



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

Mildred Herrera-Solórzano*, Patricia Lappe-Oliveras, Carmen Wachter-Rodarte

*Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Km 107 Carretera Tijuana-Ensenada, Baja California, fax: (646)1750569, mherrera@cicese.mx.

Palabras clave: pulque, levaduras, bacterias ácido lácticas.

Introducción. El pulque es probablemente la bebida más antigua y tradicional de México. Es una bebida alcohólica ligeramente ácida y viscosa que se obtiene por fermentación de la savia azucarada o aguamiel de varias especies de *Agave*, principalmente *A. salmiana*, *A. atrovirens* y *A. mapisaga* que crecen en las zonas semiáridas y templadas del altiplano mexicano, en donde se produce y consume regularmente. Al iniciarse la fermentación del aguamiel los cambios químicos que se presentan en el sustrato propician el desarrollo y sucesión de diversos grupos microbianos, como sigue: 1) bacterias productoras de ácido láctico de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (especies homo y heterolácticas), que incrementan la acidez de la bebida; 2) levaduras no-*Saccharomyces* y *Saccharomyces* y bacterias (*Zymomonas mobilis* ssp. *mobilis*) que transforman los azúcares en etanol y otros metabolitos secundarios que repercuten en el perfil sensorial de la bebida, 3) bacterias productoras de dextranas (*Leuconostoc* spp.) que confieren la viscosidad al pulque; y 4) bacterias acéticas (*Acetobacter* spp.) que junto con las BAL acidifican la bebida (1). Recientemente Escalante y colaboradores determinaron la diversidad bacteriana del pulque mediante la secuenciación del gene 16r ARN. Observaron la dominancia de especies de *Lactobacillus* (80.97%) e identificaron por primera vez en el pulque las especies *Lactobacillus cepa* ASF36, *Lactobacillus acetotolerans*, *L. acidophilus*, *L. hilgardii*, *L. kefir*, *L. plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Microbacterium arborescens*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Acetobacter pomorum*, *Gluconobacter oxydans* y *Hafnia alves*, e indicaron la posible presencia de nuevas especies (2).

Con el fin de continuar con el estudio microbiano del pulque, el presente estudio tuvo como objetivos el aislamiento e identificación polifásica de levaduras y BAL presentes en muestras de aguamiel, pulque y semilla.

Metodología. El muestreo del aguamiel, del pulque y de la semilla se realizó en la población de Santa Mónica, estado de Hidalgo. El aislamiento de los microorganismos se realizó por el método de dilución en serie, y siembra por extensión en placa. Se utilizaron medios específicos de cultivo para cada grupo microbiano. Los aislados de levaduras se identificaron a especie por sus características fenotípicas utilizando las claves y las diagnosis consignadas en las monografías de Kurtzman y Fell (1998) y Barnett (2000), y en la base de datos del Centraal Bureau voor Schimmelcultuur (CBS). La identidad de los aislados se corroboró

mediante la secuenciación de pares de bases del dominio D1/D2 del gene 26S ADNr. Los aislados de BAL se identificaron genotípicamente mediante la secuenciación del gene 16S ADNr. Todas las secuencias obtenidas se compararon con las existentes en el GenBank utilizando el programa BLAST, y posteriormente se depositaron en dicho banco.

Resultados y discusión. Se obtuvieron 20 aislados de levaduras y 10 de BAL. En aguamiel se identificaron las levaduras *Candida lusitanae* (1) y *Kluyveromyces marxianus* (9), y las bacterias *Lactobacillus paracasei* (1), *Lactobacillus sanfranciscensis* (1), *Lactobacillus* sp. (1), *Leuconostoc citreum* (2) y *Acetobacter orientalis* (1). En pulque las levaduras *K. marxianus* (3) y *S. cerevisiae* (2), y las bacterias *Lactobacillus* sp. (1) y *Leuconostoc lactis* (1). En la semilla las levaduras *K. marxianus* (2), *S. cerevisiae* (2) y *Saccharomyces paradoxus* (1) y las bacterias *Lactobacillus* sp. (2). *K. marxianus* se aisló de las 3 muestras estudiadas y correspondió al 70% del total de los aislados. *S. paradoxus* fue por primera vez aislada del inóculo del pulque. En lo que respecta a las BAL, las especies del genero *Lactobacillus* fueron las más abundantes (60%) en dichos sustratos.

Conclusiones. Se observó la persistencia o el reemplazo de algunas especies, de los diversos grupos microbianos durante el proceso de producción de pulque. A medida que se conozca la función e interacción de los consorcios microbianos en la fermentación del aguamiel, se podrán elaborar inóculos que garanticen la obtención de una bebida estandarizada, de buena calidad higiénica y con alto valor nutricional.

Agradecimiento. Al CONACYT por el financiamiento de este trabajo y a la Universidad Nacional Autónoma de México por su apoyo en la realización de los experimentos.

Bibliografía.

1. Lappe-Oliveras P., Moreno-Terrazas R., Arrizón-Gaviño J. Herrera-Suárez T., García-Mendoza A. y Gschaedler-Mathis A. 2008. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled *Agave* beverages. *FEMS Yeast Res.* 8: 1037-1052
- 2.- Escalante, A., Rodríguez, M. E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F. y Gosset, G. 2004. Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 235: 273-279.
- 3.- Barnett, J. A., Payne, R. W. y Yarrow, D. 2000. *Yeast: Characteristics and identification.* University Press. United Kingdom. 1105pp.
- 4.-Kurtzman, C. P. y Fell, J. W. 1998. *The Yeasts: A Taxonomic Study.* Elsevier, Netherlands. 1105pp.