



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE LEVADURAS DURANTE  
LA FERMENTACIÓN DE PULQUE DE LA HACIENDA XOCHUCA EN  
TLAXCO, TLAXCALA**

*Tesis*

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**VALERIA HAIDE JIMÉNEZ SEGURA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DRA. PATRICIA ESTER LAPPE OLIVERAS**



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** GLORIA DÍAZ RUÍZ  
**VOCAL:** NORMA ANGÉLICA CAMACHO DE LA ROSA  
**SECRETARIO:** PATRICIA ESTER LAPPE OLIVERAS  
**1er SUPLENTE:** BEATRIZ RUÍZ VILLAFAN  
**2ndo SUPLENTE:** LAURA CARMONA SALAZAR

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Micología C006 del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Patricia Ester Lappe Oliveras.

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. PATRICIA LAPPE OLIVERAS**

**SUSTENTANTE**

**VALERIA HAIDE JIMÉNEZ SEGURA**

# Índice

Índice de tablas .....	iii
Introducción.....	1
Marco teórico.....	1
Definición de fermentación. ....	1
Alimentos fermentados .....	2
Definición de levaduras .....	2
Relevancia histórica de las levaduras.....	2
Importancia y uso de las levaduras .....	3
Características morfológicas distintivas de las levaduras .....	4
Reproducción.....	4
Hábitat .....	6
Los alimentos fermentados tradicionales en México y su importancia .....	6
Historia del pulque: orígenes, producción y estado actual.....	7
Descripción del pulque, especies de agaves utilizadas para la elaboración de la bebida .....	10
Características del aguamiel .....	11
Producción tradicional de pulque.....	11
Normatividad: aguamiel y pulque.....	18
Estudios microbianos del pulque .....	17
Dinámica microbiana, cambios fisicoquímicos y químicos durante la fermentación del aguamiel.....	19
Valor medicinal, nutrimental, prebiótico y probiótico del pulque .....	23
Componentes de sabor .....	25
Industrialización del pulque .....	25
Justificación.....	27
Objetivo general.....	28
Objetivo particular.....	28
Materiales y métodos .....	29
Obtención de las muestras .....	30
Aislamiento y cuantificación de levaduras y obtención de cultivos axénicos .....	32

Conservación de los aislados a mediano y largo plazo .....	32
Conservación a mediano plazo.....	32
Conservación a largo plazo .....	32
Identificación fenotípica .....	33
Reproducción sexual.....	33
Pruebas fisiológicas.....	33
Fermentación de compuestos de carbono.....	33
Asimilación de compuestos de carbono.....	34
Asimilación de compuestos de nitrógeno.....	34
Identificación genotípica.....	34
Reacción de amplificación del dominio D1/D2 LSU del gen 26S ADNr mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	34
Reacción de secuenciación y análisis de las secuencias .....	36
Resultados y discusión.....	37
Aislamientos y cuantificación de levaduras .....	37
Identificación de los aislados de levaduras.....	41
Conclusiones.....	67
Anexos .....	68
Bibliografía .....	73

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Análisis químico de muestras de aguamiel tradicional y aguamiel pasteurizado de planta piloto e industrial. ....	17
<b>Tabla 2.</b> Microorganismos identificados en pulque hasta la fecha .....	21
<b>Tabla 3.</b> Composición química de muestras de pulque tradicional, comercial e industrializado. ....	24
<b>Tabla 4.</b> Muestras obtenidas durante la elaboración comercial de pulque en la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala .....	30
<b>Tabla 5.</b> Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas consideradas para la identificación de las levaduras de acuerdo con la metodología de Yarrow (1998), Kurtzman <i>et al.</i> (2011b).....	31
<b>Tabla 6.</b> Reactivos y cantidades utilizados en la reacción de amplificación del dominio D1/D2 LSU del gen 26S ADNr.....	35
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación del dominio D1/D2 LSU del gen 26S ADNr. ....	35
<b>Tabla 8.</b> Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de levaduras cuantificadas en las diferentes muestras obtenidas durante el proceso de elaboración y fermentación de pulque comercial en la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala.	38
<b>Tabla 9.</b> Resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas considerados para realizar la identificación fenotípica de los aislados de levaduras obtenidos de las muestras del proceso de elaboración y fermentación del pulque comercial de la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala. ....	47
<b>Tabla 10.</b> Identificación de 81 aislados de levaduras obtenidas a partir de las diferentes muestras del proceso de elaboración de pulque comercial en la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala, con la galería de pruebas del API 32C. ....	52
<b>Tabla 11.</b> Identificación fenotípica y genotípica de los aislados obtenidos partir de las diferentes muestras del proceso de elaboración de pulque comercial en la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala. ....	56
<b>Tabla 12.</b> Especies de levaduras, número de aislados por especie y por muestra de las diferentes etapas de elaboración y fermentación de pulque comercial en la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala. ....	58

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> División celular por gemación, formación de paredes transversales (septos), y gemación-fisión (Phaff <i>et al.</i> , 1978). .....	5
<b>Figura 2.</b> Esquema general del ciclo de la vida de una levadura que lleva a cabo la reproducción sexual (García Cortés, 2004). .....	6
<b>Figura 3.</b> Elaboración de pulque comercial en la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala. ....	14
<b>Figura 4.</b> Diagrama de flujo de la metodología seguida para el aislamiento, cuantificación e identificación de las levaduras presentes durante el proceso de elaboración y fermentación de pulque comercial elaborado en la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala. ....	29
<b>Figura 5.</b> Ubicación de la región D1/D2 del gen 26 S ADNr amplificada con los iniciadores NL1 y NL4 (Makene, 2014). .....	36
<b>Figura 6.</b> Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de levaduras cuantificadas en las diferentes muestras obtenidas durante el proceso de elaboración y fermentación de pulque comercial en la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala. ....	39
<b>Figura 7.</b> Colonias gigantes de las diferentes especies de levaduras identificadas en las en distintas etapas de elaboración y fermentación de pulque comercial de la Hacienda Xochuca Tlaxco, Tlaxcala, sembradas en placas de medio WLA, incubadas por 1 mes a 27°C en obscuridad. ....	44

## **Introducción**

Los alimentos y bebidas fermentados tradicionales son aquellos cuyo proceso de elaboración involucra el crecimiento y la actividad de microorganismos como bacterias, mohos o levaduras, los cuales al desarrollarse en la materia prima, comestible o no, modifican su textura, color, sabor, olor, valor nutricional, y grado de conservación, haciéndola más atractiva para el consumidor (Steinkraus, 1996).

La mayoría de los alimentos fermentados tradicionales son productos autóctonos que sólo se conocen en su región de origen, varían según la zona geográfica y las preferencias de los consumidores y forman parte del acervo cultural de diversos grupos étnicos del mundo. Se producen a nivel doméstico para autoconsumo o a pequeña escala para ser comercializados; en su proceso de elaboración se utilizan técnicas sencillas ancestrales que han pasado de generación en generación hasta la actualidad (Lappe-Oliveras y Herrera-Suárez, 2014).

## **Marco teórico**

### **Definición de fermentación**

La fermentación es un proceso metabólico de levaduras, bacterias y mohos para la producción de ATP en condiciones anaerobias. Se conocen diversos tipos de fermentación los cuales pueden clasificarse de acuerdo con: 1) el estado físico del medio en el que se realiza, es decir sólida o líquida, 2) por los metabolitos que se obtienen: fermentación alcohólica, el piruvato se convierte en etanol liberando CO<sub>2</sub>; fermentación ácido-láctica, donde se produce ácido láctico sin liberación de CO<sub>2</sub>; fermentación acética en la cual se forma ácido acético a partir del etanol en presencia de oxígeno; fermentación butírica en la que se obtiene ácido butírico a partir de glúcidos en ausencia de oxígeno, 3) el tipo de sustrato en el que se realiza, es decir azucarado, amiláceo, proteico, entre otros (García-Garibay y López-Munguía, 2004; Campbell y Reece, 2007).



## **Alimentos fermentados**

En alimentos, la fermentación consiste en la conversión de los componentes presentes en las materias primas, productos vegetales como frutas, cereales, leguminosas, o productos animales como carne o leche, mediante la actividad enzimática de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Durante dicho proceso se modifican las características organolépticas de los sustratos, como sabor, aroma y texturas; se aumenta su valor nutricional por la producción de aminoácidos esenciales, ácidos grasos y vitaminas, además de que se incrementa su vida de anaquel por la producción de ácidos orgánicos (láctico y acético primordialmente) y hay detoxificación de los alimentos por medio de la transformación de componentes tóxicos o antinutricionales presentes naturalmente en ellos (Steinkraus, 1996;Wacher-Rodarte, 2014).

### **Definición de levaduras.**

Las levaduras son hongos unicelulares que no constituyen una unidad taxonómica real. Se reproducen asexualmente por gemación y fisión, no forman sus estados sexuales dentro o sobre cuerpos fructíferos y pasan gran parte del ciclo vegetativo como células individuales (Kurtzman *et al.*, 2011a). En la monografía de Kurtzman *et al.* (2011a) se reconocen 149 géneros y 1500 especies, que se clasifican en los *Phyla Ascomycota* y *Basidiomycota* del reino *Fungi*.

### **Relevancia histórica de las levaduras**

El uso de las levaduras es muy antiguo, se ha encontrado evidencias arqueológicas que señalan que durante el Neolítico (8500-4000 a. C.) estos microorganismos ya eran utilizados en China, Irán y Egipto, y alrededor del mundo para la producción de bebidas alcohólicas y alimentos. En tablas babilónicas con una antigüedad de más de 6000 años se describen la elaboración de cerveza y vino, cuyo consumo data de esa fecha (Starmer y Lachance, 2011), en los murales de la Mastaba de Ty en Saqqara, Egipto (2400-2300 a. C.) se muestra en detalle

el proceso de elaboración y conservación de la cerveza de cebada (García Cortés, 2004).

Estas tecnologías ancestrales para la producción de bebidas y alimentos se transfirieron y refinaron a través del tiempo, evolucionando a los procesos biotecnológicos actuales. Uno de los grandes avances fue lograr la domesticación de *Saccharomyces cerevisiae*, especie que hoy en día es empleada en muchos de los procesos actuales, además de ser utilizada como modelo de organismos eucariontes para la investigación de diversos procesos biológicos, incluyendo los humanos (Starmer y Lachance, 2011).

### **Importancia y uso de las levaduras**

La importancia de las levaduras radica en que estas son utilizadas a diario, para la producción de pan, cerveza, vino u otras bebidas y productos fermentados. Además, en los últimos años, estos microorganismos se han empleado en la industria farmacéutica y alimenticia para obtener diversos productos, como vitaminas, colorantes, saborizantes, entre otros, y han sido utilizados como agentes en el biocontrol de patógenos de plantas. Sin embargo, algunas especies de levaduras, principalmente de los géneros *Candida* y *Cryptococcus* son patógenos reales o patógenos oportunistas, que en determinadas condiciones pueden representar un problema de salud pública (Johnson y Echavarri-Erasun, 2011).

Así, estos microorganismos tienen importancia científica, industrial, alimenticia, médica y agrícola, siendo *S. cerevisiae* la especie con mayor importancia biotecnológica (Johnson y Echavarri-Erasun, 2011).

## **Características morfológicas distintivas de las levaduras**

La mayoría de las levaduras son mesófilas, sin embargo también hay psicrófilas y termófilas, tienen un crecimiento óptimo de entre 20 y 25° C. Su pH óptimo es de 4.5 y 6.5, sin embargo algunas especies pueden tolerar pH alcalinos de 7-8, o ácidos de hasta 2.8 (Phaff *et al.*, 1978; Kurtzman *et al.*, 2011a).

La forma de las células vegetativas puede ser esférica, globosa, ovoide, elongada o cilíndrica, apiculada, o triangular (como en el género *Trigonopsis*); su tamaño varía de 2-3  $\mu\text{m}$  de largo aunque algunas especies pueden alcanzar hasta 20-50  $\mu\text{m}$ .; el ancho por lo general es de 1-10  $\mu\text{m}$  (Phaff *et al.*, 1978; Kurtzman *et al.*, 2011b).

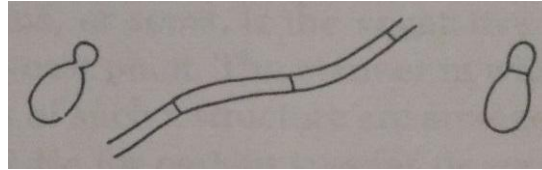
Muchas de las levaduras son semejantes morfológicamente, por lo que sólo se pueden diferenciar por sus características fisiológicas y bioquímicas, y más recientemente por sus características moleculares (Alberts *et al.*, 2006).

## **Reproducción**

La reproducción de las levaduras puede ser asexual o sexual. La asexual a su vez puede ser por gemación o fisión. Cuando es por gemación la célula madre desarrolla una protuberancia, que es la célula hija, la que crece hasta tener un tamaño semejante a la célula madre; esta nueva célula puede separarse o permanecer unida a la célula madre para dar origen a cadenas cortas de células o a pseudomicelio (van der Walt y Yarrow, 1984). Figura 1.

Cuando se reproducen por fisión, las células aumentan de tamaño y se alargan, forman un tabique transversal que bisecta la célula; las nuevas células crecen y nuevamente repiten el proceso de fisión. En algunos casos las células pueden crecer hasta formar filamentos largos, formando un micelio verdadero que bajo determinadas condiciones puede fragmentarse o desarticularse a nivel del septo dando origen a células independientes denominadas artrosporas que pueden formar un tubo germinativo y originar un nuevo filamento o hifa (van der Walt y

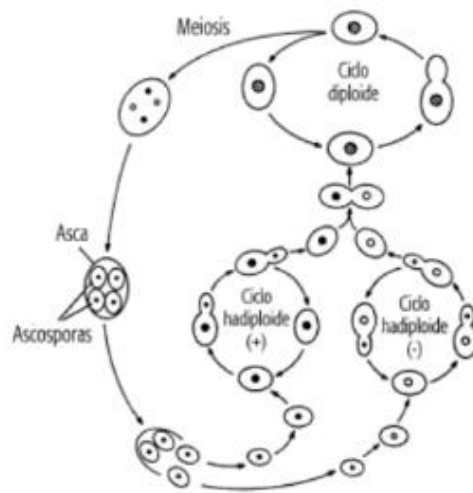
Yarrow, 1984). Este tipo de reproducción se presenta en los géneros *Endomyces* y *Schizosaccharomyces* (van der Walt y Yarrow, 1984).



**Figura 1. División celular por gemación, formación de paredes transversales (septos), y gemación-fisión (Phaff *et al.*, 1978).**

Cuando se reproducen sexualmente generan ascas con ascosporas, o basidios con basidiosporas, pero éstas estructuras sexuales no quedan confinadas dentro de un cuerpo fructífero (Moore, 1998).

Muchas levaduras, aunque no todas, se caracterizan por presentar una alternancia de fases con formación de células características en la cual se lleva a cabo la división meiótica. En levaduras ascógenas el sitio de la meiosis es el asca, donde la generación haploide o ascosporas se delimitan internamente por el proceso llamado “formación de libre del asca”, en el cual el citoplasma que rodea a los núcleos meióticos queda envuelto por una pared. En levaduras basidiógenas la división meiótica está restringida al basidio, sobre el cual la haplofase es externamente delimitada como basidiosporas (van der Walt y Yarrow, 1984).  
Figura 2.



**Figura 2. Esquema general del ciclo de la vida de una levadura que lleva a cabo la reproducción sexual (García Cortés, 2004).**

### **Hábitat**

Las levaduras tienen un hábitat muy amplio en los biomas alrededor de mundo, ya que pueden encontrarse en la estratosfera; en las profundidades de los océanos, en acuíferos debajo del mar; en hielo glacial antiguo o permafrost, y muy abundantemente en la filosfera. En ambientes terrestres las levaduras generalmente se desarrollan en sustratos ricos en nutrientes y ambientes húmedos, por lo que es frecuente encontrarlas en frutos, flores, corteza y troncos de árboles, exudado de hojas, raíces. Muchas viven una vida saprobia, es decir crecen sobre sustratos orgánicos no vivos, mientras que otras establecen diferentes tipos de relaciones con diversos organismos como: simbiosis, mutualismo, competencia, parasitismo, patogénesis, comensalismo o amensalismo (Starmer y Lachance, 2011).

### **Los alimentos fermentados tradicionales en México y su importancia**

En México como en otros países, los alimentos fermentados han tenido gran importancia en la vida diaria de los diversos grupos indígenas que han habitado en el país desde la época prehispánica, siendo utilizado con diversos fines como:

alimenticio, ceremonial, religioso, medicinal, entre otros (Ulloa *et al.*, 1987; Godoy, *et al.*, 2003). La tradición de la elaboración y consumo de algunos de ellos ha persistido hasta la actualidad, no sólo entre los indígenas sino también entre los grupos mestizos y de inmigración reciente (Herrera-Suárez, 1993).

La mayoría de los productos fermentados tradicionales de México han sido objeto de estudios históricos, sociales, étnicos y médicos, y sólo algunos de ellos como mezcal, tequila, pulque, raicilla, bacanora, pozol, entre otros, han sido estudiados desde el punto de vista microbiano y químico (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Lappe-Oliveras y Herrera-Suárez, 2014; Wachter-Rodarte, 2014).

En el México prehispánico la dieta de los indígenas se conformaba de una amplia variedad de plantas, animales, miel, aguamiel, e insectos, que variaba dependiendo de la zona geográfica, teniendo como alimentos básicos comunes al maíz, el frijol y el chile. De éstos, el maíz junto con el aguamiel fueron los sustratos más utilizados en la elaboración de alimentos y bebidas fermentados. De los productos fermentados elaborados con maíz destacan la masa agria, el atole, el atole agrio, el pozol, el sendechó, el tepache, el tesgüino, el tejuino, los tamales agrios y la tortilla agria, por mencionar algunos; de los elaborados con miel de abeja *Melipona* está el balché; a partir de frutas el tepache y el colonche, entre otros vinos de frutas; y de los elaborados con savia de algunas especies de magueyes o aguamiel o de la savia del cocotero están el pulque y la tuba, respectivamente (Wachter-Rodarte, 2014, Lappe-Oliveras y Herrera-Suárez, 2014).

### **Historia del pulque: orígenes, producción y estado actual.**

El pulque es una bebida alcohólica de origen prehispánico, que ha trascendido hasta nuestros días. Es considerada una de las bebidas más antiguas y tradicionales de México, por lo que es un ícono de nuestro país. Se obtiene por la fermentación de aguamiel extraído de diferentes especies magueyes pulqueros.

Se desconoce cuál es el origen de la palabra pulque, sin embargo diversos lingüistas han propuesto que proviene del náhuatl *polihquioctli*, nombre dado por

los mexicas al pulque descompuesto con sabor y olor desagradable, y del cual los españoles derivaron la palabra *pulque*, la cual emplearon para designar al vino de agave o *metoctli* recién preparado. Sin embargo en la población mexicana la bebida recibió diversos nombres provenientes del nahuatl: *iztacoctli* (*iztac* = blanco y *octli* = vino) o vino blanco; *metoctli* (*metl* = maguey y *octli* = vino) o vino de maguey; *teoctli* (*teo* = dios y *octli* = vino) vino de los dioses o vino ceremonial; *necutioctli* (*necutic* = dulce y *octli* = vino) vino dulce; y *polihquioctli* (*polihqui* = descompuesto y *octli* = vino) o vino descompuesto (Gonçalves-Lima, 1978; Lappe y Ulloa, 1993; Escalante *et al.*, 2012).

