

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO



Escuela Superior de Apan

TESIS DE LICENCIATURA

Aislamiento, identificación y caracterización de acetobacterias provenientes del pulque

Para obtener el título de

Licenciada en Ingeniería en Biociencias

P R E S E N T A

Carmen Guadalupe González Granillo

Director

Dra. Teresa Romero Cortes

Codirector

Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra

Apan, Hgo., México a 23 de agosto de 2024





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Escuela Superior de Apan
Campus Apan

Apan, Hgo., a 13 de julio de 2024
Número de control: ESap-315/2024
Asunto: Autorización de impresión de tesis

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
PRESENTE

Por este medio le notifico que el jurado asignado a la pasante de la licenciatura en Ingeniería en Biociencias **Carmen Guadalupe González Granillo** (398828) a quienes les presentó el trabajo para su titulación en la modalidad de tesis "**Aislamiento, identificación y caracterización de acetobacterias provenientes del pulque**", después de su revisión autorizó la impresión.

A continuación, se presentan las firmas de conformidad de los miembros de este jurado:

PRESIDENTE: Dr. Martín Peralta Gil

SECRETARIO: Dr. Víctor Hugo Pérez España

PRIMER VOCAL: Dra. Teresa Romero Cortes

SEGUNDO VOCAL: Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra

TERCER VOCAL: Dr. José Esteban Aparicio Burgos

SUPLENTE 1: Dra. Sonia Herrera Monroy

SUPLENTE 2: Dr. Juan Manuel Rivera Ramírez

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"



Dr. Jorge Zuno Silva
Director de la Escuela Superior de Apan



Carretera Apan-Calpulalpan Km. 8,
Colonia Chimalpa Tlalayote, Apan, Hidalgo; C.P. 43900
Teléfono: 771 71 72000 ext. 5800, 5801
esap@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres, quienes no solo me dieron la oportunidad de estudiar una carrera universitaria, sino que también han sido mi soporte diario, incluso en los momentos más difíciles que hemos enfrentado como familia.

A mi abuela Carmen, cuya memoria vive en mi corazón y sigue inspirándome cada día, aunque ya no esté físicamente con nosotros.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría mostrar mi más profundo agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Teresa Romero Cortes. Su paciencia y comprensión contribuyeron a la finalización de este proyecto. Sus consejos y su motivación me impulsaron a desarrollarme académicamente y personalmente. Ha sido un gusto haber aprendido y trabajado con usted.

Agradezco a mi codirector, el Dr. Jaime Alioscha Cuervo Parra por participar en el término de este trabajo.

A mis padres: María del Rosario y Leopoldo, y mis hermanos: Leonardo y Leonel, por su amor y apoyo en todos los aspectos de mi vida, y motivación para no darme por vencida en el transcurso de la carrera.

A mis amigos: Eneyda, Irma, Sandra, Gaby, Gustavo, Liz, Luz, Karen y Adán, quienes me brindaron su amistad incondicional a lo largo de estos años. Un agradecimiento especial a Eneyda, por estar siempre dispuesta a escucharme y aconsejarme en todo momento; y a Irma por la hermandad creada desde el inicio de nuestra carrera.

A mis compañeras: Nazareth y Luisa que me ofrecieron su compañía y amistad durante el desarrollo de nuestras tesis.

Por último, agradezco a la Escuela Superior de Apan por facilitarme el espacio y equipo para la elaboración de mi tesis.

RESUMEN

El proceso de fermentación del pulque da comienzo durante la obtención del aguamiel del mezontete del maguey, gracias a la flora microbiana propia de la planta. Las bacterias ácido acéticas (BAA) pertenecen a la familia Acetobacteraceae, y se clasifican en los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*; se encuentran en nichos alcohólicos y ácidos, y en particular en bebidas fermentadas. Usan principalmente al etanol como sustrato para la producción de diversos ácidos orgánicos.

El pulque es una bebida alcohólica perecedera; si se deja fermentar más tiempo, se convierte en vinagre. El objetivo de este trabajo fue aislar cepas de BAA de pulque y caracterizarlas mediante técnicas microscópicas, bioquímicas y de biología molecular. Se utilizó pulque natural con un tiempo de madurez de entre 3 a 10 días. Se inoculó en medio de cultivo CAAR modificado a 28 °C durante 3 días. Las colonias que presentaron un color amarillo y un halo de crecimiento colonial transparente alrededor de las mismas fueron seleccionadas para su posterior análisis e identificación molecular. La cepa recuperada resultó ser *Acetobacter malorum* (*A. malorum*), esta cepa es capaz de crecer cuando la concentración de etanol supera el 10-12% (v/v), pero; se obtiene mayor concentración de ácido cuando crece en medio entre 8 y 10% de etanol (1.12 ± 0.30 g/L). Análisis por HPLC muestran que esta cepa produce diversos ácidos orgánicos, principalmente ácido butírico, además del ácido acético.

Una caracterización detallada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) demostró que las células de *A. malorum* tienen una forma elipsoidal, se encuentran como monómeros o dímeros, el tamaño promedio es de aproximadamente 0.63 μm de ancho por 1.38 μm de largo. La curva de crecimiento durante las primeras 6 horas mostró que la tasa de crecimiento de las colonias se mantuvo lento y constante en un promedio 0.0879 células/h.

