.7	PCR–DGGE .....	122
7.	CONCLUSIONES .....	130
8.	PERSPECTIVAS .....	132
9.	REFERENCIAS .....	133
10.	APÉNDICES .....	141
A.1.	Curva estándar de glucosa para la cuantificación de azúcares totales por el método Dubois.....	141
A.2.	Curva estándar de glucosa para la cuantificación de azúcares reductores por el método Miller.....	141
A.3	Visualización de geles de extracción de ADN genómico de las cepas aisladas .....	142
A.4	Visualización de geles de amplificación del gen ARNr 16S y región ITS a partir del ADN genómico de las cepas aisladas.....	143
A.5	Visualización de geles de digestión enzimática del gen ARNr 16S y región de las cepas aisladas.....	145
A.6	Visualización de geles de purificación del gen ARNr 16S y región ITS a partir de las cepas aisladas.....	147
A.7	Concentración de ADN de las cepas después del proceso de extracción y purificación .....	149
A.8	Árbol filogenético de las cepas aisladas e identificadas.....	150
A.9	Visualización de un ejemplo de identificación exitosa por la técnica de espectrometría de masas MALDI Biotyper® .....	151
A.10	Espectros correspondientes a las cepas no identificadas por MALDI Biotyper®... 152	
A.11	Visualización de geles de extracciones totales, amplificaciones de los días de fermentación y de las cepas seleccionadas como blancos positivos. ....	155

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Curva tipo de crecimiento microbiano en un proceso lote. Fases de crecimiento: A) Lag, B) Exponencial, C) Estacionaria, D) Muerte .....	30
Fig. 2. Diagrama del proceso de fermentación por lotes.....	31
Fig. 3. Diagrama del proceso de fermentación continuo.....	32
Fig. 4. Diagrama del proceso de fermentación semicontinuo. ....	33
Fig. 5. Representación de las configuraciones de flujo para los sistemas de filtración por membranas. a) Flujo normal, b) Flujo tangencial. ....	40
Fig. 6. Diagrama de un equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF.....	46
Fig. 7.- Electroforesis de geles con gradiente desnaturizante. ....	48
Fig. 8. Ubicación del municipio de Singuilucan en el estado de Hidalgo. ....	59
Fig. 9. Imagen de módulo de fluidos. a) Entrada de alimentación. b) Salida de retenido. c) Salida de permeado. d) Membrana de microfiltración. e) Bomba peristáltica.....	60
Fig. 10. Diagrama del proceso por lotes con recambios secuenciales de producción de pulque. ....	61
Fig. 11. Boleta de evaluación del análisis sensorial para el pulque semilla (inóculo) y las muestras de pulque a lo largo de la fermentación y el pulque final. ....	67
Fig. 12. Formato de evaluación sensorial para la producción de pulque.....	68
Fig. 13. Criterios de caracterización morfológica colonial.....	71
Fig. 14. Termociclador Mastercycle Eppgradient Modelo 5341 (Eppendor, Hamburg, Alemania).....	77
Fig. 15. Fotodocumentador Molecular Imager Gel-Doc™ XR+ System .....	79
Fig. 16. a) Analizador MALDI Biotyper® (Bruker Daltonik GmbH GmbH, Alemania), b) placa de ensayo (Steel Target Sample Plate).....	81
Fig. 17. Microfiltración de aguamiel en módulo de filtración tangencial Millipore en condiciones asépticas. ....	86
Fig. 18. Reactor semicontinuo empleado para la producción de pulque. ....	94
Fig. 19. Dinámica de los resultados del análisis de diferencia de color de las muestras de pulque proveniente de los reactores. P.S=Pulque semilla. Se presenta la media $\pm$ desviación estándar en forma de barras(n=3) .....	95

Fig 20. Dinámica de los resultados del análisis de pH y % Acidez Total de las muestras de pulque proveniente de los reactores. P.S=Pulque semilla, %A.T= % Acidez Total (g ácido láctico/100 mL). Se presenta la media $\pm$ desviación estándar en forma de barras (n=3) .97	97
Fig. 21.Dinámica de los resultados del análisis de azúcares de las muestras de pulque proveniente de los reactores. P.S=Pulque semilla, Az.=Azúcares. Se presenta la media $\pm$ desviación estándar en forma de barras (n=3) .....	99
Fig. 22.Dinámica de los resultados del análisis de ° Brix y sólidos de las muestras de pulque proveniente de los reactores. P.S=Pulque semilla, %S:T= % de sólidos totales. Se presenta la media $\pm$ desviación estándar en forma de barras (n=3).....	100
Fig. 23. Cinética de población de bacterias ácido lácticas crecidas en medio MRS en los lotes de fermentación semicontinua de pulque. Se presenta la media $\pm$ desviación estándar en forma de barras (n=3).....	103
Fig. 24. Cinética de población de levaduras crecidas en medio APD en los lotes de fermentación semicontinua de pulque. Se presenta la media $\pm$ desviación estándar en forma de barras (n=3).....	103
Fig. 25. Cinética de población de bacterias de tipo Leuconostoc crecidas en medio APT modificado en los lotes de fermentación semicontinua de pulque. Se presenta la media $\pm$ desviación estándar en forma de barras (n=3). .....	104
Fig. 26. Prueba sensorial de las muestras de pulque provenientes del primer lote del reactor semicontinuo. ....	107
Fig. 27. Prueba sensorial de las muestras de pulque provenientes del segundo lote del reactor semicontinuo. ....	108
Fig. 28. Ejemplificación de la microscopía (tinción Gram) del aislamiento de cepas microbianas presentes en el pulque en diferentes medios de cultivo: a) bacterias ácido lácticas (MRS), b) bacterias del género Leuconostoc (APT), c) levaduras (APD). ....	109
Fig. 29 . Ejemplificación de la presencia de catalasa del aislamiento de cepas microbianas presentes en el pulque: a) bacteria ácido láctica (negativo), b) bacteria Leuconostoc (negativo), c) levadura (positivo).....	110
Fig. 30. Ejemplo de asignación de código a cepas aisladas.....	111
Fig. 31. Imagen representativa de la electroforesis del ADN genómico extraído de distintos aislados bacterianos seleccionados. En el primer carril se muestra el bandeo del marcador de peso molecular (GeneRuler de 1 kb DNA Ladder, Fermentas, EUA). ....	115

Fig. 32. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR. a) Bando del marcador de peso molecular (GeneRuler) de 1 kb DNA Ladder, Fermentas, EUA). b) Ejemplo de productos de PCR del gen ARNr 16S. ....	116
Fig. 33. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos digeridos. Carril 1: Bando del marcador de peso molecular (GeneRuler de 1 kb DNA Ladder, Fermentas, EUA), 2: PUBI, 3: PUBIII, 4: PUBIV, 5: PUBV, 6: PUB6, 7: PUB7, 8: PUB9.....	116
Fig. 34. Electroforesis en gel agarosa al 1% de productos de purificación. a) Bando del marcador de 1 kb, b) ejemplo de purificación del gen ARNr 16S. 2: PUBI, 3: PUBIII, 4: PUBIV, 5: PUBV, 6: PUB6, 7: PUB7, 8: PUB9. ....	117
Fig. 35. Placa de ensayo de MALDI Biotyper® (Steel Target Sample Plate). ....	118
Fig. 36. Intervalos de valores proporcionados por el software MALDI Biotyper®.....	119
Fig. 37. Pantalla del software MEGA.....	119
Fig. 38. Visualización de ADN total (agarosa al 1%) y fragmentos de las regiones V3, V6-V8 y D1 (agarosa al 2%). A) ADN total, B) Amplificación de la región V6-V8 (~400 pb), C) Amplificación de la región V3 (~200 pb), D) Amplificación de la región D1 (~600 pb)..	123
Fig. 39. Perfil de bandas de la DGGE (gradiente desnaturizante 30-60%) de las muestras de pulque utilizando los cebadores correspondientes a la región D1 del gen ARNr 26S de levaduras. ....	124
Fig. 40. Perfil de bandas de la DGGE (gradiente desnaturizante 30-60%) de las muestras de pulque utilizando los cebadores correspondientes a la región V3 del gel ARNr 16S de bacterias. ....	126
Fig. 41. Perfil de bandas de la DGGE (gradiente desnaturizante 30-60%) de las muestras de pulque utilizando los cebadores correspondientes a la región V6-V8 del gen ARNr 16S de bacterias. ....	128

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen nacional de la producción de maguey pulquero del 2015 al 2020 .....	25
Tabla 2. Especificaciones del aguamiel de acuerdo con la norma mexicana NMX-V-022-1972 .....	27
Tabla 3. Comparación de los niveles microbianos en aguamiel y pulque de tres ranchos del estado de Oaxaca. [28] .....	35
Tabla 4. Cambios en la microbiota de aguamiel y pulque, en función del tiempo después de la apertura de la planta de agave. ....	36
Tabla 5. Propiedades de separación de las diferentes tecnologías de membrana [32].....	39
Tabla 6. Mezcla de reacción para PCR empleando la enzima Taq Polimerasa recombinante (ThermoScientific, EUA).....	76
Tabla 7. Mezcla de reacción para la digestión enzimática. ....	78
Tabla 8. Condiciones de PCR para amplificar las regiones V3 y V6-V8 del gen ARNr 16S..	82
Tabla 9. Condiciones de PCR para la región D1 del gen ADNr 26S. ....	83
Tabla 10. Resultados de las pruebas fisicoquímicas realizadas al primer lote de aguamiel. ....	87
Tabla 11. Resultados de las pruebas fisicoquímicas realizadas al segundo lote de aguamiel. ....	88
Tabla 12. Resultados de las pruebas fisicoquímicas realizadas al pulque semilla.....	90
Tabla 13. Crecimiento microbiano de las muestras de pulque en los diferentes medios selectivos. ....	92
Tabla 14. Características fisicoquímicas de los diferentes pulques obtenidos mediante fermentación semicontinua. ....	101
Tabla 15. Características sensoriales de pulque semilla y de los productos finales de los diferentes lotes de fermentación.....	106
Tabla 16. Microorganismos cultivables aislados a partir del pulque semilla ultracongelado (PU) y el pulque producto final del reactor 1 (PR) .....	110
Tabla 17. Códigos y características de las cepas aisladas. ....	111
Tabla 18. Resultados de la identificación por MALDI Biotyper® y secuenciación de gen ARNr 16S y región ITS. ....	120
Tabla 19. Evaluación digital de los índices de la comunidad microbiana de la región D1. S (riqueza de especies), H (Diversidad de especies), y J (Uniformidad de Pielou).....	125

Tabla 20. Evaluación digital de los índices de la comunidad microbiana de la región V3. S (riqueza de especies), H (Diversidad de especies), y J (Uniformidad de Pielou)..... 127

Tabla 21.Evaluación digital de los índices de la comunidad microbiana de la región V6-V8 . S (riqueza de especies), H (Diversidad de especies), y J (Uniformidad de Pielou)..... 129

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
AT	Acidez total
BAL	Bacterias ácido lácticas
Buffer	Solución amortiguadora que puede resistir el cambio de pH
CFU	Unidades formadoras de colonias
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetil amonio
Da	Dáltones
DGGE	Electroforesis de geles con gradiente desnaturalizante
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DOF	Diario oficial de la federación
FCp	Factor de concentración proteico
FCs	Factor de concentración de sólidos
FCv	Factor de concentración volumétrico
GRAS	Generalmente Reconocidas como Seguras
g	Gramos
HTST	Alta temperatura y tiempo corto
h	Horas
ITS	Espaciador transcrito interno ribosómico
kDa	Kilo Dáltones
kPa	Kilo Pascales

Ln	<i>Leuconostoc</i>
L	Litros
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
mL	Mililitros
min	Minutos
nm	Nanómetros
OTU	Unidades taxonómicas operativas
P	Producto de fermentación deseado
PMC	Peso molecular de corte
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PU	Pulque ultracongelado
PR	Pulque proveniente del reactor semicontinuo
pb	Pares de bases
rpm	Revoluciones por minuto
So	Sustrato inicial
ST	Sólidos totales
snm	Sobre nivel de mar
TRH	Tiempo de retención hidráulico
TOF	Tiempo de vuelo
UHT	Temperatura ultra alta
UV	Ultravioleta
Xo	Concentración celular inicial
μL	Microlitros

μm

Micrómetros

°G.L

Grados de alcohol

# 1. INTRODUCCIÓN

El pulque es una bebida alcohólica ancestral tradicional mexicana que data de la época prehispánica, los antiguos aztecas desarrollaron diversas técnicas para su producción. Después de la caída del imperio azteca, el pulque perdió su valor en ceremonias religiosas y se volvió una bebida coloquial. A pesar de esto, desde los tiempos prehispánicos, diferentes beneficios nutricionales se han asociado al consumo de aguamiel y del pulque. Actualmente, con el incremento de los estudios de alimentos funcionales, estos efectos benéficos pueden explicarse por la actividad probiótica y prebiótica de los componentes del pulque. Hasta hace una o dos décadas, el pulque estaba desapareciendo del mercado, y sólo se encontraba en áreas rurales y en *pulquerías* frecuentadas principalmente por gente de bajos recursos económicos.

Un factor por el cual se ha visto fuertemente reducida tanto la demanda como la producción de pulque es la percepción negativa de algunos consumidores de las pulquerías y en algunos casos del pulque en sí mismo. Una de las razones principales de la concepción negativa del pulque es porque su proceso de producción se lleva a cabo bajo condiciones no sanitarias. Esto hace que esta bebida sea susceptible de descomposición bioquímica y microbiana, e incluso puede llegar a ser fuente de enfermedades transmitidas por alimentos. Debido a que se tiene diversos factores que no se atienden en el procesamiento del pulque, la bebida presenta pérdidas en la calidad fisicoquímica, sensorial, microbiológica y sanitaria.

Todos estos aspectos negativos en la producción de la bebida evitan que se puedan aprovechar los aspectos benéficos y potenciales del pulque. Por lo anterior, el objetivo principal de este proyecto fue evaluar la dinámica microbiana, fisicoquímica y sensorial del pulque producido en un proceso aséptico por lotes con recambios secuenciales en estado cuasi-estacionario mediante técnicas de análisis moleculares de PCR dependientes e independientes del cultivo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. GENERALIDADES DEL PULQUE

#### 2.1.1. HISTORIA

El pulque es una bebida alcohólica ancestral tradicional mexicana que tuvo su primer auge en la época de los antiguos aztecas, quienes conocían al pulque como metoctli en náhuatl (metl = agave o maguey, y octli = vino) también como iztacoctli (izac = blanco y octli = vino) vino blanco [1]. Posteriormente, en la sociedad de la Nueva España su producción y consumo tuvo un auge significativo, convirtiéndose en una bebida muy popular. Este auge se vio reflejado en el establecimiento de haciendas pulqueras, que eran fincas dedicadas a la producción y comercialización del pulque [1]. De este modo para finales del siglo XIX y principios del XX, la agroindustria pulquera alcanzó su mejor momento en la historia moderna de México.

Sin embargo, la producción de pulque en México ha pasado por etapas críticas. La primera crisis ocurrió antes de la guerra de independencia, entre los años 1629 y 1786, tiempo durante el que se prohibió su consumo y producción porque se le relacionó con problemas sanitarios. La segunda caída en la producción de este producto ocurrió en el año de 1935 cuando se decretó la Ley de Impuestos sobre Aguamiel y Productos de su Fermentación, que resultó en el posicionamiento de la cerveza como la bebida más popular, y en un declive estrepitoso en la producción de pulque que se prolongó hasta hace apenas un par de décadas [1,2]. Hasta el año 2000, el pulque estaba desapareciendo en el mercado, sólo se encontraba en áreas rurales y en *pulquerías* frecuentadas por consumidores de escasos recursos económicos [2].

Sin embargo, en los últimos años se ha dado un resurgimiento en la valorización y consumo de esta bebida debido a que en México se ha dado lo que Rojas-Rivas et al. [3] llaman "neo-consumidores", que consiste en el incremento de jóvenes consumidores de pulque, que están informados acerca de las propiedades nutricionales y funcionales de este producto y que son afines al consumo de alimentos tradicionales mexicanos. Estos neo-consumidores promocionan la bebida dentro de sus círculos sociales y así es como se incrementan las visitas a las pulquerías o directamente a los sitios de venta en restaurantes, o en los lugares de producción. Cabe mencionar que la UNESCO en el 2010 incluyó esta bebida en la Lista

del patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad [4]. Esto puede explicar el hecho de que la producción del pulque ha aumentado en los últimos años.

### **2.1.2. IMPORTANCIA NUTRICIONAL Y POTENCIAL PROBIÓTICO**

El pulque es una bebida alcohólica tradicional mexicana fermentada, no destilada, de aspecto viscoso, color blanco y ligeramente ácida (4.5 pH), obtenida a partir de la fermentación de aguamiel fresco que es la savia del maguey.

Desde los tiempos prehispánicos, diferentes beneficios nutricionales se han asociado al consumo de aguamiel y del pulque [1]. Uno de los primeros estudios acerca de los beneficios nutricionales asociados al consumo de pulque se realizó en la población indígena Otomí del Valle del Mezquital en el siglo XX. Los autores indicaron que el consumo diario de pulque en adultos (de 1 a 2 L) aporta calorías (12%), proteína (6%), tiamina (10%), riboflavina (24%), niacina (23%), vitamina C (48%), calcio (8%) y hierro (51%) [5].

Con los diversos estudios publicados que demuestran los beneficios del pulque, esta bebida es considerada saludable por ser una buena fuente de aminoácidos esenciales, vitaminas y energía. Aunado a esto, se ha observado que el pulque puede suplir las deficiencias de hierro y zinc. Entre los aminoácidos presentes en el pulque, los más importantes son la lisina y el triptófano, que generalmente son deficientes en la dieta mexicana que está constituida a base de maíz y frijol [1,5,6].

Por otra parte, el consumo de pulque se asocia no solo a beneficios en la nutrición, sino también a la prevención o control de enfermedades, por lo que se destacan sus usos en la medicina tradicional, principalmente en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Actualmente, con el incremento en los estudios sobre alimentos funcionales, estos efectos benéficos pueden explicarse por la actividad probiótica y prebiótica de los componentes de esta bebida [1,2].

A través del tiempo se han propuesto diferentes definiciones para el término probiótico; sin embargo, no fue hasta el 2001 cuando la FAO/OMS [7] definió a los probióticos como: "microorganismos vivos que, administrados en concentraciones adecuadas, pueden proveer un beneficio a la salud del hospedero". Patel et al.[8] asociaron a los probióticos con bioactividades antitumorales, inmunorreguladoras y la reducción de colesterol. Para que una bacteria sea considerada probiótica debe cumplir varios requisitos, entre los que se

encuentran los siguientes: capacidad de sobrevivir a las condiciones del procesado del alimento, resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal, actividad antimicrobiana, inocuidad, estimulante del sistema inmune y de las funciones intestinales [9].

En la actualidad, existe una gran variedad de productos comerciales que contienen microorganismos probióticos que han sido caracterizados ampliamente. Los microorganismos que predominan en estos productos son los pertenecientes al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL). Las BAL se consideran cultivos ideales para ser usados como probióticos y constituyen la población nativa dominante de muchos productos tradicionales fermentados. Otra de las razones del uso de las BAL como probióticos es que muchos de los géneros pertenecientes a este grupo (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, etc.) cumplen con el distintivo de Generalmente Reconocidas como Seguras (GRAS) por la FDA [10,11]. A los productos probióticos se les atribuyen diversos beneficios clínicos para la salud, entre los que se encuentran los siguientes: reducción de intolerancia a la lactosa, antipatogénicos, antiinflamatorios, antidiabéticos, antiobesidad, anticancerígenos, antialérgicos y angiogénicos. Adicionalmente, cabe destacar los últimos resultados publicados del efecto positivo de los probióticos en el cerebro y el sistema nervioso central [11,12].

Cervantes-Elizarrarás et al. [13] realizaron el aislamiento de BAL de pulque y aguamiel proveniente de la comunidad de Mineral de la Reforma, Hidalgo. Los autores realizaron la identificación genética por medio de la secuenciación del gen ARNr 16S y evaluaron *in vitro* el potencial probiótico y la actividad antimicrobiana de las BAL aisladas. Para determinar el potencial probiótico de las cepas se evaluó la resistencia a antibióticos, sobrevivencia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal (jugo gástrico: pH 2 y 1% de pepsina; y jugo intestinal: 0.3% sales biliares y 1% de pancreatina) y la actividad antimicrobiana. Los autores aislaron 10 cepas BAL, de las cuales 9 fueron identificadas como pertenecientes al género *Lactobacillus* y una al género *Pediococcus*. Adicionalmente, en el estudio se evaluó la resistencia de las cepas a antibióticos, resultando en 7 cepas con resistencia a todos los antibióticos excepto a vancomicina; todas las cepas mostraron sobrevivencia al jugo gástrico y jugo intestinal con valores de 63.2-96.3% y 47.8-89.2%, respectivamente; y 6 cepas inhibieron a los patógenos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

En otro estudio, Giles-Gómez et al. [14] evaluaron el potencial probiótico *in vitro* e *in vivo* de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* P45 aislada de pulque proveniente de Huitzilac, Morelos. Los autores realizaron ensayos *in vitro* de resistencia a condiciones del tracto gastrointestinal (lisozima, pH ácido y sales biliares) y actividad antimicrobiana contra patógenos del ser humano transmitidos por alimentos. Después de exponer a la cepa a 100 mg/mL de lisozima durante 30 y 120 min, los autores encontraron una sobrevivencia de 90 y 71%, respectivamente. Adicionalmente, la cepa fue sometida a un pH de 2.5 por 24 h a 37 °C, brindando una sobrevivencia del 75%, que fue mayor a la presentada por la cepa *L. casei* Shirota (48%). Por otra parte, la cepa fue evaluada a dos concentraciones de sales biliares (0.3 y 1%) por 24 h a 37 °C, resultando en una sobrevivencia de 100%. Además de esto, la cepa mostró actividad antimicrobiana *in vitro* contra *E. coli* enteropatógena, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* Typhi y Thyphimurium. Adicionalmente, los autores realizaron un ensayo *in vivo* en 18 ratones hembra y machos de 8 semanas de edad; a los cuales se les administró una dosis de la cepa *Ln. mesenteroides* P45 de  $2 \times 10^9$  UFC/día durante 7 días. En el día 8, a los ratones se les administró la cepa patógena  $1 \times 10^7$  UFC/día de *S. Typhimurium* L133 por medio de una sonda gástrica. Los autores hallaron que la administración de la cepa de prueba fue capaz de disminuir la infección del patógeno en al menos un ciclo logarítmico durante un periodo de 3 días.

Por otra parte, Castro-Rodríguez et al. [15], evaluaron las propiedades probióticas de 4 cepas de *Ln. mesenteroides* aisladas de aguamiel de *Agave salmiana* de Nopaltepec, Estado de México. Las cepas fueron evaluadas a pH ácido, sales biliares, así como por su capacidad de adhesión a la pared intestinal y su actividad antagónica contra microorganismos patógenos. Los autores encontraron que a pH 2 las cepas presentaron porcentajes de sobrevivencia de 40 a 50%, mientras que para una concentración de 0.5% de sales biliares se tuvieron porcentajes de sobrevivencia de 88 a 90%. Por otra parte, los autores evaluaron la adhesión de las cepas a la pared intestinal utilizando el intestino de ratas Wistar macho de 3 meses, dando como resultado porcentajes de adhesión de 79 a 83%. Las cepas estudiadas mostraron actividad antagónica contra los patógenos *E. coli*, *S. entérica* y *Listeria monocytogenes*.

En una investigación más reciente, Ruíz-Ramírez et al. [16] presentan los resultados del potencial probiótico de BAL aisladas de pulque proveniente de tres localidades diferentes de los estados de Oaxaca y Puebla, como control utilizaron la cepa probiótica ampliamente

estudiada *Lact. acidophilus* NCFM. Los autores indicaron que las cepas fueron resistentes a acidez (pH 2) y sales biliares (0.5%) con porcentajes de sobrevivencia del 87% y 92%, respectivamente. Adicionalmente, las cepas presentaron actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. enterica*, esto posiblemente debido a la producción de compuestos proteicos.

### **2.1.3. PRODUCCIÓN DE PULQUE EN MÉXICO**

El proceso tradicional de elaboración de pulque inicia con la extracción del aguamiel, que se obtiene principalmente de las especies *Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. mapisaga* y *A. salmiana*. Estas especies crecen principalmente en suelos secos, climas fríos y altitudes entre 1800 y 2700 msnm. El aguamiel se extrae de agaves maduros (entre 7 y 10 años), que están a punto de producir su floración, llamada quiote [6].

El maguey utilizado para la elaboración de pulque se produce principalmente en el Altiplano Central Mexicano; región que comprende los estados de Aguascalientes, Durango, Hidalgo, México, Michoacán, Puebla, San Luis Potosí y Oaxaca. En el año 2016 los principales productores de aguamiel fueron: Hidalgo, que registró una producción de 194,579 toneladas (78.1%), Tlaxcala con 38,328 toneladas (15.4%), Puebla con 10,349 toneladas (4.2%) y el Estado de México con 4.13 toneladas (1.7%) [17]. De acuerdo con el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), la producción de maguey pulquero en el 2017 fue de 217.7 millones de litros, de los cuales Hidalgo aportó 69.6%. En la Tabla 1 se muestra un resumen nacional del 2015 al 2020 de la superficie cosechada, producción y rendimiento de maguey pulquero [18].

Tabla 1. Resumen nacional de la producción de maguey pulquero del 2015 al 2020

<b>Año</b>	<b>Superficie cosechada (ha)</b>	<b>Producción (ton)</b>	<b>Rendimiento (L/ha)</b>
2015	3,432	335,731	97.82
2016	3,143	248,443	79.05
2017	3,980	217,691	54.70
2018	3,108	177,522	57.12
2019	2,683	172,774	64.40
2020	3,693	177,524	48.07

## **2.2. PROCESO ARTESANAL DE PRODUCCIÓN DE PULQUE**

El proceso de producción de pulque de forma artesanal consta de cuatro etapas: 1) la castración o capado del maguey; 2) raspado del maguey y obtención de aguamiel; 3) obtención del inóculo inicial / semilla; y 4) proceso de fermentación para obtener el pulque. A continuación, se detallan los procesos seguidos en cada una de estas etapas.

### **2.2.1. AGAVE PULQUERO Y PROCESO DE CAPADO**

El género *Agave*, conocido como maguey, se compone por plantas suculentas que engloban alrededor de 206 especies. Estas plantas se localizan en América Central y alrededor del 75% de ellas se pueden encontrar en México. Dentro de las especies de agaves, existe un grupo de gran importancia conocido como magueyes pulqueros que incluyen *A. americana*, *A. atrovirens*, *A. mapisaga* y *A. salmiana*. Estos agaves de pulque son plantas de gran tamaño, que pueden llegar a medir más de 5 m de diámetro y 10 m de altura [19,20]

El cultivo de las plantas de maguey se realiza con semillas y/o la propagación se lleva a cabo por la producción de matecuates, plántulas adquiridas de las plantas adultas. Estas plantas tienen un proceso de maduración que va de 7 a 12 años, necesario para que puedan utilizarse en la producción de pulque. Una vez que cumple su maduración, la planta de maguey comienza su floración para la producción de semilla. Después de esto la planta muere.

El proceso de castración o capado consiste en eliminar el capullo floral de los agaves maduros de 7 a 10 años. Al abrir el maguey se deja una cavidad en el centro del agave llamada cajeta, el cual, se cubre con hojas de la planta o piedras para proteger de su interacción con el ambiente. El capado usualmente se hace antes de que el tallo del maguey (quiote) brote, ya que si el quiote se deja brotar la planta no producirá aguamiel; sin embargo, algunos productores han llegado a capar el maguey con quiote asegurando que el aguamiel es mejor. Por otro lado, si el maguey se capa cuando éste es joven, la planta tendrá una baja productividad de aguamiel, además de que no será de buena calidad para la producción de pulque [1,2].

### **2.2.2. OBTENCIÓN DE AGUAMIEL**

Una vez realizada la castración del maguey se raspa el cajete para producir la secreción de aguamiel, que está constituido por la savia de la planta. El aguamiel tiene un aspecto ligeramente turbio y ligeramente espeso, y dependiendo de la especie puede ser de muy dulce a ligeramente ácido. El aguamiel acumulado en el cajete del maguey se recolecta cada 12 h aproximadamente (al amanecer y al anochecer). Después de cada colecta se realiza un nuevo raspado para que la planta siga produciendo aguamiel. El volumen de aguamiel producido varía con respecto al tamaño y edad de la planta, presentando en los primeros 6 meses después del capado su mayor producción, misma que va disminuyendo hasta la muerte de la planta [1,2]. La norma NMX-V-022-1972 [21] indica las especificaciones fisicoquímicas y bioquímicas que debe tener el aguamiel fresco recién recolectado (Tabla 2), así como, las características sensoriales de este producto: color ámbar, aspecto translúcido, sabor dulce y olor característico.

Tabla 2. Especificaciones del aguamiel de acuerdo con la norma mexicana NMX-V-022-1972

Especificaciones	Tipo I		Tipo II
	Mínimo	Máximo	Menor de:
pH	6.6	7.5	4.5
Densidad grados Baumé (Bé)	5	7	4.5
Índice de refracción con el refractómetro de inmersión a 20 °C.	59	100	27
Sólidos totales g/100 mL.	12	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	0.2
Proteínas mg/100 mL.	300	600	100
Cenizas mg/100 mL.	300	430	180
			<b>No mayor de:</b>
Acidez mg/100 mL (como ácido láctico).	0.90	1.03	4.0

### 2.2.3. OBTENCIÓN DEL INÓCULO INICIAL O SEMILLA

Para la producción del inóculo o "semilla" se deja fermentar una pequeña cantidad de aguamiel fresco en una tina de aproximadamente 20 L dedicada únicamente a la producción de la semilla. La fermentación se lleva a cabo de 1 a 4 semanas dependiendo de la época

del año. El mosto maduro se caracteriza por el desarrollo de un sabor a alcohol (característico del pulque) y por la aparición de una capa blanquecina en la superficie llamada *zurrón*. Una vez terminada la fermentación, se agrega al mosto pequeñas cantidades de aguamiel fresco hasta completar la suficiente cantidad de inóculo para la producción del pulque, y se transvasa a tinajas de 200 L en las cuales se lleva a cabo la fermentación del producto final [1,2].

#### **2.2.4. PRODUCCIÓN DE PULQUE**

La fermentación del pulque se lleva a cabo en un recipiente con un volumen de aproximadamente 200 L (considerando una semilla de 20 L). Una vez colocado el inóculo inicial, se agrega el aguamiel previamente filtrado con manta para remover insectos o fragmentos de hojas de plantas. La fermentación dura entre 6 y 14 h dependiendo de las condiciones ambientales y de las características del inóculo y del aguamiel [1,2]. Es una práctica común en la producción del pulque la de realizar ciclos de fermentación de 12 h, que se sincronizan con los tiempos de colecta de aguamiel y raspado de la planta en la madrugada y en la tarde.

Una de las metodologías empleadas para la producción del lote inicial de pulque es un proceso por lote alimentado, el cual, consiste en que una vez que se tiene el recipiente en donde se realizará la fermentación con la semilla en él, aproximadamente 20 L, se alimenta aguamiel fresco que se recolecta cada 12 h hasta que alcanza aproximadamente 3/4 o 2/3 del tanque de fermentación. Una vez que se tiene el fermento inicial, cada 12 h se colecta pulque del tanque y se introduce la misma cantidad de aguamiel fresco. El volumen de colecta y alimentación puede llegar a ser hasta 1/3 del volumen del mosto de fermentación. Este proceso de recambio puede continuar indefinidamente por hasta 6 meses o incluso un año, a menos que haya un problema de contaminación por el cual se produzcan sabores y olores que no sean propios del pulque.

Existen diferentes modos de producción del pulque que dependen de la tradición pulquera de cada localidad y región. La técnica de fermentación que se utilizará en este trabajo es la de proceso de fermentación semicontinuo, que emula al proceso original antes descrito. De acuerdo con lo anterior, en el proceso de fermentación del pulque se deben considerar varios factores que influyen en la calidad fisicoquímica, microbiológica y sensorial del pulque

final. Entre los factores más importantes están la temperatura ambiental, la madurez y la calidad del inóculo inicial.

## **2.3 PRINCIPIOS DE INGENIERÍA DE FERMENTACIONES**

Un biorreactor es un equipo en donde se lleva a cabo el proceso de fermentación. La forma de operación de un biorreactor varía en función del producto final deseado y el proceso de fermentación que se lleva a cabo dentro del mismo. Para que las operaciones del biorreactor se efectúen de manera eficiente es deseable tener conocimiento de la dinámica de crecimiento microbiano, así como, de las condiciones óptimas adecuadas para los microorganismos fermentadores de acuerdo con los objetivos del proceso.

La fermentación es un proceso en el cual las velocidades de crecimiento microbiano y de síntesis de productos de la fermentación dependen de las características intrínsecas de los microorganismos, así como, del medio de cultivo y las condiciones ambientales del biorreactor. Debido a esto es importante identificar qué tipo de microorganismos están presentes en el cultivo. Por otra parte, el método de respiración de los microorganismos requerido para el catabolismo de nutrientes determina el modo de procesamiento del biorreactor [22]. De acuerdo con esto, se tiene la siguiente clasificación:

### *Microorganismos anaerobios*

Estos microorganismos, son bacterias en su mayoría, autótrofos, de metabolismo catabólico. Sus células no utilizan la glucólisis para la respiración celular; en cambio poseen una respiración oxidativa, en la que utilizan moléculas orgánicas como aceptores de electrones.

### *Microorganismos facultativos*

Microorganismos de metabolismo mixto (anabolismo y catabolismo) que poseen la capacidad de sobrevivir en ambientes aerobios y anaerobios.

### *Microorganismos aerobios*

Microorganismos que pertenecen en su mayoría al reino eucariota. Sus células utilizan la glucólisis como forma de respiración y son de metabolismo principalmente anabólico.

### 2.3.1 ETAPAS DE CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento microbiano durante el proceso de fermentación está controlado por el contenido de sustrato y la producción de metabolitos en el medio. La cinética de crecimiento microbiano en un reactor por lote se divide en cuatro etapas (Fig. 1) [23]:

- A) Fase Lag.: periodo de adaptación o latencia; fase en la que no hay crecimiento aparente.
- B) Fase exponencial: etapa de crecimiento exponencial; los microorganismos alcanzan su máxima velocidad de crecimiento.
- C) Fase estacionaria: desaparece el crecimiento exponencial debido al agotamiento de sustrato o a la toxicación del medio.
- D) Fase de muerte: la velocidad de muerte microbiana es progresivamente mayor que la velocidad de crecimiento.

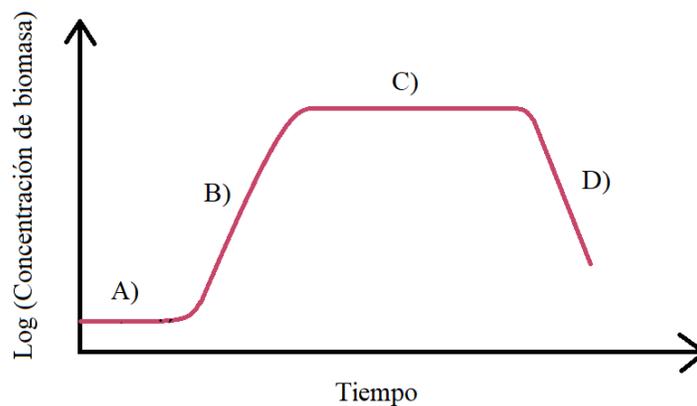


Fig. 1. Curva tipo de crecimiento microbiano en un proceso lote. Fases de crecimiento: A) Lag, B) Exponencial, C) Estacionaria, D) Muerte.

### 2.3.2 PARÁMETROS IMPORTANTES DEL PROCESO

Los parámetros del proceso que se deben considerar para el desarrollo óptimo de los microorganismos son la temperatura y el pH. La temperatura es importante dado que su variación afecta el crecimiento microbiano; puede provocar un decaimiento e incluso la muerte de los microorganismos, ya que éstos crecen en un cierto intervalo de temperatura óptima. Otro parámetro relevante es el pH, que tiene un efecto importante en la velocidad

de crecimiento y la actividad enzimática. Sin embargo, en fermentaciones de alimentos y bebidas, el pH suele cambiar durante el proceso de fermentación debido a la producción de productos de la fermentación por los microorganismos, principalmente la producción de ácidos orgánicos. Estos productos de la fermentación le dan al producto final sus características fisicoquímicas y sensoriales distintivas [24].

### 2.3.3 TIPOS DE PROCESOS DE FERMENTACIÓN

#### 2.3.3.1 Proceso por lote

En un proceso de fermentación por lotes (Fig. 2), se coloca en el biorreactor el medio de cultivo con la carga total del sustrato inicial ( $S_0$ ). El biorreactor se inocula con un volumen de inóculo con cierta concentración celular ( $X_0$ ). Una vez realizada la inoculación, se efectúa el proceso fermentativo el tiempo que sea necesario. Una vez obtenido el producto de fermentación deseado ( $P$ ), se extrae el producto final del biorreactor ( $S_f, X_f, P_f$ ). La principal ventaja de este tipo de operación es que se reduce el riesgo de presentar contaminación y su principal desventaja es el tiempo muerto que se da durante el paro del proceso para realizar el lavado o la esterilización y comenzar el nuevo lote [24].

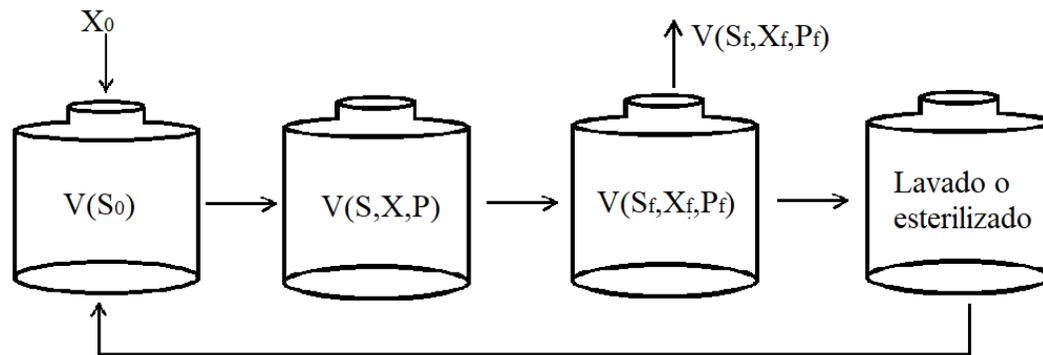


Fig. 2. Diagrama del proceso de fermentación por lotes.

#### 2.3.3.2 Proceso Continuo

Un proceso de fermentación continuo (Fig. 3) consiste en un biorreactor con carga total del sustrato ( $S_0$ ), al cual, se añade un volumen de inóculo con cierta concentración celular ( $X_0$ ).

Una vez realizado un proceso de crecimiento por lote, cuando el cultivo alcanza la fase exponencial, se alimenta una línea de flujo continua  $F(S_a)$  y se drena una línea de flujo de salida con el producto final  $F(S_f, X_f, P_f)$ , de manera que los flujos de las líneas de entrada y de salida son los mismos y la productividad del biorreactor es constante en el tiempo. La principal ventaja de este tipo de proceso radica en que la velocidad de crecimiento de los microorganismos es constante, así como la productividad del reactor, además de que no se realizan paros para lavar y esterilizar el biorreactor. La desventaja es que debido a que no hay paro en la operación es más probable el riesgo de contaminación y la presencia de reacciones indeseadas, así como, mutaciones microbianas [24].

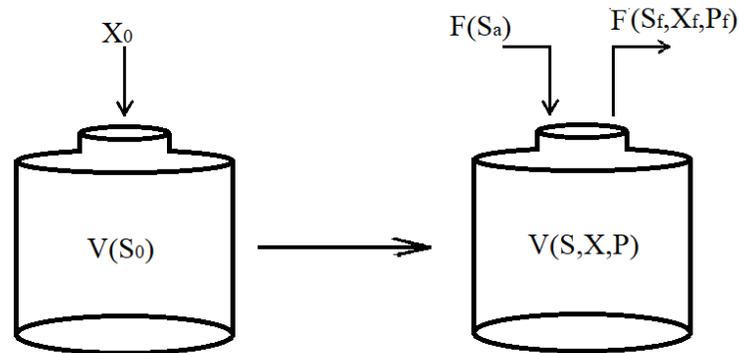


Fig. 3. Diagrama del proceso de fermentación continuo.

### 2.3.3.3 Proceso semicontinuo

En un proceso de fermentación semicontinuo (Fig. 4), se coloca en el biorreactor un volumen de medio de cultivo con la carga total del sustrato ( $S_0$ ). Al medio se le agrega un volumen de inóculo con cierta concentración celular ( $X_0$ ) y se deja efectuar el proceso fermentativo de tipo lote el tiempo que sea necesario; intervalo de tiempo denominado tiempo de retención hidráulico (TRH). A continuación, se extrae una fracción del biorreactor  $V(S_f, X_f, P_f)$ , la cual, es sustituida por una misma cantidad de volumen de sustrato fresco  $V(S_0)$ . Estos recambios se realizan periódicamente a tiempos constantes (TRH), haciendo que el crecimiento celular y la producción del reactor sean continuas en relación al TRH [24,25].

