



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

Determinación de la sucesión de las comunidades de levaduras y de los cambios fisicoquímicos durante la elaboración de pulque comercial de la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala, México

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RODRIGO ARREDONDO FERNÁNDEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Patricia Ester Lappe Oliveras
Instituto de Biología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. María del Carmen Wachter Rodarte
Facultad de Química, UNAM

Dra. Sylvie Le Borgne
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

TUTOR INVITADO: Dr. Rubén Moreno Terrazas
Universidad Iberoamericana

Ciudad Universitaria, CD. MX., mayo de 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

Determinación de la sucesión de las comunidades de levaduras y de los cambios fisicoquímicos durante la elaboración de pulque comercial de la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala, México

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

RODRIGO ARREDONDO FERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Patricia Ester Lappe Oliveras
Instituto de Biología, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dra. María del Carmen Wachter Rodarte
Facultad de Química, UNAM

Dra. Sylvie Le Borgne
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Cuajimalpa

TUTOR INVITADO: Dr. Rubén Moreno Terrazas
Universidad Iberoamericana

Ciudad Universitaria, CD. MX., mayo de 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

OFICIO CPCB/248/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de noviembre de 2022 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de SISTEMÁTICA del estudiante ARREDONDO FERNÁNDEZ RODRIGO con número de cuenta 310113966 con la tesis titulada “Determinación de la sucesión de las comunidades de levaduras y de los cambios fisicoquímicos durante la elaboración de pulque comercial de la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala, México”, realizada bajo la dirección de la DRA. PATRICIA ESTER LAPPE OLIVERAS quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER
Vocal: DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY
Vocal: DRA. PATRICIA VÉLEZ AGUILAR
Vocal: DR. CÉSAR IVÁN OJEDA LINARES
Secretario: DRA. SYLVIE LE BORGNE

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de marzo de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Gracias al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme la oportunidad de cursar la Maestría.

Por su apoyo económico a:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de CVU: 1003397

A mi directora de tesis:

Dra. Patricia Ester Lappe Oliveras

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Sylvie Le Borgne

Dr. Rubén Dario Moreno Terrazas

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte

Agradecimientos a título personal

A la Dra. Sylvie Le Borgne, Ana Lilia Juárez Vázquez y al equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología y Procesos de la UAM Unidad Cuajimalpa por su ayuda y orientación en la realización de técnicas moleculares indispensables para este trabajo.

Al Dr. Rubén D. Moreno Terrazas y al equipo de trabajo de la Universidad Iberoamericana por su ayuda en parte de la evaluación química de este trabajo.

Al Dr. César Ojeda Linares, al equipo del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, UNAM y al M. en C. Jared Mauricio López Téllez por su apoyo en el análisis de los compuestos volátiles y de otros aspectos clave para este proyecto.

Al equipo de trabajo del Laboratorio Nacional de Biodiversidad del Instituto de Biología, UNAM, por su apoyo en la secuenciación para la identificación de las especies de levaduras encontradas.

Al señor Guillermo Ramírez Flores propietario y productor de pulque de la Hacienda Xochuca por otorgar las facilidades de realizar este trabajo dentro de su sistema de producción.

A los miembros del jurado:

Dr. Robert Arthur Bye Boettler

Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

Dra. Patricia Vélez Aguilar

Por sus valiosas aportaciones, comentarios y observaciones para la culminación de este trabajo

Dedicatoria

A mi madre, Imelda Fernández Flores. Sin duda es producto de tus enseñanzas, especialmente aquella de mantenerse firme aún cuando las circunstancias no parecen favorables. Te agradezco todo el apoyo y cariño.

A mi padre, Urbano Arredondo Rodríguez, de quien aprendí los valores de la responsabilidad e integridad.

A mi hermano, Yahir Arredondo Fernández, pues llegó el momento en el que aprendemos uno de otro.

A mis amistades, Salma Gómez, Eduardo Torres, Oscar Jiménez, Agustín Guzmán, Faride Ugalde. Les agradezco sus consejos, llamados de atención y cariño que me mantuvieron en el camino correcto, nunca me sentí solo gracias a ustedes. Tienen mi lealtad y gratitud, siempre.

A Juan Cano, por acompañarme al final de este episodio en mi vida. Que la lealtad y la cooperación mutua e incondicional nos hagan un equipo más fuerte con el tiempo y alcancemos nuevos horizontes personales y profesionales.

Si viven en el mundo, están obligados a ver, tocar, escuchar, aprender y amar cosas.

-Phillp Pullman "El catalejo lacado" (2000)

En una ocasión salí de la ciudad y a la vuelta, en un punto en el que la tierra se elevaba y veía el mar a la izquierda y toda la carretera por delante, de pronto sentí que estaba en el cielo. En realidad el lugar era exactamente el mismo que el que había pasado hacía algunos minutos, pero había cambiado mi forma de verlo.

-Yann Martel "Vida de Pi" (2001)

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
FERMENTACIÓN.....	6
LAS LEVADURAS.....	8
<i>Definición.....</i>	<i>8</i>
<i>Ciclo de vida.....</i>	<i>9</i>
<i>Distribución</i>	<i>10</i>
<i>Las levaduras y la fermentación.....</i>	<i>11</i>
<i>Domesticación.....</i>	<i>12</i>
<i>Actividad probiótica</i>	<i>12</i>
<i>Levaduras silvestres</i>	<i>13</i>
PRODUCTOS FERMENTADOS.....	13
ECOLOGÍA MICROBIANA DE LOS PRODUCTOS FERMENTADOS	14
<i>Sucesión biótica en los alimentos fermentados.....</i>	<i>15</i>
ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES DE MÉXICO.....	18
EL PULQUE	18
MAGUEYES PULQUEROS.....	19
EL AGUAMIEL.....	21
ELABORACIÓN DEL PULQUE.....	22
BREVE HISTORIA DEL PULQUE E IMPORTANCIA CULTURAL.....	25
IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	28
IMPORTANCIA NUTRICIONAL	30
JUSTIFICACIÓN	31
2. OBJETIVOS	32
<i>Objetivo general.....</i>	<i>32</i>
<i>Objetivos particulares</i>	<i>32</i>
3. ANTECEDENTES	33
4. HIPÓTESIS	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE ELABORACIÓN DE PULQUE EN LA HACIENDA DE XOCHUCA.....	36

OBTENCIÓN DE MUESTRAS	36
<i>Localidad de muestreo</i>	36
ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	38
DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y DE LA SUCESIÓN MICROBIANA.....	45
ESTUDIOS FISICOQUÍMICOS	45
6. RESULTADOS	48
<i>Descripción del proceso de elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca, Tlaxcala, México.</i>	48
ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	55
DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y DE LA SUCESIÓN MICROBIANA.....	64
ESTUDIOS FISICOQUÍMICOS	67
7. DISCUSIÓN	79
8. CONCLUSIONES	92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	109
ANEXO 1 CRONOLOGÍA DE LOS ESTUDIOS MICROBIOLÓGICOS EN PULQUE	109
ANEXO 2 MICROORGANISMOS ENCONTRADOS EN DIFERENTES ESTUDIOS DE PULQUE	110
ANEXO 3. ESPECIES IDENTIFICADAS	114

Índice de tablas

Tabla 1- Producción de maguey pulquero por estado durante 2021	29
Tabla 2- Muestras obtenidas durante el proceso de elaboración y fermentación de pulque comercial de la Hacienda San Diego de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala	37
Tabla 3- Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas consideradas para la identificación de las levaduras	40
Tabla 4- Cuantificación de levaduras y parámetros fisicoquímicos tomados <i>in situ</i> de las muestras obtenidas.	56
Tabla 5-Resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas considerados para la identificación fenotípica de los aislados de levaduras obtenidos.....	58
Tabla 6-Identificación molecular	62
Tabla 7-Diversidad de la comunidad de levaduras de cada muestra con su respectivo índice de diversidad alfa (índice de Shannon).	65
Tabla 8- Parámetros fisicoquímicos tomados <i>in situ</i> durante la elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca	71
Tabla 9-Identidad de los compuestos volátiles encontrados por GC-MS.	73
Tabla 10- Cronología de los estudios microbiológicos en pulque.....	109
Tabla 11-Microorganismos encontrados en diferentes estudios de pulque.....	110

Índice de figuras

Figura 1- Reacción de la fermentación alcohólica llevada a cabo por organismos como la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Figura 2- Ciclo de vida de una levadura típica, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
Figura 3-Estructura de un maguey pulquero.	20
Figura 4- La introducción del ferrocarril que impulsó a la industria del pulque a finales del siglo XIX y parte del siglo XX.	27
Figura 5-Pruebas de fermentación de carbohidratos utilizando tubos de Durham.....	43
Figura 6- Elaboración de pulque comercial en la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala.	49
Figura 7- Elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca (Continuación)	51
Figura 8-Elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca (continuación)	53
Figura 9-Elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca (final)	54
Figura 10-Cambio en el conteo de las UFC/mL de las levaduras aisladas.	55
Figura 11-Diversidad de morfologías coloniales en medio de cultivo WL+cloranfenicol....	57
Figura 12-Dendrograma que representa el recambio de especies de levaduras entre muestras, formando grupos de acuerdo con su parecido en diversidad	66
Figura 13-Cambios en la concentración porcentual de los metabolitos principales del pulque a lo largo de su proceso de elaboración.	72
Figura 14- Composición porcentual de los compuestos volátiles encontrados en cada muestra estudiada durante la producción de pulque.....	77
Figura 15-Resumen gráfico de la sucesión de las comunidades de levaduras y los cambios fisicoquímicos.	78

Resumen

El pulque es una bebida fermentada tradicional mexicana con una gran relevancia histórica, cultural y nutrimental. Se elabora por la fermentación del aguamiel, que es la savia azucarada de especies de magueyes pulqueros como *Agave salmiana*. En este proceso de fermentación participan comunidades de bacterias y levaduras que interaccionan metabólicamente para dar lugar a las propiedades fisicoquímicas y organolépticas que distinguen al pulque. Al aislar las comunidades de levaduras que se encuentran en cada etapa de la elaboración del pulque, se pueden describir procesos, como el de la sucesión ecológica, que ayuda a comprender la influencia de los cambios fisicoquímicos asociados al producto final sobre la diversidad de las comunidades microbianas y viceversa. Además, estos aislados se pueden caracterizar y así encontrarse especies de interés biotecnológico. Derivado de lo anterior, este trabajo tuvo como objetivo estudiar la sucesión de la comunidad de levaduras y los cambios fisicoquímicos a lo largo del proceso de elaboración y fermentación del pulque en la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala, México.

Para ello, se obtuvieron muestras de cada una de las etapas de elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca a finales de febrero de 2020. De cada muestra se realizó un aislamiento *in situ* de las levaduras en medio selectivo, así como la medición de pH y temperatura. En el laboratorio, se realizó la cuantificación de las unidades formadoras de colonias y el aislamiento e identificación de los cultivos axénicos por taxonomía polifásica, considerando sus características fenotípicas y genotípicas. La caracterización química por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), y la determinación y cuantificación de los compuestos volátiles por la técnica de GC-masas.

Respecto a los cambios en las comunidades de levaduras aisladas, en las primeras etapas del proceso se observó una mayor diversidad de especies no-*Saccharomyces* como *Candida boidinii*, *Clavispora lusitaniae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Kazachstania gamospora* y

Zygosaccharomyces bailii. Esta diversidad disminuyó a medida que se consumían los azúcares y aumentaba la concentración de etanol. Las especies persistentes al final del proceso fueron *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus* y *Starmerella stellata*.

En cuanto a los cambios de los parámetros fisicoquímicos, se observó que el valor de pH descendió de 5 en el aguamiel a 3 después de 72 horas de fermentación. La concentración de los ácidos láctico y acético se mantuvo en valores <1%. En general, la concentración de la mayoría de los azúcares disminuyó a lo largo de la fermentación y el etanol alcanzó 5.5% en la etapa final. En cuanto a la diversidad de compuestos volátiles, se encontraron alcoholes como el alcohol fenético y ésteres como el dietil succinato que contribuyen a las propiedades organolépticas del pulque.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen al conocimiento microbiológico del pulque y tienen el potencial de enriquecer las bases que permiten asegurar la calidad y seguridad de esta bebida y que, además, sirven para promover una actualización de su normatividad conservando la identidad tradicional de su proceso de elaboración.

Palabras clave: pulque, fermentación, sucesión de levaduras, cambios fisicoquímicos.

Abstract

Pulque is a traditional Mexican fermented drink with great historical, cultural, and nutritional relevance. It is made by fermenting mead, which is the sugary sap of pulque maguey species such as *Agave salmiana*. In this fermentation process, communities of bacteria and yeasts participate that interact metabolically to give rise to the physicochemical and organoleptic properties that distinguish pulque. By isolating the yeast communities found in each stage of pulque production, processes can be described, such as ecological succession, which helps to understand the influence of physicochemical changes associated with the final product on the diversity of the communities. microbial and vice versa. In addition, these isolates can be characterized and thus species of biotechnological interest can be found. Derived from the above, this work aimed to study the succession of the yeast community and the physicochemical changes throughout the process of elaboration and fermentation of pulque at the Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala, Mexico.

To do this, samples were obtained from each of the stages of pulque elaboration at the Hacienda de Xochuca at the end of February 2020. In situ isolation of the yeasts was carried out in a selective medium, as well as pH measurement. and temperature. In the laboratory, the quantification of the colony-forming units and the isolation and identification of the axenic cultures were carried out by polyphasic taxonomy, considering their phenotypic and genotypic characteristics. The chemical characterization by the technique of high-resolution liquid chromatography (HPLC), and the determination and quantification of the volatile compounds by the technique of GC-mass.

Regarding the changes in the isolated yeast communities, a greater diversity of non-*Saccharomyces* species such as *Candida boidinii*, *Clavispora lusitaniae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Kazachstania gamospora* and *Zygosaccharomyces bailii* was observed in the early stages of the process. This diversity decreased as sugars were consumed and ethanol concentration increased. The species that persisted at the end of the process were *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus* and *Starmerella stellata*.

Regarding the changes of the physicochemical parameters, it was observed that the pH value decreased from 5 in the mead to 3 after 72 hours of fermentation. The concentration of lactic and acetic acids was maintained at values <1%. In general, the concentration of most sugars decreased throughout the fermentation and ethanol reached 5.5% in the final stage. Regarding the diversity of volatile compounds, alcohols such as phenethyl alcohol and esters such as diethyl succinate were found to contribute to the organoleptic properties of pulque.

The findings obtained in this work contribute to the microbiological knowledge of pulque and have the potential to enrich the foundations for ensuring the quality and safety of this beverage, and also serve to promote the updating of its regulations while preserving the traditional identity of its production process.

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos fermentados son aquellos que se producen por la actividad metabólica de las comunidades microbianas presentes en la materia prima con la que se elaboran y en el ambiente circundante, que sintetizan ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos, ésteres, entre otros. Estos compuestos transforman las materias primas, haciendo que su textura, color, aroma, sabor y valor nutricional, se vuelvan más atractivos para el consumo humano, logrando su aceptación cultural y social (Steinkraus, 1997; Tamang et al., 2016).

Estos productos son el resultado de procesos ecológicos constituidos por las interacciones bióticas y abióticas, eventos de ensamblaje y sucesión al interior de las comunidades microbianas que los caracterizan. Por su complejidad, se ha iniciado una tendencia para que sean usados como modelos ecológicos que sirvan para entender el comportamiento e identidad de tales comunidades (Scott & Sullivan, 2008; Wolfe & Dutton, 2015).

Al aprender a controlar las condiciones ambientales que favorecen el proceso de fermentación, muchas culturas alrededor del mundo han podido crear un variado mosaico de alimentos fermentados. Por ejemplo, en México los productos fermentados tradicionales generalmente son bebidas que se elaboran principalmente con maíz, pulpa y jugo de frutas, savia de plantas, y cacao (Escamilla-Hurtado & Escamilla-Hurtado, 2007).

Entre ellos, uno de los más antiguos es el pulque, una bebida ligeramente alcohólica de origen prehispánico con un alto valor cultural y nutricional. Esta se elabora a partir de la fermentación del aguamiel, savia extraída de los agaves pulqueros maduros que son cultivados principalmente en las regiones con clima cálido, escasas lluvias y suelos pobres en nutrientes de los estados de Hidalgo, Tlaxcala, México, Puebla, Querétaro, Oaxaca y Ciudad de México. Desde la Conquista, la producción de pulque ha pasado

por varios eventos históricos que han impactado de diferentes formas su producción, valor económico y social (Godoy et al., 2003; Moreno-Terrazas et al., 2017)

La caracterización de la microbiota de los productos fermentados tradicionales se ha orientado a buscar posibles beneficios a la salud y utilidades biotecnológicas para la industria, sin embargo, son pocos los trabajos que consideran a estas comunidades de microorganismos como reservorios bioculturales resultantes de una amplia variedad de prácticas tradicionales para elaborar un producto como el pulque (Ojeda-Linares et al., 2021)

Es entonces que, el pulque, al ser es una bebida icónica de México que actualmente está proceso de revalorización como un alimento funcional con alto valor cultural, y en la que conviven diversas comunidades de microorganismos, donde las levaduras contribuyen con la transformación de las condiciones fisicoquímicas de su entorno; al observar como se desarrolla su particular proceso de sucesión, identificar polifásicamente a los miembros que componen las comunidades de levaduras y describir los cambios fisicoquímicos durante la elaboración tradicional de esta bebida, se contribuye a enriquecer el conocimiento de la diversidad microbiana de esta bebida como un importante recurso biocultural.

Fermentación

En la naturaleza existen varias alternativas para que los organismos obtengan energía para su desarrollo, una de ellas es la fermentación. Esta se define como un proceso catabólico en el que un compuesto orgánico actúa como donador y otro como aceptor de electrones, produciendo moléculas de ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato (Figura 1). Los productos obtenidos pueden ser dióxido de carbono, butanol, etanol, ácido acético, ácido láctico, ácido butírico dependiendo del microorganismo fermentador, del sustrato fermentado y de las condiciones ambientales. Generalmente es llevada a cabo por microorganismos anaerobios, estrictos o facultativos como las levaduras; y microorganismos microaerófilos, como las bacterias ácido-lácticas (BAL), que pueden fermentar en condiciones de poco oxígeno y que tienen una amplia

distribución ecológica en hábitats como el tracto digestivo animal y productos fermentados (Campbell & Farrell, 2010; Ciani et al., 2008; Madigan et al., 2015)

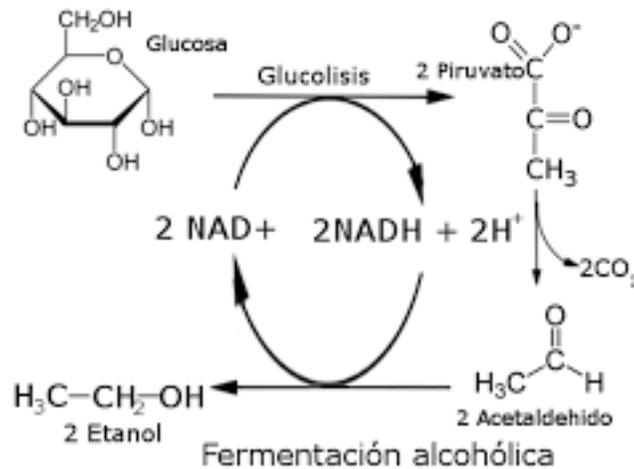


Figura 1- Reacción de la fermentación alcohólica llevada a cabo por organismos como la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son las responsables de la fermentación láctica, transforman los azúcares del sustrato en ácido láctico y reducen el pH, inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos que pueden descomponer el alimento o producir enfermedades como las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* (Migula, 1895) Castellani & Chalmers, 1919, *Campylobacter jejuni* (Jones et al., 1931) Véron & Chatelain, 1973, *Shigella flexneri* Castellani & Chalmers, 1919 o *Salmonella typhimurium* (Loeffler, 1892) Castellani & Chalmers, 1919. Estas se pueden clasificar en homolácticas, aquellas que producen únicamente ácido láctico como producto de la fermentación y heterolácticas. Entre los géneros más reconocidos de este grupo se encuentran *Alkalibacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella* (Steinkraus, 1997; Tamang et al., 2016).

Generalmente, la producción de etanol está asociada generalmente a levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* (Desm.) Meyen que, en condiciones anaerobias, transforman rápidamente los azúcares en etanol evitando el crecimiento de otros microorganismos

por su propiedad germicida. Este proceso también es llevado a cabo por bacterias como *Zymomonas mobilis* (Lindner, 1928) Kluyver & van Niel, 1936, que a través de la vía Etner-Doudoroff, que cataboliza glucosa, sacarosa y fructuosa para obtener etanol, ácido láctico y CO₂, todo en condiciones anaerobias (Conway, 1992; García-Ortega & Ponce-Rivas, 2003; Steinkraus, 1997)

Si la fermentación alcohólica no se realiza en condiciones anaeróbicas, bacterias del género *Acetobacter* pueden oxidar al alcohol y convertirlo en ácido acético, popularmente conocido como vinagre. Los alimentos con este compuesto son considerados seguros sanitariamente, pues es bacteriostático, incluso bactericida dependiendo de su concentración, entre ellos se encuentran distintos tipos de vinagre, como el vinagre de vino (vino tinto y blanco), vinagre de frutas (manzana, piña, etc.), entre otros (Steinkraus, 1997).

Las levaduras

Definición

Las levaduras se pueden definir como aquellos hongos cuyo crecimiento asexual resulta predominantemente de la yema o fisión, y que no forman sus estados sexuales dentro o sobre un cuerpo fructífero, tienen una amplia distribución y capacidad de colonizar ambientes terrestres, aéreos y acuáticos gracias a su adaptabilidad fisiológica (Kurtzman et al., 2011; Rodrigues et al., 2006). La incorporación de nuevas tecnologías y métodos de identificación, así como la tendencia de investigar nuevas especies de levaduras en distintos sustratos ha resultado en el reconocimiento de 354 géneros y más de 2000 especies aceptadas de levaduras distribuidos en el *Phylum Ascomycota*, que concentra a la mayoría de las especies de importancia bioindustrial como *Saccharomyces cerevisiae* en el subphylum Saccharomycotina; y el *Phylum Basidiomycota* (Boekhout et al., 2022; Dujon & Louis, 2017; Kurtzman et al., 2011; Shen et al., 2018).

Morfológicamente, las levaduras se caracterizan por células vegetativas globosas, ovoides, elipsoidales, apiculadas o triangulares; con un rango de tamaño general entre

2-3 μm de largo con algunas excepciones que pueden llegar hasta 20-50 μm , con un ancho general de 1-10 μm (Kurtzman et al., 2011; Phaff et al., 1978).

Ciclo de vida

Las levaduras pueden reproducirse de forma asexual y sexual. La primera se caracteriza por procesos como la gemación, en la que la célula madre desarrolla a la célula hija como una protuberancia que crece hasta tener un tamaño semejante a su progenitora, pudiendo separarse o quedarse unida a la célula madre dando origen a cadenas cortas de células o un pseudomicelio (Jiménez-Segura, 2016; Van-der-Walt & Yarrow, 1984).

La fisión es otro proceso de reproducción asexual en las levaduras, en el que las células aumentan de tamaño, se alargan y se forman tabiques transversales que seccionan a la célula dando origen a dos o más células individuales que repetirán la operación (Kurtzman et al., 2011).

La reproducción sexual en muchas levaduras se caracteriza por la alternancia entre la fase haploide y diploide. El ejemplo clásico es el de *Saccharomyces cerevisiae*, cuyas células vegetativas pueden ser haploides o diploides. Las células haploides o sexuales, designadas en forma análoga a los gametos masculinos y femeninos como α y a , se fusionan formando un cigoto diploide que crece vegetativamente. En condiciones de limitados nutrientes, el cigoto iniciará un proceso de meiosis y producirá ascosporas haploides (Figura 2) (Madigan et al., 2015).

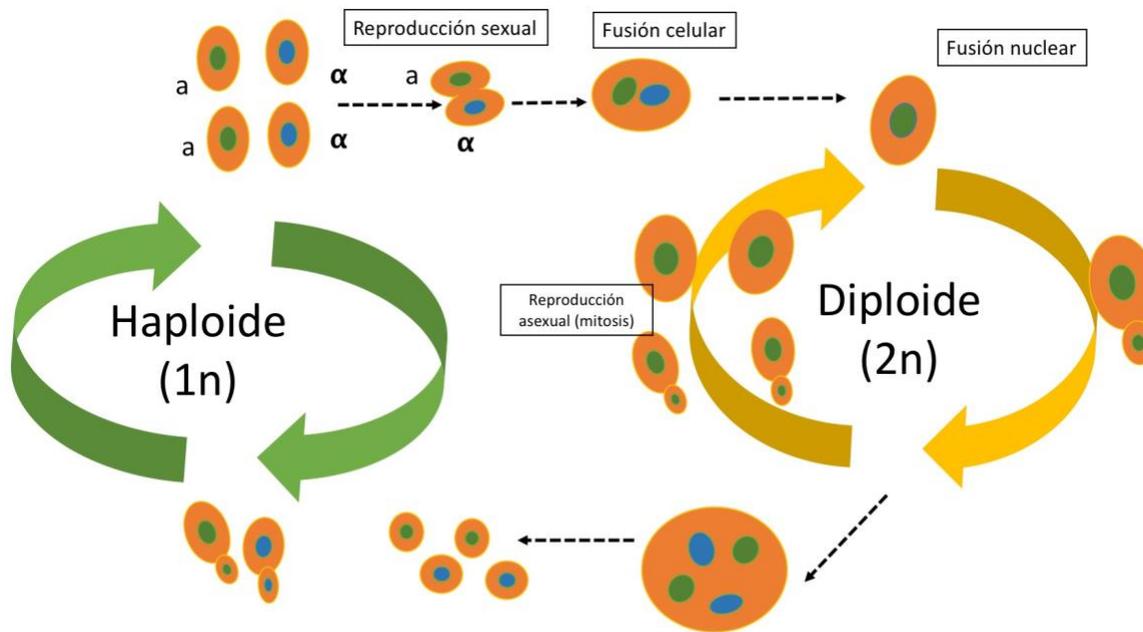


Figura 2- Ciclo de vida de una levadura típica, *Saccharomyces cerevisiae* (Madigan et al., 2015)

Distribución

La fisiología de las levaduras les permite prosperar en ambientes de condiciones variables, en general, la mayoría de las levaduras son mesofílicas y crecen óptimamente en un rango de temperaturas entre los 20°C y 30°C, aunque hay especies que pueden crecer a los 37° C y algunas otras consideradas psicrófilas que crecen a temperaturas de entre 5 y 10 °C (Deak, 2006; Jiménez-Segura, 2016). En cuanto a nutrientes, las levaduras prosperan en hábitats donde haya carbohidratos disponibles, aunque algunas especies pueden utilizar alcoholes y ácidos orgánicos en condiciones aerobias; y muchas pueden utilizar fuentes inorgánicas de nitrógeno y azufre para satisfacer la necesidad de estos y micronutrientes (Deak, 2006; Madigan et al., 2015). De acuerdo con la tendencia en el descubrimiento de nuevas especies de levaduras, los sustratos donde se han podido encontrar se pueden clasificar en dos grandes categorías: biótico (alimentos, animales, plantas, suelo, etc.) y abiótico (nieve, aire, agua marina, etc.) (Boekhout et al., 2022; Kurtzman et al., 2011)

En general son organismos aerobios, pero muchas pueden cambiar su metabolismo en condiciones de poco oxígeno o dependiendo de las concentraciones de glucosa

disponible. Prefieren medios ligeramente ácidos, pero tienen una amplia tolerancia a rangos de pH por lo que puede crecer entre valores de 3 a 10, aunque muchas especies pueden soportar pH tan bajos como 1.5 (Deak, 2006).

Las levaduras y la fermentación

Las levaduras están presentes en una amplia variedad de productos fermentados elaborados a partir de ingredientes de origen vegetal y animal, siendo particularmente reconocidas por la producción de etanol y dióxido de carbono a través de la fermentación de azúcares como hexosas y disácaridos. Pueden ser clasificadas respecto a su metabolismo de los azúcares en: 1) no fermentadoras, aquellas cuyo metabolismo no es capaz de realizar la fermentación alcohólica a partir de la glucosa; 2) fermentadoras facultativas, que dependen de las condiciones de crecimiento, la disponibilidad de oxígeno, el tipo y la concentración de azúcares; y 3) las fermentadoras obligadas, que solo son capaces de metabolizar la glucosa a través de la fermentación alcohólica (Rodrigues et al., 2006)

Sin embargo, el alcohol no es el único metabolito producido por las levaduras derivado del metabolismo de los carbohidratos durante la fermentación, pues también son responsables, junto a las BAL, de la disminución del pH por la producción de ácidos orgánicos como el citrato, el malato y el succinato, que además influyen en el aroma y sabor de los productos finales. También la transformación del sustrato inicial se debe a una amplia diversidad de enzimas hidrolíticas como la inulasa, pectinasas y β -glucosidasa que de igual forma contribuyen con las características organolépticas y propiedades químicas como la actividad antioxidante, que en particular es derivada de la liberación de polifenoles por parte de la tercer enzima mencionada (Rai & Jeyaram, 2017).

Las levaduras y otros microorganismos asociados a la fermentación pueden interactuar en cuatro formas generales: 1) por el uso de los sustratos nutritivos iniciales y la producción de metabolitos; 2) inhibiendo o eliminando microorganismos patógenos que pueden afectar la calidad del producto final; 3) inhibiendo el cultivo inicial y provocar que

el alimento se pudra; y 4) por la conversión de los metabolitos producidos por el cultivo inicial en metabolitos bioactivos con beneficios potenciales (Rai & Jeyaram, 2017).

