

**Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**

**División de Ciencia Animal**



Aislamiento de levaduras obtenidas de aguamiel y su caracterización en la producción de bebidas  
alcohólicas.

Por:

**ROSA ISELA NOPALA TIMOTEO**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA ALIMENTOS**

Buenvista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre 2023

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISION DE CIENCIA ANIMAL**

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Aislamiento de levaduras obtenidas de aguamiel y su caracterización en la  
producción de bebidas alcohólicas.**

Por:

**ROSA ISELA NOPALA TIMOTEO**

TESIS

Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para  
obtener el título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**APROBADA**



Dr. Mario Alberto Cruz Hernández  
**Presidente**



M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verastegui  
**Vocal**



Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda  
**Vocal**



Dra. María Elena Castelo Mejía  
**Vocal**

Saltillo, Coahuila, México

**Diciembre 2023**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

**DIVISION DE CIENCIA ANIMAL**

Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Aislamiento de levaduras obtenidas de aguamiel y su caracterización en la  
producción de bebidas alcohólicas.**

Por:

**ROSA ISELA NOPALA TIMOTEO**

TESIS

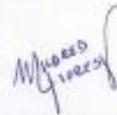
Que se somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para  
obtener el título de:

**INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Fue dirigida y aprobada por el siguiente comité Asesor:



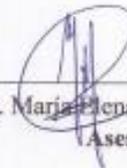
Dr. Mario Alberto Cruz Hernández  
**Director**



M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verastegui  
**Asesor**



Dra. Ruth Elizabeth Belmares Cerda  
**Asesor**



Dra. Marielena Castelo Mejía  
**Asesor**



M.C. Pedro Carrillo López  
**Coordinador de la División de Ciencia Animal**

Saltillo, Coahuila, México

**Diciembre 2023**

## DECLARATORIA DE NO PLAGIO

### DECLARO QUE:

El trabajo de investigación titulado “**Aislamiento de levaduras obtenidas de aguamiel y su caracterización en la producción de bebidas alcohólicas**” es una producción personal, donde no se ha copiado, replicado, utilizado ideas, citas integrales e ilustraciones diversas, obtenidas de cualquier tesis, obra intelectual, artículo, memoria, (en versión digital o impresa), sin mencionar de forma clara y exacta su origen o autor.

En este sentido, lo anterior puede ser confirmado por el lector, estando consciente de que en caso de comprobarse plagio en el texto o que no se respetaron los derechos de autor; esto será en objeto de sanciones del Comite Editorial y/o legales a las que haya lugar; quedando, por tanto, anulado el presente documento académico sin derecho a la aprobación del mismo, ni a un nuevo envío.

ATENTAMENTE



---

**Rosa Isela Nopala Timoteo**

## Índice principal

Agradecimientos.....	1
Dedicatoria .....	2
Abstrac.....	3
Resumen.....	4
Introducción .....	5
Objetivos.....	7
Objetivos Específicos .....	7
Justificación.....	8
Revisión de literatura .....	9
<b>Importancia del agave en México</b> .....	9
Figura 1. Morfología del agave.....	10
<i>Descripción Del Agave Salmiana</i> .....	11
Figura 2. Agave salmiana Otto ex Salm. ....	11
<i>Áreas Geográficas Donde Se Encuentra El Agave Salmiana.</i> ....	11
Figura 3. Distribución regional de los principales tipos de agave aprovechados en México.....	12
<i>Usos y aplicaciones más importantes del Agave Spp.</i> .....	13
Tabla 1. Productos obtenidos de distintas especies de agave en México.....	13
<b>Agua miel</b> .....	15
Figura 4. Producción artesanal del aguamiel .....	16
<b>Composición Química Del Agua Miel.</b> .....	17
Tabla 2. Composición fisicoquímica de aguamiel extraído de tres variedades de maguey pulquero.....	17
<i>Proceso natural de fermentación del aguamiel.</i> .....	18
Figura 5. Proceso de fermentación de aguamiel .....	19
<b>El pulque.</b> .....	20
Figura 6. Pulque .....	20
<i>Proceso de elaboración del pulque</i> .....	21
<i>Importancia Económica del pulque</i> .....	22
<b>Microorganismos del agave</b> .....	24
<b>Características morfológicas y fisiológicas de las levaduras en general</b> .....	25
Figura 8. Vista microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	27
Figura 7. Vista macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPG .....	27

<b>Fermentación:</b> .....	27
Tabla 3. Microorganismos fermentativos para la producción de alimentos fermentados. ....	28
<b>Fermentación alcohólica</b> .....	29
<b>Metodología</b> .....	31
<b>Preparación de los medios de cultivo</b> .....	31
Tabla 4. Material para formulación del medio YPD.....	31
<b>Selección de los microorganismos</b> .....	32
<b>Identificación de microorganismos</b> .....	32
<i>Figura 10. Pasos para la siembra de levaduras por la técnica de agotamiento.</i> .....	33
<b>Conservación</b> .....	33
<b>Elaboración de la fermentación de las levaduras en agua miel</b> .....	34
<b>Determinación de Azúcares:</b> .....	34
<b>PH</b> .....	35
<i>Figura 11. pHmetro o medidor de pH</i> .....	35
<b>Acidez titulable:</b> .....	35
<b>Determinación de etanol</b> .....	35
<b>Método espectrofotométrico</b> .....	36
<b>Conteo de levaduras</b> .....	36
<b>Resultados y discusión</b> .....	37
<b>Medios de cultivo:</b> .....	37
<i>Figura 12. Medio de cultivo utilizados tanto como sólidos y líquidos</i> .....	37
<b>Selección de microorganismos</b> .....	38
<i>Figura 13. Crecimiento de colonias en medio YPD</i> .....	38
<b>Identificación de microorganismos</b> .....	38
<i>Figura 14. Observación microscópica de cepas de levadura: a, b</i> .....	39
<b>Fermentación del aguamiel y YPD</b> .....	39
Figura 15. Cuantificación de azúcares totales en Aguamiel y medio de cultivo YPD .....	39
<b>Determinación de pH</b> .....	40
Figura 16. Monitoreo del pH.....	40
<b>Acidez titulable:</b> .....	41
Figura 17. Determinación de acidez .....	41
<b>Producción de etanol</b> .....	42
Figura 18. Producción de etanol en agua miel y medio de cultivo YPD.....	42

<b>Conteo de levaduras obtenidas</b> .....	43
Figura 19. Conteo de levaduras durante las diferentes horas.....	43
<b>Conclusiones</b> .....	44
<b>Bibliografía</b> .....	45

## Índice de tablas

Figura 1 Morfología del agave .....	
Tabla 1. Productos obtenidos de distintas especies de agave en México.....	13
Tabla 2. Composición fisicoquímica de aguamiel extraído de tres variedades de maguey pulquero.....	17
Tabla 3. Microorganismos fermentativos para la producción de alimentos fermentados. ....	28
Tabla 4. Material para formulación del medio YPD.....	31

## Índice de figuras

Figura 2 Agave salmiana Otto ex Salm.....	11
Figura 3. Distribución regional de los principales tipos de agave aprovechados en México .....	12
Figura 4. Producción artesanal del aguamiel.....	16
Figura 5. Proceso de fermentación de aguamiel .....	19
Figura 6. Pulque .....	20
Figura 8. Vista microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	27
Figura 7. Vista macroscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en medio YPG .....	27
Figura 10. Pasos para la siembra de levaduras por la técnica de agotamiento.....	33
Figura 11. pHmetro o medidor de pH.....	35
Figura 12. Medio de cultivo utilizados tanto como sólidos y líquidos.....	37
Figura 13. Crecimiento de colonias en medio YPD .....	38
Figura 14. Observación microscópica de cepas de levadura: a, b .....	39
Figura 15. Cuantificación de azúcares totales en Aguamiel y medio de cultivo YPD .....	39
Figura 16. Monitoreo del pH.....	40
Figura 17. Determinación de acidez .....	41
Figura 18. Producción de etanol en agua miel y medio de cultivo YPD.....	42
Figura 19. Conteo de levaduras durante las diferentes horas.....	43



## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por sus bendiciones, por iluminar mi camino en días grises, por otorgarme salud y permitirme culminar una etapa más en mi vida. Su guía ha sido mi faro en momentos de dificultad, brindándome fuerzas para seguir adelante y cuidando de mi familia.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, mi Alma Mater, le expreso mi profundo agradecimiento por abrirme las puertas de sus aulas, permitiéndome crecer y desarrollarme profesionalmente. Me siento feliz y orgullosa de haber formado parte de la comunidad butire, llevo en mi corazón los mejores momentos vividos en esta institución.

A mis padres, les agradezco por darme la vida, por su apoyo constante a lo largo de mi formación académica y por confiar en mí. A mi madre, le dedico un agradecimiento especial por su amor y cariño que me brindo además de sus consejos, que perduran en mi corazón hasta mi último día. A mi padre, gracias por todos sus esfuerzos, su trabajo incansable y su constante preocupación por mi bienestar.

Al Dr. Mario Alberto Cruz Hernández, al cual le agradezco la oportunidad de haber trabajado a su lado, por compartir sus sabios consejos, conocimientos y brindarme su apoyo moral durante esta etapa académica.

A mis primas Angelica Vergara López y Johana Vergara López, les agradezco por su apoyo, compañía y cariño en este camino. Su presencia ha sido invaluable.

A mi amiga Magdalena Sanluis Sanluis, le agradezco por los buenos momentos compartidos, por sus consejos y por ser un apoyo incondicional en mis momentos de necesidad.

También quiero mencionar a una persona especial, Esteban Hidalgo Rodríguez, quien en su momento me brindó su apoyo incondicional en los momentos más difíciles de mi vida. Agradezco su escucha comprensiva y sus palabras alentadoras, las cuales me motivaron a ser mejor cada día.

## **Dedicatoria**

Dedico esta tesis principalmente a mi Madre Eulalia Timoteo Mendoza

En memoria de mi madre, quien creyó en mí incluso cuando yo dudaba de mí misma, no me alcanzara esta vida para agradecerte por todo tu esfuerzo y sacrificio para que yo llegara hasta donde estoy ahora, este logro es tuyo y sé que desde el cielo estas feliz por ver que logre lo que te prometí. Gracias mamita, te amare hoy y siempre.

A mi Padre: Irineo Nopala Méndez, A mis hermanos: Casandra Nopala Timoteo y Leandro Nopala Timoteo

Gracias por acompañarme en este proceso brindándome su apoyo y cariño, hoy se ven cumplidos nuestros esfuerzos. Deseo de todo corazón que mi triunfo como mujer y profesionista lo sientan como el suyo propio. Son mi presente y el motivo por el cual sigo adelante, siempre estarán en mi corazón. Los amo.

**Abstrac.**

This research delves into the isolation and characterization of yeast strains obtained from aguamiel, a traditional drink extracted from various species of agave, focusing on its possible industrial applications. The study involves systematic isolation and morphological identification of yeast strains from mead samples collected from various sources. At the same time, the research addresses the broader context of agave cultivation and utilization, highlighting its importance in both traditional and industrial settings.

The isolated yeasts were subjected to purification processes to obtain concentrated and pure inoculants for subsequent experiments. The main objective is not only to evaluate the diversity of yeast species in mead, but also to understand their morphological characteristics and possible applications in the context of agave-based products. The synthesized findings highlight a rich microbial diversity in mead, with yeast strains exhibiting distinctive morphological characteristics. Furthermore, the purified inoculate show promising potential for ethanol production, indicating feasibility of using mead yeasts in industrial processes.

This study contributes knowledge about the microbial presence within aguamiel and contributes to the interdisciplinary approach to our understanding of the complex relationship between agave, aguamiel and the microbial communities involved. The results of this study have implications for both the preservation of traditional practices and the development of innovative biotechnological processes within the agave industry.