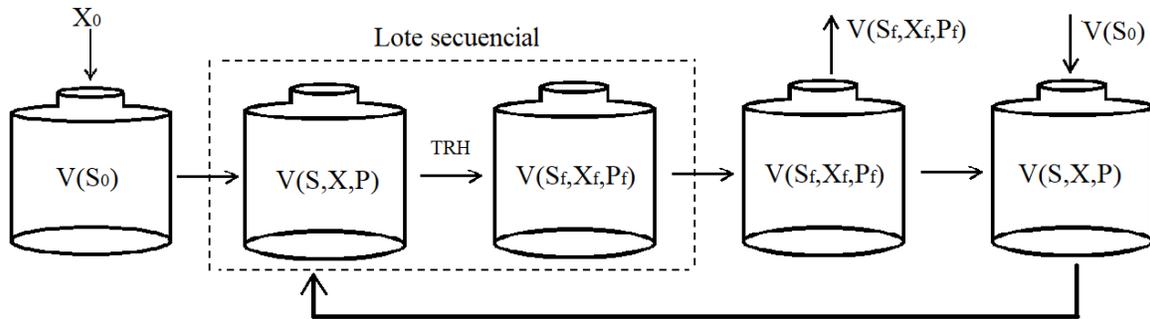


Fig. 4. Diagrama del proceso de fermentación semicontinuo.

Los dos componentes principales de las biorreacciones son el inóculo y el sustrato de alimentación. Estos procesos se suelen operar bajo condiciones asépticas para evitar la contaminación del medio y la posible competencia de los microorganismos fermentadores con la microbiota externa al biorreactor. Como se ha mencionado en secciones anteriores el sistema de fermentación a emplear en este proyecto fue el de biorreactor secuencial alimentado por lotes (semicontinuo), ya que es muy parecido al proceso seguido en la producción artesanal de pulque. Adicionalmente, se emplearon condiciones de operación asépticas para evitar la contaminación del biorreactor y con esto prevenir las desviaciones en la fermentación para producir pulque con características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales adecuadas.

## 2.4 PROBLEMAS DE LA CALIDAD DEL PULQUE Y ESTRATEGIAS PARA SU ASEGURAMIENTO

Un factor que ha afectado fuertemente la demanda y la producción de pulque es la percepción negativa que tienen algunos consumidores hacia esta bebida [4]. La razón principal de la percepción negativa del pulque es porque su proceso de producción se lleva a cabo en condiciones poco higiénicas. Las condiciones ambientales en las que se encuentra la planta de maguey, las paredes del cajete, el aire, el polvo, los insectos, la cubierta del cajete y las herramientas utilizadas, pueden favorecer la contaminación fisicoquímica o microbiológica del aguamiel. En el caso de esta última contaminación puede tratarse de microorganismos descomponedores o patógenos para el ser humano. Adicionalmente, se

sabe que a partir de la interacción del aguamiel con el ambiente que lo rodea se favorece la inoculación espontánea del aguamiel y el comienzo de los diversos procesos fermentativos que llevan a la producción del pulque.

Considerando lo anterior, se encuentran en la literatura estudios sobre la seguridad microbiana del pulque. Gómez-Aldapa et al. [26] realizaron un estudio del comportamiento de algunos patógenos en el proceso de producción de pulque. Los investigadores agregaron las cepas patógenas *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei* a aguamiel fresco, después de lo cual agregaron el pulque semilla, y dieron seguimiento al proceso de fermentación. Los autores indicaron que hubo una desactivación rápida de todas las cepas patógenas, y que no se detectó a ninguna de ellas en el producto final. Estos resultados se atribuyeron a la competencia de los microorganismos patógenos con la microbiota autóctona presente en el aguamiel y el pulque. En otro estudio, Gómez-Aldapa et al. [27] evaluaron el comportamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en el aguamiel y pulque. Esta cepa es un patógeno regularmente transmitido por alimentos que puede causar enfermedades gastrointestinales graves. Los autores hallaron que *E. coli* puede desarrollar tolerancia al alcohol y a los ácidos presentes en el pulque.

Valadez-Blanco et al. [28] realizaron un estudio para determinar las fuentes de variación en la microbiota del pulque. Los autores trabajaron con tres muestras de ranchos ubicados en el municipio de Tamazulapan, Oaxaca. Los investigadores consideraron varias fuentes de variabilidad en la producción del pulque. Como se puede apreciar en la Tabla 3, se observó una gran variación entre las muestras de los diferentes ranchos.

Tabla 3. Comparación de los niveles microbianos en aguamiel y pulque de tres ranchos del estado de Oaxaca. [28]

<b>Tipo de bacteria y solvente</b>	<b>Rancho San Jerónimo (UFC/mL)</b>	<b>Rancho Los Arcos (UFC/mL)</b>	<b>Rancho La Plazuela (UFC/mL)</b>
<b>Aguamiel</b>			
Bacterias ácido lácticas (aerobias)	6.2x10 <sup>7</sup>	3.7x10 <sup>9</sup>	4.5x10 <sup>8</sup>
Bacterias ácido lácticas (anaerobias)	1.8x10 <sup>10</sup>	2.3x10 <sup>10</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>
<i>Zymomonas sp.</i>	3.5x10 <sup>8</sup>	6.8x10 <sup>9</sup>	n.r*
Recuento de aerobios totales	1.9x10 <sup>11</sup>	2.1x10 <sup>9</sup>	n.r*
Recuento de anaerobios totales	4.0x10 <sup>8</sup>	2.5x10 <sup>10</sup>	>3.0x10 <sup>10</sup>
<b>Pulque</b>			
Bacterias ácido lácticas (aerobias)	7.1x10 <sup>7</sup>	8.3x10 <sup>7</sup>	2.7x10 <sup>11</sup>
Bacterias ácido lácticas (anaerobias)	n.r*	n.r*	9.2x10 <sup>8</sup>
<i>Zymomonas sp.</i>	2.7x10 <sup>8</sup>	3.7x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>11</sup>
Recuento de aerobios totales	5.0x10 <sup>7</sup>	n.r*	8.0x10 <sup>11</sup>
Recuento de anaerobios totales	3.3x10 <sup>7</sup>	3.9x10 <sup>6</sup>	n.r*

\*no realizado

Para eliminar la variabilidad de rancho a rancho, los autores siguieron el perfil microbiano de aguamiel y pulque a partir de una sola planta en un período de 5 semanas. De esta forma descubrieron que el número de bacterias en el aguamiel aumentó durante las primeras tres semanas después de que se abrió el agave. El aguamiel y el pulque alcanzaron una carga microbiana similar en un plazo de 3 semanas (Tabla 4). Esto sugiere que la fermentación se produce desde el cajete y contribuye a que la microbiota del aguamiel no sea constante durante el tiempo de raspado y cosecha. Considerando lo anterior, el proceso de producción de pulque también dependerá del tiempo al que se colecta el aguamiel, lo que constituye un factor de variación adicional que se debe tomar en cuenta en dicho proceso.

Debido a que en la actualidad el proceso de producción de pulque solo se realiza de forma artesanal, no existen controles fisicoquímicos y sanitarios del proceso de fermentación.

Considerando lo anterior, es de gran importancia desarrollar un proceso de producción de pulque en el cual se puedan controlar las variables del proceso de fermentación, reducir las fuentes de variación del proceso, y con ello estandarizar los parámetros fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales del producto final.

Tabla 4. Cambios en la microbiota de aguamiel y pulque, en función del tiempo después de la apertura de la planta de agave.

<b>Tipo de bacteria</b>	<b>CFU/mL (semana 1)</b>	<b>CFU/mL (semana 3)</b>	<b>CFU/mL (semana 5)</b>
<b>Aguamiel</b>			
Bacterias ácido lácticas (aerobias)	$5.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$	$3.5 \times 10^8$
Bacterias ácido lácticas (anaerobias)	$3.9 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$5.1 \times 10^8$
<i>Zymomonas sp.</i>	$3.8 \times 10^7$	$3.7 \times 10^6$	$2.5 \times 10^8$
Recuento de aerobios totales	$7.5 \times 10^7$	$8.2 \times 10^9$	$2.3 \times 10^8$
Recuento de anaerobios totales	$6.3 \times 10^7$	$7.6 \times 10^7$	$4.4 \times 10^8$
°Brix	16.0	11.6	4.0
pH	4.3	5.3	4.0
<b>Pulque</b>			
Bacterias ácido lácticas (aerobias)	$8.5 \times 10^9$	$4.2 \times 10^7$	$3.5 \times 10^7$
Bacterias ácido lácticas (anaerobias)	$8.8 \times 10^{10}$	$3.0 \times 10^7$	$3.7 \times 10^7$
<i>Zymomonas sp.</i>	n.r*	$5.1 \times 10^6$	$4.3 \times 10^7$
Recuento de aerobios totales	$9.7 \times 10^{10}$	$>10^9$	$>10^9$
Recuento de anaerobios totales	$7.2 \times 10^{10}$	$3.0 \times 10^7$	$2.2 \times 10^7$
°Brix	10.0	7.4	3.0
pH	3.7	3.8	3.7

\*no realizado

## 2.5 PROCESOS DE FERMENTACIÓN ASÉPTICA

En el proceso de fermentación aséptica se usa un sustrato estéril. El empleo de procesos asépticos en bioprocesos permite evitar la entrada al reactor de microorganismos diferentes al inóculo inicial. En el caso de la producción de pulque, el sustrato es aguamiel, por lo que, para lograr un proceso aséptico, es necesario esterilizar este sustrato, así como, el biorreactor a utilizar. El objetivo de la esterilización es principalmente limitar las fuentes de variación por microorganismos provenientes del maguey y su entorno, así como, de aquéllos presentes en el entorno del fermentador.

El procesado térmico de alimentos y bebidas ha sido ampliamente usado desde la antigüedad para la conservación de éstos. El calentamiento influye en la inactivación de enzimas y la destrucción o inactivación de los microorganismos presentes en el alimento o bebida. La pasteurización es un proceso que consiste en la aplicación de calor para eliminar patógenos en los alimentos, utilizando una temperatura definida (normalmente 63 °C) durante un cierto periodo de tiempo definido (30 min). La letalidad de este proceso se basa en la relación temperatura-tiempo de exposición, por la cual se logra la inactivación de los microorganismos mesofílicos, y por ende se reduce el riesgo de presencia de patógenos en el alimento pasteurizado [29,30]. Cabe resaltar que la pasteurización no es una esterilización, ya que las condiciones para la esterilización son más extremas (la temperatura varía entre 120 y 180 °C). Dichas condiciones pueden llegar a causar pérdida de nutrientes, reacciones no deseadas y deterioro de los atributos sensoriales del producto original.

Uno de los procesos de pasteurización más usado en la actualidad es la pasteurización de alta temperatura y tiempo corto (HTST, por sus siglas en inglés). En este proceso continuo se utilizan tubos de metal para elevar la temperatura del producto a por lo menos 73 °C, el producto pasa a través del tubo a una velocidad que garantiza el tiempo de retención requerido (15 s), seguido por un enfriamiento rápido para lograr el nivel de letalidad requerido. La pasteurización HTST es bastante eficiente debido a la regeneración de calor y las condiciones son tales que se maximiza la destrucción de microbios con cambios químicos mínimos en el producto. Otro método empleado es aquél que se le conoce como temperatura ultra alta (UHT, por sus siglas en inglés), consiste en calentar el producto a una temperatura de 135-145 °C durante unos segundos para después ser envasados en condiciones asépticas con sellado hermético [29,30].

La principal desventaja del uso de los procesos térmicos para lograr esterilizar alimentos o bebidas radica en la pérdida de nutrientes o cambios en las características sensoriales de los productos. Debido a esto, en este proyecto se realizó la esterilización en frío por medio de tecnología de membranas de microfiltración.

## **2.6 FUNDAMENTOS DE LOS PROCEOS DE MEMBRANAS DE MICROFILTRACIÓN**

La tecnología de membranas se ha convertido en un procedimiento importante para la industria química y biotecnológica, incluyendo de manera significativa la de alimentos. El tamaño de poro de la membrana determina los componentes que pasan a través de ella y los que son retenidos. Las tecnologías de separación por membranas se clasifican con base al tamaño de poro principalmente en microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa [31]. En la Tabla 5 se resumen las características de estas tecnologías.

La microfiltración es un proceso de separación sólido-líquido de un fluido que pasa a presión a través de una membrana semipermeable. El fundamento físico de esta tecnología es la separación por la presión diferencial y diámetro del poro; este último parámetro define el tipo de compuestos o componentes que se pueden separar. Al componente de flujo que pasa a través de la membrana se le denomina permeado y al componente de flujo que es rechazado por la membrana se le nombra retenido.

Tabla 5. Propiedades de separación de las diferentes tecnologías de membrana [32]

<b>Concepto</b>	<b>Microfiltración</b>	<b>Ultrafiltración</b>	<b>Nanofiltración</b>	<b>Ósmosis</b>
<b>Separación de materiales</b>	Separación de partículas, bacterias	Separación de macromoléculas	Iones y moléculas	Desalinización de agua
<b>Material de la membrana</b>	Poliacrilamida, cerámica	Poliacrilamida, cerámica	Poliacrilamida	Triacetato de celulosa
<b>Equipo</b>	Placas y marcos con espiral	Fibra hueca espiral, placas y marcos	Fibra hueca espiral	Fibra hueca Espiral
<b>Principio de separación</b>	Mecanismo de tamizado	Mecanismo de tamizado	Disolución-Difusión	Disolución-Difusión
<b>Presión</b>	<2 bar	2-10 bar	10-60 bar	10-100 bar
<b>Tamaño de poro o peso molecular de corte (PMC)</b>	<0.45 $\mu\text{m}$	5-500 kDa	100-1000 Da	50-100 Da

El fluido puede circular de dos maneras (Fig. 5): a) Flujo normal a la membrana, en el cual en un periodo corto de tiempo se genera un taponamiento de la membrana debido a la formación de una película de sólidos suspendidos que se depositan en ella; debido a esto, el flujo decae abruptamente a medida que pasa el tiempo. Este tipo de proceso se utiliza para nivel de pruebas analíticas de laboratorio y de selectividad de la membrana. b) Flujo tangencial a la membrana; con este tipo de flujo se evita el taponamiento de la membrana ya que se reduce considerablemente la acumulación de sólidos en la superficie de la membrana. Esta configuración de flujo se usa para procesos a nivel piloto e industrial.

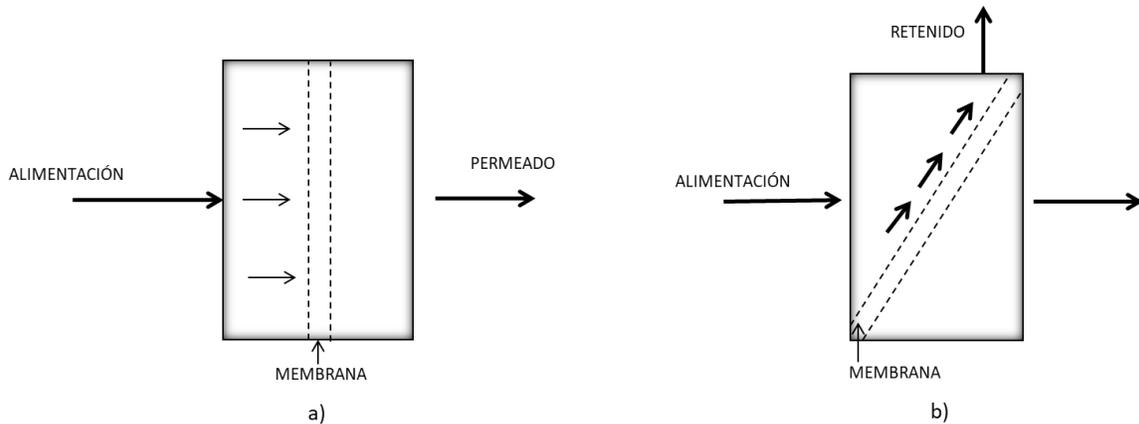


Fig. 5. Representación de las configuraciones de flujo para los sistemas de filtración por membranas. a) Flujo normal, b) Flujo tangencial.

Dentro de los tipos de materiales de membranas que suelen ser utilizadas para el proceso de microfiltración destacan las membranas de cerámica y las poliméricas. Las membranas poliméricas presentan una mayor porosidad y su distribución de tamaño de poro es estrecha, lo que promueve una estabilidad mecánica a mayores presiones resultando en una mejor separación. Cabe resaltar que las membranas poliméricas presentan menor fragilidad en comparación con las membranas cerámicas [33,34].

Uno de los principales problemas en la operación de las membranas de microfiltración es la reducción progresiva del flujo de permeado a medida que ocurre la precipitación de partículas en la superficie de la membrana tales como proteínas, sales, complejos macromoleculares, entre otros materiales. A este fenómeno se le denomina "ensuciamiento", el cual, en condiciones normales de operación se trata de un proceso reversible. A fin de evitar este problema se deben realizar ciclos regulares de limpieza, para garantizar el óptimo funcionamiento de la membrana [33,35].

La microfiltración se usa ampliamente en la industria de alimentos y bebidas para realizar la clarificación y la concentración de suspensiones a base de frutas y hortalizas, como jugos, subproductos agroalimentarios, lácteos, aceites, vinos y cervezas. Esta técnica de separación permite producir productos estériles que conservan su calidad fisicoquímica y funcional, gracias a su alta selectividad y bajas temperaturas de operación [36].

Para caracterizar el proceso de esterilización en frío por microfiltración, se emplean diferentes parámetros: factor de concentración de sólidos (FCs), factor de concentración proteico (FCp) y factor de concentración volumétrico (FCV). Sus ecuaciones son las siguientes:

$$FCs = \frac{\text{Concentración de sólidos inicial}}{\text{Concentración de sólidos final}}$$

$$FCp = \frac{\text{Concentración de proteína inicial}}{\text{Concentración de proteína final}}$$

$$FCV = \frac{\text{Volumen inicial de la alimentación}}{\text{Volumen de retenido final}}$$

## **2.7 PROCESOS DE FERMENTACIÓN EN EL PULQUE Y SU MICROBIOTA**

El aguamiel contiene nutrientes que favorecen el crecimiento y proliferación de microorganismos presentes naturalmente en él. Estos microbios pueden provenir de las paredes de la cavidad del maguey, de las hojas o del mismo suelo. Estos microorganismos son capaces de desarrollarse realizando la fermentación de aguamiel a pulque. Por medio de la intervención de esta microbiota se llevan a cabo una serie de fermentaciones del aguamiel para la producción de pulque, de las cuales, las más importantes son la fermentación ácido-láctica, la alcohólica y la viscosa [37].

### **2.7.1 FERMENTACIÓN ÁCIDO-LÁCTICA**

Las BAL se han utilizado principalmente en la fermentación de alimentos, siendo algunas especies de este grupo reconocidas como probióticas. Una de las aplicaciones más importantes de las BAL (como se señaló en la Sección 1.1.2.) es en la obtención de productos fermentados. Adicionalmente, estas bacterias ayudan a la conservación de productos alimenticios fermentados; tales como el yogurt, los quesos maduros y las carnes curadas. Por otra parte, las BAL también imparten características sensoriales y nutricionales especiales al producto fermentado final [38,39].

Las bacterias encargadas de la fermentación ácido-láctica son las BAL. Escalante et al. [37] realizaron un estudio de identificación genética por el gen ARNr 16S en el cual se determinaron las principales especies presentes en el pulque. Entre la diversidad bacteriana presente en las muestras del pulque, los autores hallaron que las BAL pertenecientes al género *Lactobacillus* predominaban constituyendo alrededor de un 27% de la población. Entre las bacterias del género *Lactobacillus* encontraron: *Lact. acidophilus*, *Lact. plantarum*, *Lact. acetotolerans*, *Lact. hilgardii* y *Lact. kefir*.

### **2.7.2 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA**

A medida que ocurre la fermentación del aguamiel durante la producción del pulque la población de levaduras aumenta. Las levaduras son las principales responsables de la producción de etanol en el pulque a partir de compuestos fermentables como la glucosa, la fructosa y la galactosa. Durante la conversión de aguamiel a pulque se llega a obtener hasta un 6% de etanol. Las levaduras que han sido identificadas en el proceso de producción de pulque son del género *Saccharomyces*, tales como: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, y *S. paradoxus*; así como, otras de géneros no *Saccharomyces*, tales como *Candida spp.*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia spp.*, *P. guilliermondii* y *Torulaspora delbrueckii* [40].

Por otra parte, se ha indicado que, en la fermentación alcohólica del pulque, algunas especies bacterianas como la *Zymomonas mobilis*, también juega un papel importante. Esta especie bacteriana ha sido catalogada como productora de alto rendimiento de etanol [41]. En los últimos trabajos de metagenómica realizados por métodos no cultivables [40] se ha detectado la abundancia de esta bacteria en el pulque, llegando a tener una presencia de hasta el 21% en relación con la población total de microorganismos presentes en el pulque.

### **2.7.3 FERMENTACIÓN VISCOSA**

La viscosidad característica del pulque está asociada a la producción de glucanos, un carbohidrato polimérico producido a base de glucosa por microorganismos del género *Leuconostoc*, presentes también en frutas y verduras. Sin embargo, en un estudio realizado por Escalante et al. [2] se encontró que estas bacterias también eran productoras de exopolisacáridos de fructosa llamados fructanos, producido por cepas de *Ln. citreum*, *Ln. mesenteroides* y *Ln. kimichi* [41].

## **2.8 TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS Y DE CARACTERIZACIÓN DE COMUNIDADES MICROBIANAS**

### **2.8.1 MÉTODOS DEPENDIENTES DEL CULTIVO**

Los estudios realizados en el pasado para la determinación de poblaciones microbianas como objeto de estudio se han basado en métodos dependientes del cultivo por medio de la caracterización fenotípica de los aislados microbianos (pruebas morfológicas y bioquímicas). Sin embargo, con el desarrollo de la biología molecular se ha logrado la identificación de microorganismos mediante el análisis de su ADN a partir de cepas aisladas por técnicas clásicas de microbiología.

#### **2.8.1.1 Medios selectivos de cultivo microbiano**

Las distintas especies microbianas tienen diferentes requerimientos nutricionales indispensables para su crecimiento. Cualquier medio de cultivo debe contener principalmente una fuente de energía, una fuente de nitrógeno, así como, sales minerales, compuestos activadores y agua. Sin embargo, algunos microorganismos tienen requerimientos nutrimentales especiales que permiten su crecimiento selectivo en determinados medios de cultivo. Una vez preparado el medio de cultivo y realizada la inoculación de la alícuota microbiana, se incuba durante alrededor de 12 a 24 h a cierta temperatura y bajo condiciones específicas para la posterior visualización de las colonias.

Para el aislamiento de microorganismos pertenecientes a cierto grupo microbiano, los medios de cultivo selectivos contienen sustancias específicas en dosis elevadas como el cloruro sódico, sales biliares, antibióticos o antisépticos fomentan el crecimiento de los grupos microbianos de interés y evitan el crecimiento de otros [42].

#### **2.8.1.2 Identificación microbiana por medio de la secuenciación del gen ARNr 16S.**

##### *Extracción de ADN*

La extracción de ADN constituye el primer paso en cualquier estudio de cepas o comunidades microbianas. El ADN se extrae a partir de las células microbianas mediante el método de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, que es una extracción basada en disolventes orgánicos. En este método el lisado celular se mezcla con fenol, cloroformo y

alcohol isoamílico para la separación de los ácidos nucleicos y las proteínas. Alternativamente, se pueden usar paquetes de extracción comerciales, los cuales, constan de soluciones para la estabilización y extracción del ADN [43].

#### *Amplificación y purificación del gen ARNr 16S*

Las estructuras de los genes 16S y 23S se han usado para la resolución genética de microorganismos con base en linajes tanto antiguos como modernos, ya que es una región conservada a través del tiempo. En la actualidad, el gen ARNr 16S se ha convertido en el marcador taxonómico para bacterias más utilizado, debido a que este gen es ampliamente informativo y está compilado en muchas bases de datos junto con datos taxonómicos fiables [43,44].

Para realizar la amplificación del gen objetivo se introduce el ADN extraído en un tubo específico para este paso, y se pone bajo condiciones de temperatura programadas en un termociclador. Posteriormente, el ADN extraído se ocupa como molde para la amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). En la reacción de PCR se sintetiza muchas veces un fragmento del ADN original utilizando enzimas polimerasas. Para llevar a cabo la reacción de PCR se introduce en un tubo una mezcla que contiene el ADN aislado del organismo, la enzima polimerasa y los cebadores o iniciadores (llamados *primers*, en inglés). Para tener la certeza de que la amplificación se llevó a cabo de manera correcta, generalmente se hace la electroforesis del producto de PCR en gel de agarosa o de acrilamida. En este proceso se separan los fragmentos de ADN y se observa el bandeo en un equipo transiluminador de UV. Estos fragmentos de ADN se purifican con paquetes comerciales, ya sea a partir del producto de PCR o de la banda de electroforesis en el gel [44].

#### *Secuenciación de genes*

La secuenciación es un proceso análogo a la amplificación. Para realizar la secuenciación del gen amplificado (amplicón) es necesario usar un cebador, cuya secuencia de oligonucleótidos esté presente también en la cadena del ADN que se quiere secuenciar. Asimismo, también se puede realizar la secuenciación del gen usando otro cebador correspondiente a la secuencia complementaria. A la primera secuenciación se le llama *forward* (hacia adelante) y a la que usa la secuencia complementaria se le llama *reverse* (hacia atrás). Estos cebadores suelen ser los mismos usados para el proceso de amplificación

de ADN, aunque también se pueden usar otros diseñados especialmente para esta etapa. Posteriormente, se añaden bases nucleotídicas marcadas con fluorocromos correspondientes a las bases de la cadena de ADN que se está secuenciando. Al final del proceso, cada base (A = adenina, G = guanina, T = timina y C = citosina) queda marcada con un fluorocromo que se absorbe a diferente longitud de onda, lo que permite determinar la secuencia de las bases por medio de análisis cromatográficos [42].

### *Identificación genética*

Después de la secuenciación de los fragmentos de ADN, el estudio del electroferograma (cromatograma que indica las bases obtenidas de la secuenciación) es el primer paso para el análisis de las secuencias. La información genética (secuencias de nucleótidos) del fragmento de ADN puede contener errores, por lo que en esos casos se requiere alinear y reensamblar las secuencias *forward* y *reverse*. La secuencia que presenta menos de 1% de indeterminaciones se ocupa para el análisis. Una vez que se dispone de la secuencia corregida, ésta se compara con otras disponibles en bases de datos en internet de acceso público o privado, para la identificación de la cepa [42].

En la actualidad, se cuenta con bases de datos con una gran gama de organismos disponibles. Una de las más importantes es la base pública GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), que además cuenta con programas como BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que permite hacer la búsqueda de las especies más cercanas al aislado microbiano con base en la similitud de las secuencias de ADN [45]. Así mismo se emplean otras bases de datos de cepas tipo como lo es EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>).

### **2.8.1.2 Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas es una técnica analítica que fue inventada por J. J. Thompson a principios del siglo XX, quien logró analizar con gran precisión la composición de diversos compuestos químicos por medio de su separación con relación a su masa/carga ( $m/z$ ). El uso de esta técnica para identificar bacterias se originó en 1975 mediante la obtención de espectros de distintos géneros y especies de bacterias liofilizadas [46,47].

Posteriormente, se empezaron a desarrollar métodos de ionización de proteínas intactas. En 1987, Köichi Tanaka desarrolló la desorción de proteínas por láser suave, la cual transfería energía a las moléculas para su ionización sin romper sus enlaces químicos.

La introducción de la espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF, por sus siglas en inglés) fue una importante evolución del área de microbiología. Esta técnica se ha convertido en una herramienta fácil de utilizar, así como, efectiva para analizar cuantitativa y cualitativamente proteínas ribosómicas de entre 2 y 20 kDa de diversos orígenes, principalmente en el área clínica en un sistema denominado MALDI Biotyper® [48,49].

Los espectrómetros de masas constan de tres elementos: una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector. En el caso específico de la espectrometría de masas MALDI-TOF (Fig. 6), la fuente de ionización es un láser ultravioleta de longitud de onda de 337 nm, que permite la desorción/ionización de la muestra que debe estar en presencia de un ácido orgánico fotosensible al que se denomina matriz. La matriz permite la absorción de la energía del láser para su posterior transmisión a la muestra y con ello se facilita la cesión de iones [49].

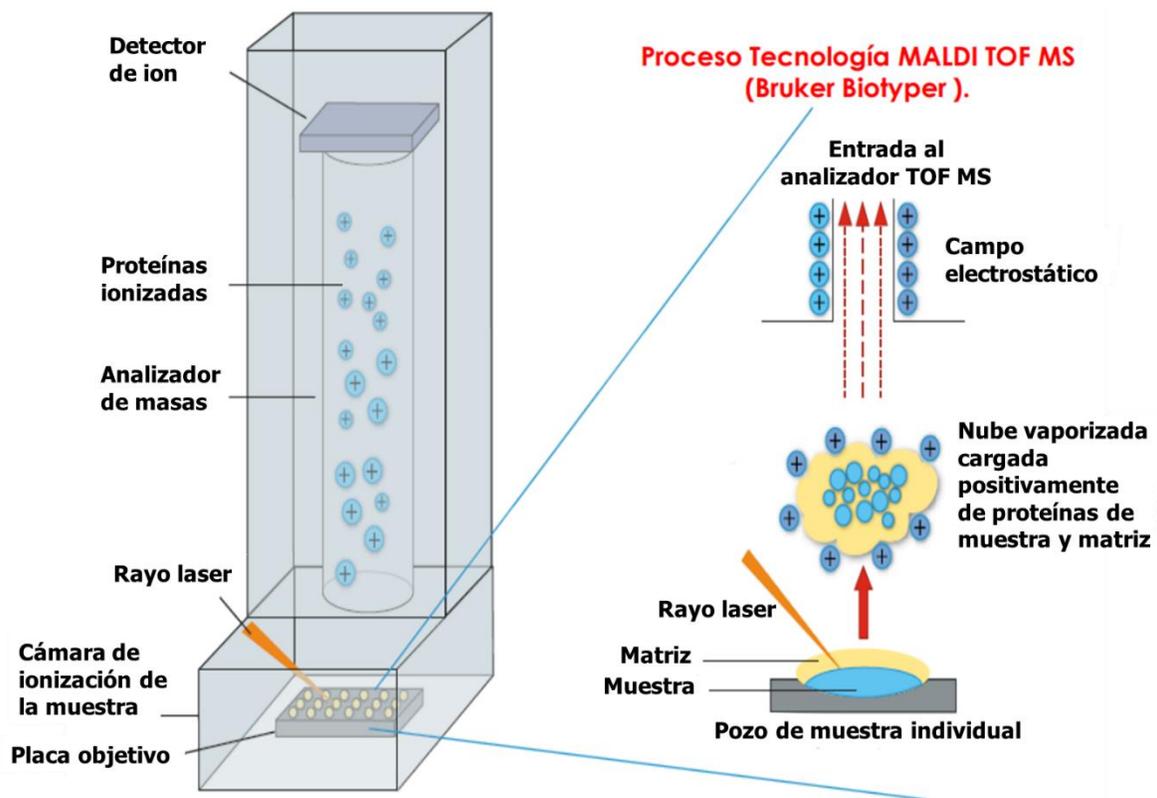


Fig. 6. Diagrama de un equipo de espectrometría de masas MALDI-TOF.

## 2.8.2 MÉTODOS INDEPENDIENTES DEL CULTIVO

Las técnicas de análisis molecular de las comunidades microbianas por métodos independientes del cultivo son empleadas por su gran capacidad de analizar e identificar mezclas complejas de microorganismos genéticamente diferentes que se encuentran presentes en la muestra. Estas técnicas han sido utilizadas con gran eficiencia incluso cuando los microorganismos se encuentran en concentraciones bajas como para ser cultivados o que no son capaces de crecer en condiciones de laboratorio.

### PCR-DGGE

La DGGE (electroforesis de geles con gradiente desnaturante, por sus siglas en inglés) diseñada por Fischer y Lerman en 1933 fue empleada originalmente para detectar mutaciones en el genoma humano. Sin embargo, Green et. al. [50] lo modificaron para la separación del gen ARNr 16S. Esta técnica es un tipo de electroforesis que consiste en separar genes del mismo tamaño que se diferencian en su temperatura de desnaturación del ADN debido a la diferencia en la secuencia de sus bases nucleotídicas. Para esto se emplea un gradiente desnaturante de ADN basado en una mezcla de urea y formamida (agentes desnaturantes) en un gel de poliacrilamida [51,52].

La diferencia en la secuencia de las bases de los genes de los distintos microorganismos, hasta en un nivel de un solo par de bases nitrogenadas, causa la presencia de bandas con distintos corrimientos en el gel (Fig. 7). Para evitar una completa desnaturación de la hebra del ADN, se agrega una secuencia compuesta de 30 a 40 pares de bases G-C en algún extremo de los cebadores; secuencia conocida como grapa o *clamp*. Al finalizar el proceso de electroforesis, el contenido de las bandas individuales puede ser cortado para su posterior amplificación y secuenciación. Se puede utilizar el gen ARNr 16S o algún otro gen como objetivo de la separación. Esta técnica es apropiada para observar la dinámica microbiana en mostos fermentativos a través del tiempo [52,53].

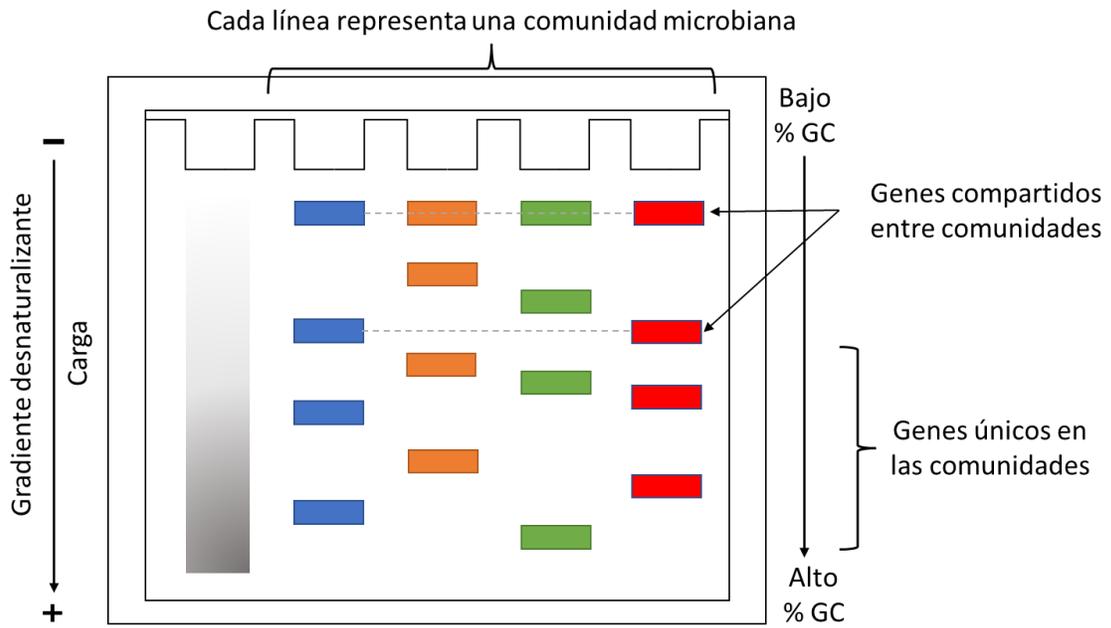


Fig. 7.- Electroforesis de geles con gradiente desnaturalizante.

### 3. ESTADO DEL ARTE

#### 3.1. PROCESOS SEMICONTINUOS DE FERMENTACIÓN DE BEBIDAS ALCOHÓLICAS

Son escasas las publicaciones en la literatura de procesos de fermentación semicontinuos como el que se propone en este trabajo para bebidas alcohólicas fermentadas. Sánchez-Miguel [54], realizó un trabajo sobre la fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el proceso de elaboración de cerveza que se realizó mediante un diseño experimental factorial simple relacionando el efecto del factor tiempo de retención hidráulica (TRH) empleando 3, 4 y 5 días, y tres variables de respuesta (concentraciones de biomasa, azúcares reductores y etanol). Cada TRH fue operado por un periodo de 25 días. En el trabajo se indica que para el TRH de 5 días se obtuvo una productividad volumétrica ( $r$ ) 20.2% mayor que la obtenida en el sistema por lote. En el caso del TRH de 4 días la  $r$  fue mayor en 50.2% al ser comparado con el sistema por lote, mientras que se destaca el TRH de 3 días para el cual la  $r$  fue superior en 100.4% a la  $r$  del sistema por lote.

En otro estudio, Lee et al. [55] realizaron la producción de vinagre de cebolla utilizando un proceso de fermentación semicontinuo y evaluaron las propiedades funcionales del producto fermentado. Los investigadores usaron cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Acetobacter orientalis* para la fermentación alcohólica y ácido acética, respectivamente. La fermentación semicontinua se realizó en dos etapas, esto para evaluar las condiciones óptimas de fermentación de la cebolla. En un principio realizaron la fermentación alcohólica inoculando el jugo de cebolla con *Saccharomyces cerevisiae* (36 h/28 °C). Posteriormente, el jugo previamente fermentado se ajustó a una concentración de etanol del 5%, después de lo cual el medio se inoculó con *Acetobacter orientalis* y se incubó por 96 h a 28 °C. Después se realizó la fermentación semicontinua, la cual, consistió en tres ciclos de recambio. Los autores indican que a las 24 h de fermentación se alcanzó una concentración de 4.8% de ácido acético y 4.35% a las 48 h y una eficiencia de fermentación del 76.7%. Concluyendo que este proceso redujo significativamente el tiempo de fermentación comparado con el proceso de cultivo sumergido por lotes que es el comúnmente utilizado en la fermentación de cebolla.

Considerando la escasa literatura, el proceso de fermentación semicontinuo constituye una propuesta novedosa para la producción de pulque en condiciones controladas, además de que este proceso es análogo al proceso de producción artesanal. En este trabajo se realizó un reactor semicontinuo como estrategia para estandarizar la producción de pulque.

### **3.2. PROCESOS DE ESTERILIZACIÓN EN FRÍO DE BEBIDAS USANDO MEMBRANAS DE MICROFILTRACIÓN**

El uso más común de la tecnología de membranas de microfiltración ha sido para retener sólidos en suspensión. El origen de este método data de los años 1920's, con su aplicación más relevante durante la Segunda Guerra Mundial, en Alemania, en donde se empleó para esterilizar agua para consumo humano. Posteriormente el interés por desarrollar este método aumentó significativamente. En 1963 se utilizó por primera vez la microfiltración para esterilizar la cerveza en frío [56]. En la actualidad, la microfiltración tiene una gran aplicación en la industria vinícola para la obtención de productos de calidad, siendo el aspecto de esterilidad del producto final el más importante. En este sentido, se han encontrado aplicaciones importantes en la clarificación y esterilización de vino y bebidas alcohólicas a base de vino [57].

Carneiro et al. [58] utilizaron la microfiltración tangencial para la esterilización en frío y clarificación de jugo de piña. La microfiltración se realizó utilizando una membrana tubular de polietersulfona con un tamaño de poro de 0.3  $\mu\text{m}$ . Las condiciones del proceso fueron 25 °C y 100 kPa. Los autores precisan que el proceso de microfiltración ayudó a reducir la turbidez y viscosidad del producto, además de que no provocó cambios significativos en el pH, acidez, azúcar y contenido de sólidos del jugo. El permeado se almacenó en refrigeración a 8 °C por un período de 28 d. Posteriormente se realizaron pruebas microbiológicas en intervalos de 7 d y se comprobó que el jugo de piña cumplía las normas sanitarias locales para jugos y bebidas.

Por otra parte, Karmakar y De [59] realizaron la esterilización en frío de agua de coco utilizando un proceso de ultrafiltración con membranas de fibra hueca, utilizando diferentes presiones 21-193 kPa y diferentes caudales (5 a 15 L/h). Los investigadores encontraron que las condiciones óptimas de funcionamiento fueron 138 kPa y 15 L/h, obteniendo un

permeado con aproximadamente 56% de sólidos solubles totales, 60% de sodio, 80% de potasio y polifenoles en relación con el contenido inicial previo a la filtración. Adicionalmente, los autores realizaron estudios de almacenamiento durante 18 semanas colocando el jugo de coco en botellas de vidrio de borosilicato y botellas de polipropileno. De acuerdo con lo descrito, el sabor de la bebida permaneció intacto durante las 18 semanas, presentando una reducción del 5% en la claridad del jugo a la semana 19.

Con base en la revisión bibliográfica realizada, se puede concluir que a la fecha no existen publicaciones sobre la esterilización en frío de aguamiel para la elaboración del pulque. Siendo la principal ventaja del uso de esta tecnología, la de lograr la esterilización del aguamiel empleado como sustrato de fermentación sin provocar cambios en las características sensoriales del producto.