Domesticación

De acuerdo con evidencias moleculares encontradas por arqueólogos, esencialmente compuestos orgánicos residuales de antiguas fermentaciones encontrados en vasijas y antiguos recipientes de barro u otros materiales, la domesticación de levaduras, especialmente del complejo de las especies *Saccharomyces sensu stricto*, podría haber existido desde del año 7000 a.C. con la producción de vino de arroz en China; con la producción de vino de uva en Irán alrededor del 7000-4000 a. C.; con la elaboración de cerveza y pan en Egipto desde el 1500-1300 a. C. Así como la producción de queso en China alrededor del 1980-1450 a. C. Todo lo anterior demuestra que el desarrollo de las civilizaciones humanas se relaciona íntimamente con la domesticación de las levaduras, y que, hasta la actualidad, estos microorganismos siguen siendo un importante e indispensable recurso biotecnológico del cual muchas industrias dependen. Las herramientas moleculares han revelado fenómenos de hibridación, poliploidia y reducción genómica en diferentes aislados domesticados de *S. cerevisiae* de distintos orígenes de la industria de las bebidas alcohólicas y de la producción de alimentos como el pan, lo que explica porque cada variedad de este organismo se ha adaptado a cada una de las industrias en las que se utiliza, por ejemplo, la resistencia al sulfito en la industria de vino (Rai & Jeyaram, 2017; Sicard & Legras, 2011).

Actividad probiótica

Las levaduras y el consumo de algunos productos elaborados con ellas tienen beneficios a la salud. En particular, hay levaduras con potencial probiótico, como *Saccharomyces boulardii* y *Kluyveromyces marxianus*, por su resistencia que tienen al atravesar el tracto gastrointestinal y por ejercer un efecto antagónico contra organismos patógenos; algunas otras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodotorula glutinis*, por producir metabolitos como niacina, riboflavina, ácido γ -aminobutírico (GABA) entre otras

sustancias promotoras para la salud del consumidor (Czerucka et al., 2007; Rai & Jeyaram, 2017)

Levaduras silvestres

Las levaduras del grupo *Saccharomyces* y No-*Saccharomyces*, responsables de las fermentaciones espontáneas que dan origen a los productos fermentados tradicionales son también conocidas como levaduras “nativas”, “autóctonas” o “silvestres” y se distinguen por estar en las superficies de los sustratos iniciales y/o ser introducidas por las personas o utensilios encargadas de la elaboración de estos productos de manera incidental. El metabolismo de estas levaduras no-*Saccharomyces* no solo se ocupa de la producción de etanol, sino de cientos de compuestos más, como terpenos, ésteres y ácidos orgánicos que les dan aromas y sabores característicos a las bebidas (Steensels & Verstrepen, 2014). Por lo anterior hay un creciente interés de estudiar aquellas levaduras del grupo no-*Saccharomyces* que permitan desarrollar cultivos iniciadores que incrementen los aromas y sabores de cervezas, vinos y otras bebidas espirituosas. Muchas de estas levaduras no son capaces de llevar a cabo una fermentación completa, por eso deben ir acompañadas por una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. No son usadas como fermentadoras principales, ya que no pueden competir contra *S. cerevisiae* por el aprovechamiento de recursos y en ocasiones, su crecimiento puede ser inhibido (Lappe-Oliveras et al., 2008; Varela, 2016).

Productos fermentados

El descubrimiento de la fermentación tuvo un importante significado en el desarrollo de la civilización humana, pues desde la prehistoria ha permitido la conservación y el almacenamiento prolongado de alimentos recolectados o cazados, como frutos, nueces, hojas, leche y carne de diferentes animales, por mencionar algunos. Este descubrimiento fue un factor que contribuyó, junto al desarrollo de la agricultura, a que la humanidad cambiara su estilo de vida nómada a sedentario, y que al tener asegurado su suministro de alimento iniciara la diversificación de sus actividades (Steinkraus, 1994)

Es entonces que se definen a los alimentos fermentados como aquéllos producidos por la actividad enzimática de consorcios microbianos presentes en el sustrato y en el ambiente circundante, y mediante la cual transforman los carbohidratos, proteínas y grasas en alcoholes, ácidos, ésteres, aminoácidos, péptidos, agua y dióxido de carbono (CO₂). Esto modifica las características bioquímicas y organolépticas de las materias primas, como textura, color, aroma, sabor y valor nutricional; elimina microorganismos patógenos y de descomponedores por el efecto antagónico de algunas de las sustancias producida por lo que incrementa la vida de anaquel del producto; características que en conjunto hacen más atractivos los alimentos para su consumo y que este sea aceptado cultural y socialmente (Ciani et al., 2008; Steinkraus, 1994; Tamang et al., 2016).

Muchos de estos productos han conservado su carácter artesanal a lo largo de la historia y su producción está estrechamente arraigada a la cultura de la región en la que fueron desarrollados o adaptados, y muchos de ellos se han visto beneficiados por los avances tecnológicos y científicos, como el caso de la cerveza, el queso, el yogurt, el kimchi, la soya, el tempeh, entre otros, permitiendo su industrialización y comercialización más allá de la región donde fueron originados. Sin embargo, la mayoría de los alimentos fermentados tradicionales, indígenas o étnicos son productos locales conocidos sólo en su lugar de origen, que se producen con materias primas locales y tecnologías sencillas de bajo costo y que, además forman parte importante de la dieta y del acervo cultural de innumerables etnias alrededor del mundo (Escamilla-Hurtado & Escamilla-Hurtado, 2007; Wachter-Rodarte, 2014).

Ecología microbiana de los productos fermentados

El estudio de las comunidades microbianas tal como se encuentran en la naturaleza siempre ha contemplado varios retos que dificultan diseccionar los procesos de ensamblaje, organización, función e identidad de la vasta diversidad filogenética que se puede encontrar en ellas. Uno de obstáculos más importantes es la incapacidad de aislar y caracterizar a la gran mayoría de las especies que conforman estas comunidades microbianas, sumado a la dificultad de recrear experimentalmente esos procesos

observados en sistemas naturales complejos como en el suelo, incluso si se tiene una perspectiva de la gran diversidad de información que ofrecen las bases de datos genómicas que se han armado a partir de estos sistemas (Wolfe & Dutton, 2015) .

Como ya se mencionó, la fermentación dan lugar a muchos alimentos tradicionales alrededor del mundo, en los que se emplean materias primas vegetales, como cereales, semillas, frutas, savias y mostos de diversas plantas, o animales como leche y carne, que ya contienen complejas comunidades microbianas que cooperan, compiten y evolucionan al transformar esos sustratos iniciales en los que habitan en un productos con nuevas propiedades dentro una escala espacio-temporal accesible y reproducible (Wolfe & Dutton, 2015). Es por eso que los alimentos fermentados pueden ser considerados como ecosistemas cuyos componentes son: a) las comunidades de microorganismos, representados generalmente por comunidades de bacterias y hongos, b) la materia orgánica o sustrato de donde se obtiene energía química, y c) las interacciones inter e intraespecíficas entre las comunidades, como la competencia y cooperación y d) las condiciones ambientales, como humedad, temperatura, acidez, salinidad, presión, entre otros (Scott & Sullivan, 2008; Wolfe & Dutton, 2015).

Sucesión biótica en los alimentos fermentados

Uno de los procesos ecológicos que se puede distinguir durante la fermentación es la sucesión biótica que se describe como un evento dinámico de adaptación, competencia, establecimiento y supervivencia de las especies que integran cada comunidad microbiana. Se compone de tres factores principales que la dirigen: la microbiota inicial, los factores ambientales iniciales y el procesamiento o ingeniería de la fermentación, es decir, las condiciones espaciales, temporales y ambientales que se designan para proceder con la fermentación (Franco-López, 2011; Wang et al., 2022). En la sucesión los grupos colonizadores o pioneros, interaccionan metabólicamente creando nuevas condiciones fisicoquímicas en el sustrato a través de la producción de metabolitos, lo que facilita o induce que sean sustituidos por otros grupos microbianos que se adaptan a este nuevo ambiente. Estos actuarán de la misma forma que los microorganismos iniciales favoreciendo el establecimiento de nuevos grupos microbianos, y así sucesivamente hasta agotar los recursos aprovechables del sustrato

o hasta alcanzar un punto de equilibrio ecológico (Scott & Sullivan, 2008; Wang et al., 2022; Wolfe & Dutton, 2015).

Esto se ha estudiado en comunidades de BAL de diferentes alimentos fermentados, lo que ha permitido observar cómo la abundancia, la diversidad y sucesión de los miembros integrantes de estas comunidades se ven afectados por la calidad de los materiales iniciales, la temperatura, el ambiente geográfico y factores microbianos en los que cada grupo involucrado desarrolla su función, uno tras otro hasta producir aquellos productos fermentados con características únicas (Wang et al., 2022). Por ejemplo, en el kéfir, una bebida tradicional elaborada por la fermentación de leche con granos de kéfir también conocidos como microbiogreas, matrices compuestas por el polisacárido kefirana, en la que está embebida la comunidad microbiana responsable de la fermentación láctica; se han observado distintos patrones en la composición de la diversidad de las bacterias y levaduras involucradas dependiendo del origen geográfico, condiciones de fermentación y el ambiente de cultivo. Sin embargo, a pesar de esas variaciones en la diversidad microbiana, mantiene una comunidad núcleo representada predominantemente por bacterias del género *Lactobacillus* aún sin importar el origen al inicio de la fermentación, estas suelen ser sustituidas por especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter* en las etapas tardías del proceso dependiendo del origen de los granos de kéfir. Además, se ha observado una correlación entre los cambios de la estructura de la comunidad con los cambios en el sabor de la bebida por dependiendo de los métodos de elaboración (Laureys & Vuyst, 2014; Wang et al., 2022).

Durante la producción del kimchi, un alimento tradicional coreano elaborado a partir de la fermentación de una preparación compuesta de sal, vegetales y especias, se ha observado una alternancia de grupos de BAL y levaduras a lo largo de 100 días de fermentación. En los primeros días del proceso, las bacterias abundan y la concentración de azúcares libres como la glucosa y la fructosa también se eleva a la par de la producción de los metabolitos clave de este alimento, ácido láctico, ácido acético y manitol. Las bacterias son sustituidas por levaduras del género *Saccharomyces* alrededor de los 40 días de fermentación y la concentración de azúcares libres deja

aumentar, también en este punto, la concentración de aminoácidos, a los que se les atribuye la aportación nutricional y organoléptica al kimchi, también se incrementa. Después de los 50 días de la fermentación, la abundancia de levaduras decae y vuelve a ser sustituida por bacterias acéticas. La concentración de ácido láctico se mantiene constante hasta el final del proceso, pero los demás metabolitos y los aminoácidos disminuyen. Hacia el final de la fermentación las bacterias descienden y son sustituidas levaduras del género *Candida* las que dominan hasta el final del proceso (Jeong et al., 2013). El análisis de este proceso funciona para entender la dinámica microbiana en los productos fermentados y encontrar el momento en el que sus propiedades nutricionales y organolépticas son óptimas.

La sucesión de la comunidad de levaduras en un proceso de fermentación se ha seguido en condiciones estocásticas como la que tiene lugar en la fruta amazónica amapa (*Parahancornia amapa* (Huber) Ducke). Se detectó que por acción de mosquitos del género *Drosophila* sp. la fruta fue inoculada con diferentes grupos de levaduras que iniciaron el proceso fermentativo. Conforme avanzó la fermentación se observó que *Candida amape* y *C. krusei* fueron las especies comunes y dominantes a lo largo del proceso fermentativo, mientras que otras aparecieron de forma esporádica y persistieron sólo por periodos cortos de tiempo conforme la fruta se iba deteriorando. Hubo especies que compartieron el espacio al mismo tiempo como *Kloeckera apis* y *Pichia kluyveri*, mientras que otras nunca coincidieron durante el proceso, como *Candida norvergensis* y *C. quercitrusa*, solo por mencionar algunos ejemplos. La presencia episódica de muchas de las especies detectadas está asociada a vectores como *Drosophila* sp. que es considerada el principal vector de levaduras en la naturaleza (Morais et al., 1995).

En la producción de la kombucha, una bebida fermentada tradicional elaborada a partir de la fermentación de té negro endulzado, y que involucra a una comunidad microbiana constituida por la simbiosis de levaduras y bacterias ácido-acéticas, se observó un proceso de sucesión biótica particular. Al evaluar la ecología de las levaduras en la fermentación de cuatro cultivos de kombucha se observó una comunidad integrada por especies como *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida stellata*, *Rhodotorula mucilaginosa*,

Schizosaccharomyces pombe, *Torulaspora delbrueckii* y *Zygosaccharomyces bailii*. Estas especies llevan un proceso de sucesión en el que *R. mucilaginosa* solo se encontró al inicio de la fermentación, mientras que *B. bruxellensis* y *Z. bailii* fueron las más persistentes a lo largo del proceso. Entender la dinámica ecológica en los procesos fermentativos como el de la producción de la kombucha da lugar a desarrollar combinaciones de levaduras y bacterias que provean un producto con sabores predecibles y calidad consistente (Teoh et al., 2004).

Alimentos fermentados tradicionales de México

En México los productos fermentados tienen un alto valor social, cultural, ceremonial, económico y nutricional para grupos indígenas (alrededor de 70), mestizos y de inmigración reciente que los preparan, consumen y comercializan en pequeña escala. Están representados por bebidas-alimento hechas a partir de maíz, frutas, savia y mosto de diversas plantas, de las cuales se estiman al menos 16 bebidas fermentadas tradicionales en las que se han documentado alrededor de 143 especies vegetales implicadas en su elaboración, siendo familias dominantes: Cactaceae, Asparagaceae y Poaceae (Ojeda-Linares et al., 2021). Ejemplo de algunos de ellos son el pozol, los atoles agrios, el tesgüino, tejuino, el tepache, el colonche, el pulque y los vinos de pitaya (Escamilla-Hurtado & Escamilla-Hurtado, 2007; Steinkraus, 1996; Wachter-Rodarte et al., 2015).

El pulque

En términos generales, el pulque es una bebida prehispánica, de consistencia viscosa, color blanquecino, ligeramente ácida y de bajo contenido alcohólico que, dependiendo de varios factores, varía entre 4 y 7 % vol. Se elabora por la fermentación espontánea o inducida del aguamiel, una sustancia líquida rica en azúcares, proteínas, vitaminas y minerales, que es extraída de diferentes especies de agaves pulqueros principalmente *A. salmiana* var. *salmiana*, *Agave mapisaga* Trel., *A. hookeri* Jacobi y *A. americana* L. Estos agaves generalmente son cultivados en climas cálidos con escasas lluvias y suelos pobres en nutrientes, principalmente en los estados de Hidalgo, Tlaxcala, México,

Puebla, Querétaro, Michoacán, Oaxaca y Ciudad de México (Álvarez-Ríos et al., 2020; Moreno-Terrazas et al., 2017; SECOFI, 1972b)

Magueyes pulqueros

Los magueyes pulqueros se clasifican en el género *Agave* de la subfamilia Agavoideae que pertenece a la familia Asparagaceae de acuerdo con la clasificación APG III basada en evidencias morfológicas y genéticas (Mendoza et al., 2019). Son plantas adaptadas a condiciones de sequías prolongadas y altas temperaturas a través de estrategias como:

- Desarrollo de succulencia para el almacenamiento de agua a largo plazo y así mantener las reacciones metabólicas en flujo constante.
- Sistema de raíces superficiales para la absorción eficiente de agua.
- Fibras en las hojas para mantener la rigidez de los tejidos cuando hay pérdida hídrica.
- Una cutícula gruesa acompañada de producción de cera y estomas de estructura compleja para dificultar la transpiración.
- Filotaxia en roseta que reduce la exposición de las hojas al sol evitando sobrecalentamiento.
- Metabolismo ácido crasuláceo (CAM) en el que la planta absorbe el dióxido de carbono durante la noche y lo almacena en las vacuolas en forma de ácido málico que es descarboxilado para producir carbohidratos durante el día.

La reproducción puede ser sexual llevada a cabo por la polinización de las inflorescencias paniculadas por murciélagos, o de inflorescencias espigadas por insectos y aves; mientras que la reproducción asexual, que es la más común entre las especies de *Agave* spp., se lleva a cabo por producción de clones en diferentes secciones de la planta, llamados hijuelos cuando salen de la base de la planta, hijuelos interfoliares cuando surgen al interior de la roseta al desprenderse o al morir la planta madre, y los bulbilos, que se originan en la inflorescencia a lado de las flores (Figura 3) (García-Mendoza, 2007). En el caso particular del maguey pulquero (*Agave salmiana* y *A. americana*) la reproducción es semélpara o monocárpica, lo que significa que la planta muere después de realizar el máximo esfuerzo reproductivo que implica una alta

inversión de recursos para el desarrollo de una inflorescencia suficientemente alta para que sea atractiva a los polinizadores en un episodio de reproducción único (García-Mendoza, 2007)

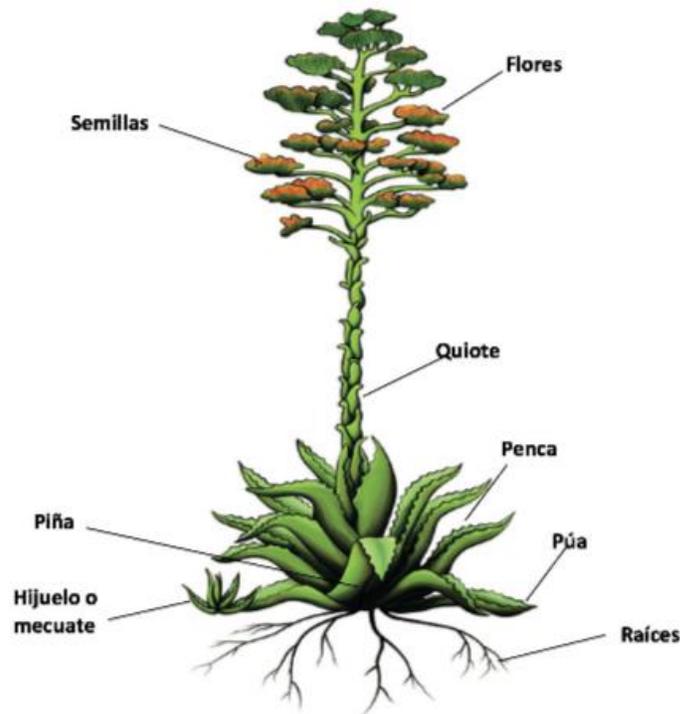


Figura 3- Estructura de un maguey pulquero. Ilustración de Carlos Alfonso León/Raíces (Vela, 2014)

Las especies de agave utilizadas para la producción de pulque son conocidas comúnmente como magueyes pulqueros de las que se conocen alrededor de 40 especies, siendo las más importantes: *A. americana* (maguey cenizo, blanco), que se cultiva desde Nuevo León y Durango hasta Oaxaca y Veracruz; *A. atovirens* (maguey de cumbre, tepemetl) de la Sierra Madre Oriental; *A. hookeri* (maguey manso, blanco) que habita en climas templados como los bosques del Eje Neovolcánico; *A. mapisaga* (maguey listoncillo, mano larga, xilometl) cultivado desde Nuevo León hasta Oaxaca; *A. marmorata* (tepeztate, pitzometl) típico de las zonas áridas de Puebla y Oaxaca; *A. salmiana*, es considerado uno de los más importantes para este fin ya que además de ser la especie con mayor diversidad de variedades es la más cultivada México especialmente en Ciudad de México, Hidalgo, Estado de México, Puebla, Tlaxcala,

Michoacán, Aguascalientes y San Luis Potosí. En general, la zona que se ha considerado más importante para el cultivo de maguey pulquero se compone por los estados de Hidalgo, Tlaxcala, México, Puebla y Ciudad de México (G. Álvarez-Ríos et al., 2022; García-Mendoza, 2007; Godoy et al., 2003; Ojeda-Linares et al., 2021)

El conjunto de conocimientos que las personas tienen sobre los diferentes etapas de vida de los magueyes les permite obtener una amplia diversidad de recursos materiales extraídos de estas plantas, que son empleados para satisfacer necesidades o utilidades que pueden ser agrupados, de manera general, en las siguientes categorías (Vázquez-García et al., 2016):

- 1) Alimenticios, por la obtención de sustancias comestibles y materiales para la preparación de alimentos y bebidas, por ejemplo, el *mixiote*, las flores comestibles conocidas en Tlaxcala como gualumbos, las pencas para los hornos usados para la cocción de la barbacoa, entre otros.
- 2) Domésticos, orientados a la producción de utensilios empleados en el hogar como muebles, materiales de limpieza, combustibles entre otros.
- 3) Tejido y vestuario, la obtención del ixtle, una fibra resistente y flexible usada para la confección de prendas y otros productos relacionados.
- 4) Salud y belleza, que considera los beneficios medicinales y cosméticos de algunos productos.
- 5) Construcción, al utilizar materiales para edificaciones sencillas o elementos de colindancias.
- 6) Agrícolas, favoreciendo la regeneración del suelo.
- 7) Forraje y suplemento, aportación a la dieta de animales de corral.

El aguamiel

El aguamiel es la materia prima con la que se elabora el pulque, es la savia extraída de los magueyes pulqueros. Es un líquido incoloro o ligeramente ambarino, con un sabor dulce, fresco y ligeramente ácido, con un pH entre 4.5 - 7.5. Esta compuesto principalmente de agua, azúcares como: D-glucosa, sacarosa, D-fructosa,

fructooligosacáridos y agavinas, polímeros con potencial prebiótico (Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018; SECOFI, 1972a; Villarreal-Morales et al., 2019)

Se destaca la presencia de aminoácidos esenciales y ácido γ -aminobutírico (GABA), a excepción de la metionina (Moreno-Terrazas et al., 2017; Ortiz-Basurto et al., 2008); vitaminas como ácido ascórbico, niacina, piridoxina, riboflavina y tiamina (Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018; Moreno-Terrazas et al., 2017); y minerales como potasio, calcio, zinc y hierro (Escalante et al., 2016; Moreno-Terrazas et al., 2017; Romero-López et al., 2015).

En las plantas monocotiledóneas como los agaves, es común encontrar saponinas, glúcidos esteroideos con actividad antiinflamatoria, antifúngica, antiparásitaria, antitumoral, antioxidante y afrodisiaca (Sparg et al., 2004). En *A. americana* y *A. salmiana*, se ha identificado que las saponinas derivan de la kammogenina, manogenina, gentrogenina y hecogenina, además de que se ha observado que la concentración de estas tiende a decrecer conforme la planta madura (Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018; Romero-López et al., 2015)

El aguamiel, al ser un ambiente rico en carbohidratos y sales, es un ambiente propicio para el desarrollo de la microbiota que es introducida por el uso de utensilios para raspar el cajete, con el polvo y por diversos vectores como *Drosophila* spp.; y que rápidamente se adapta y se desarrolla en este hábitat (Lappe-Oliveras et al., 2008). Entre los microorganismos que se han encontrado en el aguamiel están especies lácticas del género *Lactococcus* y *Leuconostoc*, con un alto potencial probiótico y especies de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania zonata* y *Kluyveromyces marxianus*, (Escalante et al., 2016; Estrada-Godina et al., 2001; Moreno-Terrazas et al., 2017; Sánchez-Marroquín & Hope, 1953).

Elaboración del pulque

El proceso de producción de pulque puede presentar ligeras variaciones de una región productora a otra. De manera general, inicia con el “capado” o “castración” del maguey,

operación que requiere de la selección previa de magueyes maduros, con 8 a 12 años edad, en los que se observa un adelgazamiento en la base del *meyolote* (las hojas centrales de la planta donde se encuentra el meristemo apical), que en su interior guarda el pedúnculo floral embrionario. Éste se corta dejando una cavidad en el centro del tallo del maguey que es denominado *cajete* (Escalante et al., 2016; Fournier-García & Barrios, 2012; Godoy et al., 2003). El agave recién capado se deja reposar de 4 a 12 meses para que el contenido de azúcares en el aguamiel incremente de 7 a 14% p/v (Lappe-Oliveras et al., 2008).

Transcurrido ese tiempo, se debe hacer un raspado a las paredes del cajete para inducir el flujo y acumulación del aguamiel. Después de cuatro días el *tlachiquero* (persona responsable de la extracción del aguamiel) realiza el raspado del cajete para abrir los vasos y promover la producción del aguamiel. Esta operación se realiza dos veces al día, por la mañana y por la tarde, obteniendo de 4 a 6 L de aguamiel diarios por un periodo de 3-6 meses hasta la muerte de la planta. Para la extracción de la savia se emplea el acocote, que es una calabaza hueca (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standley), o un utensilio con la misma forma elaborada con fibra de vidrio. Con éste el *tlachiquero* succiona el aguamiel acumulado en el cajete y luego lo vierte en recipientes llamados castañas, que son transportadas por animales de carga al tinacal, donde se llevará a cabo la fermentación del aguamiel (Fournier-García & Barrios, 2012; Ramírez-Rodríguez, 2004; Valdivieso-Solís et al., 2021).

Dentro del *tinacal*, la elaboración de pulque se realiza por fermentación inducida, es decir, añadiendo un inóculo o *semilla* o “pie de cuba” al aguamiel; el tiempo de fermentación es variable y depende de varios factores como: la calidad del aguamiel, la carga microbiana presente en el aguamiel y en el inóculo, la temperatura ambiental y la estación del año (Escalante et al., 2016; Valdivieso-Solís et al., 2021). El inóculo, también llamado *semilla*, “pie”, “nana” o “madre”, se prepara con aguamiel de la mejor calidad, conocida como Tipo 1 de acuerdo con la norma NMX-V-022-1972 (SECOFI, 1972a), y se fermenta espontáneamente de 15 a 30 días, lo que dependerá de la estación del año. La fermentación se da por terminada cuando se alcanza cierto grado alcohólico y acético,

el líquido presenta un color blanquecino y se forma una capa en la superficie llamada *zurrón*. Cuando la semilla está lista se procede a distribuirla en las tinas de fermentación de 700 L, agregando aguamiel fresco de la mejor calidad en una proporción de 1:3 (v/v) para producir el “pulque pie de punta” o “pulque pie de cuba”, que es el que se emplea como inóculo en la elaboración del pulque comercial. Para iniciar la producción comercial, el “pulque pie de punta” se vierte o “tiende” en otra tina de fermentación llamada *despacho* o *barrida*, a la que se agrega aguamiel *tlachique*, conocida como Tipo 2 de acuerdo a la misma norma (SECOFI, 1972a; Valdivieso-Solís et al., 2021), en una proporción de 1:1 (v/v) y se deja fermentar hasta que presente sus características distintivas, siendo el mayordomo, quien de acuerdo con su experiencia decide cuando el producto está listo para la comercialización, antes de que se inicie su acidificación y putrefacción. El tiempo de fermentación varía según la calidad del aguamiel, de la microbiota presente en la semilla y en el aguamiel, de la temperatura y de la estación del año (García-Garibay & López-Munguía, 2004; Loyola-Montemayor, 1956; Ramírez et al., 2004; Ramírez-Rodríguez, 2004)

La fermentación del aguamiel es regulada por la actividad metabólica de comunidades de microorganismos y de factores ambientales como temperatura, humedad, temporalidad entre otros. Los microorganismos (bacterias y levaduras) responsables de la fermentación, están presentes naturalmente en el ambiente durante la acumulación y recolección del aguamiel en el cajete, durante el transporte y manipulación. Esos grupos microbianos cambian las propiedades bioquímicas del sustrato, otorgándole las características de acidez, viscosidad y contenido alcohólico distintivas del pulque. (Escalante et al., 2016; Lappe-Oliveras et al., 2008; Sánchez-Marroquín & Hope, 1953). Tales propiedades derivan de cuatro procesos metabólicos microbianos principales: 1) fermentación ácido láctica, regulada principalmente por bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus* y *Leuconostoc* que al producir ácido láctico le da un sabor ácido a la bebida; 2) fermentación alcohólica, realizada principalmente por la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la alfa-proteobacteria *Zymomonas mobilis* que en conjunto producen etanol a partir de los azúcares del aguamiel (Escalante et al., 2016; Jiménez-Segura, 2016); 3) fermentación acética como resultado de la oxidación del etanol y otros

metabolitos generados principalmente por bacterias del género *Acetobacter* y *Gluconobacter*, un indicador del decremento de la calidad del producto por lo que no son deseables ya que se asocia a la producción de ácido acético (Escalante et al., 2016; Jiménez-Segura, 2016); y 4) la formación de exopolisacáridos (EPS) de fructuosa producidos por *Leuconostoc mesenteroides*, y levano producido por *Z. mobilis*, que juntos le dan una consistencia viscosa distintiva al pulque (Escalante et al., 2016).

Breve historia del pulque e importancia cultural

El hallazgo de fibras masticadas de maguey en cuevas en el Valle de Tehuacán fue la evidencia arqueológica que indica que estas plantas fueron usadas por los antiguos pueblos mesoamericanos desde hace 11 mil años aproximadamente (García-Marín et al., 2017; MacNeish & Byers, 1967). Esa evidencia sugiere que el uso de los magueyes para uso alimenticio y para la producción de fibras llevó a la domesticación de los magueyes alrededor del 6 500 a.C., siendo los otomíes los primeros en elaborar pulque cerca del año 2000 a.C. de acuerdo con el hallazgo de vasijas de cerámica en el que se han encontrado residuos orgánicos asociados a *Zymomonas mobilis*, una bacteria distintiva del pulque (Escalante et al., 2016; Valdivieso-Solís et al., 2021). Con el paso del tiempo el pulque se convirtió en una bebida sagrada y ceremonial de varios grupos indígenas del altiplano, especialmente para la cultura mexicana que consideró al *metoctli* (del náhuatl *metl* que se traduce como “maguey”, y *octli*, que significa “vino”) una bebida divina asociada a *Mayahuel*, y los *Centzon totochtin* o los 400 dioses conejo de la embriaguez. Durante el esplendor de la cultura mexicana, el pulque era producido y consumido exclusivamente para rituales religiosos, mientras que se restringía su consumo cotidiano a los ciudadanos comunes exceptuando a las mujeres embarazadas, niños en etapa de lactancia, ancianos y prisioneros de guerra (Godoy et al., 2003; Ramírez-Rodríguez, 2014; Valdivieso-Solís et al., 2021).

