

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERETARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



“AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE *Leuconostoc* spp RESPONSABLES DE LA VISCOSIDAD DEL PULQUE”

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA

L.G.C. Luis Martín Ortiz Mateos

DIRIGIDA POR

Dra. Sofía María Arvizu Medrano



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

“AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE *Leuconostoc* spp RESPONSABLES DE LA VISCOSIDAD DEL PULQUE”

TESIS

QUE COMO PARTE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA

L.G.C. Luis Martín Ortiz Mateos

DIRIGIDA POR

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

SINODALES

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Presidenta

Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Secretaria

Firma

Dra. Dalia Elizabeth Miranda Castilleja
Vocal

Firma

Dr. Jesús Alejandro Aldrete Tapia
Vocal

Firma

Mtro. Ángel Gustavo Cruz Bonnet
Vocal

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Mayo 2022
México

Dedicatoria

A mis padres y hermanas por el apoyo incondicional que siempre me han brindado, la motivación que me aportaron. Muchos de mis logros se los debo a ustedes, pero principalmente les dedico este. Gracias por todo, los amo mucho.

Al Dr. Peniche que dios lo tenga en su gloria y quiero dedicarle también esta tesis porque siempre creyó en mí inicio la maestría, me dejó un vacío grande en el corazón, pero me quedo con todas las enseñanzas, regaños y apoyos que me ayudaron a seguir adelante y poder concluir este proyecto. Nunca olvidaré esa frase que algún día me mencionó..." El mundo es de los locos y tú estás loco, ve por ello"

Agradecimientos

A la Dra. Sofía María Arvizu: Medrano por toda ayuda que me brindó durante la pandemia, lo académico y personal. Gracias por ser una excelente persona, por tenerme tanta paciencia y por ayudarme a concluir.

A la Dra. Dalia Elizabeth Miranda Castilleja: por toda la flexibilidad, paciencia y apoyo incondicional que me brindaste para salir a adelante. Gracias por estar ahí presente en la evolución y desarrollo del proyecto.

Al Mtro. Ángel Gustavo Cruz Bonnet: por apoyarme desde la universidad y estar presente en este proyecto, junto con todas sus enseñanzas.

A Geronimo Rosainz: por apoyarme con su aguamiel, pulque, amistad, consejos y la confianza puesta para este proyecto.

A SEFOA: por la vinculación con los productores y apoyo.

A mis amigos: Erick Rivera, Carlos Jiménez, Guadalupe Hernández, Luis Ramón, Edgar Ayala, Omar Hernández, Cristian Jaime, Ana Arceo, Samantha. Porque cada uno de ustedes que me brindó su amistad y apoyo en todo momento influyendo para poder terminar.

Índice General	
RESUMEN	11
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN	14
ANTECEDENTES	16
2.1. Historia del pulque	16
2.2 Importancia del pulque	17
2.3 Cultivo del agave pulquero	18
2.3.1. La planta	18
2.3.2 Propagación, plantación y prácticas culturales	19
2.4 Elaboración de Pulque.....	19
2.4.1 Composición del aguamiel.....	20
2.5 Microbiología del pulque	23
2.5.1 Generalidades.....	23
2.5.2 Fermentación alcohólica	24
2.5.3. Fermentación láctica.....	26
2.5.4. Viscosidad en el pulque	29
2.5.5. Fermentación acética.....	31
3. OBJETIVOS	33
General.....	33
Específicos	33
4. METODOLOGÍA.....	34
4.1 Localización del sitio experimental.....	34
4.2. Obtención de muestras de aguamiel, semilla y pulque	34
4.3. Cuantificación de BAL y detección de <i>Leuconostoc</i> spp.....	35
4.5. Tolerancia cepas <i>Leuconostoc</i> a medio fermentativo	37
4.6 Evaluación de la viscosidad generada por cepas de <i>Leuconostoc</i> seleccionadas en medio de cultivo.....	37
4.7. Evaluación de la viscosidad generada por cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. en aguamiel.	38

4.8. Efecto de las cepas seleccionadas de <i>Leuconostoc</i> spp sobre las características físicas, químicas y sensoriales del pulque.....	38
4.8.1. Elaboración de pulque	38
4.8.2. Características físicas y químicas del pulque producido con cepas <i>Leuconostoc</i> spp. seleccionadas.....	39
4.8.2.1. pH	39
4.8.2.2. Acidez total titulable	39
4.8.2.3. Grados Brix.....	39
4.8.2.4. Densidad	39
4.7.2.5. Viscosidad	40
4.7.2.6. Alcohol	40
4.9. Análisis sensorial.....	40
4.10. Análisis estadístico.....	42
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1. Cuantificación de BAL y detección de <i>Leuconostoc</i> spp.....	42
5.2. Identificación de <i>Leuconostoc</i> spp.	45
5.3. Tolerancia cepas <i>Leuconostoc</i> a medio fermentativo	46
5.4. Evaluación de la viscosidad generada por cepas de <i>Leuconostoc</i> seleccionadas en medio de cultivo.....	47
5.5. Evaluación de la viscosidad generada por cepas de <i>Leuconostoc</i> seleccionadas en aguamiel.	48
5.7. Análisis Sensorial.....	51
5.7.1 Prueba triangular.....	51
5.8 Prueba de Rangos	54
6. Conclusiones.....	56
7. BIBLOGRAFÍA	57
8.0. Anexos	65
Anexo 8.1	65
Anexo 8.2.....	66
Anexo 8.3	67
RESUMEN	11

ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN	14
ANTECEDENTES	16
2.1. Historia del pulque	16
2.2 Importancia del pulque	17
2.3 Cultivo del agave pulquero	18
2.3.1. La planta	18
2.3.2 Propagación, plantación y prácticas culturales	19
2.4 Elaboración de Pulque.....	19
2.4.1 Composición del aguamiel.....	20
2.5 Microbiología del pulque	23
2.5.1 Generalidades.....	23
2.5.2 Fermentación alcohólica	24
2.5.3. Fermentación láctica.....	26
2.5.4. Viscosidad en el pulque	29
2.5.5. Fermentación acética.....	31
3. OBJETIVOS	33
General.....	33
Específicos	33
4. METODOLOGÍA.....	34
4.1 Localización del sitio experimental.....	34
4.2. Obtención de muestras de aguamiel, semilla y pulque	34
4.3. Cuantificación de BAL y detección de <i>Leuconostoc</i> spp.....	35
4.5. Tolerancia cepas <i>Leuconostoc</i> a medio fermentativo	37
4.6 Evaluación de la viscosidad generada por cepas de <i>Leuconostoc</i> seleccionadas en medio de cultivo.....	37
4.7. Evaluación de la viscosidad generada por cepas de <i>Leuconostoc</i> spp. en aguamiel.	38
4.8. Efecto de las cepas seleccionadas de <i>Leuconostoc</i> spp sobre las características físicas, químicas y sensoriales del pulque.....	38

4.8.1. Elaboración de pulque.....	38
4.8.2. Características físicas y químicas del pulque producido con cepas <i>Leuconostoc</i> spp. seleccionadas.....	39
4.8.2.1. pH	39
4.8.2.2. Acidez total titulable	39
4.8.2.3. Grados Brix.....	39
4.8.2.4. Densidad	39
4.7.2.5. Viscosidad	40
4.7.2.6. Alcohol	40
4.9. Análisis sensorial.....	40
4.10. Análisis estadístico.....	42
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
5.1. Cuantificación de BAL y detección de <i>Leuconostoc</i> spp.....	42
5.2. Identificación de <i>Leuconostoc</i> spp.	45
5.3. Tolerancia cepas <i>Leuconostoc</i> a medio fermentativo	46
5.4. Evaluación de la viscosidad generada por cepas de <i>Leuconostoc</i> seleccionadas en medio de cultivo.....	47
5.5. Evaluación de la viscosidad generada por cepas de <i>Leuconostoc</i> seleccionadas en aguamiel.	48
5.7. Análisis Sensorial.....	51
5.7.1 Prueba triangular.....	51
5.8 Prueba de Rangos	54
6. Conclusiones.....	56
7. BIBLOGRAFÍA	57
8.0. Anexos.....	65
Anexo 8.1	65
Anexo 8.2.....	66
Anexo 8.3	67

Índice de Tablas

Tabla 2.1. Composición de aguamiel según su tipo (NMX-V022-1972)	19
Tabla.2.2. Composición de pulque conforme a la (NMX-V-037-1972)	21
Tabla 4.1 Muestras de aguamiel, semilla y pulque dulce recolectadas de productores GP y APPA de julio 2020 a febrero 2021.	33
Tabla 5.1. Concentración promedio de BAL de aguamiel, semilla y pulque obtenidos de productores de GP (julio 2020-febrero 2021).	41
Tabla 5.2. Concentración de BAL expresada en Log UFC/mL de aguamiel, semilla y pulque obtenidos de productores de APPA (septiembre 2020-febrero 2021)	41
Tabla 5.3. Cepas identificadas como <i>Leuconostoc</i> spp. en aguamiel, semilla y pulque.	43
Tabla 5.4. promedio de viscosidad producida en medio con condiciones similares al aguamiel y en aguamiel	47
Tabla 5.5. Evaluación de las características físicas y químicas de los pulques obtenidos a partir de las bacterias inoculadas	49
Tabla 5.6 Resultados de la prueba triangular con las cepas seleccionadas e inoculadas en aguamiel del productor (GP y APPA)	50
Tabla 5.7 Moda de calificación en la prueba Hedónica con las cepas seleccionadas e inoculadas en aguamiel del productor (GP)	51
Tabla 5.8 Moda de la calificación en la prueba Hedónica con las cepas seleccionadas e inoculadas en aguamiel del productor (APPA)	51
Tabla 5.9 Moda de la valoración de la prueba de rangos con las cepas seleccionadas e inoculadas en aguamiel del productor (GP)	53
Tabla 5.10. Resultados de moda de la prueba de rangos con las cepas seleccionadas e inoculadas en aguamiel del productor (APPA)	53

Índice de Figuras

Figura 2.1 Planta de maguey	16
Figura 2.2. Vías metabólicas de la fermentación alcohólica en función del microorganismo. A) Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) en <i>S. cerevisiae</i> B) Etner-Doudoroff en <i>Z. mobilis</i> (Abdallah <i>et al.</i> , 2016).	23
Figura 2.3. Tipos de Fermentación de las BAL. heterofermentación y homofermentación.	25
Figura 2.4. Vías de fermentación para bacterias del género <i>Lactobacillus</i> (Gonzalez-Crespo, 2018).	25
Figura 2.5. Vías de fermentación para bacterias del género <i>Leuconostoc</i> (Munir <i>et al.</i> , 2019).	27
Figura 2.6. Estructura química del dextrano (De la cruz Noriega, 2019).	29
Figura 2.7. Fermentación acética (Rasheed, 20018).	30
Figura 5.1 Número de cepas aisladas a partir de aguamiel, semilla y pulque de acuerdo a su respuesta a la tinción Gram y la prueba de catalasa.	42
Figura 5.2. Densidad óptica alcanzada por cepas de <i>Leuconostoc</i> (GP)	44
Figura 5.3. Densidad óptica alcanzada por cepas de <i>Leuconostoc</i> (APPA).	45
Figura 5.4. Viscosidad generada por cepas de <i>Leuconostoc</i> seleccionadas en medio de cultivo.	46
Figura 5.5. Relación de la viscosidad del aguamiel con la viscosidad en el medio	48
Figura 5.6 Acidez, aroma, color, sabor, viscosidad y preferencia de pulque producido con las cepas de <i>Leuconostoc</i> seleccionadas.	52

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDAINTE

Declaro que los datos y resultaos que han surgido de esta investigación se obtuvieron durante el periodo que desarrollé este proyecto de tesis, con valores éticos y que posee los detalles necesarios para la reproducibilidad de los mismos en futuros proyectos.

Adicionalmente esta tesis es un trabajo original y conciso en cual declaro y doy consentimiento a cualquier colaborador o cita textual presentado en el manuscrito.



ATTE. LUIS MARTIN ORTIZ MATEOS

RESUMEN

El pulque es una bebida alcohólica fermentada ácida, de coloración blanca y aspecto viscoso con un porcentaje de alcohol entre 5 y 10 °GL. La transformación del aguamiel en pulque implica varias fermentaciones. En la fermentación alcohólica suelen participar levaduras, mientras que las bacterias ácido lácticas (BAL) transforman el azúcar en ácido láctico (fermentación láctica). Por su parte *Leuconostoc* spp., utiliza la sacarosa para sintetizar dextrano, que confiere al pulque su viscosidad. El objetivo de este trabajo fue aislar, identificar y seleccionar cepas de *Leuconostoc* spp. que puedan ser inoculadas en el pulque para lograr una viscosidad controlada. Se siguió el desarrollo de BAL a lo largo de la producción de pulque en Tlaxcala, México. De julio de 2020 a febrero de 2021 se aislaron cepas de BAL (324) del pulque dos productores (APPA y GP). De estas se identificaron 122 cepas como *Leuconostoc* por medio de la prueba de PCR. En un medio con condiciones similares al pulque (en caldo MRS con 9% de etanol, 2% de sacarosa, 3.5% de fructosa, 1.5% de glucosa; pH 4) se inocularon individualmente (5 log UFC/mL) de las cepas de *Leuconostoc* y se incubaron a 35°C/48 h para evaluar su desarrollo y tolerancia a las condiciones del medio; se seleccionaron 18 cepas. En un medio de cultivo similar al aguamiel (sin etanol) se evaluó la viscosidad generada por las cepas de *Leuconostoc* spp. seleccionadas. De este grupo, 8 cepas que generaron alta, intermedia y baja viscosidad en medio se evaluaron en aguamiel; dos cepas produjeron la mayor viscosidad: P12169 (1.41 cp en medio y 2.60 cp en aguamiel) y P18229 (1.40 cp en medio y 2.96 en aguamiel). Ambas cepas se utilizaron para producir pulque y realizar el análisis sensorial. Se inocularon 5 log UFC/mL de cada cepa de manera independiente en 4.5 litros de aguamiel y se fermentó a 25°C /10 h. Las bebidas generadas tuvieron buena aceptación por los expertos y la viscosidad fue la característica que más influyó en la aceptación. La inoculación de las cepas seleccionadas permite controlar las características de calidad y reducir los tiempos de fermentación. Esta información es de utilidad para los productores de pulque ya que permite la elaboración de una bebida de calidad.

Palabras clave: pulque, aguamiel, BAL, *Leuconostoc*, viscosidad.

