

Evaluación de temperaturas de congelación en la supervivencia de la microbiota del pulque

ARROYO-CRUZ, Celerino*† & REYNOSO-OCAMPO, Carlos Abraham

Universidad Tecnológica del Valle del Mezquital, carretera Ixmiquilpan-Capula, Col.El Nithl, Ixmiquilpan, Hgo. CP42300

Recibido 24 Enero, 2017; Aceptado 06 Marzo, 2017

Resumen

La congelación es el proceso de conservación originado por la reducción de la temperatura por debajo del punto de fusión del agua pura, este debe su poder conservador a la total eliminación del agua líquida por transformación en hielo (reducción de la actividad de agua), obstaculizando la actividad microbiológica y enzimática por el descenso de la temperatura que generalmente se lleva hasta un valor entre -10 y -20 °C. El presente trabajo estuvo orientado a evaluar el efecto de las temperaturas de congelación en la supervivencia de la microbiota presente en el pulque. Según la NMX-V-037-1972 el pulque es el líquido que se obtiene por fermentación alcohólica de aguamiel. Entre las variedades encontradas se seleccionó el maguey *Agave salmiana Xamini* por ser la de mayor rendimiento y la más adaptable a las condiciones climáticas de la región. La metodología consistió en someter al pulque a diferentes temperaturas debajo de 0° C por un periodo de 16 horas, posteriormente se descongelaron las muestras después del tiempo propuesto realizando análisis microbiológicos. Mediante la aplicación de un diseño experimental aleatorizado y utilizando la prueba estadística Chi cuadrada (X^2), con la finalidad de comprobar si existe diferencias significativas en cuanto a las características fisicoquímicas con respecto al tratamiento térmico del pulque. Se encontró que si existe diferencia significativa al aplicar los diferentes tratamientos térmicos.

Pulque, congelación, conservación

Abstract

Freezing is the conservation process caused by the reduction of temperature below the melting point of pure water, which owes its conservative power to the total elimination of liquid water by transformation into ice (reduction of water activity), hampering the microbiological and enzymatic activity by the drop in temperature which is generally carried to a value between -10 and -20 °C. The present work was oriented to evaluate the effect of the freezing temperatures on the survival of the microbiota present in pulque. According to NMX-V-037-1972 pulque is the liquid obtained by alcoholic fermentation of mead. Among the varieties found, the maguey *Agave salmiana Xamini* was selected because it is the one with the highest yield and the most adaptable to the climatic conditions of the region. The methodology consisted in subjecting the pulque to different temperatures below 0 ° C for a period of 16 hours, after which the samples were thawed after the proposed time by performing microbiological analyzes. By means of the application of a randomized experimental design and using the statistical test Chi square (X^2), in order to verify if there are significant differences in the physicochemical characteristics with respect to the heat treatment of the pulque. It was found that if there is significant difference when applying the different thermal treatments.

Pulque, freezing, conservation

Citación: ARROYO-CRUZ, Celerino & REYNOSO-OCAMPO, Carlos Abraham. Evaluación de temperaturas de congelación en la supervivencia de la microbiota del pulque. Revista de Simulación y Laboratorio. 2017, 4-10: 42-48.

*Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: carroyo@utvm.edu.mx)

†Investigador contribuyendo como primer autor

Introducción

El pulque es una bebida tradicional Mexicana que se obtiene por la fermentación de la savia azucarada conocida como aguamiel, se caracteriza por ser una bebida alcohólica, blanca, con olor fuerte y viscosa, su proceso de obtención se lleva a cabo a través de una fermentación que da inicio en el maguey, donde se encuentran microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de exopolisacáridos. Estos microorganismos transforman de manera natural parte de los azúcares disponibles en el aguamiel, sin embargo el proceso se acelera por la adición de un inóculo iniciador llamado semilla (Arroyo y col., 2016).