ABSTRACT

The fermentation process of pulque begins during the production of mead from the maguey mezontete, thanks to the plant's own microbial flora. The acetic acid bacteria (AAB) belong to the Acetobacteraceae family, which is classified into the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*; AAB are found in alcoholic and acidic niches, and particularly in fermented beverages. They mainly use ethanol as substrate for the production of various organic acids.

Pulque is perishable alcoholic drink; if left to ferment longer, it becomes vinegar. The objective of this work was to isolate AAB strains from pulque and characterize them using microscopic, biochemical and molecular biology techniques. Natural pulque was used with a ripening time of between 3 to 10 days. Which was inoculated in modified CAAR culture medium at 28 °C for 3 days. Colonies that had a yellow color and transparent colonial growth halo around them were selected for subsequent analysis and molecular identification. The recovered strain turned out to be *Acetobacter malorum* (*A. malorum*), this strain is able to grow when the ethanol concentration exceeded 10-12 (v/v), however; a higher concentration of acid is obtained when it grows between 8 and 10% ethanol (1.12 ± 0.30 g/L) is obtained. HPLC analysis shows that various organic acids are produced, mainly butyric acid, in addition to acetic acid.

A detailed characterization by scanning electron microscopy (SEM) showed that *A. malorum* cells have an ellipsoidal shape, are found as monomers or dimers, the average size is approximately 0.63 μm wide by 1.38 μm long. The growth curve during the first 6 hours showed that the growth rate of the colonies remained slow and constant at an average 0.0879 cells/h.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CAPÍTULO I..... | 2 |
| ANTECEDENTES..... | 2 |
| 1.1 El aguamiel..... | 2 |
| 1.2 El pulque..... | 3 |
| 1.2.1 Composición química del pulque..... | 3 |
| 1.3 Microorganismos en el aguamiel y pulque..... | 4 |
| 1.4 Proceso de fermentación del pulque..... | 7 |
| 1.5 Acetobacterias..... | 10 |
| 1.5.1 Características generales..... | 10 |
| 1.5.2 Taxonomía..... | 10 |
| 1.5.3 Metabolismo..... | 12 |
| 1.5.3.1 Metabolismo del etanol..... | 12 |
| 1.5.3.2 Metabolismo de los ácidos orgánicos..... | 13 |
| 1.5.4 Factores que intervienen en el crecimiento de BAA..... | 14 |
| 1.5.4.1 Temperatura..... | 14 |
| 1.5.4.2 Oxígeno..... | 14 |
| 1.5.4.3 pH..... | 14 |
| 1.5.4.4 Concentración de etanol..... | 15 |
| 1.5.5 Identificación y análisis del gen 16S..... | 16 |
| 1.5.6 Conservación..... | 16 |
| 1.5.6.1 Conservación de BAA..... | 17 |
| 1.5.6.1.1 Conservación por congelación..... | 17 |
| 1.5.6.1.2 Conservación por liofilización..... | 18 |
| 1.5.7 Estabilidad genética de las BAA..... | 18 |

| | |
|---|----|
| JUSTIFICACIÓN..... | 20 |
| HIPÓTESIS | 21 |
| CAPÍTULO II..... | 22 |
| OBJETIVOS..... | 22 |
| 2.1 Objetivo General..... | 22 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 22 |
| CAPÍTULO III | 23 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 23 |
| 3.1 Materia prima..... | 23 |
| 3.2 Aislamiento de las BAA a partir de pulque natural | 23 |
| 3.2.1 Características morfológicas..... | 23 |
| 3.3 Cinética de crecimiento de las BAA..... | 24 |
| 3.4 Caracterización molecular de las BAA..... | 24 |
| 3.5 Determinación indirecta del ácido producido | 25 |
| 3.6 Cuantificación de ácidos orgánicos por HPLC..... | 25 |
| 3.6.1 Cuantificación del ácido por HPLC | 26 |
| 3.7 Conservación por congelación..... | 26 |
| 3.8 Conservación por liofilización..... | 26 |
| 3.9 Control de viabilidad de la BAA conservada por congelación..... | 27 |
| CAPÍTULO IV | 29 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 29 |
| 4.1 Aislamiento de Bacterias Ácido Acéticas (BAA)..... | 29 |
| 4.1.1 Características morfológicas de las BAA aisladas | 30 |
| 4.1.1.1 Morfología de <i>A. malorum</i> | 30 |
| 4.2 Cinética de crecimiento de las BAA..... | 31 |
| 4.3 Caracterización molecular de la BAA | 33 |
| 4.4 Tolerancia de <i>A. malorum</i> al etanol | 35 |