Keywords: Agave, mead, yeasts, isolation

## **Resumen**

Esta investigación se adentra en el aislamiento y caracterización de cepas de levaduras obtenidas de aguamiel, una bebida tradicional extraída de diversas especies de agave, enfocándose en sus posibles aplicaciones industriales. El estudio implica el aislamiento sistemático y la identificación morfológica de cepas de levadura a partir de muestras de aguamiel recolectadas de diversas fuentes. Al mismo tiempo, la investigación aborda el contexto más amplio del cultivo y la utilización del agave, destacando su importancia tanto en entornos tradicionales como industriales. Las levaduras aisladas fueron sometidas a procesos de purificación para obtener inoculantes concentrados y puros para experimentaciones subsiguientes. El objetivo principal no solo es evaluar la diversidad de especies de levaduras en el aguamiel, sino también comprender sus características morfológicas y posibles aplicaciones en el contexto de productos basados en agave. Los hallazgos sintetizados destacan una rica diversidad microbiana en el aguamiel, con cepas de levaduras que exhiben características morfológicas distintivas. Además, los inóculos purificados muestran un potencial prometedor para la producción de etanol, lo que indica viabilidad de utilizar levaduras de aguamiel en procesos industriales.

Este estudio aporta conocimientos sobre la presencia microbiana dentro del agua miel y contribuye al enfoque interdisciplinario a nuestra comprensión de la compleja relación entre el agave, el aguamiel y las comunidades microbianas involucradas. Los resultados de este estudio tienen implicaciones tanto para la preservación de prácticas tradicionales como para el desarrollo de procesos biotecnológicos innovadores dentro de la industria del agave.

Palabras clave: Agave, aguamiel, levaduras, aislamiento

## Introducción

Las bebidas alcohólicas elaboradas a partir del agave son un tesoro culinario y cultural que se ha forjado a lo largo de siglos, principalmente en las áridas tierras de México. El agave, una planta resistente y versátil, ha sido la fuente de inspiración para la elaboración de estas, su producción es un arte ancestral que ha evolucionado a lo largo del tiempo, pero sin embargo su procedimiento sigue siendo el mismo: transformar los azúcares en alcohol a través de la fermentación.

El *Agave salmiana* es una especie de planta suculenta nativa de México, se caracteriza por tener hojas grandes y carnosas con espinas en los bordes. Es ampliamente conocido por ser una de las especies más utilizadas en la producción de mezcal, este agave se cultiva por sus piñas, que se cocinan y fermentan para obtener el aguamiel, que luego se destila para producir mezcal. Las principales zonas en México que producen agave en mayor cantidad son: Jalisco el estado que es el epicentro de la producción de agave para la elaboración de tequila. El agave azul (*Agave tequilana Weber*) es la variedad predominante utilizada para hacer tequila en esta región, Oaxaca: es otro de los estados que es famosa por la producción de mezcal, y aquí se cultiva una amplia variedad de agaves, incluyendo el Agave espadín, el *Agave arroqueño*, el *Agave tobala* y muchos otros. Estas zonas son solo algunas de las regiones más destacadas en la producción de agave en México, pero hay otras áreas en el país donde también se cultiva agave para diferentes usos, como la producción de otras variedades de mezcal y productos derivados del agave, como pulque y aguamiel.

El aguamiel, el dulce néctar que se obtiene de ciertas especies de agave, ha sido consumida por siglos por diversas culturas en todo el mundo. Pero su potencial en la producción de bebidas alcohólicas ha sido subestimado en gran medida. Este tipo de productos incluye azúcares naturales

y nutrientes esenciales, convirtiéndola en un caldo de cultivo ideal para microorganismos, especialmente levaduras.

Normalmente se ha empleado cepas de levaduras específicas para la producción de bebidas alcohólicas. Sin embargo, se ha buscado otra alternativa para esto, que es el aislamiento de levaduras a partir del agua miel.

El aislamiento y caracterización de levaduras procedentes del agua miel desempeña un papel esencial en la producción de bebidas alcohólicas como pulque. El proceso de producción del pulque implica la fermentación natural del aguamiel, que es el líquido extraído de la piña del agave. Este proceso es más simple que el proceso de destilación utilizado en la producción de mezcal o tequila, lo que hace que la producción de pulque sea más accesible y económica.

Este aislamiento de levaduras a partir del aguamiel consiste en la extracción y cultivo de microorganismos presentes en este medio, seguido de su identificación y caracterización. Esto puede proporcionar valiosa información sobre la diversidad de levaduras presentes en el aguamiel, sus propiedades metabólicas y su capacidad para fermentar azúcares. Además, al estar trabajando con un microorganismo puro, se pueden establecer condiciones de cultivo y procesos de manera más precisa y controlada. Esto garantiza que las características y los resultados sean consistentes y reproducibles. Así mismo minimiza el riesgo de contaminación cruzada,

Por lo tanto, en base a lo anterior el aislamiento de levaduras a partir del agua miel es una base clave en este presente proyecto, ya que a partir de aquí se explorarán las técnicas y métodos utilizados para extraer y purificar cepas microbianas endémicas de este medio ambiente, presentes en este medio específico, lo cual nos permitirá identificar y clasificar las levaduras con propiedades innovadoras.

## Objetivos

### Objetivo General

Aislar microorganismos de muestras de aguamiel de *Agave Salmiana* seleccionando las que presenten características como levaduras para realizar una identificación macro y microscópica además de evaluar su uso en la producción de bebidas alcohólicas utilizando agave.

### Objetivos Específicos

- Aislar e identificar morfológicamente levaduras de muestras de aguamiel.
- Purificar las levaduras obtenidas para la producción del inóculo.
- Evaluar cinéticamente la producción de etanol utilizando aguamiel como sustrato de las levaduras aisladas.

## **Justificación**

La industria de las bebidas alcohólicas está en constante búsqueda de innovación y diversidad de productos. La inclusión de levaduras de aguamiel en la producción de bebidas alcohólicas podría llevar a la creación de nuevos perfiles de sabor y productos únicos que atraigan a consumidores y entusiastas de bebidas artesanales. El aislamiento de levaduras de aguamiel puede contribuir a la sostenibilidad de las regiones productoras de agave al promover un uso más completo y eficiente de esta planta emblemática. Esto podría tener un impacto positivo en la conservación del agave, una planta que enfrenta desafíos de sobreexplotación y agotamiento.

Aislar y seleccionar levaduras procedentes de la fermentación del jugo de la piña va a contrarrestar la problemática de inhibición por producto, la inhibición por sustrato y la contaminación; ya que se ha demostrado que es más efectivo el uso de cultivos autóctonos de levaduras, pues estas se encuentran adaptadas a las condiciones climáticas de la zona, además optimizan e impulsan una mejora progresiva en el rendimiento y productividad del proceso de etanol.

Explorar este campo puede conducir a avances significativos en la industria de las bebidas alcohólicas, además de promover la sostenibilidad y la valorización de los recursos naturales.

## **Revisión de literatura**

### **Importancia del agave en México**

Entre las plantas más conspicuas del paisaje mexicano, en especial de las zonas áridas y semiáridas de México, están los agaves o magueyes, considerados especies clave en estas regiones, tanto por su abundancia como por la cantidad de recursos que proporcionan a otros organismos.

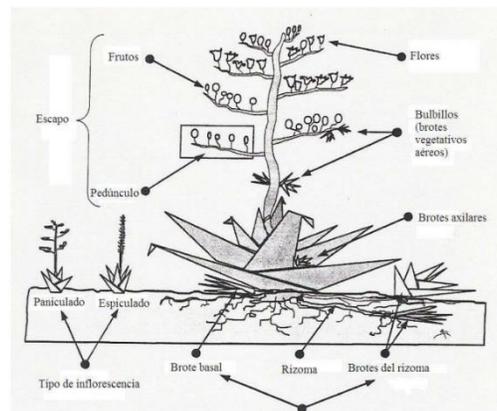
En México, los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de las hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos. Los magueyes fueron una de las primeras plantas aprovechadas por los pobladores de Mesoamérica para alimentarse, de lo cual se hallan restos en cuevas en el Valle de Oaxaca, el de Tehuacán y en Coahuila en este último sitio, además de restos de fibras mascadas, se recuperaron cordeles de ixtle y sandalias elaboradas con fibras de maguey. El empleo como alimento y fibras pervive en México desde hace por lo menos siete mil años.

Los grupos humanos que se establecieron en estas regiones desarrollaron uno de los principales centros agrícolas de América. Al aprovechar los magueyes, estos pueblos hicieron de México su centro de domesticación y diversificación mediante la selección humana, pues los escogían por sus fibras, el aguamiel o las altas cantidades de azúcares que les proporcionaba —lo que posteriormente se denominaría en nahuatl como mexcalli, es decir el tallo y bases de las hojas (cabezas) cocidos. Es por esto que los agaves no sólo tienen su máxima expresión de diversidad morfológica, filogenética y evolutiva en México, sino también cultural, ya que los seres humanos que lo han poblado han sabido aprovechar al máximo los beneficios que producen. (García, 2007)

-Descripción del género *Agave*

El género *Agave* es originario de América. De sus aproximadamente 200 especies, 150 se encuentran en México, además que 36 pertenecen a categorías infra específicas, lo que en conjunto constituye un total de 186 taxones. El gran número de especies endémicas de México sugiere que la diversidad del grupo se debe, principalmente, a aspectos fisiológicos que han permitido adaptarse localmente a hábitats heterogéneos; parte de la diversidad también puede atribuirse a los procesos de domesticación de varias especies de agave. (García, 2007)

La morfología de las plantas del género *Agave* (Figura 1) son monocotiledóneas, sus hojas, también denominadas pencas, se muestran en disposición arrosada, son generalmente rígidas y en su mayoría presentan dientes aculeiformes. La roseta se considera perenne debido a que requiere de 8 a 20 años para madurar (Gentry, 1982;Hernández, 2022). La penca puede tener forma lineal, espatulada, lanceolada, deltoide, oblonga u ovada; el tallo puede ser acaulescente o caulescente. Son plantas hermafroditas que poseen inflorescencias en espiga, con flores de color amarillo verdoso. Su fruto es capsular, leñoso, alargado y dehiscente; cada cápsula contiene numerosas semillas aplanadas y de testa negra (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2007; Esparza-Ibarra et al., 2015; Hernández, 2022).



**Figura 1.** *Morfología del agave*

### ***Descripción Del Agave Salmiana***

El maguey manso o mãäxo, maguey verde o hok' uada, maguey palmilla y xa'mni, en español y otomí respectivamente (Figura 2), es una de las especies con más usos en México. Pertenece a la familia Agavaceae y se reconoce por sus hojas anchas, fuertes, suculentas, de color verde con largos ápices acuminados y sigmoideos, de tallo corto y macizo, con forma de roseta y tamaño que van de 1.5 a 3.4 m de altura y hasta 5 m de diámetro. Tiene flores carnosas de tépalos dimorfos, estrechos, doblados hacia el interior. Se le encuentra en terrenos planos y montañosos, en suelos profundos o superficiales (Garcia, 2007)



***Figura 1. Agave salmiana Otto ex Salm.***

### ***Áreas Geográficas Donde Se Encuentra El Agave Salmiana.***

Agave salmiana es una especie que se considera endémica de México, con poblaciones silvestres y cultivadas. Se ubica principalmente en las zonas áridas y semiáridas del centro de México, desde Coahuila hasta Oaxaca (García-Mendoza, 1998; Cortes & Basurto, 2008). A continuación, en la figura 3 se presenta la distribución geográfica en la República Mexicana de los tres principales tipos de agave que se aprovechan para la producción de bebidas alcohólicas (tequila, mezcal y pulque). En la región occidente de México que comprende los estados de Jalisco, Michoacán, Guanajuato y Nayarit se cultiva en su mayoría el agave tequilero, el cual es mayormente Agave

tequilana (Weber) y es aprovechado para la elaboración del tequila, bebida altamente apreciada a nivel mundial.