La cultura del maguey aparece hacia el 6000 a. C. mientras que la domesticación de los agaves se inició en el 3,500 a. C. Hacia los años 2,000 a 200 a. C. los habitantes de Tula, Tulancingo y Teotihuacán ya cultivaban los magueyes; en estas regiones se han encontrado raspadores semejantes a los que se utilizan en la actualidad para la obtención de aguamiel, por lo que es probable que sus pobladores hayan extraído el aguamiel para utilizarlo como sustituto de agua o para la elaboración de pulque. Muchos de los pueblos del centro de México también cultivaron los magueyes y los explotaron con diversos fines. Obtuvieron fibra para elaborar tejidos o cuerdas; material de construcción; agujas (elaboradas con las espinas de la pencas); jabón; dulce; aguamiel, por mencionar algunos productos, por lo que los españoles llamaron al maguey “el árbol de las maravillas” (Ramírez-Rodríguez, 2004; Wachter-Rodarte *et al.*, 2014).

Los otomíes preparaban el pulque hacia el año 2000 a. C., por lo cual se les adjudica su descubrimiento e introducción a otros pueblos del centro de México (Martín del Campo, 1938; Blomberg, 2000), sin embargo diversas leyendas atribuyen el origen de la bebida a los toltecas, en Tula (1021-990 a. C.) (Escalante *et al.*, 2012).

En la cultura mexicana, el pulque era consumido de manera restringida y con un orden jerárquico; tenía una gran importancia en los rituales religiosos y bélicos.

Era consumido en pequeñas cantidades por adultos mayores, ya que no formaban parte de la fracción productiva de la población, y por mujeres embarazadas y en etapa de lactancia; los gobernantes y guerreros lo consumían de forma cotidiana, y los sacerdotes ingerían el *teoctli* o vino de los Dioses en grandes cantidades con la finalidad de estar en comunión con Dioses. A los prisioneros de guerra se les suministraba la bebida para que estuvieran tranquilos durante su sacrificio. El consumo excesivo de pulque era penado con castigos e incluso con la muerte (Escalante *et al.*, 2012). Los niños tenían autorización de ingerirlo con moderación en la festividad del *pillaoano* “fiesta de la borrachera de los niños” que se realizaba cada cuatro años, y los jóvenes en el festejo del Dios *Ometochtli* “Dios Dos Conejo” (Lappe-Oliveras y Herrera-Suárez, 2014; Wachter-Rodarte *et al.*, 2014).

Los mexicas utilizaron el pulque como alimento divino, medicinal e intoxicante ritual (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008). Dentro de la mitología azteca la diosa asociada con el descubrimiento del maguey y del pulque es *Mayahuel*, la que además es considerada la diosa de la fecundidad y de los cuatrocientos pechos que alimentan a los *Centzon-Totochtin*, o Cuatrocientos Dioses Conejo, que representaban a los dioses menores asociados con el pulque y la embriaguez (Gonçalves-Lima, 1978; Godoy *et al.*, 2003). Según la leyenda *Mayahuel* fue quien observó que del maguey se producía una sustancia líquida y dulce, denominada *necutli* (miel), la que al fermentarse se convertía en *metoctli*.

Con la caída del imperio azteca el pulque perdió su importancia como bebida ritual y religiosa, conservando su relevancia sólo como alimento y sustituto de agua. Sin embargo, su consumo se incrementó entre los habitantes indígenas al amparo de las nuevas leyes impuestas por los conquistadores, quienes emplearon la bebida como un medio para controlar a la población. Así el pulque se volvió una bebida popular, llegando a considerarse por algunos la bebida nacional de México (Lappe y Ulloa, 1993).



En las últimas décadas del siglo XX el consumo de pulque se redujo notablemente; actualmente en las zonas urbanas la bebida sólo puede encontrarse en pulquerías, torees y restaurantes de comida mexicana, mientras que en las zonas rurales es la bebida alcohólica por excelencia, siendo consumida en festividades familiares como bodas, bautizos y funerales. Para la población de escasos recursos y que tienen una dieta con base en el maíz, el pulque representa un complemento importante de su dieta debido a su contenido de aminoácidos y de vitaminas del complejo B. Además esta bebida ha sido considerado un alimento funcional debido a la presencia de prebióticos y probióticos (Ramírez-Rodríguez, 2004; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Escalante *et al.*, 2012).

En años recientes se ha impulsado el consumo del pulque por lo que es promovido en muestras gastronómicas y restaurantes de comida mexicana con el fin de evitar la desaparición de una de las bebidas prehispánicas que ha subsistido hasta la actualidad y que forma parte de la cultura y de la historia de México (Lappe-Oliveras y Herrera-Suárez, 2014).

### **Descripción del pulque, especies de agaves utilizadas para la elaboración de la bebida**

El pulque es una bebida alcohólica con 4-6% de etanol, blanca, viscosa y ligeramente ácida, que se obtiene de la fermentación espontánea láctica-alcohólica-acética de la savia de agave o aguamiel de diferentes especies de magueyes pulqueros del género *Agave*, principalmente de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck (maguey pulquero, manso o verde), *Agave mapisaga* Trel. (maguey pulquero, de manos largas o mexicano), y en proporción menor de *Agave americana* L. (maguey pulquero), *Agave inaequidens* K. Koch (maguey hoeimetl), *Agave hookerii* Jacobi (maguey ixquitécatl o pulquero) y *Agave marmorata* (maguey tepeztate) (García-Mendoza, 1998; Godoy *et al.*, 2003). Estas especies crecen en zonas áridas y semiáridas del altiplano central de México, en suelos arenosos, someros, pobres o fértiles, y en terrenos de poca pendiente. Las mayores áreas cultivadas de maguey se sitúan en los estados de Hidalgo,

Tlaxcala y México, parte de Puebla, Querétaro, Michoacán y Distrito Federal (Sánchez-Marroquín, 1967; García-Mendoza, 1998; Escalante *et al.*, 2012).

### **Características del aguamiel**

El aguamiel es un líquido blanco amarillento, ligeramente turbio y espeso, con un sabor dulce, fresco y ligeramente ácido. Está compuesto por agua, azúcares como: glucosa, sacarosa, fructosa, fructo-oligosacáridos y agavinas; proteínas; aminoácidos: todos los aminoácidos esenciales, excepto metionina; sales minerales: calcio, fósforo, sodio, magnesio, hierro, zinc, cobre y manganeso; vitaminas: ácido p-aminobenzóico, ácido pantoténico, tiamina, riboflavina, niacina, biotina y vitamina C; y gomas como sus componentes principales (García-Mendoza, 1998; Lappe *et al.*, 2008; Escalante *et al.*, 2012).

La composición química del aguamiel varía dependiendo de la especie de agave, de su estado fenológico, así como de su localidad y condiciones ambientales en las que crece. En la Tabla 1 se muestra el análisis químico realizado a muestras de aguamiel de diversa procedencia.

### **Producción tradicional de pulque**

La producción de pulque se inicia con la castración del maguey *A. salmiana* (Fig. 3 a-d). Cuando el maguey tiene de 8 a 12 años de plantado, se observa un adelgazamiento en la base del *meyolote* y el surgimiento del brote floral llamado quiote, por lo que se procede a cortarlo o al “capado o castración del maguey” dejando una cavidad en el tallo del agave llamada *cajete*. Esta acción se realiza con la finalidad de evitar el surgimiento de inflorescencia, ya que durante su desarrollo se consumirían los nutrientes de reserva del maguey. El agave capado se deja reposar de 6 a 12 meses para incrementar el contenido de azúcares de 7-14% p/v en la savia o aguamiel (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008) y que las hojas centrales alcancen su madurez. Pasado ese lapso se realiza la *picazón* que consiste en abrir el tejido cicatricial del cajete, para posteriormente raspar la cavidad para que en ella se acumule el aguamiel. Después de aproximadamente

cuatro días el *tlachiquero* (persona encargada del raspado y extracción del aguamiel) nuevamente realiza el raspado del cajete con el fin de abrir los vasos y promover la producción de aguamiel (Fig.3 e-f). El cajete se cubre con pencas y piedras para proteger la savia de la lluvia, de insectos y de otros animales; cada vez que se extrae aguamiel se repite el raspado para que la producción de aguamiel continúe. El aguamiel, *tlachique* o *neutle* es extraído dos veces al día, por la mañana y por la tarde, produciendo de 4 a 6 L diarios por un periodo de 3-6 meses (Fig.3 g). Después de este tiempo la planta muere. Para la extracción de la savia se emplea el acocote (Fig.3 h), que es una calabaza hueca (*Lagenaria siceraria* L.), con la que el *tlachiquero* succiona (Fig.3 i, j) el aguamiel para ser vaciado en las castañas (recipientes de madera, de fibra de vidrio o plástico) u odres (bolsas de cuero de chivo) (Fig. 3 k) (Loyola-Montemayor, 1956; Ramírez-Rodríguez, 2004) para ser transportado al *tinacal* (Fig. 3 l), que es un espacio cerrado con ventanas pequeñas, donde se encuentran las tinas de fermentación con una capacidad de 500 a 800 L (Fig.3 m-s). Anteriormente se utilizaban tinas de cuero de res sin curtir o de madera, sin embargo en la actualidad las más empleadas son de fibra de vidrio. La elaboración de pulque comercial 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. Para producir el inóculo también llamado “semilla”, “pie”, “nana” o “madre”, se extrae aguamiel de la mejor calidad y se fermenta espontáneamente en tinas de poca capacidad (10-15 L), destinadas ex profeso para este fin, por aproximadamente 8 a 30 días, lo que dependerá de la estación del año (Fig.3 o). La fermentación se da por terminada cuando se alcanza cierto grado alcohólico y acético, y el líquido presenta un color blanquecino y la formación de 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 *de cuba*, que es el que se emplea como inóculo en la elaboración del pulque comercial (Fig.3 p). 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* en una proporción de 1:1 (v/v) (Fig. 3 r) y se deja fermentar hasta que presente sus características distintivas, siendo el mayordomo que se encarga de la elaboración de la bebida, el que según su experiencia decide, cuando parar la fermentación para posteriormente comercializar el producto, antes de que se inicie su acidificación y putrefacción (Fig. 3 t-v). 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 (Loyola-Montemayor, 1956; García-Garibay y López-Munguía, 2004; Ramírez-Rodríguez, 2004; Ramírez *et al.*, 2004; Escalante *et al.*, 2012).

Durante la fermentación del pulque se producen tres tipos de fermentación que definen las características físicas, químicas y organolépticas de la bebida: fermentación ácida, alcohólica y viscosa, siendo los metabolitos primarios producidos ácidos láctico y acético, etanol y exopolisacáridos de fructosa, glucosa y sacarosa, respectivamente. Además, se producen metabolitos secundarios que dan las características particulares al pulque. Después de estas fermentaciones se presentan la acética y pútrida, las que dan como resultado un pulque de mala calidad, por lo que éstos no son deseables (Herrera-Solórzano, 2008).

El pulque puede consumirse natural o curado, es decir, adicionado con frutas, semillas, hortalizas o derivados de origen animal (Fig. 3 w) (García-Garibay y López-Munguía, 2004).



**Figura 3. Elaboración de pulque comercial en la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala.**  
a) *Agave salmiana*, b) Maguey al hilo, c) Castración del maguey, corte del quiote d) Maguey castrado, e) Raspado del cajete, f) Mexal, g) Cajete con aguamiel, h) Extracción de aguamiel. Fotografías de P. Lappe Oliveras.



**Figura 3. Continuación.**

i) Succión del aguamiel con el acocote, j) Aguamiel, k) vaciado del aguamiel a la castaña, l) Transporte de las castañas al tinacal, m) Pesado de las castañas, n) Tinacal, ñ) Lavado de la tina de fermentación, o) Semilla madre. Fotografías de P. Lappe Oliveras, a excepción de j), k) n) de C. León Cano.



**Figura 3. Continuación.**

p) Semilla pie de cuba, q) Extracción de semilla pie de cuba para inoculación de tanque de fermentación, r) Adición de aguamiel al tanque de fermentación, s) Tina de fermentación, t) Pulque, u) Llenado de barriles, v) Barriles listos para su transporte, w) Pulque curado y natural. Fotografías de P. Lappe Oliveras, a excepción de s) de C. León Cano.

**Tabla 1. Análisis químico de muestras de aguamiel tradicional y aguamiel pasteurizado de planta piloto e industrial.**

Compuesto	Hidalgo <sup>a</sup>	México <sup>a</sup>	Puebla <sup>b*</sup>	Tlaxcala <sup>c</sup>	Planta piloto <sup>d*</sup>	Néctar del Razo <sup>d*</sup>
°Brix				11.41	6	
pH				6.3	4.6	
Proteína <sup>•</sup>			0.34	0.34	0.17	0.37
Cenizas <sup>•</sup>	0.4	0.3	0.37	0.53	0.29	0.24
Carbohidratos <sup>•</sup>						
Sacarosa			1		0.42	
Fructosa			3.7	4.7		
Glucosa			3	2.3	0.06	
Fructooligosacáridos			1.17			
Minerales <sup>▼</sup>						
Calcio	10	20	8.1			11
Fósforo	20	9				6
Hierro	0.4	-	0.1			0.7
Vitaminas <sup>▼</sup>						
Tiamina	0.1	0.02			0.02	0.02
Riboflavina	0.01	0.03			0.03	0.03
Niacina	0.5	0.4			0.37	0.35
Piridoxina	-				0.03	
Biotina <sup>▲</sup>					0.02	
Ácido ascórbico	11.3	6.7	nd			5.1
Aminoácidos <sup>▼</sup>						
Lisina			3.1		7.5	12.0*
Triptófano			0.46		9	6.0*
Histidina			0.69			
Fenilalanina			2.64		10	
Leucina			1.26		7.5	
Treonina			1.84		6	
Metionina			0		5	
Valina			1.26		5	
Arginina			3.45		7.5	
Tirosina			1.15		32	

Fuentes: <sup>a</sup>Cravioto *et al.*, (1951), <sup>b</sup>Ortiz Basurto *et al.*, (2008), <sup>c</sup>Flores *et al.*, (2008), <sup>d</sup>Ramírez *et al.*, (2004) (*apud* Wachter-Rodarte *et al.*, 2014).

<sup>a, b, c</sup> Aguamiel tradicional; <sup>d, e</sup> Aguamiel pasteurizado de planta piloto o industrial

\*Promedio muestras analizadas, <sup>•</sup>g/100mL; <sup>▼</sup>mg/100mL; <sup>▲</sup>µg/100mL; nd no detectado



## **Normatividad: aguamiel y pulque**

La Dirección General de Normas de la Secretaría de Economía en la NMX-V-022-1972 define el aguamiel como un líquido traslucido, amarillento, utilizado principalmente como sustrato para la elaboración del pulque, y reconoce dos tipos de aguamiel; el tipo I o *neutle*, de mayor calidad con respecto al tipo II, con una concentración mayor de proteínas y azúcares, con un pH cercano a la neutralidad, y que es utilizado en la producción pulque semilla y pulque pie de punta o cuba; y el aguamiel tipo II o aguamiel ácido o *tlachique*, de menor calidad, empleado para elaborar pulque comercial.

Así mismo, la NMX-V-037-1972, define al pulque como el líquido obtenido de la fermentación alcohólica de aguamiel. Especifica dos tipos de pulque: el tipo I, que corresponde al pulque semilla y al pulque de punta o cuba, refiriéndose al producto de las primeras tinajas de fermentación en la elaboración de pulque, y que se emplea como inóculo para la elaboración del pulque tipo II o pulque comercial. La diferencia entre ambos tipos de pulque es su contenido alcohólico, que para el tipo I de 6.0-9.0%, y de 4.0-6.0% para el tipo II.

## **Estudios microbianos del pulque**

Los primeros estudios realizados en el pulque fueron históricos, sociales, étnicos y médicos, y fue en el siglo XIX que se iniciaron los estudios microbianos, siendo el primero el realizado por Río de la Loza, quien en 1864 observó al microscopio una muestra de pulque y distinguió corpúsculos albuminoides, que probablemente correspondían a bacterias y levaduras. Posteriormente, en 1870 Barragán aisló por primera vez una levadura, a la que identificó como *Cryptococcus* (Lappe-Oliveras y Herrera-Suárez, 2014).

Después de los estudios de Río de la Loza y Barragán muchos investigadores tanto nacionales como extranjeros han realizado diversas investigaciones para determinar la diversidad microbiana presente en el pulque. Actualmente los

microorganismos que han sido identificados en esta bebida utilizando técnicas dependientes e independientes del cultivo son los que se enlistan en la Tabla 2.

La mayoría de estos microorganismos han sido aislados de diferentes muestras de pulque, de diversas localidades, lo que demuestra una uniformidad en la distribución de los microorganismos.

Sin embargo, en estudios más recientes en lo que se utilizaron técnicas moleculares independientes del cultivo, fue posible identificar a microorganismos no cultivables, algunos de los cuales probablemente corresponden a nuevas especies, que forman parte de la compleja y diversa microbiota del pulque (Escalante *et al.*, 2004, Lappe-Oliveras y Herrera-Suárez, 2014).

### **Dinámica microbiana, cambios fisicoquímicos y químicos durante la fermentación del aguamiel**

En un inicio el aguamiel tiene un pH cercano a la neutralidad; la cuenta bacteriana está en un rango de  $80 \times 10^7$ - $15 \times 10^8$  UFC/mL predominando sobre las levaduras ( $30$ - $60 \times 10^5$  UFC/mL). Conforme avanza la fermentación la cuenta de levaduras se incrementa a  $25$ - $30 \times 10^7$  UFC/mL siendo ésta ligeramente más alta que la de las bacterias ( $10$ - $20 \times 10^7$  UFC/mL); el pH desciende (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

La viscosidad característica del pulque se ha asociado a polisacáridos extracelulares como las dextranas producidas por *Leuconostoc mesenteroides*, sin embargo la viscosidad puede deberse también a la presencia de levanas, agavinas e inulinas producidas durante la fermentación por diversas bacterias (*Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Z. mobilis* (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Escalante *et al.*, 2012).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) producen ácido láctico y etanol, además de ácidos grasos, ésteres, ácidos orgánicos y alcoholes superiores como metabolitos secundarios. *Zymomonas mobilis* ssp. *mobilis* sintetiza a partir de glucosa y

fructosa, etanol, ácido láctico, acetaldehído, acetil metil carbinol, gomas, acetato, acetona, glicerol y ácido acético (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Escalante *et al.*, 2012).

Las levaduras producen etanol, aminoácidos esenciales, vitaminas y compuestos del sabor (ésteres, alcoholes, aldehídos) que dan al pulque sus características sensoriales distintivas. Las levaduras no-*Saccharomyces* se desarrollan en las primeras etapas de fermentación, para después ser sustituidas por las tolerantes a etanol es decir las especies de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Escalante *et al.*, 2012).

Durante la fermentación del aguamiel se observan una serie de cambios:

1. Al adicionar la semilla al aguamiel el pH disminuye de 7.5 a 4.5, y puede reducirse hasta 4.1 al final de la fermentación.
2. La temperatura se incrementa debido a la actividad microbiana.
3. La concentración de etanol puede alcanzar de 4-6 %, creando las condiciones adecuadas para el desarrollo de microorganismos resistentes al etanol o alcohológenos, los que al principio de la fermentación se encuentran en una cuenta baja o aparentemente inexistentes.
4. Se producen ácido láctico y acético como resultado del metabolismo de bacterias ácido lácticas (BAL) (*Leuconostoc* spp. y *Lactobacillos* homo y heterofermentativos) y bacterias acéticas (BA) (*Acetobacter* spp., *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter* spp., *Gluconobacter oxidans*, *Komagataeibacter xylinus*, *Gluconobacter xylinus*, *Pseudmonas* spp., entre otras).
5. Los azúcares pueden ser transformados no sólo en etanol sino en otros metabolitos secundarios como, aminoácidos esenciales, vitaminas y compuestos del sabor producidos por de levaduras no-*Saccharomyces*, *Saccharomyces* y de *Z. mobilis*.
6. Además *Leuconostoc* spp. y *Z. mobilis* sintetizan agentes de viscosidad como dextranas, fructanos, levanos, agavinas e inulinas (Ramírez *et al.*, 2004; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Escalante *et al.*, 2012).