| | |
|---|----|
| 4.4.1 Conversión de etanol a ácido | 37 |
| 4.5 Caracterización y cuantificación del ácido producido por HPLC | 37 |
| 4.6 Control de vialidad de las BAA conservadas por congelación..... | 39 |
| CAPÍTULO V | 40 |
| CONCLUSIONES..... | 40 |
| REFERENCIAS | 41 |
| APÉNDICE A | 55 |
| APÉNDICE B..... | 56 |
| APÉNDICE C..... | 57 |
| APÉNDICE D | 87 |
| APÉNDICE E..... | 88 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Elaboración del pulque..... | 8 |
| Figura 2. Oxidación del etanol (EtOH) a ácido acético (AcOH). | 13 |
| Figura 3. Colonias de BAA en medio de cultivo CAAR. (A) Aisladas de la bebida de pulque, y (B) con solubilidad del CaCO ₃ | 29 |
| Figura 4. Tinción de Gram de la bacteria aislada. (A) vista con aumento de 100X (B) y foto tomada con filtro AmScope (MD130). | 30 |
| Figura 5. Imagen SEM de <i>A. malorum</i> cepa TRC-B7 que muestra detalles de las células bacterianas. (A) vistas a 5,000X (B) y a 10,000X..... | 31 |
| Figura 6. Cinética de crecimiento acumulado de <i>Acetobacter malorum</i> | 32 |
| Figura 7. Velocidad específica de crecimiento de <i>Acetobacter malorum</i> | 32 |
| Figura 8. Árbol filogenético de <i>Acetobacter malorum</i> | 34 |
| Figura 9. Concentración de ácido acético a través del tiempo a diferentes concentraciones de etanol como sustrato..... | 36 |
| Figura 10. Crecimiento de <i>A. malorum</i> en medio CAAR después de ser conservada por congelación y almacenada a -20°C. | 39 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Composición química del aguamiel. | 2 |
| Tabla 2. Composición fisicoquímica del pulque. | 3 |
| Tabla 3. Componentes nutritivos del pulque. | 4 |
| Tabla 4. Microorganismos reportados para el aguamiel..... | 4 |
| Tabla 5. Microorganismos reportados para el pulque. | 6 |
| Tabla 6. Medio CAAR modificado. | 23 |
| Tabla 7. Caldo de papa. | 24 |
| Tabla 8. Medio de conservación por congelación. | 27 |
| Tabla 9. Crioprotector..... | 27 |
| Tabla 10. Cuantificación del ácido producido por las BAA por HPLC. | 37 |

INTRODUCCIÓN

El pulque es una bebida tradicional, con raíces muy arraigadas en las poblaciones de México. Se obtiene a partir de la fermentación de los azúcares presentes en el aguamiel, savia extraída de una gran variedad de magueyes, los más relevantes son: *A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens* y *Agave americana*, (González *et al.*, 2016). El proceso de fermentación inicia desde la obtención del aguamiel del mezontete del maguey, esta savia sufre cambios debido al incremento del porcentaje de alcohol y la formación de exopolisacáridos, ocasionados por la flora microbiana propia de la planta (Pérez-España *et al.*, 2023); la cual está compuesta por diversos grupos de microorganismos, como levaduras, bacterias lácticas, bacterias etanólicas y bacterias productoras de exopolisacáridos (Cervantes-Contreras & Pedroza, 2008; Campos *et al.*, 2009; González *et al.*, 2016). Estos microorganismos, junto con la adición de un inóculo (una porción de pulque previamente producido, conocido como semilla), aceleran el proceso que dura de 12 a 48 horas, bajo las condiciones adecuadas de temperatura (Chellapandian *et al.*, 1998; Escalante *et al.*, 2004). Los consorcios microbianos, presentes en varias bebidas fermentadas, muestran interacciones positivas que favorecen la captación de nutrientes y la eliminación de algunos metabolitos tóxicos que se generan durante el proceso de fermentación (González *et al.*, 2016).

Recientemente, la taxonomía de las BAA se ha reorganizado mediante métodos moleculares basados en el ADN. Se han incluido a la familia Acetobacteraceae, la cual incluye los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, y ocho géneros más. El género *Acetobacter* está conformada por 19 especies, son bacilos Gram negativos y las células viejas pueden convertirse en Gram variables. *Acetobacter* spp. son aerobias obligadas y muestran una rápida oxidación de acetato y lactato (Hommel, 2014). Especies como: *A. malorum*, *A. pasteurianus* y *A. cibonongensis* han sido identificadas en el pulque en trabajos previos (Escalante *et al.*, 2008; Astudillo-Melgar *et al.*, 2023).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 El aguamiel

El aguamiel, también conocido como savia, es un líquido dulce, de olor característico que se extrae del cogollo de las plantas de maguey pulquero. De todas las especies del género *Agave* reportadas, 40 de ellas son utilizadas en México para la extracción de aguamiel (Agronoticias, 2023). De las cuales, *Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. mapisaga* y *Agave salmiana* son las más utilizadas para la obtención de aguamiel (Campos *et al.*, 2009; CONABIO, 2021). Este exudado, que varía en color desde un blanco suave a un amarillo claro, es rico en carbohidratos como la inulina, sacarosa y la fructosa (García-Fournier, 2007). Se produce en las plantas de maguey maduras durante la fase previa a la floración y se concentra en la parte inferior de la planta, conocida como mezontete. Además de los carbohidratos, el aguamiel contiene pequeñas cantidades de aminoácidos y vitaminas, lo que le confiere propiedades nutricionales significativas (Cuellar & Rosas, 2019). En la **Tabla 1**, se muestra a detalle la composición química del aguamiel en muestra fresca y seca.

Tabla 1. Composición química del aguamiel.

| Parámetro | Muestra fresca (g%) | Muestra seca (g%) |
|---------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Humedad | 87.38 | - |
| Densidad | 1.0226 | - |
| pH | 7.72 | - |
| Proteínas | 0.30 | 2.38 |
| Grasas | 0.01 | 0.08 |
| Carbohidratos | 12.03 | 95.32 |
| Cenizas | 0.03 | 1.82 |
| Fibra cruda | 0.05 | 0.40 |
| Acidez titulable | 0.03 | 0.24 |
| Azúcares reductores (% glucosa) | 9.08 | 71.95 |
| Energía total (Kcal/100 g) | 37.28 | 335 |

Fuente: Cuellar & Rosas, 2019.