### **3.3 DINÁMICA MICROBIANA EN EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL PULQUE**

Actualmente, el uso de tecnologías de secuenciación masiva principalmente del gen ARNr 16S permite el estudio microbiológico de diversos productos fermentados. Con estas nuevas tecnologías se han podido conocer los perfiles microbianos de alimentos y bebidas como el kéfir, chorizo tipo español, sake de kimoto, makgeolli / nuruk, doenjang, kimchi, narezushi, dahi, khoormog y vino de palma [52,60].

En un estudio en el que además de usar las técnicas de secuenciación masiva, se usa la técnica de DGGE, Juárez-Castelán et al. [52] determinaron la diversidad y dinámica bacteriana del chorizo tipo Español durante su proceso de maduración. El estudio fue realizado durante diferentes etapas de maduración. Por otra parte, la identificación de las bacterias aisladas se realizó mediante la secuenciación del gen ARNr 16S. Los investigadores determinaron la diversidad y dinámica bacteriana durante la maduración utilizando la técnica molecular de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) y mediante la secuenciación masiva de cada una de las muestras usando la tecnología Miseq Illumina. Los microorganismos identificados por la secuenciación completa del gen ARNr 16S fueron *Lactobacillus sakei*, *Weisella thailandensis* y *Pediococcus acidilactici*. Adicionalmente, por medio de la técnica de PCR-DGGE, los autores determinaron que al inicio del proceso de

maduración *Pseudomonas* fue el género más abundante, mientras que al final del proceso lo fue el género *Lactobacillus*. Utilizando la secuenciación masiva se corroboró lo obtenido con DGGE, y además conocer con mayor detalle los cambios de la diversidad bacteriana ocurridos durante la fermentación.

En un estudio similar, Villareal Morales et al. [61] estudiaron la diversidad microbiana de aguamiel de dos especies diferentes de agave (*Agave salmiana* y *A. atrovirens*) durante las cuatro estaciones del año, mediante gel de gradiente desnaturalizante (DGGE) y secuenciación del gen ARNr 16S (para bacterias) y regiones del gen 26S ARNr (para levaduras). Los investigadores describen que la mayor diversidad la encontraron en verano para ambas muestras de *Agave*, detectando los géneros bacterianos *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Trichococcus*. En el caso de las levaduras los autores identificaron a las especies *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En particular, en el año 2020 la microbiología del pulque fue estudiada en diversos grupos de investigación por técnicas de secuenciación masiva. Rocha-Arriaga et al. [60], realizaron un estudio de los perfiles de las comunidades microbianas a lo largo del proceso de fermentación del pulque. Los investigadores utilizaron la secuenciación masiva del gen ARNr 16S y el espaciador transcrito interno ribosómico (ITS, por sus siglas en inglés). En este estudio los autores recolectaron muestras de las tres etapas del proceso de producción de pulque (aguamiel, contrapunta y pulque) de tres lugares diferentes del Estado de Hidalgo (Epazoyucan, Tepeapulco y Zempoala). Los autores identificaron un total de 2,855 unidades taxonómicas operativas de bacterias (OTU, por sus siglas en inglés) utilizando el gen ARNr 16S, observándose una mayor abundancia de éstas en el aguamiel. En el caso de hongos se identificaron 1,494 OTUs. Del mismo modo que con las bacterias, la mayor abundancia de hongos se encontró en el aguamiel.

Por otra parte, Chacón Vargas et al. [40] realizaron una secuenciación metagenómica masiva de muestras de cinco diferentes etapas del proceso de fermentación del pulque y con ello caracterizaron la diversidad microbiana y funcional de las diferentes etapas del proceso. Los investigadores indicaron que los géneros más abundantes en las diferentes etapas fueron *Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Saccharomyces* y *Zyymomonas*. Por otra parte, las especies más abundantes reportadas fueron: *Acinetobacter boissieri*, *Acinetobacter Nectaris*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactococcus lactis*,

*Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gelidum*, *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales, estuvieron presentes en al menos una etapa del proceso de fermentación con un porcentaje mayor o igual al 1%. A medida que la fermentación avanzó, se observaron variaciones en la abundancia de géneros y especies. Los autores asociaron dichos cambios a la disminución de la sacarosa y al aumento del etanol y del ácido láctico, lo que ocasionó competencia entre los microorganismos por los nutrientes del medio.

A partir de lo anterior, se puede concluir que en la actualidad existen estudios muy completos sobre la metagenómica del pulque, sin embargo, estos estudios no se han realizado en un proceso de fermentación aséptico para la producción del pulque como el que se propone en este proyecto. Por lo tanto, considerando que la tecnología PCR-DGGE es una herramienta que permite caracterizar la dinámica y diversidad microbiana durante procesos de fermentación complejos, se utilizó para caracterizar el proceso semicontinuo para la producción de pulque que se plantea en esta investigación. Cabe destacar que esta técnica no se ha empleado hasta el momento en el análisis metagenómico del pulque.

## **4. MARCO CONCEPTUAL DE LA TESIS**

### **4.1. JUSTIFICACIÓN**

El pulque a lo largo de su historia ha sufrido diferentes estados críticos, llegando a un punto de su casi desaparición a mediados del siglo XX. Diferentes factores socioeconómicos y culturales han ocasionado este declive. Desde hace un par de décadas, las investigaciones científicas sobre el pulque han ayudado a la revalorización de esta bebida ancestral mexicana por un sector de la población. Sin embargo, y a pesar de los grandes beneficios a la nutrición y salud humana que se han encontrado para el pulque, aún en la actualidad, el problema más importante que impide la aceptación y comercialización del pulque y con ello su resurgimiento, lo constituye la falta de control de calidad en la producción de la bebida, principalmente asociado a su calidad sanitaria. En la actualidad, una parte importante de la sociedad sigue percibiendo al pulque como una bebida de mala calidad por la falta de condiciones sanitarias apropiadas durante su preparación y venta.

La elaboración del pulque es realizada principalmente por productores artesanales. Sin embargo, en el proceso artesanal no se tiene un control sobre las variables importantes de la fermentación del aguamiel para la producción de pulque, como son la temperatura, la concentración y el tipo de microorganismos fermentadores presentes en la semilla empleada para la inoculación, los microorganismos presentes en el aguamiel fresco usado para la fermentación, así como, las condiciones de asepsia requeridos durante el proceso. Todas estas variables afectan de manera importante la calidad fisicoquímica, probiótica, sensorial y sanitaria del producto final.

Con base en lo anterior, en este proyecto se estandarizó la producción del pulque mediante el uso de un reactor semicontinuo que emula el proceso seguido artesanalmente. Sin embargo, en este trabajo el proceso de elaboración de pulque se desarrolló en condiciones asépticas mediante el uso de la esterilización en frío del aguamiel por medio de membranas de microfiltración, evitando así la variación microbiana durante el proceso de fermentación y a su vez conservando la microbiota autóctona derivada del inóculo natural inicial. Aunado a esto, se evaluó la dinámica microbiana del pulque producido en el reactor mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo.

## **4.2. ORIGINALIDAD**

El proceso de fermentación semicontinuo de pulque en condiciones controladas realizado en esta investigación, el cual emula el proceso de producción artesanal, no ha sido publicado hasta el momento en la literatura científica; por consiguiente, el presente trabajo constituye una contribución científica y tecnológica novedosa. Otro rasgo original del presente trabajo es la implementación de un proceso para la producción de pulque en condiciones asépticas mediante el uso de esterilización por membranas de microfiltración. El fin último de este trabajo es llegar a un proceso estandarizado para la producción de pulque, logrando preservar sus características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales, así como la calidad sanitaria del producto.

Por otro lado, a pesar de que en la actualidad existen estudios muy completos sobre la metagenómica del pulque, éstos no se han realizado en un proceso aséptico de producción de pulque como el que se desarrolló en el presente trabajo por medio de la tecnología PCR-DGGE. De acuerdo con lo anterior y a los reportes de la literatura relevante, es posible afirmar que el presente proyecto constituye una propuesta novedosa y útil para la estandarización del proceso de elaboración del pulque.

## **4.3. OBJETIVOS**

### **4.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un proceso de fermentación semicontinua de producción de pulque usando membranas de microfiltración y evaluar la dinámica microbiana del pulque producido mediante técnicas de análisis moleculares de PCR dependientes e independientes del cultivo.

### **4.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar fisicoquímica, sensorial y microbiológicamente el inóculo inicial del proceso de fermentación semicontinua.
2. Aislar e identificar los microorganismos presentes en el inóculo inicial del proceso de fermentación semicontinua del pulque por métodos dependientes del cultivo.
3. Determinar la diversidad microbiana en el inóculo inicial del proceso de fermentación semicontinua del pulque por métodos independientes del cultivo.
4. Esterilizar el aguamiel que fue usado como sustrato en la producción de pulque empleando procesos de membranas de microfiltración.
5. Desarrollar un proceso por lotes con recambios secuenciales en estado cuasi-estacionario de producción de pulque y evaluar la dinámica de los parámetros fisicoquímicos, sensoriales y microbiológicos durante el proceso de fermentación.
6. Determinar la diversidad microbiana en el producto final del proceso de fermentación semicontinua de pulque.

### 4.3.3. METAS

Para el Objetivo Específico 1:

- 1.1. Determinación de los parámetros fisicoquímicos del pulque inicial: sólidos totales, color, acidez total, pH, °Brix, alcohol y azúcares (reductores y totales).
- 1.2. Evaluación sensorial del inóculo inicial.
- 1.3. Enumeración de microorganismos característicos del pulque inicial: bacterias ácido lácticas (MRS Y APT), levaduras y *Zymomonas*.

Para el Objetivo Específico 2:

- 2.1. Aislamiento de bacterias ácido lácticas y levaduras presentes en el inóculo inicial empleando medios selectivos de cultivo.
- 2.2. Extracción del ADN genómico de las cepas aisladas.
- 2.3. Amplificación del gen ADN ARNr 16S proveniente de los aislados microbianos mediante el uso de la técnica de PCR.
- 2.4. Selección de cepas únicas por especie mediante el análisis del perfil de la digestión enzimática de los amplificados del gen ARNr 16S.
- 2.5. Purificación del gen ARNr 16S de cepas únicas determinadas en la Meta 2.4.
- 2.6. Secuenciación de genes de cepas purificadas.
- 2.7. Identificación genética de aislados microbianos.

Para el Objetivo Específico 3:

- 3.1. Extracción del ADN genómico de una muestra del pulque inicial
- 3.2. Análisis de la diversidad microbiana en el pulque inicial usando la técnica de PCR-DGGE y secuenciación de bandas de ADN características.

Para el Objetivo Específico 4:

- 4.1. Acondicionamiento y esterilización química del sistema de membranas de ultrafiltración.

- 4.2. Esterilización en frío del aguamiel empleando un sistema de membranas de microfiltración.
- 4.3. Análisis fisicoquímicos del aguamiel filtrado usando membranas de microfiltración de acuerdo con la Meta 1.1.
- 4.4. Análisis de esterilidad del aguamiel filtrado usando membranas por el método de cultivo en placa.

Para el Objetivo Específico 5:

- 5.1. Establecimiento del reactor por lotes con recambios secuenciales usando pulque inicial seleccionado como inóculo y aguamiel esterilizado por membranas de microfiltración como sustrato.
- 5.2. Monitoreo de las características fisicoquímicas, sensoriales y microbiológicas del producto de pulque durante el proceso de recambios secuenciales de acuerdo con las metas del Objetivo Específico 1.
- 5.3. Análisis del proceso por lotes con recambios secuenciales hasta alcanzar el estado cuasi-estacionario de acuerdo con los parámetros monitoreados en la Meta 5.2.

Para el Objetivo Específico 6:

- 6.1. Aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en el producto final del proceso de fermentación semicontinua de pulque por métodos dependientes del cultivo de acuerdo con las metas establecidas para el Objetivo Específico 2.
- 6.2. Análisis de la diversidad microbiana en el producto final del proceso de fermentación semicontinua de pulque por métodos independientes del cultivo de acuerdo con las metas establecidas para el Objetivo Específico 3.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. RECOLECCIÓN DE LA SEMILLA Y DE AGUAMIEL

El inóculo (pulque fermentado) y el sustrato (aguamiel), fueron proporcionados por los productores de la región de La Altiplanicie Pulquera, municipio de Singuilucan, estado de Hidalgo (19°59'20" N, 98°27'56" W, altitud: 2 588 m snm) (Fig. 7). Para evitar contaminación, las muestras se recolectaron en frascos previamente esterilizados y fueron transportadas al Laboratorio de Bioprocesos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca en una hielera. Para evitar la fermentación del aguamiel y del pulque semilla, después de tomar una muestra para los análisis proximales, ambas muestras se sometieron a ultracongelación a una temperatura de  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de Macromoléculas de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa para análisis microbiológico y para su procesamiento posterior de acuerdo con los objetivos de este proyecto.



Fig. 8. Ubicación del municipio de Singuilucan en el estado de Hidalgo.

## 5.2. MICROFILTRACIÓN DEL AGUAMIEL

La esterilización del aguamiel empleado como sustrato para la fermentación se llevó a cabo en un módulo de filtración de flujo tangencial Pellicon 2 Mini (Millipore, EUA) (Figura 9), el cual cuenta con una bomba peristáltica automatizada (Fig. 9-e). Se utilizó un cartucho de membrana de microfiltración con un tamaño de poro de  $0.45\ \mu\text{m}$  (Fig. 9-d), para remover los microorganismos presentes en el aguamiel.

La esterilización del equipo se realizó empleando una solución de hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}$ ) con una concentración de 200 ppm durante 15 min, configurado en modo de recirculación. Para eliminar los residuos de  $\text{NaClO}$  se hizo fluir agua pasada por ósmosis estéril durante 10 min. El aguamiel se alimentó al equipo de filtración (Fig. 9-a) con ayuda de la bomba peristáltica. La salida de la corriente retenida (Fig. 9-b) fue recirculada al frasco de alimentación y la salida de permeado (Fig. 9-c) a un frasco previamente esterilizado. El aguamiel estéril se mantuvo en refrigeración hasta su uso. Al finalizar la operación, el equipo se lavó con una solución de hidróxido de sodio al 0.2%, seguido por agua estéril. La esterilidad del aguamiel microfiltrado se verificó por el método de cultivo en extensión en placa de una muestra del aguamiel sin diluir empleando agar cuenta estándar, por triplicado.

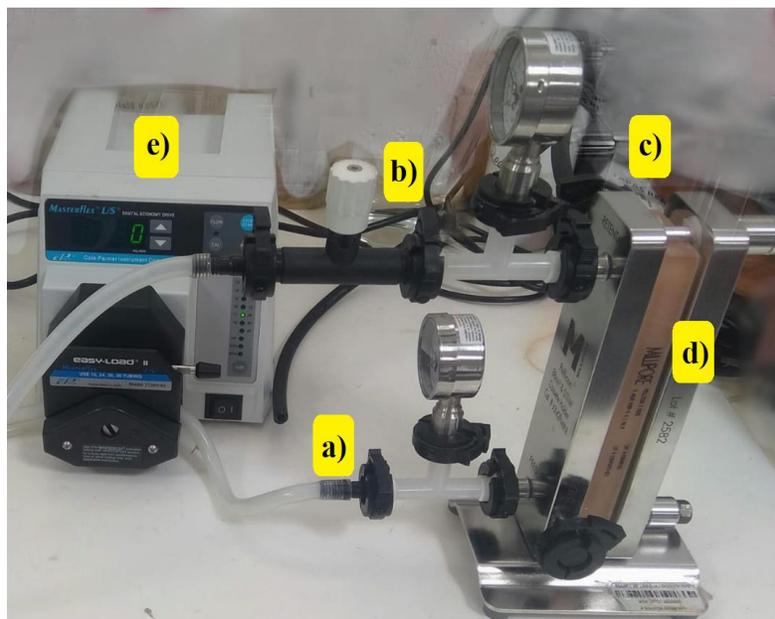


Fig. 9. Imagen de módulo de fluidos. a) Entrada de alimentación. b) Salida de retenido. c) Salida de permeado. d) Membrana de microfiltración. e) Bomba peristáltica.

### 5.3. PRODUCCIÓN DE PULQUE EN UN REACTOR SEMICONTINUO A NIVEL PILOTO

Se designó un área específica en una incubadora a una temperatura de 28 °C y ausencia de luz para la localización del frasco de vidrio roscado de 500 mL que se empleó como biorreactor. De acuerdo con las prácticas de los productores artesanales, el proceso de fermentación se llevó a cabo empleando 50% de pulque maduro de buena calidad seleccionado como inóculo inicial y 50% de aguamiel previamente esterilizado por microfiltración como sustrato (1:1).

La cosecha de pulque y recambios se realizó cada 24 h (Fig.9), haciendo el retiro de 1/3 del volumen de pulque y la subsecuente adición del mismo volumen de aguamiel estéril. A las muestras de pulque cosechado, se les realizaron pruebas fisicoquímicas (color, pH, acidez total, °Brix, determinación de alcohol, humedad y sólidos totales), así como, análisis sensoriales (aroma, sabor, acidez, astringencia y dulzor). La fermentación se continuó hasta que alcanzó el estado cuasi-estacionario, de acuerdo con los parámetros monitoreados. Todo lo anterior se realizó en condiciones asépticas.

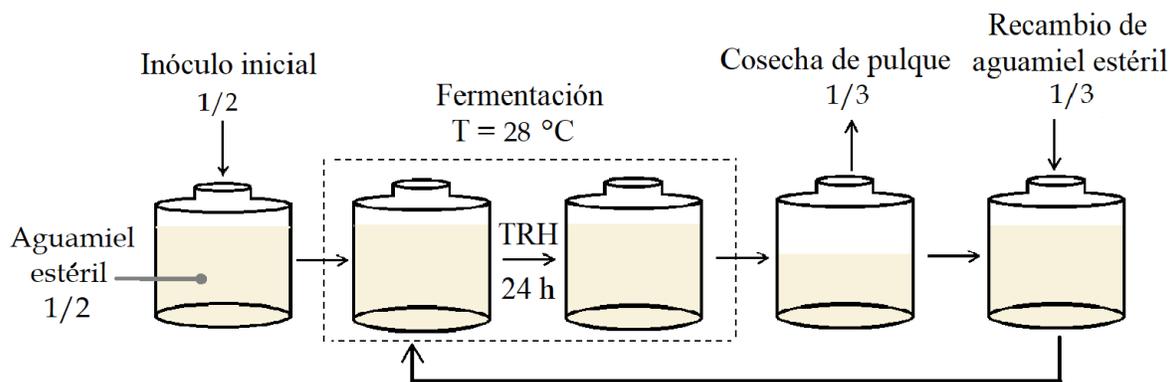


Fig. 10. Diagrama del proceso por lotes con recambios secuenciales de producción de pulque.

## 5.4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL PULQUE

Las pruebas fisicoquímicas que a continuación se mencionan se realizaron al pulque inicial y aguamiel, así como, a las muestras del producto cosechado a lo largo del proceso de fermentación en el reactor semicontinuo, hasta obtener el producto final. Los análisis se realizaron por triplicado. El muestreo del reactor semicontinuo se realizó cada 24 h. Así mismo, se realizaron análisis del aguamiel antes y después del proceso de microfiltración por triplicado.

### 5.4.1. COLOR

La determinación de color se realizó mediante el uso del espectrofotómetro UltraScan Vis (HunterLab, EUA). El equipo cuenta con un software habilitado para la medición de los parámetros CIE  $L^*a^*b^*$  de las muestras líquidas. El espacio de color CIE  $L^*a^*b^*$  se define con los siguientes parámetros:

$L^*$ = Luminosidad

$a^*$ = coordenadas rojo/verde (+ a indica rojo, - a indica verde)

$b^*$ = coordenadas amarillo/azul (+ b indica amarillo, - b indica azul)

El equipo se configuró en el modo de transmitancia total con un área de visión de 9.55 mm. Una vez realizada la calibración del equipo, se colocó 25 mL de muestra dentro de la celda de cuarzo y se procedió a tomar la lectura de los parámetros de color CIE  $L^*a^*b^*$ .

La diferencia total de color entre dos muestras Delta  $E^*$  ( $\Delta E^*$ ) se calculó de la siguiente manera:

$$\Delta E^* = \left( (L^*_1 - L^*_2)^2 + (a^*_1 - a^*_2)^2 + (b^*_1 - b^*_2)^2 \right)^{1/2}$$

Siendo  $L^*_1$ ,  $a^*_1$ ,  $b^*_1$  los parámetros de color pertenecientes a la muestra de pulque semilla. Y  $L^*_2$ ,  $a^*_2$ ,  $b^*_2$  los parámetros de color pertenecientes a la muestra de pulque proveniente del reactor semicontinuo.

#### **5.4.2. pH**

La determinación del pH de las muestras se realizó con un potenciómetro digital. La calibración se realizó con soluciones buffer de pH 7 y pH 4, considerando que el pH del pulque está en el intervalo de pH ácido. Se utilizó un volumen de 10 mL para realizar la lectura, verificando que la muestra cubriera el electrodo en su totalidad.

#### **5.4.3. ACIDEZ TOTAL**

La determinación de acidez total (AT) se llevó a cabo siguiendo la norma NMX-V-042-1972 [62]. Este parámetro se determinó utilizando 10 mL de muestra, en una relación 1:1 de la muestra con agua destilada. Se tituló con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N utilizando fenolftaleína como indicador. El resultado se expresó en gramos de ácido láctico por 100 mL de muestra.

Para la determinación, se utilizó la siguiente fórmula:

$$A.T. = \frac{V \times N \times 0.090}{M} \times 100;$$

en donde:

A.T. = Acidez total expresada en gramos de ácido láctico por 100 mL de muestra;

V = Volumen de hidróxido de sodio gastados en la titulación de la muestra;

N = Normalidad de la solución de hidróxido de sodio usada en la titulación;

0.090 = Miliequivalente del ácido láctico;

M = Volumen de muestra empleado en la determinación.

#### **5.4.4. SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES (°BRIX)**

Se utilizó un refractómetro digital MA822 (Milwaukee, EUA), el cual, antes de ser utilizado para las mediciones fue calibrado con agua pasada por ósmosis. Las lecturas se realizaron colocando muestra suficiente en la mirilla del refractómetro para una buena medición.

#### 5.4.5. DETERMINACIÓN DEL % DE ALCOHOL (ETANOL)

La determinación del etanol se realizó siguiendo la norma NMX-V-013-S-1980 [63]. Para realizar esta determinación, se utilizó un equipo de destilación simple, en el cual, se depositaron 20 mL de muestra y 10 mL de agua pasada por ósmosis y se colocaron 5 perlas de ebullición de vidrio. El sistema se llevó a temperatura de ebullición (90-95 °C) para realizar la destilación. Posteriormente, el destilado obtenido se midió con una probeta graduada, después de lo cual se realizó la lectura de la concentración de etanol con un refractómetro de alcohol.

Para el cálculo del contenido de alcohol en la muestra se utilizó la siguiente ecuación:

$$C_1V_1=C_2V_2;$$

en donde:

$C_1$  = Concentración de etanol en la muestra;

$V_1$  = Volumen de la muestra;

$C_2$  = Concentración de etanol que se obtuvo en el destilado (lectura del alcoholímetro);

$V_2$  = Volumen obtenido en la destilación.

#### 5.4.6. SÓLIDOS TOTALES (S.T.)

Se determinó el porcentaje de sólidos totales de acuerdo con la norma NMX-F-083-1986 [63] como se describe a continuación. Primeramente, se secaron las cápsulas a 110 °C durante 30 min, después de lo cual estas se trasladaron al desecador y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente. Posteriormente, se pesaron las cápsulas sin muestra ( $P_1$ ), y se volvieron a pesar después de colocarles las muestras ( $P_2$ ). Después de esto, las muestras se introdujeron en el desecador para trasladarlas a la estufa, donde se mantuvieron por 4 h a 110 °C. Las muestras se depositaron en el desecador para dejarlas enfriar a temperatura ambiente. Para finalizar la determinación, se pesaron las muestras secas ( $P_3$ ). El porcentaje de sólidos totales se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\%Sólidos\ Totales\ (S.T) = \frac{(P - P_1)}{P_2} \times 100;$$

en donde:

P = Peso del recipiente con la muestra seca;

$P_1$  = Peso del recipiente sin muestra;

$P_2$  = Peso de la muestra fresca.

#### **5.4.7. AZÚCARES REDUCTORES**

Todo el material que se utilizó en esta determinación fue cuidadosamente lavado, seguido de un enjuague con agua bidestilada.

##### **5.4.7.1. Determinación de azúcares reductores totales**

La concentración de azúcares totales se determinó usando el método Dubois [64], de acuerdo con la metodología de Ávila Núñez et al. [65] con algunas modificaciones. Para la curva de calibración se prepararon soluciones de 66 a 1000 ppm de glucosa como estándar. Como blanco para las lecturas se utilizó agua bidestilada aplicándole el mismo tratamiento que a las muestras y los estándares. Para la preparación del estándar de interés, se pesó 1 g del azúcar y se aforó a 10 mL para obtener una solución stock de 100 g/L. A partir de esta solución se prepararon las diferentes concentraciones para la curva de calibración.

Para la aplicación del método Dubois, se mezcló 150  $\mu$ L de muestra con 500  $\mu$ L de fenol al 5% en tubos de ensayo, los cuales se agitaron por 1 min. Posteriormente, a la mezcla se le añadió 2.5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado. Los tubos se colocaron en una gradilla dejándose reposar durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los tubos se llevaron a agitación en vórtex por 1.5 min y se sumergieron en un baño de agua a 25 °C por 20 min. Para finalizar, los tubos se agitaron durante 1 min y se analizaron en el espectrofotómetro UV-Vis GENESYS™ 50 (Thermo Scientific™, Waltham, EUA) a una longitud de onda de 490 nm. Para calcular la concentración de los azúcares en las muestras se empleó la ecuación de la línea recta obtenida a partir de la curva de calibración.

##### **5.4.7.2. Determinación de azúcares reductores fermentables**

La determinación de azúcares reductores fermentables se llevó a cabo a través de una curva de calibración aplicando el método Miller [66], de acuerdo con la metodología de Ávila Núñez et al. [65], empleando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como agente reductor. Para las curvas se prepararon soluciones de 66 - 1000 ppm de glucosa como estándar. Como blanco para las lecturas se utilizó agua bidestilada sin adición de azúcar aplicándole el mismo tratamiento que a los estándares.

El reactivo Miller se preparó disolviendo en agua bidestilada 1.6 g de NaOH, 30 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado y 1 g de DNS. La mezcla se aforó a 100 mL y se almacenó en un frasco ámbar a 4 °C. Para la aplicación del método Miller, se mezclaron 150 µL de muestra con 150 µL del reactivo DNS. Los tubos con la mezcla de reacción se pusieron en un baño térmico a temperatura de ebullición por 5 min, e inmediatamente fueron llevados a un baño de agua fría para el detenimiento de la reacción. Posteriormente, a las muestras se les añadió 1.5 mL de agua bidestilada, se agitaron en vórtex por 1 min y se dejaron reposar por 15 min. Finalmente, se determinó la absorbancia de la mezcla de reacción a 540 nm en el espectrofotómetro UV-Vis GENESYSTEM 50 (Thermo Scientific™, EUA). Para calcular la concentración de los azúcares reductores fermentables en ppm de las muestras se empleó la ecuación de la línea recta obtenida a partir de la curva de calibración.

## **5.5. ANÁLISIS SENSORIAL**

Se llevó a cabo una prueba de análisis sensorial con 6 panelistas semi-entrenados, en donde se evaluó el aroma, el sabor, la acidez, la astringencia y el dulzor en una escala del 1 al 10 del pulque semilla con base a un puntaje global asignado a un pulque ideal para saber el puntaje de cada uno de los atributos (Fig. 11).

Evaluador: _____		
Favor de evaluar los siguientes atributos en la escala del 1-10 (1 mínimo-10 máximo)		
	P. Ideal	
Aroma característico	10	_____
Sabor característico	10	_____
Sabor a planta	2	_____
Acidez	5	_____
Astringente	5	_____
Dulzor	5	_____
Comentarios: _____		
_____		
_____		

Fig. 11. Boleta de evaluación del análisis sensorial para el pulque semilla (inóculo) y las muestras de pulque a lo largo de la fermentación y el pulque final.

Con la finalidad de describir y cuantificar los parámetros sensoriales del aguamiel a lo largo del proceso de fermentación tomando como referencia al pulque semilla, se realizó una prueba de análisis descriptivo comparativo como se muestra en la Fig. 12, en la cual, los evaluadores designaron valores negativos o positivos en función de la referencia, para verificar por medio de los evaluadores si el pulque obtenido durante la fermentación en el reactor semicontinuo, usando aguamiel estéril como sustrato, es o no similar al pulque con el cual se inóculo el sustrato (pulque semilla).



## **5.6. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA PRESENTE EN EL INÓCULO Y DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL PULQUE POR REACTOR SEMICONTINUO**

### **5.6.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA CONTEO Y AISLAMIENTO DE GRUPOS MICROBIANOS PRESENTES EN LAS MUESTRA**

A continuación, se describen los medios de cultivos selectivos que se usaron para realizar conteos de los distintos grupos microbianos presentes tanto en el inóculo como durante el proceso de fermentación semicontinuo que se desarrolló en este proyecto. Asimismo, se detallan los medios usados para realizar los aislamientos de los distintos grupos microbianos presentes tanto en el inóculo como en el producto final de las fermentaciones. La descripción se realiza de acuerdo con los grupos microbianos que se tienen como objetivo para cada medio de cultivo.

Bacterias ácido lácticas

El Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) es un medio de cultivo apropiado para el aislamiento de bacterias ácido lácticas. Composición para 1 L de agar MRS: 10 g de peptona de carne, 8 g de extracto de carne, 5 g de extracto de levadura, 20 g de glucosa, 2 g de fosfato dipotásico, 5 g de acetato de sodio, 2 g de citrato de triamonio, 0.2 g de sulfato de magnesio, 0.05 g de sulfato de manganeso, 13 g de agar bacteriológico y 1 g de Tween 80 Polisorbato. La incubación se realizó en condiciones de microaerofilia a 37 °C durante 24-72 h. En el proyecto emplearon 4 mg/L de cicloheximida (Sigma Aldrich, EUA) como inhibidor de levaduras.

*Leuconostoc* spp.

Se empleó medio Agar All Purpose Tween (APT) enriquecido con 20% de sacarosa el cual es utilizado para el cultivo de bacterias ácido lácticas heterofermentativas del género *Leuconostoc*. La composición para 1 L de agar es: agar bacteriológico 13.5 g, sulfato ferroso 0.004 g, cloruro de manganeso (II) 0.14 g, cloruro sódico 5 g, clorhidrato de tiamina 0.001 g, hidrogenofosfato de potasio 5 g, D (+)-glucosa 10 g, sulfato magnésico 0.8 g, peptona 12.5 g, citrato de sodio 5 g, extracto de levadura 7.5 g. Adicionalmente, se agregó al medio 20% de sacarosa y 4 mg/L de cicloheximida (Sigma Aldrich, EUA) como inhibidor de levaduras. La incubación se realizó a 32 °C durante 24 a 48 h [14].

*Zymomonas* spp.

Para *Zymomonas spp* se empleó el medio caldo de enriquecimiento y aislamiento según lo indicado por Oribe O. [67] y el medio de agar de acuerdo con lo establecido por Chacón-Vargas et al. [40], ambos con algunas modificaciones. El medio caldo de enriquecimiento y aislamiento se preparó con la siguiente composición para 1 L: 3 g de extracto de levadura, 20 g de glucosa, 5 g de peptona, 3% de etanol, 1 µg/mL de cicloheximida (Sigma Aldrich, EUA). Este medio se ajustó a un pH de 4 con ácido clorhídrico. Para su aplicación, el caldo inoculado se incubó a 30 °C durante 5 h. Por otro lado, para la preparación del medio agar (Zm) se utilizó la siguiente formulación para 1 L de agar Zm: 3 g de extracto de malta, 3 g de extracto de levadura, 14 g de glucosa, 6 g sacarosa, 5 g de peptona, 1 µg/mL de cicloheximida (Sigma Aldrich, EUA). La incubación se realizó en condiciones de microaerofilia a 30 °C.

*Levaduras*

El medio empleado para levaduras fue Agar de Papa y Dextrosa (APD) con la siguiente composición por 1 L: agar bacteriológico 15 g, dextrosa 20 g, infusión de papa 4 g. Se usaron 25 mg de cloranfenicol (Sigma Aldrich, EUA) como inhibidor de bacterias. El cultivo se incubó a 25 °C durante 24-72 h

### **5.6.2. CULTIVO DE MICROORGANISMOS**

Se tomó 1 mL de la muestra para el análisis y se hicieron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  de pulque en agua peptonada previamente esterilizada. Posteriormente, se realizó la siembra por extensión en placa, empleando una alícuota de 0.1 mL de la dilución seleccionada en cajas con aproximadamente 15 mL del medio de cultivo correspondiente. Las placas con cultivo se incubaron bajo las condiciones específicas para cada medio mencionadas anteriormente. Durante la fermentación dicha siembra se realizó cada 24 h, posterior a la cosecha diaria de pulque.

### **5.6.3. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MICROSCÓPICA DE LAS COLONIAS**

Se realizó la clasificación fenotípica de las colonias microbianas de acuerdo con las características morfológicas particulares de los diferentes grupos encontrados. Esta clasificación se realizó de acuerdo con las características macroscópicas observadas en las

colonias con base en los criterios de la Fig. 13; siendo los criterios más importantes los siguientes: coloración, forma, aspecto, elevación y bordes.

A partir de esta clasificación, basada en la morfología colonial, se determinaron los grupos microbianos que se consideraron para el aislamiento y enumeración de microorganismos en procedimientos posteriores. Adicionalmente, se realizó la caracterización microscópica para cada uno de los grupos microbianos seleccionados. Para esto, a las 24 h de crecimiento, a cada colonia seleccionada se le realizó un frotis y posteriormente una tinción Gram, Adicionalmente, se procedió a realizar la observación microscópica a 100X en un microscopio óptico compuesto (AmScore, EUA) de las preparaciones microbianas para observar las diferencias o similitudes entre colonias similares.

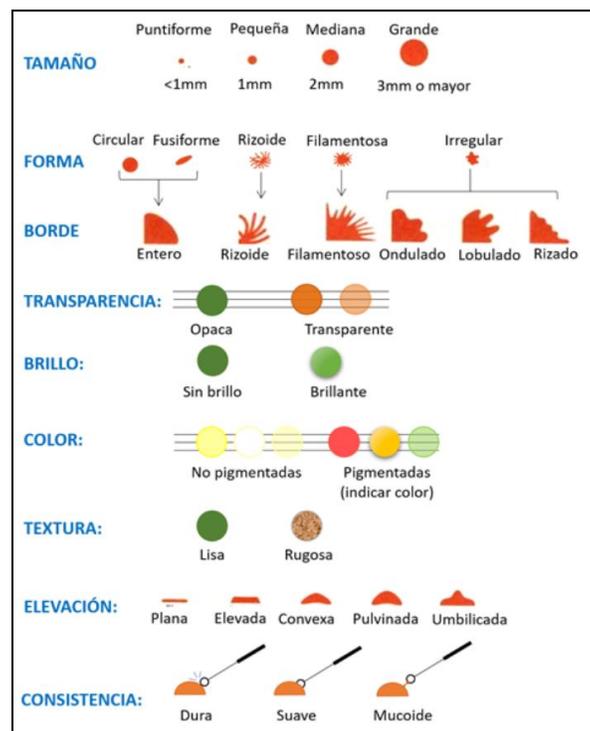


Fig. 13. Criterios de caracterización morfológica colonial.

#### 5.6.4. ENUMERACIÓN DE CÉLULAS MICROBIANAS

Una vez realizada la clasificación de los diferentes grupos de colonias para cada medio de cultivo específico, se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) en las cajas Petri para las diluciones que se encontraron dentro del intervalo contable (25-250

colonias). La cuenta de la caja correspondiente se multiplicó por el factor de dilución para obtener el valor de UFC/mL en la muestra original.

La enumeración de los diferentes grupos coloniales se realizó para el inóculo inicial y en el producto final de la fermentación considerando todos los medios selectivos mencionados en la Sección 5.6.1. Por otra parte, en el caso del seguimiento de la dinámica microbiana durante el proceso de fermentación semicontinuo, se realizó el conteo general y el conteo de grupos microbianos únicamente en los medios selectivos (MRS, APT y APD).

#### **5.6.5. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CARACTERÍSTICOS**

Se aislaron las colonias procedentes del inóculo y del producto final de la fermentación semicontinua que presentaron características morfológicas y microscópicas diferentes entre ellas, con base en la clasificación realizada según la Sección 5.6.3. El aislamiento consistió en la toma cuidadosa de una asada de la colonia y su siembra en el mismo medio de cultivo que se usó originalmente para el crecimiento de la cepa, como se describió en la Sección 5.6.1. Para la siembra se usó el método de estriado por agotamiento en caja de Petri. Posteriormente, se hicieron observaciones coloniales y microscópicas de las cepas desarrolladas para comprobar que la cepa se logró aislar adecuadamente. De lo contrario, se repitió el procedimiento de aislamiento hasta obtener la cepa pura. Una vez obtenida la cepa pura, se realizó la prueba de catalasa, que consistió en colocar la cepa en un portaobjetos previamente limpio y estéril para posteriormente agregar peróxido de hidrógeno, dando como resultado la presencia o ausencia de burbujeo. Si la cepa produce burbujas se clasifica como catalasa positiva; en caso contrario, la cepa se clasifica como catalasa negativa.

Una vez que las cepas de cada grupo microbiano definido anteriormente fueron aisladas y purificadas, estas se conservaron en cajas Petri en condiciones de refrigeración (5 °C), realizando resiembras cada 2-3 semanas para su mantenimiento y conservación. Adicionalmente, se hicieron respaldos de los aislados en una solución de glicerol al 30% en condiciones de congelación a -20 °C. A cada aislado se le designó un código para su identificación, para las cepas provenientes del pulque semilla se antepuso PU, para las cepas provenientes de la fermentación del reactor se antepuso PR. Consecutivamente, se indicó el medio del cual fueron aisladas, B para MRS, Ln para medio APT y L para las provenientes

del medio APD. Por último, se le asignó un número a cada cepa proveniente de los diferentes medios.

## **5.7. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA MICROBIANA POR MÉTODOS DEPENDIENTES DE CULTIVO**

### **5.7.1. EXTRACCIÓN DE ADN DE COLONIAS AISLADAS**

Las colonias aisladas se reactivaron por medio de su siembra en tubos con caldo MRS en el caso de BAL, APT modificado en el caso de *Leuconostoc* y APD en el caso de levaduras. A continuación, las cepas se incubaron durante 24 h en las condiciones respectivas para cada medio selectivo de acuerdo con la Sección 5.6.1.

#### **Extracción de ADN de bacterias**

La extracción de ADN de las colonias bacterianas aisladas se realizó de acuerdo con las indicaciones del kit de extracción Ultra Clean™-Microbial DNA isolation kit (MO BIO Laboratories Inc., EUA). En un microtubo de 2 mL se depositó 1.8 mL del cultivo incubado por 24 h previamente homogenizado. El tubo se centrifugó a 10,000 rpm por 30 s y posteriormente se decantó el sobrenadante. Al pellet se le agregaron 300 µL de solución buffer Microbead y el tubo se llevó a agitación en un vórtex. Después de esto, la solución homogenizada se transfirió a un tubo Microbead adicionándole 50 µL de la solución MD1 para llevar a cabo la lisis celular. El tubo se agitó en un vórtex a la velocidad máxima por 10 min colocado de manera horizontal y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 30 s.

El sobrenadante se transfirió a un microtubo de 2 mL agregándole 100 µL de la solución MD2, con subsecuente agitación en un vórtex por 5 s. Seguido de esto, el tubo se incubó a 4 °C durante 5 min. Después de la incubación, la solución se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min. Posteriormente, el sobrenadante se depositó nuevamente en un microtubo de 2 mL, al cual se le agregaron 900 µL de la solución MD3. La mezcla se agitó en el vórtex durante 5 s. A continuación, se pipetearon 700 µL de la mezcla anterior en el filtro de membrana, seguido de lo cual el tubo se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 s. Después de esto, se desechó el sobrenadante, y se depositó el resto de la mezcla nuevamente en el

filtro. A continuación, se repitió el proceso de centrifugación del filtro a las mismas condiciones y el sobrenadante se desechó.

Adicionalmente, se colocó 300  $\mu\text{L}$  de la solución MD4 en el centro de la membrana, y la mezcla se centrifugó dos veces a 10,000 rpm durante 30 s, desechando el sobrenadante después de cada centrifugación. Posteriormente, la membrana fue traspasada a un microtubo de 2 mL, al cual se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  de la solución MD5 al centro de la membrana. Después de esto, el tubo se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm durante 30 s. Con esta acción se separó el ADN de la membrana, por lo cual la membrana se desechó y el ADN fue recuperado en el tubo recolector.

### **Extracción de ADN de levaduras**

La extracción de ADN de las colonias de levaduras aisladas se realizó de acuerdo con las indicaciones del kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, EUA). Se colocaron 100 mg de biomasa en tubos de 2 mL. Posteriormente, se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de buffer AP1 y 4  $\mu\text{L}$  de solución madre de ARNasa A (100 mg/mL). La mezcla se incubó durante 10 min a 65 °C, tiempo durante el cual se realizaron 2 o 3 mezclados invirtiendo el tubo. A continuación, se agregaron 130  $\mu\text{L}$  de buffer P3 al lisado, y se mezcló e incubó durante 5 min en hielo. Después de esto, el lisado se centrifugó durante 5 min a 20,000  $\times$  g (14 000 rpm), seguido de lo cual, éste se pipeteó en la columna giratoria QIAshredder Mini colocada en un tubo de recolección de 2 mL y se centrifugó durante 2 min a 20,000  $\times$  g (14 000 rpm). Después de esto, la fracción de sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo sin perturbar el sedimento de restos celulares.