Ante la caída del imperio Mexica durante la Conquista, el pulque perdió su importancia ritual y pasó a ser una bebida popular sin perder su valor alimenticio (Escalante et al., 2016). Durante el periodo Colonial (1521-1821), la producción del pulque fue una de las principales actividades económicas, resultando en el florecimiento de las Haciendas

Pulqueras, principalmente en Altiplano Central, lo que ahora se consideran los estados de Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Morelos, Michoacán y Querétaro (Escalante et al., 2016)

En el periodo de 1629-1786, la producción y consumo de pulque fue prohibida, especialmente aquel que estaba “mezclado” con aditivos vegetales que le daban un carácter más embriagante y hasta alucinógeno. Sin embargo, las autoridades eliminaron las restricciones ya que la producción de pulque tenía un fuerte valor económico que estaba a la altura de los vinos europeos y el licor de caña de azúcar (Escalante et al., 2016; Nemser, 2011).

Después de la Guerra de Independencia, las haciendas pulqueras recuperaron su relevancia económica, particularmente por la introducción del ferrocarril, que permitía transportar miles de litros de pulque a las principales ciudades de México. La producción de pulque alcanzó los 500 millones de litros al año, y se estimó que el consumo era de cerca de los 350,000 litros sólo en la Ciudad de México, siendo los estados que más producían eran Hidalgo y Tlaxcala, por pertenecer a una región donde predominaba el cultivo de maguey. El pulque era la principal bebida alcohólica consumida en el país y una de las agroindustrias mexicanas más importantes al final del siglo XIX, por lo que los principales productores de Puebla, Tlaxcala y de los Llanos de Apan, formaron compañías que buscaban monopolizar el negocio en sus respectivas regiones de producción y venta aprovechándose de la expansión del uso del ferrocarril y la consolidación de las haciendas favoreciendo así la industria pulquera hasta principios del siglo XX (Figura 4) (Escalante et al., 2016; Narváez-Suárez et al., 2016; Ramírez-Rancaño, 2000).



Figura 4- La introducción del ferrocarril que impulsó a la industria del pulque a finales del siglo XIX y parte del siglo XX.

a) Hombres cargando barriles de pulque en una estación de ferrocarril en la Ciudad de México; b) Hombres con carretas durante la llegada del tren con carga de pulque, en patios de una estación de Apan, Hidalgo, México; c) Estación de ferrocarril con estibas de pulque; d) Hombre bebiendo pulque en la barra de una pulquería. (ENAH, 1920, 1945a, 1945b, 1955)

Después de la Revolución Mexicana (1910-1920), la estructura de producción de las haciendas pulqueras quedó prácticamente desintegrada durante el gobierno de Venustiano Carranza, forzando a los hacendados a dejar el país. Además, el consumo de pulque se asociaba a la "criminalidad y degradación de la raza mexicana", iniciando la debacle de la producción agroindustrial del pulque (Escalante et al., 2016; Ramírez-Rancaño, 2000).

Entre 1920 y 1930, la producción y transporte de pulque a la Ciudad de México se intentó recuperar de nuevo, sin embargo, apareció una política antialcohólica entre 1935 y 1940 y la consolidación de la cerveza como una bebida alcohólica popular, lo que afectó la producción y el consumo del pulque severamente, aunque realmente fue la falta de

investigación y de desarrollo tecnológico (Escalante et al., 2016; Gonçalves-De-Lima, 1956).

Como se ha expuesto, la producción de pulque ha pasado por procesos históricos que la han mermado, como los movimientos armados, las políticas prohibicionistas, competencia con otras bebidas como la cerveza, cultivo inadecuado de los magueyes pulqueros, decremento en su popularidad y restricción de su consumo. Sin embargo, en la actualidad se promueve: la elaboración de pulque de calidad, su revalorización en festivales gastronómicos, el incremento en el número de pulquerías en la Ciudad de México (Escalante et al., 2016; Jiménez-Segura, 2016; Moreno-Terrazas et al., 2017; Valadez-Blanco et al., 2012)

Ejemplo de lo anterior es que, a principios de 2019 se creó el Museo del Pulque y las Pulquerías en la Ciudad de México, con el propósito de difundir la historia e información del proceso de elaboración de esta bebida contrarrestando el mal prestigio que se le dio por décadas (Nicolas, 2019) Además, organizaciones de activistas productores de pulque de diferentes estados del país, han logrado instaurar el Día Nacional del Pulque el primer domingo de febrero de cada año, fecha que coincide con la celebración de Ometochtli (Dios Dos Conejo), una de las deidades del pulque; en este día se celebran actividades culturales y gastronómicas vinculadas a la bebida (Elizondo, 2019). Por otro lado, en cuestiones fiscales, el Servicio de Administración Tributaria (SAT) quitó el impuesto especial sobre producción y servicios (IEPS) al que están sujetas las bebidas alcohólicas, pues de acuerdo con el artículo 8 de la Ley IEPS, los productos derivados del aguamiel están exentos del pago de tal impuesto a pesar del contenido alcohólico que el pulque posee (NOTIMEX, 2019).

Importancia económica

El cultivo de maguey pulquero y la producción de pulque han tenido relevancia económica a lo largo de la historia de México. Entre 1900 y 1910 llegó a representar el 25% de los ingresos totales del país, lo que se redujo dramáticamente entre 1940 y 2012,

debido a que la superficie de cultivo de maguey pulquero se redujo sustancialmente, más del 80% en los estados productores, lo que impacto en la producción de pulque como como la desaparición de pulcatas y pulquerías (Trejo, 2017). De acuerdo con los registros del Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera (SIAP), en 2021 se cultivaron 9,107.59 ha de maguey pulquero a nivel nacional reportando una producción de 189,456.73 miles de litros de aguamiel con un valor de producción de \$863,217.15 pesos mexicanos, siendo el estado de Hidalgo el principal productor por proveer 110,411.07 litros de aguamiel, información que se resume en la Tabla 1.

La producción de pulque también se ha visto como un recurso de desarrollo rural en los últimos años ya que existen agrupaciones que han impulsado la reforestación con maguey pulquero y la venta de su producto para obtener un fondo de ingresos como la organización de “Mujeres Milenarias” en la comunidad El Almacén en la Sierra Mixteca Oaxaca (Miranda, 2019)

Tabla 1- Producción de maguey pulquero por estado durante 2021(SIAP, 2022)

	Entidad	Superficie (ha)			Producción de aguamiel (miles de L)	Rendimiento (udm/ha)	PMR (\$/udm)	Valor Producción (miles de Pesos)
		Sembrada	Cosechada	Siniestrada				
1	Guanajuato	657	654	0	9,070.50	13.87	4,420.24	40,093.81
2	Guerrero	1	1	0	6.97	6.97	3,895.50	27.15
3	Hidalgo	4,842.20	1,372.20	0	110,411.07	80.46	5,224.23	576,812.51
4	México	1,539.25	1,289.75	0	18,503.22	14.35	4,074.45	75,390.45
5	Michoacán	5.5	0	0	0	0	0	0
6	Puebla	993.64	354.75	0	11,645.90	32.83	4,725.30	55,030.36
7	Querétaro	259	0	0	0	0	0	0
8	San Luis Potosí	47	47	0	1,103.00	23.47	1,407.66	1,552.65
9	Tlaxcala	648	529	0	37,192.87	70.31	2,870.12	106,748.18
10	Veracruz	115	112	0	1,523.20	13.6	4,964.57	7,562.03
	Total	9,107.59	4,359.70	0	189,456.73	43.46	4,556.28	863,217.15

Importancia nutricional

Existe evidencia arqueológica como vasijas del clásico tardío maya, donde se sugiere el uso de enemas con pulque para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, algo que se respalda con lo que se sabe sobre sus propiedades probióticas (Fuentes, 2006). Estas, son atribuidas a las BAL como *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides*, abundantes en aguamiel y pulque, que son capaces de sobrevivir a través de las barreras químicas del tracto digestivo, adherirse a la mucosa intestinal y ejercer un efecto antiinflamatorio y antimicrobiano contra especies patógenas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella entérica* (Castro-Rodríguez et al., 2015; Escalante et al., 2016; Ruiz et al., 2017; Edgar Torres-Maravilla et al., 2016).

Por otro lado, las propiedades prebióticas del pulque están asociadas a la presencia de exopolisacáridos y hetero-oligosacáridos producidos por las comunidades de bacterias ácido-lácticas que contiene, pues estas sustancias son consideradas fibras solubles y se les asocia un efecto positivo para la adherencia y mantenimiento de la comunidad de bifidobacterias en el intestino (Escalante et al., 2016; Salazar et al., 2015).

Desde épocas prehispánicas, el pulque se reconoce como una bebida nutritiva, y desde el siglo XX se ha encontrado evidencia de ser considerado una fuente importante de vitaminas del complejo B, vitamina C, calcio y aminoácidos esenciales, de los cuales se destacan lisina y triptófano; además, por el contenido de fitasa, la biodisponibilidad de hierro y zinc se incrementa (Correa-Ascencio et al., 2014; Moreno-Terrazas et al., 2017; Sánchez-Marroquín & Hope, 1953).

En zonas rurales de México central, es recomendado que las mujeres y en periodo de lactancia consuman pulque pues mejora la producción de leche; sin embargo, existen trabajos que sugieren que el contenido de alcohol del pulque propicia una limitación en el desarrollo integral de los infantes hasta casi los 5 años de crecimiento cuando hay un

consumo excesivo, es decir, más de 400 g de etanol consumido por las madres asociadas (Backstrand et al., 2001, 2004).

Justificación

El pulque es una bebida prehispánica fermentada muy importante dentro de la cultura mexicana en proceso de revalorización como un alimento funcional, que, como un producto tradicional fermentado, actúa como un reservorio de biodiversidad microbiana producto de las prácticas tradicionales intrínsecas de su elaboración y puede ser considerado como un ecosistema microbiano en el que las comunidades microbianas que lo conforman, cambian su composición conforme cambian las propiedades fisicoquímicas.

Por eso, es importante caracterizar y describir la sucesión de las comunidades microbianas involucradas en el proceso de fermentación, identificando los cambios fisicoquímicos que ocurren por la actividad metabólica microbiana que transforman el aguamiel que le dan las características distintivas de acidez, viscosidad, contenido alcohólico y valor nutrimental al pulque. Al respecto, la investigación se ha centrado en la determinación *ex situ* de la microbiota en el producto final y en la sucesión de las comunidades bacterianas, por lo que el propósito de este trabajo es contribuir al conocimiento sobre la sucesión de las levaduras durante las distintas fases del proceso de elaboración y fermentación del pulque, considerando los cambios fisicoquímicos que se producen en el sustrato como resultado de la actividad metabólica conjunta de los diferentes grupos microbianos participantes; estudiando un episodio único de fermentación, es decir, describirlos los cambios en la diversidad y composición de las comunidades de levaduras a través de las diferentes fases del proceso de elaboración de pulque y en diferentes tiempos de fermentación de una sola adición de aguamiel en el sistema observado hasta que, de acuerdo con el criterio del productor, se transformó en pulque pues de lo contrario, al agregar más materia prima al sistema, se reiniciaría el proceso de fermentación.

Por lo anterior, es que, en este trabajo, los resultados obtenidos tienen el potencial de enriquecer al conocimiento del pulque como un reservorio biocultural de biodiversidad, al entendimiento de los procesos ecológicos de las comunidades microbianas y a fortalecer las bases que permitan asegurar la calidad y seguridad del pulque, y así promover una actualización de su normatividad conservando la identidad tradicional de su proceso de elaboración.

2. Objetivos

Objetivo general

Determinar la sucesión de las comunidades de levaduras y los principales cambios fisicoquímicos que ocurren durante la elaboración y fermentación de la bebida.

Objetivos particulares

1. Describir el proceso de elaboración y fermentación de pulque de la Hacienda Xochua en Tlaxco, Tlaxcala, México.
2. Aislar y cuantificar las comunidades de levaduras presentes en las muestras obtenidas de las diferentes fases del proceso de elaboración de pulque
3. Identificar por taxonomía polifásica de los aislados de levaduras obtenidos a través de características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y por el análisis de secuencias de ADN de la región ITS-5.8S.
4. Determinar la composición de la comunidad de levaduras aisladas de cada fase de elaboración y fermentación del pulque.
5. Determinar *in situ* los principales cambios fisicoquímicos (pH y temperatura) de cada una de las fases del proceso.
6. Determinar el cambio en el contenido azúcares, ácidos orgánicos, etanol y compuestos volátiles, en cada una de las fases del proceso.

3. Antecedentes

El estudio de la microbiota asociada a la elaboración y fermentación del pulque se inició en 1864 con Río de la Loza quien realizó las primeras observaciones microscópicas e inferencias sobre las identidades de los microorganismos involucrados (Gonçalves-De-Lima, 1956; Jiménez-Segura, 2016). Desde entonces múltiples investigadores, tanto nacionales como extranjeros, han enfocado sus esfuerzos en la identificación de los principales microorganismos que participan en el proceso, a través de técnicas dependientes e independientes de cultivo basadas en la extracción total de ADN y análisis moleculares, en establecer sus características químicas y nutricionales así como sus propiedades probióticas y prebióticas que hacen de este producto fermentado un alimento funcional (Jiménez-Segura, 2016)

Para este trabajo se consideraron como antecedentes directos aquellos trabajos donde se realizaron estudios con un enfoque polifásico, en los que se toman en cuenta caracteres fenotípicos y genotípicos para la identificación de la microbiota del pulque; así como estudios en los que se reportan sucesiones o cambios en las comunidades microbianas a lo largo del proceso de elaboración de esta bebida, que sugieran una influencia o interacción entre ellos y con los cambios fisicoquímicos a lo largo del proceso de fermentación.

Al respecto de la identificación polifásica y los cambios en las comunidades de bacterias, existen un trabajo en el que se estudiaron estos aspectos en diferentes etapas de la fermentación de pulque, uno de ellos se desarrolló en el pueblo de Huitzilac, Morelos, México (Escalante et al., 2008). Al inicio del proceso se observa que el aguamiel tiene una abundante presencia de *Leuconostoc mesenteroides*, *L. kimchi* y *L. citreum*. Esta diversidad cambió cuando se inoculó con pulque previamente fermentado por 12 horas, pues se introducen abundantes levaduras al sistema junto a una dominancia de especies de *Lactobacillus* homofermentativas y a *Z. mobilis* subsp pomaceae, un organismo asociado con la producción de etanol. Con el progreso de la fermentación, observaron que las poblaciones bacterianas disminuyeron desde la primera etapa y se mantuvieron constantes. Este mismo comportamiento se observó en muestras de

aguamiel y pulque de tres diferentes ranchos productores en el pueblo de Tamazulapan, Oaxaca, (Valadez-Blanco et al., 2012), donde la mayor carga microbiana en el aguamiel, expresada en un rango aproximado de 10^8 UFC/mL, mientras que en el pulque se encontró en una proporción uniforme aproximada a 10^7 UFC/mL. De acuerdo con los autores, la mayor abundancia de bacterias en las etapas iniciales se debió a la constante interacción que tiene el aguamiel cuando esta en el cajete y a su extracción con el uso de herramientas no esterilizadas lo que lleva a una mayor integración de microorganismos al sistema, estos van disminuyendo conforme los recursos se agotan y las propiedades fisicoquímicas del sustrato se vuelven más selectivas. Con respecto a la diversidad de estas comunidades microbianas los autores reconocen a *Z. mobilis*, a las especies de *Citrobacter*, γ -Proteobacterias, como las bacterias responsables de la producción de ácido láctico, CO_2 , etanol y ácido acético, metabolitos que le dan importantes características sensoriales al pulque fermentado y que moldean las características fisicoquímicas del producto final que les permite a estos microorganismos desarrollarse plenamente. Aunque el objetivo del primer trabajo no fue identificar la diversidad de levaduras, durante el proceso se observó que, en contraste con las bacterias, estos organismos tuvieron una tendencia a incrementar su densidad en el sistema conforme avanzó el proceso, desde 3.1×10^4 UFC/mL en el aguamiel hasta 1.4×10^7 UFC/mL en el producto final.

En la búsqueda de profundizar sobre fondo la diversidad microbiana de las comunidades pulque, se han usado herramientas metagenómicas que han permitido registrar más géneros bacterianos que es difícil encontrar a través de técnicas microbiológicas dependientes de cultivo. Por ejemplo, en una comparación las comunidades microbianas de pulque de diferentes fases del proceso de fermentación de pulque de tres distintas localidades de Hidalgo (Rocha-Arriaga et al., 2019), se observó que las comunidades bacterianas de las muestras de aguamiel y el pulque fueron muy parecidas entre sí, mientras que el inóculo usado contó con la diversidad más alta de bacterias. Los géneros de bacterias representativos en el proceso de ese estudio fueron: *Sphingomonas*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Gluconobacter*, *Halomicronema*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Mrivitia*, *Serratia* y *Weisella*; mientras que la diversidad

fúngica estuvo representada por 20 especies entre los que se encuentran como las más abundantes a *Kluyveromyces marxianus* seguida por *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera anomala*, *Kazachstania gampospora* y *Westerdykella*.

Siguiendo el mismo enfoque, en otro estudio se caracterizó la comunidad de procariontes en pulque casero de Huitzilac, Morelos (Zepeda et al., 2020) encontrando que la comunidad bacteriana de pulque se compuso principalmente por los filos *Proteobacteria* y *Firmicutes* representados por un 70% y 28% de abundancia relativa respectivamente, de los cuales el género bacteriano más abundante del filo de *Proteobacteria* fue *Zymomonas* representando cerca del 36% de la abundancia relativa total, información que se complementa con el perfil de las comunidades bacterianas y fúngicas de cinco etapas de la fermentación de pulque realizado en la misma región (Chacón-Vargas et al., 2020), donde se identificó un grupo de 6 géneros bacterianos principales y uno fúngico entre los que se registraron 10 especies: *Acinetobacter boissieri*, *Acinetobacter nectaris*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gelidum*, *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Algo que enriquece estos trabajos es el uso de herramientas bioinformáticas que permitió se hizo una búsqueda de genes involucrados en vías metabólicas relacionadas con moléculas de interés alimenticio, encontrando aquellos relacionados con enzimas participantes en la síntesis de vitaminas, cobalamina, ácido fólico, etanol, ácido acético, dextrano, levan e inulina.

Estos trabajos enriquecen el conocimiento sobre la diversidad y dinámicas microbianas que se desarrollan en el pulque que lo posicionan como recurso biocultural complejo. Sin embargo, aún hay información que aportar sobre la participación y comportamiento de las comunidades de levaduras durante el proceso de elaboración de esta bebida.

4. Hipótesis

El pulque un producto fermentado tradicional elaborado a partir de la fermentación del aguamiel, proceso que implica la participación de comunidades microbianas como la de las levaduras, cuya composición cambia siguiendo un proceso de sucesión en contexto con los cambios fisicoquímicos del sustrato resultantes de las interacciones metabólicas de los microorganismos. En la Hacienda de Xochuca se produce pulque a través de métodos tradicionales, por lo que, a través técnicas microbiológicas dependientes de cultivo, será posible determinar la sucesión de las comunidades de levaduras, así como los cambios en los parámetros fisicoquímicos a lo largo de un proceso de elaboración de pulque.

5. Materiales y Métodos

Descripción del proceso de elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca

A través de observación participante (Angrosino, 2012), se documentó el proceso de producción en la Hacienda de Xochuca se observó en detalle, iniciando con el proceso de selección de la plantas maduras que serían capadas para la obtención del aguamiel hasta la obtención y envasado del pulque, para ser transportado y distribuido en los sitios de venta. En paralelo se realizaron entrevistas al personal involucrado en el desarrollo del proceso y se obtuvo un registro fotográfico del mismo.

Obtención de muestras

Localidad de muestreo

Las muestras se tomaron de diferentes etapas del proceso de elaboración de pulque de la Hacienda de Xochuca, ubicada en el municipio de Tlaxco (altitud 2540 msnm, latitud 19°36'53"N, longitud 98°07'11"O, altitud 2540 msnm), en el estado de Tlaxcala, del 18 al 21 de febrero de 2020. Se obtuvo una muestras de 16 diferentes

etapas de elaboración y fermentación del pulque comercial (Tabla 2) midiendo el pH y temperatura al momento, a excepción del “metzal”, que es el tejido sustraído del cajete durante el proceso de raspado. Cada muestra se dividió en tres fracciones de 100mL cada una; una de ellas se utilizó para los estudios microbianos, las otras dos para las determinaciones fisicoquímicas.

A partir de la muestra destinada para los estudios microbianos dependientes de cultivo se tomaron 10 mL los que se resuspendieron en 90 mL de agua peptonada (0.1%) para obtener la dilución 10^{-1} , y al resto de la muestra se le añadió 25% (v/v) de glicerol para su crioconservación a -78°C .

Tabla 2- Muestras obtenidas durante el proceso de elaboración y fermentación de pulque comercial de la Hacienda San Diego de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala

No. de muestra	Muestra
1	Aguamiel cajete
2	Aguamiel acocote
3	Aguamiel castaña
4	Semilla
5	Agua lavado
6	T0 Aguamiel + semilla
7	T1 fermentación 4h
8	T2 fermentación 8 h
9	T3 fermentación 12 h
10	T4 fermentación 20 h
11	T5 fermentación 24 h
12	Metzal
13	“Xaxtle”
14	Raspado cajete
15	T6 fermentación 48 h
16	T7 fermentación 72 h

Estudio microbiológico

a) Aislamiento, cuantificación y conservación

De las diferentes etapas de elaboración y fermentación del pulque se tomaron 10 mL que se diluyeron en 90 mL de agua peptonada estéril (peptona 0.1%), obteniendo la dilución 10^{-1} ; a partir de ésta se hicieron diluciones decimales seriadas de 10^{-2} hasta 10^{-9} , dependiendo del tipo de las muestras. La cuantificación de las UFC se realizó en placas que presentaban entre 100 y 300 colonias.

Para aislar las comunidades de levaduras se tomaron alícuotas de 100 μ L de las diluciones seleccionadas, que se inocularon por el método de extensión en placa de medio en medio WLA (Alpha Biosciences, Baltimore, MD, EUA) adicionado con cloranfenicol (100 μ g/mL, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) para levaduras y hongos. La inoculación de las placas se hizo *in situ*, por triplicado y se incubaron por 10 días a temperatura ambiente, periodo en el que fueron revisadas diariamente para cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

b) Obtención de cultivos axénicos

A partir de las características macromorfológicas (color, forma, elevación, brillo, textura y borde) se seleccionaron las colonias con macromorfología diferente, se aislaron y resembraron por estriado en el mismo tipo de medio de cultivo del cual se aislaron, hasta la obtención de cultivos axénicos.

Los cultivos axénicos de levaduras se resembraron en placas de GELPA (glucosa 20g, extracto de levadura 5 g, peptona 10 g, agar 20 g, H₂O d 1000 mL).

c) Conservación de los cultivos axénicos

La conservación de los aislados de levaduras se hizo a mediano y largo plazo de la siguiente manera:

1. Conservación a mediano plazo

A partir de los cultivos axénicos sembrados en medio GELPA y con 24 o 48 h de crecimiento a temperatura ambiente, se cosecharon las células para transferirlas a tubos con 5 mL de agua destilada estéril, hasta la obtención de una suspensión cargada, por duplicado. Los tubos debidamente etiquetados y empacados se conservaron en refrigeración a 4 °C.

2. Conservación a largo plazo

A partir de los cultivos axénicos sembrados en medio GELPA y con 24 o 48 h de crecimiento a temperatura ambiente, se cosecharán las células para transferirlas a crioviales de 2 mL que contengan 1.5 mL de medio GELP con 25%, glicerol; esto se realizó por triplicado. Los crioviales debidamente etiquetados y colocados en criocajas que se refrigeraron 4 °C por 10 minutos a para se transferidas a un congelador a -20°C por 10 minutos y por último se transfirieron a un ultracongelador a -78 °C.

d) Identificación fenotípica de los aislados de levaduras

La identificación fenotípica de los cultivos axénicos de levaduras aisladas en el medio GELPA se hizo siguiendo los lineamientos de Kurtzman (Kurtzman et al., 2011) resumidos en la Tabla 3. Considerando las características macro y micromorfológicas, fisiológicas y bioquímicas, se formaron grupos para la posterior identificación genotípica.

Tabla 3- Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas consideradas para la identificación de las levaduras

I. Características morfológicas	II. Características fisiológicas y bioquímicas
<p>A. Macromorfología o características culturales de los aislamientos:</p> <p>1. Crecimiento en medio sólido WL, desarrollo de colonia gigante para determinar (color, forma, elevación, superficie, brillo, textura y borde)</p> <p>B. Micromorfología</p> <p>1. Características de las células vegetativas</p> <p>A) Morfología en medio sólido GELPA</p> <p>2. Características de la reproducción asexual o vegetativa en los medios GELPA</p> <p>3. Características de la reproducción sexual</p> <p>A) Proceso de formación de ascas y ascosporas</p> <p>B) Características de las ascas y ascosporas en McClary A</p>	<p>1. Utilización de compuestos de carbono</p> <p>A) Fermentación de siete compuestos de carbono</p> <p>2. Pruebas de tolerancia</p> <p>A) 50% glucosa</p> <p>B) 10% NaCl 5% glucosa</p> <p>C) 0.01% y 0.1% de cicloheximida</p> <p>D) 2, 4, 8 y 10% de etanol</p>

Abreviaturas: **GELP**: glucosa 20 g, extracto de levadura 5 g, peptona 10 g; **GELPA**: glucosa 20 g, extracto de levadura 5g, peptona 10 g, agar 20 g, agua 1000 mL; **McClary A**: glucosa 1 g, cloruro de potasio 1.8 g, acetato de sodio 8.2 g, extracto de levadura 2.5 g, agar 15 g, agua 1000 mL. Yarrow (1998), Kurtzman et al. (2011b).

Formación de ascas y ascosporas

Para inducir la formación de ascas y ascosporas de los aislados se inocularon en placas del medio de esporulación de McClary (glucosa 1 g, cloruro de potasio 1.8 g, acetato de sodio trihidratado 8.2 g, extracto de levadura 2.5 g, agar 15 g y agua destilada 1 L) (McClary et al., 1959)

Las placas inoculadas se incubaron a 27°C, durante varios días o semanas. Diariamente se hicieron preparaciones de cada aislado para observar en el microscopio y verificar la presencia de ascas y ascosporas

Caracterización fisiológica de levaduras.

El crecimiento y resistencia a diferentes presiones osmóticas de los aislados se evaluó en tres medios de cultivo, dos con concentraciones de 50 y 60% de glucosa, y otro con una concentración de 10% de NaCl y 5% de glucosa (Kurtzman *et al.* 2011).

(1) Agar glucosa al 50%. En un litro de una solución al 1% de extracto de levadura se disolvieron 13 g de agar y posteriormente 500 g de glucosa. El medio se esterilizó a 120°C durante 15 min y posteriormente se vació en placas de Petri.

(2) Agar glucosa al 60%. En un litro de una solución al 1% de extracto de levadura se disolvieron 13 g de agar y posteriormente 600 g de glucosa. El medio se esterilizó a 120°C durante 15 min y posteriormente se vació en placas de Petri.

(3) Medio de 10% NaCl más 5% de glucosa. En 200 mL de agua destilada se disolvieron 20 g de cloruro de sodio y 10 g de glucosa; alícuotas de 4.5 mL se dispensaron en tubos de ensaye con tapa de rosca que se esterizaron en autoclave a 120°C durante 15 min. A cada tubo ya frío se le añadieron 0.5 mL de una solución microfiltrada de Base Nitrogenada para levaduras (BNL, Difco, 6.7 g/100mL agua destilada).

(4) Resistencia a cicloheximida. La prueba se realizó en concentraciones de 0.1% y 0.01% de cicloheximida (p/v): Alícuotas de 4.5 mL se dispensaron en tubos de con tapa de rosca que se esterizaron a 121 °C durante 15 min. Ya fríos a cada tubo se le añadieron 0.5 mL de la solución microfiltrada de BNL. Los resultados se registraron de la siguiente manera

- + crecimiento positivo
- +/D crecimiento débil
- - sin crecimiento

Tolerancia a diferentes concentraciones de etanol

El crecimiento en presencia de etanol se evaluó en placas de agar YM suplementado con 8 % de glucosa de acuerdo con la metodología de Lachance (Lachance, 2004). El medio se esterilizó a 120°C por 15 minutos. Al medio estéril con una temperatura de entre 45-50°C, se le añadió etanol tibio (6 a 12 % v/v con incrementos de 1 %) inmediatamente antes de vaciarlo a las placas de Petri.

Los respectivos aislados se inocularon en las placas con las diferentes concentraciones de etanol, se sellaron con Parafilm, se colocaron en bolsa de plástico con cierre y se incubaron a 27°C. El crecimiento de los aislados axénicos se evaluó durante 9 días (Lachance, 2004) y los resultados se evaluaron de la siguiente manera:

- V=variable
- (+)=positiva
- (-) = negativa
- D=débil.

Fermentación de carbohidratos

Esta prueba se realizó en el medio basal Wickerham (4 g/L de extracto de levadura y 7,5 g/L de peptona de caseína). Se colocaron alícuotas de 2 mL del medio basal en tubos con tapa de rosca, que contenían un tubo de Durham invertido, de acuerdo con la metodología de Kurtzman *et al.* (2011a). Los tubos se esterilizaron a 120°C durante 15 min, y se verificó que los tubos de Durham estuviesen llenos de medio basal. A cada uno de los tubos ya estériles se le agregó aseptícamente 1 mL de solución concentrada de cada azúcar (2.5 g/100 mL agua destilada), esterilizada por microfiltración para obtener una concentración final de azúcar en el medio de fermentación del 2% (p/v).