1.2 El pulque

El pulque en México tiene una historia de producción y consumo que se remonta a tiempos prehispánicos. Es una bebida alcohólica tradicional, no destilada mexicana producida a partir de la fermentación del aguamiel de algunos tipos de magueyes (Campos, 2010; Escalante *et al.*, 2016; García-Arce & Castro-Muñoz, 2021). Esta bebida tiene un color blanco lechoso, de textura viscosa y ligeramente ácido con un contenido de alcohol de entre 4 y 7 °GL (Herrera-Solórzano, 2008; Escalante *et al.*, 2016).

1.2.1 Composición química del pulque

El pulque es rico en nitrógeno amínico, en nutrientes, proteínas, y vitaminas, además de propiedades medicinales (SADER, 2018). Su alto contenido de proteínas y carbohidratos le otorga un sabor único, que oscila entre lo ácido y dulce, y puede compensar la falta de aminoácidos como el triptófano y la tirosina (Matías-Luis *et al.*, 2019). En la **Tabla 2** y **Tabla 3** se muestran datos obtenidos de algunos autores sobre la composición fisicoquímica y nutrimental del pulque.

Tabla 2. Composición fisicoquímica del pulque.

| Parámetros | g L ⁻¹ |
|--------------------|-------------------|
| Brix (azúcar) | 4.3 |
| % de alcohol | 4.5 |
| Densidad | 1.011 |
| % de acidez total | 1.25 |
| pH | 4.01 |
| % Glucosa | 3.30 |
| % Sacarosa | 2.34 |
| % Proteínas crudas | 0.33 |
| % Cenizas | 0.36 |

Fuente: Medina-Mendoza *et al.*, 2022.

Tabla 3. Componentes nutritivos del pulque.

| Componente nutritivo | Cantidad en 1 litro |
|-----------------------------|----------------------------|
| Proteínas | 4.4 g |
| Fósforo | 10 mg |
| Calcio | 10 mg |
| Hierro | 7 mg |
| Tiamina (Vit. B1) | 0.2 mg |
| Riboflavina (Vit. B2) | 1.1 mg |
| Niacina (Complejo B) | 0.3 mg |
| Ácido ascórbico (Vit. C) | 60 g |
| Ácido fólico | 0.01 mg |
| Calorías | 204 |

Fuente: García-Fournier, 2007.

1.3 Microorganismos en el aguamiel y pulque

El aguamiel contiene diversas poblaciones microbianas, que utilizan sus compuestos como fuente de carbono y energía para la producción celular y la formación de productos de fermentación. Alberga una variedad de microorganismos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de exopolisacáridos (Cervantes-Contreras & Pedroza, 2008; González *et al.*, 2016). Durante el proceso de fermentación del aguamiel, se incorpora la microbiota natural, además de microorganismos propios del entorno local (**Tabla 4**) que son transportados por insectos, como *Drosophila* spp. (Gutiérrez-Rodríguez, 2015; Cuellar & Rosas, 2019).

Tabla 4. Microorganismos reportados para el aguamiel.

| Microorganismo | Referencia |
|----------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Zymomonas mobilis</i> | |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | |
| <i>Leuconostoc</i> sp. C2 | (Chacón-Vargas <i>et al.</i> , 2020) |
| <i>Leuconostoc kimchi</i> | |

Leuconostoc citreum
Leuconostoc carnosum
Lactococcus raffinolactis
Lactococcus plantarum
Lactococcus piscium
Lactococcus lactis
Lactobacillus sanfranciscensis
Kluyveromyces marxianus
Kluyvera intermedia
Hafnia alvei
Acinetobacter tandoii
Acinetobacter sp. ANC 3789
Acinetobacter seohaensis
Acinetobacter rudis
Acinetobacter larvae
Acinetobacter gerneri
Acinetobacter equi
Acinetobacter brisouii
Acinetobacter boissieri
Acinetobacter baumannii

Gluconobacter oxydans
Lactobacillus acidophilus
Lactobacillus acetotolerans
Flavobacterium johnsoniae
Saccharomyces carbajali
Pseudomonas lindneri
Pichia barragani
Torulopsis hydromelitis

(Guzmán-Pedraza & Contreras-Esquivel, 2018)

| | |
|--------------------------------------|---|
| <i>Leuconostoc dextranicum</i> | |
| <i>Acetobacter pasteurianus</i> | |
| <i>Enterobacter asburiae</i> | |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i> | (Enríquez-Salazar <i>et al.</i> , 2017) |
| <i>Lactobacillus casei</i> | |
| <i>Clasvipora lusitaniae</i> | |
| <i>Acetobacter pomorium</i> AJ001632 | |
| <i>Lactobacillus streptococcus</i> | (Escalante <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>Sacharomyces cerevisiae</i> | |
| <i>Sacharomyces</i> sp. | |

Tabla 5. Microorganismos reportados para el pulque.