**Tabla 2. Microorganismos identificados en pulque hasta la fecha**

Nivel Taxonómico	Especie
<b>Bacterias. Reino Monera</b>	
<b>Bacterias lácticas</b>	
<i>Phylum firmicutes</i> Clase Bacilli Orden Lactobacillales Familia Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Lactobacillus acetotolerans</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus leichmanii</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
Familia Streptococcaceae	<i>Lactococcus lactis</i> sbsp <i>lactis</i> , <i>Streptococcus</i> sp.
Familia Leuconostocaceae	<i>Leuconostoc spp.</i> , <i>Leuconostoc citreum</i> , <i>Leuconostoc durionis</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Leuconostoc kimchi</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Mesenteroides</i>
Orden Bacillales Familia Bacillaceae	<i>Bacillus spp.</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus simplex</i>
<i>Phylum Actinobacteria</i> Clase Actinobacteria Orden Micrococcales Familia Micrococcaceae	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Micrococcus candidus</i> , <i>Kocuria rosea</i>
Familia Microbacteriaceae	<i>Microbacterium arborescens</i>
Familia Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas spp.</i>
<i>Phylum Proteobacteria</i> Clase $\alpha$ Orden Sphingomonadales Familia Sphingomonadaceae	<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>Mobilis</i>
<b>Bacterias acéticas</b>	
Orden Rhodospirillales Familia Acetobacteraceae	<i>Acetobacter spp.</i> , <i>Acetobacter aceti</i> , <i>Acetobacter malorum</i> , <i>Acetobacter redioresistens</i> , <i>Gluconobacter spp.</i> , <i>Gluconobacter asai</i> , <i>Gluconobacter orientalis</i> , <i>Gluconobacter oxidans</i> , <i>Komagataeibacter xylinus</i> , <i>Gluconobacter xylinus</i>
Phylum Protobacteria Clase $\beta$ Proteobacteria Orden Burkholderiales Familia Comamonadaceae Genera <i>Incertae sedis</i>	<i>Sphaerotilus</i>
Clase $\gamma$ Protobacteria Orden Pseudomonadales Familia Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>Chryseomonas luteola</i>
Familia Enterobacteraceae	<i>Enterobacter spp.</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Erwinia agglomerans</i> , <i>Erwinia rhapontici</i> , <i>Klebsiella neumoniae</i> , <i>Kluyvera ascorbata</i>

**Tabla 2.Continuación**

<i>Phylum Bacteroidetes</i> Clase Flavobacteria Orden Flavobacteriales Familia Flavobacteriaceae	<i>Flavobacterium oryzihabitans</i>
Clase Bacteroidetes Orden Bacteroidales Familia Bacteroidaceae	<i>Cytophaga johnsonae</i>
<b>Reino fungi</b>	
<b>Levaduras</b>	
<i>Phylum Ascomycota</i> Subphylum Saccharomycotina Clase Saccharomycetes Subclase Saccharomycetidae Orden Saccharomycetales Familia Debaryomcetaceae	<i>Meyerozyma guilliermondii</i> <i>Priceomyces carsonii</i>
Familia Dipodascaceae	<i>Galactomyces candidus</i>
Familia Metschnikowiaceae	<i>Clavispora lusitaniae</i>
Familia Pichiaceae	<i>Pichia</i> spp., <i>Pichia membranifaciens</i>
Familia Saccharomycetaceae	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces</i> spp., <i>Saccharomyces bayanus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i>
Familia Saccharomycodaceae	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
Familia Incertae sedis	<i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida rugopelliculosa</i> , <i>Candida rugosa</i>
<i>Phylum Basidiomycota</i> Subphylum Puccioniomycotina Clase Microbotryomycetes subclase Incertae sedis Orden Sporidiobolales Familia Incertae sedis	<i>Rhodotorula</i> spp. <i>Rhodotorula mucilaginoso</i>
<b>Mohos</b>	
<i>Phylum Zygomycota</i> subphylum Mucormycotina Clase Incerta sedis subclase Incertae sedis Orden Mucorales Familia Rhizopodaceae	<i>Rhizopus stolonifer</i>
<i>Phylum Ascomycota</i> Subphylum Pezizmycotina, Clase Eurotiomycetales Subclase Eurotiomycetidae Orden Eutoriales Familia Trichocomaceae	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Aspergillus glaucus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Penicillium glaucum</i>

Fuentes (Lappe Oliveras y Herrera Suárez, 2014).

Ver anexo 1

## **Composición química del pulque**

Los primeros estudios químicos fueron realizados por Río de la Loza en 1864, quien estableció que los principales componentes del pulque eran sacarosa, gomas y cenizas. En años recientes el estudio químico del pulque y aguamiel se ha enfocado en su contenido de vitaminas y minerales y su importancia como alimento funcional, ya que se ha observado que es un alimento con gran valor nutritivo (Lappe-Oliveras y Ulloa, 1993).

En la Tabla 3 se muestra la composición química de diversas muestras de pulque de localidades y de épocas distintas.

## **Valor medicinal, nutrimental, prebiótico y probiótico del pulque**

En el México prehispánico, el pulque era utilizado, ya fuese solo o mezclado con alguna semilla o planta, para curar diversas enfermedades, quedando su uso en la medicina tradicional, sin evidencia científica que lo avale. Era utilizado para tratar diarreas, trastornos gastrointestinales, tifo, clorosis, anemia, tuberculosis, para sanar dolor de pecho, estómago, cabeza y espalda, dispepsia, gastralgia, anorexia, astenia, vértigo, infecciones urinarias, diuresis, pitiriasis y sífilis; también se administraba caliente para curar bronquitis, tos y facilitar el esputo (Escalante *et al.*, 2012; Wachter-Rodarte *et al.*, 2014).

Desde el punto de vista nutricional el pulque es considerado un alimento saludable debido a su contenido de vitaminas del complejo B, vitamina C, minerales y aminoácidos, en particular de lisina y triptófano, por lo que ayuda a coadyuvar las deficiencias nutricionales de la dieta mexicana basada en maíz. Disminuye las deficiencias de ferritina y hemoglobina, ya que mejora la absorción de hierro en presencia del ácido ascórbico (Escalante *et al.*, 2012). Se ha demostrado que el consumo moderado de pulque, durante la gestación y lactancia, ayuda al desarrollo psicomotor del niño, debido a su contenido de vitaminas y de triptófano, el que es precursor de algunas neuro-hormonas (Chávez *et al.*, 1998).

**Tabla 3. Composición química de muestras de pulque tradicional, comercial e industrializado.**

Compuesto	Pulque <sup>a*</sup>	Tlachique <sup>a</sup>	Pulque <sup>b*</sup>	Envasado <sup>c*</sup>	Tradicional <sup>d</sup>	Planta piloto <sup>d*</sup>	Néctar del Razo <sup>e*</sup>
°Brix						6	
pH						4.6	
Proteína <sup>*</sup>	0.41	0.2	0.37		0.29	0.17	0.37
Cenizas <sup>*</sup>	0.2	0.2	0.24			0.29	0.24
Carbohidratos <sup>*</sup>							
Sacarosa						0.42	
Fructosa							
Glucosa						0.06	
Fructooligosacáridos							
Minerales <sup>▼</sup>							
Calcio	10.5	10	11	11.5			11
Fósforo	8	5	6	34.5			6
Hierro	0.7	-	0.7	0.65			0.7
Vitaminas <sup>▼</sup>							
Tiamina	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
Riboflavina	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03
Niacina	0.33	0.15	0.35	0.42	0.28	0.37	0.35
Piridoxina					0.02	0.03	
Biotina <sup>*</sup>					0.03	0.02	
Ácido ascórbico	5.7	4.6	5.1	2.7			5.1
Aminoácidos <sup>▼</sup>							
Lisina				16.2	3	7.5	12.0*
Triptófano				2.7	2.5	9	6.0*
Histidina				4.7			
Fenilalanina				11.2	4	10	
Leucina				10.5	6.5	7.5	
Treonina				6.4	4	6	
Metionina				0.7	1.5	5	
Valina				6.6	3	5	
Arginina				10.9	2.5	7.5	

Fuentes: <sup>a</sup>Cravioto *et al.*, 1951, <sup>b</sup>Instituto de Nutriología, 1952 *apud* Loyola Montemayor, 1956, <sup>c</sup>Massieu *et al.*, 1959, <sup>d</sup>Sánchez-Marroquín, 1977, <sup>e</sup>Ramírez *et al.*, 2004 (*Apud* Wachter-Rodarte *et al.*, 2014)

\*Promedio muestras analizadas, °g/100mL; ▼mg/100mL; \*µg/100mL.

En aguamiel y en pulque se ha logrado observar acción probiótica de algunos de sus microorganismos como las BAL *L. acidophilus*, *L. mesenteroides* (Escalante *et al.*, 2012) y *Z. mobilis*, las cuales ejercen una acción antagónica hacia bacterias y hongos, contrarrestando desequilibrios intestinales (Godoy *et al.*, 2003). Además, en ambos se ha detectado acción prebiótica debido a la presencia de polímeros como la inulina y fructo- oligosacáridos (Escalante *et al.*, 2012).

## Componentes de sabor

Durante la fermentación del pulque se producen metabolitos secundarios que contribuyen al sabor final de la bebida como son ésteres (20-30 mg/mL), aldehídos (2.5 mg/100 mL) y alcoholes superiores (80-100 mg/mL) (Escalante *et al.*, 2012). De León-Rodríguez *et al.* (2008) observaron que el 3-metil-tio-1-propanol y el ácido nonanoico son compuestos propios del pulque, por lo que podrían considerarse marcadores para esta bebida.

## Industrialización del pulque

En 1960, el gobierno trató de organizar la industria del maguey creando el Patronato del Maguey, con el fin de potencializarlo y producir pulque de calidad. En esa década se inauguró una planta industrializadora de pulque, en Santa María Tecajete, Hidalgo, que producía pulque a partir de aguamiel pasteurizado e inoculado con 5-10% v/v de un cultivo mixto de *Lactobacillus* spp. homofermentativos, *Z. mobilis* ssp. *mobilis*, *Leuconostoc* sp. y *S. cerevisiae*, el que fue comercializado con el nombre de “Magueyin”. Sin embargo el pulque industrializado al no tener las mismas cualidades del pulque tradicional no tuvo éxito, al igual que otras marcas industrializadas que habían sido comercializadas en décadas anteriores como: Crespomel (Pat. Mex-1933), Miel-mex (Pat. Mex-1945), Jícara (Pat. Mex-1954) (Escalante *et al.*, 2012; Lappe *et al.*, 2008; Lappe Oliveras y Herrera Suárez, 2014).

En la actualidad el pulque se produce a pequeña escala industrial, a partir de aguamiel pasteurizando o microfiltrado, el cual es inoculado con un cultivo mixto de BAL, *Z. mobilis* ssp. *mobilis* y *S. cerevisiae*, controlando la temperatura entre 20 y 25 °C; para después del proceso de fermentación proceder a enlatarlo o envasarlo. El pulque industrializado se comercializa natural o curado con diversos ingredientes como cereales, frutas, nueces, entre otros. Es importante mencionar que el pulque industrializado no tiene las mismas características organolépticas, físicas y químicas que el pulque tradicional, por lo que no es del todo aceptado por



los consumidores habituales (García-Garibay y López-Munguía, 2004; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008).

Actualmente existen diversas compañías productoras de pulque procesado que venden su producto en México y alrededor del mundo como son: Procesadora de Pulque S.A., Productos Naturales de Agave S.A. de C.V., Pulmex en Tlaxcala, Desarrollo Agropecuario del Altiplano, Tecnología e Innovación en Pulque Industrial S.A. de C.V. y Torre Grande INC en Puebla; y Pulquemex S.A. de C.V en Hidalgo (Lappe Oliveras y Herrera Suárez, 2014).

## **Justificación**

La tradición de elaboración y consumo del pulque ha persistido hasta la actualidad, sin embargo las investigaciones que se han realizado han sido de carácter médico, histórico, social y étnico, y pocas investigaciones han abordado la identificación de levaduras en el pulque como producto final.

Sólo en el estudio realizado por Herrera-Solórzano (2008), se determinó y caracterizó la microbiota presente en aguamiel y en algunas de las fases de fermentación del pulque, no existía un estudio sobre la sucesión de la micobiota durante todas las etapas de elaboración y fermentación de esta bebida.

El conocimiento de la microbiota presente en la elaboración y fermentación de pulque ayudará a estandarizar el proceso, con la finalidad de obtener un producto con características y calidad homogéneas, además de entender la importancia de los microorganismos en la fermentación y como componente del pulque.

Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como finalidad determinar la diversidad de levaduras en muestras de las diferentes etapas de elaboración y fermentación durante la producción comercial de pulque elaborado en la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala, con el fin de contribuir al conocimiento y a la sucesión de la compleja micobiota que participa en la fermentación de la bebida.

## **Objetivo**

### **Objetivo general**

- Caracterización polifásica de las levaduras aisladas durante la elaboración y fermentación de pulque comercial producido en la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala.

### **Objetivos particulares**

- Aislamiento, cuantificación, purificación y conservación a mediano y largo plazo de las levaduras presentes en muestras obtenidas de las diferentes etapas de elaboración y fermentación del pulque de la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala.
- Identificación fenotípica de los aislados de levaduras obtenidos en el presente estudio.
- Caracterización genotípica de las levaduras por análisis de la secuencia de bases del dominio D1/D2 de la LSU del gen 26S ADNr.

## Materiales y métodos

### Diagrama de metodología experimental

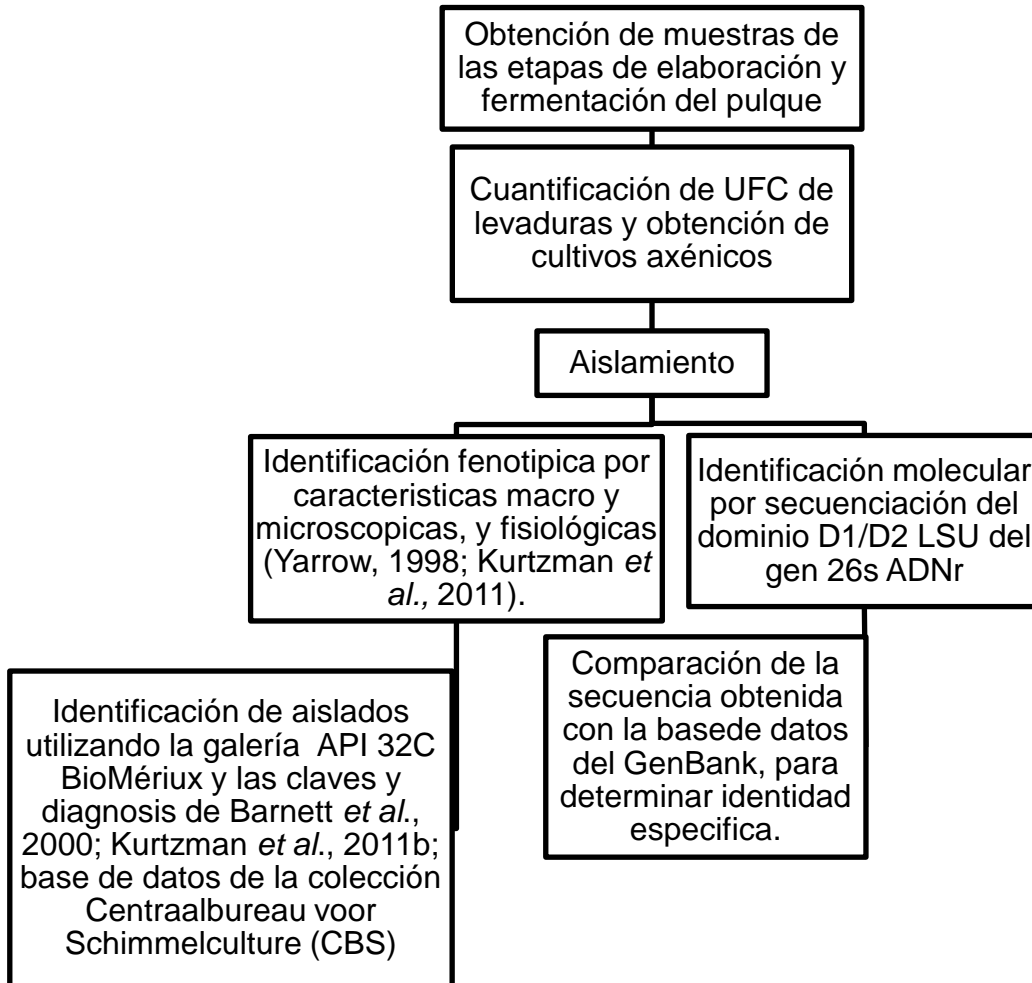


Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología seguida para el aislamiento, cuantificación e identificación de las levaduras presentes durante el proceso de elaboración y fermentación de pulque comercial elaborado en la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala.

## Obtención de las muestras

Las muestras estudiadas en el presente trabajo se obtuvieron en febrero de 2011, en la Hacienda Xochuca ubicada en el municipio de Tlaxco (altitud 2540 msnm, latitud 19°36'53"N, longitud 98°07'11"O), Tlaxcala. Se obtuvieron 19 muestras de 200 mL de las diferentes etapas de elaboración y fermentación de pulque comercial, cuyo proceso de elaboración es semejante al tradicional ya descrito e ilustrado. Las muestras de aguamiel se extrajeron a las 8 am y 4 pm de magueyes pulqueros de la especie *A. salmiana*. Cada una de las muestras se dividió en dos fracciones de 100 mL; una de ellas adicionada con 30% (v/v) de glicerol, con el fin de crioconservar la muestra a -78°C y ser utilizada para otro tipo de estudios. La otra muestra se empleó para realizar los aislamientos microbianos *in situ* y para análisis químicos. Tabla 4.

**Tabla 4. Muestras obtenidas durante la elaboración comercial de pulque en la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala**

No. de muestra	Tipo de muestra	No. de muestra	Tipo de muestra
1	Aguamiel del cajete	11	2ª fermentación t2' (2 h 30 min)
2	Aguamiel del acocote	12	2ª fermentación t3' (4 h 30 min)
3	Aguamiel de la castaña	13	2ª fermentación t4' (7 h 30 min)
4	Semilla madre (tina de cuero)	14	3ª fermentación t0''
5	Semilla pie de punta	15	3ª fermentación t1'' (15 h)
6	1ª fermentación t0 (aguamiel + semilla)	16	4ª fermentación t0'''
7	1ª fermentación t1 (1 h)	17	Agua de lavado de la tina
8	1ª fermentación t2 (16 h)	18	Hisopo con muestra del sedimento de la tina
9	2ª fermentación t0	19	Hisopo con muestra del cajete
10	2ª fermentación t1' (30 min)		

**Tabla 5. Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas consideradas para la identificación de las levaduras de acuerdo con la metodología de Yarrow (1998), Kurtzman *et al.* (2011b).**

<b>I. Características morfológicas</b>	<b>II. Características fisiológicas y bioquímicas</b>
<p>A. Macromorfología o características culturales de los aislamientos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Formación de película o de anillo en medio líquido GELP</li> <li>2. Crecimiento en medio sólido GELPA, desarrollo de colonia gigante para determinar (color, forma, elevación, superficie, brillo, textura y borde)</li> </ol> <p>B. Micromorfología</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Características de las células vegetativas               <ol style="list-style-type: none"> <li>a) Morfología en medio sólido GELPA</li> <li>b) Formación de pseudomicelio y micelio verdadero en placa de Dalmau en HMA</li> </ol> </li> <li>2. Características de la reproducción asexual o vegetativa en los medios GELPA</li> <li>3. Características de la reproducción sexual               <ol style="list-style-type: none"> <li>a) Proceso de formación de ascas y ascosporas</li> <li>b) Características de las ascas y ascosporas en McClary A</li> </ol> </li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Utilización de compuestos de carbono           <ol style="list-style-type: none"> <li>a) Fermentación de siete compuestos de carbono</li> <li>b) Asimilación de 37 compuestos de carbono</li> </ol> </li> <li>2. Asimilación de compuestos de nitrógeno</li> <li>3. Pruebas de tolerancia           <ol style="list-style-type: none"> <li>a) 50% glucosa</li> <li>b) 10% NaCl 5% glucosa</li> </ol> </li> <li>4. Temperatura máxima de crecimiento (25, 30, 37°C en medio GELP)</li> <li>5. Reacción al azul de diazonio (DBB)</li> <li>6. Hidrólisis de Urea</li> <li>7. Licuefacción de gelatina</li> </ol>

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; **HMA:** Harina de maíz 40 g, agar 20 g, agua 1000 mL; **McClary A (McClary agar):** 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.