Los azúcares que se emplearon en la prueba de fermentación fueron:

- D-Glucosa
- Maltosa
- Sacarosa
- Lactosa
- D-galactosa
- Fructosa

Todos los azúcares fueron de grado analítico y de la marca Sigma-Aldich (Misuri, Estados Unidos)

Los resultados de esta prueba se registraron como se indica a continuación, si la levadura fermentó el azúcar, produjo CO₂ que desplazó el medio de fermentación contenido en el tubo de Durham al llenarlo con CO₂, y la cantidad de líquido desplazado del tubo de Durham se evaluó de la siguiente manera, (Kurtzman *et al.*, 2011a):

- + si fermentó el carbohidrato y produjo CO₂
- - no fermentó el carbohidrato ni produjo CO₂

- + 1/2 si fermentó el carbohidrato, pero el CO₂ producido sólo vació la mitad del tubo de Durham

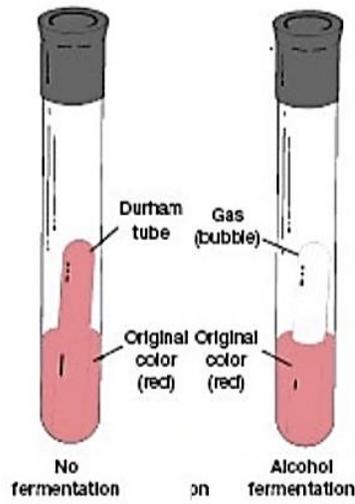


Figura 5-Pruebas de fermentación de carbohidratos utilizando tubos de Durham.

e) *Identificación molecular*

La identificación de las cepas aisladas representativas de cada grupo formado a partir de la identificación se hizo a través de la reacción de amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS4. Para ello, primero se realizó una extracción de ADN genómico con el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research, EUA) de células recolectadas de un cultivo GELP (YPD) incubado 24 h a 27°C. La amplificación se llevó a cabo en un volumen de reacción de 25 µl, que contenía 12.5 µl de HotStart Master-mix Qiagen, 0.25 µl de cada uno de los iniciadores ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTTGCGG'3) e ITS4 (5' TCCTCCGCTTAGATATGC'3) (White et al., 1990) 12 µl de agua bidestilada libre de nucleasas y 1µL (15 ng/µL) del producto de la extracción. La amplificación realizada en un termociclador modelo Bio-Rad Mycycler (Bio-Rad, CA, EUA) siguió el siguiente programa de condiciones: una etapa de desnaturalización inicial de 15 min a 95 °C seguida de 35 ciclos: 1 min a 94 °C, 2 min a 55.5 °C, 2 min a 72 °C; y una extensión final de 10 min a 72 °C (White et al., 1990)

Todos los productos de amplificación fueron secuenciados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Biodiversidad y de la Salud, Instituto de Biología UNAM (México) por el método de reacción de terminación de cadena (Sanger et al., 1977) utilizando el kit el kit Big Dye terminador V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa UGENE v42.0 (Okonechnikov et al., 2022) y se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank utilizando el programa BLASTN en línea (Altschul et al., 1997), considerando como de la misma especie aquellas con un 99% al 100% de similitud. Todas las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank, el número de acceso de cada secuencia se indica en la sección de resultados.

Determinación de la diversidad y de la sucesión microbiana.

La diversidad alfa de cada una de las muestras se determinó utilizando el índice de diversidad de Shannon calculado con la fórmula $-\sum p_i \ln(p_i)$ [p_i =proporción de individuos de la especie i respecto al total de individuos] para cada tiempo de fermentación (Kirchmayr et al., 2017).

Para evaluar el cambio de diversidad entre las muestras, se determinó la diversidad beta a través del índice de Sorensen ($I_s = \frac{2c}{a+b}$), que permite comparar el número de especies en común entre las etapas de fermentación, donde a y b indican el número de especies de cada muestra respectivamente, mientras que c se refiere a las especies que se comparten entre ambas muestras (Franco-López, 2011; Moreno, 2001). Para ello se utilizó la librería de análisis ecológico de comunidades “vegan” (Oksanen et al., 2020) y la librería de partición de la diversidad beta en componentes de recambio y anidamiento “betapart” (Baselga et al., 2022) del entorno de programación “R” (versión 4.2.1) que calcularon los índices de similitud y, aplicando el modelo de aglomeración UPGMA en el que se promedian los índices de similitud entre pares de muestras, (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011) se construyó un dendrograma que resume y representa gráficamente el recambio de especies a lo largo de las etapas evaluadas a lo largo del proceso de elaboración y fermentación del pulque en la Hacienda de Xochuca.

Estudios fisicoquímicos

Se realizó una evaluación del pH (NMXV-041) *in situ* de cada una de las muestras tomadas durante el proceso de elaboración del pulque.

Las concentración de la glucosa, fructosa, sacarosa, ácido láctico, ácido acético y etanol, de cada una de las muestras evaluadas fue obtenidas por le técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando un equipo Infinity II 1260 (Aligent Technologies, CA, EU) con una columna Aminex HP 87 H (Bio-Rad, CA, EU), ácido sulfúrico 0.005 M como fase móvil con un flujo de 0.6 mL/min, detector RID y horno de columnas a 45 °C.

Para la evaluación del contenido de compuestos volátiles por cromatografía de gases (HPLC GC-MS) se inició con una técnica de extracción líquido-líquido (Abad-Fitz et al., 2020). Para ello, por muestra de pulque, se preparó un embudo separador limpio al que

se agregaron 20 mL de CH₂Cl₂ (Sigma-Aldrich-Fluka Co., St. Louis, MO, EE. UU.) con 20 mL de la muestra respectiva, seguido de una agitación cuidadosa durante 10 minutos. Las muestras se pasaron a través de Na₂SO₄ anhidro (Sigma-Aldrich-Fluka Co., St. Louis, MO, EE. UU.) para deshidratar completamente. La separación por fases se hizo por centrifugación a 500 rpm durante 20 min en una centrífuga refrigerada a 4°C, recuperando las fases orgánicas. Después, las muestras se almacenaron a -20 °C durante 12 horas y en los casos de detectar la presencia de residuos inorgánicos, se filtraron y centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones. Las fases orgánicas se concentraron con nitrógeno gaseoso hasta obtener un volumen de 1 mL antes de ser almacenadas en viales de vidrio transparente para automuestreador de 5 mL a -20 °C, hasta el momento en el que se realizaron los análisis de GC-MS. Se preparó una alícuota de cada muestra que se mezcló en un vortex con 500 µL de una solución de tetradecano (0.5mg mL⁻¹). Cada preparación se llevó a un volumen de 250 µL con nitrógeno gaseoso. Posteriormente, se añadieron 20 µL de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) y se calentó a 30 °C durante 10 min. Para el análisis de compuestos volátiles de cada muestra, se procesaron 2 µL en un cromatógrafo de gases (Hewlett Packard 6890 serie II) acoplado a un espectrómetro de masas con flujo de impacto de electrones (Hewlett Packard serie 5972) con una columna capilar ECWAX10 (30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm de espesor de película). Se utilizó helio como gas portador a 7,67 psi con un flujo constante de 1,0 mL min⁻¹. Las condiciones instrumentales se programaron de la siguiente manera: la entrada frontal se mantuvo a 200 °C, temperatura del detector 250 °C, potencial eléctrico 70 eV, voltaje de ionización, presión del inyector 5 psi. La temperatura inicial del horno se fijó en 44 °C durante 2 min aumentando 15 °C cada min hasta alcanzar los 80 °C durante 1 min.

El software cualitativo MS-DIAL (versión 4.9.2., RIKEN, EUA) fue utilizado para procesar todos los datos obtenidos en el análisis GC-MS. El tratamiento de los datos crudos inició con la deconvulación de las entidades moleculares potenciales (EMP) mediante el algoritmo incluido en el programa en modo centroide, incluyendo todas aquellas EMPs resultantes en el tiempo de corrida analítica y con un peso molecular de entre 200 y 1500 Da con una tolerancia de 0.05 Da. Después, las señales pertenecientes al blanco N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) fueron suprimidas de cada cromatograma para

eliminar interferencias. En seguida, los datos de los cromatogramas fueron comparados con las bases de datos locales del software correspondientes a productos naturales obteniendo 3 propuestas de fórmulas moleculares y compuestos por cada EMP. A continuación, la base de datos del NIST Mass Spectral Search Program (versión 11.0, NIST, EUA) fue utilizada para la comparación de las EMP con los compuestos encontrados, estableciendo las correspondientes identidades cuando la correlación experimental y la base de datos fue mayor a 0.65 así como cuando los índices de retención experimentales y teóricos fueron correspondientes.

6. Resultados

Descripción del proceso de elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca, Tlaxcala, México.

El proceso de producción de pulque comercial que se lleva cabo en la Hacienda de Xochuca en el municipio de Tlaxco, Tlaxcala, México, se describe a continuación con la información obtenida de los *tlachiqueros* y *mayordomo*, personal responsable a la extracción de aguamiel y elaboración de pulque durante la realización de este estudio. La producción de pulque inicia con la selección de ejemplares de *A. salmiana* maduros que estén listos para el proceso de capado que, de acuerdo con la información proporcionada por uno de los *tlachiqueros* responsables del capado de magueyes, ocurre cuando el maguey tiene de aproximadamente 5 años o más de plantado y se observa un adelgazamiento y cambio en el tono de color del *meyolote*, que son las hojas centrales del maguey, lo que precede al surgimiento del brote floral conocido como *quiote*, por lo que se procede a retirar el “huevo del maguey”, tal como se conoce al primordio floral embrionario de la planta, evitando así el crecimiento del quiote que, de lo contrario, consumiría todos los recursos de reserva de la planta. Otro criterio que el *tlachiquero* contempla para considerar a un maguey maduro es lo que se conoce como las “tres caras”, que significa que el *meyolote* se observa completo sin la obstrucción de alguna de las pencas, desde tres puntos distintos. Se selecciona el punto de donde es más fácil acceder al centro del maguey, abriendo una entrada al cortar las líneas de espinas de las pencas que llevan a él. Una vez formada la entrada, se “corta la llave”, es decir, se corta en triángulo una de las pencas centrales, para luego empezar con la abertura de las hojas que componen el *meyolote*, fijándolo con las pencas cortadas, formando una “cruz” que marca y “protege” al maguey recién capado. Terminado eso, el centro del *meyolote* queda expuesto y es entonces que, utilizando una barreta de hierro con un extremo plano afilado conocida como *quebrador*, se corta ese órgano de la planta dejando una oquedad en su lugar, terminando así, el proceso de capado. La oquedad formada se tapa con una piedra y el maguey se deja madurar por varios meses con el fin de que se incremente el contenido de azúcares del aguamiel (Figura 6, fotografías a-h).



Figura 6- Elaboración de pulque comercial en la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala. Fotografías a-h. Proceso de capado de un maguay para la producción de aguamiel. A) Selección de un maguay (*Agave salmiana*) maduro, b) formación de la entrada al meyolote, c) apertura de las pencas que forman el meyolote d) el maguay se marca con una cruz hecha por las pencas del mismo meyolote, e) el centro queda expuesto y es cortado con un “quebrador”, f) el brote floral es retirado, g) maguay castrado, h) el “huevo del maguay”.

Después de 6 meses se realiza la *picazón* que consiste en abrir el tejido cicatricial que se formó en el centro de la oquedad con el fin de formar la cavidad conocida como *cajete* para que en ella se acumule el aguamiel. Una vez hecho el *cajete*, se inicia un ciclo de raspados consecutivos, aminorando el tiempo entre episodios de raspado, siendo el primero 15 días después de haber hecho la cavidad, el segundo episodio de raspado ocurre a los 6 días del primero, y luego de uno o dos días, se concluye con el tercer ciclo de raspado, que indica que el maguey está listo para formar parte de la cadena de producción constante de aguamiel, así que se raspa diariamente con la intención de abrir los vasos del *cajete* y de que fluya el aguamiel hacia la cavidad para que después sea extraído por el tlaquichero. El *cajete* siempre es cubierto con pencas y piedras para proteger la savia de la lluvia, insectos y de otros animales.

Para la extracción se ocupa un acocote de fibra de vidrio con la que el tlachiquero succiona hasta 2 L de aguamiel desde el interior del *cajete* para luego ser vaciada en las *castañas*, contenedores de fibra de vidrio con una capacidad de 45 L. En ellas se transporta el aguamiel, con ayuda de un burro, al interior del *tinacal*, donde las *castañas* se pesan para cuantificar la cantidad de aguamiel y determinar el pago correspondiente a cada *tlachiquero* (Figura 6.2, fotografías i-o).



Figura 7- Elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca (Continuación)

Fotografías i-k. 1) Equipo para la colecta del aguamiel, acocote y castañas utilizadas para el traslado del aguamiel, j) Cajete con abejas, k) Metzal, l) Interior del cajete con aguamiel, m) Colecta del aguamiel por succión con el acocote, n) Deposito del aguamiel en la castaña, ñ) Exterior del tinacal, o) Pesado de las castañas. Fotografías: Rodrigo Arredondo Fernández

El *tinacal* es un espacio cerrado con ventanas pequeñas, donde se encuentran las tinas de fermentación con una capacidad de 500 a 800 L fabricadas con fibra de vidrio, usadas para la producción comercial de *pulque*; y unas más pequeñas que pueden ser cuero de res sin curtir, destinadas esencialmente para el consumo del personal de la hacienda en tiempo de festividades, tanto así que la más pequeña, con capacidad aproximada de 15 L, es llamada “tina del patrón”. En este espacio, se prepara el inóculo, también llamado “semilla”, utilizando aguamiel fresco y de buena calidad de acuerdo con el criterio del *mayordomo*, quien monitorea constantemente el proceso que consiste en dejar que se fermente espontáneamente de 15 a 30 días, considerándola lista cuando se alcanza cierto grado alcohólico y acético, presenta un color blanquecino y se forma el *zurrón* en la superficie (Figura 6.3, fotografías p-w). Esta *semilla* se mantiene bajo protección y se renueva de acuerdo con las necesidades del tinacal.



Figura 8-Elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca (continuación)

Fotografías p-w. p) Tinas para la *semilla madre*, q) alimentación de la semilla con el mejor *aguamiel*, r) *semilla madre*, s) filtrado del *aguamiel* colectado, t) tina de piel, u) depósito de alícuota de *semilla madre*, v) filtrado de *aguamiel*, w) adición de *aguamiel* a la tina de fermentación de cuero. Fotografías Rodrigo Arredondo Fernández.

Cuando la *semilla* esta lista, es utilizada para inocular las tinas de fermentación de 700 L, dándole continuidad al proceso de producción de pulque. A estas tinas se les agrega aguamiel fresco diariamente para mantener el proceso fermentativo hasta que presente las características distintivas del pulque, siendo el mayordomo quien, de acuerdo con su experiencia, decide cuando el producto esta listo para la comercialización, antes de que se inicie su acidificación y putrefacción. El tiempo de fermentación varía según la calidad del aguamiel, de la temperatura y de la estación del año, y de acuerdo con la experiencia del personal de la hacienda, el pulque de invierno es considerado de los mejores por su sabor.

Cuando el pulque está listo, es transportado en garrafones de 50 L y distribuido a tres pulquerías en la Ciudad de México, preferentemente en la tarde para evitar el calor del día y así mantener el producto fresco para su venta y consumo ya sea natural o curado, es decir, adicionado con frutas, semillas, hortalizas o derivados de origen animal (Figura 6.4, fotografías x-a1)



Figura 9-Elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca (final)

Fotografías x-a1. x) Control de calidad del pulque comercial, y) Vaciado de la tina de fermentación para pulque comercial, z) Llenado de los garrafones, a1) Cargamento de garrafones Fotografías Rodrigo Arredondo Fernández.

Estudio microbiológico

a) Aislamiento y cuantificación de levaduras

A partir de las placas de WL adicionadas con cloranfenicol inoculadas e incubadas *in situ* se realizó el conteo de UFC de levaduras durante 5 días. El promedio del total de UFC/mL presentes en las tres placas evaluadas para cada una de las diferentes muestras, así como el número de morfologías distintas observadas de cada muestra se presentan en la Tabla 4, mientras que la Figura 10 representa gráficamente el cambio de UFC/mL entre muestras a lo largo del proceso, que como se puede observar, tiene una tendencia ascendente hasta la última muestra evaluada, correspondiente a la 72 horas de fermentación.

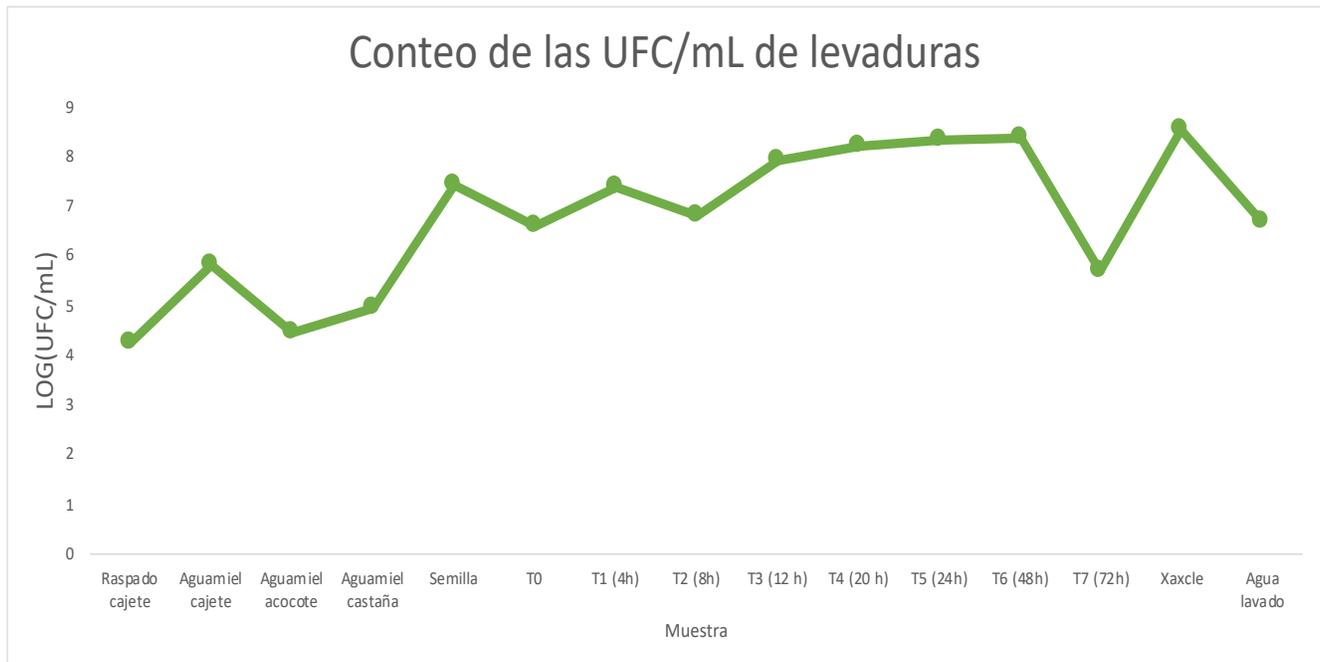


Figura 10-Cambio en el conteo de las UFC/mL de las levaduras aisladas.

b) Identificación fenotípica

Los resultados de las evaluaciones de identificación fenotípica permitieron formar 10 grupos cuyas respectivas caracterizaciones se encuentran agrupadas en la Tabla 5. Del proceso de selección de colonias a partir de sus características macromorfológicas se creó un registro con las descripciones morfológicas de las colonias (Tabla 5), logrando

registrar 86 colonias aisladas en total de todas las muestras, teniendo un máximo de 13 morfotipos coloniales distintos en la muestra tomada del aguamiel del *acocote* y un mínimo de 2 desde la muestra correspondiente a las 12 h de fermentación (M9) (Figura 11).

Tabla 4- Cuantificación de levaduras y parámetros fisicoquímicos tomados *in situ* de las muestras obtenidas.

Muestra	Clave	UFC/mL	pH±0.025	Temperatura (°C)
Aguamiel cajete	M1	61.7x10 ⁴	5	8
Aguamiel acocote	M2	26.7x10 ³	5	10
Aguamiel castaña	M3	83.0x10 ³	5.5	18
Semilla	M4	26.7x10 ⁶	3	17
Agua lavado	M5	46.6x10 ⁵	4	ND
T0 Aguamiel + semilla	M6	36.7x10 ⁵	4.5	17
T1 fermentación 4h	M7	23.6x10 ⁵	4	16
T2 fermentación 8 h	M8	60.0x10 ⁵	3.5	17
T3 fermentación 12 h	M9	78.0x10 ⁶	3.5	16
T4 fermentación 20 h	M10	16.0x10 ⁷	3	15
T5 fermentación 24 h	M11	21.1x10 ⁷	3	16
Raspado cajete	M13	17.6x10 ³	5	8
“Xaxtle”	M14	33.3x10 ⁷	3.5	16
T6 fermentación 48 h	M15	21.8x10 ⁷	3.5	22
T7 fermentación 72 h	M16	46.6x10 ⁴	3	21

ND=No determinado

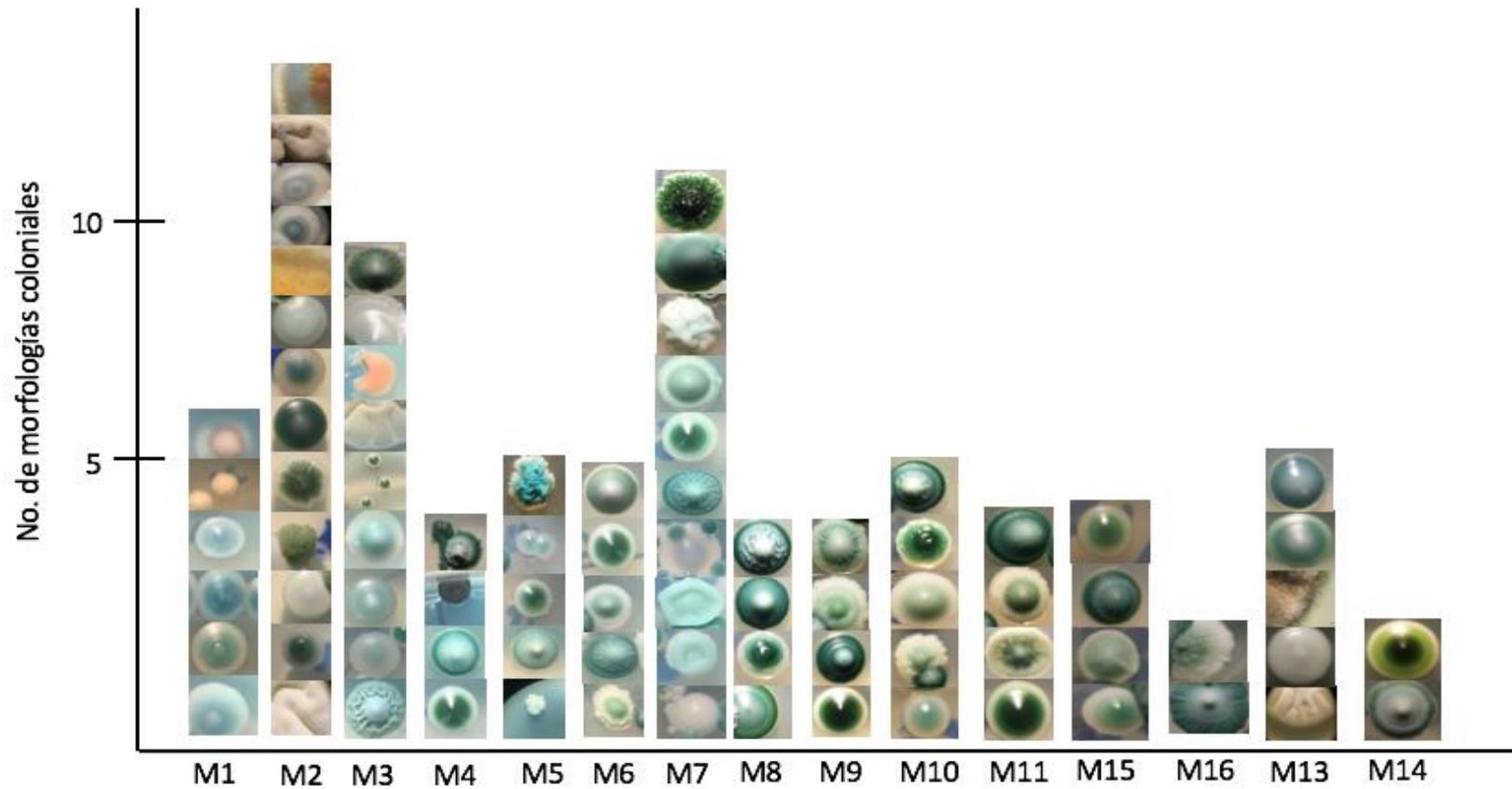


Figura 11-Diversidad de morfologías coloniales en medio de cultivo WL+cloranfenicol

M1: Aguamiel cajete; M2: Aguamiel acocote; M3: Aguamiel castaña; M4: Semilla; M5: Agua de lavado de la tina; M6: T0 Aguamiel+semilla; M7: T1 fermentación 4 h; M8: T2 fermentación 8 h; M9: T3 fermentación 12 h; M10: T4 fermentación 20 h; M11: T5 fermentación 24 h; M15: T6 fermentación 48 h; M16: T7 fermentación 72 h; M13: Raspado de cajete; M14: "Xaxtle".

Tabla 5-Resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas considerados para la identificación fenotípica de los aislados de levaduras obtenidos.

Grupo	Clave aislado										
	<i>C. boidinii</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>K. gamospora</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>M. guilliermondii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. paradoxus</i>	<i>Saccharomyces-OTU</i>	<i>St. stellata</i>	<i>Z. bailii</i>
Prueba	m3c2	m2c3 m2c5a m7c6 m7c10 m13c2 m1c5 m2c12 m3c10.A	m8c1	m7c9	m1c2.1 m1c3 m1c4 m2c6.B m2c7a.1 m2c8.A m2c10.C m2c11.B m3c8.A m7c4	m5c5.p m4c1.1 m2c4b m3c1 m10c2 m11c2b m13c4 m13c5 m3c7 m3c9.A m2c7b m10c1 m3c3.A	m4c2 m4c4 m9c2 m10c5 m11c4 m16c2 m11c3 m8c4	m3c4 m6c5 m7c2.A m7c7 m9c3a m10c3 m15c2	m1c1.p m4c5 m5c2.2 m6c1 m6c2 m6c3a m7c3 m11c2a.1 m14c1 m15c4.P m15c6 m16c1	m5c3 m6c4 m7c5 m9c1 m10c4 m11c1a m14c2 m15c1 m15c5	m2c4a
Morfología Colonial											
Color	VA	B-V	V-B	V	G-B	Vc-B	VA	VA	VA	V-B	Vc
Brillo	Br	Op	Br	Br	Br	Br, Op	Op	Op	Op	Br	Br
Textura	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu

Borde	Ct	Ct, On	Ct	On	Ct	On, Ct	Ct	Ct, On	Ct, On	On, Lb	Ct
Forma	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci
Elevación	Pl	Cn, Pl	Pl	Pl	Cn	Un, Cn	Un, Cv	Un, Cv	Un, Cv	Pl	Cn

Color: A=azul, B=blanca, V=verde, Vc=verde claro, G=gris. (La combinación homogénea de dos colores está indicada por las claves correspondientes a cada color, p. ej: AV=azul verdoso; mientras que la combinación heterogénea de dos colores está indicada por un guión, p.ej: A-V=azul con verde); Brillo: Br=Brillosa, Op=Opaca; Textura: Bu; Borde: Ct=continuo, On=ondulado, Lb=lobulado; Forma: Ci=circular; Elevación: Pl=plana, Cn=convexa, Un=unbonada, E=elevada, Cv=convoluta.

Morfología Celular

Grupo	<i>C. boidinii</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>K. gamospora</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>M. guilliermondii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. paradoxus</i>	<i>Saccharomyces-OTU</i>	<i>St. stellata</i>	<i>Z. bailii</i>
Forma de la célula	G,S,C, Oo	G, S	C, S	G, S	O, G, S, C	G,S, O, C,Oo	G,S, O, Oo	G,S, O, Oo	G,S, O, Oo	C, O, Oo	O, Oo, G,S
Gemación	GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM
Seudomicelio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Reproducción sexual	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
Forma ascosporas	Rd	-	-	-	Re	Re	Re	Re	Re	-	-

Forma de la célula: G=globosa, S=subglobosa, C=cilíndrica, O=Ovalada, Oo=ovoide; Forma de ascosporas: Rd=redonda, Re=reniforme

Pruebas de fermentación

Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactosa	-	+	-	-	+	V	+	V	V	-	-

Maltosa	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	+	(v)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	+	V	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	+	V	V	+	V	V	V	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tolerancia a etanol												
Grupo	<i>C. boidinii</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>H. valbyensis</i>	<i>K. gamospora</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>M. guilliermondii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. paradoxus</i>	<i>Saccharomyces-OTU</i>	<i>St. stellata</i>	<i>Z. ballii</i>	
2%	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4%	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	D
6%	+	+	-	+D	+	+	+	+	+	+	D	D
8%	+D	+D	-	-	V	+D	+	+	+	+	D	D
10%	-	-	-	-	-	-	V	V	V	V	-	-
Tolerancia a cicloheximida												
0.01%	+	V	-	+	+	+	D	V	V	V	-	-
0.1%	+	V	-	+	+	+	-	V	V	V	-	-
Osmotolerancia												
Glucosa 50%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucosa 60%	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
NaCl 10%	+	+	+	+	V	+	-	-	-	-	-	-

V=variable, (+)=positiva, (-) = negativa, D=débil.

c) Identificación genotípica

La información de la secuenciación de la región ITS1-ITS4 de aislados representativos de cada grupo formado a partir de la caracterización fenotípica descrita anteriormente fue comparada con la base de datos genéticos del NCBI, permitiendo identificar las secuencias con un rango de similitud del 99-100%. La clave de los aislados representantes de cada grupo con su respectivo porcentaje de similitud y número de acceso correspondiente se encuentra en la Tabla 6.

