

## AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS DE *Leuconostoc* ASOCIADOS A LA VISCOSIDAD DEL PULQUE

Ortiz Mateos L. M.<sup>1</sup>, Arvizu Medrano S. M.<sup>1</sup>, Martínez Peniche R.Á.<sup>1</sup>, Miranda Castilleja D. E.<sup>1</sup>, Aldrete Tapia J. A.<sup>1</sup>, Cruz Bonnet Á. G.<sup>2</sup>

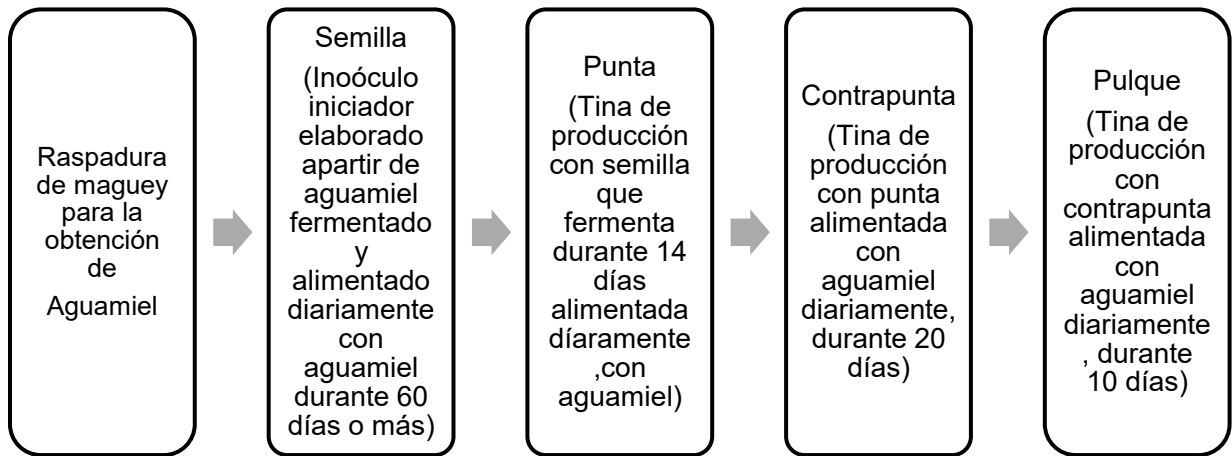
<sup>1</sup>Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, C.U. Cerro de las Campanas s/n, Cp. 76010, Querétaro, Querétaro, México. Tel: 4421921200, Ext.5556. <sup>2</sup>Facultad de Gastronomía, Universidad Metropolitana de Tlaxcala, San Miguel conlta, Tlaxcala, México,90640 Tel:2414174795. Correo: [sofia.arvizu@uaq.mx](mailto:sofia.arvizu@uaq.mx)

**Palabras Clave:** Fermentación, Aguamiel, Bacterias lácticas

### Introducción

El pulque es una bebida fermentada alcohólica que ha tenido gran relevancia para los mexicanos a lo largo de su historia y cuyo primer registro se tiene desde la época prehispánica [1]. Ésta bebida se elabora a partir del aguamiel, de diferentes especies de agaves, destacando: *Agave atrovirens*, *A. americana*, *A. salmiana* y *A mapisaga*. 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 [2]. El resultado del proceso será la producción del aguamiel, que es un jugo con alto contenido de azúcares, 61.31g/ 100g. La fermentación se realiza comúnmente de manera espontánea y de acuerdo al proceso que se siga, existen 2 tipos de pulque: el tipo 1 (Figura 1) [3] y el tipo 2 (Figura 2) [4]. La transformación del aguamiel en pulque implica varias fermentaciones consecutivas (alcohólica, láctica y acética), que dan como resultado una bebida ácida, blanca y aspecto viscoso, con un porcentaje de alcohol de entre 5 y 10° GL. No se tiene estandarizado algún método que defina los estándares de calidad en el pulque, sin embargo, en la región centro conformada por Hidalgo, Estado de México, Ciudad de México y Tlaxcala, tanto productores como consumidores asocian una bebida de buena calidad, además del sabor y el aroma; con la viscosidad. Sin embargo, esta viscosidad, se ve influenciada por la estacionalidad del año y no se tiene regulada o estandarizada la producción del pulque. Se sabe que la viscosidad es producida por algunas especies de *Leuconostoc* una vez terminada la fermentación láctica cuando existe un exceso del sustrato natural (sacarosa). *Leuconostoc* secreta una enzima llamada dextransacarasa, la cual se encarga sintetizar dextrano que le conferirá textura a la bebida [5]. El dextrano es un exopolisacárido complejo y ramificado formado por numerosas moléculas de glucosa que se produce por fermentación o de manera enzimático, en el que  $\alpha$ -D glucosa, se une por enlaces glucosídicos en un 95%  $\alpha$  1,6 y un 5% puede variar de acuerdo al tipo de dextrano en  $\alpha$  1,3 o  $\alpha$ -1,4 [6]. Por lo que el objetivo del trabajo fue aislar, identificar y seleccionar cepas de bacterias ácido lácticas que intervienen en la fermentación