## **Aislamiento y cuantificación de levaduras y obtención de cultivos axénicos**

Las muestras sin glicerol se procesaron *in situ*; de cada una se tomaron 10 mL los que se diluyeron en 90 mL de agua peptonada estéril (peptona 0.1%, NaCl 0.85%, agar 0.02%, pH 7.2), la muestra se homogenizó y a partir de ésta se realizaron diluciones decimales seriadas hasta  $1/10^9$  (NOM-110-SSA1-1994). Se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ L de diluciones seleccionadas que se inocularon por el método de extensión de superficie en placas de medio nutritivo selectivo de Wallenstein (WLA) (Alpha Biosciences, Baltimore, MD, EUA), adicionado con 0.4 g de cloranfenicol (Sigma, St. Louis, MO EUA) por triplicado; las placas se incubaron a temperatura ambiente en obscuridad, y se observaron diariamente por dos semanas para cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) y aislar las colonias de levaduras con morfología colonial diferente (color, forma, elevación, superficie, brillo, textura y borde), las que se resembraron en el mismo medio de cultivo por el método estrías cruzada con el fin de verificar la pureza del cultivo, el que se confirmó por observación en el microscopio. Los cultivos axénicos se resembraron en el medio de WLA y en GELPA y se incubaron a 27° C por varios días, con el fin de observar su macro y micromorfología (Kurtzman *et al.*, 2011b).

## **Conservación de los aislados a mediano y largo plazo**

### **Conservación a mediano plazo**

A partir de los cultivos axénicos sembrados en medio GELPA, se cosecharon las células, las que se transfirieron a tubos con 9 mL de agua estéril, por duplicado, y se conservaron en refrigeración a 4 °C.

### **Conservación a largo plazo**

A partir de los cultivos puros sembrados en medio GELPA, se cosecharon las células, las que se transfirieron a crioviales de 2 mL que contenían 1.5 mL de medio GELP con 30%, glicerol; se guardaron 3 crioviales por aislado y se conservaron en el ultracongelador a -78 °C.

## **Identificación fenotípica**

La identificación fenotípica se realizó conforme los lineamientos de la metodología de Yarrow (1998), Kurtzman *et al.* (2011b). Tabla 5.

## **Determinación de las características macro y microscópicas de los aislados**

Las características macroscópicas de la colonia gigante (color, elevación, brillo, textura y borde) se determinaron en los medios de WLA y GELPA; sus características microscópicas y de reproducción asexual, como forma y tamaño de las células, tipo de gemación, formación de blastosporas, presencia de película y de anillo ascendente, se observaron en los medios de GELPA y GELP y la formación de micelio y pseudomicelio en HMA. De acuerdo con estas características los aislados se agruparon, y se procedió a realizar las pruebas de fermentación de todas ellas.

## **Reproducción sexual.**

Con el fin de determinar la presencia de reproducción sexual en los aislados se procedió a inocularlos en el medio de McClary agar, después de varias semanas de incubación a 27° C se hicieron preparaciones en fresco con KOH al 10%, las que se observaron en el microscopio óptico con el fin de determinar la presencia o ausencia de ascas o basidios en los cultivos (Kurtzman *et al.*, 2011b).

## **Pruebas fisiológicas**

### **Fermentación de compuestos de carbono**

Se emplearon siete fuentes de carbono: glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, rafinosa y fructosa (Yarrow, 1998; Kurtzman *et al.*, 2011b).



## **Asimilación de compuestos de carbono**

Con el fin de agilizar la realización de estas pruebas se utilizaron las galerías API 32C marca BioMérieux (Marcy-l'Etoile, Francia), que contienen 28 de las fuentes de carbono requeridas en la metodologías en las monografías de (Barnett *et al.*, 2000; Kurtzman *et al.*, 2011b). El resto (9) de las pruebas de asimilación de fuentes de carbono se realizó de la forma convencional (arbutina, inulina, salicina, metanol, etanol, ribitol, succinato, galactitol, D-gluconolactona). Según la metodología de Yarrow, 1998; Kurtzman *et al.*, 2011b.

## **Asimilación de compuestos de nitrógeno**

Se realizó utilizando ocho fuentes de nitrógeno: nitrato de potasio, nitrito de sodio, hidrocloreuro de etilamina, L-lisina, creatina, creatinina, hidrocloreuro de cadaverina, D-glucosamina (Yarrow, 1998; Kurtzman *et al.*, 2011b).

## **Identificación genotípica**

### **Reacción de amplificación del dominio D1/D2 LSU del gen 26S ADNr mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

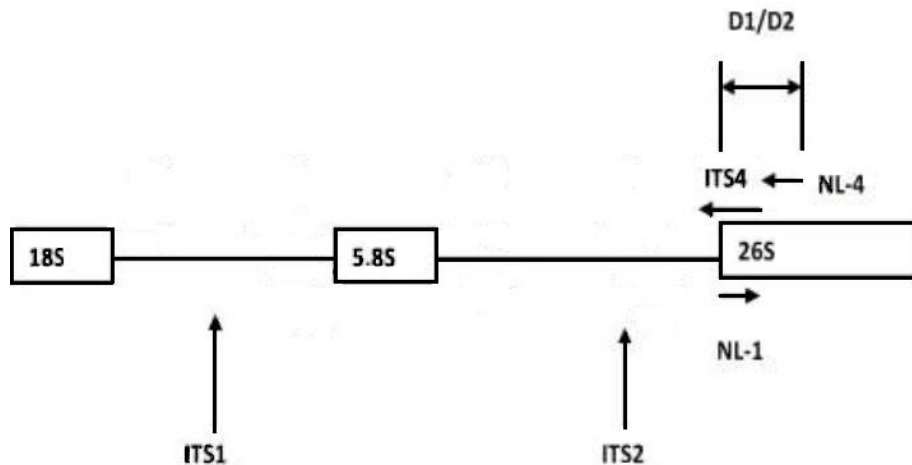
La reacción de amplificación del dominio D1/D2 LSU del gen 26S ADNr (Fig. 5) se hizo con células completas recolectadas, por la técnica de picadura, directamente del cultivo crecido en medio del GELPA por 24 h (Lachance, 1988), y se realizó en un volumen de reacción de 25  $\mu$ L, que contenía 12.5  $\mu$ L de GoTaq® Master Mix (Taq polimerasa, dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y buffer) (Promega, Madison, WI, EUA), 2.5  $\mu$ L de cada uno de los iniciadores NL1 Forward (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG'3) y NL4 Reversa (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG'3) (O'Donnell, 1993) y 7.5  $\mu$ L de agua bidestilada libre de nucleasas (Promega, Madison, WI, EUA) (Tabla 6). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador modelo 2720 (Applied Biosystems, Singapore) siguiendo el siguiente programa: una etapa de desnaturalización inicial de 12 min a 95 °C seguida de 35 ciclos: 60s a 94 °C, 55 s a 52 °C, 120 s a 72 °C, y una extensión final de 8 min a 72 °C (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999). Tabla 7.

**Tabla 6. Reactivos y cantidades utilizados en la reacción de amplificación del dominio D1/D2 LSU del gen 26S ADNr.**

	Reactivos	Reacción (µL)
GoTaq® Green Master Mix	Buffer PCR	12.5
	MgCl <sub>2</sub>	
	dNTP mix	
	Taq	
	Primer NL1 (10 pmol/ µL)	2.5
	Primer NL4 (10 pmol/ µL)	2.5
	AND	
	H <sub>2</sub> O	7.5
		Vol total= 25

**Tabla 7. Condiciones de la reacción de PCR para la amplificación del dominio D1/D2 LSU del gen 26S ADNr.**

Etapa	Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95	12 min
Desnaturalización	35	94	60s
Alineamiento		52	55s
Extensión		72	120s
Extensión final	1	72	8 min



**Figura 5. Ubicación de la región D1/D2 del gen 26 S ADNr amplificada con los iniciadores NL1 y NL4 (Makene, 2014).**

El producto de la PCR se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con gel red (Biotium Hayward, CA, EUA) en 1X buffer TBE (Tris-ácido bórico-EDTA), que se corrió a 90 V durante 50 min, y se visualizó en un transiluminador UV (UVP Upland, CA, EUA). Las imágenes fueron digitalizadas y procesadas con el programa UVP Bioluminescence Imaging Systems (UVP Upland, CA, EUA).

### **Reacción de secuenciación y análisis de las secuencias**

La reacción de secuenciación se realizó en el Laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Biología UNAM, usando el método de reacción de terminación de cadena (Sanger *et al.*, 1977) con el kit Big Dye terminador V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Las secuencias se editaron con el programa Bio Edit v 7.0.5 (Hall, 2007), y se compararon con las secuencias de la base de datos GenBank utilizando el programa BLASTN en línea (Altschul *et al.*, 1997), [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) y se depositaron. Los números de acceso de cada una de las secuencias depositadas se presentan en la sección de resultados.

## Resultados y discusión

### Aislamientos y cuantificación de levaduras

Las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) cuantificadas en cada una de las 19 muestras estudiadas, obtenidas de las distintas etapas del proceso de elaboración y fermentación del pulque comercial de la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala, se presentan en la Tabla 6.

La cantidad de UFC/mL presentes en aguamiel acumulado en el cajete (**M1**) ( $42 \times 10^4$  UFC/mL) y en el extraído del acocote (**M2**) ( $55 \times 10^4$  UFC/mL) fue similar, y está dentro del rango reportado en estudios anteriores (Ruiz-Oronoz, 1953; Loyola-Montemayor, 1956); mientras que en el aguamiel obtenido de la castaña (**M3**) la cuenta fue mayor ( $26 \times 10^6$  UFC/mL); dicho incremento pudo deberse a una contaminación por microorganismos presentes en las paredes de la castaña, o a una contaminación durante el vaciado del aguamiel del acocote a la castaña, o al tiempo transcurrido durante el traslado desde el campo hasta el tinacal. Con este aguamiel se inició el proceso de fermentación continuo y al cual se adicionó el inóculo pulque pie de punta (**M5**), cuya carga microbiana fue  $70 \times 10^7$  UFC/mL; esta etapa fue considerada el t0 de la primera fermentación (**M6**) ( $35 \times 10^7$  UFC/mL).

Durante todo el proceso estudiado se alternaron fermentaciones cortas y largas, dependiendo del momento en que se añadía el aguamiel; si era por la mañana la fermentación era corta (< 8 h), y si era por la tarde la fermentación era larga (> 15h). En el t1 de fermentación (**M7**) la cuenta no aumentó con respecto al t0, ya que sólo había transcurrido 1 h ( $19 \times 10^7$  UFC/mL); para el t2 (**M8**) la microbiota aumentó a  $33 \times 10^{10}$  UFC/mL, como resultado de una fermentación larga de 16 horas, donde las levaduras aprovecharon los sustratos disponibles para su crecimiento y multiplicación.

**Tabla 8. Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de levaduras cuantificadas en las diferentes muestras obtenidas durante el proceso de elaboración y fermentación de pulque comercial en la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala.**

<b>Código de la muestra</b>	<b>Hora de toma de la muestra</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Dilución</b>	<b>UFC/mL</b>
<b>M1</b>		Aguamiel del cajete	$10^{-3}$	$42 \times 10^4$
<b>M2</b>		Aguamiel de acocote	$10^{-4}$	$55 \times 10^4$
<b>M3</b>	10:00 am	Aguamiel colectado de la castaña	$10^{-5}$	$26 \times 10^6$
<b>M4</b>		Semilla madre en tina de cuero pH 3.7	$10^{-8}$	$46 \times 10^9$
<b>M5</b>		Semilla o pulque pie de punta	$10^{-4}$	$70 \times 10^7$
<b>Procesos fermentativos</b>				
<b>1ª Fermentación</b>				
<b>M6</b>		(t0) aguamiel + pulque pie de punta	$10^{-6}$	$35 \times 10^7$
<b>M7</b>	5:00 pm	(t1) 1 h de fermentación	$10^{-6}$	$19 \times 10^7$
<b>M8</b>	9:00 am	(t2) 16 h de fermentación	$10^{-8}$	$33 \times 10^{10}$
<b>2ª Fermentación</b>				
<b>M9</b>	10:30 am	(t0') adición de aguamiel a la tina de fermentación	$10^{-7}$	$86 \times 10^9$
<b>M10</b>	11:00 am	(t1') 30 min de fermentación pH 3.5	$10^{-6}$	$72 \times 10^8$
<b>M11</b>	12:30 pm	(t2') 2 h 30 min de fermentación pH 3.5	$10^{-6}$	$63 \times 10^8$
<b>M12</b>	14:45 pm	(t3') 4 h 15 min de fermentación pH 3.5	$10^{-7}$	$19 \times 10^9$
<b>M13</b>	17:30 pm	(t4') 7 h de fermentación	$10^{-6}$	$60 \times 10^7$
<b>3ª Fermentación</b>				
<b>M14</b>	17:45 pm	(t0'') adición de aguamiel a la tina de fermentación	$10^{-4}$	$46 \times 10^6$
<b>M15</b>	8:45 am	(t1'') 15 h de fermentación	$10^{-7}$	$24 \times 10^9$
<b>4ª Fermentación</b>				
<b>M16</b>		(t0''') adición de aguamiel a la tina de fermentación	$10^{-7}$	$42 \times 10^8$
<b>Otras muestras</b>				
<b>M17</b>		Agua de lavado de la tina	$10^{-6}$	$28 \times 10^7$
<b>M18</b>		Hisopo con muestra del sedimento de la tina	ND	ND
<b>M19</b>		Hisopo con muestra del cajete	ND	$15 \times 10^3$

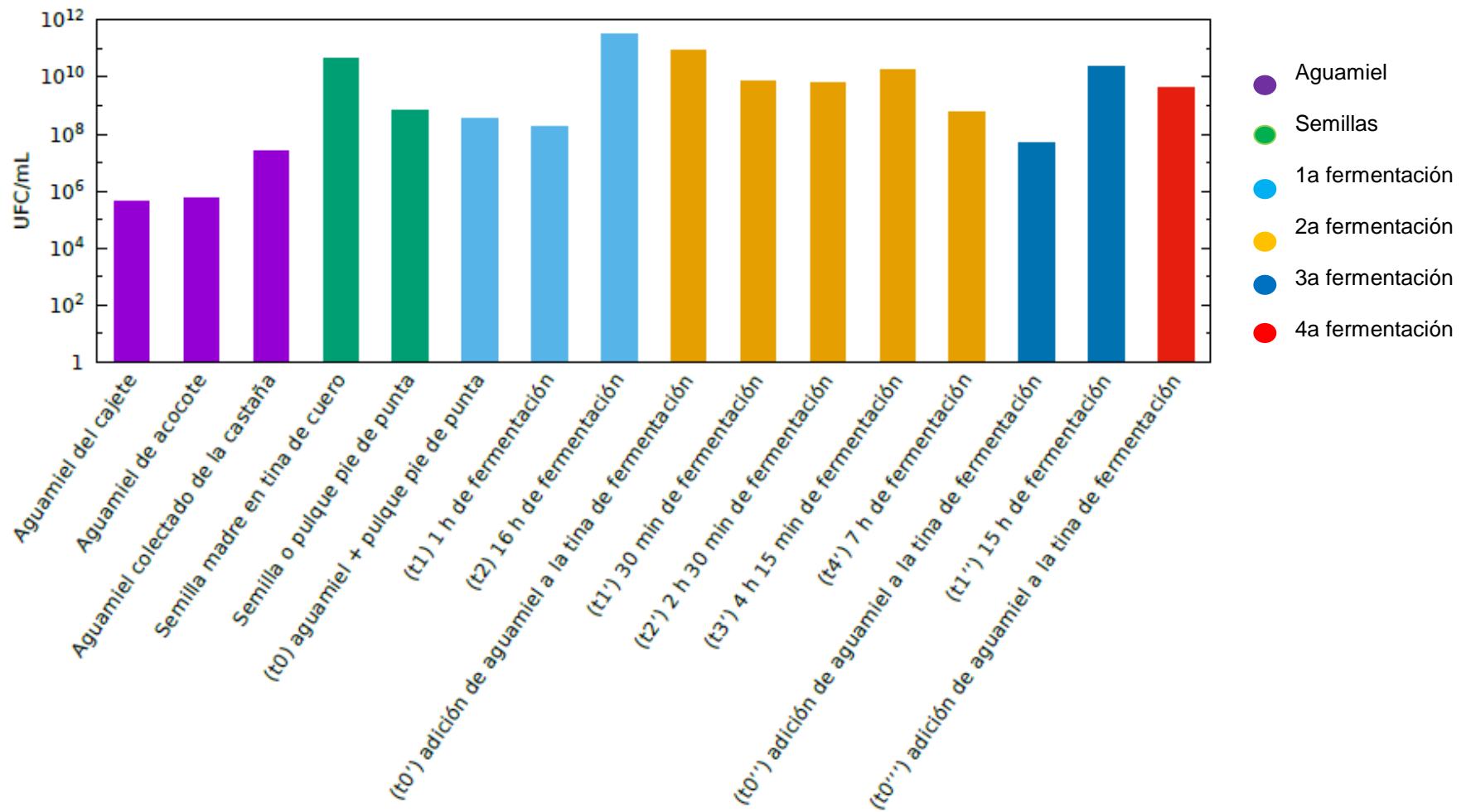


Figura 6. Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de levaduras cuantificadas en las diferentes muestras obtenidas durante el proceso de elaboración y fermentación de pulque comercial en la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala.

Al ser una fermentación continua, se agregó más aguamiel con el fin de proveer de más nutrientes a los microorganismos, por lo que se consideró el inicio de una nueva fermentación t0' (**M9**) y no es extraño que disminuyeran las UFC/mL a  $86 \times 10^9$ , ya que se realizó una dilución al añadir más aguamiel a la tina de fermentación. Sin embargo para el t1' (**M10**) y t'2 (**M11**) se obtuvieron cuentas de  $72 \times 10^8$  y  $63 \times 10^8$  respectivamente, lo que es contrario a lo esperado ya que en vez de aumentar las UFC estas disminuyeron; esto probablemente se debió a la posición en la que el mayordomo (persona encargada de la producción del pulque en el tinacal) tomó las muestra de la tina de fermentación, ya que si las tomó de la superficie, probablemente haya sido de aguamiel y no de pulque que por ser más denso estaría hacia el fondo de la tina; para t'3 (**M12**), que correspondió a 4 h y 15 min de fermentación las UFC/mL aumentaron a  $19 \times 10^9$ , sin embargo se esperaba que para el t4' (**M13**), al tener 7 h de fermentación, la carga aumentara pero esta disminuyó a  $60 \times 10^7$  UFC/mL, lo que probablemente pudo deberse a que la muestra fue tomada a las 17:30 h, tiempo en que las condiciones ambientales habían cambiado principalmente la temperatura, la que disminuyó de  $25^{\circ} \text{C}$  a  $15^{\circ} \text{C}$ , lo que probablemente afectó el crecimiento de levaduras y bacterias presentes, muchos de ellas mesófilas, o probablemente a que hubo una sucesión microbiana, la que ocasionó una disminución en la concentración de UFC/mL de levaduras y un aumento en la de otros microorganismos, sin embargo se necesita realizar el conteo de bacterias para afirmar esto.

Una vez tomada la muestra (**M13**) se agregó más aguamiel a la tina de fermentación, con el fin de iniciar una nueva fermentación; en el t0'' (**M14**) las UFC/mL cuantificadas disminuyeron  $46 \times 10^6$ , debido a la dilución, que transcurridas 15 h de fermentación t1'' (**M15**) aumentaron a  $24 \times 10^9$  UFC/mL.