García y col. (2004) mencionan que más de 30 microorganismos han sido identificados en el pulque, principalmente de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Sarcina*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Diplobacter*, *Bacillus*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Picchia*, *Candida* (Antes *Torulopsis*) *Rhodotorula* y *Mycoderma*. Se ha mencionado en varias investigaciones que la bacteria *Zymomonas mobilis*, es la responsable del inicio de la fermentación alcohólica.

Existen trabajos de caracterización específicamente de microorganismos tales como una cepa de *S. Cereviceae* a la que se le dio el nombre de *S. Carbajali*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus* sp. *Leuconostoc mesenteroides* es la bacteria a la que se le atribuye la producción de dextranas a partir de sacarosa. La caracterización del pulque es un tema complejo debido precisamente a que no es un solo microorganismo quien lo produce, sino que se ve afectado también por el tipo de maguey del cual proviene, la tierra donde se cultivo y el clima donde crece, además de la época de recolección y las prácticas de inocuidad llevadas a cabo durante su proceso y fermentación.

El maguey pulquero o *Agave salmiana Xamini* es la especie de maguey más robusta y de mayor producción de aguamiel, sus hojas miden aproximadamente 2.5 m. De esta especie se obtiene el pulque, para ello antes de que se desarrolle el tallo foral se elimina este y se hace en su sitio una cavidad donde se almacena la savia, la cual por fermentación produce pulque (Flores, 2006).

Existen pocos métodos de conservación del pulque, muchos de ellos son por pasteurización y otros, por adición de alcohol. El primer método implica someter al pulque a temperaturas de pasteurización, con esta metodología se detiene la fermentación del mismo lo cual brinda la posibilidad de poder enlatarlo y así transportarlo a grandes distancias. El segundo método consiste en adicionar alcohol (aguardiente de caña al 85 %) logrando conservar pulque por poco tiempo.

Existen muchas técnicas para la conservación de alimentos, una de las más utilizadas es la Congelación, el fundamento de ésta se basa en la solidificación del agua durante el proceso, generando una alta concentración de sólidos solubles lo que provoca una baja en la cantidad de agua libre.

La congelación es un medio excelente para mantener casi inalteradas durante un tiempo prolongado las características originales de alimentos perecederos. Éste tipo de conservación radica en la disminución de la temperatura, generalmente entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo cual permite que las reacciones bioquímicas sean más lentas y además inhibe la actividad microbiana, generando el estado de latencia de ésta, lo que no significa que los microorganismos estén muertos. Durante el proceso se produce la solidificación del agua libre presente en el alimento, es decir, el agua contenida es transformada en hielo a una temperatura habitual de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, disminuyendo así la actividad de agua del sustrato.

Las bajas temperaturas de congelación pueden causar trastornos en el metabolismo microbiano, incrementándose por consiguiente los requerimientos nutricionales de los microorganismos. El efecto letal de las bajas temperaturas se debe a la desnaturalización y floculación de las proteínas celulares debido al efecto salino que tiene lugar durante la congelación y al daño físico a la membrana celular causado por puncturación de los cristales de hielo que se forman durante el proceso de congelación. En términos generales el efecto letal de las bajas temperaturas sobre los microorganismos depende de los siguientes factores: a) Clase de microorganismos y su estado físico.

Las células vegetativas son menos resistentes que las esporas, y en la etapa de crecimiento las fase de crecimiento logarítmico son menos resistentes que cuando se encuentran en la fase estacionaria, b) Temperatura de congelación., almacenamiento y congelación. Se ha demostrado que los microorganismos mueren rápidamente cuando la congelación es lenta y en especial si la temperatura se mantiene entre -1 y -5° C, pues se forman grandes cristales de hielo y mayormente extracelulares y el efecto salino se hace mas notable. La experiencia práctica ha sido indicativa de que la mortalidad asociada con la congelación lenta es del orden del 50 al 70% de la población original presente.

De igual manera el almacenamiento a temperaturas moderadamente altas puede inducir recristalización y mayor mortalidad que el almacenamiento a temperaturas bajas. Es de notar que la congelación no es un método de conservación dirigido a reducir la carga microbiana de los alimentos, sino a preservar su condición, deteniendo el crecimiento bacteriano y reduciendo las reacciones bioquímicas. Por lo tanto la congelación lenta no es recomendable, especialmente por que afecta la textura en forma significativa.