ABSTRACT

Pulque is an acidic fermented alcoholic beverage, white in color and viscous in appearance with an alcohol percentage between 5 and 10 °GL. The transformation of mead into pulque involves several fermentations. Yeasts usually participate in alcoholic fermentation, while lactic acid bacteria (LAB) transform sugar into lactic acid (lactic fermentation). *Leuconostoc* spp., uses sucrose for the synthesis of dextran, which gives viscosity to pulque. The objective of this work was to isolate, identify and select strains of *Leuconostoc* spp. that can be inoculated in pulque to achieve a controlled viscosity. The growth of BAL was followed throughout pulque production in Tlaxcala, Mexico. From pulque samples collected from July 2020 to February 2021 from two small producers (APPA and GP), BAL strains (324) were isolated and selected. Of these, 122 strains were identified as *Leuconostoc* spp. by PCR test. Using a medium with similar conditions to pulque (MRS broth with 9% ethanol, 2% sucrose, 3.5% fructose, 1.5 % glucose; pH 4) strains were inoculated (5 log CFU/mL) and incubated at 35°C for 48 h to evaluate their growth ability and tolerance to the adverse conditions in the medium; 18 strains were selected. In a medium similar to mead (without ethanol), viscosity generated by selected *Leuconostoc* spp. strains was evaluated. Eight *Leuconostoc* spp. strains with high, medium and low viscosity generation in medium was evaluated in mead. Two strains generated high viscosity: P12169 (1.41 cp in medium and 2.60 cp in mead) and P18229 (1.40 cp in medium and 2.96 in mead). Both strains were used to produce pulque for sensorial evaluation. These two strains were individually inoculated (5 log CFU/mL) in 4.5 L of aguamiel each one and fermentation followed at 25°C for 10 h. The obtained beverages have good acceptance by experts and the pulque viscosity was the characteristic more associated to acceptance level. The application of selected strains in pulque production allows to control its quality and to reduce the fermentation period with benefits for the beverage and the pulque producers.

Key words: pulque, aguamiel, LAB, *Leuconostoc*, viscosity.

INTRODUCCIÓN

El pulque es una bebida fermentada alcohólica, que ha tenido gran relevancia para los mexicanos a lo largo de la historia y cuyo primer registro data de la época prehispánica (10,000 - 8,000 a.C.). Éste se elabora a partir de aguamiel de diferentes especies de maguey del género agave (Escalante *et al.*, 2016). El proceso inicia con la raspadura del cajete o cavidad central del maguey (NMX-V-037-1972), dando paso a la secreción del aguamiel (SEGOB, 1981), que es un jugo azucarado en el que se pueden encontrar aminoácidos, fructosa, glucosa y que tiene un pH casi neutro; un sustrato ideal para su fermentación por levaduras, bacterias etanólicas y lácticas. Éstas son inoculadas en el aguamiel de manera natural a través del polvo, insectos, por los mismos productores y sus instrumentos de trabajo (Castro-Díaz *et al.*, 2021), o por la adición de un inóculo iniciador llamado “semilla” o *xinaxtli*, cuyo origen dependerá del tipo de pulque que se quiera obtener (Ballesteros- Rodríguez *et al.*, 2021).

Hoy en día se sabe que existen diversos microorganismos que metabolizan los azúcares presentes en el aguamiel y producen varios procesos fermentativos; el primero de ellos es la fermentación alcohólica, en la que participan bacterias (*Zymomonas mobilis*) y levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). La primera sigue la vía *Etner-Doudoroff* y es la principal productora de alcohol en el pulque, mientras que *Saccharomyces cerevisiae* en una condición anaerobia utiliza la vía glicolisis para formar etanol (Ballesteros- Rodríguez *et al.*, 2021). La fermentación láctica se lleva a cabo por bacterias ácido lácticas (BAL) principalmente de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (Juárez *et al.*, 2021). Finalmente, la llamada fermentación viscosa se genera cuando algunas BAL del género *Leuconostoc*, además de ácido láctico, producen un polisacárido llamado dextrano a partir de la sacarosa, que al acumularse confiere la viscosidad al pulque (Giles *et al.*, 2016). La producción de este polímero dependerá de la concentración y capacidad de las cepas de *Leuconostoc* spp. presentes en el pulque, así como la cantidad de sacarosa contenida en el aguamiel y en el pulque. Entre mayor sea la viscosidad

en la bebida, tanto consumidores como productores asocian a una bebida de mejor calidad. La medición de la viscosidad se hace de manera empírica lanzando el último trago de la bebida a una superficie. Si la bebida no es viscosa, se formará sólo una línea recta, en cambio sí tiene buena viscosidad formará el famoso alacrán en la bebida.

En los procesos de elaboración del pulque no suele existir un control de *Leuconostoc* spp., ni se cuenta con cepas seleccionadas que puedan ser añadidas durante el proceso fermentativo y que por ende puedan contribuir a mejorar la viscosidad del producto. La mejora en el proceso y calidad de la bebida permitiría a los productores obtener un producto con mayor aceptación, lo que redundará en beneficios económicos y sociales para diversas comunidades productoras. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar, seleccionar e identificar cepas de *Leuconostoc* spp. responsables de la viscosidad en el pulque.

El trabajo se realizó en colaboración con los productores de pulque de Grupo Pulmex (GP), la Asociación de Productores de Pulque de Alzayanca (APPA) y la Secretaría de Fomento Agropecuario del estado de Tlaxcala (SEFOA).

ANTECEDENTES

2.1. Historia del pulque

De acuerdo a Escalante *et al.* (2016), el pulque ha tenido gran relevancia en México a lo largo de la historia. Los primeros registros de esta bebida datan de la época prehispánica (10,000- 8,000 a.C.). Posteriormente, la civilización de los aztecas nombró al pulque como *metoctli* (*metl* que tiene como significado agave o maguey y *octli* que hace referencia a vino), o *iztacoctlli* (donde: *izac* que hace referencia al color blanco) o *poliuhquioctli* (*poliuhquise*, que se puede interpretar como estropeado o podrido) (Rocha-Arriaga *et al.*, 2020).

Para la civilización azteca, el pulque era usado como una bebida ceremonial consumida por los sacerdotes, personas que iban a ser sacrificadas, guerreros, mujeres embarazadas (por su efecto en la producción de leche materna) y personas de la tercera edad, ya que ellos eran las personas más sabías. Después de la caída del imperio azteca, el pulque fue perdiendo el valor religioso que tenía y pasó a ser una bebida embriagante popular (Gonçalves de Lima, 1956; Rojas-Rivas *et al.*, 2019; Rocha- Arriaga *et al.*, 2020).

Posteriormente en la época de la colonia española (1521-1821), la producción de pulque fue una de las principales actividades económicas y la bebida alcohólica más popular, por lo que abundaron haciendas pulqueras (ranchos dedicados al cultivo de agave, producción de pulque y comercialización), manteniendo el proceso de producción casi intacto desde la caída del imperio azteca (Kepecs *et al.*, 2018; Álvarez Duarte *et al.*, 2018).

El pulque llegó a ser uno de los productos más consumidos por los españoles reduciendo las ventas de otros productos que ellos comercializaban, como el vino. Como consecuencia, la corona española prohibió la producción de pulque, así como otros subproductos del maguey, afectando a varios hacendados españoles que se dedicaban a esta labor. Al ver el efecto que causó en la

población, así como en su economía, las autoridades se vieron obligados a poner fin a la prohibición (Ballesteros-Rodríguez *et al.*, 2021).

En la actualidad el pulque es una bebida que ha retomado auge gracias a la promoción que se le ha dado con eventos culturales y ferias gastronómicas, principalmente. Se considera una de las bebidas mexicanas favoritas de los jóvenes y adultos, tanto por su sabor, como el misticismo que lleva este brebaje de los dioses (Echeverría, 2018). El incremento en el consumo y amor por la bebida por mexicanos y extranjeros ha llevado a la asociación nacional de pulquerías tradicionales, a crear una ruta de pulquerías y un museo del pulque para visitar en la ciudad de México y el estado de México (ANPT, 2020).

2.2 Importancia del pulque

Existen 210 especies de agaves en el mundo, teniendo México 79 especies endémicas distribuidas en casi todos los estados de la república (Vázquez-Pérez *et al.*, 2020). De éstas, cuatro son agaves pulqueros: *Agave atrovirens*, *A. americana*, *A. salmiana* y *A. mapisaga* (Reyes-Agüero *et al.*, 2019; Rojas-Rivas *et al.*, 2020). Éstas se encuentran distribuidas en varios estados de la república: Hidalgo (69.6%), Tlaxcala (24.5%), Puebla (4.1%), Estado de México (1.6%), Jalisco (0.1%), Guanajuato (0.02%) y San Luis Potosí (0.1%); generando una producción total anual de 186.3 millones de litros de pulque (SIAP, 2018).

SAGARPA (2017) realizó un estudio con la colaboración del Sistema Producto Agave Pulquero de Puebla A.C. y Notimex, en donde mencionan que aproximadamente se cultivan alrededor de 1,000 plantas por hectárea. Cada una de ellas puede producir alrededor de 1,000 litros del pulque a lo largo de su vida, estimando una producción de 1 millón de litros aproximados por hectárea.

2.3 Cultivo del agave pulquero

2.3.1. La planta

El maguey o agave pulquero pertenece a la familia *Agavaceae*; es una planta rosetófila (hojas en roseta). Ésta se divide en 2 subgéneros *Littaea* y *Agave*, que se pueden diferenciar por su inflorescencia. En el caso de *Littaea* tiene una inflorescencia espiciforme o racemosas. *Agave* presenta panículas con las flores agrupadas en umbelas laterales en donde se encuentra *A. mapisaga*, *A. atrovirens* y *A. americana* (Walker, 2019). Las hojas son densas o laxas, lineares, lanceoladas espatuladas u ovadas, acaules o arborescentes y con un ápice con una espina terminal o ligeramente endurecido. Éstas llegan a medir de 1.5 a 2 m de altura (Figura 2.1), contiene tallos principalmente gruesos, pero cortos; raíces fibrosas, las cuales se encuentran revestidas de escamas (Enríquez- del Valle *et al.*, 2021). Estas 4 variedades crecen en climas semi secos con altitudes de 1500 a 2000 m sobre el mar con una temperatura promedio de 22°C, la planta es monocárpica y produce un qurote en la parte central del maguey y puede medir aproximadamente 10 m y pesar 40 kilos, dependiendo de la variedad (Enríquez- del Valle *et al.*, 2021). Una vez alcanzada la madurez del maguey (15 a 30 años) brotan flores de color amarillo que serán que polinizadas por murciélagos, colibríes, mariposas nocturnas e insectos y darán como resultado la formación de semilla (Pérez *et al.*, 2017).



Figura 2.1 Planta de maguey

2.3.2 Propagación, plantación y prácticas culturales

El proceso de la plantación inicia cuando la planta llega a una maduración aproximada de tres a cinco años, que da como resultado la formación de hijuelos (pequeñas plantas del mismo clon), éstos no deben de contar con ninguna plaga y deben tener un peso de entre 1.5 a 3 kg. Se deben separar cortando el rizoma que une al hijuelo con la planta madre. Una vez finalizado este proceso se deben mantener al sol durante 10 días aproximados para la cicatrización de las heridas provocadas durante la extracción. La planta se debe establecer en hileras con una distancia de separación de 4 a 5 m entre hileras y de 3 m entre plantas (INIFAP, 2018).

El agave puede alcanzar hasta 3 m de altura con una circunferencia que puede llegar hasta 10 m, tardando aproximadamente de ocho a diez años para poder ser susceptible de producir aguamiel, dependiendo de la especie de agave y las condiciones ecológicas (Echeverría, 2018).

2.4 Elaboración de Pulque

El proceso de elaboración del pulque inicia con la raspadura del cajete o cavidad central del maguey, que induce el flujo de la savia como forma de cicatrización, acumulándose en la cavidad y dejando los vasos abiertos. Este paso se debe de repetir dos veces en el día, en la mañana y en la noche, evitando que cicatricen las paredes del cajete (NMX-V-037-1972; García-Arce *et al.*, 2021). El resultado del proceso será la producción de esta secreción llamada aguamiel (SEGOB, 1981), que es un jugo azucarado que sirve como sustrato para la fermentación de diversas bebidas. El aguamiel es succionado del cajete por el *tlachiquero* (persona que extrae aguamiel y realiza la mezcla para obtención de pulque), con la ayuda de un *acocote* (calabaza seca y hueca con dos orificios).

2.4.1 Composición del aguamiel

El aguamiel es la savia obtenida del maguey pulquero, está compuesta principalmente por 3.5 % de proteína, 3 % de cenizas, 61.3 % de azúcares reductores (fructosa principalmente). De acuerdo a la NMX-V-022 (1972), existen dos tipos de aguamiel el Tipo1 y Tipo 2. El Tipo1, es el aguamiel que contiene una cantidad mayor de azúcar y un pH neutro, con el que los diferentes microorganismos involucrados no se ven estresados y así puedan realizar más eficiente la fermentación. El aguamiel Tipo 2 contiene una cantidad menor de azúcar y un pH más bajo (Tabla 2). El agave maduro llega a producir aguamiel, que, dependiendo de la variedad, se pueden extraer de la planta de 4 a 6 L diarios durante un tiempo promedio de tres a seis meses; este periodo depende del proceso de raspado que se le aplique y lo intensivo de su producción. La cantidad máxima que producirá la planta puede variar de 800 a 1000 L a lo largo de su vida útil (Álvarez-Duarte *et al.*, 2018).

Tabla 2.1. Composición de aguamiel según su tipo (NMX-V022-1972)

Especificaciones	Tipo1		Tipo 2
	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	13	17	7
Azúcares reductores totales (en glucosa) g/100 mL	8	12	6
Azúcares reductores directos (en glucosa) g/100 mL.	2	3	3
Gomas (en Glucosa) g/ 100mL	2	6	0.2
Proteínas mg/100 mL	300	600	100
Cenizas mg/ 100 mL	300	430	180
Acidez mg/100 mL (como ácido láctico)	0.9	1.03	4.0

2.4.2 Proceso de elaboración y composición del pulque

El aguamiel es llevado al tinacal y colocada en tinas donde se produce la fermentación. Esta se realiza comúnmente de manera espontánea, gracias a que microorganismos fermentadores que ingresan a través de diversos vectores, como el polvo, insectos o los mismos productores y sus instrumentos de trabajo. O bien, mediante la adición de un inóculo iniciador llamado “semilla” o *xinaxtli*, que corresponde a un aguamiel previamente fermentado y seleccionado desde su extracción (aguamiel Tipo 1), con el fin de obtener una microbiota óptima para que la fermentación sea controlada; el periodo de fermentación puede variar de acuerdo a la temperatura y estación del año (Castro-Díaz et al., 2021).