viscosa en el pulque; y con ello ofrecer una mejor comprensión y herramientas biológicas a los productores para alcanzar una estandarización en el proceso y calidad de esta bebida.



**Figura 1.** Elaboración de pulque Tipo 1.



**Figura 2.** Elaboración de pulque tipo 2.

## Materiales y Métodos

### Muestreo

Se recolectaron 30 muestras de 300 ml de aguamiel, semilla y pulque de los productores Grupo Pulmex (GP) y Asociación de Productores de Pulque de Altzayanca (APPA) de Julio 2020 a febrero 2021. Cada muestra se transportó en hieleras a 4°C.

### 1. Cuantificación de BAL

A partir de alícuotas de cada muestra de aguamiel, semilla y pulque se realizaron diluciones decimales seriadas y se cuantificaron las bacterias ácido lácticas por extensión en superficie en agar MRS adicionado con cicloheximida (0.1 gr/L). Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h y se aislaron aproximadamente el 5 % de colonias con morfología colonial diferenciable. A las colonias seleccionadas, se les realizó la prueba de catalasa, tinción Gram y evaluación de su morfología celular para catalogarlas como BAL. Aquellas con morfología cocácea se purificaron por resiembras sucesivas [7].

### 2. Identificación de *Leuconostoc* spp

Para confirmar la identificación de los aislamientos como pertenecientes al género *Leuconostoc*, 1 ml de cultivos de las cepas en caldo MRS (35°C/48 h), se centrifugaron a

12,000 rpm/ 1 min. El pellet se resuspendió en 300µl de buffer TNES y se colocó 10 min en termo bloque a 95°C. La suspensión se centrifugó 1 min a 12,000 rpm y se recuperó el sobrenadante, al que se le adicionaron 90µl de acetato de sodio y se almacenó a -20°C/ 10 min. La solución se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 min, el sobrenadante se separó y se le añadieron 400µl de isopropanol, dejándolo reposar 10 min a -20°C. La suspensión se centrifugó 5 min a 12,000 rpm, el precipitado se resuspendió en 1 ml de etanol al 70% y se mantuvo 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 5 min a 12,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar en termo bloque a 60°C durante 30 min. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 50µl de buffer TE. Una vez extraído el ADN, 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) y las condiciones consistieron en una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C con 35 ciclos de: 30s a 94° C, 45s a 72°C y una elongación final de 5 min a 72°C [8].

### **3. Tolerancia cepas *Leuconostoc* a medio fermentativo**

Las cepas confirmadas por PCR como *Leuconostoc* spp, fueron inoculadas de manera individual (5 logUFC/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 hrs y posteriormente se midió la densidad óptica a las 0, 4, 7 y 24 hrs mediante el equipo Varioskan™.

### **4. Evaluación de la viscosidad generada por cepas de *Leuconostoc* seleccionadas.**

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, donde se inocularon de manera independiente tres cepas de *Leuconostoc* de diferentes capacidades de desarrollo en el medio, con base en la DO alcanzada en el estudio previo. Los cultivos se incubaron a 35°C durante 7 días y al final del almacenamiento se midió la viscosidad generada mediante un viscosímetro (Brookfield/DV2T).