Adicionalmente, al lisado aclarado se le añadió 1.5 volúmenes de solución buffer AW1 y se realizó la mezcla con una pipeta. Posteriormente, se colocaron 650  $\mu\text{L}$  de la mezcla, en la columna de centrifugación DNeasy Mini colocada en un tubo de recogida de 2 mL (suministrado), se centrifugó durante 1 min a 8000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se colocó la columna de centrifugación DNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 mL, se agregó 500  $\mu\text{L}$  de buffer AW2 y se centrifugó durante 1 min a 12,000  $\times$  g (8000 rpm). Se añadió 500  $\mu\text{L}$  de buffer AW2 a la columna de centrifugado DNeasy Mini y se centrifugó durante 2 min a 20,000  $\times$  g (14 000 rpm) para secar la membrana.

Subsecuentemente, se transfirió la columna de centrifugación DNeasy Mini a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL o 2 mL y se pipeteó 100  $\mu$ L de buffer AE directamente en la membrana DNeasy, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó durante 1 min a 12,000  $\times$  g (8000 rpm) para eluir. Por último, se pipeteó 100  $\mu$ L de buffer AE directamente en la membrana DNeasy, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y después se centrifugó durante 1 min a 8000 rpm para eluir por última vez.

### **5.7.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE de electroforesis, el cual se calentó hasta disolver totalmente la agarosa. Posteriormente, en la cubeta de electroforesis se colocaron los topes y la peineta para formar los pozos; después de lo cual, se tomaron 40 mL del gel y se vertieron en la cubeta. El gel se dejó enfriar por 20 min. Una vez solidificado el gel, se retiraron las peinetas y los topes, y se agregó buffer TBE a la cubeta hasta cubrir el gel. Para cargar los pozos se mezcló 2  $\mu$ L de la muestra con 2  $\mu$ L de colorante de carga. La mezcla anterior se depositó en el pocillo del gel. Para calcular el tamaño aproximado de ADN analizado, uno de los pocillos se cargó con la mezcla de 2  $\mu$ L de colorante de carga con 1.5  $\mu$ L del marcador de peso molecular, estándar de ADN de 1kb GeneRuler Ladder (Fermentas, EUA).

Posteriormente, se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación y se corrió la electroforesis a 100 V durante 40 min aproximadamente. Una vez terminada la electroforesis el gel se incubó en una cubeta con 100 mL de buffer TBE y 10  $\mu$ L de bromuro de etidio como agente revelador, durante 15 min. Para el revelado del gel se empleó un fotodocumentador BIOTOP EVO Flour Shot PRO II (Biotech, China), manipulando el gel de agarosa con guantes de nitrilo en todo momento.

### **5.7.3. AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL GEN ARNr 16S Y DE LA REGIÓN ITS**

A continuación, se realizó la amplificación de los genes ARNr 16S y la región ITS del ADN de las colonias aisladas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) usando la enzima Taq polimerasa recombinante (ThermoScientific, EUA). En la Tabla 6 se muestra la mezcla para una reacción de PCR.

Los *primers* que se utilizaron para la amplificación del gen ARNr 16S son los siguientes:

- 27F: 5' - AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'
- 1492R: 5' - TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3'

En el caso de la región ITS, los *primers* utilizados fueron:

- ITS1: 5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
- ITS4: 5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'

Tabla 6. Mezcla de reacción para PCR empleando la enzima Taq Polimerasa recombinante (ThermoScientific, EUA).

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen <math>\mu</math>L</b>
10 X Taq Buffer	5
dNTP Mix	1
Forward Primer (10 $\mu$ M)	2.5
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	2.5
MgCl <sub>2</sub>	2
Taq DNA Polimerasa	1
Agua libre de RNA	35
ADN	1
Total	50

Se preparó una mezcla de reacción para todas las muestras de ADN obtenidas, sin agregar el ADN. Posteriormente, se transfirió 49  $\mu$ L de la mezcla correspondiente a una reacción a microtubos para PCR y se agregó 1  $\mu$ L del ADN de estudio. Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizó el termociclador Mastercycle Eppgradient Modelo 5341 (Eppendorf, Hamburg, Alemania), el cual es un equipo especializado para proveer las condiciones necesarias para la reacción. Las condiciones para la amplificación del gen ARNr 16S fueron las siguientes: desnaturalización inicial, 95 °C durante 5 min; amplificación, 95 °C por 1 min, seguido de 42 °C por 1 min y 72 °C por 1.5 min repitiendo este ciclo 30 veces; amplificación final, 72

°C durante 10 min. Por otra parte, las condiciones para la amplificación de la región ITS fueron: 95 °C durante 10min; amplificación, 94 °C por 30 s, seguido de 55 °C por 30 s y 72 °C por 1 min repitiendo este ciclo 36 veces; amplificación final, 72 °C durante 1 min. El producto final de la amplificación se verificó en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE de electroforesis, visualizándolo en el fotodocumentador Molecular Imager Gel-Doc™ XR+ System (Bio-Rad, E.U.A), utilizando el software Image Lab versión 5.0.



Fig. 14. Termociclador Mastercycle Epgradient Modelo 5341 (Eppendorf, Hamburg, Alemania)

## **DIGESTIÓN ENZIMÁTICA**

La técnica de digestión enzimática del gen amplificado es de utilidad para evaluar si distintas muestras de microorganismos pertenecen a la misma especie. La digestión enzimática se realizó con una enzima de restricción, la cual rompe específica y controladamente el ADN. La enzima que se utilizó para la digestión en el presente trabajo fue la *HAEIII* #R0108 (New England BioLabs Inc., EUA). En la Tabla 7 se muestra la composición de la mezcla de reacción para la digestión enzimática. El producto final de la digestión se verificó en un gel

de agarosa al 2% en buffer TBE de electroforesis. La electroforesis se corrió a 70 V por 40 min, visualizándolo en el fotodocumentador Molecular Imager Gel-Doc™ XR+ System (Fig. 15), utilizando el software Image Lab versión 5.0.

Tabla 7. Mezcla de reacción para la digestión enzimática.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (μL)</b>
Buffer 10X	2
Enzima <i>HAE</i> III	0.125
H <sub>2</sub> O	12.875
ADN	5
Total	20



Fig. 15. Fotodocumentador Molecular Imager Gel-Doc™ XR+ System

## **PURIFICACIÓN DE LOS AMPLIFICADOS**

La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo utilizando el kit de purificación GeneJet™ PCR Purification kit (Fermentas, EUA), siguiendo las indicaciones del fabricante. La muestra se mezcló en una relación volumétrica 1:1 con la solución *Binding buffer* agitándose en un vórtex. La mezcla se transfirió a una columna de purificación GeneJet, misma que se llevó a centrifugación a 10,000 rpm durante 1 min. El sobrenadante fue desechado y el pellet se resuspendió con 700  $\mu$ L del buffer de lavado. Posteriormente, se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm durante 1 min, y el sobrenadante fue desechado. Subsecuentemente, la columna de purificación se colocó en un tubo nuevo de 2 mL, después de lo cual, se agregó 50  $\mu$ L del buffer de elución. Finalmente, la columna se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 min y el sobrenadante se colectó conteniendo el ADN<sub>r</sub> purificado.

La cuantificación de la cantidad de ADN purificado se realizó utilizando la placa Take3™ Multi-volume (Biotek Instruments GmbH, EUA) en un espectrofotómetro Epoch Biotek (Synergy HT, EUA). El equipo se calibró con 2  $\mu$ L de agua ultrapura. Posterior a la calibración, se depositaron 2  $\mu$ L del producto de PCR purificado para su cuantificación.

#### **5.7.4. SECUENCIACIÓN DE GENES**

Las secuenciaciones del gen ARNr 16S y la región ITS de las cepas aisladas se realizaron en los laboratorios de Macrogen Inc. (Corea del Sur). Para cada muestra de ADN se obtuvieron dos secuencias (forward y reverse), las cuales se alinearon con el software Mega-X. A partir del alineamiento, se obtuvieron las secuencias completas del gen de cada cepa, que se utilizaron para su identificación genética.

#### **5.7.5. IDENTIFICACIÓN GENÉTICA**

Las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el uso del programa online Blast (refseq) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y el repositorio de secuencias bacterianas tipo del gen 16S ARNr EzBioCloud ([www.ezbiocloud.net](http://www.ezbiocloud.net)).

#### **5.7.6 ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI Biotyper®**

Además del uso de las técnicas moleculares, en este trabajo se realizó la identificación de las cepas aisladas usando la técnica de MALDI Biotyper® en el Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas de la UAM-Iztapalapa (Fig. 16). Para la identificación de los microorganismos cultivables por esta técnica, las cepas aisladas se cultivaron por no más de 48 h, y se empleó la metodología de extracción con ácido fórmico descrito por los fabricantes del equipo y que se resume a continuación. Una vez obtenido un cultivo por estriado en placa, se transfirió una colonia con un palillo de madera estéril a un tubo Eppendorf con 300  $\mu$ L de agua desionizada estéril. Posteriormente, la mezcla se homogenizó en vórtex y a esta se le agregaron 900  $\mu$ L de etanol puro. Subsecuentemente, la mezcla se centrifugó a máxima velocidad (15,000 rpm) por 2 min, el sobrenadante se decantó y el proceso de centrifugación se repitió para remover los residuos de etanol.

A continuación, el pellet se dejó secar a temperatura ambiente por 5 min, después de lo cual se añadió ácido fórmico al 70% y se realizó el mezclado por pipeteo. Adicionalmente, se agregó a la mezcla 1  $\mu$ L de acetonitrilo y ésta se centrifugó a la máxima potencia (13,000-15,000rpm) durante 2 min. Posteriormente, se transfirió 1  $\mu$ L de sobrenadante a la placa de ensayo (Steel Target Sample Plate) del MALDI Biotyper® dejándolo secar a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1  $\mu$ L de la matriz compuesta por ácido alfa-cyano-4-25 hidroxicinámico disuelta en una solución saturada de acetonitrilo y ácido trifluoroacético, y se dejó secar al aire. Finalmente, se analizó la muestra con ayuda del analizador MALDI

Biotyper® (Bruker Daltonik GmbH GmbH, Alemania) comparando los espectros obtenidos de las muestras de estudio con las bases de datos del proveedor.

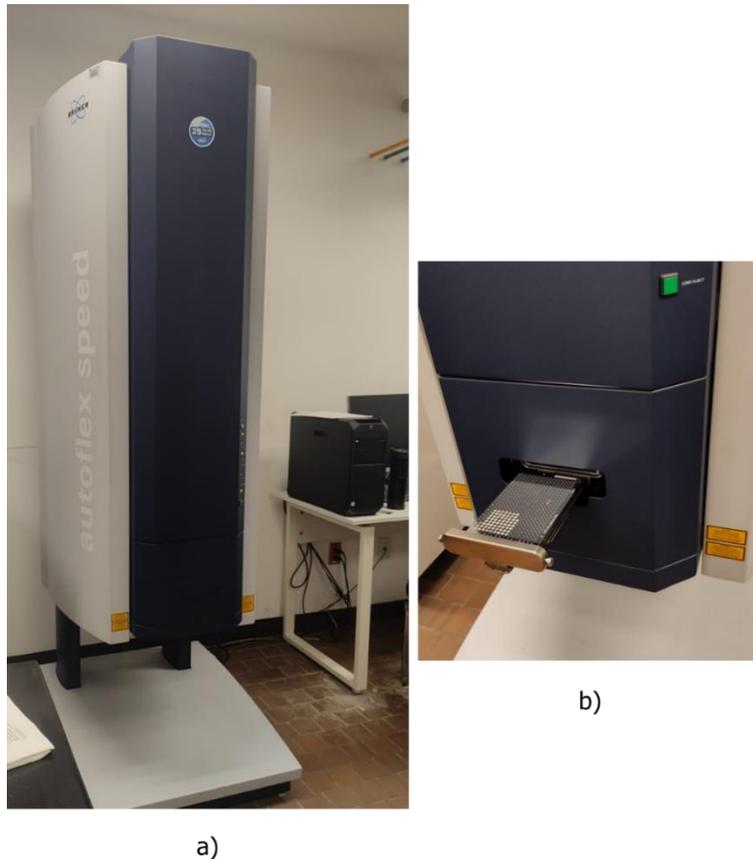


Fig. 16. a) Analizador MALDI Biotyper® (Bruker Daltonik GmbH GmbH, Alemania), b) placa de ensayo (Steel Target Sample Plate)

## **5.8. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA POR MÉTODOS INDEPENDIENTES DE CULTIVO**

### **5.8.1. EXTRACCIÓN TOTAL DE ADN**

La extracción de ADN total de las muestras de pulque se realizó con el kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), método indicado en la Sección 5.7.1 para la extracción de ADN de levaduras. Finalmente, el ADN obtenido se verificó en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE de electroforesis, visualizándolo en el fotodocumentador Molecular Imager Gel-Doc™ XR+ System (Bio-Rad, E.U.A), utilizando el software Image Lab versión 5.0.

### 5.8.2. PCR-DGGE

Para el caso del gen ARNr 16S se amplificaron las regiones V3 y V6-V8, dado que son marcadores ampliamente utilizados para caracterizar comunidades bacterianas mediante la técnica de PCR-DGGE. En la Tabla 8 se enlistan las condiciones de PCR empleadas en el presente trabajo para amplificar las regiones V3 y V6-V8 [52,61].

Tabla 8. Condiciones de PCR para amplificar las regiones V3 y V6-V8 del gen ARNr 16S.

<b>Región V3</b>			
<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>No. de ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94	3	1
Desnaturalización	94	0.3	
Alineación	65	0.3	30
Extensión	72	2	
Extensión final	72	5	

<b>Región V6-V8</b>			
<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>No. de ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	
Alineación	53	1	30
Extensión	72	1	
Extensión final	72	5	1

Los *primers* utilizados son los siguientes:

- Región V3:

B518r: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

338G-F: 5'-

CGCCCCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCCGCCCCACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'

338F: 5' - ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'

- Región V6-V8:

BAC-968F: 5'-GAACGCGAAGAACCTTAC-3'

BAC 1401r: 5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'

Clamp BAC-968F: 5' -

CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3'

La amplificación de la región D1 del gen ADNr 26S se amplificó utilizando las condiciones indicadas en la Tabla 9 [61] y los siguientes *primers*:

- LS2r: 5'-ATTC CCAAACAACCTCGACTC-3'
- NL1-fGC:  
5'GCCCGCCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3'

Tabla 9. Condiciones de PCR para la región D1 del gen ADNr 26S.

<b>Región D1</b>			
<b>Paso</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>No. de ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	1	
Alineación	52.3	2	30
Extensión	72	2	
Extensión final	72	10	

Los productos de PCR fueron verificados en un gel de agarosa al 1%. La técnica de DGGE se realizó utilizando un gel de poliacrilamida con un gradiente de agentes desnaturalizantes de 40-60% de urea y formamida, utilizando buffer TAE 1X (Tris-acetato-EDTA). El gel se

corrió a 60 °C; a 20 V, los primeros 10 min; a 85 V las siguientes 16 h. Posteriormente, se realizó la tinción del gel con plata [52,68]. Para el revelado del gel se empleó un Fotodocumentador Molecular Imager Gel-Doc™ XR+ System, manipulando el gel de acrilamida con guantes de nitrilo en todo momento.

Así mismo, se evaluó la diversidad de especies por medio del índice de diversidad de Simpson (S) que representa la riqueza de especies, índice de Shannon-Wiener (H) también conocido como índice de diversidad estructural y el índice de uniformidad o de Pielou (J), los cuales permiten comparar de manera rápida la diversidad de microorganismos en una muestra [69], utilizando las siguientes formulas:

índice H

$$H = -\sum p_i \ln p_i ;$$

donde:

$p_i = n_i/N$  (abundancia relativa de la banda individual)

$n_i$  = intensidad de la banda en el carril

$N$  = suma de intensidad de las bandas de un carril

índice J

$$J = H / \ln S ;$$

donde:

$S$  = número total de bandas por carril

## 5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los resultados se realizó un ANOVA de un solo factor con un nivel de significancia del 95% para identificar si existe o no diferencia significativa en los resultados del producto del reactor teniendo como referencia el pulque que se ocupó como inóculo inicial. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza y una prueba múltiple de medias de Tukey con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ) para el análisis de comparación de medias. Para la comparación de medias de dos muestras se utilizó la prueba t-Student ( $p < 0.05$ ).

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En el presente proyecto se realizó el análisis de dos muestras diferentes de aguamiel, antes y después de su filtración por membranas de microfiltración, para su uso como sustrato en el proceso de fermentación para la producción de pulque. Adicionalmente, se realizaron análisis fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales del pulque semilla utilizado como inóculo en el proceso de fermentación semicontinuo. Asimismo, se llevó a cabo la fermentación en un reactor semicontinuo por duplicado analizando periódicamente los cambios fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales a lo largo de la fermentación. Por último, se realizaron aislamientos de las cepas microbianas características en el pulque semilla y el pulque (producto final) proveniente de la primera fermentación, así como análisis de identificación molecular y de la diversidad microbiana tanto por métodos cultivables como no cultivables.

### **6.1. MICROFILTRACIÓN DE AGUAMIEL**

Se realizó la microfiltración de dos diferentes lotes de aguamiel para su utilización como sustrato en los reactores semicontinuos para producción de pulque. Dicho proceso se realizó en un sistema de microfiltración en condiciones asépticas como se muestra en la Fig. 17. El primer lote de aguamiel fue cosechado en el mes de septiembre de 2021 y el segundo lote de aguamiel fue cosechado en el mes de enero de 2022.

Para el primer lote, se sometieron a filtración un total de 2.25 L de aguamiel fresco y en el segundo un total de 2.65 L de aguamiel fresco. Durante el proceso, el aguamiel alimentado se mantuvo a una temperatura de 40 °C y un flujo de alimentación constante a razón de 400 mL/min. Al finalizar la filtración se obtuvieron factores de concentración volumétricos (FCV) de 14.5 para el primer lote y de 26 para el segundo. El aguamiel estéril se almacenó en frascos de vidrio previamente lavados y esterilizados, y fue conservado mediante congelación hasta su uso posterior en el proceso de fermentación semicontinua para la producción de pulque.

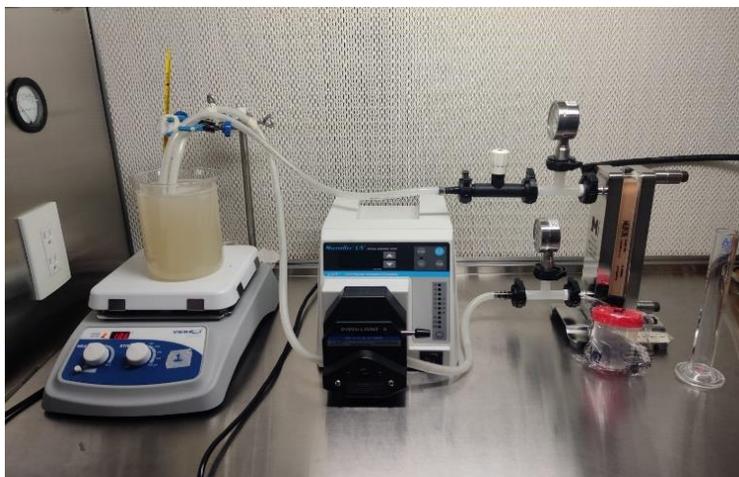


Fig. 17. Microfiltración de aguamiel en módulo de filtración tangencial Millipore en condiciones asépticas.

La esterilidad del aguamiel pasado por membranas de microfiltración se verificó empleando el método de cultivo en extensión en placa de una muestra de aguamiel microfiltrado directamente en agar cuenta estándar. Como resultado del análisis se determinó la ausencia de crecimiento microbiano en el aguamiel microfiltrado ( $< 10$  UFC/mL); lo que indica que el producto de aguamiel obtenido en el proceso de membranas quedó estéril.

#### **6.1.1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL AGUAMIEL**

Los resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos evaluados en las muestras de aguamiel crudo y aguamiel microfiltrado del primer y segundo lote, se muestran en la Tabla 10 y 11, respectivamente. Se puede observar que en la mayoría de los parámetros no existe diferencia significativa entre el aguamiel crudo y el aguamiel filtrado, exceptuando en los parámetros de color, porcentaje de sólidos y azúcares totales. Esto es razonable de acuerdo con los principios del proceso de microfiltración el cual es la retención de los sólidos presente en las muestras sometidas a dicho proceso.

Se puede observar que los datos obtenidos en esta investigación se encuentran dentro de los intervalos publicados en la literatura por diferentes autores en relación con dos parámetros fisicoquímicos que son grados Brix y pH. En los estudios realizados por Enríquez-Salazar et al. [70], quienes evaluaron el seguimiento del perfil bioquímico del aguamiel colectado de dos especies diferentes de agave durante diferentes estaciones del año, el pH del aguamiel presentó variaciones de 4.5 a 7.0, y los grados Brix de 7.3 a 13.8. De manera

similar, Rocha-Arriaga et al. [60] obtuvieron valores de pH alrededor de 4.7 y Valadez-Blanco et al. [28] midieron grados Brix en un intervalo de 4 a 16.

Adicionalmente, en lo que se refiere a la acidez de ambos lotes de aguamiel, indicada por los valores obtenidos de pH y acidez total, el aguamiel presentó valores alrededor de 5.5 y 0.17 respectivamente, el cual sugiere que ambos parámetros no fueron afectados por la microfiltración, además de coincidir con lo referido por la norma NMX-V-022-1972 [21].

Tabla 10. Resultados de las pruebas fisicoquímicas realizadas al primer lote de aguamiel.

<b>Parámetro</b>	<b>Aguamiel crudo <sup>1</sup></b>	<b>Aguamiel microfiltrado <sup>1</sup></b>	<b>Aguamiel reportado en literatura</b>
<b>COLOR</b>			
L*	82.28 ± 0.64	98.82 ± 0.01*	
a*	0.42 ± 0.00*	0.06 ± 0.00	
b*	7.46 ± 0.07*	5.30 ± 0.01	
<b>pH</b>	5.34 ± 0.06	5.33 ± 0.01	3.95 a 7.02 [60]
<b>°Brix</b>	9.80 ± 0.10	9.17 ± 0.05	4.00 a 13.82 [70]
<b>Acidez total (%)</b>	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.00	0.90 a 4.00 [21]
<b>% Sólidos Totales</b>	8.75 ± 0.01*	8.59 ± 0.01	7.0 a 17.0[21]
<b>Azúcares totales (g/L)</b>	68.51 ± 0.12*	60.88 ± 0.29	44.8 a 254 [70]
<b>Azúcares reductores (g/L)</b>	58.07 ± 0.21	58.69 ± 0.27	13.72 a 58.8 [70]

<sup>1</sup> Se presenta la media ± desviación estándar (n=3). \*Representa diferencia significativa entre medias de la misma fila de la columna 2 y 3 (P<0.05)

Uno de los parámetros que presentó una diferencia significativa antes y después del microfiltrado fue el porcentaje de sólidos totales, esto debido a la retención de partículas en la membrana de microfiltración. Sin embargo, comparando estos resultados con los del estudio de Rocha-Arriaga et al. y la NMX-V-022-1972, se puede concluir que éstos se encuentran dentro de los intervalos indicados en dichas referencias para ambas muestras de aguamiel.

Tabla 11. Resultados de las pruebas fisicoquímicas realizadas al segundo lote de aguamiel.

<b>Parámetro</b>	<b>Aguamiel crudo <sup>1</sup></b>	<b>Aguamiel microfiltrado <sup>1</sup></b>	<b>Aguamiel reportado en literatura</b>
<b>COLOR</b>			
L*	95.86 ± 0.27	99.82 ± 0.07*	
a*	0.20 ± 0.01*	-0.04 ± 0.04	
b*	6.26 ± 0.02*	4.53 ± 0.07	
<b>Ph</b>	6.57 ± 0.02	5.57 ± 0.01	3.95 a 7.02 [60]
<b>°Brix</b>	10.3 ± 0.08	10.2 ± 0.02	4.0 a 13.82 [70]
<b>Acidez total (%)</b>	0.18 ± 0.08	0.15 ± 0.01	0.9 a 4 [21]
<b>% Sólidos Totales</b>	10.03 ± 0.02*	9.9 ± 0.02	7 a 17[21]
<b>Azúcares totales (g/L)</b>	56.15 ± 0.24*	56.26 ± 0.26	44.8 a 254 [70]
<b>Azúcares reductores (g/L)</b>	55.18 ± 0.18	54.46 ± 0.58	13.72 a 55.8 [70]

<sup>1</sup> Se presenta la media ± desviación estándar (n=3). \*Representa diferencia significativa entre medias de la misma fila de la columna 2 y 3 (P<0.05)

Para analizar con mayor detalle la diferencia de color entre las muestras, se calculó el valor  $\Delta E^*$ , el cual, es la diferencia de color total que incluye los tres parámetros del espacio de

color CIE  $L^*a^*b^*$ , teniendo como resultado un valor  $\Delta E^*$  para el primer y segundo lote de 16.6 y 18.75, respectivamente, lo cual denota que tienen un color diferente perceptible a simple vista respecto al aguamiel crudo. Esto debido a que a través del proceso de microfiltración hay una remoción de sólidos, llamada clarificación, por ende, los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  que son indicativos de color tienden a disminuir, caso contrario el parámetro  $L^*$  que aumenta.

El contenido de azúcares totales se determinó aplicando el método Dubois por medio de una curva de calibración utilizando glucosa como estándar (Apéndice A.1.) y el contenido de azúcares reductores se determinó aplicando el método de Miller por medio de una curva de calibración (Apéndice A.2.). Como se puede llegar a apreciar en las tablas anteriores, existe un decremento significativo en la concentración de azúcares posterior a la microfiltración, lo que probablemente se debe a la retención de estas moléculas por la membrana. Sin embargo, la concentración de azúcares totales en las dos muestras de aguamiel está de acuerdo con el intervalo que se reporta en la NMX-V-022 (6-12 g/100 mL) [21]. Adicionalmente, estos resultados pueden ser comparables con los de Valadez-Blanco et al. [28] con un intervalo de 44.8 a 69.0 g/L.

Se puede observar un menor contenido de azúcares reductores fermentables en comparación con los azúcares totales ya que no todos los azúcares presentes en la muestra son monosacáridos o presentan un grupo funcional libre capaz de oxidarse. Sin embargo, se puede ver que, al ser moléculas más pequeñas, no fueron afectadas por el proceso de microfiltración, además de estar en los intervalos indicados en por la NMX-V-022, así como por diferentes autores en la literatura.

## **6.2. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DEL PULQUE SEMILLA**

El Diario Oficial de la Federación (DOF) en su Reglamento para el control sanitario del pulque [71] establece que "El pulque como producto final para consumo público, deberá ser de color blanco, consistencia viscosa y, olor y sabor característicos, además de reunir los siguientes requisitos: pH de 3.5 a 4.0, grado alcohólico de 4.0 a 6.0%, acidez total (g. de ácido láctico) de 400 a 700 mg/100 mL". La Tabla 12 muestra los resultados de las pruebas fisicoquímicas realizadas al pulque semilla. Se puede observar que de acuerdo con el DOF la muestra de pulque está dentro del intervalo de pH y el grado alcohólico recomendado,

mismo que coincide con los resultados de Escalante et al [41]. Por otra parte, la acidez total del pulque semilla usado en el presente proyecto presentó un contenido superior a lo dictado por el DOF. Sin embargo, en comparación con el estudio realizado por Valadez-Blanco et al. [28], el cual, obtuvo un porcentaje de acidez total de 1.32, se puede apreciar que el pulque empleado en este proyecto tiene un menor porcentaje de acidez.

Tabla 12. Resultados de las pruebas fisicoquímicas realizadas al pulque semilla.

<b>Parámetro</b>	<b>Pulque semilla <sup>1</sup></b>	<b>Pulque reportado en la literatura</b>
<b>COLOR</b>		
L*	54.95 ± 0.10	
a*	-0.42 ± 0.01	
b*	10.86 ± 0.18	
<b>pH</b>	3.95 ± 0.01	4.3 ± 0.2 [41] 3.7 ± 0.1 [28]
<b>°Brix</b>	3.70 ± 0.1	3 – 7.4 [28]
<b>Acidez total (%)</b>	0.75 ± 0.01	0.4 – 0.75 [41] 1.32 ± 0.04 [28]
<b>°G.L</b>	5.76± 0.31	3.88 a 6.73 [72]
<b>% Sólidos Totales</b>	1.37 ± 0.02	1.70 a 2.05 [60]
<b>Azúcares totales (g/L)</b>	8.85 ± 0.06	1.5 a 9.0 [60] 23.0 ± 0.3 [28]
<b>Azúcares reductores (g/L)</b>	1.94 ± 0.02	0.5 a 1.2 [60] 4.76 [73]

<sup>1</sup> Se presenta la media ± desviación estándar (n=3).

En relación con el contenido de sólidos solubles totales, Álvarez-Ríos et al. [72] indicó un contenido de 5.4 a 5.5 °Brix para pulque usado como inóculo, que es mayor que el valor del pulque semilla empleado en este trabajo. Esto puede deberse a distintos factores de

variación como lo podrían ser la región, tipo de agave o el tiempo de fermentación del pulque, ya que un pulque dulce tiene un contenido de grados Brix mayor en comparación a un pulque semilla.

En cuanto al porcentaje de los sólidos totales, los valores obtenidos en la muestra de pulque semilla se encuentran ligeramente por debajo de los datos de Rocha-Arriaga et al. [60] quienes obtuvieron un intervalo de porcentaje de sólidos totales entre 1.7 a 2.0. De forma similar, esto puede deberse al tiempo de fermentación del pulque. De acuerdo con los parámetros de color, se obtuvo una luminosidad igual a 54.9, lo que indica que la muestra contiene colores blancos tal como se le define al pulque de manera característica.

El contenido de azúcares totales y reductores fermentables se determinaron aplicando los métodos de Dubois y Miller respectivamente, por medio de una curva de calibración, utilizando glucosa como estándar (Apéndice A.1. y A.2.). En este trabajo se obtuvo una cantidad de azúcares reductores totales comparables a los obtenidos por Rocha-Arriaga et al. [60], quienes indican un promedio de 4.9 g/L de azúcares totales. En el caso de azúcares fermentables, estos autores obtuvieron valores de 0.5 a 1.2 g/L, que se encuentran en el intervalo de los resultados obtenidos en este trabajo. Como se puede observar, los resultados obtenidos en este trabajo se encuentran entre los valores incluidos en por la literatura.

Por otra parte, el contenido de azúcares en el pulque semilla es menor que el obtenido para las muestras de aguamiel. Estos resultados son congruentes, debido a que los microorganismos presentes en el pulque, tales como los pertenecientes a los géneros *Zymomonas* y *Saccharomyces*, realizan fermentación alcohólica a partir de los azúcares disponibles en el pulque como parte de su metabolismo. Debido a esto, a medida que ocurre la fermentación de aguamiel y la producción de pulque, es de esperarse una disminución considerable en el contenido de azúcares en el pulque, y más aun tratándose de un pulque semilla que requiere procesos de fermentación mucho más prolongados.

Cabe resaltar que la mayoría de los valores de los parámetros fisicoquímicos que se encuentran en la literatura, y que son usados como comparación en esta investigación, corresponden al análisis de pulque de mediana fermentación (pulque para vender a los

consumidores). Por lo tanto, al analizar un pulque semilla se espera mayores grado alcohólico y acidez y menor contenido de azúcares fermentables.

### 6.3. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y EFECTO DE LA ULTRACONGELACIÓN

Con la finalidad de conocer los microorganismos presentes en la muestra de pulque, se realizó la cuantificación en tres medios selectivos, que ya han sido clasificados como favorecedores del crecimiento de microorganismos específicos. Dicha cuantificación se realizó al pulque fresco y al pulque después de haberse ultracongelado y previo a ser usado en la inoculación del reactor para las fermentaciones.

En la Tabla 13 se presentan los resultados de los conteos microbianos obtenidos después de 96 h de incubación, utilizando los diferentes medios.

Tabla 13. Crecimiento microbiano de las muestras de pulque en los diferentes medios selectivos.

Medio	Pulque Fresco (UFC/mL)	Pulque Ultracongelado <sup>1</sup> (UFC/mL)	Pulque Ultracongelado <sup>2</sup> (UFC/mL)
MRS	1.50 ±0.42X10 <sup>7</sup> <sup>b</sup>	5.5±0.3 X10 <sup>2</sup> <sup>b</sup>	1.27±0.25 X10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>
APD	3.82±0.02 X10 <sup>8</sup> <sup>a</sup>	n.d <sup>c</sup>	n.d <sup>c</sup>
APT	3.82±0.02 X10 <sup>8</sup> <sup>a</sup>	8.97±0.5X10 <sup>2</sup> <sup>a</sup>	7.67±0.2X10 <sup>2</sup> <sup>b</sup>

n.d: No detectable. Se presenta la media ± desviación estándar (n=3). Los valores por columna que muestran diferentes letras (a, b o c) son significativamente diferentes ( $P \leq 0.5$ ) acorde a la prueba de Tukey para la comparación de medias. <sup>1</sup>Pulque semilla con un tiempo de ultracongelación de 6 meses. <sup>2</sup>Pulque semilla con un tiempo de ultracongelación de 12 meses.

El pulque fresco se destacó por presentar el mayor crecimiento de levaduras en el medio APD, así como de bacterias de tipo *Leuconostoc* en el medio de cultivo APT; crecimientos que fueron en el orden de 8 ciclos logarítmicos, se presentó con una diferencia de un ciclo logarítmico menor el crecimiento de bacterias ácido lácticas en el medio MRS. De acuerdo

con la literatura, el grupo de microorganismos predominante en el pulque es el de las BAL destacando particularmente los de la familia *Lactobacillaceae*, seguido por las levaduras [37,41]. En la muestra a emplear como pulque semilla en esta investigación el conteo de dichos microorganismos fue de manera inversa, puesto que presentó mayor presencia de levaduras que de bacterias ácido lácticas. En el pulque fresco evaluado en este estudio se puede apreciar que se obtuvieron poblaciones comparables para los distintos grupos microbianos evaluados: BAL, *Leuconostoc* y levaduras. Por otra parte, Valadez-Blanco et al. [28] estudiaron las poblaciones microbianas presentes en pulque de tres ranchos de Tamazulapan del Progreso, Oaxaca, con conteos de  $7.1 \times 10^7$  –  $2.7 \times 10^{11}$  para BAL, observando diferencias significativas entre estas tres muestras. Los autores atribuyen los resultados a las diferentes fuentes de variabilidad presentes durante la producción del pulque, que van desde el medio ambiente en el cual se encuentra la planta hasta las herramientas utilizadas durante el proceso de recolección y producción del pulque.

Como se puede observar en la Tabla 13, la ultracongelación disminuyó significativamente la viabilidad de los microorganismos del pulque fresco, llegando al grado de no detectar crecimiento de levaduras (medio APD), las cuales, son importantes en el pulque semilla, debido a que éstas son el principal productor de alcohol en la bebida y en el caso de las bacterias ácido lácticas y *Leuconostoc* descendieron hasta 4 y 6 órdenes de magnitud, respectivamente en pulque ultracongelado por 12 meses. El casi nulo crecimiento de estos microorganismos se debió posiblemente a la inactividad de las células inducida por el drástico tratamiento térmico ocurrido durante la ultracongelación, principalmente en la etapa de descongelación, en la que no es posible controlar de manera efectiva la velocidad de transferencia de calor sin dañar la muestra. Debido a que el pulque semilla se utiliza como inóculo de un proceso de fermentación para producir bebidas para consumo humano, no fue posible adicionar sustancias crioprotectoras, como polialcoholes, para proteger a las células del daño térmico como se hace en otros procesos biotecnológicos. Cabe destacar que, aunque el daño térmico causado a la microbiota del pulque semilla fue drástico, la población se recuperó durante el proceso de fermentación semicontinuo.

#### **6.4. PRODUCCIÓN DE PULQUE EN UN REACTOR SEMICONTINUO**

La producción de pulque se llevó a cabo por duplicado en un reactor semicontinuo (Fig. 18). El volumen total empleado para el primer reactor fue de 334 mL y 420 mL para el segundo,

teniendo como inicio de la fermentación 50% de aguamiel microfiltrado y 50% de pulque semilla (inóculo). Los recambios se realizaron secuencialmente cada 24 h en una relación de 1/3 con el volumen total del reactor, en condiciones asépticas. La fermentación se llevó a cabo a una temperatura constante de 28 °C y sin agitación. Se realizaron análisis fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales cada 24 h para evaluar la dinámica de la fermentación y se determinó que el reactor llegó al estado cuasi-estacionario tras 6 días de fermentación en el caso del primer lote y 8 días en el caso del segundo. El estado cuasi-estacionario se definió cuando la fluctuación de cambios dentro de la mayoría de los parámetros fisicoquímicos no fue significativamente diferente; adicionalmente a esto, se consideraron los resultados de la evaluación sensorial de la bebida a lo largo de la fermentación. Una vez que se determinó que el proceso alcanzó el estado cuasi-estacionario, se detuvo la fermentación y se realizaron los análisis del producto final de acuerdo con las Secciones 5.4 y 5.6.



Fig. 18. Reactor semicontinuo empleado para la producción de pulque.

#### **6.4.1. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA**

Los resultados de los análisis fisicoquímicos a lo largo de la fermentación de ambos reactores se muestran de forma gráfica en las Figuras 19-22. Por otra parte, en la Tabla 14 se presentan las características fisicoquímicas del pulque semilla y los dos productos de pulque finales obtenidos mediante fermentación semicontinua en este trabajo.

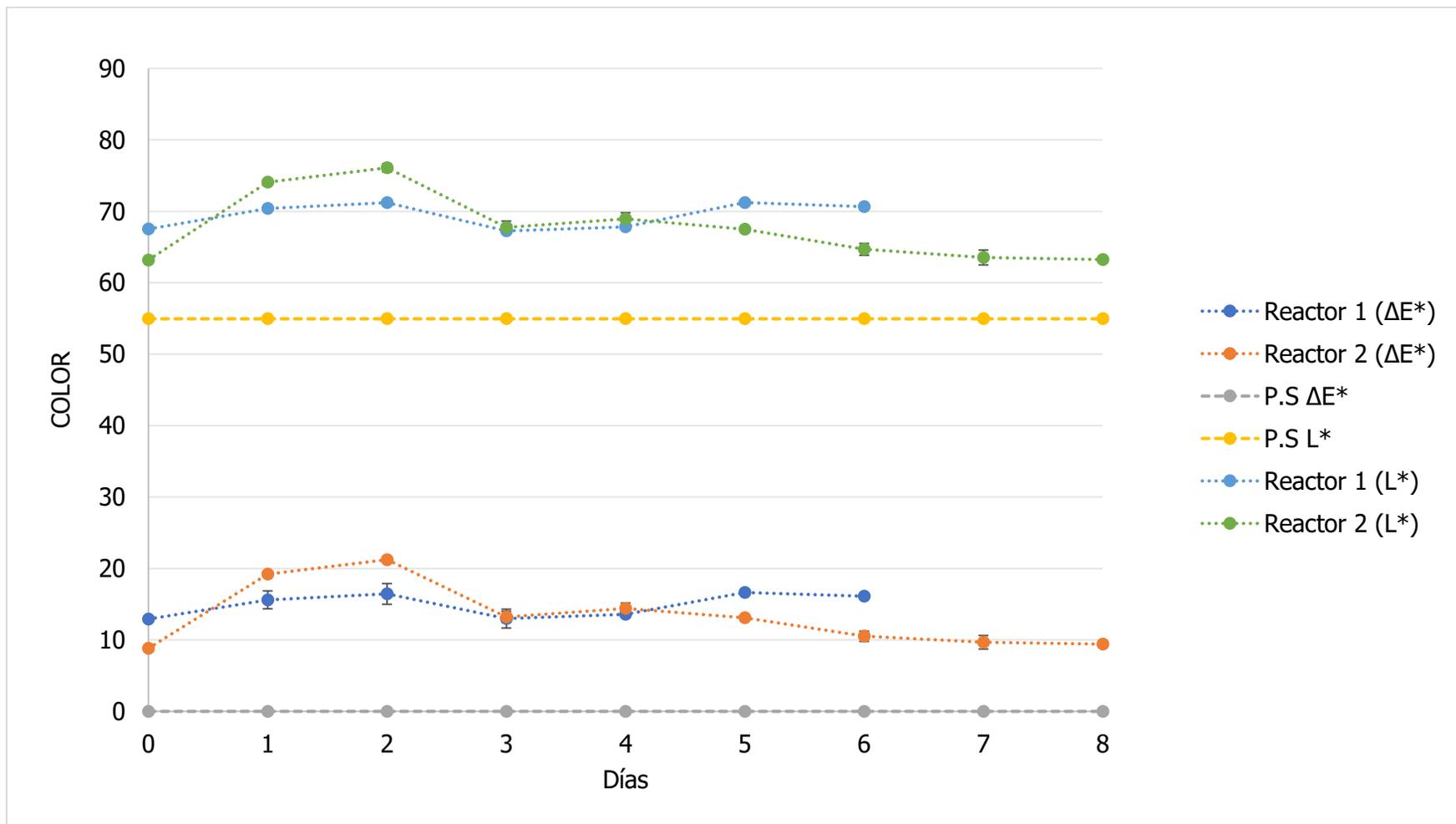


Fig. 19. Dinámica de los resultados del análisis de diferencia de color de las muestras de pulque proveniente de los reactores. P.S=Pulque semilla. Se presenta la media  $\pm$  desviación estándar en forma de barras(n=3)

En la literatura, hasta el momento no se ha publicado el parámetro de color para la caracterización del pulque; sin embargo, dado que el pulque tiene un color característico blanco, en este trabajo se dio seguimiento a los parámetros de color CIE  $L^*a^*b^*$  y a la diferencia total de color ( $\Delta E^*$ ), a medida que ocurría la fermentación. En la Fig. 19 se puede observar que el valor de  $\Delta E^*$  varió con el tiempo de fermentación en ambos reactores. Se pudo observar que el  $\Delta E^*$  fue afectado principalmente por la variación en el parámetro de color  $L^*$ , el cual es indicador de qué tan oscuro ( $L^* = 0$ , para una muestra negra) o blanco ( $L^* = 100$  para una muestra blanca) es el producto. En ambos casos se encontró una diferencia significativa en comparación con el pulque semilla, siendo el pulque producto del primer reactor más blanco en comparación con el producto del segundo.