**Figura 2.** Distribución regional de los principales tipos de agave aprovechados en México

Otra bebida alcohólica característica de México es el mezcal, el cual se obtiene del agave mezcalero teniendo a especies como *A. angustifolia*, *A. esperrima* Jacobi, *A. weberi* cela, *A. patatorum* y *Agave salmiana* (NOM-070-SCFI-1994;Guzman & Contreras, 2018) siendo Oaxaca y Guerrero los principales productores de mezcal. En el sur- sureste, principalmente Chiapas, Quintana Roo y Yucatán se encuentran *Agave sisalana* y *A. fourcroydes* los cuales son empleados principalmente para la elaboración de fibras y textiles.

Por último, la región centro y norte que va desde las sierras veracruzanas y poblanas hasta las planicies coahuilenses y duranguenses se presenta en abundancia el agave forrajero o pulquero que son aprovechados para la extracción del aguamiel, que tras ser fermentado se obtiene el pulque. (Consejo Regulador del Tequila, 2015; SIAP, 2015;Guzman & Contreras, 2018).

**Usos y aplicaciones más importantes del Agave Spp.**

Las aplicaciones tradicionales y contemporáneas del Agave son notables por su versatilidad y significado cultural . Considerando sus usos más importantes, los magueyes se dividen en tres grupos: los textileros, los pulqueros y los mezcaleros.

Su savia se emplea fundamentalmente para la elaboración de bebidas, las cuales pueden ser de dos tipos: el primero se consume fresco como Aguamiel o fermentado como Pulque, el segundo destilado como Mezcal o Tequila (Roca y Llamas, 1901; Medina y Orozco, 1901; Walton, 1977; Granados, 1993; José, 1993; García, 1998; Magallán, 1998; Ayala y Ruiz, 1999; Magallán y Hernández, 2000; Palma, 2000; Parsons y Darling, 2000;Gonzalez, 2005). A continuación, en la tabla 1 se muestran los principales productos de algunas especies de agave.

**Tabla 1. Productos obtenidos de distintas especies de agave en México.**

<b>Especie</b>	<b>Producto</b>	<b>Referencia</b>
Agave tequiliana F.A.C Weber	Tequila	Bautista-Justo et al.,2001; Perez-Hernandez et al.,2016
Agave sisalana perrine ex Engelm	Fibra natural	Martin et al.,2009.
Agave fourcroydes Lem	Fibra natural	Abreu et al.,2007.
Agave angustifolia Haw	Mezcal	Parra-Negrete et al.,2010; Perez-Hernandez et al.,2016

Agave cupreata Trel & A.Berger	Mezcal	Perez-Hernandez et al.,2016
Agave rhodacanthla Trel	Mezcal	Perez-Hernandez et al.,2016
Agave americana L.	Producción de aguamiel, pulque, ornamento y sogas.	Parra-Negrete et al.,2010
Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck	Producción de aguamiel y pulque	Parra-Negrete et al.,2010
Agave lechuguilla Torr.	Fibra natural	Parra-Negrete et al.,2010; Castillo-Quiroz et al.,2013

Se han obtenido de diversas especies de maguey, sustancias de enorme interés para la industria, mismas que se dividen en tres tipos: a) por fermentación alcohólica del aguamiel, b) obtención de proteína y c) investigaciones sobre: vitaminas, giberelinas, dextranas, aminoácidos, ensilaje del Agave, mieles, jarabes de fructosa y ácidos orgánicos. Al igual que productos tales como: gomas, bases para pinturas y barnices, celulosa, pulque enlatado con sabores de frutas, refrescos sin alcohol obtenidos del pulque, licor bajo en gradación alcohólica y vino de excelente calidad (Guerrero, 1980;Gonzalez, 2005). Como material secundario en las industrias del tequila, mezcal y fructosa, resultan los bagazos de maguey, los 29 cuales tienen un uso potencial en la fabricación de tableros de aglomerado de calidad y con altas posibilidades de industrialización (Montes y Palacios, 1982; Gonzales-Alvarez,2005). Las hojas de Agave salmiana pueden utilizarse como

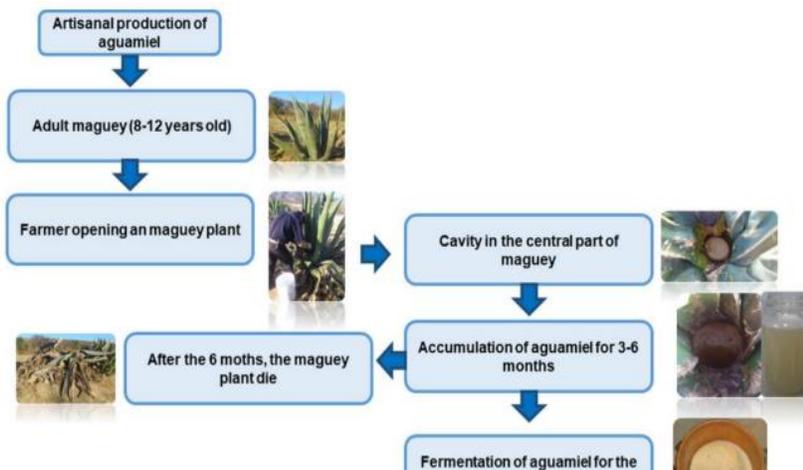
alimento para el ganado, constituyendo un excelente forraje ya que en promedio alcanza un 62% de digestibilidad. Además de que en el proceso no hay pérdidas de materia orgánica ni se usan reactivos contaminantes (Gentry, 1982; Zúñiga y Grellmann, 1982; Tello 1983; Tello, 1988; Aguirre et al., 2001; Gonzalez, 2005). La cutícula se utiliza para envolver diversos guisos (García, 1998; José y García, 2000; Gonzalez, 2005).

En Coahuila e Hidalgo, el pulque se utiliza como levadura para la elaboración de pan y para la preparación de diversos alimentos. Las flores también se comen de diversas maneras: los botones se cortan, se pican finamente y se hierven y fríen con cebolla, chile y sal; también se cuecen al vapor con condimentos en una cacerola tapada; se guisan con huevo y/o con quelites. El escapo floral (quiate) cocido, se puede masticar como dulce. De las brácteas, se obtiene una fibra suave llamada ixtle, que se utiliza para la elaboración de diversas prendas (Medina y Quezada, 1975; Gentry 1976; García, 1998; Magallán 1998; Salinas, 2000; Gonzalez, 2005).

### **Agua miel**

El aguamiel de savia de agave es una savia fresca comestible producida por varias especies de agaves, entre ellas *A. americana*, *A. atrovirens*, *A. salmiana*, *A. mapisaga* y *A. ferox* (Leal-Díaz et al., 2015; Villarreal-Morales et al., 2019). El aguamiel es considerado una bebida nutracéutica por la presencia de una amplia clase de compuestos con alta capacidad antioxidante, efecto protector contra el cáncer, antiinflamatorio, antiobesidad y otras propiedades como hipocolesterolemia (Serment-Moreno et al., 2017; Villarreal-Morales et al., 2019). Este subproducto lo obtienen los agricultores (Figura 4) del maguey adulto (8-12 años), primero cortando el vapor floral (meyolote) y algunas hojas (pencas), luego se hace una cavidad en la parte central de la planta, luego se acumula el aguamiel. en la cavidad durante 3 a 6 meses, pero la cavidad se sella con hojas de

magüey o piedras para evitar la contaminación por insectos o animales y proporcionar un ambiente séptico (Valadez-Blanco et al., 2012; Villarreal-Morales et al., 2019). Durante este tiempo, se raspa la cavidad todos los días y se recolecta la savia manualmente dos veces al día hasta que el magüey se haya secado. El rendimiento de aguamiel de un magüey es de alrededor de 900 litros en total (Tovar-Robles et al., 2011; Santos-Zea et al., 2016a; Enríquez-Salazar et al., 2017; Villarreal-Morales et al., 2019); sin embargo, el volumen total extraído del magüey se ve afectado por diversos factores ambientales como los nutrientes del suelo, las especies de agave, la disponibilidad de agua y la madurez de las plantas (Leal-Díaz et al., 2016; Villarreal-Morales et al., 2019). En algunas ocasiones, los agricultores fermentan el aguamiel en recipientes de plástico para la producción de pulque, una bebida alcohólica tradicional mexicana no destilada que actualmente se consume en la Meseta Central de México (Torres-Rodríguez et al., 2014; Villarreal-Morales et al., 2019). El aguamiel es un jugo dulce parecido a una savia de incoloro a ámbar que se obtiene del corazón del magüey y es un producto rico en azúcares como fructosa 32%, glucosa 26% y sacarosa 8%. En esta bebida se han encontrado otros compuestos bioactivos como minerales, vitaminas, gomas, proteínas, FOS, inulina y microorganismos probióticos.



**Figura 3.** Producción artesanal del aguamiel

### Composición Química Del Agua Miel.

En la actualidad, son pocos los estudios de la caracterización química de este subproducto del Agave, causando una limitación para proponer las posibles opciones de empleo para fines alimentarios, nutracéuticos o medicinales. Según lo reportado por algunos autores el aguamiel es una bebida de sabor dulce, ácida o ligeramente alcalina rica en proteínas y carbohidratos como fructosa, glucosa y sacarosa por lo cual este producto natural resultaría ser un buen candidato para ser empleado en la industria de la fermentación (Flores et al., 2008;(Muñiz-Márquez et al., 2013)). En el siguiente cuadro se muestra un estudio realizado por Flores et al., (2008) acerca de la composición química de aguamiel extraído de diversas variedades de magueyes pulqueros (A. salmiana, A. duranguensis y A. americana) comúnmente nombrados magueyes manzo, cenizo y amarillo respectivamente (Tabla 2). Se aprecia que el aguamiel está constituido principalmente por proteínas y azúcares y que a pesar de que son diferentes variedades, la composición fisicoquímica no varía drásticamente. Esto puede deberse posiblemente a que la función de esta savia en la planta es la misma, independientemente de la variedad del maguey.

**Tabla 2. Composición fisicoquímica de aguamiel extraído de tres variedades de maguey pulquero.**

	Manzo	Cenizo	Amarillo
Densidad (g/L)	1.29	1.26	1.23
pH	6.30	6.40	6.60
Indice de refracción	1.35	1.35	1.36
Solidos solubles (°Brix)	11.44	11.01	12.67

Acidez (%)	1.65	1.41	1.47
Humedad (%)	87.00	87.90	86.00
Proteínas (g/L)	3.41	3.11	2.49
Cenizas (g)	0.53	0.41	0.48
Azúcares reductores (g/L)	1.63	1.97	1.06
Glucosa (mg/L)	2.31	2.31	2.50
Fructosa (mg/L)	4.70	4.92	4.50

### ***Proceso natural de fermentación del aguamiel.***

El proceso de fermentación inicia en el maguey (Figura 5), donde se encuentran microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de exopolisacáridos (Escalante et al., 2004; Cervantes & Pedroza, 2007). Estos microorganismos transforman de manera natural parte de los azúcares disponibles en aguamiel, sin embargo, el proceso se acelera por la adición de un inóculo iniciador llamado semilla (una porción de pulque previamente producido). El tiempo de fermentación puede durar de 12 a 48 horas a 25° C, cuidando que el recipiente no tenga ninguna sustancia que inhiba los microorganismos mesofílicos (Detergentes, perfumes, desinfectantes, entre otros). A medida que pasa el tiempo se presentan cambios importantes como un incremento en el porcentaje de etanol y formación de exopolisacáridos como β-glucanos y dextranos; que generan un incremento en la viscosidad transformando el fluido de newtoniano a no newtoniano (Chellapandian M et al., 1998; Cervantes & Pedroza, 2007). Los consorcios microbianos son frecuentemente encontrados en varias bebidas fermentadas y se considera que esta interacción positiva es un mecanismo evolutivo que favorece

a todas las poblaciones presentes en el consorcio con respecto a la captación de nutrientes, eliminación de ciertos metabolitos que pueden llegar a ser tóxicos si se acumulan en la bebida y control de flora microbiana alterante de la fermentación (Yu & Zhang, 2003; Cervantes & Pedroza, 2007). La literatura reporta que a partir del pulque se pueden recuperar diversos grupos microbianos clasificados como: subdivisión Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus (Lactobacilluscepa ASF360 AF157050, Lactobacillus acidophilus M99740, L. hilgardii M58521, L. plantarum D79210 y Leuconostoc mesenteroides spp mesenteroides), subdivisión proteobacteria (Acetobacter pomorium AJ001632, Zymomonas mobilis AF281034) y hongos levaduriformes pertenecientes a los géneros (Sacharomyces cerevisiae, Saccharomyces sp) (Escalante et al.,2004; Cervantes & Pedroza, 2007).