Tabla 6-Identificación molecular

Muestra	Clave aislado	Especie	Id NCBI Identificado	%Similitud	No. acceso
Aguamiel cajete	m1c3	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KY103823.1	99%	ON248389
	m1c4	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	MW284516.1	99%	ON248390
	m1c5	<i>Clavispora lusitaniae</i>	EU149777.1	99%	ON248391
Aguamiel acocote	m2c6.B	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KY103823.1	99%	ON248399
	m2c10.C	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KY103823.1	99%	ON248401
	m2c8.A	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	KY103823.1	99%	ON248400
	m2c11.B	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	MW284516.1	99%	ON248402
	m2c4a	<i>Zygosaccharomyces balii</i>	KY106027.1	99%	ON248396
	m2c3	<i>Clavispora lusitaniae</i>	EU149777.1	99%	ON248395
	m2c4b	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MK267607.1	100%	ON248397
	m2c5a	<i>Clavispora lusitaniae</i>	EU149777.1	99%	ON248398
	m2c7b	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY104244.1	100%	ON248441
	m2c12	<i>Clavispora lusitaniae</i>	EU149777.1	100%	ON248403
Aguamiel castaña	m3c7	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY104257.1	100%	ON248438
	m3c2	<i>Candida boidinii</i>	KY101978.1	99%	ON248436
	m3c4	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	MH595334.1	100%	ON248437
	m3c10.A	<i>Clavispora lusitaniae</i>	EU149777.1	99%	ON248439
Semilla	m4c2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KY105003.1	100%	ON248445
	m4c4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MH595427.1	100%	ON248446
	m4c1.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY104257.1	99%	ON248444
Agua de lavado	m5c5.p	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KY104257.1	99%	ON248450
	m5c1.1	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	KY105213.1	100%	ON248448
	m5c4.A	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	MH595334.1	100%	ON248449
T0 Aguamiel + semilla	m6c5	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	KY105213.1	99%	ON248498
	m6c4	<i>Starmerella stellata</i>	MN371887.1	99%	ON248497
T1 fermentación 4h	M7C2	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	KY105207.1	99%	ON306654

	m7c4	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	MW284516.1	100%	ON306655
	m7c5	<i>Starmerella stellata</i>	KY102416.1	100%	ON306656
	m7c6	<i>Clavispora lusitaniae</i>	EU149777.1	99%	ON306657
	m7c10	<i>Clavispora lusitaniae</i>	EU149777.1	99%	ON306660
	m7c7	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	KY105207.1	100%	ON306658
	m7c9	<i>Kazachstania gamospora</i>	KY103643.1	99%	ON306659
T2 fermentación 8 h	m8c4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CP006454.1	99%	ON287071
	m8c1	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	KY103576.1	100%	ON287070
T3 fermentación 12 h	m9c1	<i>Starmerella stellata</i>	KY102416.1	100%	ON306708
	m9c2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CP006454.1	100%	ON306709
	m9c3a	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	KY105207.1	100%	ON306710
	m9c4.B	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	KY105213.1	100%	ON306711
T4 fermentación 20 h	m10c2	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	KP794175.1	100%	ON318878
	m10c3	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	MH595334.1	100%	ON318879
	m10c4	<i>Starmerella stellata</i>	KY102416.1	99%	ON318880
	m10c5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MH595427.1	100%	ON318881
T5 fermentación 24 h	m11c2b	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MW284504.1	99%	ON328321
	m11c3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KY105213.1	99%	ON328322
	m11c4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MH595427.1	100%	ON328322
T6 fermentación 48 h	m15c1	<i>Starmerella stellata</i>	KY102416.1	99%	ON339526
	m15c2	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	KY105213.1	99%	ON339527
	m15c3.1	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	KY105213.1	99%	ON339528
	m15c5	<i>Starmerella stellata</i>	KY102416.1	99%	ON339529
T7 fermentación 72 h	M16c2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KY105003.1	99%	ON340533
Raspado cajete	m13c2	<i>Clavispora lusitaniae</i>	EU149777.1	99%	ON4060202

Determinación de la diversidad y de la sucesión microbiana.

A partir de la identificación de los aislados representativos de cada grupo de la Tabla 5 se calculó la diversidad de la comunidad de levaduras de cada una de las muestras. Se determinó la diversidad alfa para cada muestra a través del índice de Shannon, calculado con la fórmula $-\sum p_i \ln(p_i)$, (Kirchmayr et al., 2017). Estos resultados se encuentran agrupados en la Tabla 7 entre los que se destaca que la muestra correspondiente a las 4 horas de fermentación (M7) fue la que mayor diversidad.

En la Figura 9 se muestra el dendrograma que resume y representa gráficamente el reambio de la diversidad de especies de levaduras aisladas, de acuerdo con la determinación de la diversidad beta a través del índice de Sorensen, cuyo valor obtenido fue de 0.91, y por medio del modelo de aglomeración UPGMA, que indica que hay una diferenciación de 3 comunidades principales a lo largo de todo el proceso de producción de pulque estudiado en este trabajo.

Tabla 7-Diversidad de la comunidad de levaduras de cada muestra con su respectivo índice de diversidad alfa (índice de Shannon).

Especies	MUESTRAS															TOTAL
	Pared-cajete	Aguamiel cajete	Aguamiel acocote	Aguamiel castaña	Semilla	T0	T1 (4h)	T2 (8h)	T3 (12 h)	T4 (20 h)	T5 (24h)	T6 (48h)	T7 (72h)	Xaxcle	Agua lavado	
<i>Candida boidinii</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Clavispora lusitanae</i>	1	1	3	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	8
<i>Clavispora</i> sp. (UBC)	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	4
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Kazachstania gamospora</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	0	2	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7
<i>Kluyveromyces</i> sp. (UBC)	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0	0	1	2	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	7
<i>Meyerozyma</i> sp. (UBC)	2	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	0	0	0	2	0	0	1	1	1	2	0	1	0	0	8
<i>Saccharomyces paradoxus</i>	0	0	0	1	0	1	2	0	2	1	0	1	0	0	2	10
<i>Saccharomyces</i> sp. (UBC)	0	1	0	0	1	3	1	0	0	0	1	3	1	1	1	13
<i>Starmerella stellata</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	2	0	0	0	6
<i>Starmerella</i> sp. (UBC)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	4
<i>Zygosaccharomyces balii</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total de aislados identificados	3	5	11	9	4	5	9	4	5	5	5	6	2	2	5	80
Índice de Shannon (H')	0.6365	1.3321	1.3761	1.3030	1.0397	0.9502	2.1594	1.3862	1.3321	1.3321	1.3321	1.0114	0.6931	0.6931	1.3321	2.6310

UBC= Unidad básica de caracterización (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011)

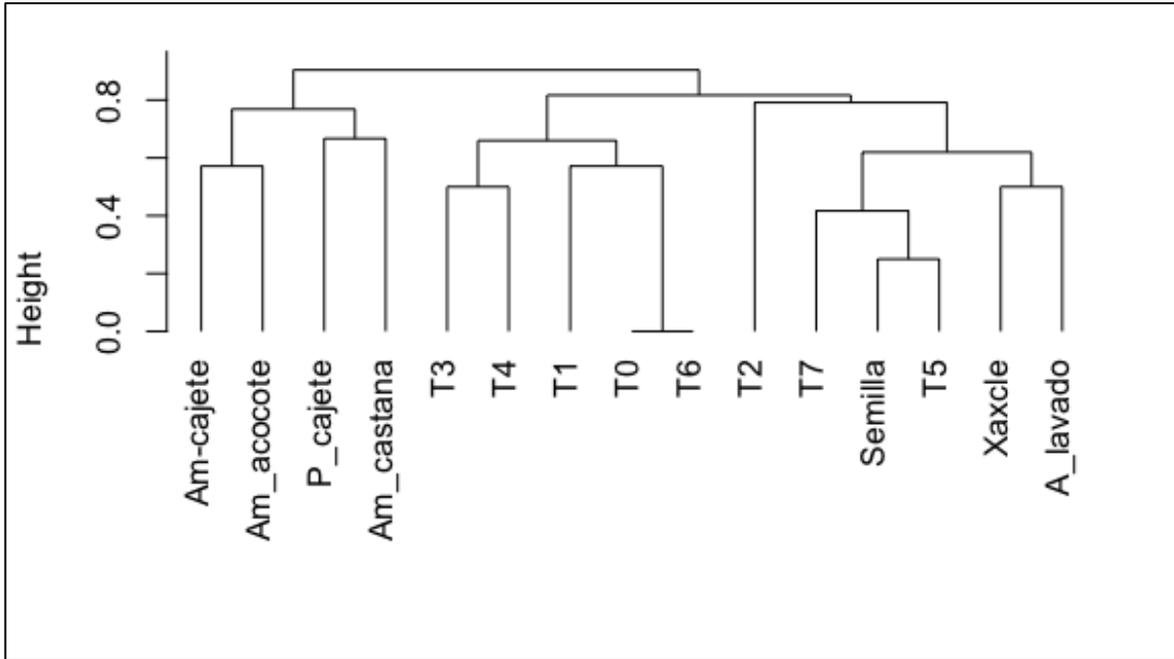


Figura 12-Dendrograma que representa el recambio de especies de levaduras entre muestras, formando grupos de acuerdo con su parecido en diversidad

Estudios fisicoquímicos

El pH y la temperatura fueron parámetros tomados *in situ*, cuyos datos se encuentran registrados en la Tabla 8, mientras que los cambios de las concentraciones porcentuales de los metabolitos principales de la fermentación del pulque obtenidas por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se encuentran representados gráficamente en la Figura 13.

Como se puede observar, la primera fase del proceso de fermentación del pulque corresponde a la muestra obtenida del *aguamiel del cajete*, cuyas condiciones fisicoquímicas *in situ* de esta fase caracterizaron por un pH de 5, una temperatura de 8° C y un color ámbar claro. De acuerdo con la evaluación química, en este punto hay fructuosa, sacarosa, etanol, ácido láctico y acético representados con una concentración del 2.3, 2.0, 1.7, 0.7 y 0.4% respectivamente.

La segunda muestra, el aguamiel del *acocote*, fue tomada minutos después de la primera por lo que son similares entre si, el pH se mantuvo en 5 y la temperatura se elevó solo 2°C, en cuanto a la composición química se caracterizó por la presencia de sacarosa (0.05%), glucosa (0.1%), fructuosa (4.2%), etanol (0.1%), ácido láctico (0.6%) y acético (0.4%). Es importante señalar que en el caso de la fructosa, tuvo un incremento en su concentración, siendo en esta segunda muestra, la que registró el valor más alto en todo el proceso estudiado.

En la tercera fase, correspondiente al aguamiel proveniente de la *castaña*, se caracterizó por tener una temperatura de 18°C y un pH de 5.5 relacionado a la presencia de ácido láctico y acético principalmente en un porcentaje de 0.1 y 0.06% respectivamente. Por otra parte, el etanol estuvo representado por un 0.1%, indicador de que la fermentación alcohólica ya había iniciado, mientras que las concentraciones de los azúcares de esta muestra fueron: sacarosa (2.3%), glucosa (0.3%) y fructosa (3.1%) que descendió 1.1% en comparación con la muestra anterior.

En la *semilla*, correspondiente a la cuarta muestra, caracterizada por un color blanco y consistencia viscosa, registró un pH con valor de 3 representado por el ácido láctico y acético en concentraciones de 0.7 y 0.2% respectivamente. El etanol tuvo una concentración de 4.7%, uno de los puntos más altos registrados en el proceso y la concentración de azúcares fue <1% en los tres evaluados.

Dentro de la secuencia del proceso, la siguiente muestra corresponde a la conjunción del aguamiel de la *castaña* y la *semilla* en una proporción 3:1, también llamada muestra tiempo cero (T0), Esta muestra tuvo un pH de 4.5 a una temperatura de 17°C, un color ligeramente ámbar del aguamiel que se combinó con el blanco de la semilla, en la que los azúcares tuvieron una concentración de: sacarosa (0.18%), glucosa (0.19%), fructosa (3.7%); mientras que la del ácido acético, láctico y etanol fue de 0.88%, 0.62% y 1.18% respectivamente.

La sexta muestra, correspondiente a las 4 horas de fermentación, se distinguió por un pH de 4, mientras que la concentración de los azúcares fue la siguiente: sacarosa (2.3%), glucosa (0.86%) y fructosa (2.3%), mientras que la concentración del etanol fue de 1.7%. Después de 8 horas de fermentación, en la séptima muestra, el pH disminuyó hasta 3.5 a una temperatura de 17°C. La concentración de azúcares y ácidos orgánicos quedó registrada de la siguiente manera: sacarosa (2.4%), glucosa (0.9%), fructosa (2.9%), ácido acético (0.13%) y ácido láctico (0.41%).

La octava muestra, tomada a las 12 horas de fermentación, considerado un pulque listo para su consumo de acuerdo con los criterios del responsable de la elaboración, registró una acidez con valor de 3.5 de pH a una temperatura de 16°C. Las concentraciones de los metabolitos evaluados permanecieron prácticamente iguales a la muestra anterior a excepción de la sacarosa, cuya concentración bajo de 2.4% en la muestra anterior a 0.9%

A partir de las 20 horas de fermentación, correspondiente a la novena muestra, ya se consideró que era un pulque maduro por su sabor más ácido, representado por un pH

de 3, en la que los ácidos láctico y acético tuvieron una concentración de 0.45% y 0.14% respectivamente. También en este punto la concentración de la fructosa comenzó a descender hasta 2.4%, mientras que a sacarosa disminuyó hasta 0.4%. Por otro lado, la concentración del etanol continuó con su ascenso, alcanzando 2.7% en esta muestra.

En la décima muestra, tomada las 24 horas, las condiciones de acidez se mantienen en un pH de 3 a una temperatura de 16°C. La concentración de los ácidos orgánicos evaluados se mantuvo constante respecto a la muestra anterior, pero la de los azúcares mantuvo su tendencia a disminuir (sacarosa con 0.12%, glucosa con 0.5% y fructosa con 1.6%), en contraste con el etanol que llegó a registrar una concentración de 4.0%, cercano al del inóculo.

Después de las 48 horas de fermentación se tomó la onceava muestra, cuya acidez ya era desagradable, aunque su valor de pH seguía siendo de 3, así como su aroma por lo que se trataba de un pulque ya en un estado de deterioro. Las concentraciones de los metabolitos evaluados continuaron relativamente constantes en esta muestra respecto a la anterior.

La última muestra del proceso de fermentación, a las 72 horas, el pH se registró con un valor de 3 a 16°C, los azúcares registraron su concentración más baja en todo el proceso, 0.28% y 0.05%, para fructuosa y sacarosa respectivamente, y la de la glucosa fue nula; el etanol llegó a su punto más alto dentro del proceso, alcanzando una concentración de 5.5%.

Finalmente, las evaluaciones de las muestras correspondientes a los componentes residuales del proceso de fermentación, "Xaxtle" y el agua de lavado se enlistan a continuación. El "Xaxtle", es una sustancia sedimentaria que registró un pH de 3.5 a una temperatura de 16°C y se caracterizó por un bajo contenido de azúcares (<1%) y una concentración de etanol 5.45%, muy similar a la concentración de la muestra correspondiente a las 72 horas de fermentación. Por otro lado, el agua de lavado de la tina, es decir, después de vaciar la preparación estudiada se procedió al enjuague de la superficie donde se llevó a cabo la fermentación y se recuperó una muestra de la misma,

que tuvo un pH de 4, mientras que la concentración del contenido de azúcares, ácidos orgánicos y etanol fueron todos <1%.

En cuanto a los compuestos volátiles, la familias química más diversa detectadas durante el proceso fueron los ésteres, representados con 7 compuestos durante todo el proceso, de los cuales el ácido hexanedioico, bis(2-etilhexil) éster fue el más persistente y abundante desde el tiempo cero hasta las 48 horas de fermentación, siendo a las 24 horas cuando registró su concentración más alta detectada con 93.5%. Los alcanos y alcoholes estuvieron representados con 6 compuestos cada uno, de los cuales el tetradecano y el feniletil alcohol, fueron los más persistentes de estas respectivas familias. En la Tabla 9 se registran las concentraciones porcentuales de los compuestos volátiles detectados en el proceso que se complementa con la representación gráfica de la Figura 14.

Finalmente, se construyó un resumen gráfico que integra los principales resultados de la diversidad de levaduras y de los parámetros fisicoquímicos que permite observar los cambios en la composición de las comunidades de levaduras aisladas a lo largo del proceso en función del avance del proceso de elaboración del pulque (Figura 15).

Tabla 8- Parámetros fisicoquímicos tomados *in situ* durante la elaboración de pulque en la Hacienda de Xochuca

Muestra	Clave	pH±0.025	Temperatura (°C)
Aguamiel cajete	M1	5	8
Aguamiel acocote	M2	5	10
Aguamiel castaña	M3	5.5	18
Semilla	M4	3	17
Agua lavado	M5	44	ND
T0 Aguamiel + semilla	M6	4.5	17
T1 fermentación 4h	M7	4	16
T2 fermentación 8 h	M8	3.5	17
T3 fermentación 12 h	M9	3.5	16
T4 fermentación 20 h	M10	3	15
T5 fermentación 24 h	M11	3	16
Raspado cajete	M13	5	8
“Xaxtle”	M14	3.5	16
T6 fermentación 48 h	M15	3.5	22
T7 fermentación 72 h	M16	3	21

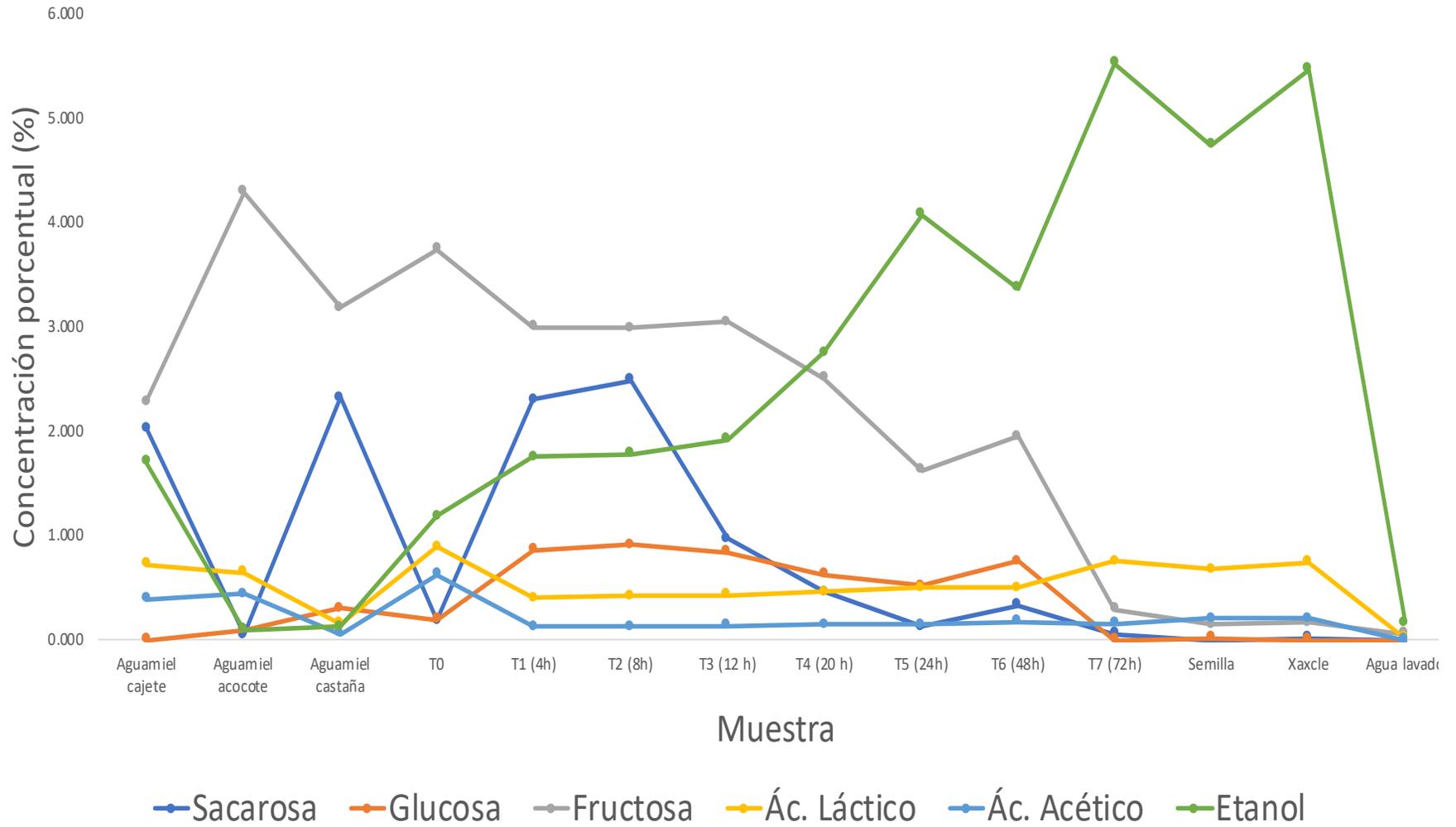


Figura 13-Cambios en la concentración porcentual de los metabolitos principales del pulque a lo largo de su proceso de elaboración.

Tabla 9-Identidad de los compuestos volátiles encontrados por GC-MS.

COMPUESTO TENTATIVO	FAMILIA	R.T. (min)	Masa	RI enc	RI teo	M1%	M2%	M3%	M4%	M5%	M6%	M8%	M9 %	M10%	M11 %	M13 %	M14 %	M15 %	M16 %	
1-Ciclopentiletanona	Acetonas	4,006	112.1	705	706							1.417245								
Ácido 4-Etoxi-4-oxobutanoico	Ácidos carboxílicos	5.382	146.1	1908	1912	1.350867	1.39946	16.31946	2.210735										2.084873	
Heneicosano	Alcanos	18,256	296.3	2100	2100					4.939012	1.057799									
Heptadecano	Alcanos	14.502	240.5	1699	1700				0.805549											
Hexadecano	Alcanos	14,498	226.2	1600	1600					9.220109										
Octacosano	Alcanos	18,260	394.4	2800	2800						1.660408								1.092418	

Pentadecano	Alcanos	13,578	212.2	1498	1500																
Tetradecano	Alcanos	11.352	198.4	1400	1400					7.476504	45.48763	13.08255	0.666077	4.464599	4.65985	4.329572	6.447689	8.429319	10.71915	4.213695	3.011558
2-Etil-1-decanol	Alcoholes	18,813	186.3	1963	1965						5.399232										
2,4-Dietilheptan-1-ol	Alcoholes	18.176	172.3	1981	1982						3.923386	1.126036									
2-Hexil-1-decanol	Alcoholes	18.982	242.4	1504	1504	0.429093	0.443198					1.318904									
2-Isopropil-5-metil-1-heptanol	Alcoholes	24,830	172.3	1351	1351						1.239754										
Isotridecanol	Alcoholes	9.25	200.3	1931	1931			5.673425	0.862307												

Feniletil alcohol	Alcoholes	4.66	122.1	1942	1944	3.567984	4.774329	66.69954	9.997006		1.350462	0.904785		3.050248		4.221626		9.037212
3,4-Dimetilbenzaldehido	Aldehídos	6,991	134.1	1789	1790						1.37549							
4,6,8-Trimetil-1-noneno	Alquenos	14,490	168.3	1067	1067							1.016638		1.171064				1.737219
2,3-Dimetil-1-penteno	Alquenos	3,993	98.1	647	648									1.638911				
2,3-Dimetil-3-hepteno	Alquenos	9.018	126.2	878	877	0.470967					2.711165			1.114065		2.455282		2.696349
3,3-Dimetil-1-hexeno	Alquenos	9.237	112.2	717	718	0.558683				10.44683	3.616039	1.36279						
Dietil succinato	Ésteres	5.876	130	1681	1680			7.723678	0.987043									

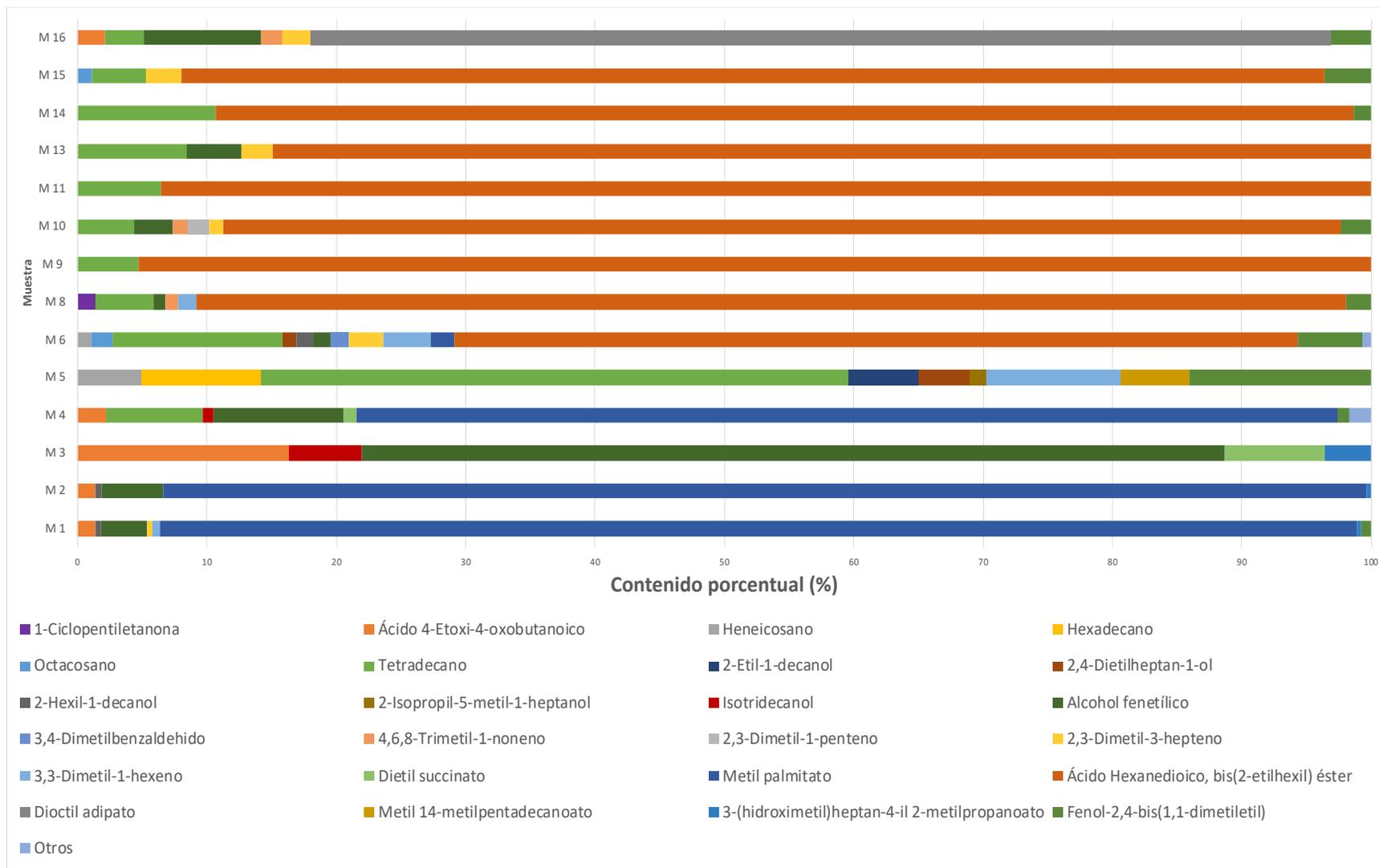


Figura 14- Composición porcentual de los compuestos volátiles encontrados en cada muestra estudiada durante la producción de pulque.



Figura 15-Resumen gráfico de la sucesión de las comunidades de levaduras y los cambios fisicoquímicos.

7. Discusión

La producción de pulque que se desarrolla en la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala, mantiene prácticas tradicionales y semejantes con otras descripciones de elaboración de pulque de diferentes localidades, como el capado del maguey, la recolección diaria del aguamiel y el uso de un inoculo o *semilla*, en el que se involucran personas encargadas de dirigir el proceso de acuerdo a criterios que son transmitidos entre las generaciones de trabajadores de la Hacienda que evidencian la autenticidad del producto (G. D. Álvarez-Ríos et al., 2020; Escalante et al., 2016; Ojeda-Linares et al., 2021).

Como se mencionó previamente, la sucesión ecológica es un proceso dirigido por los organismos y las condiciones iniciales, las interacciones entre ellos y los factores ambientales circundantes al sistema de fermentación, que dan lugar al recambio o sustitución secuencial de las comunidades microbianas involucradas (Franco-López, 2011; Wang et al., 2022). Particularmente, en el contexto de la elaboración de pulque se puede revisar cada etapa estudiada desde el ámbito biótico y fisicoquímico para determinar la sucesión de las comunidades de levaduras durante este proceso, que es evidente al observar los cambios en la diversidad de las levaduras aisladas e identificadas que son congruentes con el dendrograma construido a partir de los índices de similitud (Figura 9), en el que se pueden ver tres grupos principales: 1) las muestras iniciales de aguamiel obtenidas en el exterior del tinacal, 2) desde el tiempo cero hasta las 48 horas de fermentación y 3) la *semilla*, las últimas etapas de fermentación y las muestras residuales.