## **Resultados y discusión**

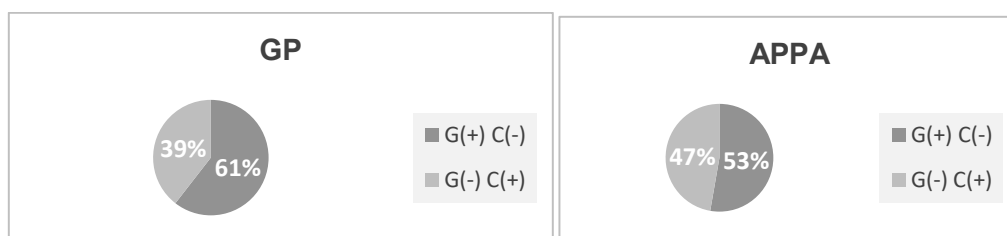
### **1. Cuantificación de BAL y detección de *Leuconostoc* spp**

Se obtuvieron 324 aislados a partir de los diferentes materiales y productores (Tablas 1 y 2). Se decidió realizar más muestreos con GP debido a que su pulque presenta mayor viscosidad que el de APPA, por lo que se realizó muestreo de julio a febrero con GP mientras que de APPA se llevó a cabo en septiembre, diciembre y febrero. Se observó que en noviembre y diciembre se presentó una mayor concentración en la población de BAL, 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). Se realizó diferenciación de morfología con tinción Gram y prueba de catalasa (Figura 3). Se obtuvo una mayor cantidad de cepas Gram positivas y catalasa negativa, el cual fue el primer filtro para purificar las bacterias lácticas.

## 2. Identificación de *Leuconostoc* spp

Una vez diferenciadas por morfología se realizó extracción de ADN a partir de cultivos activados y se confirmaron en PCR 122 cepas correspondieron al género *Leuconostoc*, 25 de APPA y 97 de GP.



**Figura 3.** 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.

**Tabla 1.** Concentración de BAL de aguamiel, semilla y pulque obtenidos de productores de GP.

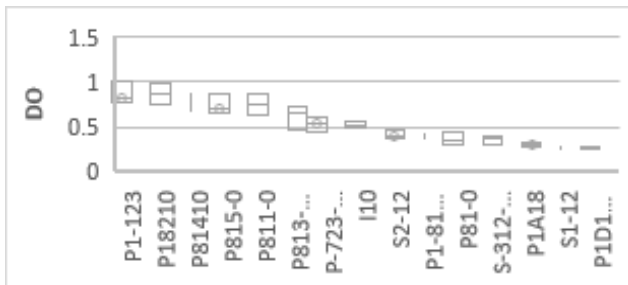
Muestra	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Febrero
Aguamiel	4.3	5.2	1.7	5.4	6.4	6.4	4.4
Semilla	5.4	4.4	4.3	5.4	6.4	6.3	4.1
Pulque	5.3	4.1	4.2	5.4	5.3	6.3	4.3

**Tabla 2.** Concentración de BAL de aguamiel, semilla y pulque obtenidos de productores de APPA

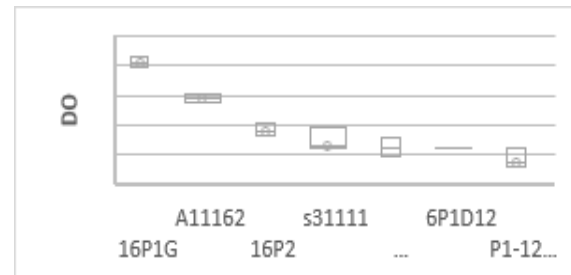
Muestra	Septiembre	Diciembre	Febrero
Aguamiel	1.8	6.2	4.3
Semilla	4.1	6.2	4.0
Pulque	4.1	5.0	4.2

### 3. Tolerancia cepas *Leuconostoc* a medio fermentativo

Una vez identificadas las bacterias, se inocularon en un medio selectivo con etanol y azúcares. Se observó el crecimiento de 21 cepas de las 122 identificadas como *Leuconostoc* spp. Los valores observados de DO a las 24 h entre las cepas que fueron capaces de desarrollarse se encontraron entre 0.19 y 1.0. En la Figura 4 (GP) y 5 (APPA) se muestran los niveles de DO alcanzados a las 24 h. Las cepas P1-123, P18210 y P81410 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 16P1G, A11162 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 la microbiota.