Por otro lado la reducción de la población bacteriana durante la congelación lenta (50%), es muy moderada y poco significativa, lo cual se puede demostrar con cifras.

La descongelación lenta produce un menor daño celular que la rápida, sin embargo si esta es excesivamente lenta puede haber crecimiento microbiano durante la descongelación e incluso aumentar la población a niveles superiores a los presentes antes de congelar. La descongelación rápida produce mayor mortalidad pero incrementa las perdidas de agua por sinéresis y afecta la textura en mayor grado.

Tiempo de almacenamiento congelado. A medida que aumenta el tiempo de almacenamiento congelado la población microbiana decrece más rápido al principio y paulatinamente después

Bajo este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de bajas temperaturas (-3 °C, -8°C, -16°C y -20°C) como un medio de conservación sobre las características microbiológicas del pulque (*Agave salmiana Xamini*).

Materiales y métodos

Se realizó una caracterización microbiológica de pulque de maguey *Agave salmiana Xamini* del municipio de Cardonal, Hidalgo, México. Dicho sitio se ubica en la zona centro de la entidad en la llamada zona otomí entre los 20°37' latitud norte y los 99° 07' longitud oeste y a una altitud de 2048 m.s.n.m.

Los muestreos se realizaron en bolsas estériles de 500 ml, mismas que fueron refrigeradas. Posteriormente se realizaron los análisis en la cuarta etapa de fermentación denominada corrida, con un periodo de fermentación de 48 horas, esta es la etapa final y se comercializa en la zona.

Tratamientos y evaluación microbiológica

Una vez obtenida la muestra, estas se sometieron a un tratamiento térmico a bajas temperaturas (-3°, -8°, -16° y -20°C) por un periodo de 16 horas. Una vez finalizado el periodo propuesto, se procedió a la descongelación de las muestras (a temperatura ambiente) y se llevaron a cabo los análisis antes mencionados.

Se realizó análisis al producto antes de someterse a tratamiento térmico, esto con la finalidad de conocer las características microbiológicas del producto y con ello verificar si este cumple con las especificaciones establecidas por la Norma. En la siguiente tabla se muestran las pruebas microbiológicas que se le realizan al producto (pulque) de acuerdo a la normatividad establecida.

Determinación	Técnica	Normatividad
Hongos y levaduras	Por estrías	NOM-111-SSA1-1994
Cuenta total estándar	Vertido en placa	NOM-092-SSA1-1994
Coliformes Totales y Fecales (Presuntiva y confirmativa)	Por el NMP	NOM-112-SSA1-1994

Tabla 1 Pruebas microbiológicas de acuerdo a la normatividad establecida

Fuente: EQUIPO 2/ PROCBIO, 2015

Diseño experimental

Los tratamientos fueron definidos con base a un diseño completamente al azar, con tres repeticiones por unidad. El análisis de las respuestas contemplo un análisis de varianza, con una prueba estadística χ^2 (Chi Cuadrada) para evaluar si existía diferencia significativa entre el pulque fresco y sometido a los diferentes tratamientos térmicos. Planteando las siguientes hipótesis:

H₀: No existe efecto de los diferentes tratamientos térmicos en las características microbiológicas del pulque.

H₁: Existen diferencias significativas al utilizar diferentes tratamientos térmicos como un medio de conservación sobre las características microbiológicas del pulque.

Para este diseño se utilizaron los siguientes valores:

$$A = 0.05$$

$$\chi^2_t = 1.55$$

Una vez realizados los cálculos se estableció si existe diferencia significativa entre el pulque fresco y el pulque sometido a los diferentes tratamientos térmicos.