Al respecto, en el primer grupo de las muestras del aguamiel obtenidas en el exterior del tinacal, como el aguamiel de cajete, del acocote y de la castaña, se pudo una mayor diversidad de levaduras no-Saccharomyces junto con 5 unidades básicas de caracterización (Núñez-Colín & Escobedo-López, 2011), así como los primeros cambios fisicoquímicos en el proceso de elaboración del pulque que se les puede

asociar a la actividad metabólica de estos organismos. Al principio, en el *aguamiel del cajete* se observó que el contenido de etanol en esta etapa inicial (1.7%) ya era un indicativo de que la actividad microbiana con respecto a la fermentación alcohólica ya había iniciado. En este punto se pudo encontrar a *Clavispora lusitaniae*, *Kluyveromyces marxianus* y un miembro del género *Saccharomyces*, que, en conjunto, son considerados como especies representativas del *aguamiel* y son comunes de exudados y tejidos vegetales en proceso de descomposición, ricos en carbohidratos y vinculados a los insectos de entornos semejantes, (Enríquez-Salazar et al., 2017; Lachance, 2011a), tal como condiciones que son semejantes al de un maguey con un cajete expuesto, pues se trata de un tejido vegetal abierto que esta en un proceso de senescencia o deterioro por el proceso intrínseco del ciclo de vida de la planta que está en constante manipulación e interacción con insectos, especialmente abejas y mosquitas de la fruta (Escalante et al., 2016; Valadez-Blanco et al., 2012) .

A la diversidad de levaduras de la muestra anterior se suma con las encontradas en el *aguamiel del acocote*, *Meyerozyma guilliermondii* y *Zygosaccharomyces balii*, la primera esta relacionada con excrementos de insectos asociados a flores y frutos, así como a su capacidad de sintetizar ácidos orgánicos de interés industrial (Kurtzman, 2011; Yan et al., 2020); mientras que la segunda es común de hábitats ricos en azúcares fermentables y en proceso de acidificación, como miel, jugos y tejidos de frutas, mosto de uvas y exudados de árboles, y es reconocida en la industria por su capacidad de ser un organismo ácido-tolerante por lo que se ha evaluado su uso para producir ácido láctico (Kurtzman et al., 2011). Por lo tanto era factible que se encontrarán estas especies estas primeras fases del proceso, ya que al ser *aguamiel* recién extraído del *cajete*, aún se contaban con abundantes azúcares tal como se mostró en el apartado de resultados correspondientes de esta muestra.

En la castaña se integran las extracciones de *aguamiel* de otros cajetes, en la que aparece de *Candida boidinii* que es una levadura asociada en vida silvestre a frutos

y tejidos necróticos de *Opuntia megacantha* y a la mosca de la fruta (*Drosophila* sp.), aunque también se ha reportado su presencia en productos fermentados como el tepache, una bebida mexicana fermentada elaborada a partir de la piña, además, es de interés biotecnológico por ser capaz de sintetizar xilitol a nivel industrial (Lachance et al., 2011) (Bedó et al., 2021). *Saccharomyces paradoxus* es otra levadura que hace su primer aparición en el proceso, esta es considerada la especie hermana silvestre de *S. cerevisiae*, que se ha encontrado como parte de la microbiota natural de los exudados de árboles, superficies de hojas y entre las especies no identificadas de *Drosophila* sp. (Kurtzman et al., 2011).

La particular diversidad inicial de levaduras no-*Saccharomyces* es característica de procesos de fermentación espontánea o de aquellos que se llevan a cabo en condiciones aerobias con una constante interacción a la intemperie y con vectores que transportan e integran especies a la comunidad de estas levaduras que además son de interés biotecnológico por el aporte de compuestos aromáticos que contribuyen con el enriquecimiento de las características organolépticas a bebidas como el vino (Varela, 2016), la kombucha (Teoh et al., 2004) y el pulque.

El segundo grupo tuvo menos diversidad que la anterior, pero fue constante entre estas muestras que abarcaron desde el tiempo cero hasta las 48 horas de fermentación, durante este tiempo debieron ocurrir fenómenos de cooperación y antagonismo entre bacterias y levaduras, por el consumo de los azúcares y la producción de ácidos orgánicos y etanol, que restringen el crecimiento de otros microorganismos y se reduce la diversidad (Escalante et al., 2016; Estrada-Godina et al., 2001; Perez et al., 2019).

Un elemento clave que dirige la fermentación en este punto es el inóculo, que en este trabajo su diversidad de levaduras estuvo representada por *M. guilliermondii* y *S. cerevisiae* que es la especie de levadura más extendida en la industria alimenticia, muy común de los ambientes de fermentación artificiales, donde persiste, se reproduce, evoluciona y se dispersa; sin embargo, al ser

constantemente usada en procesos de fermentación en ambientes ricos en carbohidratos, se impuso una selección artificial que justifica su escasa presencia en ambientes naturales donde no puede competir con la microbiota silvestre; en contraste con *Saccharomyces paradoxus* que es la única especie de alta fermentación del género que ha sido aislada en la naturaleza (Kurtzman et al., 2011). La baja diversidad se puede explicar por el bajo contenido de azúcares de esta sustancia y el contenido de etanol, que fue de 4.7%, lo que es congruente con las propiedades típicas de un pulque maduro (Escalante et al., 2016). Es importante recordar que la semilla se alimenta diariamente con aguamiel para mantener su integridad y calidad, por lo que estas propiedades se mantienen relativamente constantes, por lo que es de esperar que esta diversidad de levaduras también sea persistente en esta muestra a lo largo del tiempo, algo que podría estudiarse si se evalúa la diversidad de levaduras de esta del inóculo a través del tiempo.

La combinación del inóculo y el aguamiel fresco de la *castaña* tuvo diversidad caracterizada por *Saccharomyces paradoxus* y la primera aparición de *Starmerella stellata*. Esta última es reconocida en la industria vinícola por ser un organismo fructofílico y por capacidad de sintetizar ésteres y beta-glucosidasa que mejoran los aromas de los vinos, además de ser capaz de tolerar hasta un 9% (v/v) de etanol (García et al., 2018; Magyar & Tóth, 2011), en este trabajo fue una de las especies persistentes a lo largo del proceso de elaboración del pulque después de este punto, mostrando tolerancia a etanol en concentraciones mayores al 4%, sin embargo, se ha reportado como sensible a la acidez (García et al., 2018) situación que debe ser considerada para posteriores estudios sobre sus interacciones con otras especies que le permiten sobrevivir a las concentraciones ácidas del pulque en las últimas etapas.

Después de 4 horas de fermentación, en un contexto en el que la concentración de los azúcares aún era semejante a los valores iniciales con un ligero incremento en la concentración de etanol, la diversidad de levaduras aisladas en esta fase se distinguió por la reaparición de especies que estaban originalmente en el aguamiel:

Clavispora lusitaniae y *Kluyveromyces marxianus*, junto con *Saccharomyces paradoxus* y *Starmerella stellata* originarias del inoculo; además aparece por única vez en todo el proceso *Kazachstania gamospora*, una especie que se ha aislado de suelos y hojarasca en Japón, sin embargo se ha estudiado en la industria del vino y se le reconoce por sintetizar más de 90 compuestos volátiles, entre ellos el fenetilpropionato que le da a los vinos un aroma floral (Dashko et al., 2015; Martini et al., 2011; Whitener et al., 2015).

En la séptima muestra, sobre la superficie de la preparación observó una espuma distintiva del proceso de fermentación, además de la presencia incidental de *Drosophila* sp. Respecto a la diversidad de levaduras aisladas de este proceso, *Saccharomyces cerevisiae*, *Clavispora lusitaniae* y *Starmerella stellata* mantuvieron su presencia y *Hanseniaspora valbyensis* hizo su aparente única aparición en todo el proceso. Esta última especie ya había sido reportada en pulque previamente, así como en exudados de plantas en Japón y cerveza de barril en Reino Unido; mientras que en la naturaleza se ha aislado de suelo, plantas y en la microbiota de *Drosophila* sp. junto a *H. guilliermondii* y *H. occidentalis*, sugiriendo que este insecto es un vector común de microorganismos que participan en la producción de productos fermentados (Cadez & Smith, 2011) además de ser considerada una especie responsable de producir altas concentraciones de compuestos aromáticos como etil-ésteres y alcohol isoamílico que brindan aromas afrutados en los productos en los que participa esta especie en su producción (Xu et al., 2006)

De las 8 a las 20 horas de fermentación, la acidez y etanol ya habían aumentado mientras que los azúcares tenían una tendencia a disminuir. En ese contexto, la diversidad de levaduras se mantuvo representada por *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *St. stellata*, y *M. guilliermondii*, cuya permanencia se le atribuye a su tolerancia al etanol gracias a la actividad de las alcoholdehidrogenasas y su capacidad de utilizar alcoholes como fuente de carbono y para sintetizar lípidos (Kurtzman, 2011; Yan et al., 2020).

El tercer grupo se caracterizó por aquellas muestras cuya diversidad era considerablemente menor a los otros dos grupos coincidiendo con el agotamiento de los carbohidratos y el aumento de la acidez; en general corresponden a la última etapa de fermentación, de las 24 a las 72 horas de fermentación y a las muestras residuales correspondientes al *Xaxtle* la sustancia blanca y viscosa que se precipita al fondo de la tina de fermentación (E. Torres-Maravilla et al., 2016), que es muy similar a la *semilla* en cuanto a su contenido de azúcares y etanol; y al agua de lavado, donde se encontraron las especies de levaduras más resistentes a las condiciones ácidas y etanólicas finales del pulque, tales como *S. paradoxus*, *St. stellata* y *M. guilliermondii* lo que indica que en la tina de pelo pueden quedar resguardadas células de las levaduras y otros microorganismos nativos del proceso de elaboración del pulque.

La densidad de las comunidades de levaduras (UFC/mL) también cambió a lo largo del proceso, similar al de otros procesos fermentativos, con una tendencia al aumento hasta las 72 horas de fermentación, donde al final quedan aquellas levaduras ácido-tolerantes como ocurre en el caso de la kombucha (Teoh et al., 2004). Esta disminución se asocia al proceso de deterioro del producto, por el contenido de etanol, la oxidación de varios compuestos orgánicos como los aminoácidos y el agotamiento de los carbohidratos (Escalante et al., 2016; Jeong et al., 2013).

Con respecto a los cambios fisicoquímicos a lo largo del proceso estudiado, estos se deben a la dinámica de los ácidos orgánicos, azúcares y alcohol que se producen por la actividad metabólica microbiana presente desde el sustrato inicial, el aguamiel.

Uno de los azúcares más relevantes de este proceso es la fructosa, pues es el componente principal de los fructooligosacáridos del aguamiel (Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018). Esto explica el aumento en la concentración del la

fructosa en las muestras de aguamiel y la persistencia de *K. marxianus* dentro de las comunidades encontradas en estas muestras, ya que se le ha asociado a la hidrólisis de los fructanos que libera este monosacárido en el sistema a través de la actividad de la inulinasa (Vicente-Magueyal et al., 2020), lo que ocurre hasta la muestra de las 20 horas de fermentación, donde fue encontrada por última vez y en donde este azúcar ya exhibía una tendencia a la disminución en su concentración.

Las concentraciones de los metabolitos evaluados se mantuvieron constantes respecto a la muestra anterior (Figura 6), una situación que se ha visto en otros procesos fermentativos, como en el kimchi (Jeong et al., 2013) y el doejang (Jung et al., 2016) en los que la liberación y permanencia de los azúcares libres como la glucosa y la fructosa en las etapas tempranas de la fermentación, es gracias a la capacidad que tienen las bacterias ácido-lácticas de hidrolizar polisacáridos y glicósidos flavonoides, que aunque no se evaluó su actividad y presencia en este trabajo, son parte de la microbiota típica en el contexto de la producción del pulque (Escalante et al., 2004)

A las 72 horas, para la última muestra del proceso de fermentación ya no se hizo una evaluación organoléptica completa a excepción del registro del aroma, que semejaba al vinagre, debido a la acción de bacterias acéticas (Escalante et al., 2016); mientras que el etanol alcanzó su punto más alto dentro del proceso, alcanzando una concentración de 5.5%, sin embargo, se mantiene dentro de los parámetros de la norma referente al pulque (SECOFI, 1972b)

La sacarosa es uno de los principales azúcares presentes en el aguamiel, que tuvo una concentración inicial del 2% en el cajete, que al ser recogido con el acocote disminuyó hasta menos del 1%, probablemente por la continua actividad microbiana que consume el azúcar. Posteriormente la concentración de la sacarosa se incrementó hasta el 2.3% en el aguamiel de la castaña, debido probablemente a que en la castaña se mezclaron aguamieles provenientes de diferentes magueyes o cajetes. En la mezcla de aguamiel fresco con la “semilla madre” o inóculo, la

concentración de sacarosa volvió a descender hasta 0.8% por la disolución. A las 4 horas de fermentación (HF) la concentración de este azúcar se elevó hasta el 2.3% por la actividad microbiana, ya que especies como *Saccharomyces paradoxus* y *Kluyveromyces marxianus*, son capaces de liberar durante la fermentación, disacáridos como la sacarosa a partir de las inulinas y otros polisacáridos complejos del aguamiel (Vicente-Magueyal et al., 2020), por lo que es hasta las 8 horas de fermentación que la sacarosa alcanzó su concentración máxima en este proceso, que corresponde a 2.4%. Esta sacarosa liberada puede ser aprovechada por otros microorganismos de la comunidad, por lo que es natural que la concentración comience a descender, llegando a 0.96% pasando las 12 HF hasta llegar a la concentración mínima de 0.056% a las 72 horas.

La glucosa es un monosacárido que es difícil encontrar como tal en la naturaleza ya que generalmente forma parte de disacáridos como la sacarosa, maltosa y de polisacáridos como el almidón (Campbell & Farrell, 2010). Es por eso que, la concentración de esta hexosa es prácticamente cero al inicio del proceso, y conforme la actividad microbiana va liberándola como un azúcar libre por la actividad de glucosidasas y otras enzimas glucofilicas desde los polisacáridos del aguamiel, la concentración va aumentando hasta alcanzar su concentración máxima (0.9%) en el proceso de elaboración del pulque tal como se ha visto en otros procesos de fermentación como el kimchi (Jeong et al., 2013). Eventualmente, la concentración fue descendiendo conforme la comunidad microbiana la iba metabolizando hasta alcanzar su punto mínimo a las 72 HF.

En cuanto a la concentración ácido láctico, exhibió una tendencia constante que estuvo en función de la presencia de las bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides*, que aunque no se registraron en este trabajo, son organismos considerados nativos del proceso de producción del pulque (Escalante et al., 2016), y a las levaduras como *Z. bailii*, que además es considerada un organismo ácido-tolerante (Kuanyshev et al., 2021)

Por otro lado, el ácido acético es otro de los metabolitos que contribuyen a la acidez del pulque, y es producido generalmente por bacterias del género *Acetobacter* que forman parte de la microbiota nativa del pulque (Escalante et al., 2016), que en este trabajo ya está presente desde el aguamiel del cajete en una concentración <1%, que al igual que la del láctico, esta concentración no es superada en todo el proceso.

El etanol es el responsable de darle al pulque la distinción de ser una bebida ligeramente alcohólica, pues en general, no tiene más de 7% de etanol en su composición (Escalante et al., 2016; Moreno-Terrazas et al., 2017; SECOFI, 1972b). En este trabajo, la presencia de etanol se registró desde la muestra del cajete, que coincidió con la presencia de representantes del grupo de *Clavispora lusitanae* y *Saccharomyces* sp, a los que se les puede atribuir la producción de este metabolito desde esta temprana etapa en la producción (Ochoa-Chacón et al., 2022), que continúa en ascenso hasta donde la diversidad de especies se reduce hasta estar solo representada por representantes del género *Saccharomyces* y *Starmerella stellata* a partir de las 12 horas de fermentación, pues tienen una producción y resistencia al etanol similares (Magyar & Tóth, 2011).

Por otra parte, en cuanto a los metabolitos aromáticos o compuestos volátiles que se produjeron a lo largo de la producción de pulque y que fueron detectados por la técnica de GS-MS, se pueden mencionar algunos relevantes por su dominancia en las muestras o en cuestión de su contribución a las propiedades organolépticas.

Hablando de los compuestos que contribuyen a la identidad sensorial del pulque, en primer lugar es un compuesto de sabor identificado en las muestras de aguamiel como el ácido 4-etoxi-4-oxobutanoico, un éster considerado como un producto natural encontrado en plantas como el chícharo (*Pisum sativum* L.) (NCBI, 2022g) y como parte de un grupo de biocompuestos producidos por *Cortinarius caperatus* (Pers.) Fr., un hongo comestible, con la capacidad de regular el crecimiento de la raíz de lechugas y del micelio de *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer (Ridwan et al., 2018). En el contexto de los productos fermentados, este compuesto se ha asociado

al metabolismo de *Kluyveromyces marxianus* y *S. cerevisiae* que forman parte de la diversidad de levaduras identificadas en vinos de cinco regiones del país de (Vigentini et al., 2016), así como en las mismas muestras de aguamiel de este trabajo.

En segundo lugar esta el alcohol fenético pertenece al grupo de los alcoholes alifáticos cuyo sabor y fragancia es de carácter floral, por lo que es de particular interés para la industria alimenticia y cosmética, es producido generalmente a través de la vía metabólica Ehrlich por levaduras como *Clavispora lusitanae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Meyerozyma guilliermondii*, *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Pichia* sp., *Yarrowia lypolitica*, *Aspergillus* sp., *Metschnikowia chrysoperlae*, entre otras (Chreptowicz et al., 2018; Mitri et al., 2022; NCBI, 2022a; Qian et al., 2019), de las cuales, las primeras tres fueron encontradas en las muestras de aguamiel y hasta las 24 horas de fermentación mientras en donde se detectó este compuesto, por lo que se infiere que son las responsables de producirlo durante este proceso de fermentación.

El tercero es el dietil succinato es un ácido graso con sabor afrutado (NCBI, 2022e) encontrado en el aguamiel de castaña y en la “semilla” de este proceso de producción de pulque y, en otros trabajos se ha encontrado formando parte de los compuestos volátiles del fruto de *Opuntia ficus-indica* (Flath & Takahashi, 1978) y de las secreciones de las glándulas rectales de los tefrítidos, moscas de la fruta diferentes a *Drosophila* sp., muy comunes de ambientes agrícolas (Perkins et al., 1990), como el de la Hacienda de Xochuca. En otras fermentaciones, este compuesto se ha encontrado asociado principalmente a levaduras del género *Saccharomyces* y se ha observado que contribuye con este y mas compuestos volátiles durante la elaboración de vinos (Antonelli et al., 1999; Sottit et al., 2019) y en *takjou*, una bebida fermentada tradicional de Corea (Jung et al., 2016)

Entre los compuestos volátiles se encontraron algunos otros que, aunque no contribuyen con las propiedades organolépticas si cuentan con actividades

biológicas con el potencial de influir en la comunidad microbiana del pulque y otras que le aportan el carácter de bebida funcional (Heredia, 2016). Uno de ellos fue encontrado en la muestra de las 72 horas de fermentación, el dioctil adipato un éster con propiedades antimicrobianas asociado al metabolismo de bacterias del género *Streptomyces*, (NCBI, 2022f; Zellagui et al., 2012), que, aunque en este trabajo no se identificaron bacterias, si se han detectado organismos de este grupo en otros trabajos de pulque (Rocha-Arriaga et al., 2019). Este compuesto también se ha reportado como parte de los componentes de los aceites esenciales de *Launaea resedifolia* una planta silvestre de la familia Asteraceae, en cuyos casos se ha evaluado su actividad antimicrobiana contra cepas de bacterias de interés clínico como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* probando ser potencialmente efectivo (Ivanova et al., 2001).

Otro compuesto asociado a bacterias del género *Streptomyces* y con actividad antimicrobiana encontrado en este trabajo fue el ácido hexanodioico, bis(2-etilhexil) (Elleuch et al., 2010; NCBI, 2022h; Rocha-Arriaga et al., 2019). Aunque no hay información sobre su aportación a los aromas o sabores del pulque, indagar sobre la actividad antimicrobiana que posee podría aportar elementos que expliquen la disminución de la diversidad de levaduras desde su aparición en el Tiempo Cero del proceso de producción de pulque estudiado hasta las 72 h, cuando se observó uno de los puntos más bajos en cuanto a diversidad de levaduras, teniendo solo a *Saccharomyces cerevisiae* como levadura representante de esa muestra. La influencia en la comunidad de bacterias del pulque también es un punto para considerar en futuros trabajos.

Por otro lado, se detectó un compuesto volátil cuya actividad biológica si influye directamente en la composición de la diversidad fúngica, el fenol-2,4-bis (1,1-dimetiletilo), previamente reportado como uno de los metabolitos producidos por la bacteria rizosférica *Bacillus safensis* con capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Alternaria alternata* (Fr.) Keisll. (Prakash & Arora, 2021). Este fenol también es producido por plantas como el aguacate (*Persea americana*

Miller var. *drymifolia* (Schltdl. & Cham.) S.F. Blake) demostrando el mismo efecto contra el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Phytophthora cinnamomi* y *Aspergillus* sp. (Rangel-Sánchez et al., 2014). Aunque no está documentado el efecto que este fenol pueda tener sobre las levaduras, su persistencia a lo largo de la fermentación del aguamiel, desde el cajete y hasta las 72 horas de fermentación, puede explicar la aparente ausencia de hongos filamentosos durante este trabajo.

Al respecto de propiedades funcionales, el métil palmitato fue uno de los compuestos volátiles más abundantes en las muestras de aguamiel de cajete, acocote y en semilla, que se ha asociado a múltiples organismos especialmente a hongos de los cuales forma parte de los componentes volátiles de sabor de hongos comestibles como el matsutake (*Tricholoma matsutake*) y a productos como el aceite esencial de clavo (NCBI, 2022b; Yajima et al., 2014). De este químico se ha evaluado su actividad antiinflamatoria (El-Demerdash, 2011) y el potencial de su producción a gran escala a través de la caracterización de las rutas metabólicas de las levaduras *Yarrowia lipolytica* y *Saacharomyces cerevisiae* (Blitzblau et al., 2021).

Dentro de la diversidad de volátiles detectados también están aquellos que no aportan directamente a las propiedades organolépticas o que otorguen alguna actividad biológica. Uno de ellos es el tetradecano, un hidrocarburo estructural precursor compuestos volátiles y del metabolismo de las plantas (NCBI, 2022c), por ejemplo, *Agave decipiens* Baker como parte de la fracción de ácidos grasos no saponificables (Abdel-Gawad et al., 1999). Este es aprovechado por varios géneros de hongos como *Cunninghamaella* y *Penicillium* para producir ácidos grasos como el ácido tetradecanoico, y alcoholes insaturados como el tetradeca-3-ol, entre otros (Allen & Markovetz, 1970) En este trabajo resultó ser uno de los compuestos persistentes durante el proceso, siendo el más abundante en la muestra de agua de lavado con un 45% y con menos del 10% en el resto de las muestras hasta el final de la evaluación. Su presencia en esas cantidades se deba probablemente por tratarse de metabolito producido por el mismo agave del cual se obtuvo el aguamiel

y por precursor para otros compuestos producidos por la actividad metabólica microbiana.

De la misma forma se encontraron algunos otros compuestos volátiles con menor representación durante este trabajo, por ejemplo, alcanos como el heptadecano (NCBI, 2022d) que ha sido reportado como parte los aceites esenciales de *Opuntia prolifera* Engelm. (Wright & Setzer, 2014); y el octacosano, también encontrado en el *Agave decipiens* (Abdel-Gawad et al., 1999); pero que no cuentan con una descripción sobre su aportación a las propiedades sensoriales del pulque o si tienen alguna actividad biológica.

El resto de los componentes volátiles encontrados durante el análisis carecen de información asociada a la producción de pulque o algún otro escenario relacionado con la fermentación y a sus materias primas, además de que estuvieron representados en bajas proporciones. Sin embargo, se pueden agrupar de acuerdo a su clasificación dentro de la química orgánica, tales como los alcanos: heneicosano, hexadecano, octacosano, pentadecano; alcoholes como 2-Ethyl-1-decanol, 2,4-Dimethyl-1-pentanol, 2-Hexyl-1-decanol, 2-Isopropyl-5-methyl-1-heptanol, isotridecanol; el aldehído 3,4-Dimethylbenzaldehído; y los ésteres 4,6,8-Trimetil-1-noneno, 2,3-Dimetil-1-penteno, 2,3-Dimetil-3-hepteno, 3,3-Dimetil-1-hexeno, metil 14-metilpentadecanoato, 33-(hidroximetil)heptan-4-il 2-metilpropanoato.

8. Conclusiones

- A lo largo del proceso de elaboración del pulque en la Hacienda de Xochuca se pudieron observar cambios en la diversidad de las comunidades de levaduras aisladas de acuerdo con un proceso de sucesión ecológica en congruencia con los cambios de las condiciones fisicoquímicas resultantes del aguamiel hasta su transformación en pulque.
- La densidad de UFC de levaduras tuvo un comportamiento ascendente conforme avanzaba el proceso de fermentación hasta que el pH y la concentración de etanol volvieron las condiciones fisicoquímicas más selectivas.
- La mayor diversidad de levaduras se encuentra al inicio del proceso, pues el aguamiel es un sustrato rico en azúcares que está en contacto con el ambiente en el que se pueden encontrar vectores asociados a levaduras y otros microorganismos que participan durante la producción del pulque.
- La menor diversidad de levaduras se encontró en las etapas finales del proceso de acuerdo con el agotamiento de los azúcares, un pH más bajo y una concentración más alta de etanol, resistiendo solo aquellas que mostraron una mayor tolerancia al etanol como *Starmerella stellata* y representantes del género *Saccharomyces*.
- El contenido de etanol se fue incrementando desde las primeras etapas del proceso, lo que indica que incluso antes de usar un inóculo, la fermentación alcohólica ya había iniciado espontáneamente.
- La presencia de levaduras no-*Saccharomyces*, como *Clavispora lusitanae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Meyerozyma guilliermondii*, se puede asociar con la presencia de compuestos volátiles, como el alcohol fenético y el dietil succinato, que enriquecen las propiedades sensoriales del pulque.