**Figura 4.** *Proceso de fermentación de aguamiel*

### **El pulque.**

El pulque, metoctli, iztac octli o poliuhqui octli como lo conocían los aztecas, es una de las bebidas fermentadas alcohólicas tradicionales no destiladas más antiguas de México (Figura 6). Se cree que esta bebida tiene su origen en Mesoamérica. La hipótesis es que el pulque se utilizaba como suplemento dietético y alimento amortiguador de riesgos en la antigua Teotihuacán (150 a. C. a 650 d. C.) (Correa-Ascencio et al., 2014; Ramírez-Guzmán et al., 2019). El pulque se consumía en ceremonias religiosas, por sus propiedades nutricionales, promotoras de la salud y contenido alcohólico (Valadez-Blanco et al., 2012) Es una bebida de color blanco, viscosa, ligeramente ácida y con un contenido alcohólico entre 4 y 7°GL (Escalante et al., 2016; Ramírez-Guzmán et al., 2019). El pulque se produce por fermentación de la savia (aguamiel) obtenida de la planta Maguey, principalmente de las especies *Agave atrovirens* y *Agave americana*; sin embargo para su producción también se pueden utilizar otras especies como *Agave ferox*, *Agave mapisaga* y *Agave salmiana*. (Torres-Maravilla et al., 2016). El proceso de fermentación es espontáneo tradicionalmente realizado por la flora natural presente en la savia (microorganismos autóctonos), aunque es posible utilizar como iniciador un pulque previamente fermentado.



*Figura 5. Pulque*

### ***Proceso de elaboración del pulque***

La producción del pulque se lleva a cabo en cuatro etapas generales: (1) castración del maguey, (2) raspado y extracción del aguamiel, (3) preparación de la semilla y (4) fermentación del pulque. En la castración de maguey, se destruye el pedúnculo floral embrionario que rodea el capullo floral en la planta madura (5 a 10 años de crecimiento) de maguey. Se eliminan las hojas centrales de la planta para dejar un hueco en el centro de la planta. Finalizado este proceso, la planta se deja en proceso de maduración durante 3 meses. En el raspado y extracción de aguamiel, se raspa la superficie de la cavidad para favorecer la producción de savia. La savia (aguamiel) fluye y se acumula en la cavidad. El aguamiel acumulado se extrae dos veces al día. Este líquido se almacena en recipientes de plástico. En la preparación de semillas se prepara el inóculo para la fermentación, en general este es una porción del pulque previamente producido. En esta etapa se agregan 2L de pulque fermentado a 20L de aguamiel fresco, se incuba a temperatura ambiente durante 1 a 4 semanas hasta obtener las características de acidez y alcohol deseadas. Y finalmente, en la fermentación del pulque, el aguamiel fresco se filtra y se transfiere a cualquier recipiente para su fermentación. El aguamiel se fermenta durante 12 a 24 h en madera, arcilla o, más comúnmente, en recipientes de plástico (Escalante et al., 2016;Ramírez-Guzmán et al., 2019). Existen diferentes parámetros para determinar la calidad y grado de fermentación en el pulque entre los que se encuentran la viscosidad, debido a la síntesis de exopolisacáridos por el microorganismo, la acidez y el contenido de alcohol. Estos parámetros están relacionados con el tipo de Fermentación que se produce durante el proceso: fermentación viscosa, ácida y alcohólica. El proceso es estático y se realiza en condiciones no asépticas, por lo que la bebida tiene una gran población de microorganismos (Giles-Gómez et al., 2016;Ramírez-Guzmán et al., 2019). Estos

microorganismos son una mezcla de bacterias y levaduras como *Zymomonas mobilis*, *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc kimchii*, *Candida lusitanae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Microbacterium arborescens*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Acetobacter pomorum*, *Gluconobacter oxydans* y *Hafnia alvei* (González-Vázquez et al., 2015).

### ***Importancia Económica del pulque***

A principios y mediados del siglo XX, el pulque representó un recurso económico potencial en el centro de México y todavía se consume en la región, aunque no hay mucha información sobre su estabilidad microbiológica (Gómez-Aldapa et al., 2011; Ramírez-Guzmán et al., 2019). Es importante mencionar que el principal productor de pulque es el estado de Hidalgo, que en 2010 produjo más de 206 millones de litros de pulque, equivalente al 82% de la producción nacional total, seguido de Tlaxcala con el 13.3% y el Estado de México con 2,58% (SAGARPA, 2015, 2017; Ramírez-Guzmán et al., 2019). El consumo de pulque a nivel nacional es bajo, principalmente se consume en los estados de Guadalajara, Estado de México y Puebla. Actualmente existen diferentes planes de exportación para enviar pulque a diferentes países de América, Europa y Asia. Sin embargo, actualmente solo se exportan productos de agave con 21% de alcohol a Estados Unidos (179,630L/año) y España (8397L/año) (Breña Cervantes et al., 2010; Ramírez-Guzmán et al., 2019).

#### **-Diversidad microbiana asociada al pulque**

La diversidad microbiológica del pulque es muy alta (Galindo, 2007; Luis et al., 2019). De ella se pueden recuperar más de 50 géneros de microorganismos diferentes dependiendo del tipo de Agave utilizado. La fermentación alcohólica, ácida y viscosa del aguamiel es realizada por un consorcio microbiano compuesto por levaduras, bacilos Gram positivos y cocobacilos Gram

negativos, los cuales están presentes en todas las etapas del proceso. Los recuentos más bajos se encuentran en las primeras materias primas como el aguamiel y la semilla (Cervantes & Pedroza, 2007; Luis et al., 2019). Este resultado está asociado con las características iniciales del aguamiel que es un líquido fresco no fermentado rico en azúcares de fácil asimilación y proteínas que mantiene algunas poblaciones autóctonas en espera de las condiciones ambientales y nutricionales apropiadas para su propagación (Botes et al., 2007; Luis et al., 2019). Al iniciarse la fermentación del aguamiel los cambios químicos que se presentan en el sustrato propician el desarrollo y sucesión de diversos grupos microbianos como sigue (Yu y Zhang, 2003; Luis et al., 2019):

1. Bacterias productoras de ácido láctico de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (especies homo y heterolácticas), que incrementan la acidez de la bebida.
2. Levaduras no-*Saccharomyces*, *Saccharomyces* y bacterias (*Zymomonas mobilis* ssp. *mobilis*) que transforman los azúcares en etanol y otros metabolitos secundarios que repercuten en el perfil sensorial de la bebida.
3. Bacterias productoras de dextranos (*Leuconostoc* spp.) que confieren la viscosidad al pulque.
4. Bacterias acéticas (*Acetobacter* spp.) que junto con las bacterias ácido-lácticas acidifican la bebida.

En cada estadio del proceso de fermentación se han identificado levaduras y bacterias que persisten o reemplazan a otras especies (Herrera-Solórzano et al., 2015; Luis et al., 2019). En aguamiel se han identificado las levaduras *Candida lusitanae* y *Kluyveromyces marxianus*, y las bacterias *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc citreum* y *Acetobacter orientalis*. · En pulque las levaduras *K. marxianus* y *S. cerevisiae*, y las bacterias *Lactobacillus* sp. y *Leuconostoc lactis*. · En la semilla las levaduras *K. marxianus*, *S. cerevisiae* y *Saccharomyces paradoxus* y las bacterias *Lactobacillus* sp. En el pulque existe predominancia de

algunos géneros: con un 98% están *Saccharomyces* sp., *Zymomonas* sp. y *Lactobacillus* sp. (Cervantes & Pedroza, 2007; Luis et al., 2019). Los consorcios microbianos se encuentran frecuentemente en varias bebidas fermentadas y se considera que esta interacción es un mecanismo evolutivo que favorece a todas las poblaciones presentes en el proceso para mejorar la captación de nutrientes, eliminación de metabolitos que pueden llegar a ser tóxicos si se acumulan en la bebida y para el control de la flora microbiana alterante de la fermentación (Lappe-Oliveras et al., 2008; Luis et al., 2019) .

### **Microorganismos del agave**

A pesar de la importancia ecológica y económica de los agaves, es poco lo que se sabe acerca de los microorganismos que interactúan con estas plantas. Los estudios realizados en este contexto, han estado enfocados principalmente en el aislamiento e inoculación de microorganismos (bacterias y hongos) en distintas especies como *A. deserti* (CUI & NOBEL, 1992; Desgarenes, 2016), *A. angustifolia* (Bautista-Cruz et al., 2015; Desgarenes, 2016), *A. tequilana* (Pimienta-Barrios et al., 2009; Martínez-Rodríguez et al., 2014; Desgarenes, 2016), *A. americana* (Martínez-López et al., 2009; (Desgarenes, 2016)), *A. potatorum* (Carballar-Hernández et al., 2013; Desgarenes, 2016) y *A. victoria-reginae* (Obledo et al., 2003; Desgarenes, 2016). Algunos de estos reportes en las diferentes especies de Agave, han mostrado efectos benéficos como producto de la colonización de algunos microorganismos. Es el caso de los hongos micorrízicos, en cuya presencia se registra una mejoría en la obtención de agua y nutrientes por parte de las plantas (CUI & NOBEL, 1992; Camargo-Ricalde et al., 2003; Pimienta-Barrios et al., 2009; Desgarenes, 2016). Efectos similares, además del incremento de la actividad fotosintética, el contenido de azúcares y un mayor crecimiento de las plantas, se observaron cuando las plantas de Agave

establecieron asociaciones con hongos endófitos (Obledo et al., 2003; Desgarenes, 2016), bacterias diazótrofes (Ruiz et al., 2011; Desgarenes, 2016) y solubilizadoras de fosfatos (Bautista-Cruz et al., 2015; (Desgarenes, 2016)). En conjunto, estos reportes sugieren que las interacciones que los agaves establecen con sus microorganismos juegan un papel importante en la salud y productividad de estas plantas. Considerando lo anterior, y que los agaves son plantas con metabolismo CAM adaptadas a condiciones extremas de temperatura y humedad, el análisis del microbiota asociado con dichas plantas podría brindar una nueva perspectiva acerca de las interacciones planta-microorganismo y su función en la adecuación de las plantas en las zonas áridas.

### **Características morfológicas y fisiológicas de las levaduras en general**

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de organismos unicelulares, incluyendo especies patógenas para plantas y animales, así como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad (Gonzales, 2003; Suárez-Machín et al., 2016).