| Microorganismo | Referencia |
|---|--------------------------------------|
| <i>Zymomonas mobilis</i> | |
| <i>Saccharomyces kudriavzevii</i> | |
| <i>Saccharomyces eubayanus</i> | |
| <i>S. cerevisiae</i> x <i>S. Kudriavzevii</i> | |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | |
| <i>Saccharomyces arborícola</i> | |
| <i>Leuconostoc</i> sp. C2 | |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | (Chacón-Vargas <i>et al.</i> , 2020) |
| <i>Leuconostoc kimchii</i> | |
| <i>Leuconostoc gelidum</i> | |
| <i>Leuconostoc citreum</i> | |
| <i>Leuconostoc carnosum</i> | |
| <i>Lactococcus raffinolactis</i> | |
| <i>Lactococcus plantarum</i> | |
| <i>Lactococcus piscium</i> | |
| <i>Lactococcus chungangensis</i> | |

| | |
|---------------------------------------|--|
| <i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> | |
| <i>Lactobacillus lindneri</i> | |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | |
| <i>Hafnia alvei</i> | |
| <i>Acinetobacter qingfengensis</i> | |
| <i>Acinetobacter nectaris</i> | |
| <i>Acinetobacter boissieri</i> | |

| | |
|--|---|
| <i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>Mobilis</i> | |
| <i>weissella beninensis</i> | |
| <i>Acetobacter pasteurianus</i> | |
| <i>Lactococcus uncultured</i> | |
| <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> | (Astudillo-Melgar <i>et al.</i> , 2023) |
| <i>Lactococcus</i> sp. S23 | |
| <i>Acetobacter cibirongensis</i> | |
| <i>Gluconobacter albidus</i> | |
| <i>Lactobacillus capillatus</i> | |

| | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| <i>Acetobacter malorum</i> | |
| <i>Enterobacter agglomerans</i> | |
| <i>Enterococcus agglomerans</i> | (Escalante <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | |

1.4 Proceso de fermentación del pulque

La fermentación del aguamiel comienza en la planta de maguey, gracias a la acción de la microbiota autóctona del maguey, estos microorganismos convierten de forma natural parte de los azúcares presentes en el aguamiel (**Figura 1**). La elaboración del pulque implica tres tipos de fermentaciones: ácida, alcohólica y viscosa (Medina-Mendoza *et al.*, 2022). Los microorganismos que participan en este proceso tienen la capacidad de actuar como transportadores de azúcar, enzimas hidrolíticas, exopolisacáridos, ácido láctico o productores de etanol (Escalante *et al.*, 2012). Los microorganismos que intervienen están presentes de manera innata en el aguamiel y son los mismos que predominan durante las

etapas de recolección, transporte, inoculación y manipulación (Medina-Mendoza *et al.*, 2022). Entre los microorganismos más frecuentes se encuentran diversas especies de levaduras y bacterias, incluyendo las bacterias ácido-lácticas (BAL) homo y hetero fermentativas, la bacteria *Zymomonas mobilis* que produce alcohol y la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* que produce dextrano (Castro *et al.*, 2015).

El proceso tradicional de la elaboración del pulque inicia con la identificación y selección de magueyes con una madurez de entre 8 y 12 años. El tlachiquero, quien posee conocimiento sobre la biología del maguey, identifica una planta lista para ser castrada (capada) e iniciar la producción del aguamiel (Escalante *et al.*, 2016; Pérez-España *et al.*, 2023).



Figura 1. Elaboración del pulque.

Adaptada de Escalante *et al.*, 2016.

La castración (o capado) consiste en la eliminación de las pencas céntricas de la planta (meloyote) para exponer el “corazón” mediante el uso de un instrumento puntiagudo y afilado (**Figura 1A**). Finalmente se deja madurar en un período de 3 a 8 meses (Pérez-España *et al.*, 2023). Después del proceso de madurez, se raspa la pared del cajete con ayuda

de un raspador, lo cual induce la salida de savia, y con ello la acumulación del aguamiel. La extracción del aguamiel se realiza con ayuda de un acocote y se recolecta en contenedores de madera o de plástico (**Figura 1B**). Después de cada recolección de aguamiel, se raspa nuevamente el cajete para evitar su cicatrización (Escalante *et al.*, 2016; Pérez-España *et al.*, 2023).

La elaboración del inóculo iniciador conocido como “semilla” (una porción de pulque producido previamente), consiste en tomar aproximadamente 2 litros de pulque fermentado y se depositan en un tinajón de 20 litros. Luego, se vierte el aguamiel fresco en el mismo recipiente. La fermentación comienza espontáneamente a temperatura ambiente, desarrollando un sabor alcohólico y acético característico. Para finalizar, el tlachiquero transfiere la semilla a una o más tinas limpias donde se llevará a cabo la fermentación del pulque (**Figura 1C**) (Escalante *et al.*, 2016; Matías *et al.*, 2019; Cortazar-Martínez *et al.*, 2022).

Una vez recolectado, el aguamiel es filtrado y vertido en una tina donde previamente se colocó la semilla. La fermentación varía de acuerdo a la calidad del aguamiel, la madurez de la semilla, la temporada y la región. Comúnmente, dura de 12 a 48 horas (**Figura 1D**) (Escalante *et al.*, 2016). Sin embargo, la fermentación continua durante todo el proceso, razón por la cual la composición de los microorganismos presentes también cambia con el tiempo. En general, el pulque tiene una vida de anaquel de tres días (cinco como máximo si se mantiene en refrigeración), esto debido a la fermentación acética, en la que bacterias del género *Acetobacter* ssp. y *Gluconobacter* ssp. convierten el alcohol en ácido acético (Herrera-Solórzano, 2008; Álvarez-Ríos *et al.*, 2020).