Referencias bibliográficas

- Abad-Fitz, I., Maldonado-Almanza, B., Aguilar-Dorantes, K. M., Sánchez-Méndez, L., Gómez-Caudillo, L., Casas, A., Blancas, J., García-Rodríguez, Y. M., Beltrán-Rodríguez, L., Sierra-Huelsz, J. A., Cristians, S., Moreno-Calles, A. I., Torres-García, I. & Espinosa-García, F. J. (2020). Consequences of Traditional Management in the Production and Quality of Copal Resin (*Bursera bipinnata* (Moc. & Sessé ex DC.) Engl.) in Mexico. *Forests*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/f11090991>
- Abdel-Gawad, M. M., El-Sayed, M. M. & Abdel-Hameed, E. S. (1999). Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. *Fitoterapia*, 70(4), 371–381. [https://doi.org/10.1016/s0367-326x\(99\)00057-x](https://doi.org/10.1016/s0367-326x(99)00057-x)
- Allen, J. E. & Markovetz, A. J. (1970). Oxidation of n -Tetradecane and 1-Tetradecene by Fungi. *Journal of Bacteriology*, 103(2), 426–434. <https://doi.org/10.1128/jb.103.2.426-434.1970>
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Álvarez-Ríos, G. D., Figueredo-Urbina, C. J. & Casas, A. (2020). Sistemas de manejo de maguey pulquero en México. *Etnobiología*, 18(2), 3–23.
- Álvarez-Ríos, G., Vallejo, M., Figueredo-Urbina, C. & Estremo, S. (2022). *Agaves pulqueros de México*. <https://doi.org/10.13140/rq.2.2.30667.05928>
- Angrosino, M. (2012). *Etnografía y observación participante en investigación cualitativa*. Morata.
- Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C. & Carnacini, A. (1999). Yeast Influence on Volatile Composition of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1139–1144. <https://doi.org/10.1021/jf9807317>
- Backstrand, J. R., Allen, L. H., Martinez, E. & Pelto, G. H. (2001). Maternal consumption of pulque, a traditional central Mexican alcoholic beverage: relationships to infant growth and development. *Public Health Nutrition*, 4(4), 883–891. <https://doi.org/10.1079/PHN2001130>
- Backstrand, J. R., Goodman, A. H., Allen, L. H. & Pelto, G. H. (2004). Pulque intake during pregnancy and lactation in rural Mexico: alcohol and child growth from 1 to 57 months. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(12), 1626. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602019>

- Baselga, A., Orme, D., Villeger, S., Bortoli, J. D., Leprieur, F., Logez, M. & Henriques-Silva, R. (2022). *Partitioning Beta Diversity into Turnover and Nestedness Components* (1.5.5) [R]. <https://CRAN.R-project.org/package=betapart>
- Bedő, S., Fehér, A., Khunnonkwao, P., Jantama, K. & Fehér, C. (2021). Optimized Bioconversion of Xylose Derived from Pre-Treated Crop Residues into Xylitol by Using *Candida boidinii*. *Agronomy*, 11(1), 79. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010079>
- Bellut, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., Jacob, F., Schutter, D. P. D., Daenen, L., Lynch, K. M., Zannini, E. & Arendt, E. K. (2018). Application of Non-Saccharomyces Yeasts Isolated from Kombucha in the Production of Alcohol-Free Beer. *Fermentation*, 4(3), 66. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030066>
- Blitzblau, H. G., Consiglio, A. L., Teixeira, P., Crabtree, D. V., Chen, S., Konzock, O., Chifamba, G., Su, A., Kamineni, A., MacEwen, K., Hamilton, M., Tsakraklides, V., Nielsen, J., Siewers, V. & Shaw, A. J. (2021). Production of 10-methyl branched fatty acids in yeast. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01863-0>
- Boekhout, T., Amend, A. S., Baidouri, F. E., Gabaldón, T., Geml, J., Mittelbach, M., Robert, V., Tan, C. S., Turchetti, B., Vu, D., Wang, Q.-M. & Yurkov, A. (2022). Trends in yeast diversity discovery. *Fungal Diversity*, 114(1), 491–537. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00494-6>
- Cadez, N. & Smith, M. Th. (2011). Chapter 32. *Hanseniaspora Zikes* (1912). En C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts. A taxonomic study* (5th ed., Vol. 2, pp. 431–432). Elsevier Amsterdam.
- Campbell, M. K. & Farrell, S. O. (2010). *Bioquímica*. Cengage Learning.
- Castro-Rodríguez, D., Hernández-Sánchez, H. & Fernández, J. Y. (2015). Probiotic Properties of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(2), 107–117. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9187-5>
- Chacón-Vargas, K., Torres, J., Giles-Gómez, M., Escalante, A. & Gibbons, J. G. (2020). Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Scientific Reports*, 10(1), 15115. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71864-4>
- Chreptowicz, K., Sternicka, M. K., Kowalska, P. D. & Mierzejewska, J. (2018). Screening of yeasts for the production of 2-phenylethanol (rose aroma) in

- organic waste-based media. *Letters in Applied Microbiology*, 66(2), 153–160.
<https://doi.org/10.1111/lam.12835>
- Ciani, M., Comitini, F. & Mannazzu, I. (2008). Encyclopedia of Ecology. *Ecological Processes: Article Titles: F, Nutrition in Clinical Practice* 202005, 1548–1557.
<https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00272-X>
- Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 1–27.
- Correa-Ascencio, M., Robertson, I. G., Cabrera-Cortés, O., Cabrera-Castro, R. & Evershed, R. P. (2014). Pulque production from fermented agave sap as a dietary supplement in Prehispanic Mesoamerica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(39), 14223–14228.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1408339111>
- Cruz-Guerrero, A. E., Olvera, J. L., García-Garibay, M. & Gómez-Ruiz, L. (2005). Inulinase-hyperproducing strains of *Kluyveromyces* sp. isolated from aguamiel (Agave sap) and pulque. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(2), 115. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9005-4>
- Czerucka, D., Piche, T. & Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26(6), 767–778. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x>
- Dashko, S., Zhou, N., Tinta, T., Sivilotti, P., Lemut, M. S., Trost, K., Gamero, A., Boekhout, T., Butinar, L., Vrhovsek, U. & Piskur, J. (2015). Use of non-conventional yeast improves the wine aroma profile of Ribolla Gialla. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(7), 997–1010.
<https://doi.org/10.1007/s10295-015-1620-y>
- Deak, T. (2006). *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (5th ed.).
https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_8
- Dujon, B. A. & Louis, E. J. (2017). Genome Diversity and Evolution in the Budding Yeasts (Saccharomycotina). *Genetics*, 206(2), 717–750.
<https://doi.org/10.1534/genetics.116.199216>
- El-Demerdash, E. (2011). Anti-inflammatory and antifibrotic effects of methyl palmitate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254(3), 238–244.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.04.016>
- Elizondo, S. (2019, 3. febrero). *Revaloran el maguey*. Criterio.
<https://criteriohidalgo.com/fin-de-semana/revaloran-el-maguey>

- Elleuch, L., Shaaban, M., Smaoui, S., Mellouli, L., Karray-Rebai, I., Fguira, L. F.-B., Shaaban, K. A. & Laatsch, H. (2010). Bioactive Secondary Metabolites from a New Terrestrial Streptomyces sp. TN262. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 579–593. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8808-4>
- ENAH. (1920). *Hombres con carretas durante la llegada del tren con carga de pulque, en patios de una estación de Apan.*
<https://mediateca.inah.gob.mx/repositorio/islandora/object/fotografia%3A51514>
- ENAH. (1945a). *Hombre tomando pulque en la barra de una pulquería.*
<https://mediateca.inah.gob.mx/repositorio/islandora/object/fotografia%3A260727>
- ENAH. (1945b). *Hombres cargando barriles de pulque en una estación de ferrocarril.*
<https://mediateca.inah.gob.mx/repositorio/islandora/object/fotografia%3A205555>
- ENAH. (1955). *Estación de ferrocarril con estiba de barriles de pulque.*
<https://mediateca.inah.gob.mx/repositorio/islandora/object/fotografia%3A174096>
- Enríquez-Salazar, M. I., Veana, F., Aguilar, C. N., Garza-Rodríguez, I. M. D. la, López, M. G., Rutiaga-Quiñones, O. M., Morlett-Chávez, J. A. & Rodríguez-Herrera, R. (2017). Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from *Agave salmiana* and *A. atrovirens* during different seasons of year. *Food Science and Biotechnology*, 26(4), 1003–1011.
<https://doi.org/10.1007/s10068-017-0141-z>
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G. & Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124(2), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003>
- Escalante, A., Rodríguez, M., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F. & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 273–279. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09599.x>
- Escalante, A., Soto, D. R. L., Gutiérrez, J. E. V., Giles-Gómez, M., Bolívar, F. & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01026>
- Escamilla-Hurtado, M. & Escamilla-Hurtado, M. G. (2007). Los alimentos fermentados que comían nuestros bisabuelos prehispánicos. *Ciencias*, 58(2).

- Estrada-Godina, A. R., Cruz-Guerrero, A. E., Lappe, P., Ulloa, M., García-Garibay, M. & Gómez-Ruiz, L. (2001). Isolation and identification of killer yeasts from Agave sap (aguamiel) and pulque. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17, 557–566.
- Flath, R. A. & Takahashi, J. M. (1978). Volatile constituents of prickly pear (*Opuntia ficus indica* Mill., de Castilla variety). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(4), 835–837. <https://doi.org/10.1021/jf60218a053>
- Fournier-García, P. & Barrios, L. M. (2012). Las bebidas mexicanas. Pulque, mezcal y tesguino. *Arqueología Mexicana*, XIX(114), 53–59.
- Franco-López, J. (2011). 29. Sucesión de protozoarios. En J. F. López, *Ecología y Conservación. Laboratorio y Campo* (pp. 207–210). Trillas.
- Fuentes, E. L. (2006). *Los enemas prehispánicos como instrumentos para aplicar prebióticos*. 10(29), 17–26.
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M. & Arroyo, T. (2018). Advances in the Study of *Candida stellata*. *Fermentation*, 4(3), 74. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030074>
- García-Garibay, M. & López-Munguía, C. A. (2004). Bebidas alcohólicas no destiladas. En L. México (Ed.), *Bioteología alimentaria* (pp. 263–311).
- García-Marín, P. C., Torres-García, I., Casas, A., Urbina, C., Rangel-Landa, S., Lemus, A., Vargas-Ponce, O., Cabrera-Toledo, D., Zizumbo-Villarreal, D., Aguirre-Dugua, X., Eguiarte, L. & Galván, G. (2017). *Los agaves y las prácticas mesoamericanas de aprovechamiento, manejo y domesticación 1* (pp. 273–308).
- García-Mendoza, A. J. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 87, 14–23.
- García-Ortega, A. M. & Ponce-Rivas, E. (2003). Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudoroff. *Bioteología Aplicada*, 20, 85–94.
- Godoy, A., Herrera, T. & Ulloa, M. (2003). *Más allá del pulque y el tepache. Las bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Investigaciones Antropológicas.
- Gonçalves-De-Lima, O. (1956). El maguey y el pulque en los códigos mexicanos. *Fondo de Cultura Económica*.

- Guzmán-Pedraza, R. & Contreras-Esquivel, J. C. (2018). Aguamiel and its fermentation: Science beyond tradition. *Mexican Journal of Biotechnology*, 3(1), 1–22. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.1>
- Heredia, M. R. B. de. (2016). Alimentos funcionales. , 30(3), 12–14. <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-alimentos-funcionales-X0213932416546681>
- Ivanova, V., Oriol, M., Montes, M.-J., García, A. & Guinea, J. (2001). Secondary Metabolites from a *Streptomyces* Strain Isolated from Livingston Island, Antarctica. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 56(1–2), 1–5. <https://doi.org/10.1515/znc-2001-1-201>
- James, S. A. & Stratford, M. (2011). Chapter 84. *Zygosaccharomyces* Barker (1901). En C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts. A taxonomic study* (5th ed., pp. 938–940). Elsevier Amsterdam.
- Jeong, S. H., Jung, J. Y., Lee, S. H., Jin, H. M. & Jeon, C. O. (2013). Microbial succession and metabolite changes during fermentation of dongchimi, traditional Korean watery kimchi. *International Journal of Food Microbiology*, 164(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.016>
- Jiménez-Segura, V. H. (2016). Caracterización de la diversidad de levaduras durante la fermentación de pulque de la hacienda de Xochuca en Tlaxco, Tlaxcala. *Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Jung, W. Y., Jung, J. Y., Lee, H. J. & Jeon, C. O. (2016). Functional Characterization of Bacterial Communities Responsible for Fermentation of Doenjang: A Traditional Korean Fermented Soybean Paste. *Frontiers in Microbiology*, 7, 827. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00827>
- Kirchmayr, M. R., Segura-García, L. E., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Rosa, M. de la & Mathis, A. G. (2017). Impact of environmental conditions and process modifications on microbial diversity, fermentation efficiency and chemical profile during the fermentation of Mezcal in Oaxaca. *LWT - Food Science and Technology*, 79(Nucleic Acids Research. 25 1997), 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.052>
- Kuanyshev, N., Rao, C. V., Dien, B. & Jin, Y. (2021). Domesticating a food spoilage yeast into an organic acid-tolerant metabolic engineering host: Lactic acid production by engineered *Zygosaccharomyces bailii*. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(1), 372–382. <https://doi.org/10.1002/bit.27576>
- Kurtzman, C. P. (2011). Chapter 47 *Meyerozyma* Kurtzman & M. Suzuki (2010). En C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts. A taxonomic study* (5th ed., Vol. 2, pp. 622–624). Elsevier Amsterdam.

- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts. A taxonomic study*. Elsevier .
- Lachance, M. A. (2004). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 68, 151–160.
- Lachance, M. A. (2011a). Chapter 21. *Clavispora Rodrigues de Miranda* (1979). En C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts. A taxonomic study* (5th ed., Vol. 2, pp. 350–351). Elsevier Amsterdam.
- Lachance, M. A. (2011b). Chapter 35. *Kluyveromyces van der Walt* (1971). En C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts. A taxonomic study* (5th ed., Vol. 2, pp. 477–479). Elsevier Amsterdam.
- Lachance, M. A., Boekhout, T., G. Scorzetti, Fell, J. W. & Kurtzman, C. P. (2011). Chapter 80. *Candida Berkhout* (1993). En C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts. A taxonomic study* (5th ed., Vol. 2, pp. 1032–1034). Elsevier Amsterdam.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A. & Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1037–1052. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x>
- Laureys, D. & Vuyst, L. D. (2014). Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(8), 2564–2572. <https://doi.org/10.1128/AEM.03978-13>
- Loyola-Montemayor, E. (1956). *La industria del pulque* (B. de M. D. de I. Industriales, Ed.).
- MacNeish, R. S. & Byers, D. S. (1967). *The Prehistory of the Tehuacán Valley. Vol. I: Environment and Subsistence* (D. S. Byers, Ed.; Vol. 1). University of Texas Press.
- Madigan, T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. & Stahl, D. A. (2015). BROCK. *Biología de los microorganismos*. Pearson Educación, S.A.
- Magyar, I. & Tóth, T. (2011). Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28(1), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.011>

- Martini, A., Lachance, M. A. & Kurtzman, C. P. (2011). Chapter 34. Kazachstania Zubkova (1971). En C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts. A taxonomic study* (5th ed., Vol. 2, pp. 449–450). Elsevier Amsterdam.
- McClary, D. O., Nulty, W. L. & Miller, G. R. (1959). EFFECT OF POTASSIUM VERSUS SODIUM IN THE SPORULATION OF SACCHAROMYCES. *Journal of Bacteriology*, 78(3), 362–368. <https://doi.org/10.1128/jb.78.3.362-368.1959>
- Mendoza, A. J. G., Martínez, I. S. F. & Gutiérrez, D. S. (2019). Cuatro especies nuevas de Agave (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botanica Mexicana*, 126. <https://doi.org/10.21829/abm126.2019.1461>
- Miranda, F. (2019, 19. enero). *Con pulque, mujeres de la mixteca buscan salvar a su comunidad*. El Universal. <https://oaxaca.eluniversal.com.mx/sociedad/19-01-2020/con-pulque-mujeres-de-la-mixteca-buscan-salvar-su-comunidad>
- Mitri, S., Koubaa, M., Maroun, R. G., Rossignol, T., Nicaud, J.-M. & Louka, N. (2022). Bioproduction of 2-Phenylethanol through Yeast Fermentation on Synthetic Media and on Agro-Industrial Waste and By-Products: A Review. *Foods*, 11(1), 109. <https://doi.org/10.3390/foods11010109>
- Morais, P. B., Martins, M. B., Kalczko, L. B., Mendonça, L. C. & Hagler, A. N. (1995). Yeast Succession in the Amazon Fruit Parahancornia amapa as Resource Partitioning among Drosophila spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(12), 4251–4257. <https://doi.org/10.1128/aem.61.12.4251-4257.1995>.
- Moreno, C. E. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad* (CYTED & ORCYT-UNESCO, Eds.; Vol. 1). M&T-Manuales y Tesis SEA.
- Moreno-Terrazas, R., Lappe-Oliveras, P. E. & Larralde-Corona, C. P. (2017). Capítulo 3. Bebidas tradicionales y nuevas alternativas. *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)*.
- Narváez-Suárez, A. U., Martínez-Saldaña, T. & Jiménez-Velázquez, M. A. (2016). El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*, 56, 33–44.
- NCBI. (2022a). *PubChem Compound Summary for CID 6054, 2-Phenylethanol*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Phenylethanol>
- NCBI. (2022b). *PubChem Compound Summary for CID 8181, Methyl palmitate*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methyl-palmitate>
- NCBI. (2022c). *PubChem Compound Summary for CID 12389, Tetradecane*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetradecane>

- NCBI. (2022d). *PubChem Compound Summary for CID 12398, Heptadecane*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Heptadecane>
- NCBI. (2022e). *PubChem Compound Summary for CID 31249, Diethyl succinate*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diethyl-succinate>
- NCBI. (2022f). *PubChem Compound Summary for CID 31271, Dioctyl adipate*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dioctyl-adipate>
- NCBI. (2022g). *PubChem Compound Summary for CID 70610, 4-Ethoxy-4-oxobutanoic acid*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Ethoxy-4-oxobutanoic-acid>
- NCBI. (2022h). *PubChem Compound Summary for CID 40468165, Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl)ester*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hexanedioic-acid-bis-2-ethylhexyl-ester>
- Nemser, D. (2011). "To Avoid This Mixture": Rethinking Pulque in Colonial Mexico City. *Food and Foodways*, 19(1), 98–121. <https://doi.org/10.1080/07409710.2011.544204>
- Nicolas, A. (2019, 16. enero). *La CDMX tendrá un nuevo Museo del Pulque*. El Universal. <https://www.eluniversal.com.mx/destinos/la-cdmx-tendra-nuevo-museo-del-pulque#:~:text=Estas%20son%20las%20nuevas%20tarifas%20del%20pasaport e%20mexicano&text=%C2%BFte%20imaginas%20un%20museo%20dedicado ,del%20Pulque%20y%20las%20Pulquer%C3%ADas>.
- NOTIMEX. (2019, 19. noviembre). *SAT deja libre al pulque de impuestos*. Forbes México. <https://www.forbes.com.mx/sat-deja-al-pulque-libre-de-impuestos/>
- Núñez-Colín, C. A. & Escobedo-López, D. (2011). Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana*, 22(2), 415–427.
- Ochoa-Chacón, A., Ramos-Valdivia, A. C., Poggi-Varaldo, H. M., Villa-Tanaca, L., Martínez, A. & Ponce-Noyola, T. (2022). Fermentation performance of a Mexican native *Clavispora lusitaniae* strain for xylitol and ethanol production from xylose, glucose and cellobiose. *Enzyme and Microbial Technology*, 160, 110094. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2022.110094>
- Ojeda-Linares, C., Álvarez-Ríos, G. D., Figueredo-Urbina, C. J., Islas, L. A., Lappe-Oliveras, P., Nabhan, G. P., Torres-García, I., Vallejo, M. & Casas, A. (2021). Traditional Fermented Beverages of Mexico: A Biocultural Unseen Foodscape. *Foods*, 10(10), 2390. <https://doi.org/10.3390/foods10102390>

- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M. & team., the U. (2022). *Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit* (42.0) [MacOS]. Bioinformatics. <http://ugene.net/>
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E. & Wagner, H. (2020). *Community Ecology Package* (2.5-7) [R]. <https://cran.r-project.org>, <https://github.com/vegandevs/vegan>
- Orlić, S., Arroyo-López, F. N., Huić-Babić, K., Lucilla, I., Querol, A. & Barrio, E. (2010). A comparative study of the wine fermentation performance of *Saccharomyces paradoxus* under different nitrogen concentrations and glucose/fructose ratios. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1), 73–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04406.x>
- Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M. & Belleville, M.-P. (2008). Analysis of the Main Components of the Aguamiel Produced by the Maguey-Pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the Harvest Period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3682–3687. <https://doi.org/10.1021/jf072767h>
- Perez, M. F., Díaz, M. A., Pereyra, M. M., Córdoba, J. M., Isas, A. S., Sepúlveda, M., Ramallo, J. & Dib, J. R. (2019). Biocontrol features of *Clavispora lusitaniae* against *Penicillium digitatum* on lemons. *Postharvest Biology and Technology*, 155, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.05.012>
- Perkins, M. V., Kitching, W., Drew, R. A. I., Moore, C. J. & König, W. A. (1990). Chemistry of fruit flies: composition of the male rectal gland secretions of some species of South-East Asian Dacinae. Re-examination of *Dacus cucurbitae* (melon fly). *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 0(4), 1111–1117. <https://doi.org/10.1039/p19900001111>
- Phaff, H. J., Miller, M. W. & Mrak, E. M. (1978). *The Life of Yeasts* (2a ed.). Harvard University Press.
- Prakash, J. & Arora, N. K. (2021). Novel metabolites from *Bacillus safensis* and their antifungal property against *Alternaria alternata*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114(8), 1245–1258. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01598-4>
- Qian, X., Yan, W., Zhang, W., Dong, W., Ma, J., Ochsenreither, K., Jiang, M. & Xin, F. (2019). Current status and perspectives of 2-phenylethanol production through biological processes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(2), 235–248. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1530634>
- Rai, A. K. & Jeyaram, K. (2017). *Yeast Diversity in Human Welfare*. 83–113. https://doi.org/10.1007/978-981-10-2621-8_4

- Ramírez, J. F., A.Sánchez-Marroquin, Álvarez, M. M. & Valyasebi, R. (2004). Industrialization of Mexican Pulque. En K. Steinkraus, *Industrialization of Indigenous Fermented Foods* (2a ed., pp. 547–586). Marcel Dekker.
- Ramírez-Rancaño, M. (2000). *Ignacio Torres Adalid y la industria pulquera*. Instituto de Investigaciones Sociales-UNAM. Plaza y Valdés Editores.
- Ramírez-Rodríguez, R. (2004). *El maguey y el pulque: Memoria y tradición convertida en historia, 1984-1993*.
- Ramírez-Rodríguez, R. (2014). Las representaciones del maguey y del pulque en las culturas de Mesoamérica. *Revista Pulquimia*, 2(5), 22–31.
- Rangel-Sánchez, G., Castro-Mercado, E. & García-Pineda, E. (2014). Avocado roots treated with salicylic acid produce phenol-2,4-bis (1,1-dimethylethyl), a compound with antifungal activity. *Journal of Plant Physiology*, 171(3–4), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.07.004>
- Ridwan, A. Y., Wu, J., Choi, J.-H., Hirai, H. & Kawagishi, H. (2018). Bioactive compounds from the edible mushroom *Cortinarius caperatus*. *Mycoscience*, 59(2), 172–175. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2017.08.015>
- Rocha-Arriaga, C., Espinal-Centeno, A., Martínez-Sánchez, S., Caballero-Pérez, J., Alcaraz, L. D. & Cruz-Ramírez, A. (2019). Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a major biocultural resource of Mexico. *BioRxiv*, 718999. <https://doi.org/10.1101/718999>
- Rodrigues, F., Ludovico, P. & Leão, C. (2006). Chapter 6. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. En Sa (Ed.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 101–121). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_6
- Romero-López, M. R., Osorio-Díaz, P., Flores-Morales, A., Robledo, N. & Mora-Escobedo, R. (2015). Chemical composition, antioxidant capacity and prebiotic effect of aguamiel (*Agave atrovirens*) during *in vitro* fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14(2), 281–292.
- Ruiz, Y., Guadarrama, P. C. & Valadez, R. (2017). Pulque: fuente de probióticos y péptidos antimicrobianos. *BioTecnología*, 21(3), 37–57.
- Salazar, N., Gueimonde, M., Reyes-Gavilán, C. G. de los & Ruas-Madiedo, P. (2015). Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria as Fermentable Substrates by the Intestinal Microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(9), 1440–1453. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.770728>

- Sánchez-Marroquín, A. & Hope, P. H. (1953). Agave juice, fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(3).
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- Santos, A. R. O., Leon, M. P., Barros, K. O., Freitas, L. F. D., Hughes, A. F. S., Morais, P. B., Lachance, M.-A. & Rosa, C. A. (2018). *Starmerella camargoi* f.a., sp. nov., *Starmerella ilheusensis* f.a., sp. nov., *Starmerella litoralis* f.a., sp. nov., *Starmerella opuntiae* f.a., sp. nov., *Starmerella roubikii* f.a., sp. nov. and *Starmerella vitae* f.a., sp. nov., isolated from flowers and bees, and transfer of related *Candida* species to the genus *Starmerella* as new combinations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(4), 1333–1343. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002675>
- Scott, R. & Sullivan, W. C. (2008). Ecology of fermented foods. *Human Ecology Review*, 15(1).
- SECOFI. (1972a). *NMX-V-022-1972 Aguamiel*. Publicada en el Diario Oficial de la Federación, México: Dirección General de Normas Mexicanas.
- SECOFI. (1972b). *NMX-V-037-1972. PULQUE MANEJADO A GRANEL*.
- Shen, X.-X., Opulente, D. A., Kominek, J., Zhou, X., Steenwyk, J. L., Buh, K. V., Haase, M. A. B., Wisecaver, J. H., Wang, M., Doering, D. T., Boudouris, J. T., Schneider, R. M., Langdon, Q. K., Ohkuma, M., Endoh, R., Takashima, M., Manabe, R., Čadež, N., Libkind, D., Rokas, A. (2018). Tempo and Mode of Genome Evolution in the Budding Yeast Subphylum. *Cell*, 175(6), 1533-1545.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.023>
- SIAP. (2022). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sicard, D. & Legras, J.-L. (2011). Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus Biologies*, 334(3), 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.016>
- Sottit, C., Salor-Torregrosa, J. M., Moreno-García, J., Peinado, J., Mauricio, J. C., Moreno, J. & García-Martínez, T. (2019). Using *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* wine yeasts as starter cultures for fermentation and quality improvement of mead. *European Food Research and Technology*, 245(12), 2705–2714. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03384-z>

- Sparg, S. G., Light, M. E. & Staden, J. van. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2–3), 219–243. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.016>
- Steensels, J. & Verstrepen, K. J. (2014). Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68(1), 1–20. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>
- Steinkraus, K. H. (1994). Nutritional significance of fermented foods. *Food Research International*, 27(3), 259–267. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(94\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0963-9969(94)90094-9)
- Steinkraus, K. H. (1996). Handbook of Indigenous Fermented Foods. *Marcel Dekker, Inc.*
- Steinkraus, K. H. (1997). Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*, 8(5–6), 311–317. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(97\)00050-9](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(97)00050-9)
- Tamang, J. P., Watanabe, K. & Holzapfel, W. H. (2016). Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology*, 7, 377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00377>
- Teoh, A. L., Heard, G. & Cox, J. (2004). Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 95(2), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.020>
- Torres-Maravilla, E., Blancas-Nápoles, J. A., Vázquez-Landaverde, P. A., Cristiani-Urbina, E., Mayorga-Reyes, L. & Sánchez-Pardo, M. E. (2016). Evaluación de sedimentos de pulque (*xaxtle*) como cultivo iniciador para obtener un producto de panificación de bajo índice glucémico. *Agrociencia*, 50, 183–200.
- Torres-Maravilla, Edgar, Lenoir, M., Mayorga-Reyes, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., Sánchez-Pardo, M. E. & Bermúdez-Humarán, L. G. (2016). Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(1), 385–396. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7049-4>
- Trejo, L. (2017). De dioses a hipsters: el resurgimiento del pulque, una moda de antigua tradición. *Oikos*, 18, 14–19.
- Valadez-Blanco, R., Bravo-Villa, G., Santos-Sánchez, N. F., Velasco-Almendarez, S. I. & Montville, T. J. (2012). The Artisanal Production of Pulque, a Traditional Beverage of the Mexican Highlands. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(2), 140–144. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9096-9>

- Valdivieso-Solís, D. G., Vargas-Escamilla, C. A., Contreras, N. M., Galván-Valle, G. A., Gilés-Gómez, M., Bolívar, F. & Escalante, A. (2021). Sustainable Production of Pulque and Maguey in Mexico: Current Situation and Perspectives. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 678168. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.678168>
- Van-der-Walt, J. P. & Yarrow, D. (1984). Chapter II. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast. En C. P. Kurtzman & J. W. Fell (Eds.), *The Yeast. A taxonomic study* (4th ed.). Elsevier.
- Varela, C. (2016). The impact of non-Saccharomyces yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 9861–9874. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>
- Vaughn-Martini, A. M. & Martini, A. (2011). Chapter 61. Saccharomyces Meyen ex Rees (1870). En C. P. Kurtzman, J. W. Fell & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts. A taxonomic study* (5th ed., Vol. 2, pp. 737–743). Elsevier Amsterdam.
- Vázquez-García, A., Aliphath-Fernández, M. M., Chulim, N. G. E., Ortiz-Torres, E., Ramírez-Juárez, J. & Ramírez, A. M. (2016). EL MAGUEY PULQUERO, UNA PLANTA MULTIFUNCIONAL Y POLIFACÉTICA: LOS USOS DESDE UNA VISIÓN MESTIZA E INDÍGENA. *Scripta Ethnologica*, 38, 65–87.
- Vela, E. (2014). El maguey. *Arqueología Mexicana*, 57, 42–65.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109387>
- Vigentini, I., Maghradze, D., Petrozziello, M., Bonello, F., Mezzapelle, V., Valdetara, F., Failla, O. & Foschino, R. (2016). Indigenous Georgian Wine-Associated Yeasts and Grape Cultivars to Edit the Wine Quality in a Precision Oenology Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7, 352. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00352>
- Vijayaraghavan, K., Yamini, D., Ambika, V. & Sowdamini, N. S. (2009). Trends in inulinase production – a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(1), 67–77. <https://doi.org/10.1080/07388550802685389>
- Villarreal-Morales, S. L., Muñoz-Márquez, D. B., Michel-Michel, M., González-Montemayor, Á.-M., Escobedo-García, S., Salas-Tovar, J. A., Flores-Gallegos, A. C. & Rodríguez-Herrera, R. (2019). Natural Beverages. En *AGUAMIEL A FRESH BEVERAGE FROM AGAVE SPP. SAP WITH FUNCTIONAL*

PROPERTIES (Vol. 13, pp. 179–208). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816689-5.00007-9>

- Wacher-Rodarte, C. (2014). La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. *Revista Digital Universitaria*, 15(8).
- Wacher-Rodarte, C., Díaz-Ruíz, G., Lappe-Oliveras, P. & Moreno-Terrazas, R. C. (2015). Capítulo 25. Alimentos indígenas fermentados. *Limusa/Noriega Editores*.
- Wang, Y., Zhang, C., Liu, F., Jin, Z. & Xia, X. (2022). Ecological succession and functional characteristics of lactic acid bacteria in traditional fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–15. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.2025035>
- White, T. J., Bruns, T., S., L. & J., T. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols a Guide to Methods Applications*, 18, 315–322.
- Whitener, M. E. B., Carlin, S., Jacobson, D., Weighill, D., Divol, B., Conterno, L., Toit, M. D. & Vrhovsek, U. (2015). Early fermentation volatile metabolite profile of non-Saccharomyces yeasts in red and white grape must: A targeted approach. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 412–422. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.018>
- Wolfe, B. E. & Dutton, R. J. (2015). Fermented Foods as Experimentally Tractable Microbial Ecosystems. *Cell*, 161(1), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.034>
- Wright, C. R. & Setzer, W. N. (2014). Chemical composition of volatiles from *Opuntia littoralis*, *Opuntia ficus-indica*, and *Opuntia proliferata* growing on Catalina Island, California. *Natural Product Research*, 28(3), 208–211. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.867345>
- Xu, Y., Zhao, G. A. & Wang, L. P. (2006). Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 192–196. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0051-6>
- Yajima, I., Yanai, T., Nakamura, M., Sakakibara, H. & Hayashi, K. (2014). Volatile Flavor Compounds of Matsutake-*Tricholoma matsutake* (Ito et Imai) Sing. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(2), 373–377. <https://doi.org/10.1080/00021369.1981.10864530>
- Yan, W., Gao, H., Qian, X., Jiang, Y., Zhou, J., Dong, W., Xin, F., Zhang, W. & Jiang, M. (2020). Biotechnological applications of the non-conventional yeast

Meyerozyma guilliermondii. *Biotechnology Advances*, 46, 107674.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107674>

Zellagui, A., Gherraf, N., Ladjel, S. & Hameurlaine, S. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils from *Launaea resedifolia* L. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 2(1), 2.
<https://doi.org/10.1186/2191-2858-2-2>

Zepeda, A. E.-, Montor, J. J., Olvera, C., Sanchez-Flores, A. & Lopez-Munguia, A. (2020). An Extended Taxonomic Profile and Metabolic Potential Analysis of Pulque Microbial Community Using Metagenomics. *SDRP Journal of Food Science & Technology*, 5(2), 83–97. <https://doi.org/10.25177/jfst.5.2.ra.10637>

Anexos

Anexo 1 Cronología de los estudios microbiológicos en pulque

Tabla 10- Cronología de los estudios microbiológicos en pulque.