Las levaduras han sido utilizadas, desde la antigüedad, en la elaboración de cervezas, pan y vino, pero los fundamentos científicos de su cultivo y uso en grandes cantidades fueron descubiertos por el microbiólogo francés Louis Pasteur en el siglo XIX (Pelizer et al., 2003; Hernandez et al., 2003; ;Suárez-Machín et al., 2016).

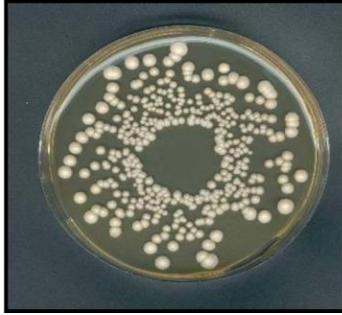
Se conocen cepas diferentes y específicas para cada labor (panificación, destilería, producción de extractos de levadura y uso en animales). (Alvarado, 2011; Suárez-Machín et al., 2016).

Las levaduras son organismos eucariotas con gran diversidad respecto a su tamaño, forma y color (Figuras 7 y 8). Son consideradas hongos unicelulares y generalmente sus células son ovaladas, pero también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Son mayores que las

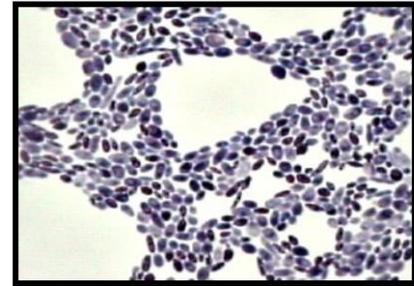
bacterias, alcanzando un diámetro máximo de entre cuatro y cinco  $\mu\text{m}$ . Se reproducen por fisión binaria o gemación y algunas pueden ser dimórficas o bifásicas y crecen como micelio bajo condiciones ambientales especiales (Ochoa y Vazquez, 2004; Perez, 2007; Suárez-Machín et al., 2016). Son resistentes a antibióticos, sulfamidas y otros agentes antibacterianos de forma natural. Se conoce la secuencia completa de su genoma y se mantiene en constante revisión, lo que ha permitido la manipulación genética de los casi 6600 genes que codifican el genoma de levadura (Bergogne, 1995; Suárez-Machín et al., 2016).

Los constituyentes macromoleculares de las levaduras incluyen proteínas, glicoproteínas, polisacáridos, polifosfatos, lípidos y ácidos nucleicos (Walker, 1998; Suárez-Machín et al., 2016). Su pared celular comprende entre 15 y 25 % de la masa seca de la célula y sus principales componentes son polisacáridos (80-90 %), esencialmente glucanos y mananos, con una menor contribución de quitina, además de proteínas y lípidos (Zinser y Daum, 1996; Rojas 1995; Suárez-Machín et al., 2016).

El contenido de proteínas en las levaduras varía entre el 40 y el 50 % de su peso seco y tienen una excelente calidad en función de su perfil de aminoácidos esenciales (Otero et al., 1995; Valionote, 2011 ;Suárez-Machín et al., 2016). La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero les resulta favorable un medio ligeramente ácido con un pH entre 4,5 a 6,5. Son capaces de competir con la bacteria *Streptococcus bovis*, el principal productor de ácido láctico en el rumen, por azúcares solubles (Chaucheyras et al., 1997 ;Suárez-Machín et al., 2016). Las levaduras más estudiadas en el mundo son cepas provenientes de las especies: *Saccharomyces cerevisiae* (levadura panadera comercial), *Kluyveromyces fragilis* y *Candida utilis*. Estas especies son consideradas como aptas para el consumo humano o GRAS (por las siglas en inglés de Generally Recognized As Safe). (Anon, 2005; Suárez-Machín et al., 2016).



**Figura 7.** Vista macroscópica de *Saccharomyces cerevisiae* en medio YPG



**Figura 8.** Vista microscópica de *Saccharomyces cerevisiae*

### **Fermentación:**

Genéricamente, el término 'fermentación' se refiere a la transformación catalítica de sustancias orgánicas, principalmente carbohidratos, mediante enzimas de origen microbiano (Cappelli y Vannucchi 1990; Baglio, 2014). Estas modificaciones pueden representar alguna alteración no deseada; por otra parte, la acción de las enzimas microbianas por parte de microorganismos seleccionados puede utilizarse para la producción segura y conveniente de productos alimenticios. La Tabla 1.1 muestra una pequeña selección de diferentes formas de vida con aplicaciones industriales. Los procesos fermentativos industriales para aplicaciones alimentarias se pueden subdividir aproximadamente en dos categorías:

- 1.-Procesos homofermentativos. Se obtiene la producción de un único compuesto. Por ejemplo: fermentación alcohólica; producto obtenido: alcohol etílico.
- 2.- Procesos heterofermentativos. Se obtienen dos o más productos finales. Ejemplo: la fermentación acetona-butanol-etanol (ABE) se puede utilizar con el objetivo de producir acetona, alcoholes etílicos, isopropílicos y butílicos (Park et al. 1989;Baglio, 2014).

**Tabla 3. Microorganismos fermentativos para la producción de alimentos fermentados.**

Organismo	Tipo	Principales aplicaciones alimentarias
Saccharomyces cerevisiae	Levadura	Vinos, cervezas, levadura de panadería, panes de trigo y centeno, quesos, verduras, probióticos
Saccharomyces bayanus	Levadura	Leches fermentadas
Streptococcus thermophilus	Levadura	Yogurt, quesos duros y blandos
Lactobacillus bulgaricus sub. Delbrueckii.	Bacteria	Yogurt
Propionibacterium shermanii	Bacteria	Queso suizo
Lactobacillus casei	Bacteria	Quesos, carnes, verduras, probióticos.
Gluconobacter suboxidans	Bacteria	Vinagres
Penicillium roquefortii	Moho	Queso gorgonzola
Penicillium camembertii	Moho	Camembert y queso brie
Aspergillus oryzae	Moho	Salsa de soja, sake
Candida famata	Levadura	Carnes

Los microorganismos fermentativos pueden ser bacterias u hongos. Por ejemplo, varias bacterias útiles pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Nitrobacter* y *Acetobacter*.

En cuanto a los hongos, las formas de vida más conocidas con importancia industrial son las levaduras y los mohos.

Las condiciones ambientales afectan la supervivencia de los microorganismos y la duración de las fermentaciones relacionadas; en consecuencia, varios procesos fermentativos pueden detenerse debido a la acción inhibidora de los principales productos de fermentación. Por ejemplo, la fermentación alcohólica se detiene si el porcentaje de alcohol etílico producido alcanza entre el 14 y el 16 %. De todos modos, los principales procesos fermentativos están relacionados con la transformación de carbohidratos (Baglio, 2014)

### **Fermentación alcohólica**

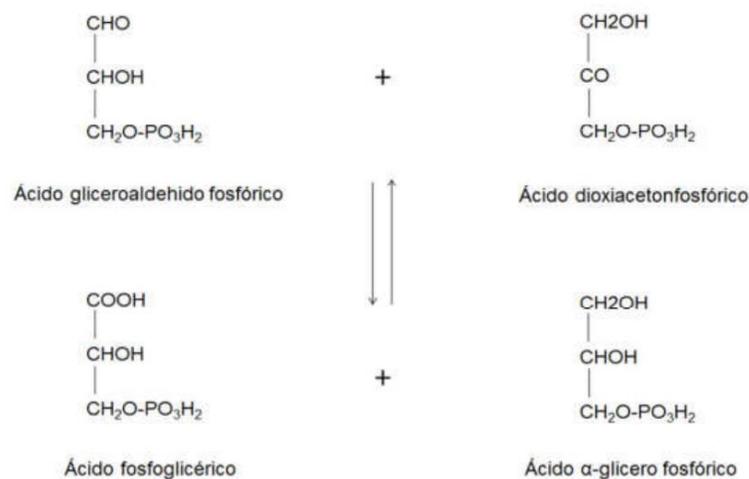
La fermentación alcohólica, denominada también como fermentación del etanol o incluso fermentación etílica, es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los hidratos de carbono, por regla general azúcares: como pueden ser glucosa, fructosa, sacarosa y almidón, para obtener como productos finales: un alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en forma de gas y unas moléculas de Adenosín Trifosfato (ATP) que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico (Aguilera y Molina, 2011; Ovando, 2018).

Este proceso tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares, como las levaduras, en ausencia de oxígeno, para ello disocian las moléculas de glucosa y obtienen la energía necesaria para sobrevivir, produciendo el alcohol y CO<sub>2</sub> como desechos consecuencia de la fermentación. Las levaduras y bacterias causantes de este

fenómeno son microorganismos muy habituales en las frutas y cereales y contribuyen en gran medida al sabor de los productos fermentados. Una de las principales características de estos microorganismos es que viven en ambientes completamente carentes de oxígeno, sobre todo durante la reacción química, por lo que se dice que la fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico (Aguilera y Molina, 2011; Ovando, 2018).

La fermentación alcohólica se debe a una enzima soluble que producen las levaduras, la zimasa, que en realidad es un complejo de enzimas. La fermentación comienza con la reacción entre los ácidos gliceroaldehidofosfórico y dióxiacetonfosfórico que producen simultáneamente ácido fosfoglicérico y ácido  $\alpha$ -glicero fosfórico. (Casado, 2006; Ovando, 2018). Como se muestra en la

Figura 9.



**Figura 9.** Inicio de la fermentación alcohólica

El tipo de fermentación alcohólica de la cerveza es en donde la acción de la zimasa segregada por la levadura convierte los azúcares simples, como la glucosa y la fructosa, en alcohol etílico y dióxido de carbono. En detalle, la diastasa, la zimasa, la invertasa y el almidón se descomponen en azúcares complejos, luego en azúcares simples y finalmente en alcohol. Generalmente, la fermentación produce la descomposición de sustancias orgánicas complejas en otras simples, gracias a una acción catalizadora (Muñoz de Cote, 2010; Ovando, 2018).

## Metodología

Los procedimientos experimentales fueron realizados en el departamento de ciencia y tecnología de alimentos en el laboratorio de genética de microorganismos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, utilizando como sustrato aguamiel, el cual se obtuvo de manera comercial.

### Preparación de los medios de cultivo

Medio PDA: Se suspendieron 7.8 gramos del medio en 200 ml de agua destilada, se mezclaron bien y se calentaron con agitación suave hasta su completa disolución, dejando hervir durante un minuto. Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar a una temperatura entre 45-50°C y se vació en placas de Petri estériles. Posteriormente, se sembraron 100 µL de sustrato y se inoculó las placas con la muestra previamente procesada de acuerdo a los procedimientos internos establecidos. Se dejó incubar de 24 a 72 horas.

Medio YPD: Se formulo medio de cultivo YPD, con las siguientes cantidades mostradas en la (Tabla 4), disueltas en 200 ml de agua destilada.

**Tabla 4. Material para formulación del medio YPD**

Material	Cantidad (g/200mL)
Extracto de levadura	2.0 gr
Peptona	4.0 gr
Dextrosa	4.0 gr
Agar	3.0 gr

Posteriormente se esterilizo en autoclave a 121 C, por 15 minutos y se vertió en cajas Petri esterilizadas, después se procedió a sembrar 100  $\mu$ L de sustrato y se dejó incubar de 24 a 72 h.