Como se puede apreciar en la Fig. 20, en lo referente a pH, las fermentaciones presentaron los mayores valores al segundo día de fermentación, posteriormente se presentó un decaimiento significativo. De manera inversa, la acidez total en las muestras procedentes de las diferentes fermentaciones presentaron un decaimiento en el segundo día de fermentación, que fue seguido por un incremento significativo 24 h después. Como era de esperarse, se observó un comportamiento inverso entre el pH y la acidez de las muestras. El aumento en la acidez del mosto a medida que transcurre la fermentación se debe muy posiblemente a la activación y desarrollo óptimo de las bacterias ácido lácticas, una vez que las células se han aclimatado al medio de cultivo (después de 48 h de fermentación).

En el trabajo de investigación realizado por Escalante et al. [41] en el cual analizan la fermentación de pulque en un reactor lote durante 6 h, los autores reportan un pH de 4.5 al inicio de la fermentación y de 4.3 al finalizar, equivalente a una disminución de 0.2 unidades de pH. Cabe resaltar que dicha variación se llevó a cabo de manera similar en el reactor lote de este proyecto, teniendo variaciones de 0.1 a 0.2 unidades de pH por día.

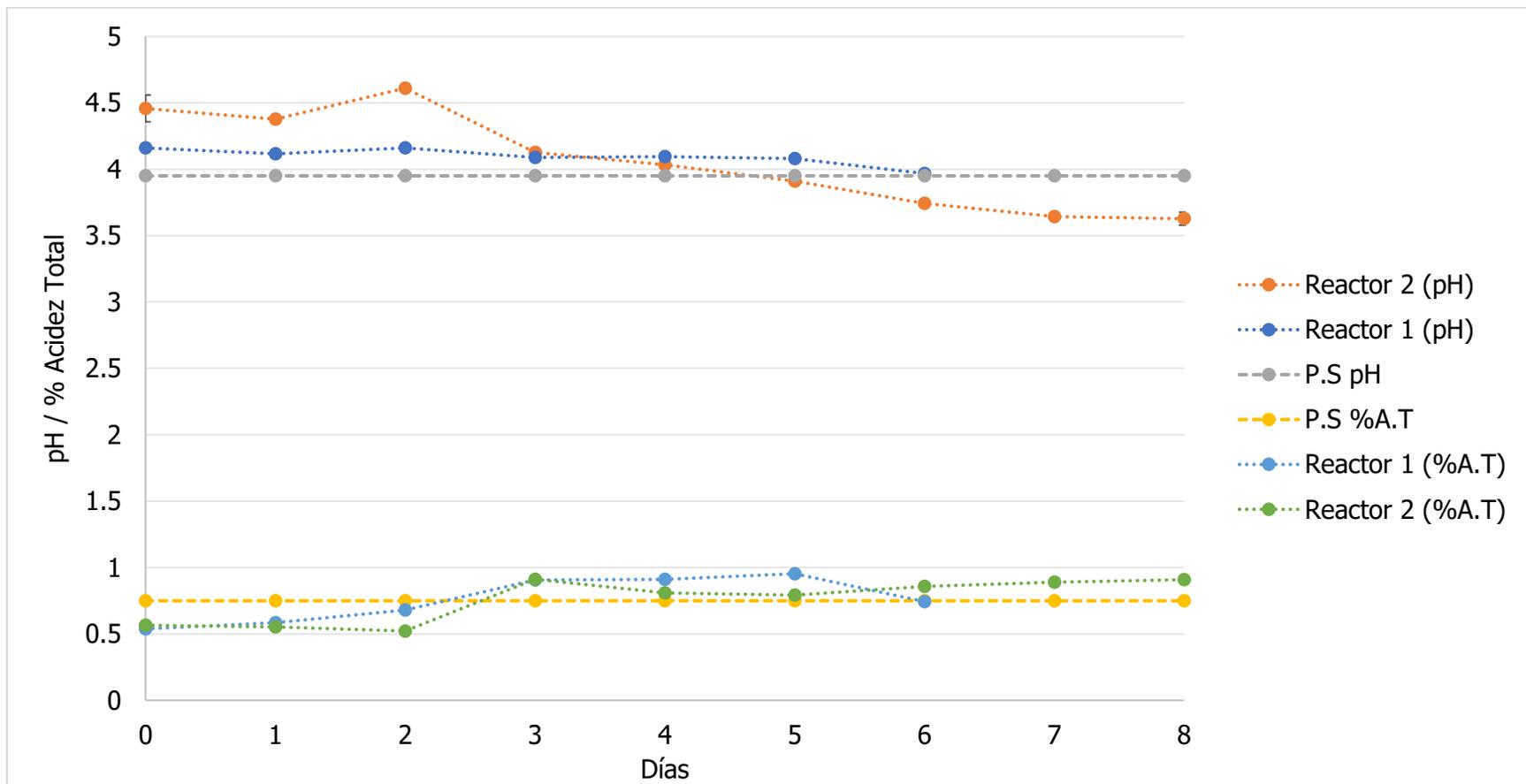


Fig 20. Dinámica de los resultados del análisis de pH y % Acidez Total de las muestras de pulque proveniente de los reactores. P.S.=Pulque semilla, %A.T= % Acidez Total (g ácido láctico/100 mL). Se presenta la media  $\pm$  desviación estándar en forma de barras (n=3)

En el estudio realizado por Chacón-Vargas et al. [40], los autores realizaron el seguimiento de la fermentación de pulque durante 12 h, en donde denotan que la evaluación del contenido de azúcares reductores en función de la glucosa oscila alrededor de los 15 g/L, aunado a esto el reactor presentó su concentración máxima a las 3 h de iniciado el proceso. De manera similar, en el presente trabajo se obtuvieron las concentraciones máximas en el día 2 (Fig. 21), después de lo cual, las concentraciones de azúcares fueron disminuyendo debido al consumo realizado por los microorganismos presentes en el pulque. En particular, como se indica en la literatura, los géneros *Zymomonas* y *Saccharomyces*, realizan la fermentación alcohólica a partir de los azúcares disponibles en el pulque como parte de su metabolismo, al igual que los demás microorganismos presentes en la bebida.

De forma simultánea, se aprecia un comportamiento similar entre el contenido de azúcares y el comportamiento del porcentaje de sólidos totales presentes en la fermentación. Dicho comportamiento se debe a la transformación de los azúcares presentes en el pulque en alcohol y el dióxido de carbono durante la fermentación alcohólica por los microorganismos antes mencionados, con la consecuente pérdida de carbono en el medio de cultivo.

Como se observa en las gráficas anteriores, se aprecia en general que el comportamiento entre los dos lotes es similar. Es natural que no sean iguales, ya que, a pesar de que se partió de un mismo inóculo, el pulque usado como semilla estuvo sometido a diferentes tiempos de ultracongelación, que como se vio antes, afectó el conteo microbiano, lo que a su vez provocó variaciones en los comportamientos de ambos lotes de fermentación. De la misma forma y quizás de manera más relevante, se usaron dos lotes diferentes de aguamiel como sustratos para las fermentaciones, mismos que como se discutió en la Sección 6.1.1, no tenían las mismas características fisicoquímicas. Todo esto afectó en los diferentes parámetros que se analizaron en este trabajo.

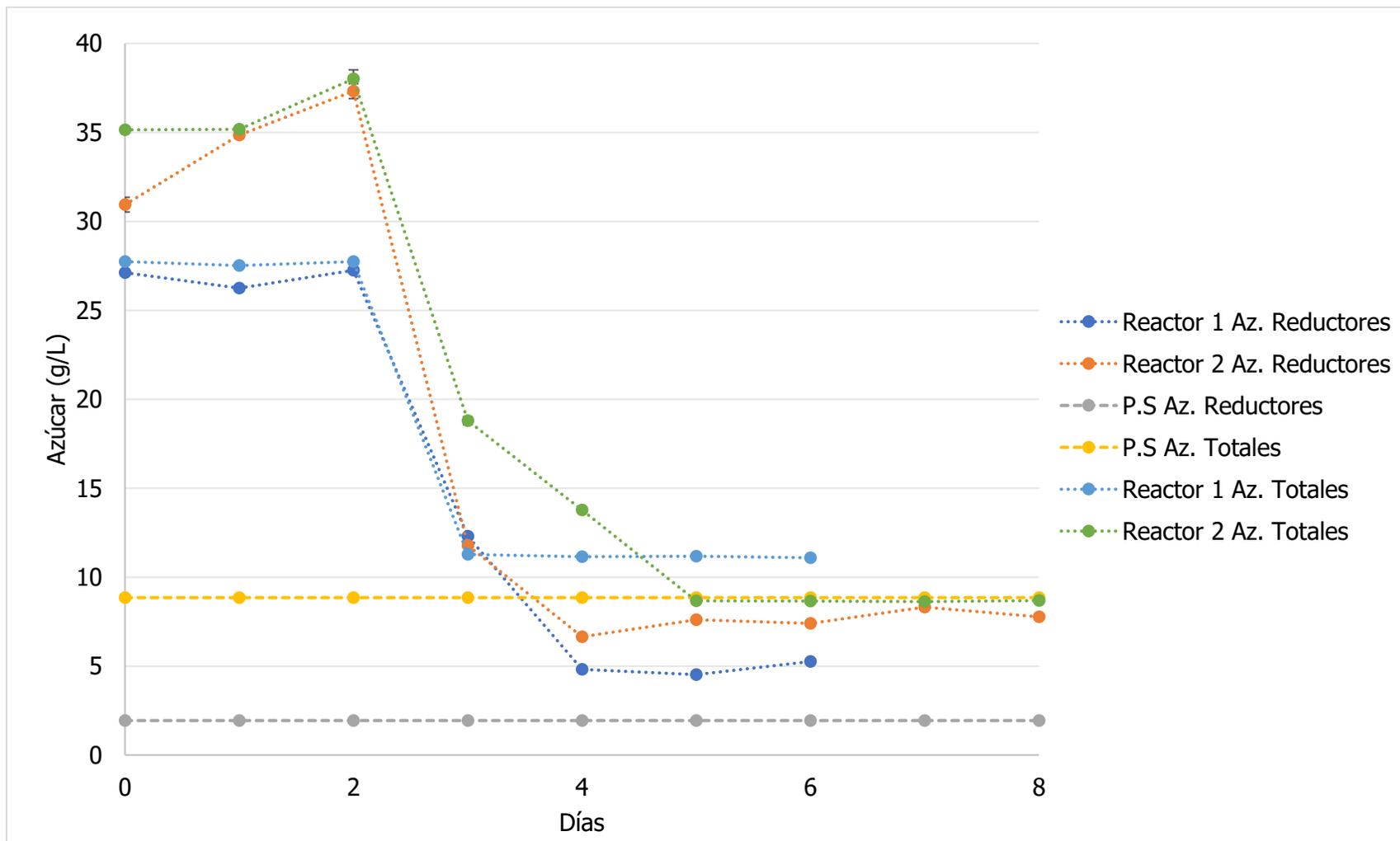


Fig. 21. Dinámica de los resultados del análisis de azúcares de las muestras de pulque proveniente de los reactores. P.S.=Pulque semilla, Az.=Azúcares. Se presenta la media  $\pm$  desviación estándar en forma de barras (n=3)

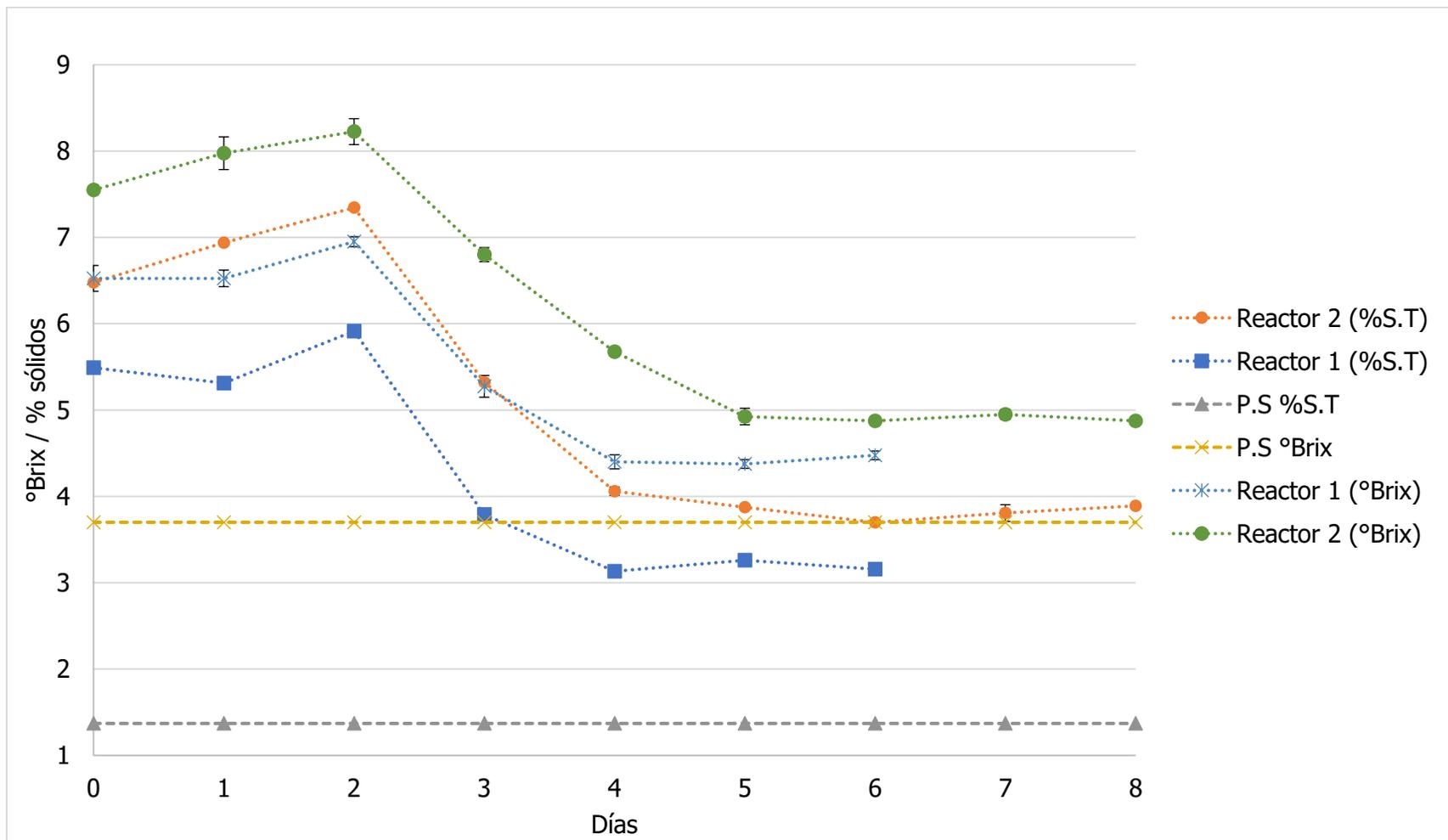


Fig. 22. Dinámica de los resultados del análisis de °Brix y sólidos de las muestras de pulque proveniente de los reactores. P.S=Pulque semilla, %S:T= % de sólidos totales. Se presenta la media  $\pm$  desviación estándar en forma de barras (n=3)

El resultado obtenido del grado de alcohol presente en el pulque después de la ultracongelación fue de  $5.6 \pm 0.02$  °G.L, mientras que los lotes de pulque obtenidos al finalizar las fermentaciones semicontinuas presentaron un grado alcohólico de  $3.04 \pm 0.2$  y  $3.62 \pm 0.2$  en el primer y segundo lote respectivamente (Tabla 14). El grado alcohólico que se encuentra en literatura está en el intervalo de 4 a 8 °G.L

Tabla 14. Características fisicoquímicas de los diferentes pulques obtenidos mediante fermentación semicontinua.

<b>Parámetro</b>	<b>Pulque semilla</b>	<b>Pulque lote 1<sup>1</sup></b>	<b>Pulque lote 2<sup>2</sup></b>
<b>COLOR</b>			
$\Delta E^*$	$0.00 \pm 0.00$	$16.12 \pm 0.32^a$	$9.40 \pm 0.10^b$
<b>pH</b>	$3.95 \pm 0.01^a$	$3.96 \pm 0.02^a$	$3.63 \pm 0.04^b$
<b>°Brix</b>	$3.70 \pm 0.1^c$	$4.47 \pm 0.05^b$	$4.87 \pm 0.05^a$
<b>Acidez total (%)</b>	$0.75 \pm 0.01^b$	$0.74 \pm 0.01^b$	$0.90 \pm 0.01^a$
<b>°G. L</b>	$5.76 \pm 0.31^a$	$3.04 \pm 0.20^c$	$3.62 \pm 0.12^b$
<b>% Sólidos Totales</b>	$1.37 \pm 0.02^c$	$3.15 \pm 0.01^b$	$3.88 \pm 0.01^a$
<b>Azúcares totales (g/L)</b>	$8.85 \pm 0.06^b$	$11.09 \pm 0.01^a$	$8.68 \pm 0.01^c$
<b>Azúcares reductores (g/L)</b>	$1.94 \pm 0.02^c$	$5.25 \pm 0.02^b$	$7.77 \pm 0.02^a$

Se presenta la media  $\pm$  desviación estándar (n=3). Los valores por renglón que muestran diferentes letras (a, b o c) son significativamente diferentes ( $P \leq 0.5$ ) acorde a la prueba de Tukey para la comparación de medias. Las medias con valor 0 no fueron tomadas en cuenta para el análisis de varianza. <sup>1</sup>Pulque producto del primer reactor. <sup>2</sup>Pulque producto del segundo reactor.

Si bien se aprecia en la Tabla 14, el producto final de la fermentación en el reactor semicontinuo no posee las mismas características fisicoquímicas del pulque semilla, en las

figuras anteriores se aprecia que se alcanzó un estado cuasi-estacionario en la mayoría de los parámetros fisicoquímicos después de 6 y 8 días en el primer y segundo reactor respectivamente, que era uno de los principales objetivos de este proyecto. Adicionalmente, en esta investigación se realizó un análisis sensorial con el objetivo de tener más elementos para poder evaluar la calidad de los productos fermentados con las tecnologías propuestas en el presente trabajo.

#### **6.4.2. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA**

Se realizó el seguimiento de la dinámica poblacional de los microorganismos presentes durante la fermentación de aguamiel en el sistema semicontinuo de producción de pulque desarrollado en este trabajo. Las cinéticas de población para los diferentes grupos microbianos en los dos lotes de fermentación se muestran a continuación: i) bacterias ácido lácticas (Fig. 23); ii) levaduras (Fig. 24); iii) bacterias del género *Leuconostoc* (Fig. 25).

En la cinética de crecimiento de BAL en el medio de cultivo MRS (Fig. 23), se puede observar que el conteo inicial es similar en ambos reactores; sin embargo, la evolución en el crecimiento bacteriano fue diferente para cada lote de fermentación. En el caso del reactor 1, el crecimiento comienza desde el primer día, mientras que el reactor 2 parece haber una fase de adaptación, y el crecimiento exponencial se da después de las 48 h, posteriormente se llega a una fase semiestacionaria, en el caso del reactor 1 hay una segunda etapa de crecimiento en el día 6. Al finalizar las fermentaciones se obtuvieron conteos de alrededor de 9 ciclos logarítmicos para el caso del primer reactor y 7 ciclos logarítmicos para el caso del segundo, ambos conteos superiores al pulque semilla.

En el caso del seguimiento del crecimiento de las levaduras en ambos reactores (Fig. 24), éstas no fueron contables en el primer día ( $< 10$  UFC/mL), esto debido a su baja presencia en el inóculo después de someterse a la ultracongelación. Sin embargo, se observó un crecimiento exponencial en los 2 primeros días de la fermentación para el primer reactor y de 3 días para el caso del segundo, posterior a esto se registra un estado estacionario en el caso del segundo reactor el cual finalizó con un conteo en el orden de 7 ciclos logarítmicos, inferior al pulque semilla. En el caso del primer reactor, éste registró una segunda etapa de crecimiento en el día 6, teniendo al final de la fermentación un crecimiento alrededor de 9 ciclos logarítmicos, superior al pulque semilla.

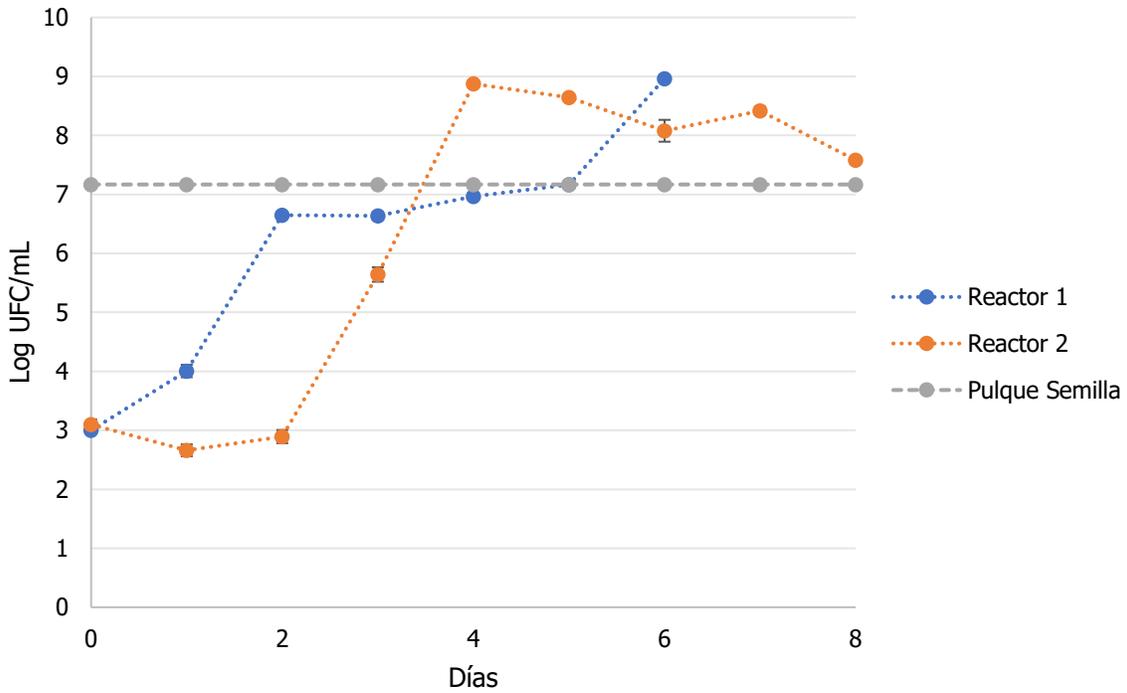


Fig. 23. Cinética de población de bacterias ácido lácticas crecidas en medio MRS en los lotes de fermentación semicontinua de pulque. Se presenta la media  $\pm$  desviación estándar en forma de barras (n=3)

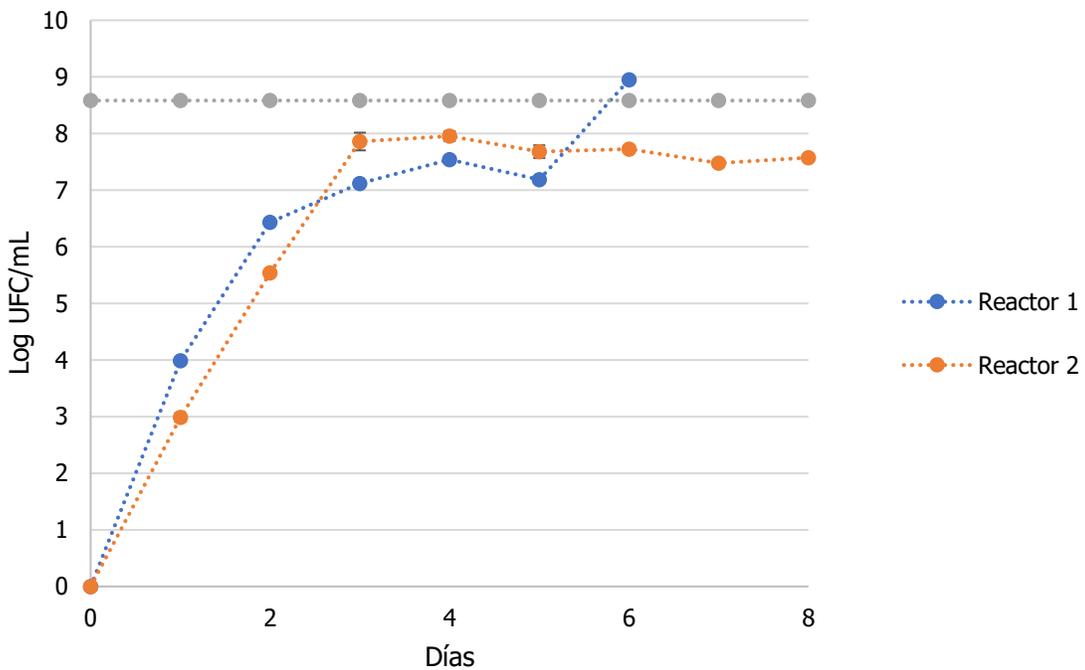


Fig. 24. Cinética de población de levaduras crecidas en medio APD en los lotes de fermentación semicontinua de pulque. Se presenta la media  $\pm$  desviación estándar en forma de barras (n=3).

Para el análisis de las poblaciones de bacterias de tipo *Leuconostoc* (Fig. 25), se puede observar que son los microorganismos con mayor presencia durante todo el proceso de fermentación del primer lote, en caso del segundo lote estos microorganismos fueron mayoritarios a excepción del tercer día de fermentación. Dichos microorganismos presentaron un conteo similar que los del medio en MRS en ambos reactores.

En el caso del reactor 1, el crecimiento comienza desde el primer día, mientras que en el reactor 2 parece haber una fase de adaptación de 24 h. Posteriormente, en ambos casos, se llega a una fase semiestacionaria y en el caso del reactor 1 hay una segunda etapa de crecimiento en el día 6. Al finalizar las fermentaciones, se obtuvieron concentraciones celulares en el orden de  $10^9$  UFC/mL para el caso del primer reactor y de  $10^7$  UFC/mL para el caso del segundo.

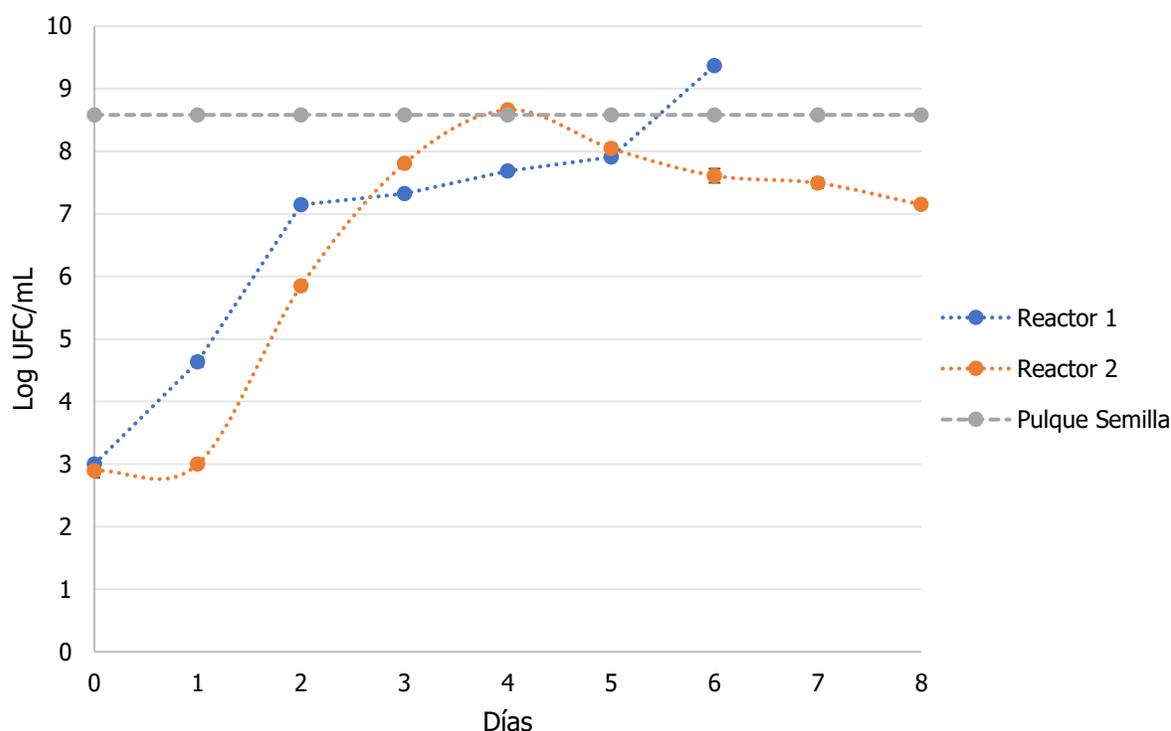


Fig. 25. Cinética de población de bacterias de tipo *Leuconostoc* crecidas en medio APT modificado en los lotes de fermentación semicontinua de pulque. Se presenta la media  $\pm$  desviación estándar en forma de barras (n=3).

En el trabajo realizado por Escalante et al. [41], los autores observaron concentraciones celulares de BAL de  $1.2 \times 10^7$  UFC/mL y de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL al inicio y al término de la fermentación (6 h), respectivamente. Para el caso de las levaduras, se tuvieron

concentraciones de  $8.8 \times 10^6$  UFC/mL y  $1.4 \times 10^7$  UFC/mL al inicio y término de la fermentación, respectivamente. Esto representa un incremento de 1 orden de magnitud en el transcurso de 6 h de fermentación. Por otro lado, el reactor realizado en este trabajo presentó un aumento de 5 órdenes de magnitud en todas las concentraciones celulares.

### **6.4.3. CARACTERIZACIÓN SENSORIAL**

La caracterización sensorial se llevó a cabo según lo establecido en la Sección 5.5. En las Fig. 26 y 27 se muestra de manera gráfica la dinámica de la intensidad de los diferentes atributos sensoriales según la percepción de los panelistas durante el proceso de fermentación semicontinua para los reactores 1 y 2 desarrollados en esta investigación. Adicionalmente, en la Tabla 15 se presentan las características sensoriales del pulque semilla y de los productos finales de los diferentes lotes de fermentación. En las figuras, se observan cambios notables en los valores asignados para las diferentes características sensoriales a medida que transcurrió la fermentación. En general, los comportamientos de la dinámica de los parámetros sensoriales fueron similares entre los dos lotes de fermentación. A medida que avanzó la fermentación, las intensidades de los atributos sensoriales característicos del aguamiel, como lo son su elevado dulzor y sabor a planta, fueron disminuyendo de intensidad; por el contrario, atributos característicos del pulque como la astringencia, acidez y aroma característico a pulque, fueron aumentando de intensidad. Esto era de esperarse, considerando que los microorganismos propios del pulque se fueron desarrollando a medida que procedió la fermentación, como se describió en la sección anterior.

Se puede observar, que al tiempo en que se detuvieron los lotes de fermentación semicontinua (una vez determinado el estado cuasi-estacionario), los parámetros sensoriales de las muestras de pulque producido en este proyecto son muy similares a los del pulque semilla usado para la inoculación del aguamiel al inicio de la fermentación. Como se muestra en la Tabla 15, para el reactor 1 de pulque con 6 días de fermentación, las características sensoriales fueron similares al pulque semilla, exceptuando los atributos sensoriales de sabor y aroma característicos, que resultaron levemente por debajo del pulque semilla. Sin embargo, para el pulque del reactor 2, el cual se dejó 48 h más de fermentación, se obtuvo mayor intensidad en estos parámetros, dando como resultado un producto más parecido sensorialmente al pulque semilla. Como conclusión de la evaluación sensorial de los productos de pulque obtenidos mediante la fermentación semicontinua, los

panelistas concordaron en que la mayoría de los atributos llegaron a tener diferencias mínimas con respecto al pulque semilla, mientras que, por el otro, se presentó una mejora en el atributo de amargor, que era algo alto para el pulque original.

Tabla 15. Características sensoriales de pulque semilla y de los productos finales de los diferentes lotes de fermentación.

<b>Atributo sensorial</b>	<b>Pulque semilla</b>	<b>Pulque Lote 1</b>	<b>Pulque Lote 2</b>
Sabor a pulque	8.3 ± 0.9 <sup>b</sup>	8.2 ± 0.4 <sup>c</sup>	9.3 ± 0.6 <sup>a</sup>
Sabor a planta	2.8 ± 1.0 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.7 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.5 <sup>c</sup>
Aroma a pulque	9.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	8.7 ± 0.7 <sup>c</sup>	9.8 ± 0.9 <sup>a</sup>
Acidez	7.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	7.1 ± 0.5 <sup>b</sup>	6.3 ± 1.4 <sup>c</sup>
Dulzor	3.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.5 <sup>b</sup>	2.6 ± 0.5 <sup>c</sup>
Astringencia	6.1 ± 1.4 <sup>c</sup>	6.5 ± 0.5 <sup>b</sup>	7.1 ± 0.9 <sup>a</sup>
Amargor	5.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	5.5 ± 0.8 <sup>b</sup>	5.2 ± 0.8 <sup>c</sup>
Efervescencia	4.8 ± 1.3 <sup>b</sup>	4.3 ± 1.0 <sup>c</sup>	5.3 ± 0.5 <sup>a</sup>
Viscosidad	4.0 ± 1.4 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.8 <sup>c</sup>	3.8 ± 0.9 <sup>b</sup>

Se presenta la media ± desviación estándar (n=3). <sup>1</sup>Pulque producto del primer reactor tras 6 días de fermentación. <sup>2</sup>Pulque producto del segundo reactor tras 8 días de fermentación. Los valores por fila que muestran diferentes letras (a, b o c) son significativamente diferentes ( $P \leq 0.5$ ) de acuerdo con la prueba de Tukey para la comparación de medias.

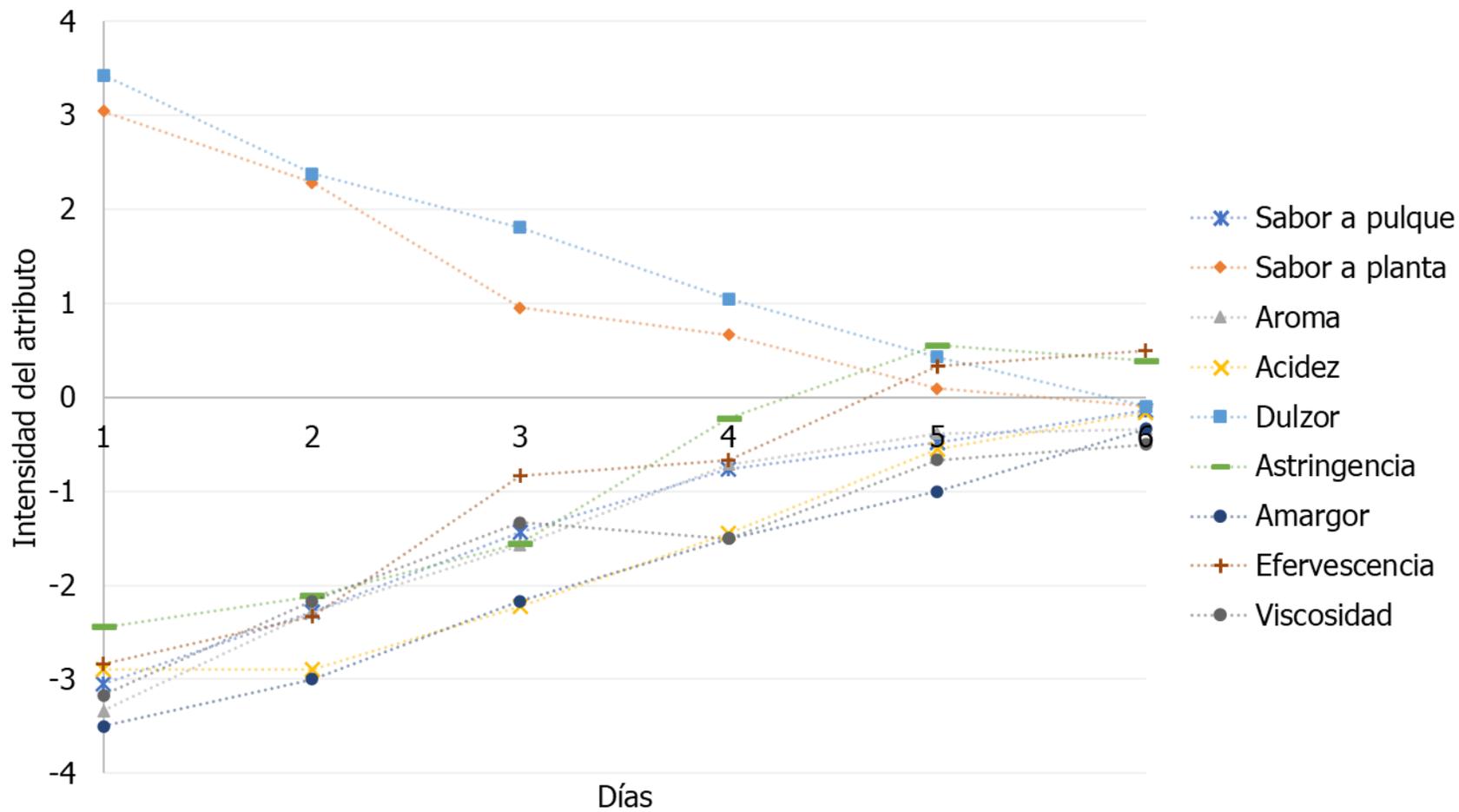


Fig. 26. Prueba sensorial de las muestras de pulque provenientes del primer lote del reactor semicontinuo.

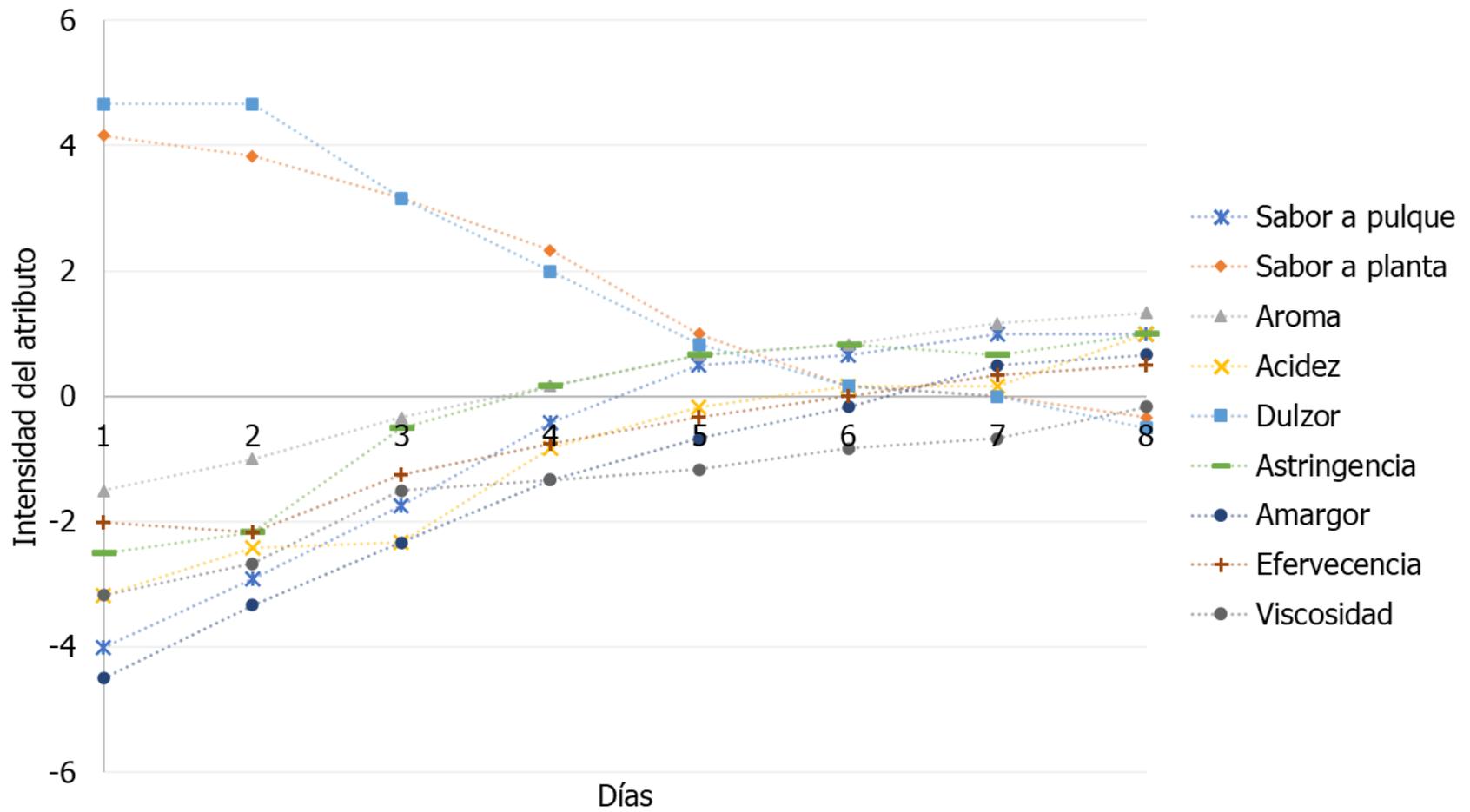


Fig. 27. Prueba sensorial de las muestras de pulque provenientes del segundo lote del reactor semicontinuo.