Resultados y discusión

Temperatura (°C)					
Dilución	20°C	-3°C	-8°C	-16°C	-20°C
10-1	10000	6200	4900	4340	50
10-2	100000	53800	48000	36100	300
10-3	1000000	497000	435000	261000	1000
UFC/MI	370000	170000	162633.3	100480	450

Tabla 2 Resultados obtenidos en hongos y levaduras en función de la NOM-111-SSA1-1994 en pulque fresco y con tratamiento térmico

En la tabla 2, se presentan los valores promedio de las UFC obtenidas durante la investigación como resultado de someter muestras de pulque a diferentes condiciones de temperaturas.

Temperatura (°C)	Repetición			Media
	1	2	3	
-3	170,000	5400	65	58488
-8	162633	5400	5	56013
-16	100480	813	-	50647
-20	450	-	-	450

Tabla 3 Resumen de UFC/ml de mohos y levaduras

Se puede observar en la tabla 3 el resultado obtenido al someter el pulque a las temperaturas establecidas en los experimento por 10, 17 y 23 días.

Como se puede observar en la figura 1 se muestra un descenso de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) conforme a las temperaturas que disminuyen, lo cual nos indica que existe una muerte de la Microbiota (Hongos y Levaduras) a una temperatura de -20°C. Díaz (2008) menciona que el crecimiento de los hongos y levaduras depende de dos factores muy importantes que son el pH y la temperatura, para el desarrollo de esto se necesita una temperatura 10 como temperatura mínima y 40 como máxima.

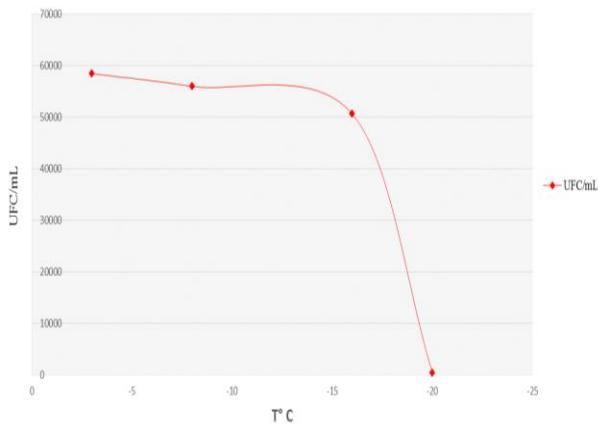


Grafico 1 Comportamiento del descenso de UFC de hongos y levaduras

En el recuento de mohos y levaduras mostró una disminución en UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias) hasta la muerte como se muestra en las tablas 1 y 2. Debido al tratamiento térmico al que se sometió el pulque la posibilidad de que desarrolle dichos microorganismos es nula. Asociado a esto, la muerte de mohos y levaduras beneficia el desarrollo de otros microorganismos ante esto se muestran esquemáticamente los resultados obtenidos del análisis de cuenta total estándar de microorganismos mesófilos aerobios (tabla 4).

UFC/ml				
Dilución	-3 °C	-8°C	-16°C	-20°C
10 ⁻¹	2,320	1700	1300	400
10 ⁻²	16000	12000	9000	600
10 ⁻³	82000	29000	22000	-
10 ⁻⁴	360000	60000	50000	-
10 ⁻⁵	1500000	300000	200000	-

Tabla 4 Resultados obtenidos en cuenta total estándar en función de la NOM-092-SSA1-1994 en pulque fresco y con tratamiento térmico

En un principio se observó la disminución drástica de los microorganismos (tabla 4) esto debido a los diferentes tratamientos térmicos (-3°C, -8°C, -16°C y -20°C). Posteriormente se observó la muerte de los microorganismos a bajas temperaturas (-20°C), esperando que esta actividad continuara como sucedió con mohos y levaduras. Sin embargo, en la determinación final (tabla 4) se observó un ligero desarrollo de microorganismos en las temperaturas más bajas (-20°C).