### **Selección de los microorganismos**

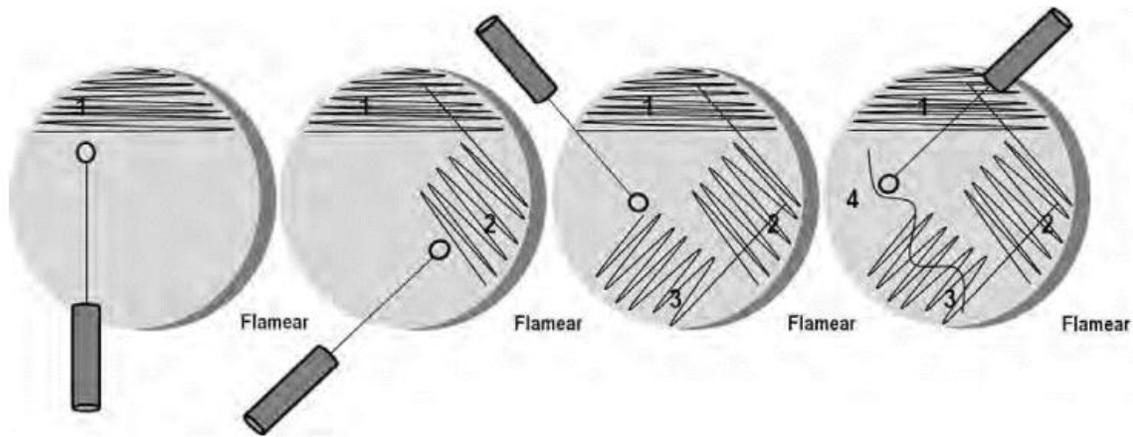
En el proceso de selección de colonias de levaduras para el resembrado por estriado de agotamiento, se dio preferencia de selección a colonias con morfología característica, destacando su uniformidad en tamaño y forma, textura lisa y definida, así como un color distintivo. Estas colonias demostraron un crecimiento rápido y saludable durante el periodo de incubación, indicando su adaptación al medio de cultivo. Por lo tanto, se eligieron las colonias con estas características para su conservación.

### **Identificación de microorganismos.**

Después de incubar 72 h. se observó al microscopio por medio del método de tinción de Gram, y se notó que además del crecimiento de levaduras se dio el de bacterias, por lo cual se realizó el proceso de purificación.

### **Purificación y conservación**

Para purificar las cepas, se utilizó el método por estrías de agotamiento como se muestra en la (Figura 10).



**Figura 10.** Pasos para la siembra de levaduras por la técnica de agotamiento.

El propósito de esta técnica fue diluir el inóculo mientras realizaba estrías en la superficie del agar. Para llevar a cabo la siembra, dividí la caja en cuatro cuadrantes, sé esterilizo el asa en el mechero, se tomó el inóculo y se comenzó a rayar la superficie del agar en los cuatro cuadrantes consecutivos, esterilizando el asa posteriormente sin tomar nuevamente el inóculo. Después las cajas sembradas de esta manera se incubaron a temperatura 30 C. Con esta técnica de siembra, se asegura el encontrar colonias de las levaduras aisladas, al menos en el cuarto cuadrante, correspondiente a la última estría realizada.

### **Conservación**

Una vez que la colonia fue purificada, se procedió a sembrarla en un caldo YPD. La incubación se llevó a cabo a 30°C durante un período de 5 días con agitación constante. Al culminar el tiempo de fermentación, se llevó a cabo una mezcla con una solución crio-protectora que consistía en leche descremada al 10% y glicerol al 10%. Cada cepa fue mezclada en una proporción 1 a 1 con la mencionada solución crioprotectora, utilizando tubos cónicos de 2 ml. Posteriormente, estos tubos fueron almacenados en condiciones de congelación hasta el momento de su utilización.

### **Elaboración de la fermentación de las levaduras en agua miel**

Para la preparación del inóculo de cada levadura seleccionada en caldo YPD se resembró 100 µL en cajas Petri en cultivo sólido YPD, y se incubó por 72 h para el crecimiento de colonias de las levaduras. Se preparó una solución de Tween 80 al 0.1% y se esterilizó a 121 °C por 15 min en autoclave. Después se agregaron 10 ml de esta solución a cada caja de las cepas seleccionadas y se rasparon las colonias utilizando una L de vidrio de la solución obtenida (levadura-Tween 80) se tomaron 500 microlitros para inocular en los frascos de fermentación.

La fermentación se realizó utilizando frascos de 300 ml con 50 ml de medio de caldo de cultivo, se realizaron dos muestras, en una se preparó caldo YPD y en la otra muestra agua miel. En los frascos de fermentación previamente esterilizados se inocularon 500 microlitros de cada levadura para iniciar el proceso de fermentación. Los frascos de fermentación se mantuvieron en una incubadora con agitación a 30 °C con una agitación de 150 rpm por 5 días tomando muestra cada 24 h. Cada 24 h se tomaron muestras de 2 mL y se almacenaron en tubos cónicos en congelación (-20 °C) para su posterior análisis.

### **Determinación de Azúcares:**

Para la determinación de azúcares totales se mezclaron en tubos de ensayo con una repetición de X2 colocados en una gradilla, mismos que a su vez estaban sumergidos en un bato de hielo, 50 µL de muestra más 200 µL de agua más 250 µL de fenol al 5% más 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> agregado cuidadosamente y lentamente por las paredes del tubo, se agitaron cuidadosamente y se llevaron a ebullición durante 10 min a una temperatura de 90 °C. Posteriormente se analizaron en un refractómetro a 480 nm.

## PH

Para realizar la medición de pH, se hizo mediante el pHmetro o medidor de pH que es un instrumento científico que mide la actividad del ion hidrógeno en soluciones acuosas, indicando su grado de acidez o alcalinidad expresada como pH. Es como se muestra en la (Figura 11).



*Figura 11. pHmetro o medidor de pH*

### **Acidez titulable:**

Se tomaron 5 mL de agua destilada más 1/2 mL de muestra en un matraz de Erlenmeyer, al cual se le agregaron 4 gotas de fenolftaleína al 1% a cada una de las muestras, en una repetición exponencial a la 6 por dos tratamientos, se colocó en una bureta un volumen conocido NaOH 0.1 (Hidróxido de sodio 0.1 N) y se tituló la muestra hasta el punto de viraje (rosa).

### **Determinación de etanol**

Para la determinación de etanol se utilizó el método colorimétrico para la cuantificación de etanol ( Udegbunam & Anosike, 2018; Sumbhate, 2012).

-Preparación de solución de Dicromato preparado.

Para la preparación de la solución stock en 50 mL de agua destilada se agregó 5000 mg de dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ).

-Preparación de buffer de acetato (pH 4.3)

Esta solución se preparó utilizando 0.199 g de acetato de sodio ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) y 1.77 mL de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) en 100 mL de agua destilada.

-Preparación de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a una concentración 1N

Se preparo ácido sulfúrico 1N midiendo con precisión 4.9 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en 95.1 mL de agua.

H <sub>2</sub> O	3	2.5	2.250	2	1.750	1.50
Etanol	1	1.5	1.750	2	2.250	2.50

### Método espectofométrico

En tubos de ensayo se agregó 300  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras más 500  $\mu\text{L}$  de dicromato preparado más 500  $\mu\text{L}$  de buffer de acetato más 2.5 mL de ácido sulfúrico preparado, todo esto por duplicado. Después se homogenizaron las muestras y se dejaron incubar durante 120 minutos a temperatura ambiente, durante este tiempo se dio una solución verde-marrón de la cual se midió de cada una de las muestras la absorbancia a una longitud de onda de 578 nm en un espectrofotómetro.

### Conteo de levaduras

Se preparo medios de cultivo solido YPD en cajas Petri para permitir el crecimiento microbiano, previamente se esterilizo agua destilada para las diluciones, después se mezcló 500  $\mu\text{L}$  de agua destilada con 500  $\mu\text{L}$  de muestra en tubos de ensayo, para realizar las diluciones de cada microorganismo (de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ), posteriormente se esterilizaron en una autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos. Posteriormente se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de la última dilución en medio de cultivo sólido y se incubaron de 24-48 h. para observar el crecimiento de microorganismos.

## Resultados y discusión

Los resultados que se presentan en la investigación se realizaron en departamento de ciencia y tecnología de alimentos de la universidad.

En la elaboración de los medios se obtuvieron los siguientes resultados.

### Medios de cultivo:

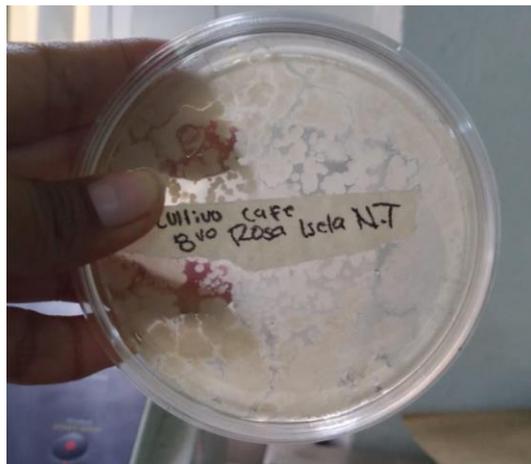
Para el cultivo de las levaduras se utilizaron 2 medios uno de YPD y otro a base de aguamiel, a continuación, en las (Figuras 12) se muestran los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de los microorganismos. Los frascos que son color blanco pertenecen al agua miel y los que presentan un color café pertenecen a cultivo en liquido YPD, y el medio que se muestra en la caja Petri pertenece a cultivo solido YPD.



*Figura 12. Medio de cultivo utilizados tanto como sólidos y líquidos*

### Selección de microorganismos

En el procedimiento de selección de colonias de levaduras destinadas al resembrado, se priorizó la elección de colonias que exhibieron características morfológicas distintivas. En la figura 13 se mostró el crecimiento tanto de colonias grandes como pequeñas, mostrando un color cremoso y formas de crecimiento uniformes.



*Figura 13. Crecimiento de colonias en medio YPD*

### Identificación de microorganismos

Se mostro contaminación al momento de identificar los microorganismos que habían crecido en el medio, la observación de presencia de bacterias además de las levaduras se hizo notoria en la primera observación. A continuación, en la figura 14 inciso a) se muestra el crecimiento de levaduras y bacterias desde el punto de vista macroscópico, una vez que se tomó la levadura para ser purificada se muestra en el inciso b) por medio de tinción de Gram se observa macroscópicamente la aparición únicamente de levaduras.

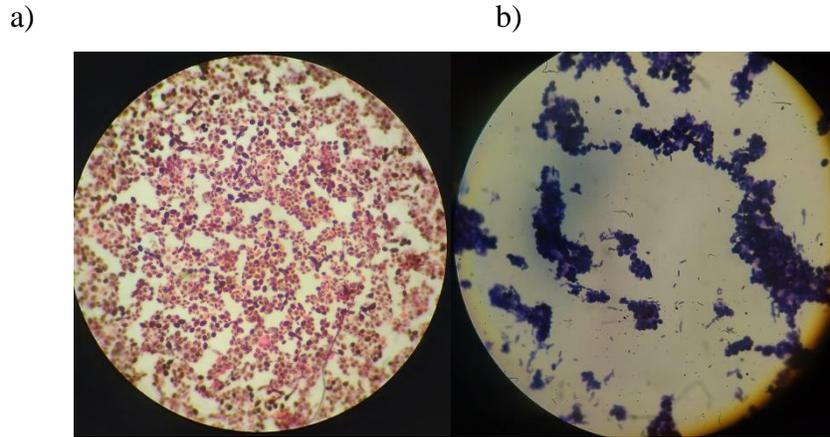


Figura 14. Observación microscópica de cepas de levadura: a, b.

### Fermentación del aguamiel y YPD

El contenido de azúcares totales se determinó aplicando el método Dubois. En la figura 15 se muestran los resultados obtenidos de azúcares totales de las de ambos tratamientos monitoreados cada 24 h.