El pulque Tipo 1 es aquel que se elabora a partir de la semilla (previamente descrita), mezclándola con la punta. La punta es aguamiel fermentada, que se obtiene de las primeras tinajas de desarrollo y su duración es de 1 a 5 semanas de fermentación, alimentándolo diariamente con aguamiel Tipo 2 hasta llegar a las características que marca la norma para ser comercializado (NMX-V-037-1972; *Castro-Díaz et al.*, 2021). Por su parte, el pulque Tipo 2, es el pulque con una fermentación espontánea, aproximadamente de 12 a 48 h y que se enriquece únicamente con aguamiel en un contenedor (*García-Arce et al.*, 2021; *Ruíz-Ramírez et al.*, 2022).

La transformación del aguamiel en pulque implica en realidad varias fermentaciones consecutivas (alcohólica, láctica, acética y viscosa), que dan como resultado una bebida ácida, de coloración blanca y aspecto viscoso, con un porcentaje de alcohol de entre 5 y 10° GL (*Ballesteros-Rodríguez et al.*, 2021). Esta bebida se compone principalmente por aminoácidos, sales, gomas, proteínas, aminoácidos y vitaminas (*Villareal et al.*, 2019).

Tabla.2.2. Composición de pulque conforme a la (NMX-V-037-1972)

Especificaciones	Pulque Tipo 1		Pulque Tipo 2	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Grado refractométrico (lectura tomada con refractómetro de inmersión) a 20 °C	32	345	25	0
Índice de refracción (lectura tomada con un refractómetro de inmersión) a 20 °C	1,3390	1,3406	1,3365	1,3380
pH	3.7	4.2	3.5	4
Acidez total (ácido láctico) g/100 mL.	0.4	0.75	0.4	0.7
Reductores totales (glucosa) g/100 mL	0.1	0.8	0.2	0.5
Grado alcohólico (% de alcohol por volumen)	6	9	4	0.6

2.5 Microbiología del pulque

2.5.1 Generalidades

Hoy en día se sabe que existen diversos microorganismos que se ven involucrados en la fermentación del aguamiel. Sánchez-Marroquín (1953) propuso un microbiota fundamentalmente compuesto por *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc mesenteroides*. Escalante *et al.* (2016) reportaron que durante la fermentación espontánea de esta bebida se presenta una diversidad de bacterias, como las ácido lácticas (BAL), entre las que se destaca *Lactobacillus acidophilus*, a quien se le atribuye actividad antagónica contra algunas bacterias y hongos patógenos (Villarreal *et al.*, 2019). No obstante, se desconoce cómo las poblaciones cambiantes de microorganismos

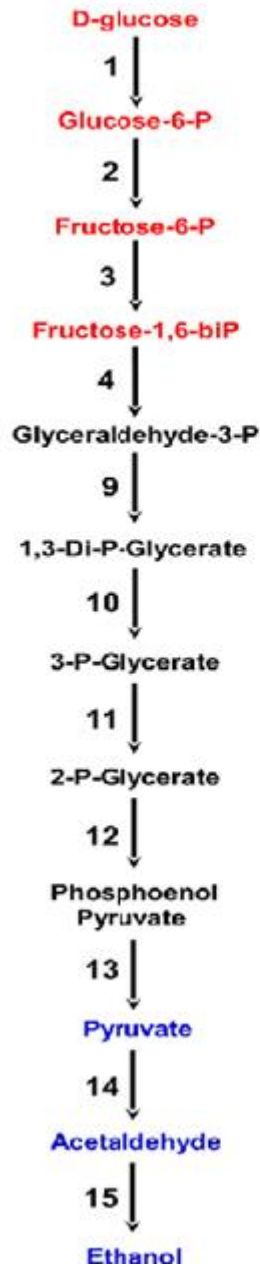
fermentativos inciden sobre algunos metabolitos específicos que se generan durante la fermentación.

Algunas levaduras como *S. boulardii* y *S. cerevisiae*, también se consideran probióticas debido a que liberan poliaminas, que estimulan la reparación de las células intestinales y de la mucosa del colon (Pomeroy et al., 2021). Sin embargo, hasta la fecha no se cuenta con evidencias científicas del potencial probiótico de los microorganismos presentes en el pulque, fundamentalmente en lo que se refiere a su capacidad antagónica contra patógenos de humanos, como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes* y cepas patógenas de *Escherichia coli*.

2.5.2 Fermentación alcohólica

En la fermentación alcohólica del aguamiel, participan *Zymomonas mobilis* y *S. cerevisiae*, siendo la primera la principal productora de alcohol en el pulque (Robles et al., 2021). Para ello, *Z. mobilis* utiliza la vía Etner-Doudoroff para la glucólisis (Figura 2.2b) obteniendo piruvato, el cual es utilizado para la formación de etanol, polímeros, carotenoides, CO₂, biosíntesis de aminoácidos, entre otros (Zurita, 2021). Por su parte, *S. cerevisiae* utiliza la vía Embden–Meyerhof-Parnas para la glicolisis y ulterior formación de etanol (Figura 2.2a) (Ballesteros-Rodríguez et al., 2021).

Embden-Meyerhof-Parnas pathway
in *Saccharomyces cerevisiae*



Entner-Doudoroff pathway
in *Zymomonas mobilis*

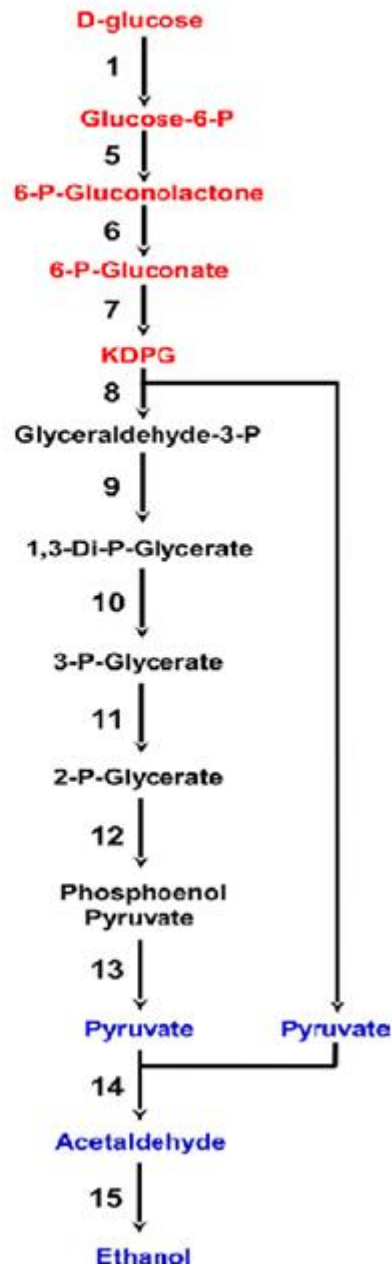


Figura 2.2. Vías metabólicas de la fermentación alcohólica en función del microorganismo. A) Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) en *S. cerevisiae* B) Etner-Doudoroff en *Z. mobilis* (Abdallah *et al.*, 2016).

2.5.3. Fermentación láctica

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un conjunto de microorganismos que transforman los azúcares en ácido láctico y pueden ser cocos o bacilos Gram positivos (Contreras-López *et al.*, 2021). Éstas son principalmente mesófilas, pero algunas de ellas tienen la capacidad de desarrollar a temperaturas de 5° C o hasta 45 °C. Su pH óptimo suele estar en rangos que van de 4 a 4.5, aunque se ha descrito que pueden crecer incluso con un pH más bajo (Granados *et al.*, 2019). La característica principal que tiene estas bacterias, es que producen ácido láctico como el principal metabolito proveniente de fermentación y se pueden clasificar en dos tipos de acuerdo a cómo metabolizan la glucosa y el tipo de ácido que producen, definiéndolas como heterofermentativas y homofermentativas (Figura 2.3).

Entre las BAL heterofermentativas se encuentran principalmente aquellas del género *Oenococcus*, *Weissella*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, siendo estas últimas las de mayor presencia en el pulque (Gaur *et al.*, 2020). Estas bacterias degradan la glucosa para la obtención ácido láctico, ácido acético, etanol, CO₂ y degradan también pentosas para formar ácido láctico y ácido acético únicamente. Las homofermentativas realizarán un proceso similar con las pentosas, pero con las hexosas sólo formarán sólo ácido láctico y en algunos casos CO₂. Entre éstas se encuentran especies de los géneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pedicoccus* y *Lactobacillus* (Gaur *et al.*, 2020). Las distintas rutas metabólicas de la fermentación láctica se ilustran en la Figura 2.3.

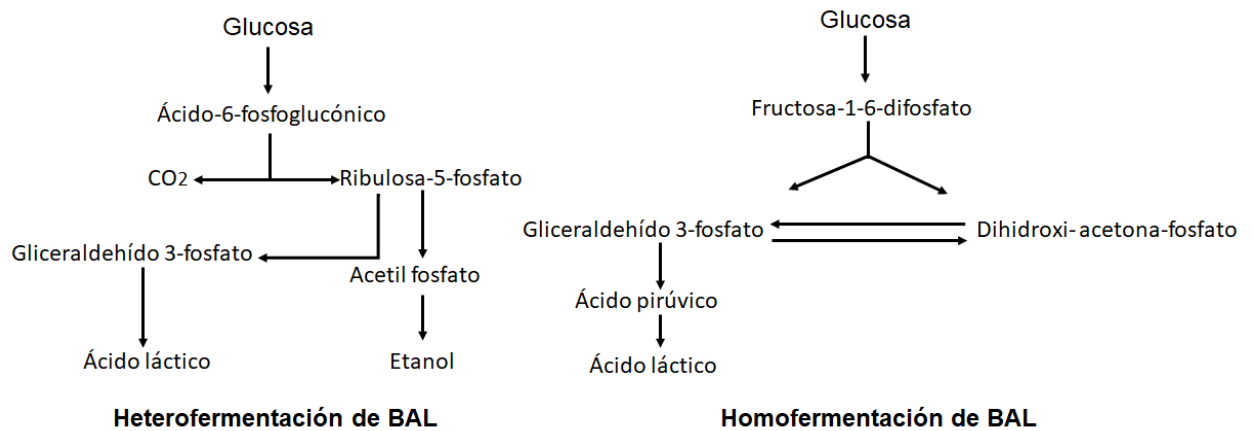


Figura 2.3. Tipos de Fermentación de las BAL. Heterofermentación y homofermentación.

Dentro del género de *Lactobacillus* existen especies heterofermentativas y homofermentativas, que pueden encontrarse en los alimentos. Las especies heterofermentativas en una condición aeróbica que además de producir lactato, también produce ácido acético (Jia *et al.*, 2021) (Figura 2.4).

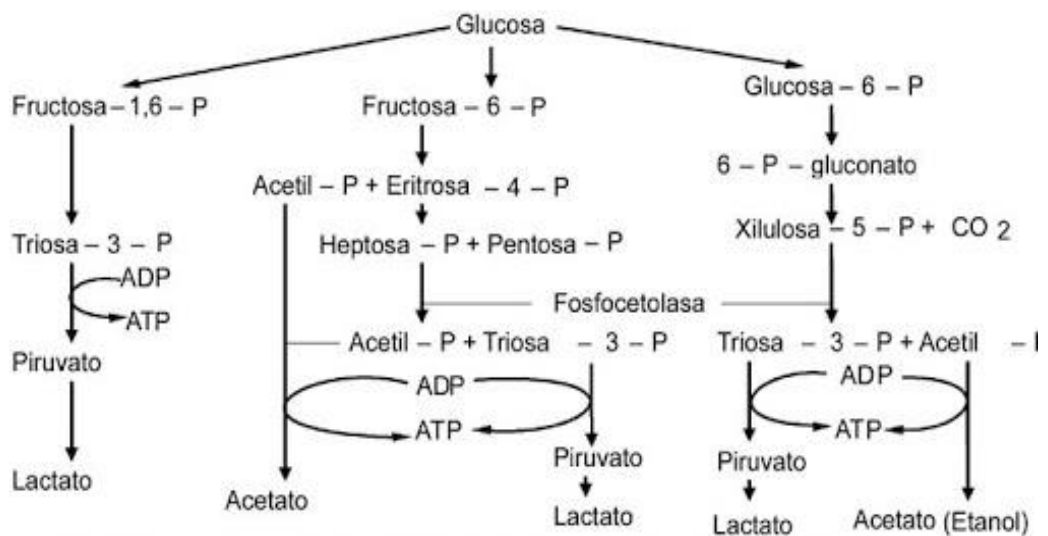


Figura 2.4. Vías de fermentación para bacterias del género *Lactobacillus* (Gonzalez-Crespo, 2018).

Por otro lado, el género *Leuconostoc* también realiza en condiciones anaeróbicas un metabolismo heterofermentativo, partiendo de glucosa como sustrato hasta llegar a lactato gracias a la enzima lactato deshidrogenasa.

El aguamiel contiene aproximadamente 12.9 gramos de sacarosa, 28.7 de glucosa y 32.6 de fructosa (Vicente-Magueyal *et al.*, 2020) que pueden ser empleados por la bacteria mediante una vía alterna que tiene un proceso similar al del glucolisis, a partir de glucosa 6 fosfato (producto obtenido de a través de una fosforilasa y una mutasa) hasta formar lactato (Vicente-Magueyal *et al.*, 2020) (Figura 2.5).