## 6.5. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN MICROBIANA PRESENTE EN EL INÓCULO Y DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL PULQUE POR REACTOR SEMICONTINUO

### 6.5.1. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CARACTERÍSTICOS

En la observación morfológica como se indica en la Sección 5.6.3 del pulque semilla y del pulque proveniente del primer lote del reactor, se encontraron un total de 24 colonias distintas en el pulque semilla y 13 colonias distintas en el pulque proveniente del reactor. En el proceso de aislamiento de colonias se perdieron algunas de las cepas originalmente aisladas, debido a que por lo general dichas colonias presentaban una relación simbiótica con otra colonia; por lo que al realizarse la separación de las cepas se afectó su sobrevivencia.

Posteriormente, una vez obtenida la colonia aislada, se hicieron observaciones morfológicas macroscópicas, tinción Gram y observaciones microscópicas de las cepas desarrolladas, para comprobar que se lograron tener cultivos axénicos de cada cepa. De lo contrario, se repitió el procedimiento de aislamiento hasta obtener la cepa pura. En la Fig. 28 se ejemplifica la diversidad de la morfología macroscópica de algunas de las cepas aisladas en cada medio utilizado.

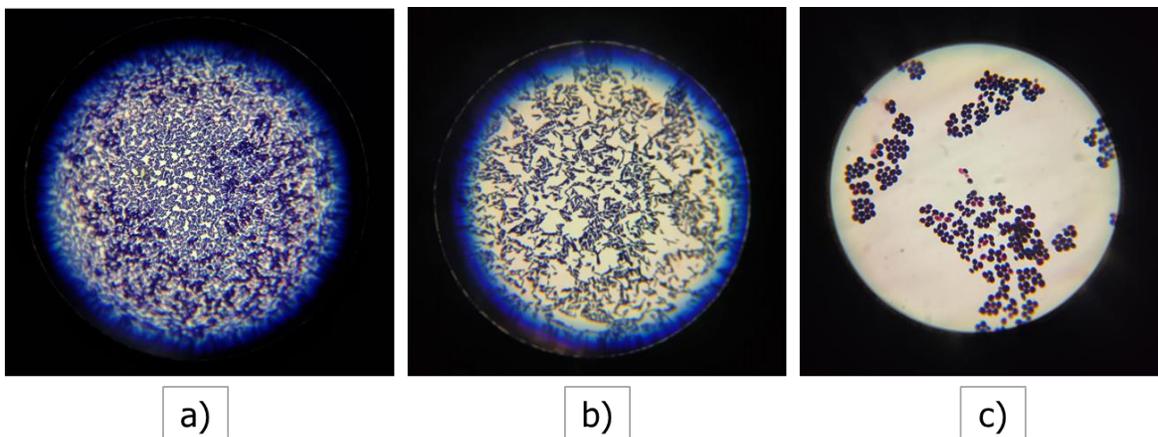


Fig. 28. Ejemplificación de la microscopía (tinción Gram) del aislamiento de cepas microbianas presentes en el pulque en diferentes medios de cultivo: a) bacterias ácido lácticas (MRS), b) bacterias del género *Leuconostoc* (APT), c) levaduras (APD).

Adicionalmente a la caracterización macro y microscópica, se realizó la prueba de catalasa a todas las colonias aisladas como se ejemplifica en la Fig. 29. Con base en los resultados de la caracterización macro y microscópica de los aislados de las dos muestras de pulque, así como la prueba de catalasa, se obtuvieron un total de 23 aislados microbianos (Tabla 16): 12 cepas provenientes del pulque semilla ultracongelado y 11 cepas provenientes del pulque producto de la fermentación semicontinua del reactor 1.

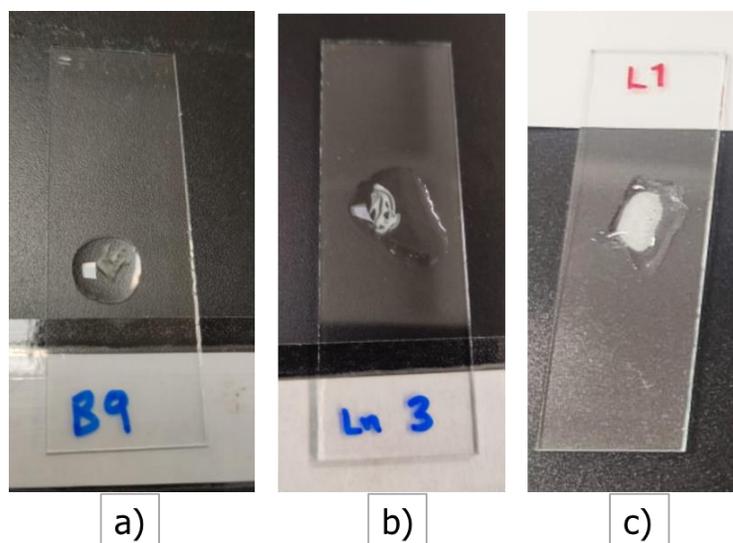


Fig. 29 . Ejemplificación de la presencia de catalasa del aislamiento de cepas microbianas presentes en el pulque: a) bacteria ácido láctica (negativo), b) bacteria *Leuconostoc* (negativo), c) levadura (positivo)

Tabla 16. Microorganismos cultivables aislados a partir del pulque semilla ultracongelado (PU) y el pulque producto final del reactor 1 (PR)

Medio	Número de cepas aisladas	
	PU	PR
<b>MRS</b>	7	5
<b>APT</b>	4	5
<b>APD</b>	1	1

En la Tabla 17 se describen las características macro y microscópicas, así como, el código asignado a cada cepa aislada. Los códigos se indicaron de la siguiente manera: para las cepas provenientes del pulque semilla se antepuso PU y para las cepas provenientes de la fermentación del reactor se antepuso PR. Consecutivamente, se indicó el medio del cual fueron aisladas, B para MRS, Ln para medio APT y L para las provenientes del medio APD. Por último, se le asignó un número decimal o romano aleatorio a cada cepa proveniente de los diferentes medios, como se ejemplifica en la Fig. 30.



Fig. 30. Ejemplo de asignación de código a cepas aisladas.

Tabla 17. Códigos y características de las cepas aisladas.

<b>Código</b>	<b>Morfología macroscópica</b>	<b>Morfología microscópica</b>	<b>Tinción gram</b>	<b>Catalasa</b>
PUBI	Forma redonda, tamaño mediano, elevación plana elevada, borde continuo, superficie lisa brillante, consistencia cremosa, color blanco mate.	Cocobacilos	+	-
PUBIII	Forma redonda, tamaño mediano, elevación umbilicada, borde continuo, superficie ligeramente rugosa, consistencia pastosa, color amarillento.	Bacilos medianos	+	-
PUBIV	Forma redonda, tamaño mediano, elevación plana, borde lobulado, superficie granulosa, consistencia cremosa, translúcida color crema.	Bacilos medianos	+	-

<b>Código</b>	<b>Morfología macroscópica</b>	<b>Morfología microscópica</b>	<b>Tinción gram</b>	<b>Catalasa</b>
PUBV	Forma redonda, tamaño mediano, elevación plana, borde lobulado, superficie granulosa, consistencia cremosa, translúcida color crema.	Bacilos medianos	+	-
PUB6	Forma irregular, tamaño mediano, elevación umbilicada, borde lobulado, superficie granulosa, consistencia cremosa, translúcida color blanquecina.	Bacilos largos	+	-
PUB7	Forma irregular, tamaño mediano, elevación umbilicada, borde lobulado, superficie granulosa, consistencia cremosa, color blanquecina.	Bacilos cortos	+	-
PUB9	Forma redonda, tamaño pequeño, elevación convexa, borde continuo, superficie lisa brillante, consistencia cremosa, color blanco.	Bacilos medianos	+	-
PULn2	Forma redonda, tamaño mediano, elevación convexa baja, borde continuo, superficie lisa, consistencia blanda, translúcida color blanquecina.	Bacilos cortos	+	-
PULnIII	Forma redonda, tamaño mediano, elevación convexa baja, borde continuo, superficie lisa, consistencia blanda, translúcida color blanquecina.	Bacilos medianos	+	-
PULn5	Forma irregular, tamaño mediano, elevación plana, borde no definido, superficie lisa, consistencia chiclosa, translúcida.	Cocobacilos	+	-

<b>Código</b>	<b>Morfología macroscópica</b>	<b>Morfología microscópica</b>	<b>Tinción gram</b>	<b>Catalasa</b>
PULn7	Forma irregular, tamaño grande, elevación plana, borde no definido, superficie lisa, consistencia chiclosa, translucida color ámbar.	Bacilos largos	+	-
PUL1	Forma redonda, tamaño mediano, elevación convexa baja, borde continuo, superficie lisa brillante, consistencia cremosa, translucida color blanco mate.	Ovales	---	+
PRB1	Forma redonda, tamaño mediano, elevación elevada, borde continuo, superficie lisa brillante, consistencia cremosa, color blanco.	Cocobacilos	+	-
PRBV	Forma redonda, tamaño mediano, elevación plana elevada, borde continuo, superficie lisa brillante, consistencia cremosa, color blanco mate.	Bacilos largos	+	-
PRB5	Forma redonda, tamaño grande, elevación plana elevada, borde continuo, superficie lisa brillante, consistencia cremosa, color blanco mate.	Bacilos largos	+	-
PRB6	Forma irregular, tamaño mediano, elevación umbilicada, borde de aspecto filamentoso, superficie rugosa, consistencia cremosa, color blanquecino.	Bacilos medianos	+	-
PRB9	Forma redonda, tamaño pequeño, elevación convexa, borde continuo, superficie lisa brillante, consistencia cremosa, color blanco.	Bacilos cortos	+	-

<b>Código</b>	<b>Morfología macroscópica</b>	<b>Morfología microscópica</b>	<b>Tinción gram</b>	<b>Catalasa</b>
PRLn2	Forma redonda, tamaño mediano, elevación convexa baja, borde continuo, superficie lisa, consistencia chiclosa, translúcida color blanquecino	Bacilos cortos	+	
PRLn2III	Forma de estrella, tamaño chico, elevación plana, borde rizado, superficie rugosa, consistencia dura, color blanco.	Bacilos medianos	+	-
PRLn5	Forma irregular, tamaño mediano, elevación convexa baja, borde no definido, superficie lisa, consistencia chiclosa, translúcida color ámbar.	Cocobacilos	+	-
PRLn7	Forma irregular, tamaño grande, elevación plana, borde no definido, superficie lisa, consistencia chiclosa, translúcida color ámbar.	Bacilos largos	+	-
PRLnX	Forma irregular, tamaño mediano, elevación convexa baja, borde no definido, superficie lisa, consistencia chiclosa, translúcida color ámbar.	Bacilos medianos	+	-
PRL1	Forma redonda, tamaño mediano, elevación convexa baja, borde continuo, superficie lisa brillante, consistencia cremosa, translúcida color blanco mate.	Ovales	---	+

### **6.5.2. EXTRACCIÓN DE ADN DE COLONIAS AISLADAS**

Una vez reactivadas, se realizó la extracción de ADN de las colonias aisladas de acuerdo con las indicaciones del kit de extracción Ultra Clean™-Microbial DNA isolation kit como se especifica en la sección 5.7.1. La extracción de ADN se verificó en un gel de agarosa al 1% y visualizado en un fotodocumentador. En la Fig. 31 se muestra de manera ejemplificativa

el gel de electroforesis del ADN genómico. Para todas las cepas se obtuvo una banda por arriba de los 10000 pb, con lo cual se corroboró la correcta extracción de ADN total (Apéndice A.3). Adicionalmente, se realizó la cuantificación de la cantidad de ADN extraído, todas las muestras presentaron concentraciones por arriba de 10 ng/μL (Apéndice A.7). Dichas concentraciones fueron consideradas para cálculos en experimentos posteriores como la técnica de PCR-DGGE.

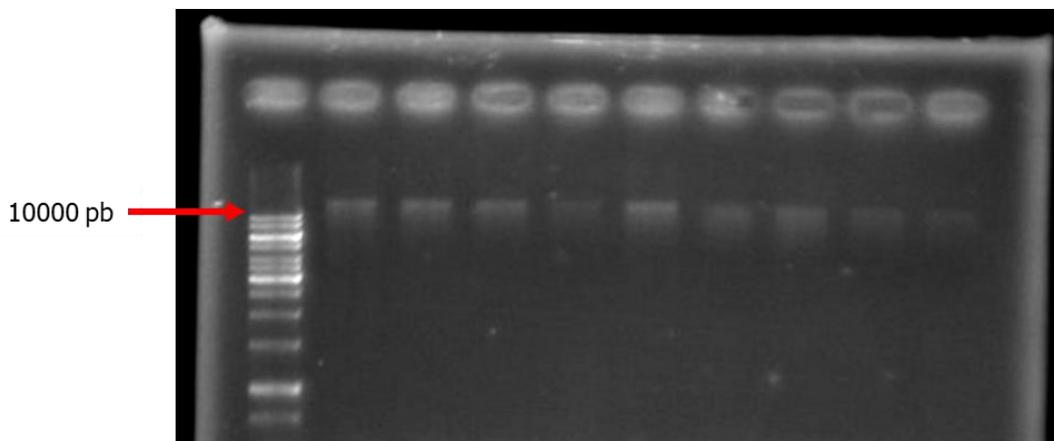


Fig. 31. Imagen representativa de la electroforesis del ADN genómico extraído de distintos aislados bacterianos seleccionados. En el primer carril se muestra el bandeo del marcador de peso molecular (*GeneRuler* de 1 kb DNA Ladder, Fermentas, EUA).

### 6.5.3. AMPLIFICACIÓN DEL GEN ARNr 16S Y REGIÓN ITS

El ADN que se obtuvo de las 23 colonias aisladas se utilizó para la amplificación de los genes ARNr 16S y la región ITS por PCR, usando la enzima Taq polimerasa recombinante, como se especifica en la Sección 5.7.3. El producto final de la amplificación se verificó en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE de electroforesis (Fig. 32). En el caso de las bacterias, se verificó la amplificación del gen ARNr 16S observando una banda de aproximadamente 1500 pb (Apéndice A.4), la cual se presentó en todas las cepas. Por otra parte, la amplificación de la región ITS de levaduras se verificó observando una banda de aproximadamente 700-900 pb (Apéndice A.4).

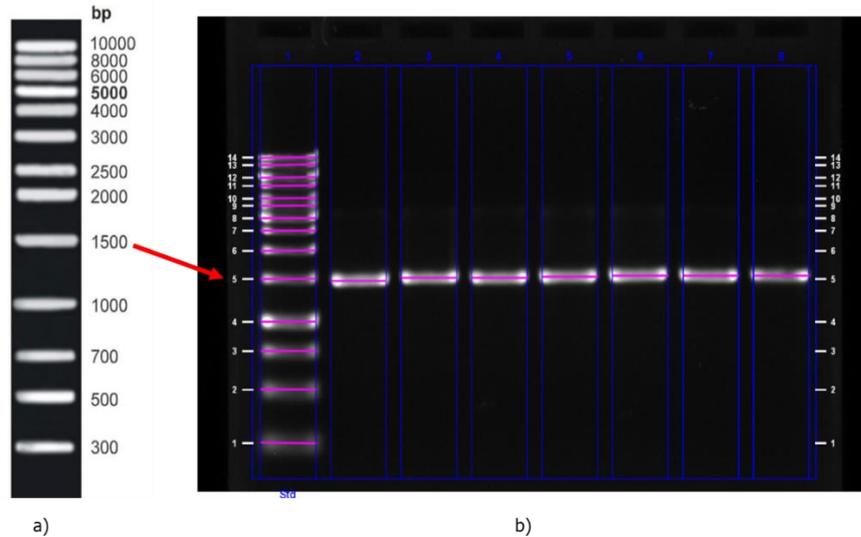


Fig. 32. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos de PCR. a) Bando del marcador de peso molecular (GeneRuler) de 1 kb DNA Ladder, Fermentas, EUA). b) Ejemplo de productos de PCR del gen ARNr 16S.

#### 6.5.4 DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

La técnica de digestión enzimática del gen amplificado se utilizó para evaluar las distintas cepas aisladas. La digestión enzimática se realizó utilizando la enzima de restricción *HAE* III #R0108. Esta técnica se le realizó al ADN de las 23 cepas aisladas con anterioridad.

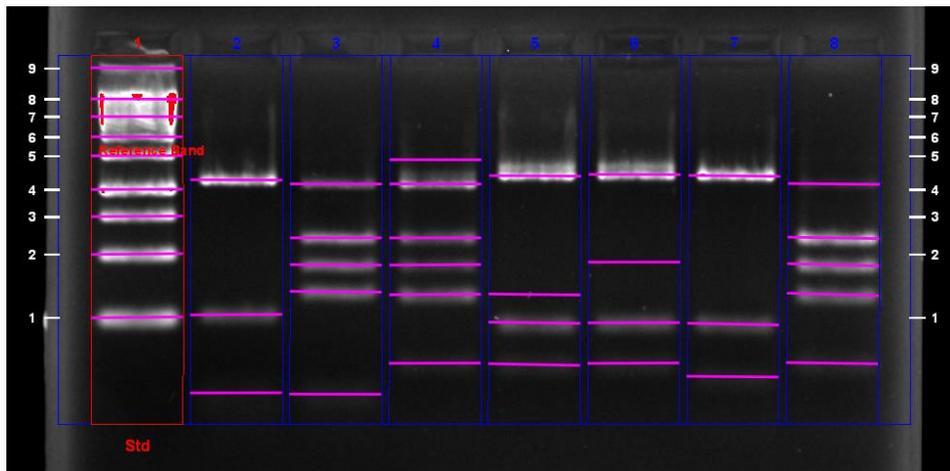


Fig. 33. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos digeridos. Carril 1: Bando del marcador de peso molecular (GeneRuler de 1 kb DNA Ladder, Fermentas, EUA), 2: PUBI, 3: PUBIII, 4: PUBIV, 5: PUBV, 6: PUB6, 7: PUB7, 8: PUB9.

En la Fig. 33 se muestra un ejemplo de los cortes escalonados realizados por la enzima y así generar fragmentos con secuencias complementarias de la cadena de ADN de cada cepa aislada. A partir del análisis de los patrones de bandeo de las diferentes cepas mediante el software Image Lab versión 5.0, se determinó que cada cepa presentó un bandeo distinto (Apéndice A.5), por lo tanto, se llevó a cabo la purificación del gen ARNr 16S de todas las bacterias y la región ITS de las levaduras aisladas.

### 6.5.5 PURIFICACIÓN DEL ADN

El producto final de la purificación se verificó en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE de electroforesis (Fig. 34). La banda observada corresponde para todos los casos al tamaño del gen amplificado (Apéndice A.6). Como resultado de la purificación, se obtuvieron concentraciones de ADN por arriba de 20 ng/ $\mu$ L (Apéndice A.7), que es la concentración requerida por los laboratorios de Macrogen Inc. (Corea del Sur) para la secuenciación de los genes.

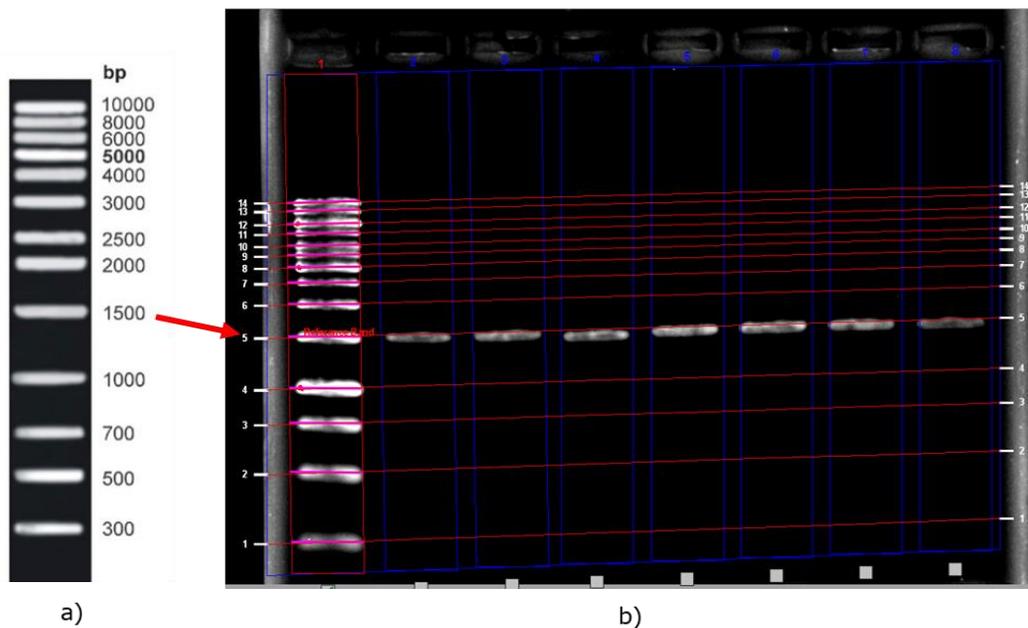


Fig. 34. Electroforesis en gel agarosa al 1% de productos de purificación. a) Bando del marcador de 1 kb, b) ejemplo de purificación del gen ARNr 16S. 2: PUBI, 3: PUBIII, 4: PUBIV, 5: PUBV, 6: PUB6, 7: PUB7, 8: PUB9.

### 6.5.6 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y SECUENCIACIÓN GENÉTICA

Para la identificación de las cepas por espectrometría de masas, se empleó la metodología descrita en la Sección 5.7.6. En el caso de las cepas provenientes del medio APT, se hizo una maceración con nitrógeno líquido debido a que en dicho medio se observó la producción de exopolisacáridos que impedían la correcta lisis de las células. Para finalizar, las muestras se transfirieron a la placa de ensayo (Steel Target Sample Plate) (Fig. 35) del analizador MALDI Biotyper®, para su posterior análisis en el equipo.

El software con el cual cuenta MALDI realizó la comparación de los iones de proteínas entre los espectros de masas obtenidos mediante una ecuación logarítmica, generando valores de 0 a 3, los cuales, cuantificaron la similitud entre la muestra analizada y la base de datos (Figura 36). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 18: para 7 de las cepas de estudio se obtuvieron valores entre 2.01 Y 2.44, lo que describe una identificación de alta confianza, para 8 de las cepas de estudio se obtuvieron valores entre 1.70 y 1.95, lo que nos describe una identificación de baja confianza mientras que el resto de las cepas no pudieron identificarse por esta técnica.



Fig. 35. Placa de ensayo de MALDI Biotyper® (Steel Target Sample Plate).

Es importante comentar que la base de datos de MALDI Biotyper® está conformada en su mayoría por microorganismos del área clínica y no del área de alimentos; sin embargo, a pesar de esto, se pudieron identificar hasta el nivel de género más del 50% de los

microorganismos aislados. Los espectros de las cepas que no se pudieron identificar se adjuntan en el Apéndice A.10. Por otra parte, en el Apéndice A.9 se ejemplifica un caso exitoso de una identificación por MALDI Biotyper®. Como se puede observar, los espectros son de buena calidad, y las cepas fueron identificadas satisfactoriamente mediante la técnica de secuenciación del gen ARNr 16S. Como aporte de este trabajo al conocimiento taxonómico bacteriano usando datos de MALDI Biotyper®, se hará el registro de los espectros de dichas cepas para su uso en identificación microbiana por la comunidad científica internacional.

Gama de valores	Descripción	Símbolos	Color
2.00 - 3.00	Identificación de alta confianza	(+++)	verde
1.70 - 1.99	Identificación de baja confianza	(+)	amarillo
0.00 - 1.69	Sin identificación posible	(-)	rojo

Fig. 36. Intervalos de valores proporcionados por el software MALDI Biotyper®.

Para la identificación por secuenciación del gel ARNr 16S y la región ITS, se obtuvieron dos secuencias de buena calidad (forward y reverse) en dos archivos distintos, los cuales se analizaron en el software MEGA (MEGA 11.0.13) para obtener las secuencias consenso de los microorganismos en un procesador de texto (Fig. 37). Cada secuencia consenso se comparó con la base de datos del NCBI utilizando el programa Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se realizó el árbol filogenético de las cepas aisladas en esta investigación, el cual se muestra en el Apéndice 8 (A.8).



Fig. 37. Pantalla del software MEGA

Tabla 18. Resultados de la identificación por MALDI Biotyper® y secuenciación de gen ARNr 16S y región ITS.

Código de la cepa	Identificación por MALDI Biotyper®		Identificación por 16S/ITS	
	Organismo mejor candidato	Puntuación	Identidad	Similitud (%)
PU B I	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2.13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.09
PU B III	<i>Lactobacillus diolivorans</i>	2.28	<i>Lentilactobacillus diolivorans</i>	99.58
PU B IV	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.34	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	99.79
PU B5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.38	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	97.6%
PU B6	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	1.83	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	98.69
PU B 7	<i>Leuconostoc fallax</i>	1.94	<i>Leuconostoc fallax</i>	99.51
PU B9	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.44	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	99.72
PU Ln 2	Sin identificación posible		<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	98.85
PU Ln III	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	1.73	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	97.94
PU Ln 5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2.01	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99.66
PU Ln 7	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	1.79	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	89.92

Código de la cepa	Identificación por MALDI Biotyper®		Identificación por 16S/ITS	
	Organismo mejor candidato	Puntuación	Identidad	Similitud (%)
PU L1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.20	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98.10
PR B 1	Sin identificación posible		<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	99.08
PR B V	Sin identificación posible		<i>Liquorilactobacillus capillatus</i>	99.24
PR B 5	Sin identificación posible		<i>Liquorilactobacillus capillatus</i>	99.5
PR B 6	Sin identificación posible		<i>Liquorilactobacillus capillatus</i>	99.4
PR B 9	Sin identificación posible		<i>Lactobacillus uvarum</i>	99.86
PR Ln 2	Sin identificación posible		<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	95.5
PR Ln III	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>		1.70	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>
PR Ln 5	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	1.75	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>	95.66
PR Ln 7	Sin identificación posible		<i>Lactobacillus uvarum</i>	99.45
PR Ln X	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>		1.73	<i>Fructilactobacillus sanfranciscensis</i>
PR L1	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	1.95	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	96.68

Se determinó concordancia en ambas técnicas de identificación para las siguientes especies microbianas: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lentilactobacillus diolivorans*, *Lactobacillus uvarum*, *Liquorilactobacillus capillatus* y *Fructilactobacillus sanfranciscensis*. En el caso de la identificación por secuenciación del gen ARNr 16S se obtuvieron resultados de similitud superiores al 95%, lo cual permite indicar que se logró una identificación confiable a nivel de género y especie. Sin embargo, en algunos casos se obtuvieron porcentajes de identificación menores, lo que podría ser indicativo de una nueva especie microbiana, aunque se tendrían que realizar más estudios para corroborar esta hipótesis.

Los resultados obtenidos en ambas identificaciones coinciden con lo establecido en la literatura, en trabajos como el realizado por Chacón y Vargas [40], y Rocha-Arriaga et al. [60], en donde se identificaron microorganismos similares. Chacón y Vargas encontraron *Leuconostoc* (14.30%), *Saccharomyces* (13.51%), *Lactococcus* (13.03%) y *Lactobacillus* (7.53%), destacando las especies *Lact. plantarum* (8.11%), *Lact. sanfranciscensis* (3.71%), *S. cerevisiae* (2.86%), *Lact. piscium* (1.57%), *L. gelidum* (1.47%) y *L. citreum* (1.04%), la mayoría de estos microorganismos coinciden con los identificados en las muestras de esta investigación.

### **6.5.7 PCR–DGGE**

El análisis de la diversidad del pulque semilla y de la dinámica microbiana de la fermentación en el reactor semicontinuo, se llevó a cabo mediante la extracción del ADN total y la amplificación de las regiones V3 y V6-V8 para el caso de bacterias, así como, de la región D1 para el caso de las levaduras mediante PCR, siguiendo las condiciones anteriormente descritas en la sección 5.8.2.

Se realizó la extracción del ADN total del pulque semilla, así como, de los diferentes días de la fermentación en el reactor semicontinuo. La extracción se verificó en un gel de agarosa al 1% en donde se observaron bandas por encima de las 10 000 pb (Fig. 38). Los fragmentos de ADN obtenidos de la amplificación de la región V3 presentaron un peso aproximado de 200 pb y los fragmentos pertenecientes a la región V6-V8 presentaron un peso aproximado de 400 pb, para el caso de la región D1 el peso de los fragmentos fue de aproximadamente 600 pb.

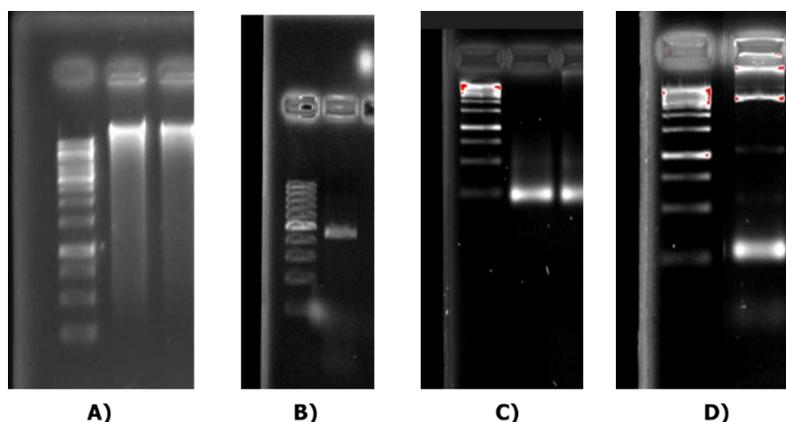


Fig. 38. Visualización de ADN total (agarosa al 1%) y fragmentos de las regiones V3, V6-V8 y D1 (agarosa al 2%). A) ADN total, B) Amplificación de la región V6-V8 (~400 pb), C) Amplificación de la región V3 (~200 pb), D) Amplificación de la región D1 (~600 pb).

En el Apéndice A.11 se presentan los geles de extracciones totales, las amplificaciones de los diferentes días de fermentación, así como, las cepas seleccionadas como blancos positivos (identificadas por secuenciación del gen ARNr 16S), a las cuales se les realizó la amplificación de las regiones. Existe la posibilidad que una misma cepa muestre más de un patrón de bandas, factor conocido como microheterogeneidad.

En la Fig. 39 se muestra el gel correspondiente a la amplificación de la región D1 de las levaduras. En la Fig. 40 se muestra el gel correspondiente a la amplificación de la región V3 de las bacterias y en la Fig. 41 se muestra el gel correspondiente a la amplificación de la región V6-V8. En cada uno de los geles se depositó el amplificado de una cepa identificada por la secuenciación de su gen correspondiente, mientras que en los carriles centrales se inyectaron los amplificados correspondientes al pulque semilla, así como, a los diferentes días de fermentación.

Se estimó el índice  $S$ , que proporciona una visión general de la diversidad de las especies dentro de los diferentes días de fermentación en el reactor, así como el índice de Shannon (H) y el índice de Pielou (J), los cuales se muestran en las Tablas 19-21.

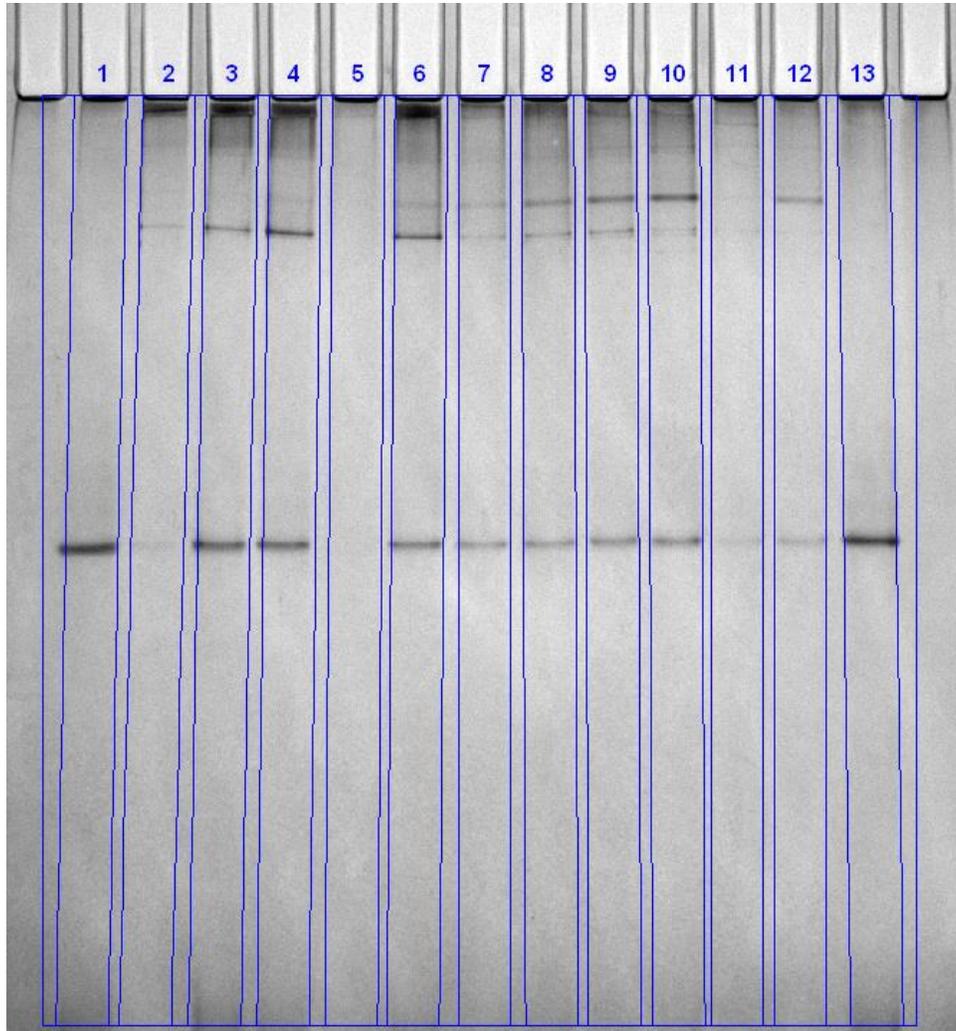


Fig. 39. Perfil de bandas de la DGGE (gradiente desnaturizante 30-60%) de las muestras de pulque utilizando los cebadores correspondientes a la región D1 del gen ARNr 26S de levaduras.

Tabla 19. Evaluación digital de los índices de la comunidad microbiana de la región D1. S (riqueza de especies), H (Diversidad de especies), y J (Uniformidad de Pielou).

<b>Carril</b>	<b>Muestra</b>	<b>Índice S</b>	<b>Índice H</b>	<b>Índice J</b>
1	PU L1	2	0.58	0.84
2	D. 8	4	0.84	0.60
3	D. 7	4	1.17	0.84
4	D. 6	5	1.27	0.79
5	D. 5	2	0.48	0.69
6	D. 4	5	1.27	0.79
7	D. 3	5	1.30	0.81
8	D. 2	5	1.41	0.87
9	D. 1	6	1.37	0.76
10	D. 0	6	1.19	0.60
11	PRD6	4	0.88	0.63
12	PS	4	1.12	0.81
13	PR L1	4	0.25	0.18

La estimación de estos índices está basada en los perfiles de DGGE obtenidos con la región D1 como se muestra en la Fig. 39. D.= Día de fermentación, PRD6= Pulque producto del primer reactor, PS= Pulque Semilla

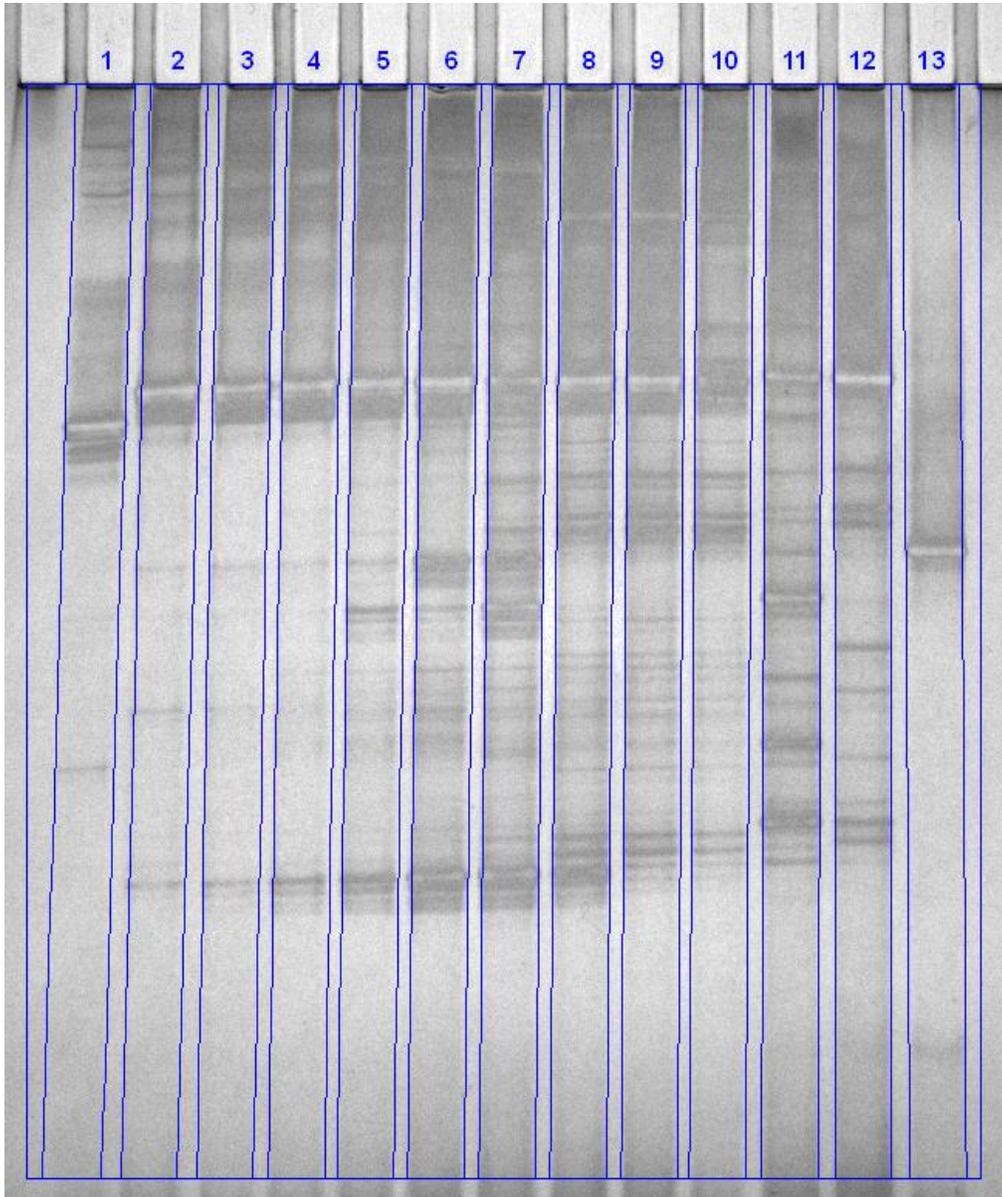


Fig. 40. Perfil de bandas de la DGGE (gradiente desnaturalizante 30-60%) de las muestras de pulque utilizando los cebadores correspondientes a la región V3 del gel ARNr 16S de bacterias.

Tabla 20. Evaluación digital de los índices de la comunidad microbiana de la región V3. S (riqueza de especies), H (Diversidad de especies), y J (Uniformidad de Pielou).