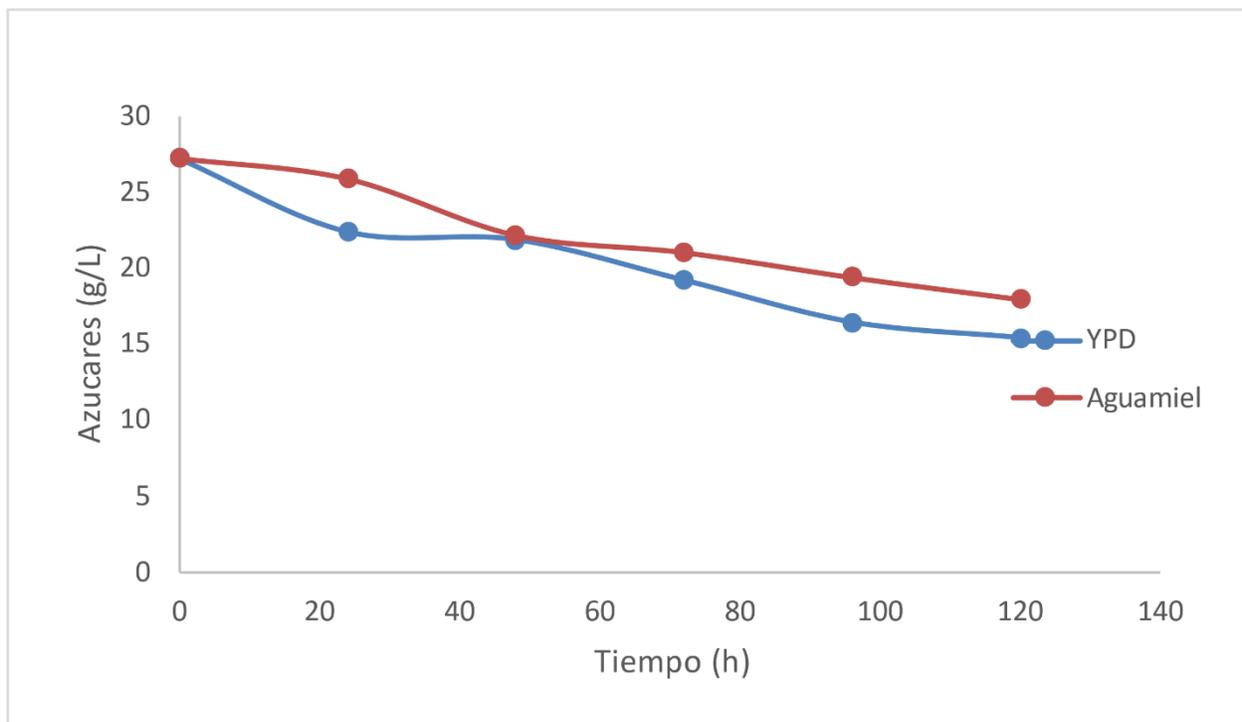


Figura 15. Cuantificación de azúcares totales en Aguamiel y medio de cultivo YPD

A continuación, en las muestras del tratamiento de Agua miel nos indica que tiene un máximo de 27 g/L al inicio de la fermentación y finalizan con una concentración mínima de 17 g/L en la hora 120, mientras que, en las muestras de YPD las concentraciones de azúcares reductores tienen un máximo de 27 g/L al inicio de la fermentación y finalizan con una concentración mínima de 15 g/L en la hora 120. Tanto como el agua miel y YPD inician con la misma concentración de azúcares reductores, pero YPD finaliza con una concentración menor que la de aguamiel, asimismo se puede notar que la concentración de ambos disminuye al aumentar el tiempo. Esto quiere decir que por una diferencia mínima la levadura en medio YPD está metabolizando con mayor velocidad el sustrato.

### Determinación de pH

En la figura 16 se muestra la variación de pH de cada muestra con la variación del tiempo transcurrido durante la fermentación.

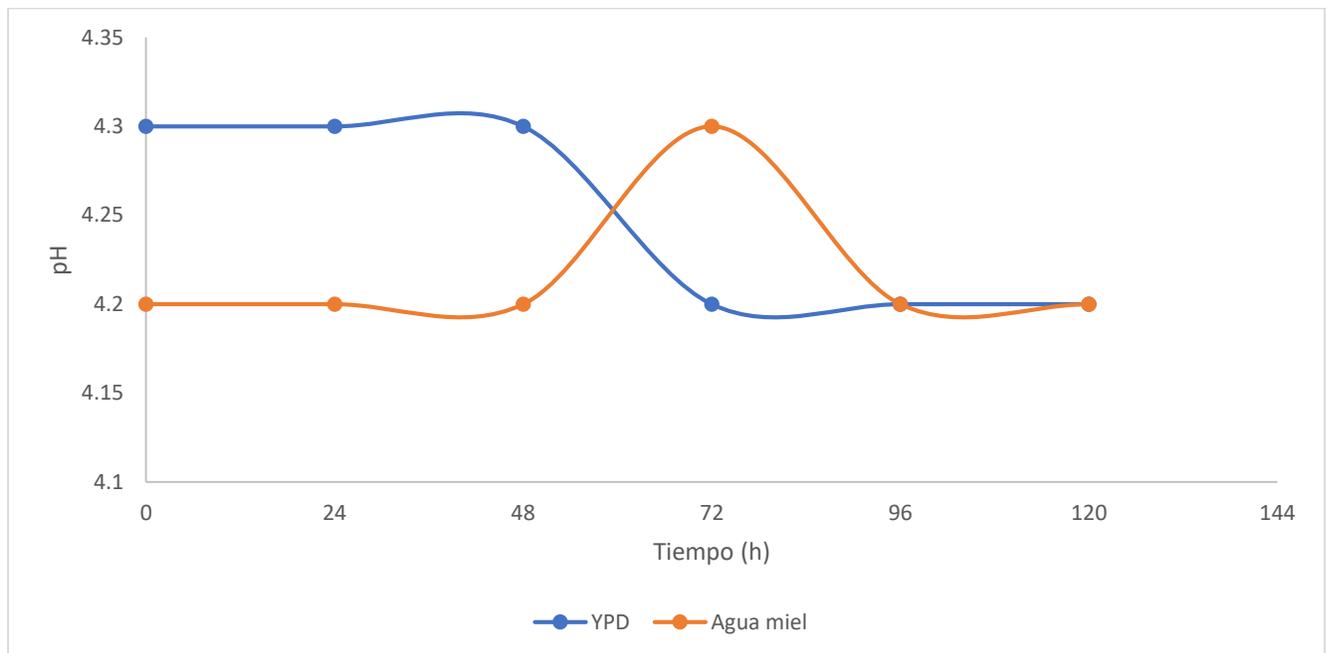
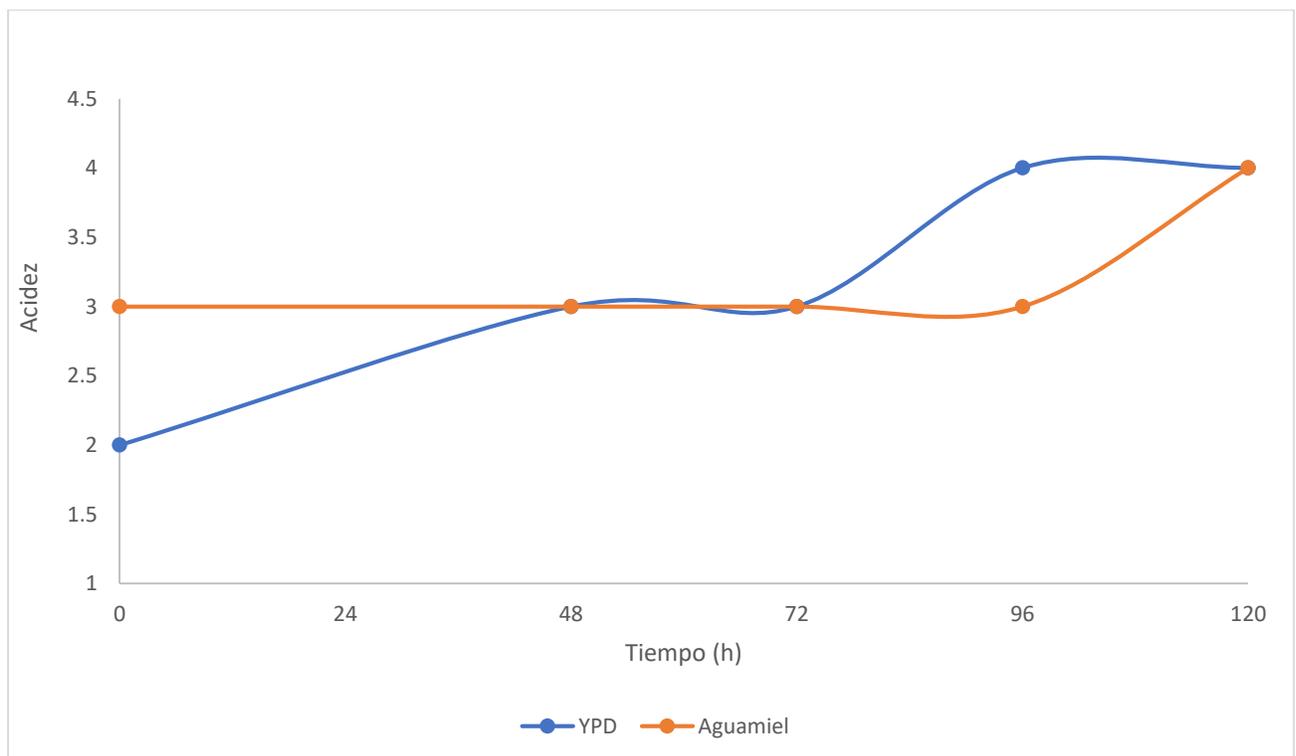


Figura 16. Monitoreo del pH

En la figura nos muestra que el pH de ambas muestras se mantiene constantes en el YPD con un pH de 4.3, mientras que en el agua miel con un pH de 4.2, a las 72 h la muestra de aguamiel muestra un aumento de pH a 4.3, pero después de 24 h vuelve a ser constante con 4.2, y la muestra de YPD a la hora 72 h disminuye a 4.2 manteniéndose constante durante las horas restantes. Esto nos muestra que durante su fermentación se encuentran en un rango óptimo de pH.

### Acidez titulable:

En la figura 17 se muestran los resultados de acidez titulable de ambos tratamientos (YPD y Aguamiel), en base al tiempo.