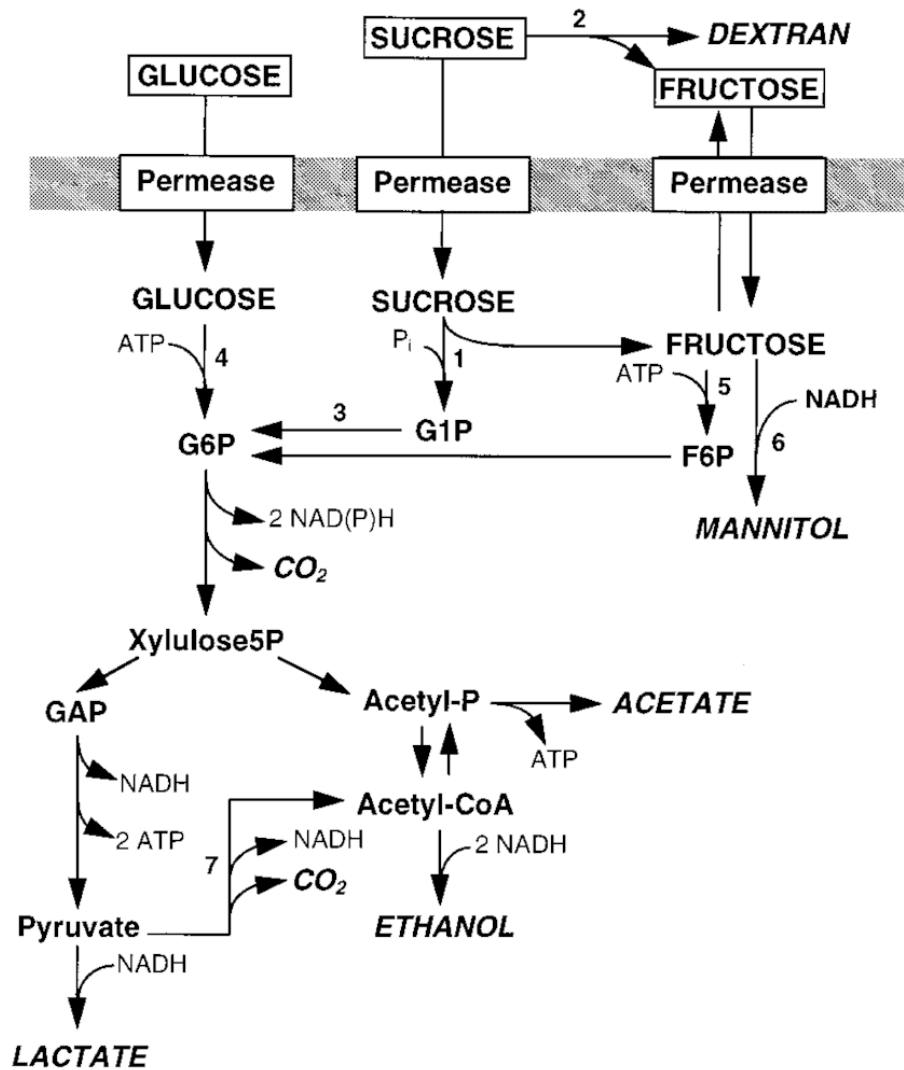


Figura 2.5. Vías de fermentación para bacterias del género *Leuconostoc* (Munir *et al.*, 2019).

2.5.4. Viscosidad en el pulque

Existen diferentes tipos de BAL que son capaces de producir exopolisacáridos, que pueden secretar directamente al medio o bien, lo pudieran tener adherido a la pared celular bacteriana (Vidaurre- Ruíz *et al.*, 2019). Estos pueden estar estructurados como homopolisacáridos o heteropolisacáridos. Los homopolisacáridos contienen un tipo de molécula de azúcar y los

heteropolisacáridos se componen de diferentes monómeros de azúcar (Zehir Şentürk *et al.*, 2020). Las características de aroma, sabor y textura de los polisacáridos estarán influenciadas por el tipo de unidades de azúcar que lo conforman, así como del tipo de enlaces glucosídicos que contengan (Ruíz-Rodríguez *et al.*, 2019).

Algunas especies de *Leuconostoc*, como *L. mesenteroides*, una vez terminada la fermentación láctica y al haber un exceso del sustrato natural sacarosa, secreta una enzima llamada dextransacarasa, la cual se encarga de sintetizar dextrano. Este es un homopolisacárido complejo y ramificado formado por numerosas moléculas de glucosa producidas por fermentación o de manera enzimático, en el que α -D glucosa, se une por enlaces glucosídicos, constituido en un 50 % de su enlace principal α 1,6 (1,6- α -glucano) y ramificaciones tipo α -(1-2); α -(1-3) y α -(1-4), mediante energía producida entre los enlaces que unen las moléculas de glucosa y fructosa que son utilizados en presencia de aceptores como maltosa o isomaltosa, para sintetiza este polímero (Ruíz-Rodríguez *et al.*, 2019). Este polímero fue aislado por primera vez en 1906 por Scheiber, el cuál fue utilizado para uso farmacéutico como expansor de volumen del plasma sanguíneo y promotor del flujo de sangre (Chia *et al.*, 2019).

En estudios realizados en el estado de Hidalgo se han reportado la detección y caracterización de dextranos producidos por *L. citreum* y *L. Kimchii* presentes en aguamiel, que al acumularse confieren al pulque su viscosidad (Escalante *et al.*, 2016). No obstante, se sabe que la diversidad de especies y cepas, las proporciones y papeles que ejercen durante la fermentación, varía ampliamente entre regiones y productores, a la par con las condiciones óptimas, requerimientos físicos, químicos y nutritivos de los microorganismos que participan (Escalante *et al.*, 2016).

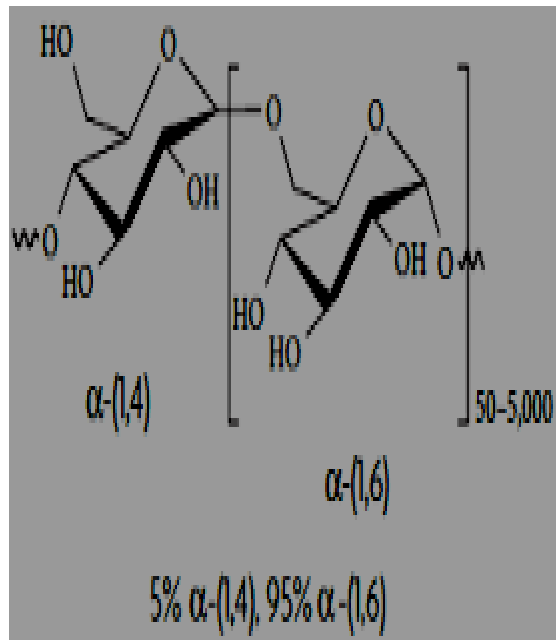


Figura 2.6. Estructura química del dextrano (De la cruz Noriega, 2019).

2.5.5. Fermentación acética

Consiste en la producción de ácido acético, principalmente mediante la oxidación del alcohol producido después de la fermentación alcohólica (Figura 2.7). Las bacterias acéticas convierten el etanol en acetaldehído gracias a la enzima deshidrogenasa. Posteriormente este metabolito se hidrata, para después oxidarse con la enzima acetaldehído deshidrogenasa, dando como resultado ácido acético (Cheng *et al.*, 2021).

Las bacterias acéticas, son un grupo de bacterias aerobias obligadas, Gram negativas, que producen ácido acético a partir de alcoholes o azúcares. Pertenecen a la familia Acetobacteraceae que cuenta con 47 géneros. Las especies que principalmente se reportan en bebidas fermentadas pertenecen a los géneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Gluconoacetobacter* (Kim *et al.*, 2019).

Villareal *et al.* (2019) registraron la presencia de la bacteria acética *A. orientalis* (17BI) en aguamiel.

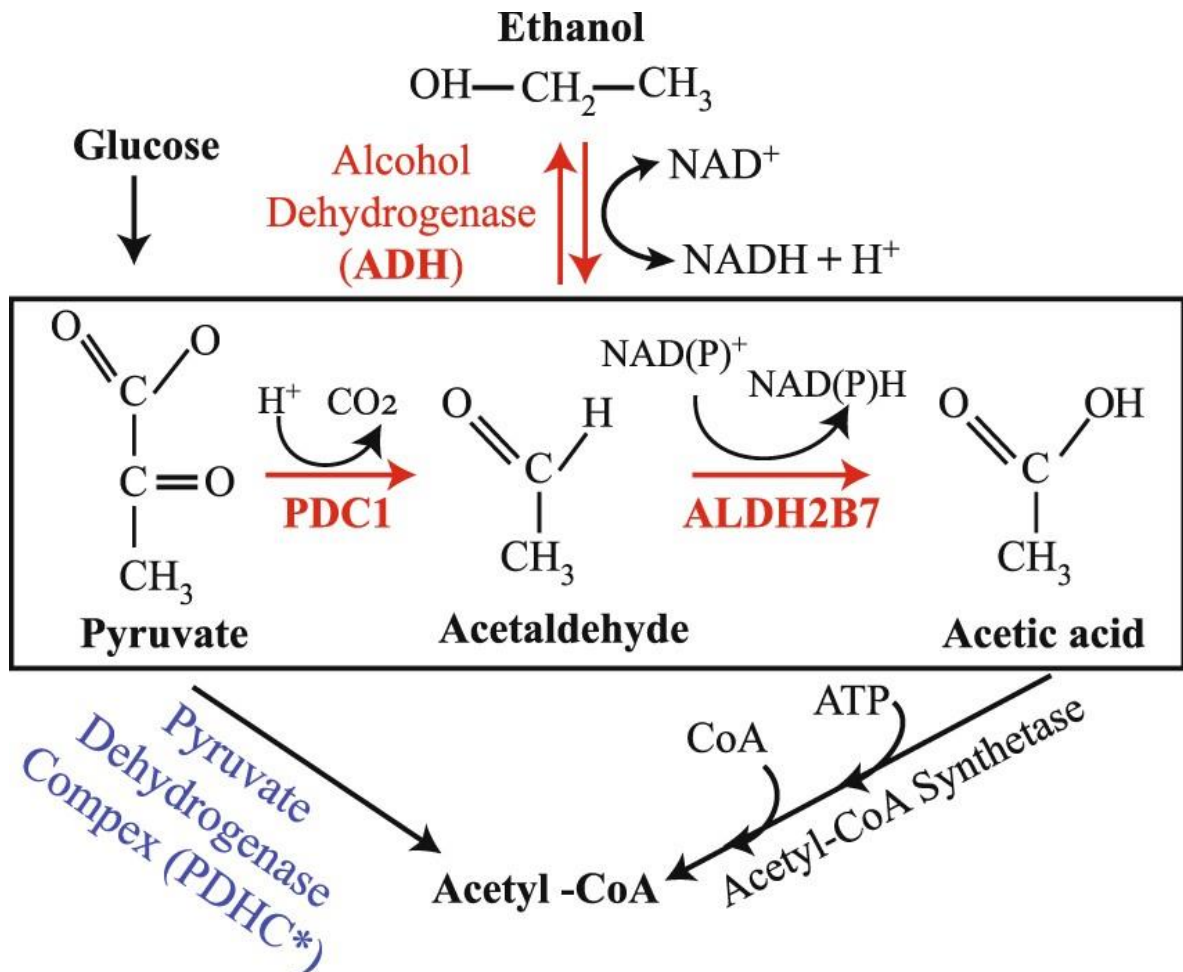


Figura 2.7. Fermentación acética (Rasheed, 20018).

La información incluida en los antecedentes de este trabajo constituye una base indispensable como referencia para conocer las diferentes etapas que conlleva el producir pulque. Iniciando con la plantación y maduración que lleva la planta para producir aguamiel o los procesos bioquímicos que ocurren durante la fermentación y que muchas veces no se tienen contempladas por los agricultores y que puede ser el inicio para generar pulque con características homogéneas y controladas. El uso de microorganismos seleccionados en los procesos de fermentación ha sido una estrategia que ha abonado a la estandarización y tipicidad en otras bebidas.

3. OBJETIVOS

General

Aislar, identificar y seleccionar cepas de *Leuconostoc* spp que intervienen en la fermentación viscosa en el pulque.

Específicos

1. Determinar la evolución de las poblaciones de BAL y aislar cepas de *Leuconostoc* spp. durante el proceso de elaboración del pulque de productores del estado de Tlaxcala.
2. Seleccionar cepas de *Leuconostoc* spp. que muestren capacidad de producir dextranos y viscosidad mediante estudios *in vitro* en medio de cultivo y durante la elaboración de pulque a escala laboratorio
3. Evaluar el efecto de las cepas seleccionadas de *Leuconostoc* spp sobre las características físicas, químicas y sensoriales del pulque.

4. METODOLOGÍA

4.1 Localización del sitio experimental

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Fermentaciones y Fisiología de Frutos de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química y en explotaciones de pulque establecidas en el Estado de Tlaxcala. El trabajo se realizó en colaboración con los productores de pulque de Grupo Pulmex (GP), la Asociación de Productores de Pulque de Alzayanca (APPA) y la Secretaría de Fomento Agropecuario del estado de Tlaxcala (SEFOA).

4.2. Obtención de muestras de aguamiel, semilla y pulque

Conforme a disponibilidad con los productores, se recolectaron de julio 2020 a febrero 2021 30 muestras de tres tipos (Tabla 4.1.):

1) Aguamiel, 2) Semilla (inóculo joven), 3) Pulque dulce (pulque con aguamiel).

De cada tipo de muestra se tomaron 300 mL que se colocaron en bolsas de poliestireno. Cada muestra se transportó a 4 °C durante 4 horas de Tlaxcala hasta el laboratorio para el análisis físico, químico y microbiológico.

En el caso del pulque, se tomaron muestras de dos tipos de productores representativos de cada gama:

- 1 Gama media: Comercialización a nivel nacional a granel (GP)
- 2 Gama baja: Comercialización local a granel (APPA)

Tabla 4.1 Muestras de aguamiel, semilla y pulque dulce recolectadas de productores GP y APPA de julio 2020 a febrero 2021.