<b>Carril</b>	<b>Muestra</b>	<b>Índice S</b>	<b>Índice H</b>	<b>Índice J</b>
1	PU Ln 5	15	2.48	0.91
2	D. 8	12	2.21	0.89
3	D. 7	10	2.06	0.89
4	D. 6	16	2.36	0.85
5	D. 5	18	1.73	0.60
6	D. 4	22	1.73	0.55
7	D. 3	23	1.83	0.58
8	D. 2	23	2.81	0.89
9	D. 1	22	2.82	0.91
10	D. 0	21	2.76	0.90
11	PRD6	19	2.66	0.90
12	PS	19	2.69	0.91
13	PR B9	7	1.76	0.90

La estimación de estos índices está basada en los perfiles de DGGE obtenidos con la región V3 como se muestra en la Fig. 40. D.= Día de fermentación, PRD6= Pulque producto del primer reactor, PS= Pulque Semilla

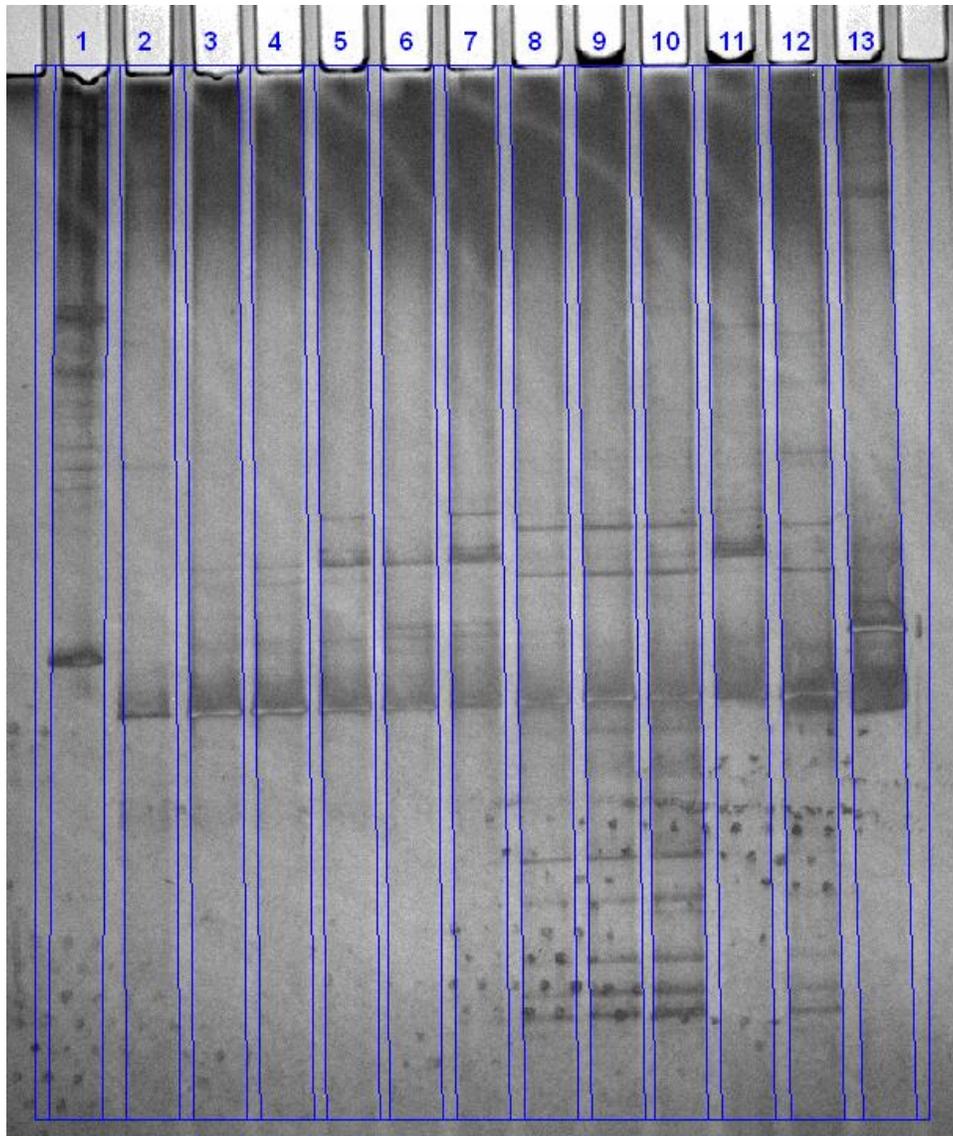


Fig. 41. Perfil de bandas de la DGGE (gradiente desnaturizante 30-60%) de las muestras de pulque utilizando los cebadores correspondientes a la región V6-V8 del gen ARNr 16S de bacterias.

Tabla 21. Evaluación digital de los índices de la comunidad microbiana de la región V6-V8 . S (riqueza de especies), H (Diversidad de especies), y J (Uniformidad de Pielou).

<b>Carril</b>	<b>Muestra</b>	<b>Índice S</b>	<b>Índice H</b>	<b>Índice J</b>
1	PU Ln 5	7	1.61	0.83
2	D. 8	6	1.57	0.87
3	D. 7	7	1.23	0.63
4	D. 6	6	1.00	0.56
5	D. 5	7	1.59	0.81
6	D. 4	6	1.50	0.84
7	D. 3	8	1.81	0.87
8	D. 2	14	2.10	0.79
9	D. 1	18	2.58	0.89
10	D. 0	19	2.70	0.91
11	PRD6	11	1.82	0.71
12	PS	19	1.14	0.38
13	PR B9	10	1.91	0.83

La estimación de estos índices está basada en los perfiles de DGGE obtenidos con la región V6 como se muestra en la Fig. 41. D.= Día de fermentación, PRD6= Pulque producto del primer reactor, PS= Pulque Semilla

Como se puede apreciar en las tablas anteriores, en el caso de las levaduras se aprecia una baja diversidad en comparación con las bacterias, y dicha diversidad en todos los microorganismos fue disminuyendo a medida que transcurría la fermentación. Cabe destacar que no se ha publicado hasta el momento el uso de esta técnica de identificación en una fermentación de pulque, y tampoco se encontraron registros de su uso en una fermentación como la que se llevó a cabo en este trabajo de investigación.

## 7. CONCLUSIONES

En el presente proyecto, la microfiltración del aguamiel permitió obtener un sustrato estéril con características fisicoquímicas similares al aguamiel original para la producción de pulque. Por otra parte, dado que la muestra de pulque se sometió a ultracongelación para el proceso de fermentación, el crecimiento microbiano se redujo severamente en relación al pulque original, lo que afectó el desarrollo inicial de la fermentación.

Adicionalmente, en este trabajo se realizó exitosamente la producción de pulque en un reactor semicontinuo por duplicado. El proceso de fermentación se detuvo cuando se alcanzó el estado cuasi-estacionario después de un periodo entre 6 y 8 días, con la mayoría de los parámetros fisicoquímicos llegando a valores similares a los del pulque semilla, con excepción del contenido de etanol. En relación a la dinámica microbiana, los productos finales de la fermentación alcanzaron concentraciones de los grupos de microorganismos estudiados mayores o similares que los del pulque semilla antes de ser sometido a la ultracongelación. En cuanto a las características sensoriales del producto fermentado, se logró obtener un producto de pulque con características sensoriales similares a las del pulque semilla, e incluso con una percepción de mejora en los parámetros de aroma, efervescencia y amargor.

Por otra parte, en el desarrollo del proyecto, se logró identificar todos los microorganismos cultivables por medio de técnicas de biología molecular y espectrometría de masas, obteniendo como resultados microorganismos como: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lentilactobacillus diolivorans*, *Lactobacillus uvarum*, *Liquorilactobacillus capillatus*, *Fructilactobacillus sanfranciscensis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Adicionalmente, por la técnica de DGGE se obtuvo un diferente bandeo para los diferentes días de fermentación, lo cual mostró la diversidad de microorganismos presentes en las muestras y su evolución en el tiempo.

De acuerdo a la literatura científica es posible aseverar la originalidad del trabajo desarrollado en esta tesis en relación al empleo de aguamiel esterilizado en frío por microfiltración para la producción de pulque en un reactor semicontinuo. En conclusión, en este trabajo se logró la producción exitosa de pulque en condiciones asépticas, el cuál conserva las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de un producto de

pulque de calidad a partir de un cultivo de pulque semilla. Los resultados obtenidos en este trabajo se pueden aprovechar para el desarrollo de un proceso de fermentación a nivel industrial para producir pulque que conserve las características benéficas del proceso artesanal, tales como la microbiota autóctona del pulque semilla y la preservación de las cualidades originales del aguamiel.

## **8. PERSPECTIVAS**

Realizar la identificación total de los microorganismos presentes en la bebida por el método de secuenciación masiva, con el fin de conocer la diversidad, dinámica y abundancia, y compararla con los resultados obtenidos en el método de DGGE y otros autores.

Estudiar el potencial biotecnológico de las bacterias aisladas en el proyecto, con la finalidad de conocer el papel que desempeñan en la producción de la bebida.

Analizar por métodos cromatográficos la presencia de los ácidos orgánicos y etanol del producto final de la fermentación semicontinua.

Considerando que los resultados obtenidos en el biorreactor a escala laboratorio fueron favorables, se plantea realizar el biorreactor a mayor escala.

## 9. REFERENCIAS

- [1] Escalante A, López Soto DR, Velázquez Gutiérrez JE, Giles-Gómez M, Bolívar F and López-Munguía A, Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Frontiers in Microbiology*. 7 (2016) 1-18.
- [2] Escalante A, Giles-Gómez M, Esquivel Flores G, Acuña V, Terrazas-Moreno R, López-Munguía A, Lappe-Oliveras P, Pulque fermentation, in: *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology*. 43 (2011) 691-706.
- [3] Rojas-Rivas E, Cuffia F, Identifying consumers' profile and factors associated with the valorization of pulque: A traditional fermented beverage in Central Mexico, *Food Science and Technology International*. (2020) 1-10.
- [4] Rojas-Rivas E, Viesca-González FC, Favila-Cisneros HJ, Cuffia F, Consumers' perception of a traditional fermented beverage in Central Mexico: An exploratory study with the case of pulque, *British Food Journal*. 122 (2019) 708-721.
- [5] Anderson, R. K., Calvo, J., Serrano, G., and Payne, G. C., A study of the nutritional status and food habits of Otomi indians in the Mezquital Valley of Mexico. *American Journal Public Health*. 36 (1946) 883-903.
- [6] Gutiérrez-Urbe J.A., Figueroa L.M., Martín-del-Campo S.T., Escalante A., Pulque, in: *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, Elsevier Inc. 23 (2017) 543-556.
- [7] FAO/OMS, Probiotics in food, health and nutritional properties and guidelines for evaluation, FAO. 85 (2002).
- [8] Patel S, Majumder A, Goyal A, Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria, *Indian Journal of Microbiology*. 52 (2012) 3-12.
- [9] Gustaw W, Koziół J, Radzki W, Skrzypczak K, Michalak-Majewska M, Sołowiej B, Sławinska A, Jabłońska-Ryś E, The effect of addition of selected milk protein preparations on the growth of *Lactobacillus acidophilus* and physicochemical properties of fermented milk, *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 15 (2016) 29-36.

- [10] Ruiz Y, Valadez R, Guadarrama P, Pulque: fuente de probióticos y péptidos antimicrobianos, Revista de La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C. 21 (2017) 23.
- [11] Kaur M, Singh H, Jangra M, Kaur L, Jaswal P, Dureja C, Nandanwar H, Chaudhuri S.R, Rajee M, Mishra S, Pinnaka A.K, Lactic acid bacteria isolated from yak milk show probiotic potential, Applied Microbiology and Biotechnology. 101 (2017) 7635–7652.
- [12] George Kerry R, Kumar Patra J, Gouda S, Park Y, Shin H.S, Das G, Benefaction of probiotics for human health: A review, Journal of Food and Drug Analysis. 26 (2018) 927-939.
- [13] Cervantes-Elizarrarás A, Cruz-Cansino N del S, Ramírez-Moreno E, Vega-Sánchez V, Velázquez-Guadarrama N, Zafra-Rojas Q.Y, Piloni-Martini J, *In vitro* probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from aguamiel and pulque and antibacterial activity against pathogens, Applied Sciences. 9 (2019) 1-12.
- [14] Giles-Gómez M, Sandoval García J.G, Matus V, Campos Quintana I, Bolívar F, Escalante A, *In vitro* and *in vivo* probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage, Springerplus. 5 (2016) 708.
- [15] Castro-Rodríguez D, Hernández-Sánchez H, Yáñez Fernández J, Probiotic properties of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from aguamiel of *Agave salmiana*, Probiotics and Antimicrobial Proteins. 7 (2015) 107-117.
- [16] Ruíz-Ramírez Y, Guadarrama-Mendoza P.C, Escalante A, Giles-Gómez M, Valadez-Blanco R, Probiotic activity traits *in vitro* and production of antimicrobial peptides by *Lactobacillaceae* isolates from pulque using *Lactobacillus acidophilus* NCFM as control, Brazilian Journal of Microbiology. 53 (2022) 921-933.
- [17] Ramírez-Manzano S.I, Bye R, García-Moya E, Romero-Manzanares A, Aprovechamiento del Maguey pulquero en Nanacamilpa, Tlaxcala, México, Revista Etnobiología. 18 (2020) 65–76.
- [18] Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Avance de siembras y cosechas. Resumen nacional por cultivo, (2020). [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do).

- [19] Trejo L, Reyes M, Corte´s-Toto D, Romano-Grande E and Muñoz-Camacho LL, Morphological Diversity and Genetic Relationships in Pulque Production Agaves in Tlaxcala, Mexico, by Means of Unsupervised Learning and Gene Sequencing Analysis, *Frontiers in Plant Science*. 11 (2020) 1-14.
- [20] Puente-Garza C.A, Espinosa-Leal C.A, García-Lara S, Steroidal saponin and flavonol content and antioxidant activity during sporophyte development of maguey (*Agave salmiana*), *Plant Foods for Human Nutrition*. 73 (2018) 287-294.
- [21] NMX-V-022-1972., Aguamiel. Hydromel, 1978. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>.
- [22] Satanier R.Y, Ingraham J.L, Wheelis M.L, Painter P.R, Microbiología, Segunda, Reverté, S.A., Barcelona, 1992. [https://books.google.com.mx/books?id=2u-6Q2XCMDgC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=2u-6Q2XCMDgC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false) (accessed January 25, 2023).
- [23] Fellows P.J, Food processing technology: principles and practice, Third, woodhead publishing limited, 2009.
- [24] Doble M, Gummadi S.N, Biochemical Engineering , Prentice Hall of India Private Limited, (2007). [https://books.google.com.mx/books?id=uW0cZ5PhYWsC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_atb#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=uW0cZ5PhYWsC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_atb#v=onepage&q&f=false) (accessed January 25, 2023).
- [25] Brányik T, Vicente A.A, Dostálek P, Teixeira J.A, A review of flavour formation in continuous beer fermentations, *Journal of the Institute of Brewing*. 114 (2008) 3-13.
- [26] Gómez-Aldapa C.A, Díaz-Cruz C.A, Villarruel-López A, Torres-Vitela M del R, Añorve-Morga J, Rangel-Vargas E, Cerna-Cortes J.F, Viguera-Ramírez J.G, Castro-Rosas J, Behavior of *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* during production of pulque, a traditional Mexican beverage, *Journal of Food Protection*. 74 (2011) 580–587.
- [27] Gómez-Aldapa C.A, Díaz-Cruz C.A, Villarruel-López A, Torres-Vitela M del R, Rangel-Vargas E, Castro-Rosas J, Acid and alcohol tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in pulque, a typical Mexican beverage, *International Journal of Food Microbiology*. 154 (2012) 79-84.

- [28] Valadez-Blanco R, Bravo-Villa G, Santos-Sánchez N.F, Velasco-Almendarez S.I, Montville T.J, The artisanal production of pulque, a traditional beverage of the Mexican highlands, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 4 (2012) 140-144.
- [29] Singh R.P, Heldman D.R, Preservation processes, in: *Introduction to Food Engineering*, Elsevier. (2014) 421-474.
- [30] Pasteurización-IDFA, (n.d.). <https://www.idfa.org/pasteurization> (acceso Febrero 5, 2021).
- [31] Laroche G, Marois Y, Guidoin R, King M.W, Martin L, How T, Douville Y, Polyvinylidene fluoride (PVDF) as a biomaterial: From polymeric raw material to monofilament vascular suture, *Journal of Biomedical Materials Research*. 29 (1995) 1525–1536.
- [32] Wankat P.C, *Ingeniería de procesos de separación, Segunda Edición*, Pearson Educación de México, 2008. <https://es.slideshare.net/yudaryeugenio/wankat-p-ingenieria-de-procesos-de-separacion-2ed> (acceso June 20, 2021).
- [33] Rouquié C, Dahdouh L, Ricci J, Wisniewski C, Delalonde M, Immersed membranes configuration for the microfiltration of fruit-based suspensions, *Separation and Purification Technology*. 216 (2019) 25-33.
- [34] Gaveau A, Coetsier C, Roques C, Bacchin P, Dague E, Causserand C, Bacteria transfer by deformation through microfiltration membrane, *Journal of Membrane Science*. 523 (2017) 446-455.
- [35] Castro-Muñoz R, Boczkaj G, Gontarek E, Cassano A, Fíla V, Membrane technologies assisting plant-based and agro-food by-products processing: A comprehensive review, *Trends Food Science and Technology*. 95 (2020) 219-232.
- [36] Walker G.M, Lappe-Oliveras P, Moreno-Terrazas R.C, Kirchmayr M, Arellano-Plaza M, Gschaedler-Mathis A.C, Yeasts associated with the production of distilled alcoholic beverages, In: *Yeasts in the Production of Wine*, Springer. 8 (2019) 477–512.
- [37] Escalante A, Rodríguez M.A, Martínez A, López-Munguía A, Bolívar F, Gosset G, Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis, *FEMS Microbiology Letters*. 235 (2004) 273–279.

- [38] König H, Jürgen F, Lactic acid bacteria, in: *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*, Springer. 1 (2009) 3-5.
- [39] Wyszynski A, Kobińska P, Bardowski J, Jagusztyn-Krynicka E.K, Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination, *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99 (2015) 2967–2977.
- [40] Chacón-Vargas K, Torres J, Giles-Gómez M, Escalante A, Gibbons J.G, Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing, *Scientific Reports*. 10 (2020) 1–13.
- [41] Escalante A, Giles-Gómez M, Hernández G, Córdova-Aguilar M.S, López-Munguía A, Gosset G, Bolívar F, Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach, *International Journal of Food Microbiology*. 124 (2008) 126–134.
- [42] Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto J.A, Valdezate S, Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 29 (2011) 601–608.
- [43] Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner F.O, Ludwig W, Schleifer K.H, Whitman W.B, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R, Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences, *Nature Reviews Microbiology*. 12 (2014) 635–645.
- [44] Espinosa Asuar L, Guía práctica sobre la técnica de PCR, *Ecología Molecular*. (2007) 517–536. <http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/530/cap17.pdf>.
- [45] Muyzer G; Brinkhoff T; Nübel U; Santegoeds C; Schäfer H, Wawer C, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. In: *Molecular Microbial Ecology Manual* (2nd ed.), Kluwer Academic Publishers. (2004) 743-770).
- [46] García P, Allende F, Legarraga P, Huilcaman M, Solari S, Identificación bacteriana basada en el espectro de masas de proteínas: Una nueva mirada a la microbiología del siglo XXI, *Revista Chilena de Infectología*. 29 (2012) 263–272.
- [47] Bourassa L, Butler-Wu S.M, MALDI-TOF Mass Spectrometry for Microorganism Identification, *Methods in Microbiology*. 42 (2015) 37–85.

- [48] Hou T.Y, Chiang-Ni C, Teng S.H, Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology, *Journal of Food and Drug Analysis*. 27 (2019) 404–414.
- [49] Siller-Ruiz M, Hernández-Egido S, Sánchez-Juanes F, González-Buitrago J.M, JMunoz-Bellido J.L, Fast methods of fungal and bacterial identification. MALDI-TOF mass spectrometry, chromogenic media, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Edition)*. 35 (2017) 303-313.
- [50] Green S.J, Leigh M.B, Neufeld J.D, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis, in: *Handbook Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer. (2010) 4137-4158.
- [51] Madigan, M.T., Martinko J.M, Dunlap P.V, Clarkc D.P, *Brock Biology of Microorganisms*, 13th ed., San Francisco, California. (2009).
- [52] Juárez-Castelán C, García-Cano I, Escobar-Zepeda A, Azaola-Espinosa A, Álvarez-Cisneros Y, Ponce-Alquicira E, Evaluation of the bacterial diversity of Spanish-type chorizo during the ripening process using high-throughput sequencing and physicochemical characterization, *Meat Science*. 150 (2019) 7-13.
- [53] Hernández M, Quijada N.M, Rodríguez-Lázaro D, Eiros J.M, Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis, *Revista Argentina de Microbiología*. 52 (2020) 150–161.
- [54] Sánchez Miguel A, *Fermentación de malta empleando un sistema semicontinuo en el Proceso de Elaboración De Cerveza*, Universidad Tecnológica De La Mixteca, 2011.
- [55] Lee S, Lee J.A, Park G.G, Jang J.K, Park Y.S, Semi-continuous fermentation of onion vinegar and its functional properties, *Molecules*. 22 (2017)
- [56] Solís C.A, Vélez C.A, Ramírez J.S, *Tecnología de membranas: desarrollo histórico*, *Entre Ciencia e Ingeniería*. (2016) 89–98.
- [57] Brennan. J.G., Butteri J.R., Cowell N.D., LiHey A.E.V., *Las operaciones de la ingeniería de los alimentos*, Tercera Edición, Acribia S.A. (1998).
- [58] Carneiro L, dos Santos Sa I, dos Santos Gomes F, Martins Matta V, Correa Cabral L.M, Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration, *Desalination*. 148 (2002) 93–98.

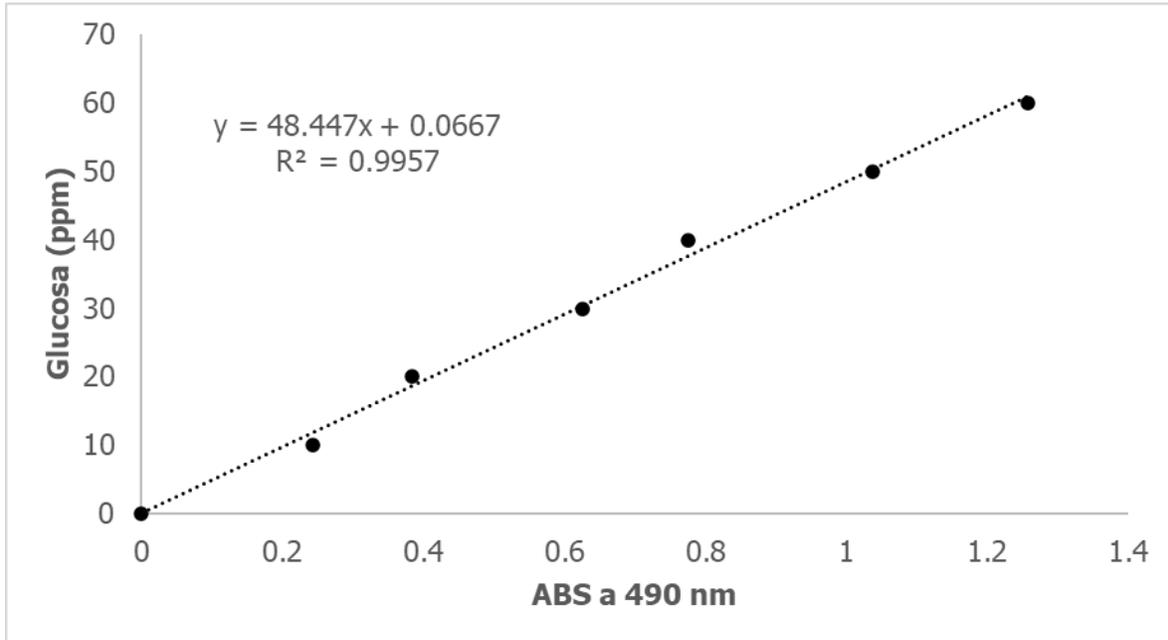
- [59] Karmakar S, De S, Cold sterilization and process modeling of tender coconut water by hollow fibers, *Journal of Food Engineering*. 200 (2017) 70–80.
- [60] Rocha-Arriaga C, Espinal-Centeno A, Martínez-Sánchez S, Caballero-Pérez J, Alcaraz L.D, Cruz-Ramírez A, Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a biocultural resource of Mexico, *Microbiological Research*. 241 (2020) 126593.
- [61] Villarreal Morales S.L, Enríquez Salazar M.I, Michel Michel M.R, Flores Gallegos A.C, Montañez-Saens J, Aguilar C.N, Rodríguez Herrera R., Metagenomic microbial diversity in aguamiel from two *Agave* species during 4-year seasons, *Food Biotechnology*. 33 (2019) 1–16.
- [62] NMX-V-013-S-1980., Bebidas alcohólicas destiladas. Determinación del por ciento de alcohol en volumen en la escala Gay - Lussac a 288 K (15 °C). Normas Mexicanas. Dirección General de Normas., 1978. <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-FF-038-2002.PDF>.
- [63] NMX-F-083-1986, Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios, 1986. <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-083-1986.PDF>.
- [64] Dubois M, Gilles K.A, Hamilton J.K, Rebers P.A, Smith F, Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, *Analytical Chemistry*. 28 (1956) 350–356.
- [65] Ávila Núñez R, Rivas Pérez B, Hernández Motzezak R, Chirinos M, Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease, *Multiciencias*. 12 (2012) 129–135.
- [66] Lorenz Miller G, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Analytical Chemistry*. 31 (1959) 426–428.
- [67] Obire O, Activity of *Zymomonas* species in palm-sap obtained from three areas in Edo State, Nigeria., *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 9 (2005) 25–30.
- [68] Huse S.M, Dethlefsen L, Huber J.A, Welch D.M, Relman D.A, Sogin M.L, Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing, *PLoS Genetics*. 4 (2008) e1000255.

- [69] Moreno C.E, M&T-Manuales y Tesis SEA, Título del volumen: Métodos para medir la biodiversidad. 1 (2001) 21-44. <http://entomologia.rediris.es/sea> (acceso marzo 1, 2023).
- [70] Enríquez-Salazar M.I, Veana F, Aguilar C.N, de la Garza-Rodríguez I.M, López M.G, Rutiaga-Quiñones O.M, Morlett-Chávez J.A, Rodríguez-Herrera R, Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from *Agave salmiana* and *A. atrovirens* during different seasons of year, Food Science Biotechnology. 26 (2017) 1003–1011.
- [71] Diario oficial de la federación, Reglamento para el control sanitario del pulque., CD. México, 1976. [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4851809&fecha=04/10/1976](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4851809&fecha=04/10/1976).
- [72] Álvarez-Ríos G.D, Figueredo-Urbina C.J, Casas A, Physical, chemical, and microbiological characteristics of pulque: Management of a fermented beverage in Michoacán, Mexico, Foods. 9 (2020).
- [73] Cervantes Contreras M, Pedroza Rodríguez A.M, El Pulque: Características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman, Nova-Publicación Científica En Ciencias Biomédicas. 5 (2007) 135.

## 10. APÉNDICES

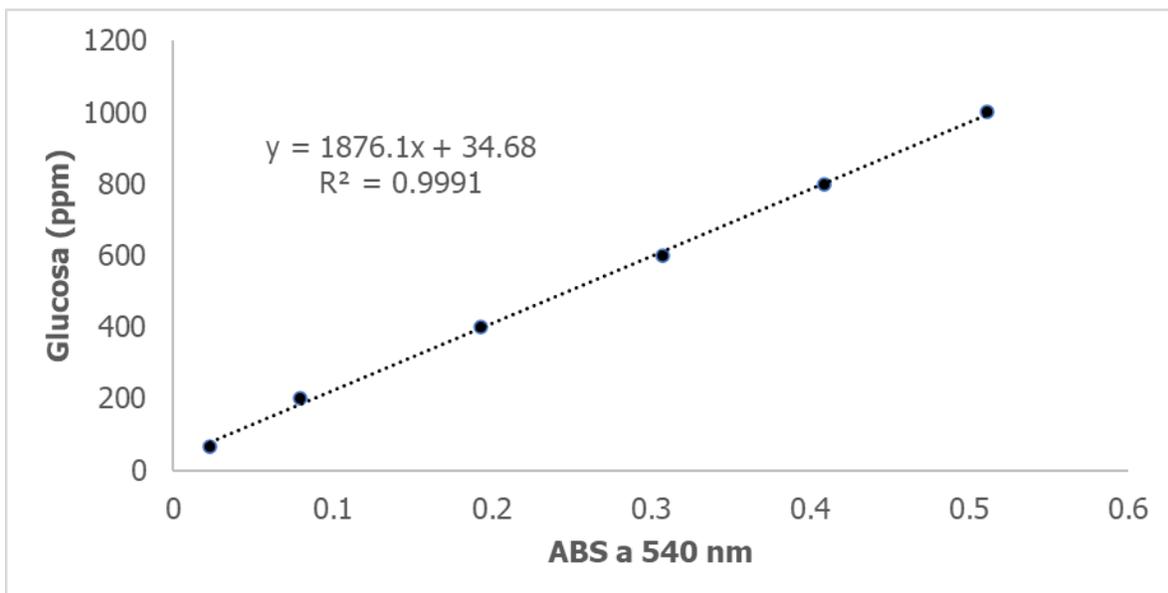
### A.1. Curva estándar de glucosa para la cuantificación de azúcares totales por el método Dubois.

La curva se realizó por triplicado.



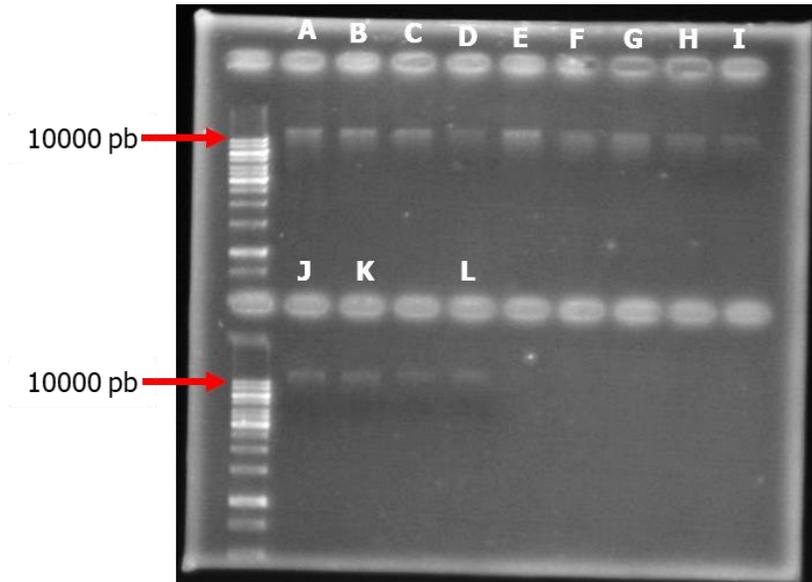
### A.2. Curva estándar de glucosa para la cuantificación de azúcares reductores por el método Miller

La curva se realizó por triplicado.

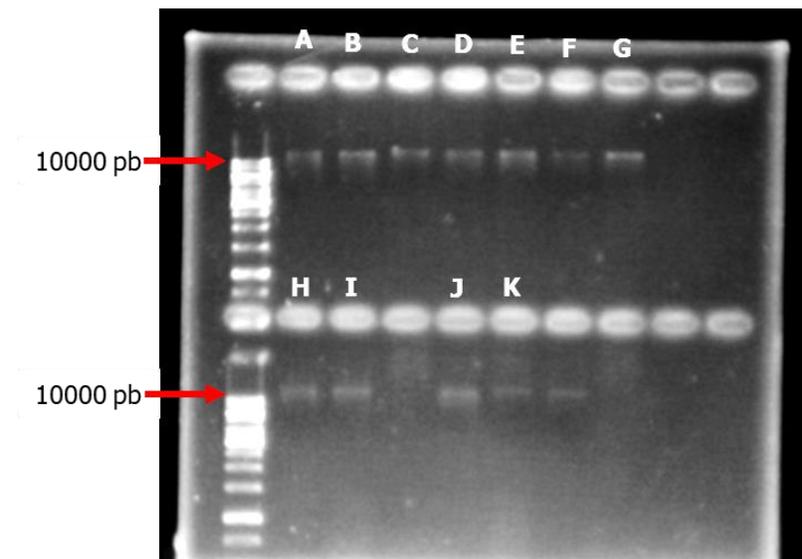


### A.3 Visualización de geles de extracción de ADN genómico de las cepas aisladas

A continuación, se presentan los geles de la electroforesis del ADN genómico extraído de los aislados provenientes del pulque ultracongelado. A: PUBI, B: PUBIII, C: PUBIV, D: PUBV, E: PUB6, F: PUB7, G: PUB9, H: PULn2, I: PULnIII, J: PULn5, K: PULn7, L: PUL1.

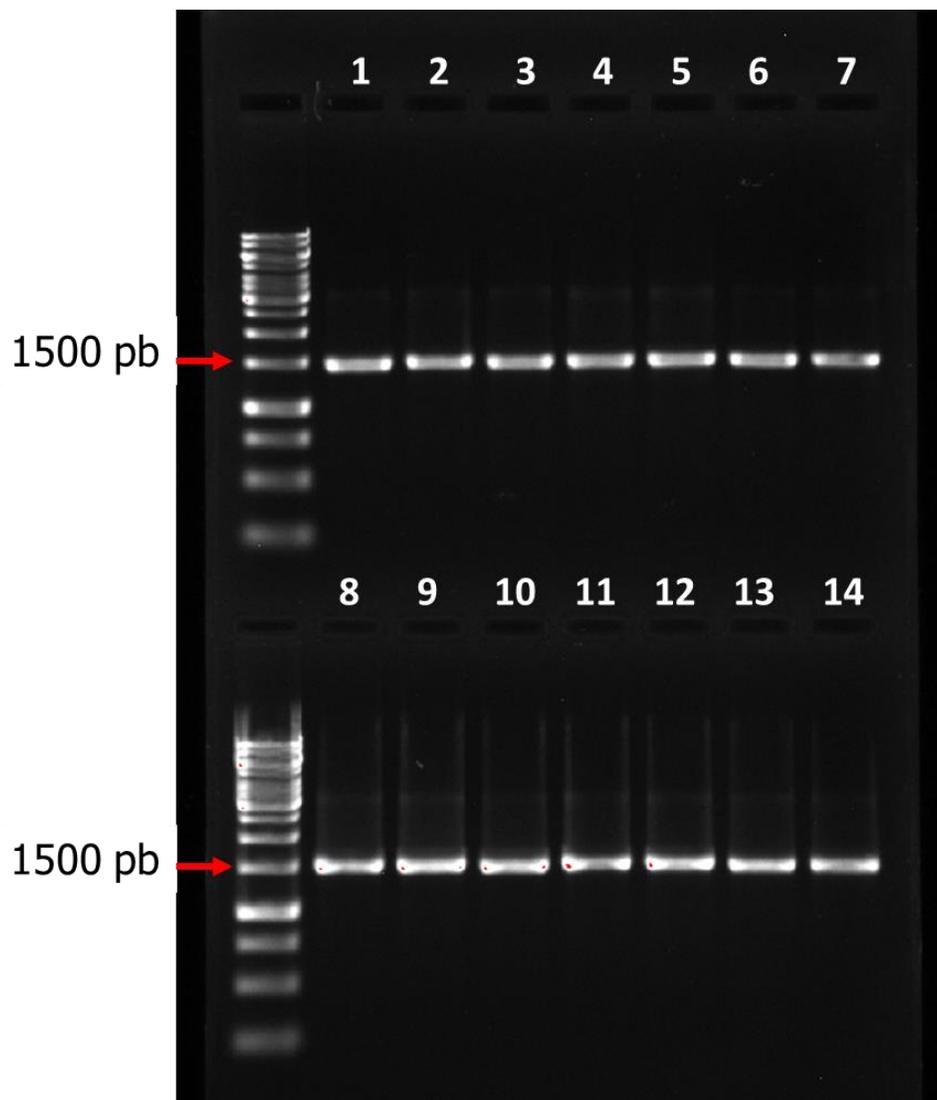


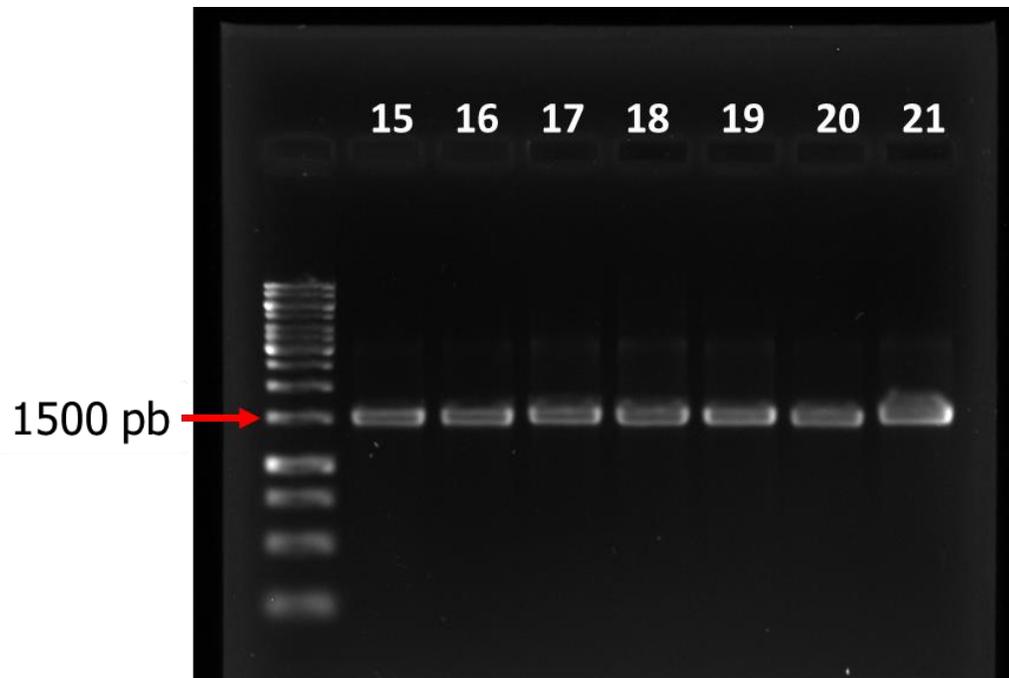
Se presentan los geles de la electroforesis del ADN genómico extraído de los aislados bacterianos provenientes del pulque del reactor. A: PRB1, B: PRBV, C: PRB5, D: PRB6, E: PRB9, F: PRLn2, G: PRLn2(III), H: PRLn5, I: PULn7, J: PULnX, K: PRL1.



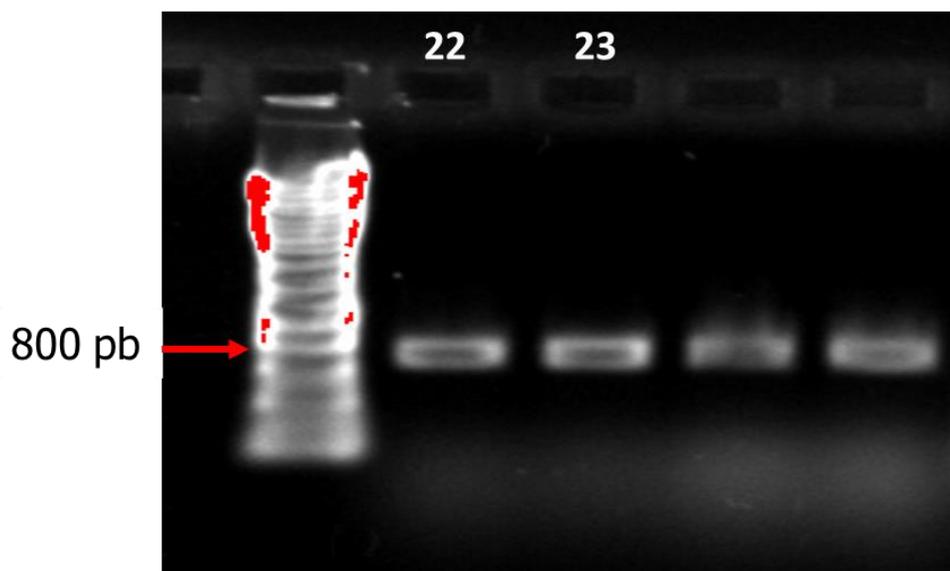
#### A.4 Visualización de geles de amplificación del gen ARNr 16S y región ITS a partir del ADN genómico de las cepas aisladas

A continuación, se muestran los geles de electroforesis de agarosa al 1% de productos de PCR. Productos de PCR del gen ARNr 16S: 1: PUBI, 2: PUBIII, 3: PUBIV, 4: PUBV, 5: PUB6, 6: PUB7, 7: PUB9, 8: PULn2, 9: PULnIII, 10: PULn5, 11: PULn7, 12: PRB1, 13: PRBV, 14: PRB5, 15: PRB6, 16: PRB9, 17: PRLn2, 18: PRLn2(III), 19: PRLn5, 20: PRLn7, 21: PRLnX.