El ácido acético tiene un papel importante en diversas áreas debido a sus diferentes aplicaciones, como: conservador alimenticio, antimicrobiano, y disolvente en reacciones químicas para la elaboración de productos químicos (Vadequímica, 2023). Su producción se realiza químicamente, mediante la carbonilación del metanol con monóxido de carbono (cerca del 75% se obtiene de esta forma) o mediante fermentación bacteriana (Shang-Tian *et al.*, 2013; Vidra & Németh, 2017). Existen algunos microorganismos que poseen la capacidad de descomponer compuestos orgánicos para producir ácido acético, como las

BAA. Razón por la cual, actualmente la comunidad científica busca una forma más eficiente de producir ácido acético mediante el uso de estas bacterias.

1.5 Acetobacterias

Las acetobacterias (BAA) son microorganismos pertenecientes de la familia Acetobacteraceae. Estas bacterias principalmente se encuentran en nichos alcohólicos y ácidos, como: frutas, flores y en bebidas fermentadas, como la kombucha, el vinagre, el kéfir e incluso algunos derivados del cacao (Sievers & Swings, 2005; Gullo & Giudici, 2008; Wu *et al.*, 2010; Mamlouk & Gullo, 2013; (Lynch *et al.*, 2021).

La capacidad metabólica de las BAA se demuestra mediante la oxidación parcial de los carbohidratos, donde se liberan los productos correspondientes (aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos) en el medio circundante. Las BAA realizan reacciones de oxidación específicas y redirigen los electrones liberados al oxígeno molecular, a través de un proceso llamado “fermentación oxidativa”. Debido a esta capacidad, se les conoce desde hace tiempo por su papel en la producción de vinagre (Mamlouk & Gullo, 2013).

1.5.1 Características generales

Las BAA pertenecen al grupo de bacterias Gram negativas o Gram variable, son microorganismos estrictamente aerobios, catalasa positivas y oxidasa negativas, pueden presentar células de formas de elipse o bastoncillo, agrandadas e irregulares de manera individual, en pares o en cadenas. Sus dimensiones varían entre 0.4 a 1 μm de ancho por 0.8 a 4.5 μm de largo. Las condiciones óptimas para su crecimiento incluyen temperaturas de 25 a 30°C, y valores de pH de entre 5 a 6; sin embargo, también pueden crecer en pH más bajos (Gomes, 2018; Sengun, 2017).

1.5.2 Taxonomía

En 1822, el científico Christian Hendrick Persson fue el primer taxónomo que trabajó con este grupo de bacterias, a las cuales nombró *Mycoderma*. Posteriormente, en 1868 Pasteur, llevó a cabo un estudio sistemático de la fermentación del ácido acético y demostró que éste se producía por medio de la oxidación del etanol, y si esta oxidación continuaba durante mucho tiempo, se convertía en CO₂ y H₂O. Además, informó que el proceso de convertir el vino en vinagre lo realizaba una especie de bacteria a la que llamó *Micoderma aceti* (Gerard, 2015). Hansen, en 1894, propuso la primera clasificación en base a la

aparición de una película en medios líquidos, y su reacción con yodo. Por su parte, Beijerinck estableció el nombre del género *Acetobacter*, en el año de 1898. En 1925, Vissert Hooft planteó la clasificación en función en criterios bioquímicos y fisiológicos (González-Benito, 2005). Más tarde, Asai en 1934 y 1935 clasificó las BAA en dos géneros principales: *Acetobacter* y *Gluconobacter*, que incluye a las BAA con limitaciones para oxidar etanol a ácido acético, pero poseen una fuerte capacidad para oxidar la glucosa a ácido glucónico (González-Benito, 2005; Gomes *et al.*, 2018).

En el año 1950, Frateur publicó el resultado de un extenso estudio bioquímico para la mayor parte de las especies clásicas disponibles del género *Acetobacter*, así como el reporte de nuevas cepas aisladas (Gerard, 2015). Propuso un sistema de clasificación del género, lo dividió en 4 grupos basados en cinco criterios bioquímicos: *i*) La presencia de catalasa; *ii*) La oxidación y sobre oxidación de etanol a ácido acético, y a CO₂ y H₂O, respectivamente; *iii*) La oxidación de lactato a carbonato; *iv*) La oxidación de glicerol a dihidroxiacetona; y *v*) La producción de ácido glucónico a partir de D-glucosa. Con lo cual, el género *Acetobacter* fue dividido en cuatro grupos, sin valor taxonómico en la actualidad, *Peroxydans*, *Oxydans*, *Mesoxydans* y *Suboxydans* (Carr & Shimwell, 1961; González-Benito, 2005; Gomes *et al.*, 2018).

En la 8ª edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, se especificó la clasificación de las BAA con flagelos peritricos móviles o fijos, capaces de oxidar acetato y lactato a CO₂ y H₂O (Gerard, 2015). Este género incluía las especies *A. aceti*, *A. pasteurianus* y *A. perxydans* y nueve subespecies. Por su parte, el género *Gluconobacter* con la presencia/ausencia de flagelos polares, la incapacidad de oxidar acetato y lactato, así como la capacidad de oxidar D-glucosa a gluconato y luego oxidarlo a 2-cetogluconato y 5-cetogluconato. Este género sólo incluye la especie *G. oxydans*, con cuatro subespecies (Gerard, 2015; Gomes *et al.*, 2018). Posteriormente, en base a resultados de hibridación de ADN-ARNr, otros autores propusieron juntar estos géneros dentro de la familia Acetobacteraceae (Kerstens *et al.*, 2006). En otro estudio conducido por Yamada & Kondo (1984), el género *Acetobacter* fue dividido en los subgéneros *Gluconobacter* que tenían el sistema de ubiquinona Q-10, y el subgénero *Acetobacter* que poseían el sistema de la ubiquinona Q-9 (Yamada & Yukphan, 2008). Clasificación que al final no fue reconocida.