Año	Autores	Principales contribuciones de los estudios
1864	Río de la Loza L.	Primera observación microscópica del pulque describe la presencia de sustancias albuminoides, probablemente fueron bacterias y levaduras
1870	Barragán J.	Identifica la primera levadura aislada del pulque como <i>Cryptococcus semejante a Cr. Cerevisiae</i> (= <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
1924	Lindner P.	Aísla <i>Thermobacterium mobile</i> (= <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>Mobilis</i>) especie que describe como nueva para la ciencia
1936 A 1942	Ruiz Oronoz M.	Estudia las levaduras del aguamiel y del pulque; describe como nuevas especies a <i>Saccharomyces carbajalii</i> (= <i>S. Cerevisiae</i>), <i>Pichia barraganii</i> (= <i>Pichia membranifaciens</i>), <i>Torulopsis hydromelitis</i> (= <i>Candida parapsilosis</i>), <i>Torulopsis aquamellis</i> * y <i>Rhodotorula incarnata</i> *
1942 A 1951	Sánchez Marroquín A. Et al.	Realizan investigaciones importantes sobre la microbiología del pulque y la actividad metabólica de varios microorganismos, que publican en la serie titulada <i>Microbiología del pulque</i> .
2001	Estrada- Godina et al.	Determinan la capacidad killer de todas cepas identificadas como levaduras del genero <i>Candida</i>
2004	Escalante et al.	Caracterización de la comunidad bacteriana del pulque, por un análisis 16s rDNA
2008	Lappe- Oliveras et al.	Identifican a los microorganismos responsables de la fermentación láctica, acética, producción de EPS y bacterias putrefactivas.
2008	Escalante et al.	Análisis de la comunidad bacteriana durante la fermentación de pulque. 0

Fuentes: (Jímenez-Segura, 2016; Moreno-Terrazas et al., 2017)

Anexo 2 Microorganismos encontrados en diferentes estudios de pulque

Tabla 11-Microorganismos encontrados en diferentes estudios de pulque.

Nivel taxonómico	Especies
<p>Bacterias Prokaryota Bacterias lácticas Phylum Firmicutes Clase Bacilli Orden Lactobacillales Familia Aerococcaceae</p>	<p><i>Aerococcus urinaeequi</i></p>
<p>Familia Lactobacillaceae</p>	<p><i>Lactobacillus</i> spp, <i>L. acetotolerans</i>, <i>L. acidophilus</i>, <i>L. brevis</i>, <i>L. buchneri</i>, <i>L. collinoides</i>, <i>L. composti</i>, <i>L. delbrueckii</i>, <i>delbrueckii</i> subsp. <i>Lactis</i>, <i>L. hilgardii</i>, <i>L.kefir</i>, <i>Leichmannii</i>, <i>L. paracasei</i>, <i>L. paracollinoides</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>L. sanfranciscensis</i></p>
<p>Familia Leuconostocaceae</p>	<p><i>Leuconostoc</i> spp., <i>L. citreum</i>, <i>L. gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i>, <i>L. kimchii</i>, <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>, <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>, <i>L. pseudomesenteroides</i>, <i>Fructobacillus durionis</i></p>
<p>Familia Streptococaceae</p>	<p><i>Lactococcus</i> sp., <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>, <i>Streptococcus</i> sp., <i>Streptococcus devriesei</i></p>
<p>Esporulados Orden Bacillales Familia Bacillaceae</p>	<p><i>Bacillus</i> spp., <i>Bacillus licheniformis</i>, <i>B. Simplex</i>, <i>B. Subtilis</i></p>
<p>Familia Staphylococaceae</p>	<p><i>Macroccoccus caseolyticus</i></p>
<p>Clase Clostridia</p>	

Orden Clostridiales Familia Clostridiaceae	<i>Sarcina</i> sp.
Phylum Actinobacteria Clase Actinobacteria Orden Micrococcales Familia Micrococcaceae	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Kocuria rosea</i>
Familia Microbacteriaceae	<i>Microbacterium arborescens</i>
Familia Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i> spp.
Phylum Proteobacteria Clase α Proteobacteria Orden Sphingomonadales Familia Sphingomonadaceae	<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>Mobilis</i> , <i>Z. Mobilis</i> subsp. <i>Pomaceae</i>
Bacterias acéticas Orden Rhodospirillales Familia Acetobacteraceae	<i>Acetobacter</i> spp., <i>A. aceti</i> , <i>A. malorum</i> , <i>A. pomorum</i> , <i>Gluconobacter asai</i> , <i>G. orientalis</i> , <i>G. oxydans</i> , <i>Komagataeibacter xylinus</i>
Clase β Proteobacteria Orden Burkholderiales Familia Comamonadaceae Genera <i>Incertae sedis</i>	<i>Sphaerotilus</i> sp.
Clase γ Proteobacteria Orden Pseudomonadales Familia Moraxellaceae	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
Familia Pseudomonadaceae	<i>Chryseomonas luteola</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.
Familia Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i> sp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>E. cloacae</i> , <i>Erwinia rhapontici</i> , <i>Escherichia</i> sp., <i>Hafnia alvei</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Kluyvera ascorbata</i> , <i>K. intermedia</i> ,

	<i>Pantoea agglomerans</i> , <i>Providencia</i> sp., <i>Serratia grimensii</i>
Orden Xanthomonadales Familia Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
Phylum Bacteroidetes Clase Flavobacteria Orden Flavobacteriales Familia Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i> sp., <i>Flavobacterium johnsoniae</i> , <i>F. Oryzihabitans</i>
Levaduras Eukaryota	
Phylum Ascomycota Subphylum Saccharomycotina Clase Saccharomycetes Subclase Saccharomycetidae Orden Saccharomycetales Familia Debaryomycetaceae	<i>Meyerozyma quilliermondii</i> , <i>Priceomyces carsonii</i>
Familia Dipodascaceae	<i>Galactomyces candidus</i>
Familia Metschnikowiaceae	<i>Clavispora lusitaniae</i>
Familia Pichiaceae	<i>Pichia</i> spp., <i>P. membranifaciens</i>
Familia Saccharomycetaceae	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>Saccharomyces</i> spp., <i>S. bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i>
Familia Saccharomycodaceae	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
Familia <i>Incertae sedis</i>	<i>Candida parapsilosis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. rugopelliculosa</i>
Phylum Basidiomycota Subphylum Pucciniomycotina Clase Microbotryomycetes Orden Sporidiobolales Familia <i>Incertae sedis</i>	<i>Rhodotorula</i> spp., <i>R. Mucilaginoso</i>

Mohos Eukaryota	
Phylum Zygomycota Subphylum Mucormycotina Clase <i>Incerta sedis</i> Orden Mucorales Familia Rhizopodaceae	<i>Rhizopus stolonifer</i>
Phylum Ascomycota Subphylum Pezizomycotina Clase Eurotiomycetes Subclase Eurotiomycetidae Orden Eutoriales Familia Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> spp., <i>A. glaucus</i> , <i>A. niger</i> ., <i>Penicillium glaucum</i>

Fuentes: Escalante *et al.*, 2012; Escalante *et al.*, 2016; Lappe-Oliveras & Herrera-Suárez, 2013; Wachter-Rodarte *et al.*, 2014. Moreno-Terrazas *et al.*, 2017)

Anexo 3. Especies identificadas

A partir de la identificación polifásica de los aislados axénicos obtenidos, se construyó este apartado en el que se encuentra una breve descripción de las especies que fueron aisladas a lo largo del proceso de fermentación del pulque en la Hacienda de Xochuca en este trabajo.

Saccharomyces cerevisiae Meyen ex E.C. Hansen (1883)

Es un organismo modelo y el primer organismo eucarionte cuyo genoma fue secuenciado, raramente vez aislado de ambientes naturales. Las cepas estudiadas tienen diversos orígenes, de los cuales se mencionan suelos de viñedos, mosto de uvas tratadas con dióxido de sulfuro, suelo de caverna, de *Drosophila* sp., de cervezas y cervecerías alrededor del mundo, así como de destilerías, también en jugo de caña y jerez (Vaughn-Martini & Martini, 2011).

Dentro del contexto del pulque, *S. cerevisiae* se ha considerado uno de los principales microorganismos responsables de la producción de etanol en esta bebida desde los primeros estudios microbiológicos realizados por Sánchez-Marroquín en la década de 1950 (Escalante et al., 2016), pues es una levadura que además esta asociada a la fermentación de otras bebidas derivadas de plantas del género *Agave* (Lappe-Oliveras et al., 2008).

El cultivo enriquecido es utilizado comúnmente para favorecer el crecimiento de esta especie, que ha mostrado estar presente en números muy bajos con respecto a la microbiota dominante. Coloniza masivamente ambientes de fermentación artificiales donde persiste, se reproduce, evoluciona y puede ser dispersada (Vaughn-Martini & Martini, 2011) .

El asilamiento genético de esta especie en islas tecnológicas, es decir, su uso en vinaterías, cervecerías y panaderías; favoreció a las células de alta fermentación en ambientes ricos en azúcar, imponiendo así una selección dirigida a una vía catabólica con baja eficiencia energética y respiración insignificantes. Es por esa razón que es escasa su presencia en ambientes naturales, pues tiene la incapacidad de competir con otros microorganismos, que están mejor adaptados a

esos hábitats con pocos recursos disponibles (Sicard & Legras, 2011; Vaughn-Martini & Martini, 2011) .

Lo anterior llevó a la domesticación de muchas cepas de esta especie, lo que complica la designación de un taxón definitivo si uno se apega a la definición original de especie. Se ha propuesto el escenario en el que una cepa o especie original asociada a sustratos naturales ricos en azúcar, como exudados de frutas o plantas, estuvo involucrada en los primeros episodios de fermentación natural de jugos azucarados. Este proceso se debió reconocer como útil entre los grupos humanos por lo que con el tiempo se perfeccionó. Un candidato de posible cepa primigenia es *S. paradoxus* que es la única especie de alta fermentación del género *Saccharomyces* que ha sido aislada de la naturaleza. Esta es fenotípicamente indistinguible de *S. cerevisiae* y ha mostrado la capacidad de emparentarse con las cepas domesticadas, pero sin producir progenie fértil. Es posible que, en el algún momento en el pasado, *S. paradoxus* haya ocupado y persistido en ambientes creados por el humano y a través de cambios genéticos haya evolucionado en *S. cerevisiae* (Vaughn-Martini & Martini, 2011).

En cuanto a sus características morfofisiológicas, es capaz de fermentar glucosa, sacarosa, maltosa, y rafinosa, pero no lactosa, y en casos variables galactosa; las células vegetativas se transforman en ascas **persistentes** que contienen de una a 4 ascoesporas globosas o elipsoidales cortas. Las formas sexuales son raras en ambientes naturales donde la concentración celular es baja, y en ambientes industriales esta forma se inhibe por las altas concentraciones de glucosa (Vaughn-Martini & Martini, 2011).

Saccharomyces paradoxus Batschinskaya (1914)

Las cepas estudiadas de *S. paradoxus* han sido aisladas usualmente de ambientes naturales asociados a exudados de arboles, superficies de hojas o como especies no identificadas asociadas a *Drosophila* sp. (Vaughn-Martini & Martini, 2011)

En el ámbito biotecnológico se ha evaluado su potencial para ser implementada como una nueva levadura iniciadora de la fermentación de vino con propiedades

enológicas particulares a partir de su desempeño en la síntesis de etanol, glicerol y compuestos volátiles bajo diferentes condiciones de concentración de nitrógeno asimilable y glucosa/fructosa. Como resultado se encontró que *S. paradoxus* es una especie con una alta actividad de síntesis de glicerol, un compuesto que eleva la calidad del vino al darle un ligero dulzor y cuerpo, propiedades valoradas en la enología que la hacen una especie alternativa a *S. crevisae* (Orlić et al., 2010)

Dentro del contexto del pulque y los agaves, *S. paradoxus* junto con *Kluyveromyces marxianus*, son reconocidas como parte de la microbiota nativa del aguamiel con actividad enzimática de las endo y exo-fructoninas que hidrolizan los fructanos de esta savia, por lo que han sido estudiadas para el desarrollo de nuevos procesos industriales de obtención de un producto análogo al aguamiel a partir de la hidrólisis dirigida de los fructanos del mosto de *Agave angustifolia*. Lo anterior tiene el potencial de satisfacer la demanda de productos alimenticios saludables que contengan fructo-oligosacáridos con grado de polimerización fieles a los del aguamiel tradicional (Vicente-Maguey et al., 2020).

En cuanto a su morfofisiología, las células se transforman directamente en ascas que contiene una a cuatro ascosporas globosas o subglobosas. En la mayoría de las cepas, la esporulación es cerca del 50% y las ascosporas son altamente viables; y ocurre en la mayoría de los medios de cultivo, como el de extracto de malta, extracto de levadura, glucosa agar, de papa y de acetato. Es capaz de fermentar glucosa, galactosa y sucrosa, en casos variables maltosa y rafinosa; pero no lactosa (Kurtzman et al., 2011).

Kluyveromyces marxianus (E.C. Hansen) van der Walt (1971)

Esta especie es conocida por ser asilada de alimentos y bebidas, especialmente lácteos, pero también se ha encontrado en tejidos vegetales en descomposición e insectos asociados. Se han descrito algunos de sus usos como una fuente de enzimas como la beta-galactosidasa, inulasa, pectinasa y como una cepa termotolerante (Lachance, 2011b).

La actividad pectinolítica tiene el potencial ambivalente de ser útil e inconveniente en actividades humanas. Por un lado, tiene la capacidad para fermentar lactosa, por lo que ha sido usada en productos lácteos para producir proteína de levadura y etanol a partir de suero de queso; así como la endo-poligacturonasa que produce se ha usado experimentalmente para eliminar la pectina del jugo de manzana. Por el lado negativo, se ha identificado como un agente de la podredumbre blanda de la cebolla (Lachance, 2011b).

La actividad de la inulinasa es de interés industrial para la producción de jarabes de fructosa y etanol, por lo que se ha investigado esta actividad en bacterias, hongos y levaduras que reduzcan costos, productos y degradaciones no deseadas (Vijayaraghavan et al., 2009). Esta actividad se evaluó cepas de *Kluyveromyces marxianus* aisladas de aguamiel y pulque, concluyendo que puede ser considerado como un organismo hiperproductor de inulinasa capaz de hidrolizar inulina y obtener fructuosa y oligofruetosácaridos con grado de polimerización (Cruz-Guerrero et al., 2005)

Su morfofisiología se destaca por la conjugación de células haploides que puede preceder la formación de ascas, o las ascas pueden crecer directamente de células diploides. Se pueden formar de una a 4 ascosporas. Las esporas tienen diferentes rangos de formas, pueden ser de esféricas a elipsoidales hasta reniformes. En cultivos de esporulación parecen ser homotáticas. Las esporas son liberadas de las ascas tan pronto se forman y tienden a la aglutinación (Lachance, 2011b).

Zygosaccharomyces bailii (Lindner)Guilliermond (1912)

Esta especie es de amplia distribución asociado al detrimento de los alimentos, particularmente los que están en proceso de acidificación y aquellos alimentos preservados que contienen altas concentraciones de azúcares fermentables. Las fuentes de donde ha sido aislada esta especie incluyen miel, jugo de frutas y jugos concentrados, mosto de uva, mayonesa, aderezo de ensalada, pepinillos dulces, vinagre, vino y bebidas sin alcohol (James & Stratford, 2011).

Metabólicamente es capaz de fermentar glucosa y ocasionalmente sacarosa, pero no azúcares como la galactosa, maltosa, lactosa y rafinosa. Por otro lado, su reproducción sexual se caracteriza por ascas persistentes y generalmente conjugadas. La conjugación ocurre entre células separadas. Cada conjugante forma una o dos ascosporas globosas a ovoides con apariencia lisa (James & Stratford, 2011).

La especie original fue descrita como *Saccharomyces bailii* por Paul Lindner en 1895 y fue basado en su estudio de una levadura aislada de Danziger Jopenbier, una cerveza hecha de un mosto concentrado. En su descripción, Lindner incluyó ilustraciones mostrando la conjugación de la levadura. A partir de ahí, Gulliermond en 1912, la transfirió al género *Zygosaccharomyces*, renombrándola como se conoce actualmente. Como ningún cultivo original sobrevivió de la cepa original estudiada por Lindner, se designó a CBS 80, una cepa recibida en 1927 de H. Naganishi y aislada en el Institute of Brewing, Tokyo, como la cepa neotipo (Kurtzman et al., 2011).

Aunque se ha aislado ocasionalmente en fabricas de alimentos, no se considera un hábitat común para *Z. bailii*. El hábitat natural de esta levadura es muy probablemente en los tejidos deshidratados de frutas o en los exudados gomos de arboles. (Kurtzman et al., 2011)

Z. bailii es quizás una de las levaduras más problemáticas encontrada en la industria alimenticia por ser resistente a los preservativos ligeramente ácidos como el ácido benzoico, ácido sórbico y ácido acético; posee osmotolerancia y la habilidad de fermentar glucosa y fructosa vigorosamente, además de que es reconocida como un notable agente del deterioro del vino por su alta tolerancia al etanol (Kurtzman et al., 2011). A pesar de que suele ser indeseable en la industria de los alimentos, al ser un organismo ácido-tolerante se ha evaluado su uso para producir ácido láctico a través de ingeniería metabólica, lo que resulta útil para desarrollar

mecanismos que prevengan el deterioro de los alimentos y entender los mecanismos de tolerancia de microorganismos como *Z. bailii* a los ácidos orgánicos (Kuanyshev et al., 2021).

Clavispora lusitaniae Rodrigues de Miranda (1979)

Las cepas registradas de *C. lusitaniae* tienen diversos orígenes en los que se incluyen fuentes clínicas, tracto digestivo de cerdo, excrementos de cuervo, jugo de la cascara de *Citrus*, raíz del árbol boonjum en India. Aunque en México se ha encontrado en tallos podridos de cactus, en hojas podridas de *Agave sp.*, en el cladodio de una nopalera, tunas en descomposición, hoja podrida de *Agave tequilana* y en un estudio de levaduras asociadas con agaves, *C. lusitaniae* fue la especie más abundante en las pudriciones acéticas en la base de las de esta planta; falta evidencia que permita definir un nicho ecológico para esta especie (Lachance, 2011a).

En el contexto del pulque, *Clavispora lusitaniae* se ha encontrado como una de las especies representativas del aguamiel (Enríquez-Salazar et al., 2017) y como parte de la microbiota esencial en la producción del pulque (Escalante et al., 2016) donde además se le atribuye la producción de compuestos como acetato de etilo (Lappe-Oliveras et al., 2008)

Dentro de la agroindustria se ha demostrado que *C. lusitaniae* funciona como un agente biocontrolador de *Penicillium digitarum*, el moho verde que infecta y causa deterioro a los limones cosechados, al inhibir la germinación de sus esporas y por su capacidad de resistir a los fungicidas usados en los cultivos (Perez et al., 2019)

Sus capacidades de fermentación resultan positivas para glucosa y variable para galactosa, sacarosa y maltosa; negativo para lactosa y rafinosa. (Kurtzman et al., 2011). Hay evidencias de cepas capaces de producir etanol y xilitol a partir de celobiosa, xilosa y glucosa (Ochoa-Chacón et al., 2022) En cuanto a su reproducción sexual, las ascas son usualmente bilobadas, conteniendo una o dos

ascosporas. Los brotes pueden ser o no visibles con microscopia electrónica. Las ascosporas son liberadas tan pronto son formadas. La esporulación es abundante a los 2-4 días (Kurtzman et al., 2011)

Meyerozyma guilliermondi (Wickerham) Kurtzman & M. Suzuki (2010)

Las cepas de esta especie que han sido estudiadas provienen de diversos orígenes clínicos y veterinarios; excremento de insecto en olmo americano; de uvas; de *bubod*, un iniciador de la fermentación de un vino de arroz en Filipinas; y en México se ha aislado de pozol (Kurtzman, 2011).

En cuanto a sus características metabólicas, es capaz de fermentar glucosa, sacarosa y rafinosa, variable para galactosa pero no maltosa y lactosa. Por otro lado, esta especie es heterotalica y solo las formas haploides han sido aisladas. Siguiendo el emparejamiento de complementariedad entre las diferentes formas sexuales, se forman ascas que producen de una a cuatro ascosporas en forma de sombrero. Las esporas son liberadas tan pronto se hayan formado. Estas se pueden observar en extracto de malta 5% a 25°C después de 5 a 15 días después del apareamiento entre las formas sexuales (Kurtzman et al., 2011).

El interés biotecnológico en *M. guilliermondi* deriva del amplio espectro de sustratos en los que se puede encontrar y en la capacidad de sintetizar varios compuestos químicos a partir de la variedad de fuentes de carbono que puede utilizar, por lo que las aplicaciones para el desarrollo de enzimas de uso industrial, síntesis de metabolitos y el control biológico son viables para esta especie. Dentro de la industria, es reconocida porque produce riboflavina y xilitol. Es capaz de usar glicerol para la síntesis de lípidos y productos extracelulares como ácido cítrico y 2-feniletanol, por mencionar algunos. De igual forma, puede tolerar etanol y metanol en concentraciones menores al 1% gracias a la actividad de las alcohol y acetaldehído deshidrogenasas, inclusive puede estos alcoholes como fuentes de carbono y para la síntesis de lípidos. La síntesis de ácidos orgánicos utilizados en la industria alimenticia como el ácido cítrico, el ácido indol-3-acético y el ácido 3-hidroxipropiónico, pueden ser sintetizados a nivel industrial por esta levadura (Kurtzman, 2011; Yan et al., 2020)

Kazachstania gamospora Imsnishi, Ueda-Nishimura & Mikata (2007)

Las cepas que se han estudiado de esta especie provienen de muestras japonesas de suelo, hojarasca y desechos de bambú; y en mosto de uva infectada con *Botrytis* en Grecia, donde demostró tener una huella de compuestos volátiles que mejoran las propiedades organolépticas del vino Ribolla Gialla (Dashko et al., 2015; Martini et al., 2011) .

Para la industria del vino, la participación de levaduras distintas al género *Saccharomyces* en fermentación temprana es de interés por la adición de compuestos que le dan sabores y otras propiedades al producto final. Entre estas levaduras particulares, *Kazachstania gamospora* resultó ser un organismo capaz de sintetizar alrededor de 90 compuestos volátiles distintos y en mayor cantidad a los que produce una cepa control de *Saccharomyces cerevisiae* en estudios de prueba, tales como el fenetil-propionato que le da un aroma floral al vino (Whitener et al., 2015).

Es capaz de fermentar para glucosa, sacarosa y rafinosa, pero no galactosa, maltosa y lactosa. En cuanto a su reproducción sexual, las células vegetativas se transforman directamente en ascas persistentes que incluyen dos cortas, elipsoidales y verrugosas ascosporas unidas por un cuerpo interesporal parecido a un cinturón. La esporulación ha sido observada en agar YM después de 7 días de incubación (Martini et al., 2011).

Hanseniaspora valbyensis Klöcker (1912b)

Esta especie está asociada con alimentos fermentados como el vinagre balsámico tradicional, *sobía*, una bebida fermentada de Arabia Saudita, y en cidra. Otras cepas de esta especie se han encontrado en muestras de suelo en Dinamarca; exudados de arboles en Japón; pulque en México; cerveza de barril en Reino Unido; cerveza, Hungría; coliflor, California. También se ha aislado de *Drosophila* sp. en los bosques

de Río de Janeiro, Brasil, donde junto a *H. guilliermondii* y *H. occidentalis* fueron las levaduras más abundantes lo que sugiere una asociación con este vector. Además, se ha investigado su papel en la formación de los componentes volátiles principales y su uso putativo como un cultivo iniciador (Cadez & Smith, 2011).

Respecto a lo anterior, se ha evaluado la interacción entre *Saccharomyces cerevisiae* y *Hanseniaspora valbyensis* para la obtención controlada de compuestos volátiles durante la elaboración de cidra, donde se observó que *H. valbyensis* produce altas concentraciones de etil-ésteres (alrededor del 20%) cuando se hace a través de una inoculación secuencial. De hecho, las especies del género *Hanseniaspora* son consideradas entre las levaduras no-*Saccharomyces* como las principales productoras de acetatos y otros compuestos aromáticos (Xu et al., 2006)

Otros estudio que se le ha dado a *H. valbyensis* junto a otras especies del género *Hanseniaspora*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces* aisladas de kombucha, es la caracterización del uso de azúcar, producción de compuestos fenólicos de sabores desagradables, sensibilidad al lúpulo y floculación, para evaluar su uso en la producción de cerveza libre de alcohol. Entre los resultado se encontró que, en este contexto, *H. valbyensis* destaca por la alta producción de alcohol isoamílico, capaz de proveer el aroma afrutado en las bebidas en las que se encuentra, así como de altos alcoholes y esterres, siendo considerada, junto a las demás especies de levaduras, como potenciales microorganismos para la producción de bebidas libres de alcohol por pasar las pruebas realizadas (Bellut et al., 2018)

Sus capacidades metabólicas le permiten fermentar solamente glucosa tolerar un rango de etanol de 11.9 a 13.2 % (v/v). Por otro lado, la reproducción sexual se caracteriza por la observación general de dos a cuatro ascosporas en forma de sombrero que se producen por asca y usualmente se liberan cuando están maduras. Las ascosporas tienen a juntarse una vez liberadas (Cadez & Smith, 2011; Deak, 2006).

Candida boidinii C. Ramírez (1953)

Esta es una especie cuyas cepas han sido aisladas de varias fuentes incluyendo ambientes relacionados con la actividad humana. Su presencia en los fluidos de savia de muchos árboles en diferentes regiones geográficas alrededor del mundo. Un vínculo en común con estos sustratos son las moscas *Drosophila* que visitan estos materiales ricos en azúcares y compuestos volátiles orgánicos. Se caracteriza por ser capaz de fermentar glucosa, pero no azúcares como galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa y rafinosa (Lachance et al., 2011).

Los orígenes de las cepas estudiadas son fluidos de savia de abeto Douglas, roble negro (*Quercus kellogi*) en California y roble rojo norteno (*Quercus rubra*); savia de álamo. En Hawaii se encontró en el fruto de *Opuntia megacantha* y tejidos necróticos de sus cladodios, así como del tallo fermentador de *Clermontia* sp. (Araliaciae) y otros fluidos de savia de koa (*Acacia koa*); de la mosca de la fruta (*Drosophila* sp.) en una destilería de tequila en México; en la savia de guanipol (*Hymenaea courbaril*) en Costa Rica, así como en la flor de *Heliconia* sp., en el exudado pegajoso de Guanacaste (*Enterolobium cyclocarpum*); en vino de Japón, ginger ale en Estados Unidos, del suelo de un hospital en Finlandia, de suelo en Holanda/Países Bajos, de tepeche, una bebida de piña en México (Kurtzman, 2011)

Dentro de la agroindustria, *C. boidinii* ha sido estudiada para la producción de xilitol a nivel industrial a partir de residuos de cultivo como paja de arroz y salvado de trigo, demostrando que, bajo ciertas condiciones y optimizaciones de los procesos biotecnológicos, esta levadura es un organismo viable para la industria (Bedó et al., 2021)

Starmerella stellata/Candida stellata (Kromer & Krumbholz) S.A. Meyer & Yarrow (1978)

Antes conocida como *Candida stellata*, esta especie perteneció al clado *Starmerella sensu stricto* y recientemente fue transferida, junto a otras 24 especies, al género

Starmerella de acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (Santos et al., 2018) .

Aunque se sabe poco de esta especie, Beltran et al. (2002) siguió el desarrollo de una comunidad de levaduras asociadas con dos diferentes mostos en una vinatería de reciente construcción durante 6 años. *St. stellata* junto a *Hanseniaspora uvarum* fueron las especies dominantes en las primeras fermentaciones de la instalación, para más tarde ser suplantadas por *S. cerevisiae* (Kurtzman et al., 2011). Gracias al desarrollo de métodos moleculares de identificación, se han encontrado aislados de *St. stellata* en vinos Tokaj Aszú junto a *Candida zemplilina*, *Saccharomyces cerevisiae* y *S. uvarum*, entre las que se hizo una comparación de sus propiedades enológicas, encontrando que *St. stellata* es un organismo de carácter fructofílico, su producción de etanol es comparable a especies del género *Saccharomyces* como *S. uvarum* y *S. bayanus*, así como la producción de glicerol, que es superior a *S. cerevisie* en este contexto (Magyar & Tóth, 2011).

Es común y persistente durante la fermentación de vinos rojos y blancos en varias regiones del mundo y es capaz de tolerar hasta un 9% (v/v) de etanol. Aunque es capaz de contribuir a la pudrición de los alimentos, también sintetiza compuestos de interés como ésteres y la beta-glucosidasa que mejoran los aromas de los vinos y aderezos tradicionales; así como el glicerol, ácido succínico, etil-acetato y acetoina (García et al., 2018).

Esta especie es extremadamente oligofágica y en cuanto a sus capacidades fermentativas resulta ser positiva para glucosa, sacarosa, fermentación lenta para rafinosa; y negativa para galactosa, maltosa y lactosa. Aunque a veces puede crecer a 37°C, es sensible al calor y a los ácidos, creciendo preferentemente a temperaturas bajas, pH bajos y condiciones aerobias (García et al., 2018; Kurtzman et al., 2011).