Tipo de muestra	Número de muestras	Periodo	Productor
Aguamiel	2	Julio-agosto 2020	GP
Semilla	2	Julio-agosto 2020	GP
Pulque dulce	2	Julio-agosto 2020	GP
Aguamiel	2	Septiembre-octubre 2020	GP
Semilla	2	Septiembre-octubre 2020	GP
Pulque dulce	2	Septiembre-octubre 2020	GP
Aguamiel	1	Septiembre 2020	APPA
Semilla	1	Septiembre 2020	APPA
Pulque dulce	1	Septiembre 2020	APPA
Aguamiel	2	Noviembre-diciembre 2020	GP
Semilla	2	Noviembre-diciembre 2020	GP
Pulque dulce	2	Noviembre-diciembre 2020	GP
Aguamiel	1	Diciembre 2020	APPA
Semilla	1	Diciembre 2020	APPA
Pulque dulce	1	Diciembre 2020	APPA
Aguamiel	1	Febrero 2021	GP
Semilla	1	Febrero 2021	GP
Pulque dulce	1	Febrero 2021	GP
Aguamiel	1	Febrero 2021	APPA
Semilla	1	Febrero 2021	APPA
Pulque dulce	1	Febrero 2021	APPA
Total	30		

4.3. Cuantificación de BAL y detección de *Leuconostoc* spp.

A partir de muestras de aguamiel, semilla y pulque se realizaron diluciones decimales seriadas y se sembraron por extensión en superficie en agar MRS (DIFCO® Fisher Scientific, Madrid, España). Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h. Posteriormente se realizaron los recuentos y de cada placa en el rango contable (30 – 300) y se aislaron, mediante estría cruzada, aproximadamente el 5 % de colonias con morfología colonial diferenciable. Se realizó a partir de las colonias aisladas, una prueba de catalasa que consistió en colocar una colonia en un portaobjetos y agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 3% (si la colonia burbujeaba es catalasa positiva, de lo contrario es negativa). También se realizó una prueba de tinción Gram colocando una colonia previamente seleccionada en un portaobjetos, se añadió 1 gota de violeta de genciana durante 1min, se lavó con agua destilada y se agregó una gota de

yodado lugol durante un minuto (nuevamente se lavó). Posteriormente se agregó una gota de etanol acetona durante 20 seg (se lavó), se adicionó una gota de safranina por 1 min, se lavó y se observó en microscopio, para verificar su morfología celular y catalogarlas como BAL. Aquellas con morfología cocácea, se purificaron repitiendo la resiembra en dos ocasiones en agar MRS con 20% sacarosa (Giles *et al.*, 2016). Se conservaron en tubos eppendorf (80% caldo MRS y 20% glicerol) a -20°C.

Para confirmar la identificación de los aislamientos como pertenecientes al género *Leuconostoc* se realizó una amplificación mediante PCR empleando los iniciadores y condiciones previamente reportados por Macian *et al.* (2004). Para ello, se extrajo el ADN de las bacterias seleccionadas mediante tinción Gram y la prueba de catalasa, obteniendo 1 mL de biomasa centrifugada a 12,000 rpm durante un minuto, la biomasa se resuspendió en buffer TNES (300 µl) y se homogenizó con vórtex. Esta mezcla se calentó por 10 minutos en un termobloque a 95 °C. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 12,000 rpm, recuperando el sobrenadante (aproximadamente 300 µL). A esto se le agregó 90 µL de acetato de sodio y se incubó 10 minutos a -20°C. Pasado el tiempo se centrifugó 1 minutos a 12,000 rpm, eliminando el pellet. Se añadieron 400 mL de isopropanol, dejándolo reposar 10 minutos a -20°C. Después se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm eliminando el sobrenadante. El pellet se suspendió en etanol al 70 %, se agitó suavemente y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó 5 minutos a 12,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar en un termobloque a 60 °C. El material genético se suspendió en buffer TE y se congeló a -20° C para su uso posterior.

El ADN de cada cepa se amplificó mediante PCR empleando los iniciadores LeucA (5'- CAC TTT GTC TCC GAA GAG-3) y LeucS (5'-AAG CAG TGT TGT ATG GGA-3) a una concentración de 1 µM, con una mezcla de reacción GoTaq® Master Mix (Promega) y 1 µL del ADN. La amplificación se llevó a cabo mediante una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos y 35 ciclos de: 30 segundos a

94 °C, 56 °C por 45 s, 45 s a 72°C, y una elongación final de cinco min a 72 °C. Los productos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en cámara horizontal (HE99XPZ9), utilizando 6 µl deL ADN extraído y 1 µL de buffer de carga en un gel de 1.8 % de agarosa y amortiguador TBE a 100 V durante 40 min y se reveló el gel en un transiluminador Hoeffler, las cepas identificadas fueron conservadas para siguientes estudios a -20°C en tubos eppendorf (80% caldo MRS y 20% glicerol) en el laboratorio de fermentaciones .

4.4. Activación de cepas Las cepas obtenidas de la identificación mediante la amplificación PCR fueron activadas de manera independiente mediante 2 resiembras sucesivas en caldo MRS (30 °C/24 h). El último cultivo se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en diluyente de peptona (0.1 gr/L) y se conservó a 5°C para su uso posterior.

4.5. Tolerancia cepas *Leuconostoc* a medio fermentativo

Las cepas confirmadas por PCR como *Leuconostoc* spp., se activaron y lavaron (sección 4.4); posteriormente, se inocularon de manera individual en una micro placa (5 Log UFC/mL) y por triplicado en un medio selectivo (300 µL) que consistió en caldo MRS con 9% de etanol, 2% de sacarosa, 3.5% de fructosa, 1.5% de glucosa y pH 4; los cultivos se incubaron a 35°C durante 48 h y se midió la densidad óptica a las 0, 4, 7 y 24 h mediante el equipo Varioskan™ (Thermo Scientific, Lux multimode microplate).

4.6 Evaluación de la viscosidad generada por cepas de *Leuconostoc* seleccionadas en medio de cultivo.

Las cepas seleccionadas de acuerdo a su a su capacidad para desarrollar en medio con azúcares, etanol y bajo pH (sección 4.5), se activaron y lavaron como se describió previamente (sección 4.4) y se utilizaron para esta evaluación. Se elaboró un medio con condiciones similares al aguamiel, en caldo MRS con 2% de sacarosa, 3.5% de fructosa, 1.5% de glucosa y pH 4. De manera individual las

cepas seleccionadas, se inocularon (5 Log UFC/mL) en 50 mL de este medio y se incubaron a 35°C durante 7 días. Se determinó la viscosidad mediante un viscosímetro rotacional (Brookfield DVE-Amatek) a 86.5 rpm, un torque de 17 % durante 3 minutos.

4.7. Evaluación de la viscosidad generada por cepas de *Leuconostoc* spp. en aguamiel.

Las cepas que mostraron la habilidad de producir dextrano en medio de cultivo se emplearon para esta evaluación. Se utilizó aguamiel de GP (50 mL) previamente esterilizada en matraces de vidrio, se le inocularon 6 Log UFC/mL de cada cepa por triplicado. Los aguamieles inoculados se incubaron a 25 °C por dos días, tras los cuales se determinó la viscosidad del pulque empleando un viscosímetro rotacional (Brookfield DVE-Amatek), añadiendo 30 mL de la muestra por triplicado a 86.5 rpm y un torque de 17 % durante 3 minutos.

4.8. Efecto de las cepas seleccionadas de *Leuconostoc* spp sobre las características físicas, químicas y sensoriales del pulque.

4.8.1. Elaboración de pulque

Se emplearon las cepas de *Leuconostoc* spp. que produjeron mayor viscosidad en aguamiel (sección 3.6). Éstas activaron en 300 ml de caldo MRS, que se incubó a 25°C durante 24 h. Posteriormente, el inóculo se centrifugó a 12,000 G, se retiró el líquido y se le añadió 30 ml de solución salina para lavar el excedente de medio de cultivo, repitiendo este proceso en dos ocasiones. Finalmente, se centrifugó una última vez y el pellet fue transportado a Tlaxcala a 4 °C. Una vez en la pulquería, el pellet de bacterias se suspendió en 500 ml de aguamiel de manera individual [4 bacterias con aguamiel de Altzayanca (APPA) y 4 bacterias con el aguamiel de Nanacamilpa (GP)], para ser inoculado posteriormente en 4.5 L de aguamiel y dejar fermentar durante 10 h (Pulque tipo 2). Al final de la fermentación, se evaluaron las características físicas, químicas y sensoriales de las bebidas obtenidas.

4.8.2. Características físicas y químicas del pulque producido con cepas *Leuconostoc* spp. seleccionadas

En muestras de pulque se determinó el pH, acidez total titulable, grados Brix, densidad, viscosidad y alcohol.

4.8.2.1. pH

El pH se midió directamente en 20 mL del producto utilizando un potenciómetro (Conductronic, pc 45) previamente calibrado.

4.8.2.2. Acidez total titulable

Se utilizaron 20 mL de muestra, se agregaron 8 gotas de fenolftaleína y se tituló con solución 0.1 N de hidróxido de sodio, hasta color rosado permanente. Se calculó la acidez como porcentaje de ácido láctico mediante la siguiente ecuación:

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

- A.T. = Acidez total expresada en gramos de ácido láctico por 100 mL de muestra.
- V = Mililitros 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 = Mililitros de muestra empleados en la determinación.

4.8.2.3. Grados Brix

Se empleo un refractómetro portátil Atago®. Se colocó 1 mL de agua destilada en el aparato para calibrar, posteriormente se secó y se añadió 1 mL de la muestra, registrando el resultado.

4.8.2.4. Densidad

Se realizó por picnometría inicialmente y sin muestra en el picnómetro. Se agregó la muestra y nuevamente se pesó. Se calculó la densidad con la siguiente ecuación:

$$D = \frac{P.F. - P.I.}{V}$$

En donde:

- D= Densidad
- P.F.= Peso Final
- P. I.= Peso Inicial
- V= Volumen

4.7.2.5. Viscosidad

Se utilizaron 20 mL de cada muestra en el viscosímetro Brookfield DVE-Amatek, a 86.5 rpm con un torque de 17% durante 3 minutos.

4.7.2.6. Alcohol

Se determinó destilando 50 mL del producto. El resultado del producto destilado se aforó con agua destilada a 50 mL, manteniendo una temperatura de 20 °C. Se colocó una gota en el prisma del refractómetro Atago® y se observó contra luz para leer los resultados.

4.9. Análisis sensorial

Se realizaron pruebas triangulares (Anexo 1 y 2) y pruebas de preferencia [hedónica (Anexo 3) y de rangos (Anexo 4)] a 8 panelistas expertos (4 hombres y 4 mujeres) en la bebida de pulque (productores de pulque).

Las pruebas triangulares consistieron en darles a los panelistas 8 rondas de 3 vasos de 5 mL de pulque, dos de ellos con pulque control y el otro con pulque Tipo 2 inoculado con diferente bacteria. Cada panelista debía escribir cuál de los 3 vasos fue diferente. El pulque control consistió en pulque Tipo 2 de Alzayanca o pulque Tipo 2 de Nanacamilpa según correspondía. De acuerdo a Manfugás

(2020) para saber si la hipótesis es aceptada o rechazada se utilizó la siguiente fórmula:

$$Z = \frac{[(X1 - 0.5) - NP]}{\sqrt{NP(1 - P)}}$$

En donde:

- Z= Score <1.65 provee de evidencia a favor de la hipótesis nula.
- N= Número de respuestas.
- X= Número de respuestas correctas.
- P= Probabilidad de decisión {1/3}
- Q= 1-p

H₀= No se percibe una diferencia sensorial entre los productos.

H₁= Si se percibe una diferencia sensorial entre los productos.

Para la prueba hedónica se proporcionaron 10 vasos de 5 mL, 8 de estos con bacterias inoculadas en pulque Tipo 2 (4 con aguamiel de Alzayanca y 4 con aguamiel de Nanacamilpa) y 2 vasos con pulques Tipo 2 (Aguamiel de Alzayanca y Nanacamilpa). Los panelistas calificaron del 1 al 4, donde 1 representó me gusta mucho y 4 me disgusta mucho. En relación a los diferentes aspectos sensoriales como aroma, sabor, acidez, viscosidad y preferencia de consumo, escribieron su opinión acerca de la bebida.

En la prueba de rangos se les pidió que contestaran simultáneamente junto con la prueba hedónica. Cada panelista enumeró del 1 al 10 las bebidas entregadas en la prueba hedónica, donde 1 era la bebida que prefería el panelista teniendo en consideración todas las características sensoriales y 10 la peor.

4.10. Análisis estadístico

Para todos los experimentos que involucraron inoculación de cepas de *Leuconostoc*, se aplicó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones en arreglo unifactorial, siendo el factor a evaluar las cepas de *Leuconostoc*.

Las variables respuesta fueron la DO máxima, las características físicas y químicas de calidad, así como la viscosidad, según correspondió en cada experimento. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de medias de Tukey para determinar diferencias entre las cepas. Todos los análisis se ejecutaron empleando el programa R (versión 4.1.3).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Cuantificación de BAL y detección de *Leuconostoc* spp.

Debido a que el pulque de GP presenta mayor viscosidad comparado con el de APPA, se decidió realizar más muestreos con el primero. Por ello, se realizaron muestreos de julio a febrero con GP, mientras que de APPA se llevaron a cabo en septiembre, diciembre y febrero. Se observó que en noviembre y diciembre se presentó una mayor concentración en la población de BAL (Tablas 5.1. y 5.2.), es posible que, a temperaturas templadas como las que se presentan en julio haya mayor crecimiento de diversos tipos de bacterias que compiten por los nutrientes y espacio; mientras que en temperaturas bajas se ven favorecidas las BAL por su capacidad para desarrollar a bajas temperaturas (psicotrofas).

Tabla 5.1. Concentración promedio de BAL de aguamiel, semilla y pulque obtenidos de productores de GP (julio 2020-febrero 2021).