Para la cuarta fermentación (**M16**), y una vez que se añadió más aguamiel fresco, la cuenta de UFC/mL bajo a  $42 \times 10^8$ , debido a la dilución realizada. Además, para este momento es probable que la concentración de ácidos orgánicos y alcohol hubiese aumentando, inhibiendo el crecimiento de algunas especies de levaduras.

La adición de aguamiel marca el inicio de una nueva fermentación, ya que se introduce una nueva fuente de nutrientes y una nueva micobiota, además se diluye la concentración de la micobiota presente en la tina de fermentación

### **Identificación de los aislados de levaduras**

De las 19 muestras obtenidas del proceso de elaboración y fermentación de pulque comercial de la Hacienda de Xochuca, Tlaxcala, procesadas *in situ*, se obtuvo un total de 240 aislados, los cuales según sus características fenotípicas se compilaron en 12 grupos.

Para diferenciar los distintos grupos se consideraron su morfología colonial, su micromorfología (forma de las células vegetativas y sexuales), así como los resultados de las pruebas de fermentación.

Para el grupo 1 que fue identificado como *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 7 k) la observación de células globosas, subglobosas y ovoides con gemación multipolar, presencia de pseudomicelio rudimentario o ausente, ascas no conjugadas, persistentes, con 1-4 ascoporas redondas, fermentación positiva de glucosa, galactosa, sacarosa, y fructosa fue esencial para agrupar 110 aislados de los cuales se seleccionaron 30 aislados para realizar el resto de las pruebas fisiológicas.

La observación de células ovoides y cilíndricas con gemación multipolar, pseudomicelio poco desarrollado a muy ramificado, ascas conjugadas o no conjugadas, dehiscentes con 1-4 ascoporas reniformes y la fermentación de glucosa, galactosa, sacarosa, lactosa, rafinosa y fructosa ayudó agrupar 46 aislados en el grupo 2 (*Kluyveromyces marxianus*) (Fig. 7 f) de los cuales a 41 cepas se les realizaron el resto de las pruebas.

Para el grupo 3, *Candida lusitanae* (Fig. 7 b) las características que se tomaron en consideración para incluir 27 aislados en este grupo fueron: células vegetativas



globosas, ovoides con gemación multipolar, pseudomicelio bien desarrollado, ausencia de ascas, y fermentación positiva de glucosa, sacarosa y fructosa; de los 27 aislados se seleccionaron 13 para completar el resto de las pruebas.

Para *Candida boidinii*, grupo 4, (Fig. 7 a) la presencia de células ovoides y globosas con gemación multipolar, presencia de pseudomicelio bien desarrollado, ausencia de ascas, y fermentación positiva de glucosa y fructosa permitieron considerar 24 aislados en este grupo, de los cuales siete se seleccionaron para realizar el resto de las pruebas.

Para el grupo 5, que correspondió a *Candida parapsilosis* (Fig. 7 c) las características distintivas que se tomaron en consideración para incluir 15 aislados en él fueron: presencia de células globosas, subglobosas, cilíndricas y ovoides con gemación multipolar, ausencia de ascas, presencia de pseudomicelio desarrollado, fermentación positiva de glucosa, galactosa, fructosa, de los 15 aislados a nueve se le realizaron el resto de las pruebas.

El grupo 6 de *Meyerozyma guilliermondii* (Fig. 7 g) se caracterizó por presentar células globosas y ovoides, con gemación multipolar, pseudomicelio desarrollado abundante y ausencia de ascas, fermentación positiva de glucosa, galactosa, sacarosa y fructosa, en él se agruparon cinco aislados a los que se les realizaron todas las pruebas adicionales.

Cuatro aislados presentaron células ovaladas y cilíndricas con gemación multipolar, pseudomicelio ausente, ascas conjugadas, persistentes, con 1-4 ascosporas redondas, y fermentación positiva de glucosa, galactosa, sacarosa y fructosa y a los que se les realizaron todas las pruebas adicionales, se agruparon en el grupo 7 que fue identificado como *Torulaspota delbrueckii* (Fig. 7 l).

En el grupo de *Candida sake* (grupo 8) se consideraron tres aislados, cuyas características distintivas fueron células globosas, subglobosas y ovoides, con

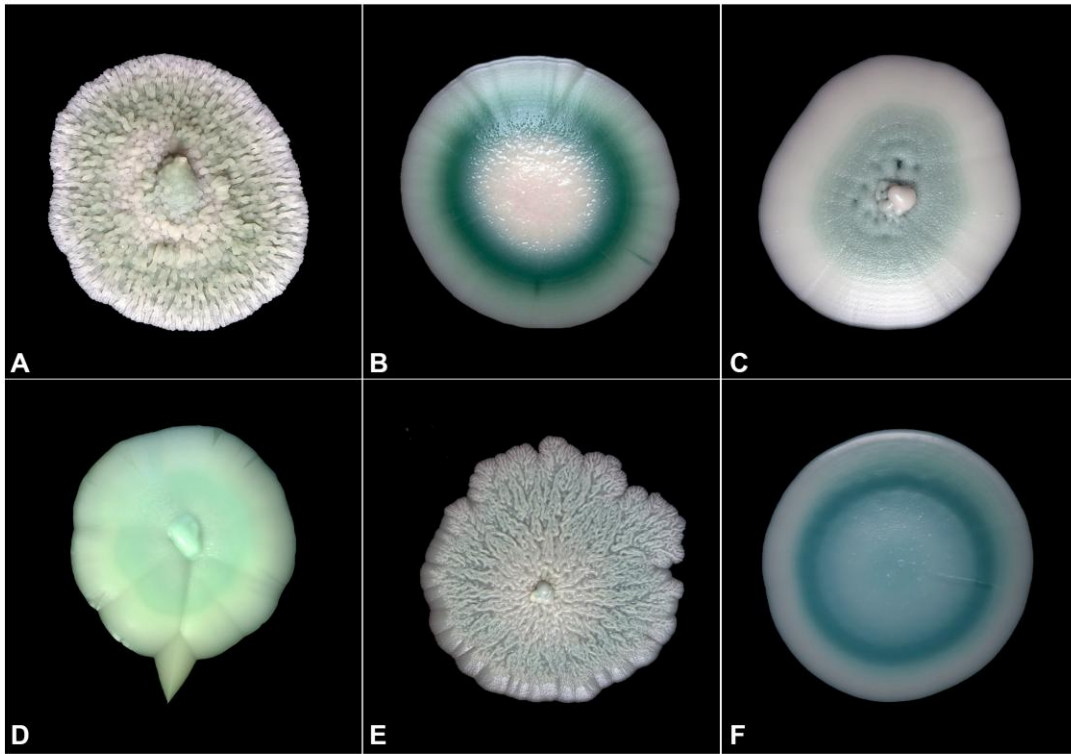
gemación multipolar, pseudomicelio con cadenas ramificadas y ausencia de ascas, fermentación positiva de glucosa, sacarosa y fructosa; a todos los aislados se les realizaron todas las pruebas adicionales.

Dos aislados que presentaron células globosas a subglobosas, ovoides, con pseudomicelio ausente o rudimentario, ascas conjugadas, persistentes, con 1-2 ascosporas redondas con pared verrugosa, y fermentación positiva de glucosa, sacarosa y fructosa se incluyeron en el grupo 9 de *Debaryomyces hansenii* (Fig. 7 e), a los dos aislados se les realizaron todas las pruebas.

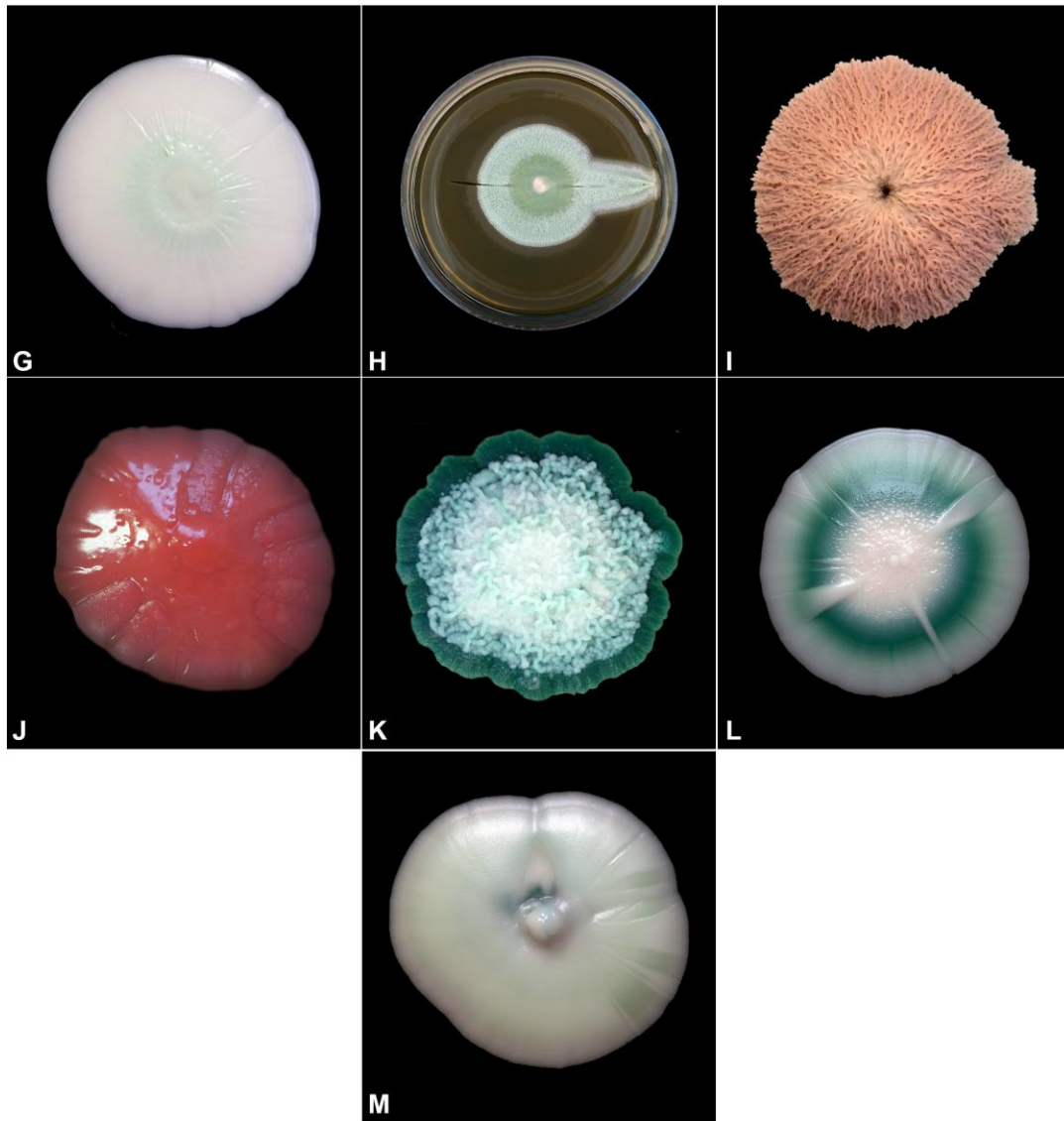
En el grupo de *Pichia membranifaciens* (grupo 10) (Fig. 7 h) se consideró un solo aislado que se caracterizó por presentar células globosas, subglobosas y ovaladas con gemación multipolar, pseudomicelio desarrollado, ascas no conjugadas, persistentes con ascosporas hemiesféricas (1-4), fermentación negativa.

El color de las colonias así como la presencia de células subglobosas, ovoides o elipsoidales, ausencia de pseudomicelio y ascas, y fermentación negativa determinó un nuevo grupo (11) que se identificó como *Rhodotorula mucilaginosa* (Fig. 7 j) con dos aislados, a los cuales se le realizaron el resto de las pruebas.

En el grupo 12, que se identificó como *Yamadazyma mexicana* (Fig. 7 m), se incluyó un aislado que se caracterizó por presentar células ovoides a cilíndricas, con abundante pseudomicelio desarrollado, fermentación positiva de glucosa, galactosa, sacarosa y fructosa y sin reproducción sexual.



**Figura 7. Colonias gigantes de las diferentes especies de levaduras identificadas en las distintas etapas de elaboración y fermentación de pulque comercial de la Hacienda Xochuca Tlaxco, Tlaxcala, sembradas en placas de medio WLA, incubadas por 1 mes a 27°C en oscuridad. a) *Candida boidinii*, b) *Candida lusitanae*, c) *Candida parapsilosis*, d) *Candida sake*, e) *Debaryomyces hansenii*, f) *Kluyveromyces marxianus*. Fotografías de Biól. C. Loyola Blanco (IBUNAM).**



**Figura 7. Colonias gigantes de las diferentes especies de levaduras identificadas en las distintas etapas de elaboración y fermentación de pulque comercial de la Hacienda Xochuca Tlaxco, Tlaxcala, sembradas en placas de medio WLA, incubadas por 1 mes a 27°C en **obscuridad**.**g) *Meyerozyma guilliermondii*, h) *Pichia membranifaciens*, i) *Pichia kudriavzevii*, j) *Rhodotorula mucilaginosa*, k) *Saccharomyces cerevisiae*, l) *Torulaspora delbrueckii*, m) *Yamadazyma mexicana*. Fotografías de Biól. C. Loyola Blanco (IBUNAM).

En la Tabla 9 se muestran las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de cada una de las especies identificadas correspondientes a los 13 grupos formados con los 240 aislados. Los resultados de todas las pruebas morfo fisiológicas realizadas se compararon con la base de datos de la colección Centraalbureau voor Schimmelculture (CBS) en línea, y conforme a los porcentajes de similitud arrojados se determinó si era necesario realizar la identificación genotípica con el fin de corroborar la identidad de aquellos aislados que presentaron un de similitud < 97 %). Del total de aislados 81 se identificaron por con las galerías Api 32 C y el sistema ApiLab (Tabla 10), 97 por sus características fenotípicas de acuerdo con las monografías de Barnett *et al.* (2000) y Kurtzman *et al.* (2011a), 22 por características morfológicas y pruebas de fermentación y 39 por identificación polifásica considerando tanto las características fenotípicas y como la secuencia del dominio D1/D2 LSU del 26S ADNr, comparando estos datos con la base del CBS (Tabla 11). Todas las secuencias obtenidas se depositaron en el GenBank, el número de acceso de cada una ellas se presentan en la Tabla 11.

De los 39 aislados cuya identidad se corroboró por secuenciación del dominio D1/D2 LSU del gen 26 ADNr, sólo en un aislado de *C. sake* se observó discrepancia, en su identidad, ya que por taxonomía polifásica se identificó como *Pichia kudriavzevii* (Fig. 7 i).

En la actualidad, con el fin de hacer una identificación certera de los las especies de levaduras esta se realiza de forma polifásica, es decir considerando tanto sus características fenotípicas como genotípicas (Lappe-Oliveras y Herrera-Suarez, 2014).

**Tabla 9. Resultados de las pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas considerados para realizar la identificación fenotípica de los aislados de levaduras obtenidos de las muestras del proceso de elaboración y fermentación del pulque comercial de la Hacienda de Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala.**

Clave del aislado													
Prueba	1R, 14, 17, 18, 43, 27, 29, 31, 43, 106, 119, 120, 121, 124, 129, m131, 155, 183R, 1981R, 211R, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227	3, 10B, 22, 26, 45, 53, 61, 94, 133, 189B, 189R, K	4, 15, 42, 75	107	30	36, 69, 126, 130, 177, 197B, 202B, 211B, 215	21,10R	2, 9, 19, 20, 24, 34, 39, 51, 54, 60, 74, 76, 77, 78, 79, 83, 84, 85, 86, 90, 91, 93, 96, 97, 98, 99, 102, 103, 117, 122, 135, 137, 153, 187, 195, 205, 218, B, E, Y, Q	85, m18c	M181, 151, m157, m165, m166, m182, m19, m196, m	1V,73	64R	1B, 5, 8, 41, 64B
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Clavispora lusitanae</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Pichia kudriavzevii</i>	<i>Yamadazyma mexicana</i>	<i>Candida. Parapsilosis</i>	<i>Candida sake</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Candida boidinii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
Morfología colonial en medio de GELPA													
Color	B-C	B-C	B-C	B-C	B-C	B-C	B-C	B-C	R	B-C	B-C	B-C	B-C
Brillo	Br	Br	Br	Op	Br	Br	Br	Br	Op	Op	Op	Op	Br
Textura	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu	Bu-M	Bu	Bu	Bu	Bu
Borde	On	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	On	Ct	On	Er	Er	Er	Ct
Forma	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci	Ci
Elevación	Cn	Cn	Cn	Pl	Pp	Pl	Pl	Pl	Cn	Cn	Pl	Um	Pl
Morfología en medio de GELP													
Formación de anillo	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+

**Tabla 9. Continuación**

Formación de película	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
Micromorfología en medio de GELPA													
Forma de la célula	G,S,OO	G,OO	OO,C,	C,E,S,OO	G,S,OO	G,S,OO,C	G,S,OO	OO,C	OO,G	OO,G	G,S,OO	G,S,O	G,OO
Gemación	GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM	GM
Seudomicelio	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	V	V	V
Reproducción sexual	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Forma de ascosporas	Rd	-	-		Re	-	-	Re	-	-	-	Rd	
Fermentación de compuestos de carbono													
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Galactosa	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
Sacarosa	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Maltosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Asimilación de compuestos de carbono (Galería API 32C)													
D-Galactosa	V	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Cicloheximida 0.01%	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+
Sacarosa	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
N-Acetil-Glucosamina	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Ácido láctico	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
L-arabinosa	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+

**Tabla 9 Continuación**

D-Celobiosa	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+
Rafinosa	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Maltosa	V	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
α Trehalosa	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
2-cetogluconato potásico	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Metil α-D-glucósido	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
D-Manitol	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lactosa	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+
D-Xilosa	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Ribosa	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Glicerol	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
L-ramnosa	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Palatinosa	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Xilitol	-	+	V	-	+	V	-	V	+	+	+	V	+
D-Melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+



**Tabla 9. Continuación**

Glucuronato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melecitosa	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+
D-Gluconato	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Levulinato	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbosa	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
D-Glucosamina	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
Esculina	-	+	+	-		-		+		+	+	+	-
Asimilación de compuestos de carbono adicionales (Kurtzman <i>et al.</i> , 2011b)													
Arbutina	-	+	-	-		+		+		-	+	-	+
Inulina	V	V	+	+		+		+	+	+	+	-	+
Metanol	-	-	-	-		-		-		+	-	-	-
Etanol	+	+	+	+		+		+		+	+	-	+
Salicina	-	+	-	+		+		+		V	+	-	+
D-glucitol	-	+	+	-		+		+		V	+	-	+
Succinato	-	+	+	+		+		+		+	+	+	+
Galactitol	-	-	-	-		-		-		-	-	-	+
D-Gluconolactona	+	V	+	+		+		+		-	+	-	+
Pruebas adicionales (Kurtzman <i>et al.</i> , 2011b)													
10 % de NaCl	-	+	+	+	+	+	V	-	+	-	+	+	+

**Tabla 9. Continuación**

50 % glucosa	+	V	+		V	+	-	V	V	-	V	V	V
DBB	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Licuefacción de gelatina	-	-	-	-	D	-	-	-	V	-		-	-
Hidrólisis de urea	-	-	-		-	-	-	-	+	-	-	-	-
Asimilación de compuestos de nitrógeno (Kurtzman <i>et al.</i> , 2011b)													
KNO <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaNO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Etilamina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cadaverina	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
L-Lisina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Creatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Creatinina	-	-	-	-		-		-	-	-	-	-	-
D-Glucosamina	-	V	-	-		-		-	-	-	-	-	+
Tolerancia a temperaturas (Kurtzman <i>et al.</i> , 2011b)													
25°C	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+
37°C	V	+	V	+	+	+	-	+	-	V	-	-	+

Color: B=blanca, C= crema; Brillo: Br=brillosa, Op= opaca; Textura: Bu=butirosa, M= mucoso; Borde: On=ondulado, Ct= continuo, Er= eroso; Forma: Ci=circular, Elevación: Cn=convexa, Pl= plana, Pp= papilada, Um:umbilicada; Forma de la célula: G=globosa, S=subglobosa, Re=reniforme, C=cilíndrica, O=ovalada, OO=ovoide; Tipo de gemación: GM=gemación multipolar; Forma de ascosporas: Rd= redonda, Re= reniforme; V=variable ; +=positiva; -=negativa; D=débil

**Tabla 10. Identificación de 81 aislados de levaduras obtenidas a partir de las diferentes muestras del proceso de elaboración de pulque comercial en la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala, con la galería de pruebas del API 32C.**

<b>Muestra</b>	<b>Clave del aislado</b>	<b>Especie</b>	<b>% de similitud API 32C</b>	<b>Clave del Aislado</b>	<b>Especie</b>	<b>% de similitud API 32 C</b>
<b>Aguamiel del cajete M1</b>	119	<i>S. cerevisiae</i>	97.3	125	<i>K. marxianus</i>	99.9
	121	<i>S. cerevisiae</i>	99.6	126	<i>C. parapsilosis</i>	99.6
	122	<i>K. marxianus</i>	98.3	129	<i>S. cerevisiae</i>	97.3
<b>Aguamiel del acocote M2</b>	24	<i>K. marxianus</i>	99.6			
<b>Aguamiel colectado de la castaña M3</b>	73	<i>D. hansenii</i>	97.4	79	<i>K. marxianus</i>	99.9
	74	<i>K. marxianus</i>	99.9	80	<i>S. cerevisiae</i>	97.3
	76	<i>K. marxianus</i>	99.9	81	<i>S. cerevisiae</i>	97.3
	77	<i>K. marxianus</i>	99.9	83	<i>K. marxianus</i>	99.9
	78	<i>K. marxianus</i>	99.9	84	<i>K. marxianus</i>	99.9
	86	<i>K. marxianus</i>	99.9	91	<i>K. marxianus</i>	99.3
	90	<i>K. marxianus</i>	99.9	93	<i>K. marxianus</i>	99.9
	96	<i>K. marxianus</i>	99.9	99	<i>K. marxianus</i>	99.9
	97	<i>K. marxianus</i>	99.9	102	<i>K. marxianus</i>	97.3
	98	<i>K. marxianus</i>	99.6	103	<i>K. marxianus</i>	99.9
	106	<i>S. cerevisiae</i>	99.6			
<b>Semilla madre en tina de cuero M4</b>	137	<i>K. marxianus</i>	99.9			
<b>Semilla o pulque pie de punta M5</b>	21	<i>C. sake</i>	99.0	29	<i>S. cerevisiae</i>	96.7
	24	<i>K. marxianus</i>	99.5	31	<i>S. cerevisiae</i>	96.7
	42	<i>T. delbrueckii</i>	99.6			

Tabla 10. Continuación.