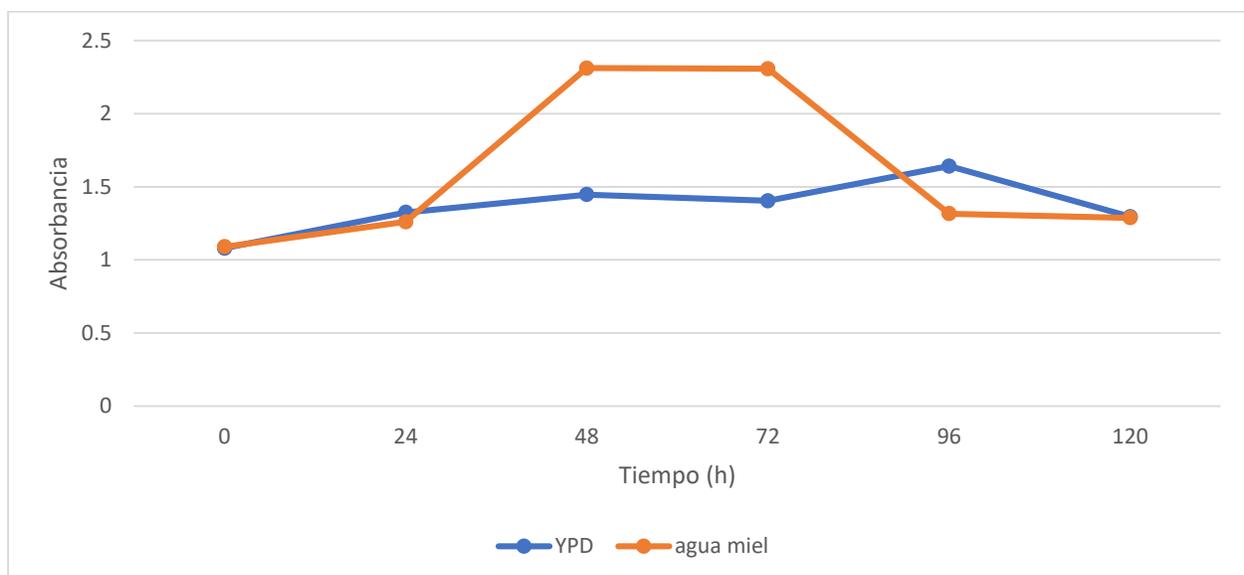


**Figura 16. Determinación de acidez**

En la figura nos muestra que la acidez del agua miel dentro de las 96 h se mantiene constante y en las últimas 24 h tiene un pequeño aumento, mientras que en la muestra de YPD mientras transcurren las horas su acidez va aumentando.

### Producción de etanol

En la figura 18 se muestra la producción de etanol que se obtuvo en las dos muestras en base al tiempo, monitoreándose cada 24 h.

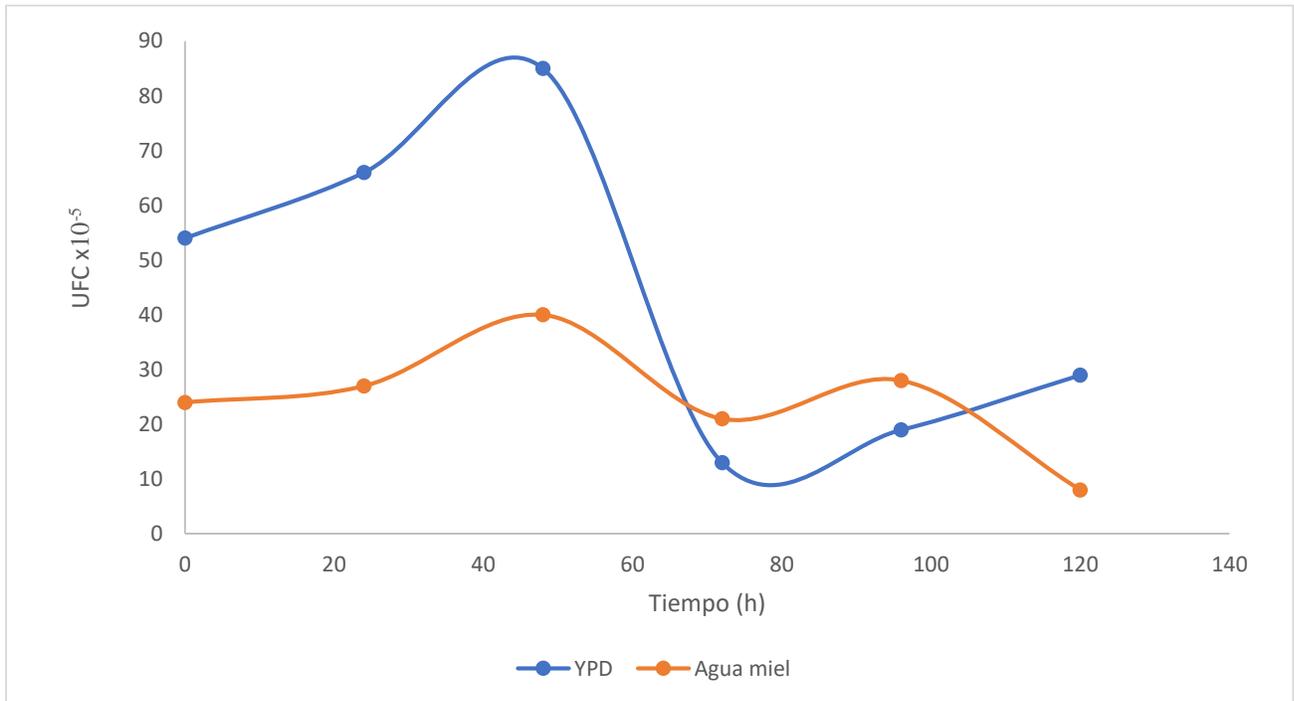


**Figura 17. Producción de etanol en agua miel y medio de cultivo YPD**

A continuación, en las muestras se puede notar que ahí mayor producción de etanol en el medio de agua miel dentro de las 24 - 72 h, que es cuando las levaduras están en su mayor punto de fermentación, después de las 72 h es notorio que la producción ya es más baja, mientras que en la muestra de medio YPD podemos notar que la producción de etanol es más lenta, por ende podemos deducir que tiene una fermentación más lenta.

### Conteo de levaduras obtenidas

El conteo de levaduras obtenidas se hizo mediante diluciones. A continuación, en la figura 19 se muestran el conteo de levaduras durante las diferentes horas.



**Figura 18. Conteo de levaduras durante las diferentes horas.**

En la figura se muestra que la producción máxima de levaduras se dio en la muestra de YPD en las 48 h, pero tuvo una disminución notoria a las 72 h y en el monitoreo restante tuvo un crecimiento no tan elevado. En tanto a la muestra de aguamiel tuvo su producción máxima a las 48 h, pero con forme aumento el tiempo tuvo un descenso notorio.

### **Conclusiones**

- Se logró aislar y describir morfológicamente cepas de levaduras procedentes de muestras de aguamiel. La variedad morfológica observada sugiere la existencia de distintas especies, lo cual aporta información sobre el microbiota presente en el aguamiel.
- La purificación de las levaduras fue realizada bajo estas condiciones, obteniendo un inóculo concentrado y libre de impurezas. La viabilidad y pureza de las cepas aisladas son aspectos cruciales para asegurar una fermentación eficiente en las siguientes etapas del proceso.
- La producción de etanol utilizando aguamiel como sustrato, se obtuvieron resultados concretos de los beneficios de su uso potencial.
- Las cepas de levaduras aisladas demostraron una notable capacidad para fermentar el aguamiel dentro de las 48-72 h, generando niveles significativos de etanol. Al igual se logró notar que utilizando aguamiel se da una fermentación más rápida.

## Bibliografía

- Baglio, E. (2014). Chemistry and Technology of Yoghurt Fermentation. *Springer*, 25–33. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-07377-4>
- Bautista-Cruz, A., Martínez-Gallegos, V., Martínez-Martínez, L., & Gutiérrez, G. M. (2015). Effect of phosphate solubilizing bacteria on the growth of *Agave angustifolia* Haw. (maguey espadín). *Pakistan Journal of Botany*, 47(3), 1033–1038. <https://ipn.elsevierpure.com/es/publications/effect-of-phosphate-solubilizing-bacteria-on-the-growth-of-agave->
- Carballar-Hernández, S., Palma-Cruz, F. J., Hernández-Cuevas, L., & Robles, C. (2013). Arbuscular mycorrhizal potential and mycorrhizal fungi diversity associated with *Agave potatorum* Zucc. in Oaxaca, Mexico. *Ecological Research*, 28(2), 217–226. <https://doi.org/10.1007/S11284-012-1008-7/METRICS>
- Cervantes, M., & Pedroza, A. (2007). El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *Nova*, 5, 135–146.
- Cortes, L., & Basurto, F. (2008). *Agave salmiana* Otto ex Salm. *Jardín Botánico, Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México*.
- CUI, M., & NOBEL, P. S. (1992). Nutrient status, water uptake and gas exchange for three desert succulents infected with mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 122(4), 643–649. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.1992.TB00092.X>
- Desgarenes, D. (2016). *EL MICROBIOMA DE LOS AGAVES: LA COMPOSICIÓN Y EL POTENCIAL FUNCIONAL DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS*. CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.
- García, A. (2007). LOS AGAVES EN MEXICO. *Ciencias*, 087, 14–23. <http://redalyc.uaemex.mx>
- Gonzalez, M. (2005). *REVISIÓN TAXONÓMICA DE LA SECCIÓN Salmianae Berger DEL GÉNERO Agave L. (AGAVACEAE)*. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.
- González-Vázquez, R., Azaola-Espinosa, A., Mayorga-Reyes, L., Reyes-Nava, L. A., Shah, N. P., & Rivera-Espinoza, Y. (2015). Isolation, Identification and Partial Characterization of a *Lactobacillus casei* Strain with Bile Salt Hydrolase Activity from Pulque. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(4), 242–248. <https://doi.org/10.1007/S12602-015-9202-X/METRICS>
- Guzman, R., & Contreras, J. C. (2018). Aguamiel and its fermentation: Science beyond tradition. *Mexican Journal of Biotechnology*, 3(1), 1–22. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2018.3.1.1>
- Hernández, V. (2022). *CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE AGAVES PULQUEROS (Agave spp.) DE LA REGIÓN OTOMÍ HUITZILAPAN,*

- Luis, G. M., Caballero, V. P., González, W. R., Roberto, L., Díaz, D., Martínez Hernández, J. J., Reyna González, W., & Roberto Domínguez Díaz, L. (2019). Valor nutricional y medicinal del pulque. *Journal of Negative and No Positive Results*, 4(12), 1291–1303. <https://doi.org/10.19230/JONNPR.3148>
- Muñiz-Márquez, D. B., Rodríguez-Jasso, R. M., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J. C., & Aguilar-González, C. N. (2013). Artisanal Production of Aguamiel: A Traditional Mexican Beverage. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*.
- Ovando, L. G. (2018). ELABORACIÓN DE HIDROMIEL MEDIANTE FERMENTACIÓN ARTESANAL DE LA MIEL DE ABEJA COMO ESTRATEGIA DE MARKETING SUSTENTABLE. <https://ri.ujat.mx/handle/20.500.12107/3462>
- Ramírez-Guzmán, K. N., Torres-León, C., Martínez-Medina, G. A., De La Rosa, O., Hernández-Almanza, A., Álvarez-Pérez, O. B., Araujo, R., González, L. R., Londoño, L., Ventura, J., Rodríguez, R., Martínez, J. L., & Aguilar, C. N. (2019). Traditional Fermented Beverages in Mexico. *Fermented Beverages: Volume 5. The Science of Beverages*, 605–635. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815271-3.00015-4>
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 50(1), 20–28. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>
- Torres-Maravilla, E., Lenoir, M., Mayorga-Reyes, L., Allain, T., Sokol, H., Langella, P., Sánchez-Pardo, M. E., & Bermúdez-Humarán, L. G. (2016). Identification of novel anti-inflammatory probiotic strains isolated from pulque. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(1), 385–396. <https://doi.org/10.1007/S00253-015-7049-4/METRICS>
- Valadez-Blanco, R., Bravo-Villa, G., Santos-Sánchez, N. F., Velasco-Almendarez, S. I., & Montville, T. J. (2012). The Artisanal Production of Pulque, a Traditional Beverage of the Mexican Highlands. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4(2), 140–144. <https://doi.org/10.1007/S12602-012-9096-9/METRICS>
- Villarreal-Morales, S. L., Muñiz-Márquez, D. B., Michel-Michel, M., González-Montemayor, Á. M., Escobedo-García, S., Salas-Tovar, J. A., Flores-Gallegos, A. C., & Rodríguez-Herrera, R. (2019). Aguamiel a Fresh Beverage from Agave spp. Sap with Functional Properties. *Natural Beverages: Volume 13: The Science of Beverages*, 179–208. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816689-5.00007-9>