	Julio- Agosto 2020	Septiembre-octubre 2020	Noviembre-Diciembre 2020	Febrero 2021
Muestra	Concentración (log UFC/mL)			
Aguamiel	4.7± 0.64	3.55 ± 2.61	6.45 ± 0.07	4.4 ± 0.10
Semilla	4.9 ± 0.70	4.85 ± 0.77	6.35 ± 0.07	4.1 ± 0.11
Pulque	4.7 ± 0.84	4.8 ± 0.84	5.8 ± 0.70	4.3 ± 0.32

± Promedio de las concentraciones de BAL analizadas en cada periodo por triplicado ± desviación estándar

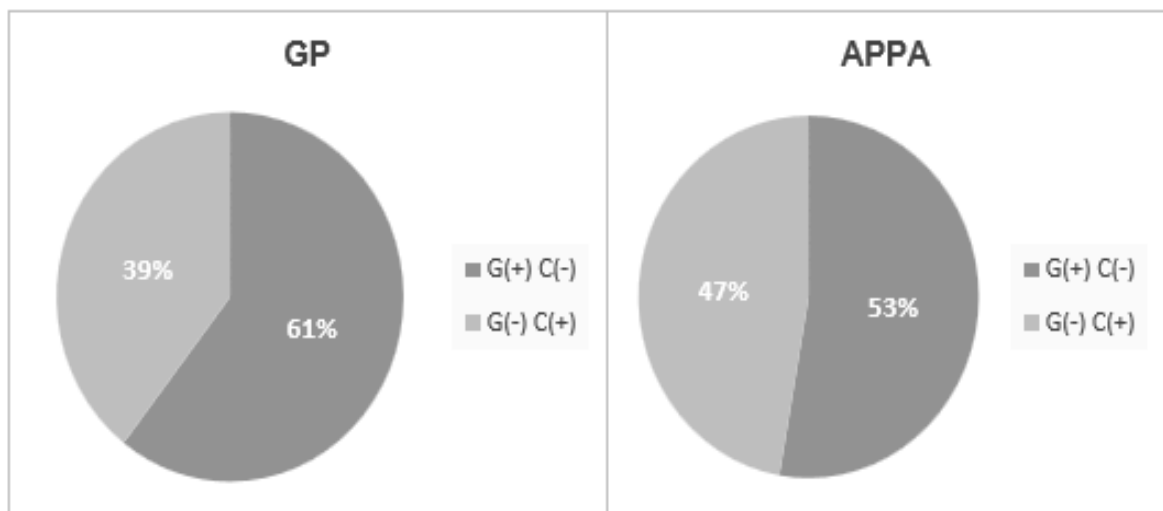
Tabla 5.2. Concentración de BAL expresada en Log UFC/mL de aguamiel, semilla y pulque obtenidos de productores de APPA (septiembre 2020-febrero 2021)

	Septiembre 2020	Diciembre 2020	Febrero 2021
Muestra	Concentración (log UFC/mL)		
Aguamiel	1.8 ± 0.14	6.2± 0.26	4.3± 0.37
Semilla	4.1± 0.17	6.2± 0.32	4.0± 0.21
Pulque	4.1± 0.34	5.0± 0.16	4.2± 0.10

± Promedio de las concentraciones de BAL analizadas en cada periodo por triplicado ± desviación estándar

Álvarez-Ríos *et al.*, (2020) reportaron concentraciones de BAL de 8.5 Log UFC/ml en pulque producido en Michoacán, cuando se partió de aguamiel con concentraciones de 7.5 Log UFC/ml de BAL y 9.8°Bx. En otro reporte de pulque elaborado en Oaxaca se encontraron concentraciones de BAL entre 7.8 y 11.4 Log UFC/ml empleando aguamiel que contenía entre 7.8 y 9.6 Log UFC/ml y con alrededor de 10°Bx (Valadez-Blanco *et al.*, 2012).

Se reconoce que la producción de pulque está sujeta a una gran variabilidad (Valadez-Blanco *et al.*, 2012). La concentración final de las poblaciones microbianas en el pulque puede estar influenciada por diversos factores, incluyendo el tipo y concentración de microorganismos presentes, la temperatura de fermentación y la composición del aguamiel.



Del total de muestras de aguamiel, semilla y pulque se aislaron 324 cepas de BAL (Gram positivas y catalasa negativa), las cuales representaron en conjunto el 61% de los aislados obtenidos de muestras de pulque de GP y el 53% de los aislados de muestras de APPA (Figura 5.1)

Figura 5.1. Porcentaje de cepas aisladas a partir de aguamiel, semilla y pulque de acuerdo a su respuesta a la tinción Gram y la prueba de catalasa.

5.2. Identificación de *Leuconostoc* spp.

Una vez diferenciadas por morfología se realizó extracción de ADN y una prueba de PCR para identificar aquellas que correspondieran al género *Leuconostoc*: confirmándose 122 cepas pertenecientes a este género, 25 de APPA y 97 de GP (Tabla 5.3). Estos microorganismos se encuentran presentes desde el aguamiel; sin embargo, se ven enriquecidos durante la fermentación que ocurre tanto en la semilla, como en el pulque. Rocha-Arriaga *et al.*, (2020) encontraron mediante métodos moleculares 57 diferentes géneros a lo largo de la producción de pulque producido en Hidalgo, de los cuales 12 se encontraban de manera consistente desde el aguamiel hasta la bebida final; los 5 de mayor abundancia fueron *Sphingomonas*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter* y *Leuconostoc*.

Tabla 5.3. Cepas identificadas como *Leuconostoc* spp. en aguamiel, semilla y pulque.

Productores	Aguamiel	Semilla	Pulque	Total
APPA	5	10	10	25
GP	19	39	39	97
Total	24	49	49	122

Dado la elaboración artesanal del pulque y los diversos factores que intervienen en el proceso, es de esperarse una gran diversidad microbiana en la bebida.

Escalante *et al.*, (2016) señala que dentro del microbiota de pulque (determinado por métodos moleculares) elaborado en el Estado de México, Hidalgo y Morelos dominaron las BAL, principalmente *Lactobacillus acidophilus* (60-85%) y *Leuconostoc mesenteroides* (0.5-25%).

5.3. Tolerancia cepas *Leuconostoc* a medio fermentativo

Una vez identificadas las bacterias, se inocularon en un medio selectivo con 9% de etanol, 3.5% de fructosa, 2.0% de glucosa y 2.5% de sacarosa, con condiciones similares al aguamiel de acuerdo a lo reportado por Romero-López *et al.* en el 2015. Se observó el crecimiento de 20 cepas de las 122 identificadas como *Leuconostoc* spp. y dos controles (P1D13-32 y P1-122-12). Los valores observados de DO a las 24 h entre las cepas que fueron capaces de desarrollar se encontraron entre 0.19 y 1.0. En la Figura 5.2. y 5.3. se muestran los niveles de DO alcanzados a las 24 h por las cepas aisladas de muestras de GP y APPA, respectivamente.

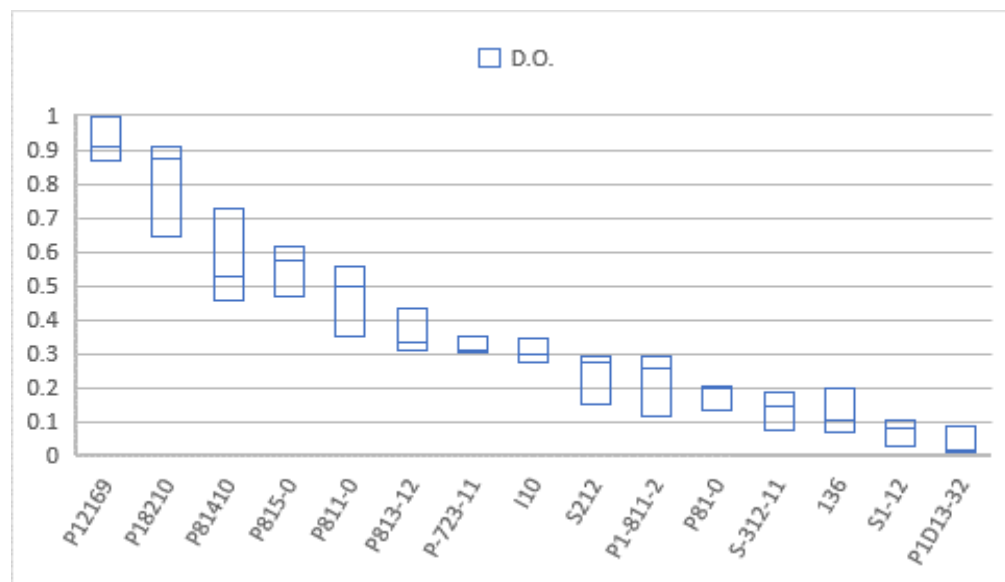


Figura 5.2. Densidad óptica alcanzada (triplicado) por cepas de *Leuconostoc* (aisladas del productor (GP)).

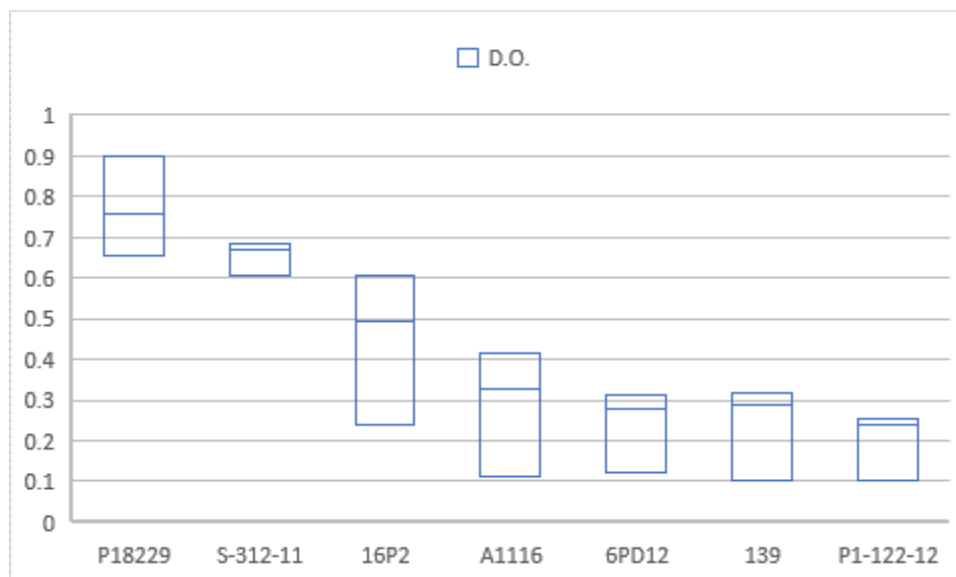


Figura 5.3. Densidad óptica alcanzada (triplicado) por cepas de *Leuconostoc* aisladas del productor (APPA).

Las cepas P12969, P18210 y P81410229 destacan de las obtenidas de los materiales de los productores de GP; mientras que para lo correspondiente a los productores de APPA, se pueden señalar a las cepas las cepas P18229, S-312-11 Y 16P2 como las que muestran mayor capacidad para tolerar las condiciones evaluadas. La tolerancia al etanol es fundamental para que las cepas de *Leuconostoc* puedan persistir en el medio y generar el dextrano que impartirá la viscosidad a la bebida. Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la capacidad de desarrollo de las bacterias que fueron aisladas de meses fríos (noviembre-diciembre) con respecto al resto de las cepas. Es posible que la temperatura genere una presión selectiva sobre el microbiota.

5.4. Evaluación de la viscosidad generada por cepas de *Leuconostoc* seleccionadas en medio de cultivo.

Se inocularon las cepas de la sección 5.3. en medio I (sección 4.5), donde las bacterias que más produjeron viscosidad fueron P12169 (1.5 cp) y P18229 (1.48 cp), mientras que A1116 fue la que menor viscosidad produjo (1.18 cp), sin

embargo, produjo mayor viscosidad que los controles que consistieron en 1.17cp. (P1D13-32 y P-811-2).

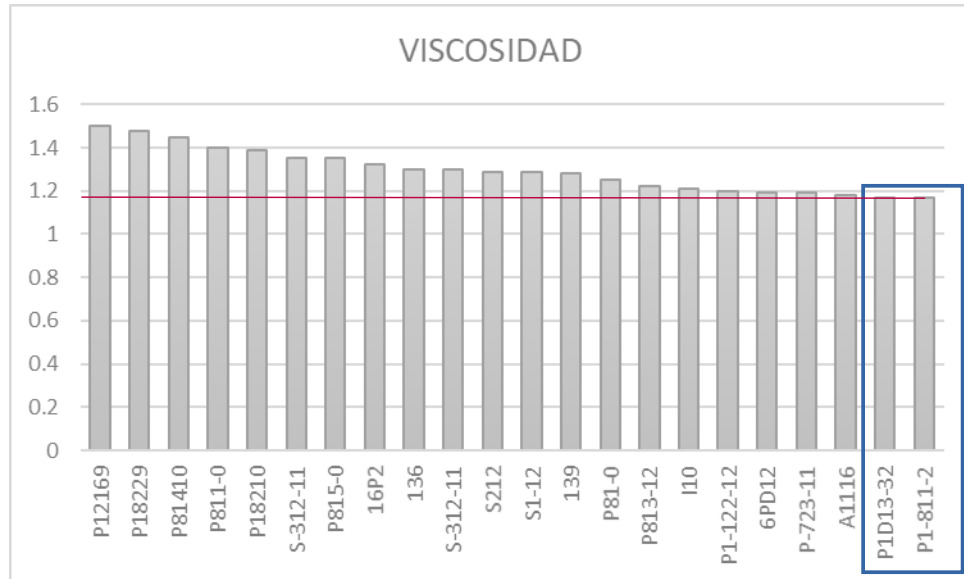


Figura 5.4. Viscosidad generada por cepas de *Leuconostoc* seleccionadas y dos controles (recuadro azul) inoculadas en medio de cultivo.

Aunque se observa con claridad que algunas cepas incrementan la viscosidad en condiciones similares al pulque es necesario confirmar que tendrán un comportamiento similar en el proceso de elaboración del pulque, cuando se inoculan en el aguamiel.

5.5. Evaluación de la viscosidad generada por cepas de *Leuconostoc* seleccionadas en aguamiel.

Para esta prueba se emplearon cepas de *Leuconostoc* que mostraron diferentes capacidades para generar viscosidad en el medio con la intención de contrastar los resultados en el medio y en el aguamiel y saber si existe una correspondencia entre ellos. Claramente los valores de viscosidad obtenidos en el aguamiel son superiores a los obtenidos en el medio (Tabla 5.4). Esto podría estar asociado a compuestos específicos presentes en el aguamiel que estimulan la producción del polímero por los microorganismos o un mayor desarrollo de los microorganismos que se encuentran adaptados al aguamiel. Destacaron las cepas P12169 (1.41

cps en medio y 2.60 cps en aguamiel) y P18229 (1.40cps en medio y 2.96 cps en aguamiel). La cepa de menor producción de viscosidad en aguamiel fue 136 con 2.24 cps. En la Figura 5.5. se hizo una comparativa de la producción de viscosidad en medio y en aguamiel.

Tabla 5.4. promedio de viscosidad producida en medio con condiciones similares al aguamiel y en aguamiel

Cepa	Viscosidad en medio	Viscosidad en aguamiel
P12169	1.41 ± 0.07*	2.60 ± 0.14
P18229	1.40 ± 0.05	2.96 ± 0.07
139	1.20 ± 0.02	2.40 ± 0.02
136	1.23 ± 0.07	2.24 ± 0.04
S212	1.35 ± 0.10	2.53 ± 0.09
I10	1.30 ± 0.02	2.38 ± 0.15
A1116	1.23 ± 0.01	2.53 ± 0.08
CR	1.17 ± 0.03	2.18 ± 0.05

*promedio de la viscosidad (por triplicado) producida en aguamiel o en medio ± desviación estándar

A pesar de las diferencias con los valores de viscosidad en ambos materiales, se observó una correlación significativa ($p < 0.05$) entre los datos obtenidos en el medio de cultivo y en el aguamiel (Figura 5.5). Aunque algunas cepas no siguen una correlación exacta, la evaluación de las cepas en el medio de cultivo puede ser una estrategia útil para la selección de cepas interesantes.