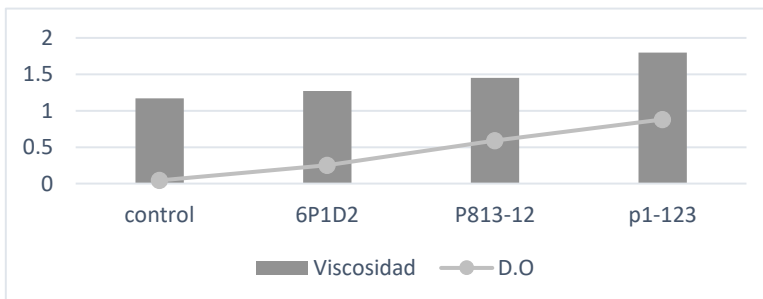
**Figura 4.** Densidad óptica alcanzada por cepas de *Leuconostoc* (GP)



**Figura 5.** Densidad óptica alcanzada por cepas de *Leuconostoc* (APPA)

### 4. Evaluación de la viscosidad generada por cepas de *Leuconostoc* seleccionadas.

Se inocularon de manera individual tres cepas: P1-123 con la DO promedio más alta (0.86), P813-12 que alcanzó una DO promedio intermedia (0.58) y 6P1D2 con una DO promedio



baja (0.22) (Figura 6). Todas estas cepas aportaron viscosidad al medio cuando se comparó con el control. Los resultados indican que existe una relación entre la densidad óptica en el medio MRS y la viscosidad generada en el medio modificado similar al pulque.

**Figura 6.** Relación de la densidad óptica alcanzada de tres cepas de *Leuconostoc* y la viscosidad generada en un medio similar al pulque.

## Conclusiones

Podemos concluir que la temperatura ambiente que ocurre durante la fermentación es un factor importante que influye sobre el tipo de bacterias que desarrollan y la viscosidad que se genera en el pulque. La evaluación del desarrollo de las bacterias lácticas mediante el seguimiento de DO puede ser un parámetro asociado a la viscosidad que se puede generar en el medio de cultivo o en el pulque. El pulque es una fuente potencial de cepas de *Leuconostoc* que permitan generar una viscosidad estandarizada en esta bebida.

## Referencias

- 1) Mora-López J. L., Reyes-Agüero J. A., Flores-Flores J. L., Peña-Valdivia C. B., Aguirre-Rivera J. R. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección Salamina del género *Agave*. *Agrociencia*, **45**(4): 465-477.
- 2) García Garibay. M., López M. C. A., Quintero R. R. (1993). Biotecnología alimentaria.
- 3) NMX-V-037-1972. Pulque manejado a granel. Pulque handled in bulk. Normas Mexicanas. Dirección general de normas. Secretaría de salud. <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-V-037-1972.PDF>. Consultado 15 de abril de 2020.
- 4) Escalante A., Giles-Gómez M., Esquivel Flores G., Matus Acuña V., Moreno-Terrazas R., López-Munguía, A., y Lappe-Oliveras, P. (2012). Pulque fermentation. Handbook of plant-based fermented food and beverage technology, 691-706
- 5) Salou, P., Loubiere, P. Pareilleux, A. (1994). Growth and energetic of *Leuconostoc oenos* during cometabolism of glucose with citrate or fructose. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**(5): 1459-1466.
- 6) Robyt, J. F. (1985). Encyclopedia of polymer science. Dextran, Vol. 4. (Kroschwitz JI, ed). pp. 753-767.
- 7) 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.
- 8) 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.