1ª fermentación						
<b>T0 M6</b>	45	<i>C. lusitaniae</i>	91.8			
<b>T1 (1 h) M7</b>	53	<i>C. lusitaniae</i>	91.8	60	<i>K. marxianus</i>	99.9
	54	<i>K. marxianus</i>	99.9	69	<i>C. parapsilosis</i>	99.6
<b>T2 (16 h) M8</b>	173	<i>C. lusitaniae</i>	91.8	176	<i>S. cerevisiae</i>	97.3
	177	<i>C. parapsilosis</i>	99.6	195	<i>K. marxianus</i>	99.6
2ª fermentación						
<b>T0' M9</b>	186	<i>S. cerevisiae</i>	98.29	189B	<i>C. lusitaniae</i>	91.8
	187	<i>K. marxianus</i>	99.9	197B	<i>C. parapsilosis</i>	99.9
<b>T1'(30 min) M19</b>	117	<i>K. marxianus</i>	99.6	130	<i>C. parapsilosis</i>	99.9
	119	<i>S. cerevisiae</i>	97.3	M131	<i>S. cerevisiae</i>	97.3
	133	<i>C. lusitaniae</i>	97.7	132	<i>K. marxianus</i>	98.29
	135	<i>K. marxianus</i>	99.6			
<b>T2' (2 h 30 min) M11</b>	205	<i>K. marxianus</i>	99.6			
<b>T3'(4 h 15 min) M12</b>	211B	<i>C. parapsilosis</i>	99.6	211R	<i>S. cerevisiae</i>	98.3
	215	<i>C. parapsilosis</i>	99.9			
<b>T4' (7h ) M13</b>	M152	<i>C. boidinii</i>	99.9			
3ª fermentación						
<b>T0'' M14</b>	M165	<i>C. boidinii</i>	99.9			
<b>T1''(15 h) M15</b>	M182	<i>C. boidinii</i>	99.9			

Tabla 10. Continuación.

4ª fermentación						
<b>T0''' M16</b>	M196	<i>C. boidinii</i>	99.9	M192	<i>C. boidinii</i>	99.9
Otras muestras						
<b>Agua de lavado de la tina M17</b>	1B	<i>M. guilliermondii</i>	92.2	14	<i>S. cerevisiae</i>	99.7
	1R	<i>S. cerevisiae</i>	97.3	17	<i>S. cerevisiae</i>	98.3
	2	<i>K. marxianus</i>	99.9	18	<i>S. cerevisiae</i>	98.3
	5	<i>M. guilliermondii</i>	92.2	8	<i>M. guilliermondii</i>	98.7
	O8	<i>S. cerevisiae</i>	99.9			
<b>Hisopo con muestra del sedimento de la tina M18</b>	10B	<i>C. lusitaniae</i>	91.8	13	<i>C. boidinii</i>	99.9
<b>Hisopo con muestra del cajete M19</b>	B	<i>K. marxianus</i>	99.9	Y	<i>K. marxianus</i>	99.9
	E	<i>K. marxianus</i>	99.9	Q	<i>K. marxianus</i>	99.9

Del total de aislados, *S. cerevisiae* fue la especie dominante con 110 aislados (46.03%), seguida por *K. marxianus* con 46 aislados (19.25%); *C. lusitaniae* con 27 (11.30%); *C. boidinii* con 24 (10.0%); *C. parapsilosis* con 15 (6.8%); *M. guilliermondii* con 5 (2.09%); *T. delbrueckii* con 4 (1.67%), *R. mucilaginosa*, *D. hansenii*, y *C. sake* con 2 (0.83%); *P. membranifaciens*, *P. kudriavzevii* y *Y. mexicana* con 1 aislado cada una (0.42%). En la Tabla 12 se muestra las especies de levaduras y números de aislados por especie y por etapa de proceso, el total de aislados por especie y por muestra.

De las especies anteriormente identificadas en pulque y aguamiel están *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *M. guilliermondii*, *Torulaspota*, *R. mucilaginosa* y *P. membranifaciens* (Ruiz-Oronoz, 1953; Estrada-Godina *et al.*, 2001; Nout, 2003; Herrera-Solórzano, 2008; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008, Lappe-Oliveras y Herrera-Suárez, 2014).

**Tabla 11. Identificación fenotípica y genotípica de los aislados obtenidos partir de las diferentes muestras del proceso de elaboración de pulque comercial en la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala.**

Muestra	Clave del aislado	Especie	% de similitud API 32C	Especie	% de similitud CBS	Especie	% de similitud GenBank	No. de acceso al GenBank
Aguamiel del cajete M1	124	<i>S. cerevisiae</i>	99.7	<i>S. cerevisiae</i>	98.9	<i>S. cerevisiae</i>	100	KU687369
	120	<i>S. cerevisiae</i>	99.7	<i>S. cerevisiae</i>	100	<i>S. cerevisiae</i>	100	KU687368
Aguamiel de acocote M2	22	<i>C. lusitaniae</i>	98.7	<i>C. lusitaniae</i>	96.36	<i>C. lusitaniae</i>	100	KU678210
Aguamiel de la castaña M3	85	<i>R. glutinis</i>	78.3	ND	ND	<i>R. mucilaginoso</i>	100	KU687365
	94	<i>D. hansenii</i>	99.9	<i>C. lusitaniae</i>		<i>C. lusitaniae</i>	100	KU687366
	75	<i>T. delbrueckii</i>	99.9	<i>T. delbrueckii</i>	93.38	<i>T. delbrueckii</i>	99	KU687364
Semilla madre en tina de cuero M4	153	<i>C. parapsilosis</i>	99.6	<i>K. marxianus</i>	ND	<i>K. marxianus</i>	99	KU687370
	155	<i>T. delbrueckii</i>	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	98.16	<i>S. cerevisiae</i>	100	KU687371
Semilla o pulque pie de punta M5	26	<i>C. lusitaniae</i>	98.7	<i>C. lusitaniae</i>	95.6	<i>C. lusitaniae</i>	98	KU687359
	27	<i>S. cerevisiae</i>	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	96.8	<i>S. cerevisiae</i>	99	KU687360
	34	<i>K. lactis</i>	95.7	<i>K. marxianus</i>	95.7	<i>K. marxianus</i>	100	KU687361
	36	<i>C. parapsilosis</i>	99.6	<i>C. parapsilosis</i>	99.6	<i>C. parapsilosis</i>	99	KU678211
	39	<i>K. marxianus</i>	99.9	<i>K. marxianus</i>	96.08	<i>K. marxianus</i>	100	KU687354
	41	<i>M. guilliermondii</i>	92.2	<i>M. guilliermondii</i>	97.9	<i>M. guilliermondii</i>	99	KU687362
	43	<i>S. cerevisiae</i>	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	99	KU687362
<b>1ª fermentación</b>								
t0 M6	45	<i>C. lusitaniae</i>	98.7	<i>C. lusitaniae</i>	95.6	<i>C. lusitaniae</i>	100	
t1 (1h) M7	61	<i>C. lusitaniae</i>	98.7	<i>C. lusitaniae</i>	96.36	<i>C. lusitaniae</i>	100	KU687355
	64B	<i>M. guilliermondii</i>	92.2	<i>M. guilliermondii</i>	97.9	<i>M. guilliermondii</i>	100	KU687383
	64R	<i>P. membranifaciens</i>	99.9	<i>P. membranifaciens</i>	99.9	<i>P. membranifaciens</i>	100	KU687363
t2(16 h) M8	177	<i>C. parapsilosis</i>	99.6	ND	ND	ND	ND	
	173	<i>C. lusitaniae</i>	98.7	ND	ND	ND	ND	

Tabla 11. Continuación.

2ª fermentación								
t0' M9	183R	<i>S. cerevisiae</i>	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	98.29	<i>S. cerevisiae</i>	100	KU687372
	189R	<i>C. lusitaniae</i>	98.7	ND	ND	<i>C. lusitaniae</i>	99	KU687373
	198-1R	<i>S. cerevisiae</i>	98.3	<i>S. cerevisiae</i>	98.29	<i>S. cerevisiae</i>	99	KU687374
t1'(30 min) M10	202B	<i>C. parapsilosis</i>	99.6	<i>C. parapsilosis</i>	99.6	<i>C. parapsilosis</i>	99	KU687357
t2' (2h 30 min) M11	218	<i>S. cerevisiae</i>	98.3	<i>K. marxianus</i>	98.29	<i>K. marxianus</i>	100	KU687375
t3' (4h 15 min) M12	211R	<i>S. cerevisiae</i>	98.3	<i>S. cerevisiae</i>	98.29	ND	ND	
t4'(7 h 30 min ) M13	M151	<i>C. boidinii</i>	99.9	<i>C. boidinii</i>	99.19	<i>C. boidinii</i>	99	KU721007
	M157	<i>C. boidinii</i>	99.9	<i>C. boidinii</i>	99.19	<i>C. boidinii</i>	99	KU687377
3ª fermentación								
t0" M14	M165	<i>C. boidinii</i>	99.9	<i>C. boidinii</i>	97.22	<i>C. boidinii</i>	99	KU687378
t1" (18 h 30 min) M15	M185	<i>C. boidinii</i>	99.9	<i>C. boidinii</i>	99.19	<i>C. boidinii</i>	99	KU687380
	M182	<i>C. boidinii</i>	99.9	<i>C. boidinii</i>	99.07	<i>C. boidinii</i>	99	KU687379
4ª fermentación								
t0"" M16	M192	<i>C. boidinii</i>	99.9	<i>C. boidinii</i>	97.22	<i>C. boidinii</i>	99	KU687381
	M196	<i>C. boidinii</i>	99.9	<i>C. boidinii</i>	97.22	<i>C. boidinii</i>	99	KU687382
Otros sustratos								
Agua de lavado de la tina M17	1V	<i>D. hansenii</i>	97.7	<i>D. hansenii</i>	98.29	<i>M. guilliermondii</i>	99	KU687384
	3	<i>D. hansenii</i>	97.0	<i>C. lusitaniae</i>	95.9	<i>C. lusitaniae</i>	99	KU678207
	4	<i>T. delbrueckii</i>	99.6	<i>T. delbrueckii</i>	96.9	<i>T. delbrueckii</i>	99	KU678208
	15	<i>T. delbrueckii</i>	99.6	<i>T. delbrueckii</i>	99.6	<i>T. delbrueckii</i>	100	KU678209
	107	<i>D. hansenii</i>	ND	<i>C. sake</i>	97.76	<i>P. kudriavzevii</i>	99	KU687367
Hisopo de la tina M18	12	<i>S. cerevisiae</i>	99.9	<i>S. cerevisiae</i>	96.7	<i>S. cerevisiae</i>	99	KU687358
Hisopo del cajete M19	M	<i>C. boidinii</i>	99.9	<i>C. boidinii</i>	96.77	<i>C. boidinii</i>	99	KU687376
	G	<i>C. lusitaniae</i>	91.8	<i>C. lusitaniae</i>	96.58	<i>C. lusitaniae</i>	98	KU721006
	K	<i>D. hansenii</i>	97.4	ND	ND	<i>C. lusitaniae</i>	99	KU687356

ND=No determinado



**Tabla 12. Especies de levaduras, número de aislados por especie y por muestra de las diferentes etapas de elaboración y fermentación de pulque comercial en la Hacienda Xochuca, Tlaxco, Tlaxcala.**

	Microorganismos	<i>C. boidinii</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. sake</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>K. marxianus</i>	<i>M. guilliermondii</i>	<i>P. membranifaciens</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>P. kudriavzevii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>T. delbrueckii</i>	<i>Y. mexicana</i>	Total
	Muestras														
Aguamiel	Aguamiel del cajete		1	1			2					5			9
	Aguamiel de acocote		1				1					8			10
	Aguamiel de la castaña		3			1	20			1		3	1		29
Semilla	Semilla madre en tina de cuero	1	1	3			2					2			9
	Semilla o pulque pie de punta		3	1	2		5	1				8	1	1	22
1 <sup>a</sup> fermentación	t0		1				1					6			8
	t1 (1 h)		3	1			2	1	1			12			20
	t2(16 h)		4	1			1					8			14
2 <sup>a</sup> fermentación	t0'		2	3			1					16			22
	t1'(30 min)		2	1			3					3			9
	t2' (2h 30 min)			2			1					8			11
	t3' (4h 15 min)			2			1					7			10
	t4'(7 h 30 min )	5										3			8
3 <sup>a</sup> fermentación	t0''	5										3			8
	t1'' (15 h)	5								1		2			8
4 <sup>a</sup> fermentación	t0'''	6										2			8
Otras muestras	Agua de lavado de la tina		1				1	3			1	5	2		13
	Hisopo del sedimento de la tina	1	1			1						9			12
	Hisopo del cajete	1	4				5								10
Total		24	27	15	2	2	46	5	1	2	1	110	4	1	240
% de aislados		10.0	11.25	6.25	0.83	0.83	19.17	2.08	0.42	0.83	0.42	45.83	1.67	0.42	100

*Saccharomyces cerevisiae* se presentó en todas las muestras (aguamiel, semilla, en las diferentes fermentaciones y así como en las otras muestras), se considera como la levadura más importante en pulque por la producción de terpenos, alcoholes superiores, ésteres, etanol y CO<sub>2</sub> que influyen en las características sensoriales de la bebida (Sánchez-Marroquín, 1967; Gonçalves de Lima, 1978). Esta especie ha sido aislado de cerveza, vinos de uva y de otras frutas, frutos maduros y jugos así como en etapas de fermentación de bebidas de agave como pulque, tequila y mezcal (Lachance, 1995; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008), por mencionar algunos. Es utilizada a nivel mundial para la producción de pan, cerveza, vino y aguardientes, y empleada como modelo en investigaciones de ingeniería genética. *S. cerevisiae* es capaz de fermentar glucosa, sacarosa, fructosa e inulina, componentes del aguamiel (Vaughan-Martini y Martini, 2011), tiene una tolerancia al etanol de 9% v/v (Herrera-Solórzano, 2008), es productora de pequeñas cantidades de ácido acético, aminoácidos como metionina y cistina, acetato isoamílico, ácidos grasos como el caproico y caprílico, alcoholes superiores (Abbas, 2006) y etanol (Vaughan-Martini y Martini, 2011). La presencia de *S. cerevisiae* todas las etapas de elaboración del pulque, bebida que en su etapa final presenta alrededor de un 6.3% de etanol, coincide con su tolerancia a este alcohol, que ha sido reportada de 9% v/v para cepas de esta especie obtenidas de pulque (Herrera Solórzano, 2008). Esta un esta especie además de producir etanol, sintetiza algunos componentes nutricionales y compuestos aromáticos que proporcionan a la bebida su valor nutrimental así como su sabor y aroma característico.

*Kluyveromyces marxianus* se encontró en ambas semillas, en todas las muestras de aguamiel y en la primera y segunda fermentación. Esta especie se ha aislado de atmósfera, del suelo, de vacas, esputo, levadura prensada, granos de kefir, de productos lácteos como el suero de leche, yogurt, salmuera del queso, queso y kumis, higos fermentados, de piñas cocidas, cerveza bantú (Barnett *et al.*, 2000), de plantas de agave; mostos fermentados de *A. tequilana* var. *azul*, *A. angustifolia*, *A. fourcroydes*, *A. salmiana*, *A. arigida* var. *sisalana* durante el proceso de

fermentación de tequila y mezcal en diferentes regiones de México (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008; Lachance, 2011c, Segura García, 2010; Verdugo Valdez *et al.*, 2011; Escalante-Minakata *et al.*, 2012; Estrada-Godina *et al.*, 2001), y de bebidas de agave de México como el pulque y aguamiel, entre otros (Estrada-Godina *et al.*, 2001). Fermenta glucosa, fructosa, sacarosa e inulina (Lachance, 2011a) componentes importantes del aguamiel; tiene una tolerancia al etanol entre el 6 y el 8% (Herrera-Solórzano, 2008), por lo que es posible encontrarla en etapas avanzadas de fermentación el pulque. Es productora de aminoácidos, vitaminas y compuestos del sabor (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008) como el fenil etanol (Abbas, 2006), por lo que su presencia influye en las características sensoriales y nutricionales de la bebida.

*Clavispora lusitaniae* se presentó en aguamiel, semillas y las primeras etapas de fermentación, es capaz de fermentar glucosa, fructosa y sacarosa (Lachance, 2011b) azúcares presentes en el aguamiel (Ortiz-Basurto *et al.*, 2008). Esta especie fue aislada anteriormente de aguamiel y pulque (Estrada-Godina *et al.*, 2001; Herrera-Solórzano, 2008). Ha sido aislada del mosto de *A. fourcroydes* (Lappe-Oliveras *et al.*, 2004), del inóculo utilizado en la producción de mezcal de *A. salmiana* en San Luis Potosí (Escalante-Minakata *et al.*, 2012), del mosto de *A. tequilana* utilizado para la elaboración de tequila, por lo que algunos autores lo consideran una levadura agavofílica. Es una levadura que presenta una baja tolerancia al etanol 4% v/v (Herrera-Solórzano, 2008), lo que explica su presencia en el aguamiel y en las etapas tempranas de fermentación del pulque y no en etapas avanzadas. Es capaz de producir acetaldehído, ésteres y alcoholes superiores por lo que su presencia en pulque está relacionada con las características organolépticas del pulque (Mingorance-Cazorla *et al.*, 2003).