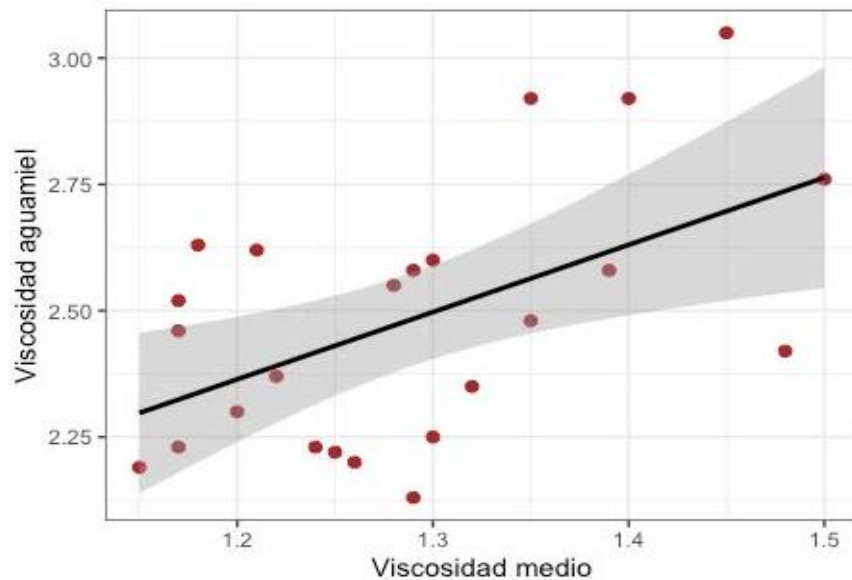


Figura 5.5. Relación de la viscosidad del aguamiel con la viscosidad en el medio **5.6 Determinación de las características físicas y químicas del pulque.**

Para la producción del pulque se emplearon las dos cepas que destacaron tanto en su capacidad para tolerar las condiciones del pulque, como por su capacidad para generar viscosidad: P18229 y P12169B. Las características de los pulques producidos con aguamiel de APPA y GP inoculados se aprecian en la Tabla 5.5. Los mejores resultados en cuanto a viscosidad fueron los las cepas inoculadas con aguamiel del productor APPA teniendo valores de 2.85 cp (P18229B) y 2.71 cp (P12169B), donde se observa que hay mayor viscosidad con respecto al control, este consistió en fermentar aguamiel sin inocular. Un comportamiento similar se observó con el pulque producido con las bacterias inoculadas en GP, a pesar de no haber alcanzado valores tan altos como los obtenidos de APPA también es notorio un mayor nivel de viscosidad con las cepas inoculadas. Las cepas inoculadas en aguamiel ayudarán a los productores a un crecimiento en cuanto a viscosidad, siendo este uno de los parámetros más importantes en calidad de la bebida.

Tabla 5.5. Evaluación de las características físicas y químicas de los pulques obtenidos a partir de las bacterias inoculadas.

Pulque	Cepa	Aguamiel	°Brix	pH	Alcohol % v/v o GL	Viscosidad cp	Acidez total titulable (ácido láctico g/L)	Densidad g/ml
Z95	P18229B	APPA	11	3.10	1.4	2.85	0.21	0.99
A15	P12169B	APPA	7	3.27	1.5	2.71	0.27	0.97
M39	P12169A	APPA	11	3.30	1.15	2.67	0.20	0.99
Q83	P18229A	APPA	9	3.27	1.13	2.62	0.20	0.99
P18	P18229A	GP	8	3.30	1.5	2.51	0.24	0.98
C23	Control	APPA	8.7	3.20	1.2	2.34	0.23	0.99
H14	P18229B	GP	8.4	3.31	1.4	2.34	0.23	0.97
R22	P12169A	GP	8	3.40	1.5	2.26	0.27	0.98
F41	P12169B	GP	8	3.33	1.4	2.20	0.24	0.94
K79	Control	GP	7	3.28	1.1	2.11	0.26	0.97

Los valores de viscosidad generados son superiores a lo que se ha reportado para pulque elaborado en Michoacán: 1.48-1.59 cps (Álvarez-Ríos *et al.*, 2020). De acuerdo a única norma que existe en México para pulque (NMX-V-037-192) las bebidas producidas (control y tratamientos) cumplen con el grado alcohólico requerido (0.6 y 4.0° GL). En todos los casos se obtuvo un nivel de pH más bajo con respecto a la norma (3.5-4.0).

5.7. Análisis Sensorial

5.7.1 Prueba triangular

Las características sensoriales de la bebida marcarán las preferencias del consumidor y el éxito del producto. En la Tabla 5.6, los tratamientos inoculados P12169A, P18229A y P18229B tuvieron un porcentaje de 0.1% que nos indica que, si hay una evidencia fuerte al encontrar similitudes en comparación al control (aguamiel sin inocular) aceptando la H_0 ; ya que no se percibe una diferencia sensorial entre los productos. Mientras que P12169B obtuvo 9.6% que se puede decir que la evidencia es débil por lo que se rechaza la H_0 ya que se percibe una diferencia sensorial entre este producto y el control (ANEXO 8.1.).

Tabla 5.6 Resultados de la prueba triangular con las cepas seleccionadas e inoculadas en aguamiel del productor (GP y APPA)

Cepa	Aguamiel		*PP	
	Correctas	Incorrectas		
P12169(A)	APPA	8	0	0.1%
P18229(A)	GP	7	1	0.1%
P18229(B)	GP	7	1	0.1%
P12169(A)	GP	5	3	0.8%
P12169(B)	GP	4	4	2.5%
P18229(A)	APPA	2	6	8.0%
P18229(B)	APPA	2	6	8.0%
P12169(B)	APPA	1	7	9.6%

*porcentaje de la probabilidad para saber si se rechaza o no se rechaza la H_0 (A y B duplicado de la cepa)

5.7. Prueba hedónica

Para la prueba hedónica la calificación más baja (1) representó una mejor valoración de la bebida, mientras que la más alta (4) era símbolo de desagrado. Los rubros a calificar fueron color, aroma, sabor, acidez, viscosidad y de preferencia. En el caso del pulque producido por GP (Tabla 5.7) la moda en la mayoría de las bebidas inoculadas e incluso el control no fue de tanto agrado para los panelistas, mientras que para las bebidas producidas con aguamiel de APPA la moda fue en general más baja (Tabla 5.8). Todas las bebidas generadas con aguamiel de GP y que fueron inoculadas fueron mejor calificadas que el control, la mejor valorada fue P12169(B).

Tabla 5.7 Moda de calificación en la prueba Hedónica con las cepas seleccionadas e inoculadas en aguamiel del productor (GP)

Cepa	Color	Aroma	Sabor	Acidez	Viscosidad	Consumo	Suma
P12169(B)	1	1	2	4	4	3	15
P12169(A)	3	2	2	4	3	3	17
P18229(B)	4	2	2	4	3	3	18
P18229(A)	3	3	3	4	2	4	19
CONTROL	4	4	3	4	4	4	23

Tabla 5.8 Moda de la calificación en la prueba Hedónica con las cepas seleccionadas e inoculadas en aguamiel del productor (APPA)

Cepa	Color	Aroma	Sabor	Acidez	Viscosidad	Consumo
P18229(B)	2	2	2	2	2	2
P18229(A)	1	1	2	2	2	2
P12169(A)	2	2	4	2	3	3
P12169(B)	1	2	4	4	2	2
CONTROL	4	2	2	3	2	2

Las bebidas producidas con las cepas P18229 (A y B)

En la Figura 5.6. se muestra el conjunto de características evaluadas en las bebidas. La línea que representa la viscosidad es la que muestra una mayor similitud con la de preferencia general por parte de los panelistas, lo que indica que es el parámetro que mayor determina la preferencia de la bebida. Por ejemplo, el pulque A15 (APPA y P12169) muestra mejores calificaciones en acidez, aroma y sabor que el pulque R22 (GP y P12169), pero su preferencia es menor, dado que su viscosidad es baja. Los pulques P18 (GP y P18229A), F41

(GP y PP12169), M39 (APPA y P12169) y H14 (GP y P18229A) mostraron una preferencia similar entre los productores, sólo detrás de R22.

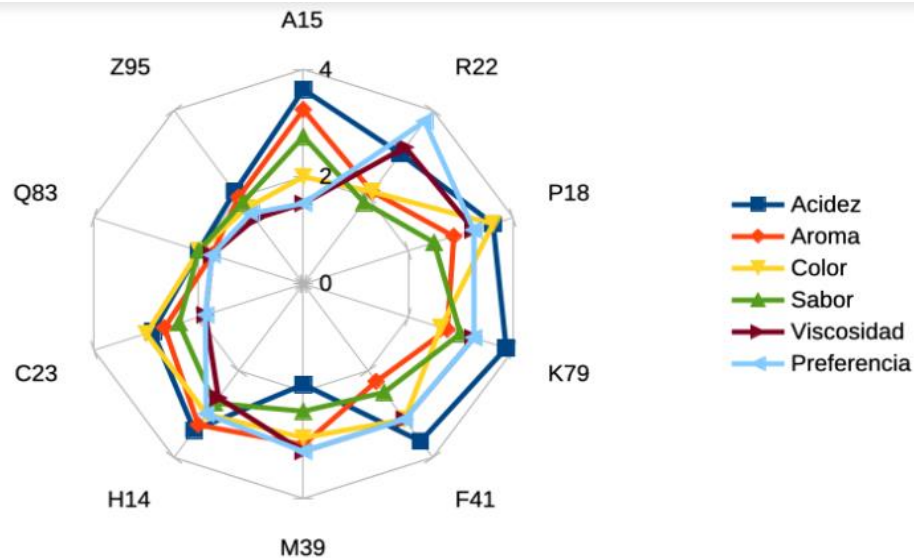


Figura 5.6 Acidez, aroma, color, sabor, viscosidad y preferencia de pulque producido con las cepas de *Leuconostoc* seleccionadas.

5.8 Prueba de Rangos

En la Tabla 5.9. (aguamiel del productor GP) y 5.10. (aguamiel con APPA), se puede contemplar la moda de las valoraciones de los panelistas a las bebidas, teniendo como valor máximo “10”, definiéndose como la bebida de su preferencia, mientras que el valor 1 fue el valor más bajo que se interpretó como la bebida de mayor desagrado. Las modas obtenidas con las cepas inoculadas en aguamiel del productor GP, tiene valores más bajos a comparación de los inoculados con el aguamiel del productor APPA. Ya que comentaban los panelistas que tenía un sabor adecuado (no tan dulce pero tampoco tan ácido) y con mayor viscosidad. Los resultados de la prueba de rangos comparada con los resultados de la Tabla 5.10 indica que hay una relación en cuanto a la viscosidad con los valores más altos, en caso de GP la cepa P18229A (2.51 cp y una moda de 8) fue la de valor más alto para los panelistas mientras que la cepa P12169A (2.71 cp y una moda de 10) inoculada en aguamiel del productor APPA tuvo la moda más alta. Esto se

puede deber a que el aguamiel de APPA tuvo mayores grados °Brix (relacionado con los azúcares contenidos en la bebida).

Tabla 5.9 Moda de la valoración de la prueba de rangos con las cepas seleccionadas e inoculadas en aguamiel del productor (GP)

Cepa	Moda
P18229(A)	8
P12169(B)	6
P18229(B)	5
P12169(A)	3
CONTROL	5

Tabla 5.10 Moda de la valoración en prueba de rangos con las cepas seleccionadas e inoculadas en aguamiel del productor (APPA)

Cepa	Moda
P18229 (B)	7
P18229 (A)	6
P12169(A)	10
P12169(B)	7
CONTROL	4

De forma general, las cepas evaluadas mejoraron la preferencia de las bebidas generadas con los dos tipos de aguamiel. Las bebidas que fueron mejor evaluadas fueron obtenidas con la cepa P12169 y aguamiel APPA, y con la cepa P18229 y aguamiel GP.

6. Conclusiones

1. El aguamiel, la semilla y el pulque son fuentes de BAL y en particular de *Leuconostoc* con capacidad para generar polímeros que imparten viscosidad al pulque.
2. Las cepas de *Leuconostoc* inoculadas en aguamiel, aportan viscosidad a la bebida sin modificar significativamente la acidez y el pH.
3. La inoculación de *Leuconostoc* permite conseguir una viscosidad adecuada para obtener una bebida de mejor calidad. Lo que podrá asentar la base para poder desarrollar una semilla con bacterias y levaduras específicas, que beneficien la producción de pulque.
4. La viscosidad fue el parámetro que más asociación mostró con la preferencia de la bebida por jueces entrenados. La inoculación de las bacterias seleccionadas genera bebidas de mayor preferencia.

7. BIBLOGRAFÍA

- Al Abdallah, Q., Nixon, B. T., & Fortwendel, J. R. (2016). The enzymatic conversion of major algal and cyanobacterial carbohydrates to bioethanol. *Frontiers in energy research*, 4, 36. DOI: 10.3389/fenrg.2016.00036
- Álvarez-Duarte, M. D. C., García-Moya, E., Suárez-Espinosa, J., Luna-Cavazos, M., & Rodríguez-Acosta, M. (2018). Conocimiento tradicional, cultivo y aprovechamiento del maguey pulquero en los municipios de Puebla y Tlaxcala. *Polibotánica*, (45), 205-222.
- Asociación Nacional de Pulquerías Tradicionales (ANTP), A.C. (2020) pulquerías tradicionales de CDMX y el Estado de México. Recuperado 16 de enero de 2020 a partir de <https://www.pulqueriastradicionales.com/nosotros/>
- Ballesteros-Rodríguez, E., & Sánchez-Teyer, L. F. (2021). El pulque. *Don Juan López Cervantes*, 28(121), 3.
- Castro-Díaz, A. S., & Guerrero-Beltrán, J. Á. (2021). Efecto de luz ultravioleta-C y ultrafiltración sobre las características fisicoquímicas, antioxidantes y sensoriales de savia de *Agave salmiana* almacenada. *Información tecnológica*, 32(4), 65-76.
- Cheng, H. W., Chiang, C. S., Ho, H. Y., Chou, S. H., Lai, Y. H., Shyu, W. C., & Chen, S. Y. (2021). Dextran-modified Quercetin-Cu (II)/hyaluronic acid nanomedicine with natural poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor and dual targeting for programmed synthetic lethal therapy in triple-negative breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 329, 136-147.
- Chia Concepción, C. C. G., & Sotelo Ganoza, K. Y. (2019). Determinación de las condiciones ambientales óptimas de la hidrólisis enzimática de dextrano del jugo de caña de azúcar (*saccharum officinarum*).