En ese mismo año, fue descubierto un nuevo subgénero de BAA oxidantes de acetato equipadas con ubiquinona Q-10, con las especies *A. liquefaciens* y *A. xylinum* (Gomes *et al.*, 2018). Más tarde, basado en un enfoque polifásico, Gillis y colaboradores (1989) describieron una nueva especie dentro de la familia Acetobacteraceae asignándole el siguiente nombre *A. diazotrophicus*. Tiempo después, se publicaron los primeros estudios filogenéticos de acetobacterias basados en la secuenciación por PCR del gen 16S ADN bacteriano mostrando que estas formaban un grupo dentro de la subclase α de *Proteobacteria* (Young, 1992). Otros autores propusieron el género *Gluconacetobacter*, entre los años 1997 y 1998, en base a secuencias parciales del gen ribosomal de la subunidad 16S (ARNr 16S). Las especies de *Acetobacter* que tienen ubiquinona Q-10: *A. xylinus*, *A. liquefaciens*, *A. hansenii*, *A. diazotrophicus* y *A. europaeus* fueron transferidas al género *Gluconacetobacter* (Cleenwerck & De Vos, 2008). Actualmente, la familia Acetobacteraceae cuenta con 19 géneros y 72 especies (Euzéby, 1987; Komagata *et al.*, 2014; Trček & Barja, 2015).

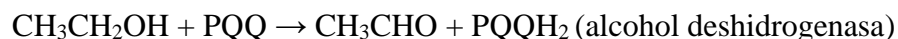
1.5.3 Metabolismo

Las BAA tienen un metabolismo que depende estrictamente del oxígeno, el cual se utiliza como receptor final de electrones. Son reconocidas por su habilidad para convertir el etanol en ácido acético. Además, durante este proceso de oxidación, se generan aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos y otros productos metabólicos (Crotti *et al.*, 2016).

1.5.3.1 Metabolismo del etanol

Las BAA, a excepción de los géneros *Asaia* y *Saccharibacter*, poseen la capacidad de transformar el etanol en ácido acético a través de un proceso de oxidación que se realiza en dos etapas principales:

1. En la primera etapa, el etanol (EtOH) se transforma en acetaldehído gracias a la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) dependiente de la pirroloquinolina quinona (PQQ). En la siguiente fórmula se muestra la reacción general de la transformación del etanol a acetaldehído:



2. A continuación, el acetaldehído se convierte en ácido acético (AcOH) mediante la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH), como se puede ver en la siguiente fórmula química:



Ambas enzimas, ADH y ALDH, se encuentran en la membrana citoplasmática y su actividad se desarrolla principalmente en el espacio periplasmático y no en el interior de la célula. Los complejos de ADH y ALDH están estrechamente vinculados a la cadena respiratoria, que transfiere electrones por medio de la ubiquinona y una ubiquinol oxidasa terminal al oxígeno, que actúa como aceptor final de electrones (Mamlouk & Gullo, 2013; Gerard, 2015; Mercanoglu-Taban & Saichana, 2017). En la **Figura 2**, se resume todos los pasos que intervienen en la oxidación del etanol.

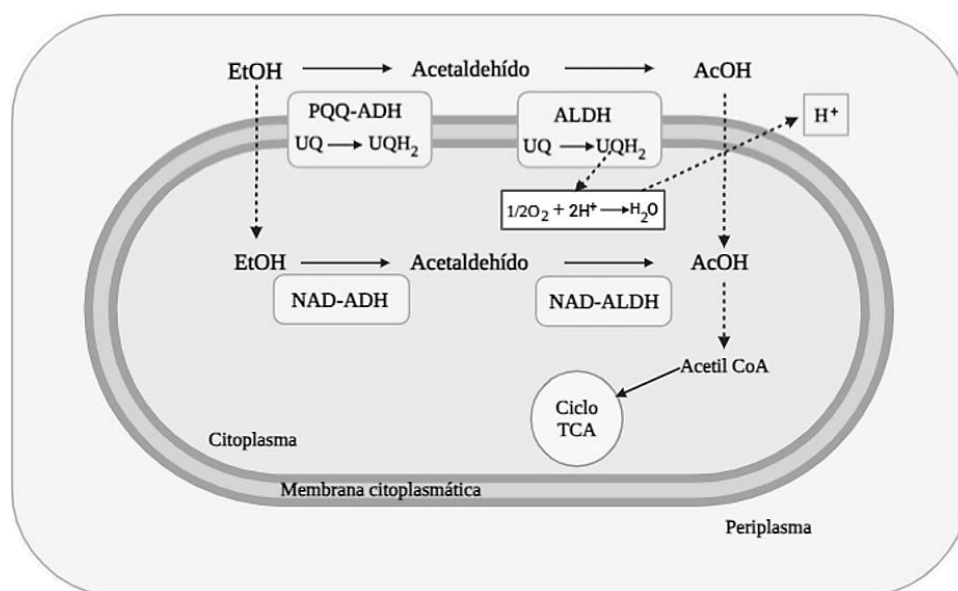


Figura 2. Oxidación del etanol (EtOH) a ácido acético (AcOH).