*Candida boidinii* se presentó en la semilla madre, hisopo de cajete y sedimento de la tina y fue predominante en la tercera y cuarta fermentación, siendo probablemente introducida en la tina de fermentación mediante la adición de aguamiel fresco. *C. boidinii* se ha encontrado en el suelo, barro viscoso, del

sedimento inter mareal *Rhizophora mangle*, del alpechín, del sobrenadante en el vino, tomates en putrefacción y en bebidas fermentadas de México como el tepache (Barnett *et al.*, 2000) y el mezcal (Escalante-Minakata *et al.*, 2012). Es fermentadora de glucosa y fructosa (Lachance *et al.*, 2011a), componentes importantes del aguamiel y productora de compuestos fenólicos, por lo que *C. boidinii* produce compuestos de sabor en el pulque (Abbas, 2006).

*Candida parapsilosis* se presentó en semilla madre y pie de punta, aguamiel de cajete, y en la primera y segunda fermentación. Se ha encontrado en olivos, troncos de *Nothofagus dombeyii* en putrefacción de (Barnett *et al.*, 2000), en bebidas fermentadas de agave como pulque (Ruíz-Oronoz, 1953) y mezcal elaborado de con mostos de *A. fourcroydes* y de *A. salmiana* (Lappe *et al.*, 2008; Escalante-Minakata *et al.*, 2012). *C. parapsilosis* es fermentadora de glucosa y fructosa, y fermentadora lenta de galactosa y sacarosa (Barnett *et al.*, 2000), componentes de aguamiel. Produce compuestos volátiles de sabor como acetaldehído y alcoholes superiores (Caileux *et al.*, 1992), antioxidantes, y compuestos fenólicos (Abbas, 2006), que impactan probablemente en el perfil sensorial de la bebida.

*Meyerozyma guilliermondii* se aisló de semilla pie de punta, agua de lavado de la tina y primera fermentación. Ha sido aislada de excretas de insectos parásitos del olmo americano, de avispas, de suelo, de uvas y jugo de uva, y de diversos productos fermentados como el cultivo iniciador de sake, de las cervezas africanas burukutu, kaffir, bantú y la cerveza turca boza, de diversos alimentos tradicionales elaborados con yuca por los indígenas de la amazonia brasileña, de productos fermentados elaborados con savia del cocotero, como el toddy de Asia o tuba de México, de productos fermentados elaborados de maíz como el pozol (Barnett *et al.*, 2000) y el tesgüino (Ulloa *et al.*, 1987) de bebidas de agave como el tequila (Lachance, 1995), pulque y mezcal (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008). Es fermentadora de glucosa, sacarosa y fructosa, componentes presentes en aguamiel. Esta especie es productora de vitaminas, aminoácidos y xilitol (Kurtzman, 2011c), de ésteres como acetato isoamílico y acetato de etilo (Plata *et al.*, 2003), por lo que

su presencia en la bebida tiene impacto en el aporte nutricional y en el sabor del pulque.

*Torulasporea delbrueckii* se encontró en agua de lavado de la tina, semilla pie de punta y aguamiel de la castaña. Es una levadura común en leche de oveja vino, corteza de *Araucaria* sp., higos agrios, en jugo fermentado de uvas negras, mosto de uvas, vino, licor de sorgo, pepinos fermentados, se emplea en la producción de pan, además ha sido aislada de mostos de *A. salmiana* utilizado para la fermentación de mezcal artesanal (Verdugo Valdez *et al.*, 2011), y de bebidas fermentadas de México como el colonche, tequila (Lachance ,1995) y el pulque (Nout, 2003; Lappe-Oliveras *et al.*, 2008); recientemente se ha empleado en la producción de pan. Es considerado un microorganismo causante de la descomposición de alimentos incluyendo vegetales y carnes saladas (Kurtzman, 2011d; Barnett *et al.*, 2000), Es fermentadora de glucosa, galactosa, sacarosa y fructosa (Barnett *et al.*, 2000), azúcares abundantes en aguamiel. Es productora de ésteres como el acetato isoamílico y el acetato de etilo (Plata *et al.*, 2003), por lo que ésta especie influye en el sabor del pulque.

*Rhodotorula mucilaginosa* se encontró en semilla pie de punta y aguamiel de la castaña. Se ha aislado de diversos hábitats, lo que concuerda con su distribución cosmopolita. Ha sido aislada en plantas y árboles y sustratos de descomposición de los mismos, de exudado de *Populus tremuloides*, estuarios, aguas costeras, mar abierto, aguas profundas y agua del Lago Pike, suelo, larva de la mosca *Drosophila pilimanae*, cerveza pasteurizada, jamón, jarabe de malta, pimiento *Capsicum frutescens* y *Tremella mesenterica* (Barnett *et al.*, 2000; Sampaio, 2011), bebidas fermentadas de México como el mezcal (Lappe-Oliveras *et al.*, 2004) y pulque (Lappe-Oliveras y Herrera-Suárez, 2014). No es fermentadora, es productora de acetaldehídos, ésteres y alcoholes superiores (Mingorance-Cazorla *et al.*, 2003), pigmentos carotenoides (Sampaio, 2011), compuestos fenólicos (Abbas, 2006) y se ha demostrado su capacidad para degradar plastificantes

(Sampaio, 2011). Esta especie aporta características sensoriales al pulque, y es probable que haya sido introducida a la bebida por insectos.

*Debaryomyces hansenii* se encontró en aguamiel de la castaña y sedimento de la tina. Es una especie que frecuentemente es aislada de productos lácteos como quesos; de productos cárnicos, como salchichas de cerdo, res, caballo, pasta de carne de caballo, y salami, así como de las etapas tempranas de la fermentación de salsa de soya y miso, de puré de tomate y tabaco, así como del cultivo iniciador de sake o sake moto. Se ha encontrado en alimentos fermentados tradicionales africanos elaborados con granos de sorgo (kisra, aceda, enjera), en takju bebida de arroz de Corea (Nout, 2003), en kefir dulce, hongo del té (Barnett *et al.*, 2000), en alimentos fermentados mexicanos elaborados con maíz, como el pozol (Lappe y Ulloa, 1989) y el atole agrio (Arce Rocha, 2007), con piloncillo, como el tepache de tibicos (Godoy *et al.*, 2003), o con mostos de *A. fourcroydes* como el mezcal de Yucatán (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008). Es una especie fermentadora de glucosa, sacarosa y fructosa, componentes del aguamiel; produce factores de crecimiento, componentes aromáticos y enzimas proteolíticas y lipolíticas (Abbas, 2006), es productora de xilitol y etanol y otros alcoholes a partir de pentosas, produce exoenzimas como la  $\beta$ -glucosidasa, estereasas e inulinasa, y de toxinas killer hacia otras levaduras (Johnson y Echavarrri-Erasun, 2011), por lo que puede afectar el crecimiento y sobrevivencia de otros microorganismos presentes en la bebida, además de impactar en las características sensoriales y de sabor del pulque.

*Candida sake* se encontró en semilla pie de punta. Ha sido aislada del sake moto, cerveza lámbica, de la savia de *Fagus* sp., del sauerkraut, de la yema de huevos en descomposición, del mosto de uvas, de salmón congelado, de tierra y agua congelada de la Antártica y de agua de mar del Océano Antártico (Barnett *et al.*, 2000), durante la fermentación de mostos de *A. salmiana* para la producción de mezcal (Verdugo Valdez *et al.*, 2011). Esta especie es por primera vez reportada en pulque. Es fermentadora de glucosa, sacarosa y fructosa, componentes del

aguamiel, es productora de alcoholes como el isoamílico y amílico, aldehídos como el 2-metil-2-hexanal, y ésteres como el acetato de isobutilo (Buzzini *et al.*, 2003), además contiene ácidos grasos poliinsaturados (Lachance *et al.*, 2011a). Esta especie influye en el valor nutricional y el desarrollo de componentes de sabor del pulque.

*Pichia membranifaciens* se encontró solamente en la primera fermentación tiempo1. A menudo es aislada de frutos (plátano, piña, dátiles, uvas) y diversas plantas, de frutos dañados o en estado de putrefacción, de productos de tomate y granada, o como contaminantes de bebidas fermentadas como sidra, cerveza de jengibre, cerveza de barril, cerveza lámbica, kumis, mosto del vino y vino, vino de palma o toddy, del ogi bebida africana de maíz, de tequila (Lachance, 1995), pulque y mezcal (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008); de la levadura de pan; pepinos encurtidos y de *Drosophila pseudoobscura* y *D. melanogaster*, (Beuchat, 1987; Barnett *et al.*, 2000; Kurtzman, 2011e). Es una levadura no fermentadora, productora de antioxidantes y compuestos fenólicos (Abbas, 2006), aromáticos como acetato de etilo y acetato isoamílico (Plata *et al.*, 2003), por lo que puede influir en las características del sabor de la bebida. Esta levadura pudo haberse introducido por contaminación con *D. melanogaster*.

*Pichia kudriavzevii* se aisló únicamente del agua de lavado de la tina. Se ha aislado del suelo, frutos y fermentaciones naturales, masas agrias, el iniciador de togwa, bebida a base de harina de maíz y mijo germinado, productos fermentados africanos elaborados de yuca, de mantequilla, de cacao (Kurtzman, 2011e), jugo fermentado de piña, naranja y uva (Chan *et al.*, 2012), así como de mezcal (Segura García, 2010). Es una levadura fermentadora de glucosa y fructosa (Kurtzman, 2011e), azúcares presentes en aguamiel. Es productora de compuestos fenólicos (Abbas, 2006). *P. kudriavzevii* no había sido reportada con anterioridad en aguamiel o pulque.

*Yamadazyma mexicana* se encontró en semilla pie de punta, ha sido aislada de suelo, mosto de uva y pinos de África (Kurtzman, 2011f), de las especies de cactus columnares *Stenocerreus thurberi*, *S. gummosus*, *Pachycereus pringlei* y de *Opuntia* spp. (Barnett *et al.*, 2000). Fue reportada en mezcal de Tamaulipas (Jacques-Hernández *et al.*, 2009), pero no había sido aislada de aguamiel ni de pulque. Es una especie fermentadora de glucosa y fructosa, azúcares abundantes en aguamiel (Kurtzman, 2011f). Es productora de xilitol (Guamán-Burneo *et al.*, 2015).

De acuerdo con los resultados obtenidos de la microbiota identificada en las diferentes muestras estudiadas, se puede indicar que las fuentes de inóculo para la elaboración del pulque son las paredes del cajete, los utensilios utilizados para la raspa del cajete, el acocote, la tina de fermentación, el aguamiel y las semillas.

Del aguamiel de cajete se aisló *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *K. marxianus* y *S. cerevisiae*, y *C. boidinii* del hisopo del cajete, levaduras que se encontraron en las primeras etapas de fermentación, con excepción de *S. cerevisiae*, que se estuvo presente a lo largo de toda la fermentación, y de *C. boidinii* que se aisló mayoritariamente de la tercera y cuarta fermentación. Es probable que todas esas especies de hayan sido introducidas a la tina de fermentación con el aguamiel extraído del cajete.

En aguamiel del acocote se identificaron las mismas especies de levaduras, por lo que se corrobora que la presencia de las levaduras identificadas, provienen desde el aguamiel de cajete. Al vaciar el aguamiel a la castaña, las especies *D. hansenii*, *R. mucilaginosa* y *T. delbrueckii* identificadas en la castaña se mezclaron con la microbiota del aguamiel. En el sedimento de la tina se encontraron nuevas especies de levaduras, *M. guilliermondii* y *P. kudriavzevii*, las que se adicionaron a la microbiota del aguamiel, aumentando así la diversidad de especies presentes en éste.



De la primera fermentación se aislaron *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *K. marxianus* y *S. cerevisiae*, especies que también se presentaron en aguamiel de cajete, por lo que su entrada a la fermentación proviene desde la materia prima. *M. guilliermondii*, también fue encontrada en el sedimento de la tina, por lo que es probable que desde el cajete fue la introducción de la levadura. *Pichia membranifaciens* fue aislada solamente de la primera fermentación tiempo 1, probablemente su presencia se deba a contaminación por insectos vectores como *D. melanogaster*, ya que esta levadura ha sido reportada en ellos.

En la segunda fermentación se identificaron *C. boidinii*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *K. marxianus* y *S. cerevisiae*, especies que pudieron ser introducidas con el aguamiel de cajete que fue añadido a la tina al inicio de esta segunda fermentación.

En la tercera y cuarta fermentación se aislaron *C. boidinii*, *S. cerevisiae* y en la tercera *R. mucilaginosa*, las dos primeras especies provenientes del aguamiel del cajete y la última de la castaña.

En la semilla pie de punta se aislaron *C. sake* y *Y. mexicana* levaduras que no habían sido identificadas anteriormente en pulque, sin embargo han sido identificadas anteriormente en producción de mezcal proveniente de *Agave* por lo que es probable que la introducción de estas cepas haya sido desde la planta misma. Sin embargo para corroborar la identidad de estas especies se recomienda realizar pruebas moleculares adicionales.

Las especies *Pichia kudriavzevii*, *Yamadazyma mexicana*, *Candida boidinii* y *Candida sake* son por primera vez reportadas en el proceso de elaboración y fermentación de pulque.

## Conclusiones

- La fermentación del aguamiel es iniciada desde que este se acumula en el cajete.
- El cajete, el acocote, la castaña, la tina de fermentación, la semilla pie de cuba y vectores como insectos son inóculo para la fermentación del aguamiel.
- La adición de aguamiel a la tina de fermentación diluye la concentración de microorganismos presentes en la bebida, introduce nueva microbiota al pulque y nuevos sustratos fermentables, por lo que se considera que después de la adición de aguamiel se inicia una nueva fermentación.
- La macro y micro morfología y pruebas fisiológicas no son suficientes para obtener la identificación veraz de los aislados de levaduras, es necesario realizar una identificación polifásica que combine características fenotípicas con genotípicas.
- A partir de las 19 muestras estudiadas se obtuvo un total de 240 aislados de levaduras, los que se identificaron en 13 especies, siendo *Saccharomyces cerevisiae* la especie dominante seguida de *Kluyveromyces marxianus*.
- Las especies *Pichia kudriavzevii*, *Yamadazyma mexicana*, *Candida boidinii* y *Candida sake* se reporta por primera vez en la elaboración de pulque.

## Anexos

### Anexo 1. Cronología de los estudios microbiológicos realizados en aguamiel y pulque, y especies de bacterias y levaduras identificadas.

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</i> semejante a <i>Cr. cerevisiae</i> (= <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
1874	Guerrero Visiera F.	Considera que <i>Cryptococcus</i> spp. realizan la fermentación del pulque
1891	Segura J. C	Identifica y describe bacterias del género <i>Leuconostoc</i>
1884	Lobato J. C.	Señala que la conversión de aguamiel a pulque la realizan <i>Cryptococcus</i> spp., no considera la participación de bacterias en la fermentación
1892	Altamirano F.	Reconoce la presencia de bacterias, menciona por primera vez al género <i>Saccharomyces</i> al que considera responsable de la fermentación alcohólica
1896	Gaviño A.	Aisla varias especies de bacterias (cocos, diplococos y bacilos) y una levadura rosa, probablemente una <i>Rhodotorula</i> ; reporta a <i>Mycoderma</i> (= <i>Acetobacter</i> ) como responsable de la fermentación acética
1901	Gaviño A.	Aisla a <i>Bacillus viscosus</i> * y un <i>Saccharomyces</i> sp.
1901	Carbajal A.	Identifica como microorganismos constantes en el pulque a: <i>Bacterium aceti</i> (= <i>Acetobacter aceti</i> ), <i>B. viscosus</i> *, <i>Micrococcus luteus</i> (= <i>Kokuria rhizophila</i> ), <i>Micrococcus translucidus</i> * y a la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae agavica silvestre</i> (= <i>S. cerevisiae</i> ) a la que considera el principal microorganismo fermentativo; y como microorganismos accidentales a las bacterias: <i>Cladotrix</i> *, <i>Micrococcus cinnabareus</i> *, <i>Micrococcus roseus</i> (= <i>Kokuria rosea</i> ), <i>Sarcina amarilla</i> *, a la levadura <i>Torula</i> * rosada y a los mohos <i>Mucor mucedo</i> , <i>Stolonifer</i> sp. (= <i>Rhizopus stolonifer</i> ), <i>Aspergillus</i> sp. del grupo <i>A. glaucus</i> , <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillium glaucum</i>

## Anexo 1. Continuación.

1916	Cordero M.	Obtiene varios aislados de levadura que son identificados por Guilliermond (1917) como <i>Pichia</i> y <i>Saccharomyces</i>
1917	De María Campos M.	Identifica cepas de <i>Pichia</i> , <i>Saccharomyces</i> y <i>Mycoderma aceti</i> (=A. aceti)
1924	Lindner P.	Aisla <i>Thermobacterium mobile</i> (=Zymomonas mobilis subsp. mobilis) especie que describe como nueva para la ciencia
1925	Morton-Gómez M.	Hace una recopilación de las especies de bacterias estudiadas por Lindner. Los microorganismos aislados del aguamiel los clasifica en: <b>1.</b> bacterias productoras de ácido láctico y CO <sub>2</sub> ; <b>2.</b> bacterias productoras de ácido láctico y de una sustancia viscosa, <b>3.</b> bacterias que utilizan azúcares y etanol para producir metabolitos secundarios; además reporta el aislamiento de las levaduras <i>Oidium lactis</i> (=Galactomyces candidus), <i>Pichia agaves</i> * y <i>Saccharomyces agave</i> *. Este trabajo es importante por la dificultad para obtener los trabajos de Lindner
1926	Lindner P.	Describe como microbiota del pulque a <i>Bacterium iridescens</i> *, <i>Bacterium xylinum</i> (=Komagataeibacter xylinus), <i>Bacterium vermiforme</i> (=Lactobacillus hilgardii) y a dos bacterias mucoides
1928	Lindner P.	Identifica en el aguamiel a las bacterias <i>Bacillus acidificans longissimus</i> (=Lactobacillus delbrueckii), <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Granulobacter amyloalcoholicum</i> *, y considera como especies nuevas a <i>Sarcina minor</i> * y <i>Sarcina major</i> *
1930	Lindner P.	Establece la sinonimia entre <i>B. viscosus</i> * y <i>Streptococcus corrosus</i> *, describe como especies nuevas de bacterias a: <i>Diplobacter viscosum</i> *, <i>Granulobacter amyloalcoholicum</i> *, <i>Sarcina corrosa</i> *, <i>Streptococcus aguameli major</i> *, <i>Streptococcus aguameli minor</i> *, <i>Streptococcus corrosus</i> *, <i>Thermobacterium iridescens</i> (=Pseudomonas iridescens*), <i>Leuconostoc</i> sp.