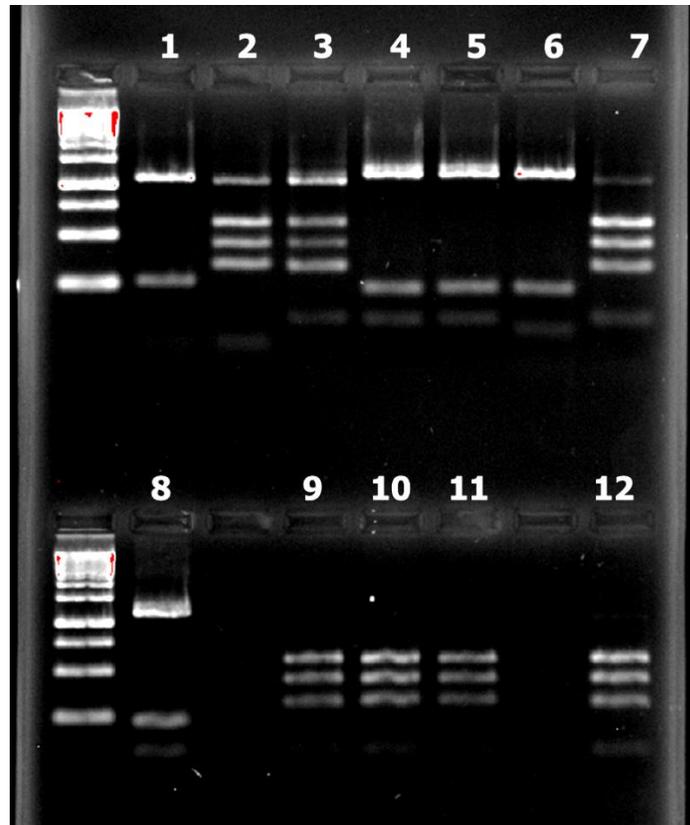


A continuación, se muestran los gels de electroforesis de agarosa al 1% de productos de PCR de la región ITS: 22: PUL1, 23: PRL1.

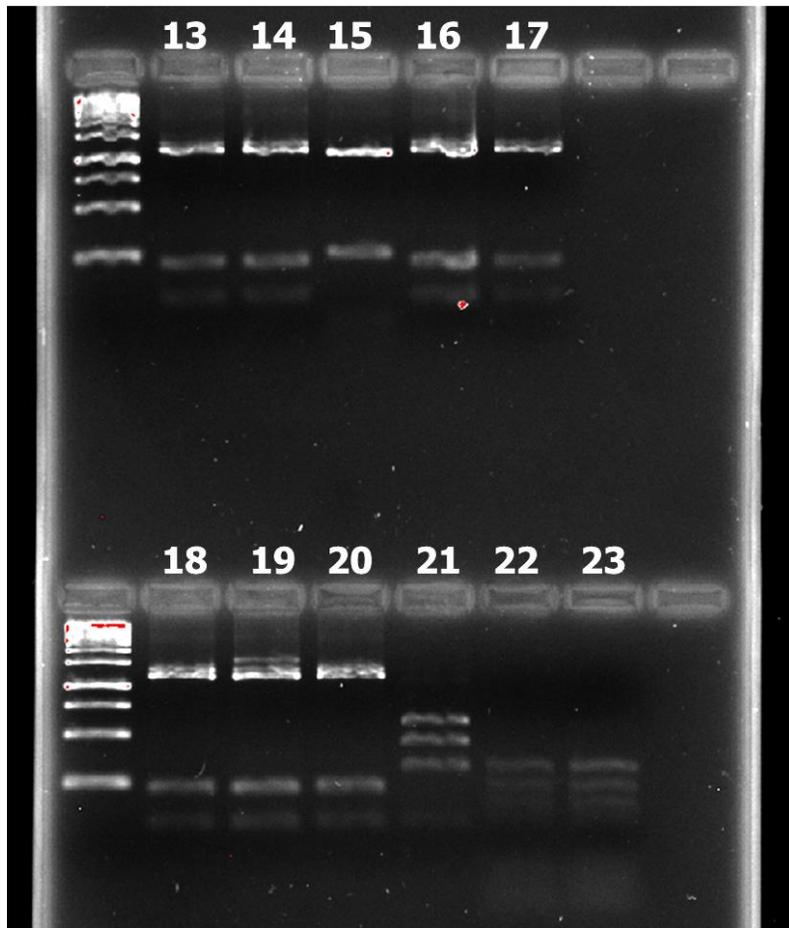


### A.5 Visualización de geles de digestión enzimática del gen ARNr 16S y región de las cepas aisladas

A continuación, se muestran los geles de electroforesis en agarosa al 2% de productos digeridos. Carril 1: PUBI, 2: PUBIII, 3: PUBIV, 4: PUBV, 5: PUB6, 6: PUB7, 7: PUB9, 8: PULn2, 9: PULnIII, 10: PULn5, 11: PULn7, 12: PUL1.

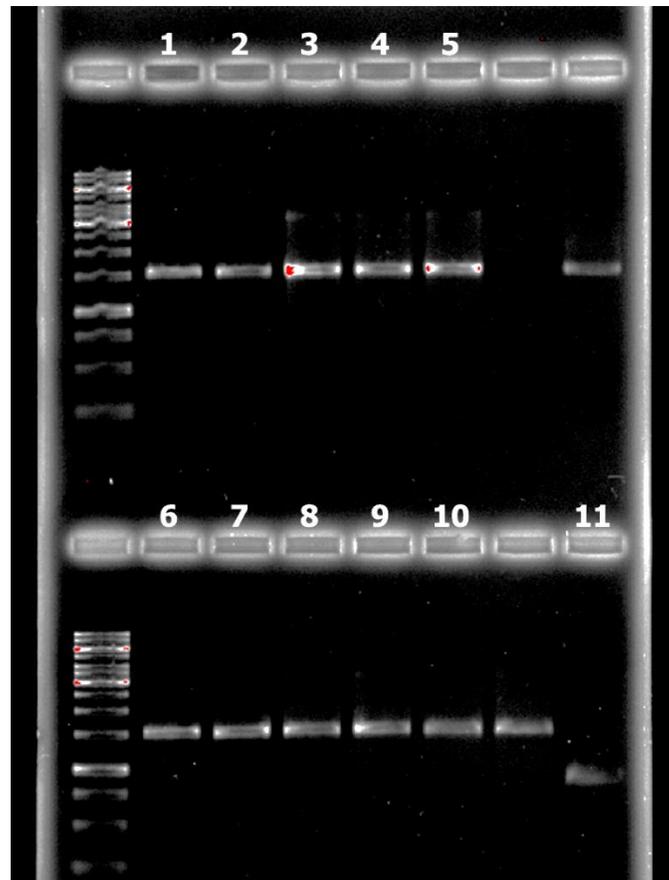


Se muestran los geles de electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos digeridos. Carril 13: PRB1, 14: PRBV, 15: PRB5, 16: PRB6, 17: PRB9, 18: PRLn2, 19: PRLn2(III), 20: PRLn5, 21: PRLn7, 22: PRLnX, 23: PUL1.

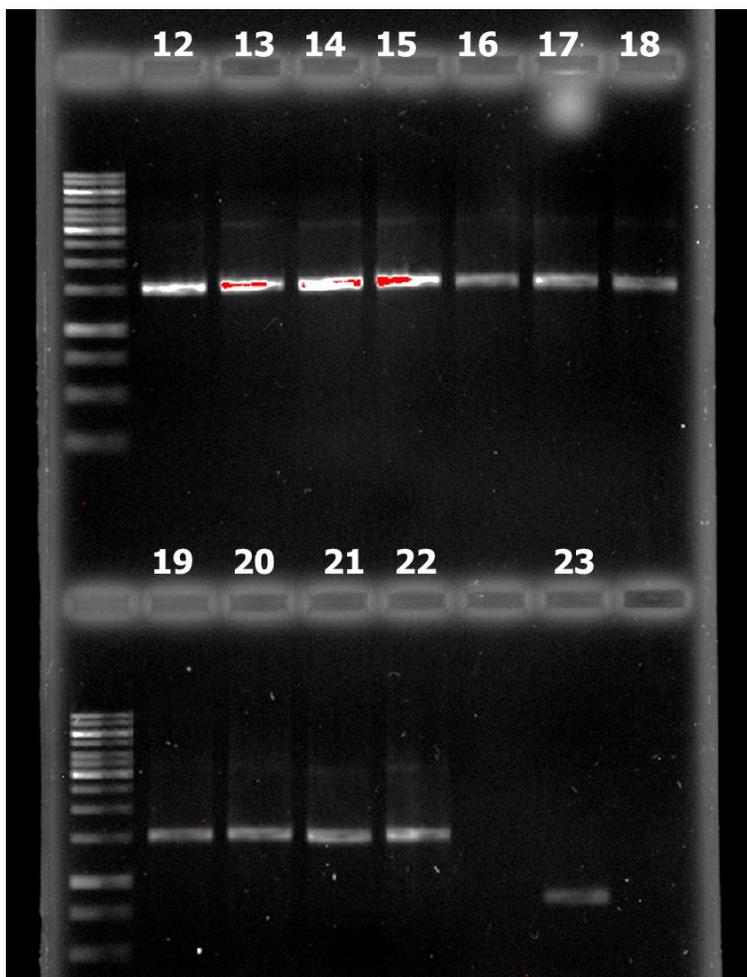


## A.6 Visualización de geles de purificación del gen ARNr 16S y región ITS a partir de las cepas aisladas

A continuación, se presentan los geles de electroforesis del ADN genómico purificado de los aislados bacterianos provenientes del pulque del reactor. 1: PRB1, 2: PRBV, 3: PRB5, 4: PRB6, 5: PRB9, 6: PRLn2, 7: PRLn2(III), 8: PRLn5, 9: PULn7, 10: PULnX, 11: PRL1.



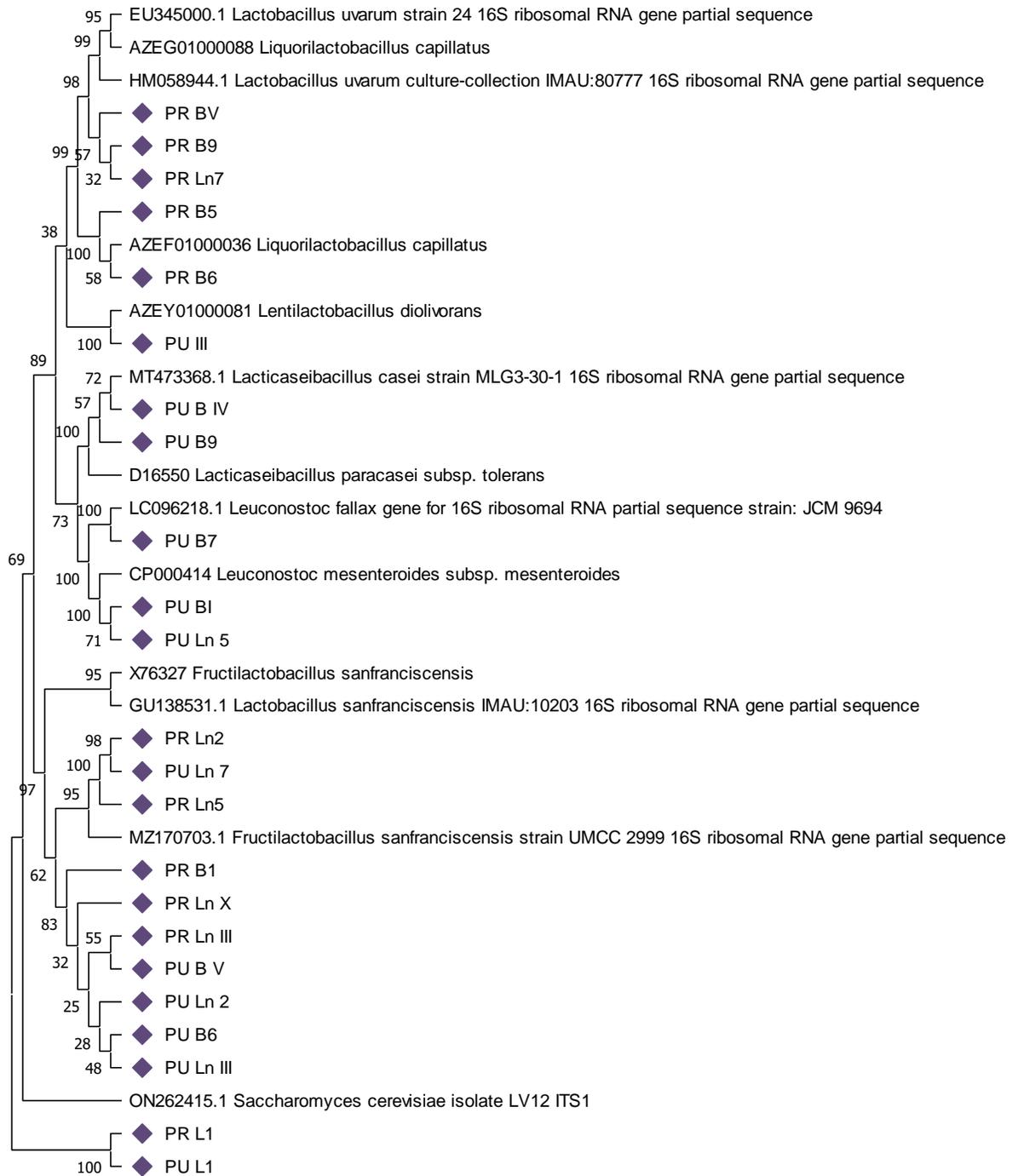
Se presentan los geles de la electroforesis del ADN genómico extraído de los aislados provenientes del pulque ultracongelado. 12: PUBI, 13: PUBIII, 14: PUBIV, 15: PUBV, 16: PUB6, 17: PUB7, 18: PUB9, 19: PULn2, 20: PULnIII, 21: PULn5, 22: PULn7, 23: PUL1.



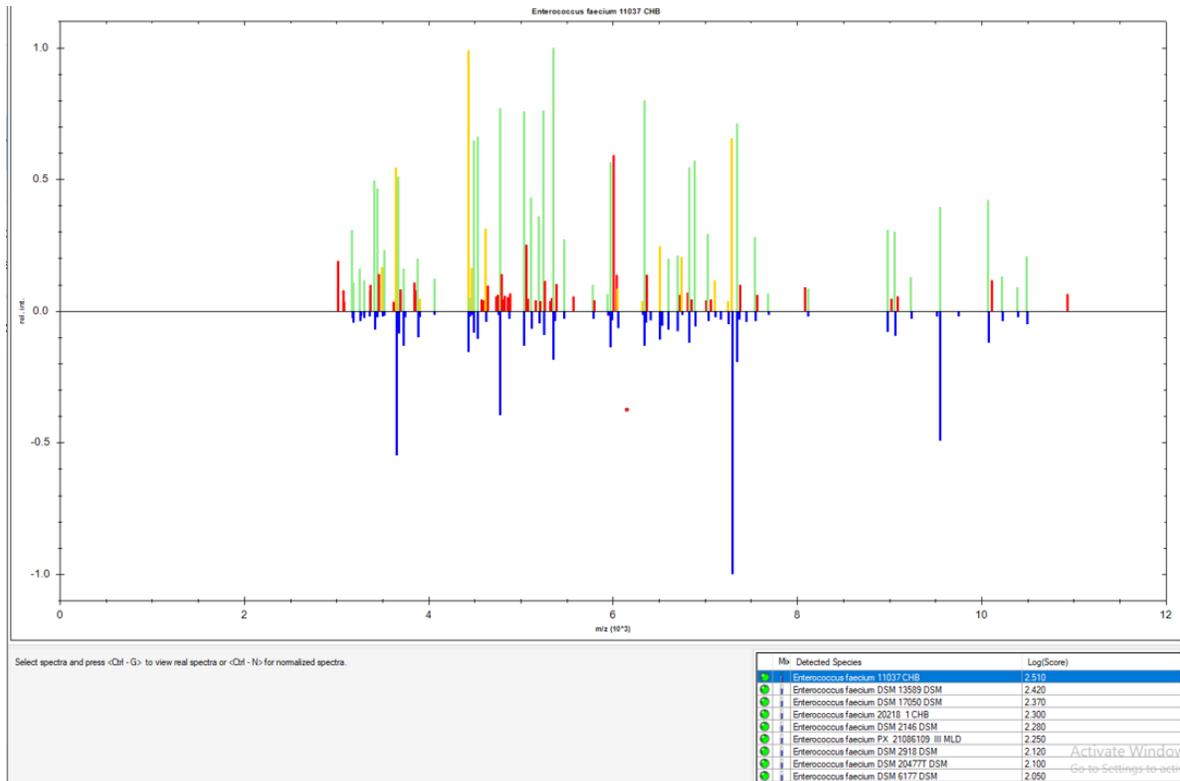
### A.7 Concentración de ADN de las cepas después del proceso de extracción y purificación

Cepa	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L)	
	Extracción	Purificación
PRB1	10.4	28.1
PRBV	63.4	21.8
PRB5	11.4	29.1
PRB6	60.3	19.8
PRB9	76.5	21.9
PRLN2	29.6	31.3
PRLN2III	7.8	21.3
PRLN5	14.0	28.6
PRLN7	11.9	39.1
PRLNX	17.8	20.3
PRL1	3.6	20.0
PUB1	13.0	44.7
PUBIII	16.7	69.6
PUBIV	23.8	76.4
PUBV	14.0	83.5
PUB6	15.1	22.9
PUB7	25.5	35.3
PUB9	36.9	27.0
PULN2	15.1	21.8
PULNIII	17.7	26.4
PULN5	11.5	20.9
PULN7	5.2	30.7
PUL1	1.6	22.3

## A.8 Árbol filogenético de las cepas aisladas e identificadas

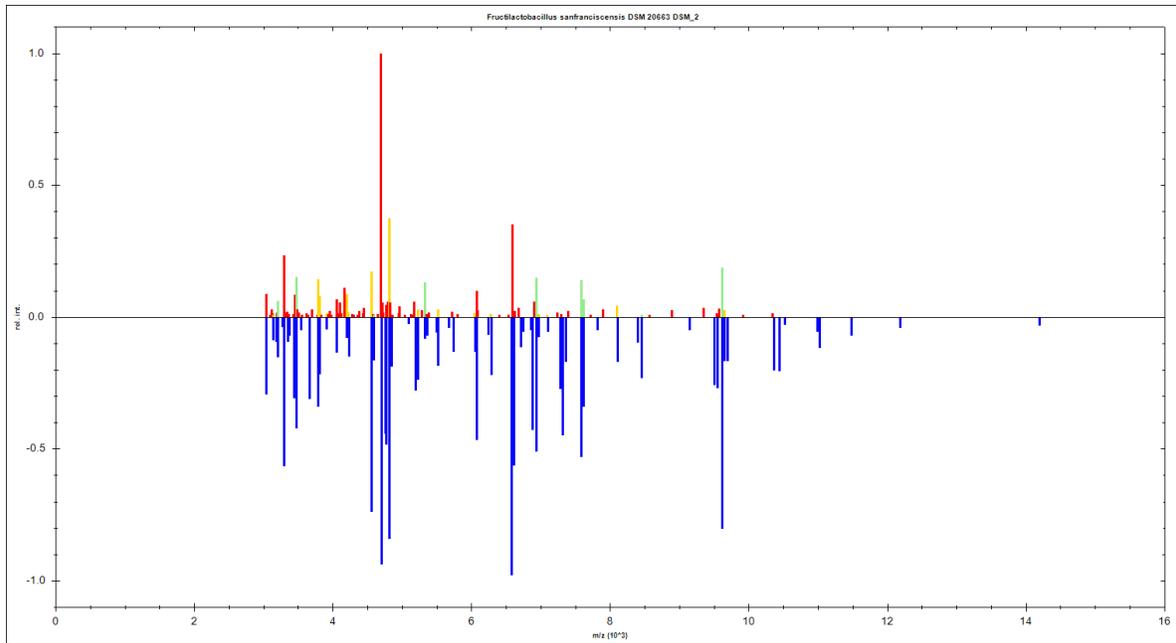


## A.9 Visualización de un ejemplo de identificación exitosa por la técnica de espectrometría de masas MALDI Biotyper®

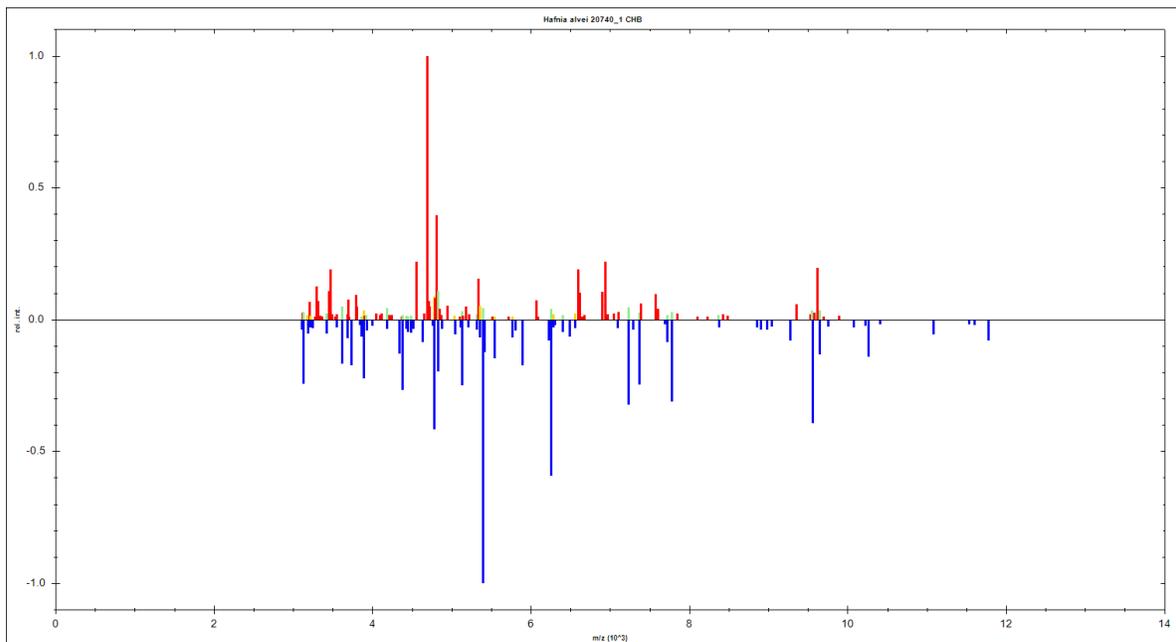


## A.10 Espectros correspondientes a las cepas no identificadas por MALDI Biotyper®

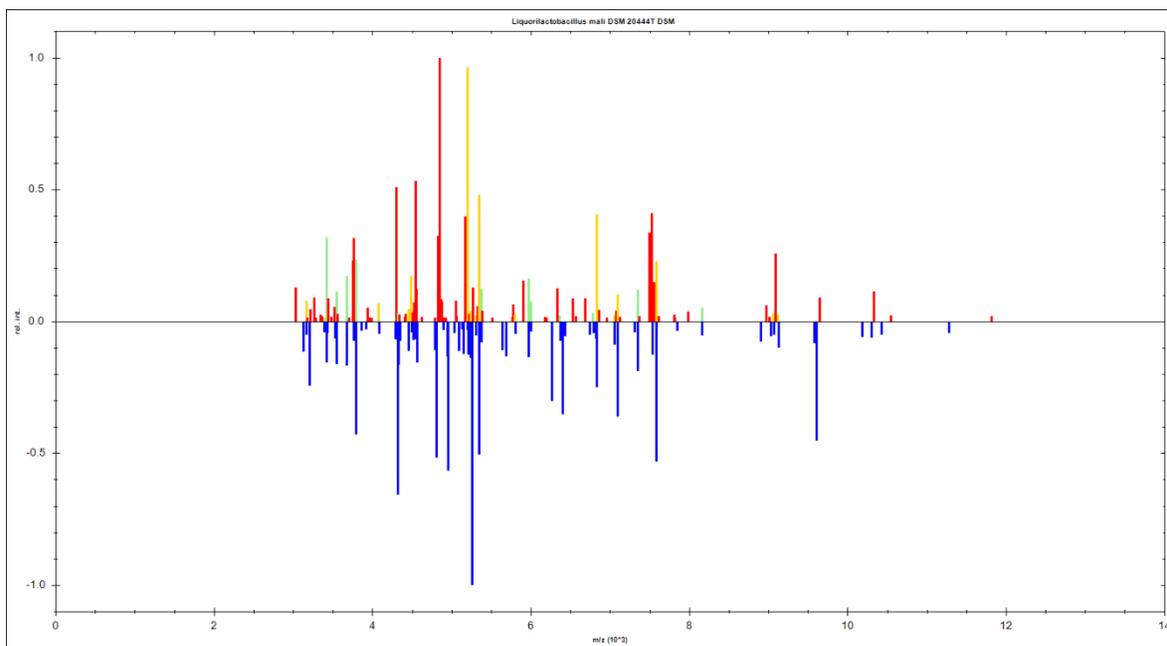
PU Ln2



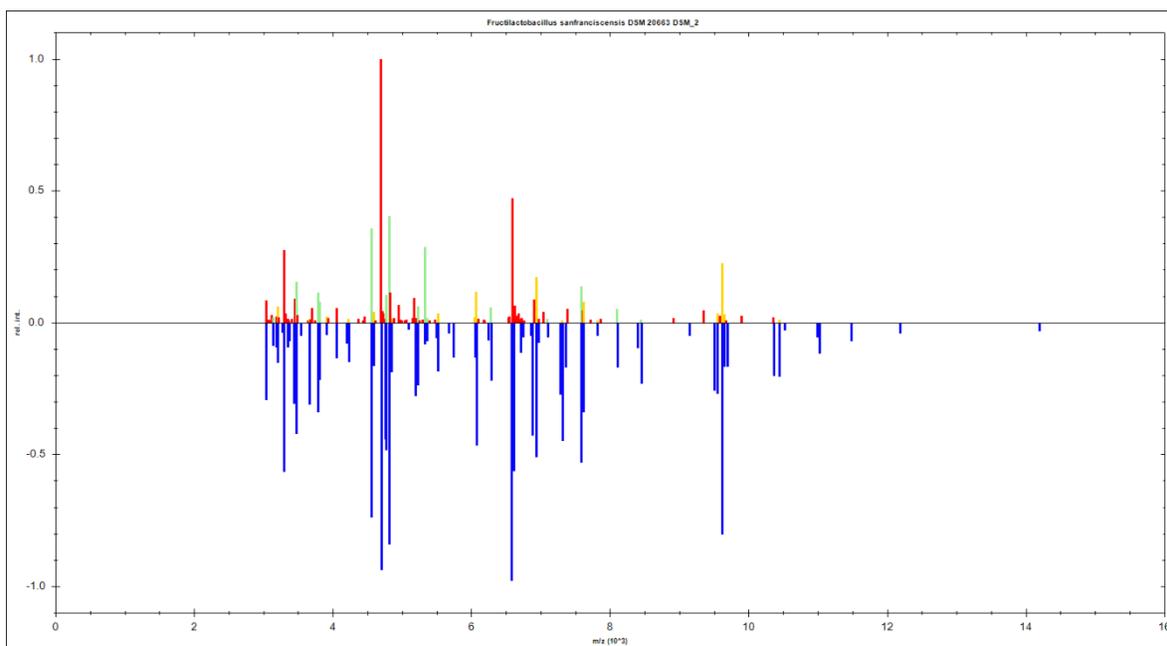
PR Ln7



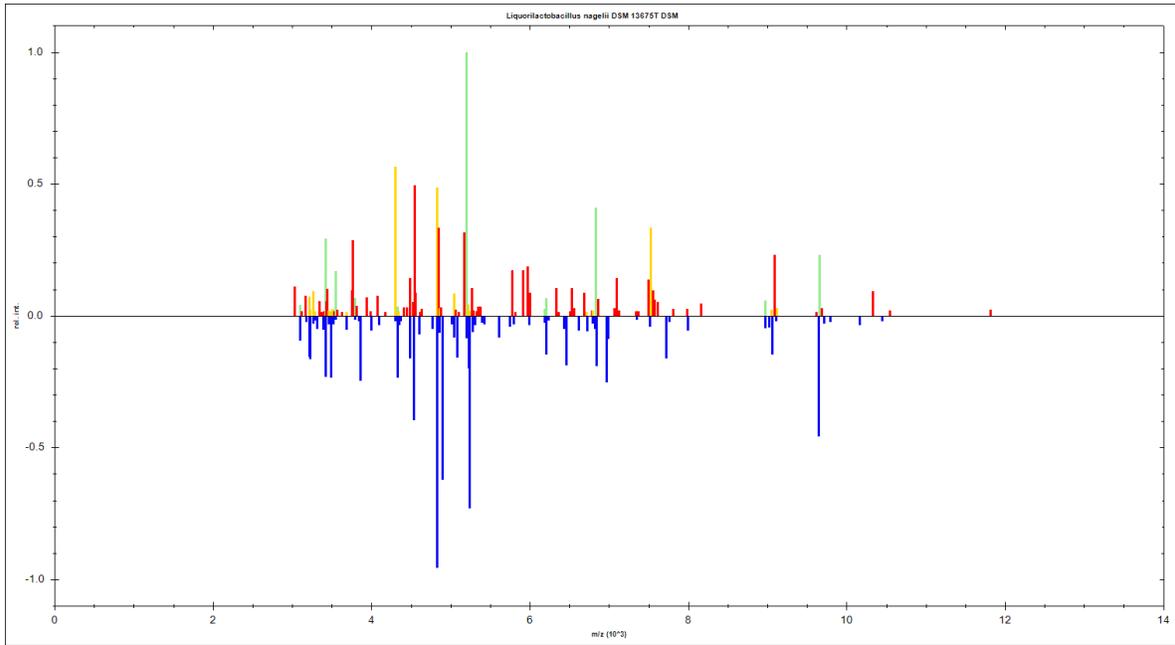
PR B9



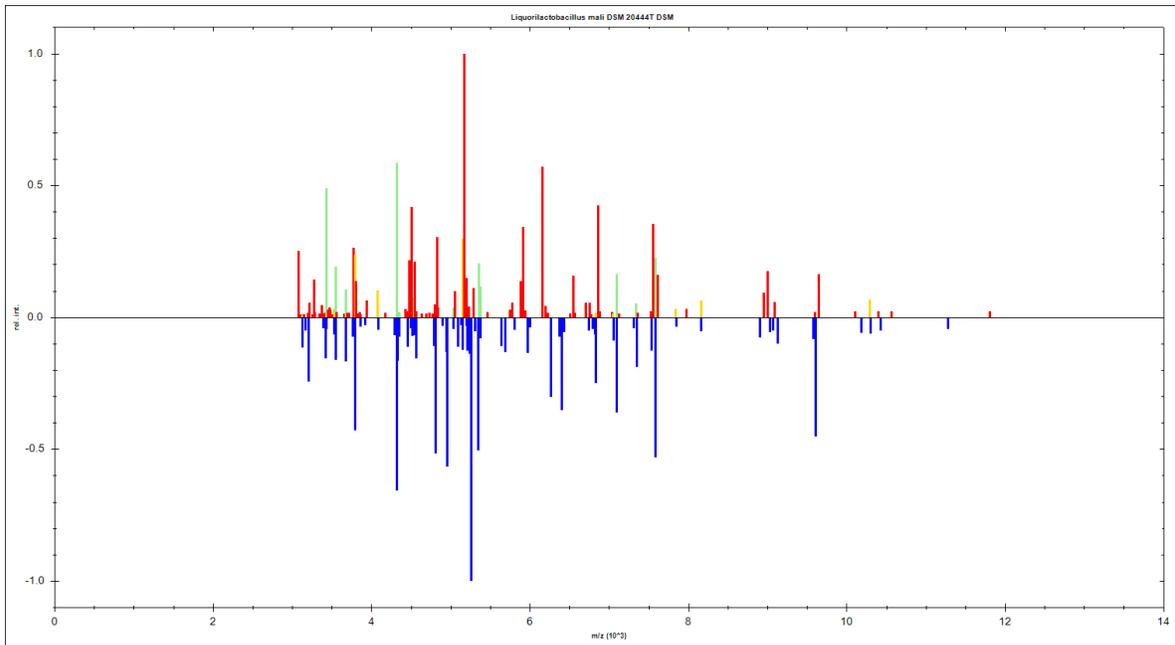
PR Ln III



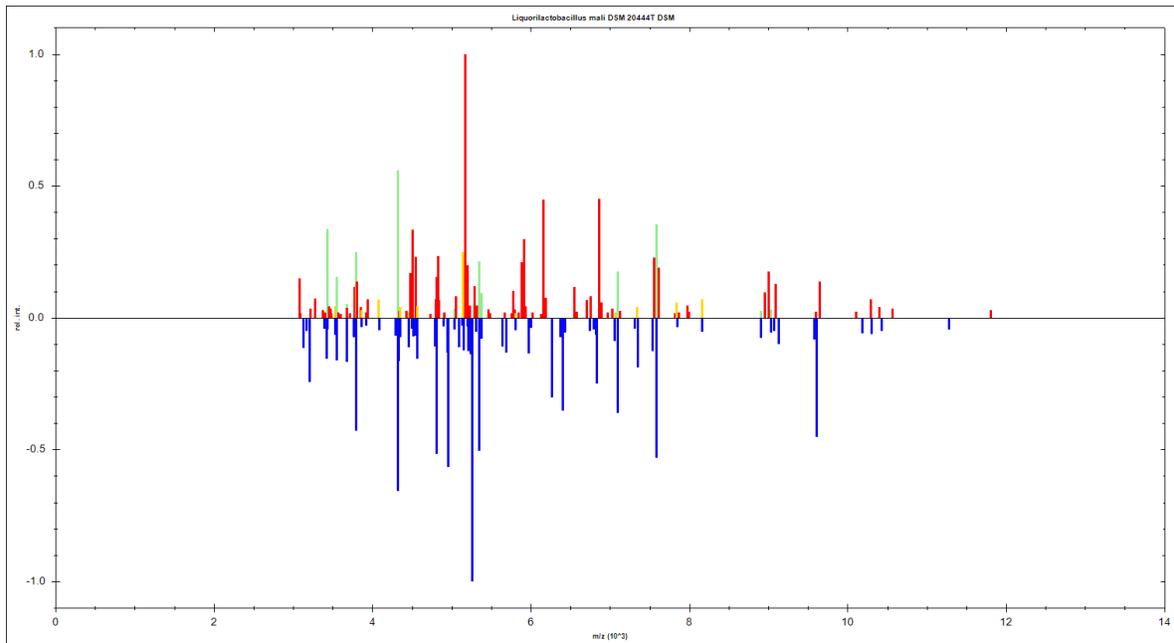
PR BV



PR B5



PR B6

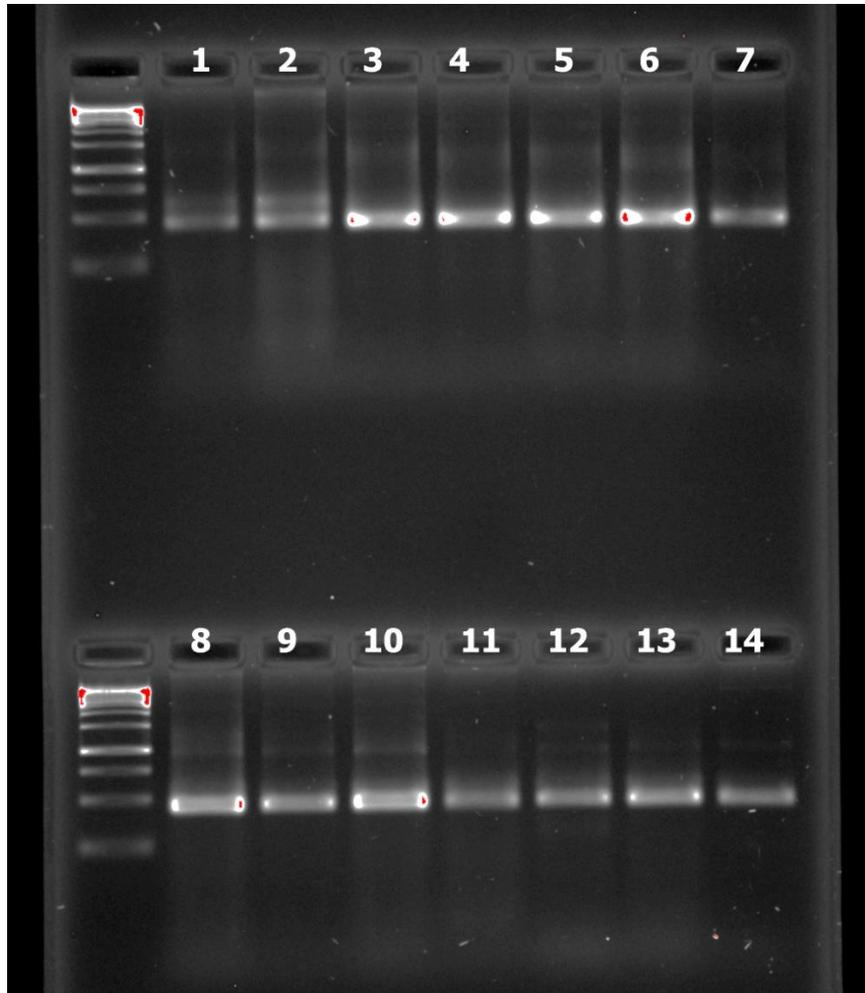


**A.11 Visualización de geles de extracciones totales, amplificaciones de los días de fermentación y de las cepas seleccionadas como blancos positivos.**

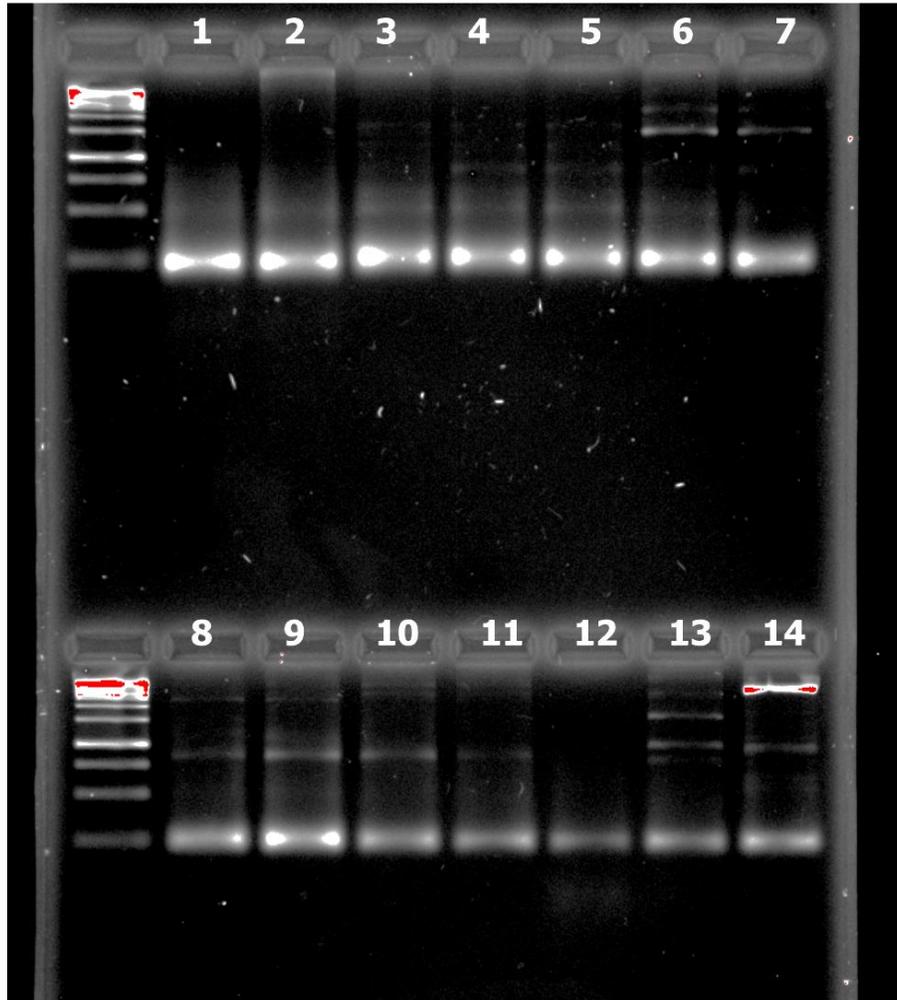
Se presenta un ejemplo del gel de electroforesis del ADN genómico total extraído de las muestras de pulque provenientes de la fermentación en el reactor semicontinuo.



Amplificación de la región V6-V8 (~400 pb) del; 1: Pulque semilla, 2: Pulque producto de la primera fermentación, 3-11 fermentación del segundo reactor (D0, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8), 12: PU B7, 13: PR B9, 14: PU Ln5.



Amplificación de la región V3 (~200 pb): 1: Pulque semilla, 2: Pulque producto de la primera fermentación, 3-11 fermentación del segundo reactor (D0, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8), 12: PU B7, 13: PR B9, 14: PU Ln5.



Amplificación de la región D1 (~200 pb): 1: Pulque semilla, 2: Pulque producto de la primera fermentación, 3-7 Y 9-12 fermentación del segundo reactor (D0, D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8), 13: PR L1, 14: PU L1.