- Contreras López, M. F. (2021). *Elaboración de películas comestibles a partir de suero de leche fermentado por bacterias ácido lácticas* (Master's thesis).
- Dror, B., Savidor, A., Salam, B. B., Sela, N., Lampert, Y., Teper-Bamnlker, P., & Eshel, D. (2019). High levels of CO₂ induce spoilage by *Leuconostoc mesenteroides* by upregulating dextran synthesis genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 85(1), e00473-18.
- Echeverria M. y Meza N. (2018). Pulque, la bebida que se niega a desaparecer. Reportaje de Indigo. Recuperado 11 de mayo de 2020 a partir de, <https://www.reporteindigo.com/indigonomics/pulque-la-bebida-se-niega-a-desaparecer-productores-impulso-nuevas-generaciones-competencia/>
- Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., Velasco-Velasco, V. A., & López-Hernández, E. (2021). fertilización durante la aclimatación en invernadero de plantas de agave potatorum micropropagadas [fertilization during the acclimation in the greenhouse of agave potatorum micropropagated plants]. *comité editorial (depi-itvo)*, 8, 36.
- Escalante A., López Soto, D. R., Velázquez Gutiérrez, J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., y López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: historical, microbiological, and technical aspects., 7: 1026.
- Garcia-Arce, Z. P., & Castro-Muñoz, R. (2021). Exploring the potentialities of the Mexican fermented beverage: Pulque. *Journal of Ethnic Foods*, 8(1), 1-16.
- Gaur, G., Oh, J. H., Filannino, P., Gobbetti, M., Van Pijkeren, J. P., & Gänzle, M. G. (2020). Genetic determinants of hydroxycinnamic acid metabolism in heterofermentative lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(5), e02461-19.

- Giles G., M., García, J. G. S., Matus, V., Quintana, I. C., Bolívar, F., y Escalante, A. (2016). In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *SpringerPlus*, 5(1), 708.
- Gonzalez-Crespo, C. (2018). Aplicación de *Lactobacillus* spp. como cultivos iniciadores de la fermentación de aceitunas verdes.
- Granados Espinoza, K. M. (2019). *Conservación de mora (Rubus glaucus.) con la aplicación de bacterias+ ácido lácticas provenientes del mucilago de cacao (Theobroma cacao L.)* (Bachelor's thesis, Quevedo: UTEQ).
- INIFAP. Instituto nacional de investigaciones forestales agrícolas y pecuarias, (2018). Tecnología para el cultivo de Maguey y Nopal Tunero con Frijol intercalado en el Altiplano de San Luis Potosí. Recuperado 3 de mayo de 2020 a partir de <http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/tecnologiasdesc.php?id=46>.
- Janiaski, D. R., Pimentel, T. C., Cruz, A. G., & Prudencio, S. H. (2016). Strawberry-flavored yogurts and whey beverages: What is the sensory profile of the ideal product?. *Journal of Dairy Science*, 99(7), 5273-5283.
- Jia, J., Ji, B., Tian, L., Li, M., Lu, M., Ding, L., ... & Duan, X. (2021). Mechanism study on enhanced foaming properties of individual albumen proteins by *Lactobacillus* fermentation. *Food Hydrocolloids*, 111, 106218.
- Juárez, F. A. R., Carrasco, H. S. U., & Hernández, A. Z. (2021). Pulque: contenido probiótico y potencial en la industria biotecnológica. *RD-ICUAP*, 7(20), 95-110.
- Kepecs, S., García, P. F., Alexander, R. T., & Charlton, C. L. O. (2018). Commodities Production and Technological Change. *Colonial and*

Postcolonial Change in Mesoamerica: Archaeology as Historical Anthropology, 29-52.

- Kim, D. H., Chon, J. W., Kim, H. y Seo, K. H. (2019). Development of a novel selective medium for the isolation and enumeration of acetic acid bacteria from various foods. *Food Control*, 106, 106717. Recuperado 21 de febrero de 2020 a partir de, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106717>
- Macian, M. C., Chenoll, E., & Aznar, R. (2004). Simultaneous detection of *Carnobacterium* and *Leuconostoc* in meat products by multiplex PCR. *Journal of applied microbiology*, 97(2), 384-394.
- Manfugás, J. E. (2020). *Evaluación sensorial de los alimentos*. Editorial Universitaria (Cuba).
- Muelas, R., de Olives, A. M., Romero, G., Díaz, J. R., Sayas-Barberá, M. E., & Sendra, E. (2018). Evaluation of individual lactic acid bacteria for the fermentation of goat milk: Quality parameters. *LWT*, 98, 506-514.
- NCBI. (2017). Taxonomy browser. Recuperado el 9 de febrero de 2020, a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=3750>
- NMX-V-022-1972. Aguamiel. Hydromiel. Normas Mexicanas. Dirección general de normas. Secretaria de salud. Recuperado 15 de abril de 2020 a partir de, <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-V-022-1972.PDF>
- NMX-V-037-1972. Pulque manejado a granel. Pulque handled in bulk. Normas Mexicanas. Dirección general de normas. Secretaria de salud. Recuperado 15 de abril de 2020 a partir de, <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-V-037-1972.PDF>
- Pérez R. A., Rodríguez O. A., Nieto-Aquino J.C., Callejas-Hernández J. y Portillo-Márquez L. 2017. Comparación de dos sistemas de siembra de Maguey

(Agave salmiana). Universidad Politécnica de F.I. Madero, Edo. Hidalgo. México. 71 pp

- Pomeroy, A. E., Pena, M. I., Houser, J. R., Dixit, G., Dohlman, H. G., Elston, T. C., & Errede, B. (2021). A predictive model of gene expression reveals the role of network motifs in the mating response of yeast. *Science signaling*, *14*(670), eabb5235.
- Rasheed, S., Bashir, K., Kim, J. M., Ando, M., Tanaka, M., & Seki, M. (2018). The modulation of acetic acid pathway genes in Arabidopsis improves survival under drought stress. *Scientific reports*, *8*(1), 1-15.
- Reyes-Agüero, J. A., Peña-Valdivia, C. B., Aguirre-Rivera, J. R., & Mora-López, J. L. (2019). variación intraespecifica de agave mapisaga trel. y agave salmiana otto ex salm-dyck.(asparagaceae) relacionada con los usos ancestrales en la región hñähñu en el centro de México. *Agrociencia*, *53*(4), 563-579.
- Robles Calderón, R. (2021). Condiciones óptimas del proceso de fermentación alcohólica del jugo de la Cabuya Azul (Agave Americana), empleando cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Rocha-Arriaga, C., Espinal-Centeno, A., Martínez-Sánchez, S., Caballero-Pérez, J., Alcaraz, L. D., & Cruz-Ramírez, A. (2020). Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a biocultural resource of Mexico. *Microbiological Research*, *241*, 126593.
- Rojas-Rivas, E., & Cuffia, F. (2020). Identifying consumers' profile and factors associated with the valorization of pulque: A traditional fermented beverage in Central Mexico. *Food Science and Technology International*, *26*(7), 593-602.
- Rojas-Rivas, E., Viesca-González, F. C., Favila-Cisneros, H. J., & Cuffia, F. (2019). Consumers' perception of a traditional fermented beverage in Central Mexico: An exploratory study with the case of pulque. *British Food Journal*.

- Ruiz Rodríguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., & Mozzi, F. (2019). Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. *Frontiers in microbiology*, 10, 1091.
- SAGARPA (2017). Entrevista realizada por Terra, interiores a Humberto Ordoñez López, presidente del sistema de producto de agave Pulquero Puebla, AC. Recuperado 17 de Enero de 2020 a partir de, <http://www.sicde.gob.mx/portal/bin/nota.php?accion=buscar¬ald=1186080218588fbb70bb434>
- SEGOB. Reglamento para el control sanitario del pulque (1981). Diario Oficial de la Federación. Secretaria de la salud. Recuperado 15 de febrero de 2020 a partir de, http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4662203&fecha=18/06/1981
- SIAP (2017). Anuario estadístico de la producción agrícola y monografía de productos agroalimentarios de mexicanos. Recuperado 6 de abril de 2020 a partir de, <https://www.gob.mx/siap/articulos/cierre-estadistico-de-la-produccion-agricola-2017?idiom=es>
- SIAP (secretaria de información agroalimentaria y pesquera) (2018). Intención de cosecha, anuario estadístico de la producción agrícola. Recuperado 6 de abril de 2020 a partir de, http://infosiap.siap.gob.mx/opt/agricultura/intension/Intencion_cosechaPerenn e_cultivo2018.pdf
- Tapia. R. O. (2016). Estandarizacion de condiciones de producción de pulque a partir de agave salmiana, Saltillo Coahuila, México. Recuperado 2 de junio de 2020 a partir de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/8166/T20>

875%20%20TAPIA%20ROMERO%20OMAR%20%2064159.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Vázquez-Pérez, N., Blancas, J., Torres-García, I., García-Mendoza, A., Casas, A., Moreno-Calles, A. I., ... & Rendón-Aguilar, B. (2020). Conocimiento y manejo tradicional de *Agave karwinskii* en el sur de México. *Botanical Sciences*, 98(2), 328-347.
- Vicente-Magueyal, F. J., Bautista-Méndez, A., Villanueva-Tierrablanca, H. D., García-Ruíz, J. L., Jiménez-Islas, H., & Navarrete-Bolaños, J. L. (2020). Novel process to obtain agave sap (aguamiel) by directed enzymatic hydrolysis of agave juice fructans. *LWT*, 127, 109387.
- Vidaurre-Ruiz, J. M., Salas-Valerio, W. F., & Repo-Carrasco-Valencia, R. (2019). Propiedades de pasta y texturales de las mezclas de harinas de quinua (*Chenopodium quinoa*), kiwicha (*Amaranthus caudatus*) y tarwi (*Lupinus mutabilis*) en un sistema acuoso. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 21(1), 5-14.
- Villarreal-Morales, S. L., Muñiz-Márquez, D. B., Michel-Michel, M., González-Montemayor, Á. M., Escobedo-García, S., Salas-Tovar, J. A., ... & Rodríguez-Herrera, R. (2019). Aguamiel a Fresh Beverage from *Agave* spp. Sap with Functional Properties. In *Natural Beverages*. Edit. Academic Press (pp. 179-208).
- Zehir Şentürk, D., Dertli, E., Erten, H., & Şimşek, Ö. (2020). Structural and technological characterization of ropy exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Tarhana. *Food Science and Biotechnology*, 29(1), 121-129.

Zurita Haro, D. M. (2021). *Elaboración de una bebida alcohólica a partir del jugo de yaca ecuatoriana (Artocarpus heterophyllus)* (Bachelor's thesis, Quito: UCE).

8.0. Anexos

Anexo 8.1



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERETARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

NOMBRE: _____

FECHA _____

FRENTE A USTED HAY TRES MUESTRAS DE PULQUE, UNA ES DIFERENTE A LAS OTRAS DOS.
COLOQUE DEL LADO IZQUIERDO EL CÓDIGO DE LAS MUESTRAS Y DEL LADO DERECHO, CON UNA
X; MARQUE LA DIFERENTE

MUESTRA	MARCA (X)

COMENTARIOS: _____

Anexo 8.2.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

NOMBRE: _____

FECHA _____

SE LE DARÁ UNAS MUESTRAS DE PULQUE QUE DEBERÁ CALIFICAR LOS ATRIBUTOS QUE CALIFICAN A LA BEBIDA DE ACUERDO CON LOS PARÁMETROS EN CADA PREGUNTA.

1. MARQUE DEL 1 AL 4, DE CADA BEBIDA, DE ACUERDO A SU PERCEPCIÓN EN CUANTO AL COLOR DE LA BEBIDA, DONDE 1 REPRESENTA ME GUSTA MUCHO Y 4 ME DISGUSTA MUCHO.

H14	R22	Q83	Z95	M39	K79	F41	A15	C23	P18

2. MARQUE DEL 1 AL 4, DE CADA BEBIDA, DE ACUERDO A SU PERCEPCIÓN EN CUANTO AL AROMA DE LA BEBIDA, DONDE 1 REPRESENTA ME GUSTA MUCHO Y 4 ME DISGUSTA MUCHO.

H14	R22	Q83	Z95	M39	K79	F41	A15	C23	P18

3. MARQUE DEL 1 AL 4, DE CADA BEBIDA, DE ACUERDO A SU PERCEPCIÓN EN CUANTO AL SABOR DE LA BEBIDA, DONDE 1 REPRESENTA ME GUSTA MUCHO Y 4 ME DISGUSTA MUCHO.

H14	R22	Q83	Z95	M39	K79	F41	A15	C23	P18

4. MARQUE DEL 1 AL 4, DE CADA BEBIDA, DE ACUERDO A SU PERCEPCIÓN EN CUANTO A LA ACIDEZ DE LA BEBIDA, DONDE 1 REPRESENTA ME GUSTA MUCHO Y 4 ME DISGUSTA MUCHO.

H14	R22	Q83	Z95	M39	K79	F41	A15	C23	P18

5. MARQUE DEL 1 AL 4, DE CADA BEBIDA, DE ACUERDO A SU PERCEPCIÓN EN CUANTO A LA VISCOSIDAD DE LA BEBIDA, DONDE 1 REPRESENTA ME GUSTA MUCHO Y 4 ME DISGUSTA MUCHO.

H14	R22	Q83	Z95	M39	K79	F41	A15	C23	P18

6. MARQUE DEL 1 AL 4, DE CADA BEBIDA, DE ACUERDO A SU PERCEPCIÓN EN CUANTO A SU PREFERENCIA DE CONSUMO DE LA

BEBIDA, DONDE 1 REPRESENTA ME GUSTA MUCHO Y 4 ME DISGUSTA MUCHO.

H14	R22	Q83	Z95	M39	K79	F41	A15	C23	P18

Anexo 8.3



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

NOMBRE: _____

FECHA _____

ENUMERE DEL 1 AL 10 LA BEBIDA DE SU PREFERENCIA. 1 REPRESENTA ME DISGUSTA MUCHO Y 10 ME GUSTA MUCHO.

PULQUE	CALIFICACIÓN
H14	
R22	
Q83	
Z95	
M39	
K79	
F41	
A15	
C23	
P18	

