



## ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD BACTERIANA DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL PULQUE, UNA APROXIMACIÓN POLIFÁSICA.

Martha Giles-Gómez<sup>1</sup>, Georgina Hernández, Marisol Córdova, Agustín López-Munguía, Guillermo Gosset, Francisco Bolívar y Adelfo Escalante\*. Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca. Mor. CP 62210. Tel/FAX (55)5622 7601. e-mail [adelfo@ibt.unam.mx](mailto:adelfo@ibt.unam.mx)

\*Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F. 04510.

*Palabras clave: Pulque, diversidad bacteriana, enfoque polifásico*

**Introducción.** El pulque es una bebida fermentada alcohólica tradicional que se obtiene a partir de la fermentación de la savia o aguamiel extraída de varias especies de maguey (*Agave atrovensis*, *A. americana*). Durante su elaboración se presentan tres tipos de fermentación: alcohólica, producción de etanol; ácida, producción de ácido láctico y acético; y viscosa, producción de un exopolisacárido (EPS) (1), características que hacen de esta bebida un ambiente naturalmente enriquecido a partir del cual se han aislado microorganismos de importancia industrial tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* y *Leuconostoc mesenteroides*, productores de etanol (dos primeros) y del EPS dextrana, respectivamente. Sin embargo, a pesar de la importancia industrial, económica y biotecnológica de esta bebida no existen reportes sobre el estudio de la dinámica microbiana durante la fermentación. El presente trabajo reporta el estudio de diversidad bacteriana presente durante el desarrollo de una fermentación de pulque bajo condiciones de laboratorio utilizando una aproximación polifásica.

**Metodología.** Para el desarrollo de la fermentación se colectó una muestra de aguamiel (AM) y pulque previamente fermentado de la localidad de Huitzilac, Morelos. Se desarrolló una fermentación en condiciones de laboratorio a una temperatura de 25°C durante seis horas. A partir de AM utilizado como sustrato para la fermentación, después de inocular con una muestra de pulque previamente fermentado (T0) y en muestras a las 3 y 6 horas de fermentación (T3 y T6, respectivamente), se analizó en número de bacterias lácticas (BL) y mesófilos aerobios totales (MAT) presentes por técnicas de cultivo tradicional; el análisis de la diversidad bacteriana a partir del ADNr 16S amplificado del metagenoma de cada una de las muestras; variaciones de pH, concentración de etanol, ácido láctico y ácido acético, concentración de sacarosa, glucosa y fructosa; análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB), determinación de viscosidad y así como también el tipo de azúcares componentes del EPS producido al final de la fermentación.

**Resultados y discusión.** Las cuentas totales de BL y MAT en AM fueron de  $3.2 \times 10^8$  y  $1.3 \times 10^7$  UFC/ml, respectivamente. Al final de la fermentación (T6) las cuentas observadas fueron  $1.5 \times 10^8$  y  $3.5 \times 10^7$  UFC/ml, respectivamente. La identificación de las BL y MAT aisladas y de las secuencias de ADNr 16S identificadas en cada una de las muestras indican que aunque las cuentas totales bacterianas totales permanecen relativamente constantes, se presentaron cambios en los

microorganismos detectados en cada una de las muestras. Así, en AM se detectó principalmente a *Leuconostoc mesenteroides*, *L. citreum* y *L. kimchi*, mientras que a partir de T0 se observó la presencia de varias especies de lactobacilos homofermentativos (*L. acidophilus*) y heterofermentativos. La presencia de *L. mesenteroides* y *L. citreum* en AM y en las muestras T0-T6, así como de *L. acidophilus*, sugiere que estos microorganismos juegan un papel importante como posibles iniciadores bacterianos de la fermentación. Se detectaron también en AM y durante la fermentación varias especies de bacterias Gram-negativas, dentro de las que destaca la presencia de algunas enterobacterias, las cuales prácticamente desaparecen, con excepción *Enterobacter agglomerans* presente en la muestra T6. El análisis por MEB de las muestras permitió observar una diversidad morfológica conformada por cocos agrupados en pares y cadenas rugosas, diferentes tipos de bacilos y muy pocas levaduras en AM, mientras que a partir de T0 y hasta T6, se observó un enriquecimiento de cocos agrupados en cadenas con superficie rugosa (posibles productores de EPS) y de levaduras.

El análisis por hidrólisis ácida y química del EPS en la muestra T6 indicó la presencia de un polímero compuesto por fructosa (posiblemente inulina o levana). Este resultado es de gran relevancia ya que hasta el momento solo se había reportado la presencia del polímero dextrana en diferentes muestras de pulque (2).

**Conclusiones.** El presente trabajo permitió determinar los cambios en la población bacteriana durante una fermentación de pulque bajo condiciones de laboratorio, siendo *L. mesenteroides*, *L. citreum* y *L. acidophilus*, microorganismos que pueden ser considerados como iniciadores bacterianos de la fermentación. Se determinó también por primera vez en el pulque la presencia de un EPS constituido por fructosa.

**Agradecimientos.** Se agradece el apoyo económico de CONACYT P46052-Z

### Bibliografía.

- Escalante, A., Flores, M. E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F. and G. Gosset. (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.
- Chellapandian, M., Larios, C., Sanchez-Gonzalez, M. and Lopez-Munguia, A. (1988). Production and properties of a dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from 'pulque', a traditional Aztec alcoholic beverage. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 51-56.