Fuente	Gt	SS	MS	F (ANOVA)
Tratamientos	3	9,758,758	3,252,919	0.55
Error	8	46,848,866	5,856,108	
Total	8	56,607,625		

Tabla 5 Resultados de UFC/ml de bloques al azar de la prueba de mohos y levaduras (Anova)

Fuente	Gt	SS	MS	F (ANOVA)
Tratamientos	3	115,594,066	38,531,355	1.3901
Error	8	221,732,800	27,716,600	
Total	8	337,326,866		

Tabla 6 Resultados de UFC/ml de bloques al azar de la prueba de cuenta total estándar (Anova)

En función de un diseño experimental y una prueba estadística de análisis de varianza (ANOVA) se compararon las pruebas microbiológicas anteriores en donde se encontró que de acuerdo a la hipótesis planteada si existe diferencia significativa entre la carga microbiana del pulque fresco (20 ° C) en comparación al sometido a los diferentes tratamientos térmicos, esto debido a que los microorganismos cuentan con diferentes factores para su óptima proliferación siendo uno de los más importantes la temperatura.

Por lo tanto, se determina que a bajas temperaturas el pulque si muestra una diferencia significativa en cuanto a la población microbiana del pulque fresco en comparación con el sometido a los diferentes tratamientos térmicos (3°C, -8°C, -16°C y -20°C).

Conclusiones

La evaluación de temperaturas de congelación en la supervivencia de la microbiota del pulque indica que efectivamente si existe una disminución de la cantidad de microorganismos presentes originalmente en una muestra de pulque, sin embargo los resultados no son definitivos ya que se debe recomendar realizar un estudio más profundo de este efecto, considerando la velocidad de congelación y la identificación exacta de la microbiota del pulque.

Se observó que en algunas de las repeticiones todavía se contaba con un valor numérico de microorganismos considerable, lo cual indica que existen microorganismos que resisten las bajas temperaturas (Psicrófilos); el desarrollo de estos se debe a que una vez eliminados los microorganismos (mohos y levaduras) que entran en competencia por sus sustratos los microorganismos restantes se adaptaron al medio permitiendo su proliferación.

Es importante reiterar que la congelación no es un método de conservación dirigido a reducir la carga microbiana de los alimentos, sino a preservar su condición, deteniendo el crecimiento bacteriano y reduciendo las reacciones bioquímicas. La aplicación de bajas temperaturas permiten incrementar la vida útil del pulque sin afectar las características fisicoquímicas más importantes, por lo se considera que por tiempo y costos que implican someter esta bebida a un tratamiento térmico la temperatura idónea para la conservación del pulque es - 3°C esto en función de los resultados que arrojen futuras investigaciones y pruebas estadísticas.

Referencias

- Arroyo, C. C., Reynoso O. C. A. (2016). Efecto de las bajas temperaturas en las características fisicoquímicas del pulque. *Revista de ciencias naturales y agropecuarias.* (3) 6: 19-24.
- Corona, D. P. (2006). El pulque, la cultura y la salud. Editorial SAGARPA. México.
- Díaz, C. A. C. (2008). Comportamiento de *Salmonella*, *Listeria Monocytogenes*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus* en el pulque y aguamiel. Tesis Químico en Alimentos, Universidad Autónoma de Hidalgo, México.
- Erlwein, S. (2009). Proceso de elaboración del pulque, su importancia económica y su concepción social en Apan, Hidalgo. Disponible en: <http://www.enah.edu.mx/publicaciones/documentos/32.pdf>. Fecha de consulta: 04 de diciembre 2015.
- Flores, M. A. (2006). Gestión de calidad de una miel obtenida a partir de aguamiel de maguey pulquero (*Agave salmiana*). Disponible en: <http://www.informatica.sip.ipn.mx/colmex/congresos/morelia/MEMORIAS%202006/TRABAJOS%20EN%20EXTENSO/E-426.pdf>. Fecha de consulta: 04 de diciembre 2015.

García G., Quintero R., López M. (2004). Biotecnología alimentaria. Bebidas alcohólicas no destiladas. Ed, Limusa. S.A. de C.V. México.

Herrera, A. (1879). Nuevo procedimiento para la conservación del pulque. Editorial Tip. Literaria de F. Mata. México.