## Anexo 1. Continuación.

1931	Fernández Tagle G.	Estudia las vitaminas y la fermentación viscosa del pulque; considera a <i>Leuconostoc mesenteroides</i> como responsable de ésta. Describe las bacterias <i>Bacterium plicatum</i> (= <i>B. lactis plicatum</i> *) y <i>B. acidificans longissimus</i> (= <i>L. delbrueckii</i> ), y las levaduras <i>Pichia</i> sp. y <i>S. cerevisiae</i> ; considera a <i>Torula mucilaginosa</i> (= <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ) y <i>Torula</i> * rosada especies ocasionales
1932	Varela G.	Realiza un estudio higiénico del pulque; describe a <i>Bacillus esterificans</i> *, <i>Escherichia formica</i> *, <i>Escherichia vekanda</i> *
1932	Sánchez M. D.	Identifica a <i>Cellulomonas</i> y a <i>Leuconostoc pleofructi</i> *
1938	Nieto Roaro D. y M. Maecke	Aislan <i>Lactobacillus patonii</i> * del aguamiel y del pulque
1940	Nieto Roaro D. y M. Maecke	Establecen la sinonimia de <i>Leuconostoc viscosum</i> * con <i>S. corrosus</i> *
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> .
1946	Sánchez Marroquín A. y A. C. Wild	Caracterización morfo-fisiológica de una cepa de <i>Lactobacillus</i> (que relacionan con <i>Lactobacillus sakei</i> ) y de <i>Lactobacillus leichmanii</i>
1948	Sánchez Marroquín A. y L. Arciniega	Estudio de la capacidad dextranogénica de tres cepas de <i>Leuconostoc</i> aisladas de aguamiel identificadas como <i>Leuconostoc</i> sp., <i>L. dextranicum</i> (= <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> ) y <i>L. mesenteroides</i> (= <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> )

## Anexo 1. Continuación.

1948 1949	Sánchez Marroquín A. y H. Rodríguez	Corroboran con pruebas serológicas y bioquímicas la identidad de <i>L. dextranicum</i> (= <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> ) y <i>L. mesenteroides</i> (= <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> )
1948	Sánchez Marroquín A., C. Celis y del Río C.	Reportan que <i>Leuconostoc</i> spp. del pulque son heterofermentativas, y que <i>L. dextranicum</i> (= <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> ) y <i>L. mesenteroides</i> (= <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ) son parte de la microbiota del pulque
1948	Brechtel P.	Describe como nuevos registros para el aguamiel y el pulque a <i>Micrococcus candidus</i> *, <i>Micrococcus ruizzii</i> *, <i>M. roseus</i> (= <i>K. rosea</i> ), <i>Sarcina flava</i> (= <i>M. luteus</i> ) y <i>Bacillus teres</i> (= <i>Lysinibacillus sphaericus</i> )
1951	Gonçalves de Lima O.	Estudia las bacterias móviles antagonistas en el pulque; señala que algunas poseen antibióticos de importancia
1951	Monroy E.	Identifica como <i>Pseudomonas</i> sp. una de las cepas aisladas por Gonçalves de Lima (1951)
1951	Gonçalves de Lima O., C. Larios y E. Azcárate	Identifican varios aislamientos de <i>Pseudomonas lindneri</i> (= <i>Z. mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> )
1962	Sánchez Marroquín A.	Hace una revisión de los estudios microbiológicos del pulque realizados durante 92 años, reporta la sinonimia de las levaduras <i>S. carbajalii</i> (= <i>S. cerevisiae</i> ), <i>P. barragnii</i> (= <i>P. membranifaciens</i> ), <i>T. hydromelitis</i> (= <i>C. parapsilosis</i> ) descritas por Ruiz Oronoz
1973	Ulloa M. y T. Herrera	Aislan <i>Kloeckera corticis</i> var. <i>pulquensis</i> (= <i>K. apiculata</i> anamófo de <i>Hanseniaspora uvarum</i> ).
1977	Sánchez Marroquín A.	Establece que las especies <i>L. mesenteroides</i> y <i>L. dextranicum</i> son las que sintetizan las dextranas; que los lactobacilos homo y hetero fermentativos producen los ácidos láctico y acético, y que <i>Z. mobilis</i> y <i>S. cerevisiae</i> son los microorganismos productores de etanol

## Anexo 1. Continuación.

1977	Swings J. y J. De Ley	Consideran a <i>Z. mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> como el microorganismo responsable de la fermentación del pulque.
1976-1982	Ulloa M. y T. Herrera	Aislan a <i>C. parapsilosis</i> y <i>P. membranifaciens</i> de aguamiel.
1989	Lappe P. et al.	Identifican a <i>S. cerevisiae</i> , <i>P. membranifaciens</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>bulgarius</i> (= <i>K. marxianus</i> ), <i>Pichia carsonii</i> (= <i>Priceomyces carsonii</i> ) y a <i>Candida guilliermondii</i> (= <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ) en muestras de pulque
1991	Herrera T. y A. Calderón	Aislan a <i>Candida rugosa</i> , <i>Candida rugopelliculosa</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i> (= <i>Kluyveromyces lactis</i> ), <i>Saccharomyces acetii</i> (= <i>S. cerevisiae</i> ), y <i>Saccharomyces globosus</i> (= <i>Saccharomyces bayanus</i> ) de pulque natural y de pulque curado con avena; en el pulque natural además identifican a <i>Candida colliculosa</i> (anamorfo de <i>Torulaspota delbrueckii</i> )
2001	Estrada Godina et al.	Identifican en aguamiel a <i>Candida lusitanae</i> (anamorfo de <i>Clavispora lusitanae</i> ), <i>Geotrichum candidum</i> ( <i>G. candidus</i> ), <i>K. marxianus</i> var. <i>bulgarius</i> (= <i>K. marxianus</i> ), <i>Saccharomyces capensis</i> (= <i>S. cerevisiae</i> ), y a las mismas especies además de <i>Candida valida</i> (anamorfo de <i>P. membranifaciens</i> ) y <i>Saccharomyces chevalieri</i> (= <i>S. cerevisiae</i> ) y excepto a <i>C. lusitanae</i> en pulque. Determinan la capacidad <i>killer</i> de todas las cepas.

Fuentes: (Del Río ,1947; Herrera, 1953; Ruíz Oronoz, 1953; Gonçalves de Lima, 1986; Lappe y Ulloa; 1993; Godoy *et al.*, 2003) *apud* Lappe-Oliveras y Herrera-Suárez, 2014. \* Especie cuya sinonimia actual y válida no fue encontrada en las monografías y bases de datos consultadas (Kurtzman et al., 2010; base de datos de las colecciones Centraalbureau voor Schimmelcultres (CBS), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DMSZ); y Global Names Index (GNI).

## Bibliografía

- Abbas C. A. 2006. Chapter 10. Production of antioxidants, aromas, colours, flavours and vitamins by yeasts. En: Querol A., Fleet G. (eds), *Yeasts in Food and Beverages*, Springer, Berlin, 285-334.
- Alberts B., Bray D., Hopkin, K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2006. *Introducción a la biología celular*. 2a ed. Editorial Médica Panamericana, Madrid.
- 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 Res*; 25: 3389–3402. consultado en línea línea: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)
- Arce Rocha G. 2007. Levaduras aisladas de atole agrio de maíz elaborado en San Andrés Tzicuilan, Cuetzalán, Puebla, Tesis de Maestría en Ciencias, Biológicas (Sistemática), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D. 2000. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Beuchat L. R. 1987. Traditional fermented food products. En: Beuchat L. (ed.) *Food and Beverage Mycology*. van Nostrand Reinhol, New York, 269–306.
- Blomberg L. 2000. *Tequila, mezcal y pulque: lo auténtico mexicano*. Editorial Diana, México D.F.
- Buzzini P., Martini A., Cappelli F. Pagnoni U. M., Davoli P. A. 2003. Study on volatile organic compounds (VOCs) produced by tropical ascomycetous yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*; 84: 301–311.
- Caileux A., Bouchara J. P., Daniel V., Chabasee D., Allain P. 1992. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatile organic compounds produced by some micromycetes. *Chromatographia*, 34: 613–617.
- Campbell N. A., Reece J. B. 2007. *Biología*. 7a ed., Editorial Médica Panamericana, Madrid.
- Centraalbureau voor Schimmelculture (CBS). 2007. Base de datos para la identificación de levaduras, Consultado en línea <http://www.cbs.knaw.nl/>. Actualizado Febrero 2015.
- Chan G. F., Gan H. M., Ling H. L. Rashid N. A. A. 2012. Genome sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a potential producer of bioethanol and phytase. *Eukaryot Cell*; 11:1300–1301.



- Chávez A., Martínez H., Guarneros N., Allen L. Pelto G. 1998. Nutrition and psychomotor development during the first six months of life. *Salud Pública México*; 40: 111–8.
- De León-Rodríguez A., Escalante-Minakata P., Jiménez-García M. I., Ordoñez-Acevedo L. G., Flores Flores J. L. Barba de la Rosa A. P. 2008. Characterization of volatile compounds from ethnic *Agave* alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Technol Biotechnol*, 46: 448–455.
- Escalante A., Rodríguez M. A., 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 Microbiol Lett*, 235: 273–279.
- Escalante A., Giles-Gómez M., Esquivel G., Matus Acuña V., Moreno Terrazas R., López-Munguía A. Lappe-Oliveras P. 2012. Pulque Fermentation. En: Hui, Y.H. y E. Özgül (eds.) *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, 691–706.
- Escalante-Minakata P., Barba de la Rosa A., Santos L. León Rodríguez A. 2012. Aspectos químicos y moleculares del proceso de producción del mezcal. *BioTecnología*; 16: 57–70.
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F. Querol A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol*; 49: 329–337.
- 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 J Microbiol Biotechnol*; 17: 557–560
- García Cortes V., 2004, Introducción a la microbiología, 2a ed, EUNED, Costa Rica. 111-115
- García-Garibay M., López-Munguía Canales A. 2004. Bebidas alcohólicas no destiladas. En: García-Garibay M., Quintero R. R., López-Munguía C. A. *Bioteología Alimentaria*. Limusa México, D.F., 263–311.
- García-Mendoza A. 1998. *Con sabor a maguey: guía de la colección nacional de agaváceas y nolináceas del Jardín Botánico*, Instituto de Biología-UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Godoy A., Herrera T. Ulloa M. 2003. *Más allá del pulque y el tepache : las bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México*. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Antropológicas, México, D. F.

- Gonçalves Lima O. 1978. *El maguey y el pulque en los códices mexicanos*. Fondo de Cultura Económica, México, D. F.
- Guamán-Burneo M. C., Dussán K.J., Cadete R. M., Cheab M. A. M., Portero P., Carvajal-Barriga E. J., da Silva S. S., Rosa C. A. 2015. Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* f.a., sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* 108: 919–931.
- Hall T. BioEdit v 7.0.5. 2007 consultado en línea <http://www.mbio.nesu.edu/BioEdit/>. Actualizado febrero 2015
- Herrera-Solórzano M. 2008. Identificación polifásica de levaduras y bacterias ácido lácticas aisladas de aguamiel, pulque y semilla. Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México.
- Herrera-Suárez T. 1993. Semblanza del estudio de las bebidas y de los alimentos fermentados mexicanos. En: Wachter Ma. C., Lappe P. (comp.) *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. Coordinación de la Investigación Científica, Programa Universitario de Alimentos, Facultad de Química, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 21-27.
- Jacques-Hernandez C., Soto-Cruz O. N., Rutiaga M., Sifuentes-Rincón A. M. Taillandier P., Ramón-Portugal F. 2009. Ecología de levaduras del mezcal San Carlos, Tamaulipas. Consultado en línea: <https://www.researchgate.net/> . Actualizado abril 2016.
- Johnson E.A., Echavarri-Erasun C. 2011. Chapter 3. Yeast Biotechnology. En: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) *The Yeasts. A taxonomic study*, 5th ed. Elsevier Amsterdam, 21–44.
- Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. 2011a. *The Yeasts. A taxonomic study*, 5th ed. Elsevier Amsterdam.
- Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T., Robert V. 2011b. Chapter 7. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. En: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) *The yeasts a taxonomic study*, 5th ed., Elsevier Amsterdam, 87–110.
- Kurtzman C. P. 2011c. Chapter 47. *Meyerozyma* Kurtzman & M. Suzuki (2010) En: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) *The Yeasts. A taxonomic study*, 5th ed., Elsevier Amsterdam, 621–624.
- Kurtzman C. P. 2011d. Chapter 75. *Torulasporea* Lindner (1904) En: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (ed.) *The Yeasts. A taxonomic study*, 5th ed., Elsevier Amsterdam, 867–74.

- Kurtzman C.P. 2011e. Chapter 57. *Pichia* E.C. Hansen (1904) En: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) *The Yeasts. A taxonomic study*, 5th ed., Elsevier Amsterdam, 685–707.
- Kurtzman C. P. 2011f. Chapter 81. *Yamadazyma* Billon-Grand (1989) En: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) *The Yeast. A taxonomic study*, 5th ed., Elsevier Amsterdam, 919–25.
- Lachance M. A., Starmer W. T., Phaff H. J. 1988. Identification of yeasts found in decaying cactus tissue. *Can J Microbiol*, 34: 1025-1036
- Lachance M. A. 1995. Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 68: 151–60.
- Lachance M. A., Boekhout T., Scorzetti G., Fell J. W., Kurtzman C. P. 2011a. Chapter 90. *Candida* Berkhout (1923). En: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) *The Yeasts. A taxonomic study*, 5th ed., Elsevier Amsterdam, 987–1278.
- Lachance M. A. 2011b. Chapter 21. *Clavispora* Rodrigues de Miranda (1979) En: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) *The Yeasts. A taxonomic study*, 5th ed., Elsevier Amsterdam, 349–353.
- Lachance M. A. 2011c. Chapter 35. *Kluyveromyces* van der Walt (1971) En: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) *The Yeasts. A taxonomic study*, 5th ed., Elsevier Amsterdam, 471–81.
- Lappe P, Ulloa M. 1989. *Estudios étnicos, microbianos y químicos del tesgüino tarahumara*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Lappe-Oliveras P., Ulloa M. 1993. Microbiología del pulque. En: Wachter M. C., Lappe P.(Comp). *Alimentos Fermentados Indígenas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación de la Investigación Científica, Programa Universitario de Alimentos, México, D. F., 75–81.
- Lappe-Oliveras P., Ulloa M., Arce Rocha G., Cáceres Farfán M., Tapia T. R., Pérez Brito D., Larque A. 2004. Isolation and identification of the mycobiota present in *Agave fourcroydes*. Proceedings of the XI International Congress on Yeast, Yeast in Science and Technology the Quest for Sustainable Development, 15-20 agosto, Río de Janeiro, Brasil.
- 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 Res* 8:1037–1052.

- Lappe-Oliveras P, Herrera-Suárez T. 2014. Evolución de los estudios de la diversidad microbiana de las bebidas y alimentos fermentados indígenas de México, con especial referencia al pulque. En: Moreno-Fuentes A., R. Garibay-Orijel (eds.) *La Etnomicología En México. Estado Del Arte. Red de Etnoecología Y Patrimonio Biocultural (CONACyT)*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Biología (UNAM), Sociedad Mexicana de Micología, Asociación Etnobiológica Mexicana A.C., Grupo Interdisciplinario para el Desarrollo de la Etnomicología en México-Sociedad Latinoamericana de Etnobiología. México, D. F. 33–61.
- Loyola-Montemayor E. 1956. *La industria del pulque*. Departamento de Investigaciones Industriales, Banco de México, México, D. F.
- Makene V. A. 2014. Identification of non-albicans *Candida* yeasts associated with vulvovaginal candidiasis in Tanzania using a combination of multiplex PCR and DNA sequence divergence of the LSU DNAr. *Sch. Acad J. Biosci*, 2:124-131.
- Martín del Campo R. 1938. El pulque en México precortesiano. *An Inst Biol UNAM Ser Botánica*, 9:5–23.
- Mingorance-Cazorla L., Clemente-Jiménez J. M., Martínez-Rodríguez S., Heras-Vázquez F.J., Rodríguez-Vico F. 2003. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. *World J Microbiol Biotechnol*, 19: 297–304.
- Moore R. T. 1998. Chapter 5. Cytology and ultrastructure of yeasts and yeastlike fungi. En: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) *The Yeasts. A taxonomic study*. 5th ed., Elsevier. Amsterdam, 33–44.
- Nout M. J. R. 2003. Chapter 17. Traditional fermented products from Africa, Latin America and Asia. En: Boekhout T., Robert V. (eds.) *Yeasts in Food*. Woodhead Publishing, Cambridge, 451–473.
- 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. *J Agric Food Chem* 56: 3682–3687.
- O'Donell K. 1993. *Fusarium* and its near relatives. En: Reynolds D. R., Taylor J. W. Taylor (eds.) *The fungal holomorph: Miotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. CAB International, Wallingford.
- Phaff H. J., Miller M. W., Mrak E. M. 1978. *The Life of Yeasts*. 2a ed., Harvard University Press, Harvard.

- Plata C., Millán C., Mauricio J. C., Ortega J. M. 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiol* 20:217–24.
- Ramírez-Rodríguez R. 2004. El maguey y el pulque: Memoria y tradición convertida en historia, 1984-1993. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Historia. Facultad de Filosofía y Letras, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla.
- Ramírez J. F., Sánchez-Marroquín A., Álvarez M. M., Valyasebi R. 2004. Industrialization of Mexican pulque. En Steinkraus K. (ed.) *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*, 2a ed. Marcel Dekker, New York, 547-586.
- Río de la Loza L. 1864. Apuntes sobre algunos productos de maguey. *Boletín Sociedad Mexicana Geografía Estadística México* X: 531-539.
- Ruiz-Oronoz M. 1953. Estudio realizados en México sobre levaduras. IV Centenario de la Universidad Nacional Autónoma de México (1551-1951). *Memoria del Congreso Científico Mexicano, Ciencias Biológicas*. 6:127-149.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci* 74(12): 5463-5467.
- Sampaio J. P. 2011. Chapter 155. *Rhodotorula* Harrison (1928) En: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) *The yeasts a taxonomic study*, 5th ed., Elsevier Amsterdam, 1873–1927.
- Sánchez-Marroquín A. 1967. Estudio sobre la microbiología del pulque. XX. Proceso industrial para la elaboración técnica de la bebida. *Rev Latamer Microbiol Parasitol* 9: 87–90.
- SECOFI. 1972a. NMX-V-022-1972. Aguamiel. Normas Mexicanas, Dirección General de Normas. *Diario Oficial México D.F.* Actualizado 26 de septiembre 2015.
- SECOFI. 1972b. NMX-V-037-SECOFI-1972. Pulque manejado a granel. Norma Oficial Mexicana Dirección General de Normas. *Diario Oficial México D.F.* Actualizado 26 septiembre 2015.
- Secretaría de Salud. 1994. NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios.. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Dirección General de Normas. *Diario Oficial. México D.F.* Actualizado 26 septiembre 2015.
- Segura Garcia L. E. 2010. Identificación y caracterización por métodos moleculares de levaduras aisladas del proceso de elaboración del mezcal en el estado de Oaxaca. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología en la

especialidad de Biotecnología Productiva. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, México, Jalisco.

- Starmer W. T, Lachance M. A. 2011. Chapter 6. Yeast Ecology. En: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.) *The Yeasts. A taxonomic study*, 5th ed., Elsevier Amsterdam, 65–83.
- Steinkraus K., 1996, Introduction to indigenous fermented foods, en: Steinkraus K. (ed.), *Handbook indigenous fermented foods*, 2nd ed., Nueva York, 1-4
- Ulloa M., Herrera T., Lappe P. 1987. *Fermentaciones tradicionales indígenas de México*. Serie de investigaciones Sociales, Núm 6, Instituto Nacional Indigenista, México, D. F.
- Vaughan-Martini A., Martini A. 2011. Chapter 61. *Saccharomyces* Meyen ex Reess (1870) En: Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout T. (eds.). *The Yeasts. A taxonomic study*, 5th ed. Elsevier Amsterdam, 733–746.
- Verdugo-Valdez A., Segura G. L., Kirchmayr M., Ramírez R. P., González E. A., Coria R., Gschaedler M. A. 2011. Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 100:497–506.
- Wacher-Rodarte C. 2014. La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. *Revista Digital Universitaria*. 15. En línea: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art64/> Actualizado el 15 de febrero del 2016.
- Wacher-Rodarte C., Díaz-Ruíz G., Moreno-Terrazas R., Lappe-Oliveras P. 2014. Alimentos fermentados indígenas. En: Guerrero L. I., García A. B., Wacher R. C., Regalado G. C (Eds). *Microbiología de Alimentos*. Editorial Limusa, México, D.F., 373–404.
- van der Walt JP, Yarrow D. 1984. Chapter II. Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts En: Kreger-van Rij, N.J.W. (ed.) *The Yeasts* 3th ed., Elsevier Amsterdam, 45–104.
- Yarrow D. 1998. Chapter II. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast. En: Kurtzman C. P., Fell J. W. (eds.) *The yeast a taxonomic study*. 4th ed. Elsevier. Amsterdam, 45-105.