Adaptada de Mamlouk & Gullo, 2013

La oxidación completa del etanol (EtOH) se lleva a cabo a nivel citoplasmático por una NAD-ADH y una NAD-ALDH. El ácido acético (AcOH) producido puede ser posteriormente utilizado por la acetil CoA sintasa, a través del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) (Mamlouk & Gullo, 2013).

1.5.3.2 Metabolismo de los ácidos orgánicos

Las BAA, con excepción de las bacterias del género *Gluconobacter*, poseen la capacidad de metabolizar diferentes ácidos orgánicos, como los ácidos acético, cítrico, fumárico, láctico, málico, pirúvico y succínico. Este proceso se realiza mediante el ciclo del TCA, a través del cual estos ácidos se oxidan a CO₂ y H₂O (Raspor & Goranovič, 2008).

1.5.4 Factores que intervienen en el crecimiento de BAA

El crecimiento y supervivencia de los microorganismos se ve significativamente influenciados por las condiciones químicas y físicas del entorno. Algunos factores que intervienen con el crecimiento de las BAA son la temperatura, oxígeno, pH y concentración de etanol (Madigan *et al.*, 2015; Gerard, 2015).

1.5.4.1 Temperatura

La temperatura tiene un papel crucial en el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, afectando tanto su velocidad de crecimiento como la morfología celular. Cada especie bacteriana tiene un rango de temperatura específico para su crecimiento óptimo. Por ejemplo, las BAA son mesófilas, es decir, crecen mejor entre los 25 y 30°C (Nuño-Pimienta, 1996). Por tanto, es vital optimizar la temperatura en el cultivo bacteriano, ya que temperaturas excesivas pueden causar la desnaturalización de enzimas esenciales, daño en la membrana celular y mayor sensibilidad a los efectos tóxicos de los productos metabólicos, como el ácido acético (Kim *et al.*, 2023). Sin embargo, existen investigaciones que evidencian que las BAA son capaces de crecer y producir ácido acético a hasta temperaturas de 40°C (Es-sbata *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2023).

1.5.4.2 Oxígeno

El oxígeno es esencial en las primeras etapas de la fermentación alcohólica, especialmente para el crecimiento celular óptimo. En la fermentación acética, el oxígeno es un factor clave durante todo el proceso. Los efectos más notables se observan cuando hay una interrupción prolongada de la aireación y una alta concentración de ácido acético en el cultivo (Nuño-Pimienta, 1996).

El oxígeno, al actuar como aceptor de electrones en la cadena respiratoria, influye en la oxidación del etanol y el ciclo del TCA, que están correlacionados con la tolerancia al ácido acético de las BAA. Un suministro adecuado de oxígeno mejora la tasa de acetificación (Zheng *et al.*, 2018).

1.5.4.3 pH

Las BAA están naturalmente adaptadas para crecer a un pH bajo, compartiendo estrategias con los acidófilos (organismos que crecen a un pH por debajo de 5.5) para mantener la homeostasis celular (Madigan *et al.*, 2015). En términos de pH, las bacterias

acéticas tienen un rango óptimo de crecimiento de 5.0 a 6.5, pero también pueden sobrevivir en rangos de pH inferiores de entre 3 y 4 (Barrao & Barja, 2017). Muchos acidófilos no pueden crecer a un pH de 7, y muchos no pueden crecer a valores que superen en dos unidades su pH óptimo. La estabilidad de la membrana citoplasmática es un factor clave para el carácter acidófilo. Cuando el pH aumenta a valores neutros, la membrana citoplasmática de las bacterias se destruye y las células se lisan (Nuño-Pimienta, 1996). Esto indica que estos organismos no solo son tolerantes a los ácidos, sino que requieren una alta concentración de protones para mantener la estabilidad de la membrana citoplasmática (Nuño-Pimienta, 1996; Madigan *et al.*, 2015; Barrao & Barja, 2017).

1.5.4.4 Concentración de etanol.

El etanol, que es el principal sustrato para la producción de ácido acético, puede interferir en el crecimiento y metabolismo de las bacterias si su concentración es intolerable para ellas, pudiendo inhibir fuertemente su crecimiento. En la industria, se ha observado que las concentraciones de etanol superiores a 50 g/L disminuyen la tasa de acetificación (García-García *et al.*, 2009). Por el contrario, una concentración de etanol demasiado baja puede afectar la viabilidad celular dependiendo de la acidez del medio, así como, llevar a la sobreoxidación del ácido acético a dióxido de carbono y agua. El etanol al ser una molécula pequeña puede penetrar fácilmente las membranas bacterianas, por lo tanto, puede inducir cambios en la membrana interna, en el crecimiento o el metabolismo de los microorganismos que estén en contacto con este alcohol (Ingram, 1990; García-García *et al.*, 2009; Es-sbata *et al.*, 2021).

En un estudio realizado por Niu y colaboradores (2019) analizaron, en *Acetobacter* sp. (GDMCC 1.152), los efectos del etanol a bajas concentraciones (3 a 9%, v/v) durante la fase estacionaria sobre la composición de ácidos grasos de la membrana celular, la conformación de los lípidos de la membrana, la fluidez de la membrana y la resistencia a los campos eléctricos pulsados (PEF). Los resultados mostraron un cambio en la fase estacionaria control de 18 h en comparación con 22, 24 y 28 h, después de la exposición a etanol al 3, 6 y 9%, respectivamente. El análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas, espectroscopía Raman y polarización de fluorescencia indicaron que la fluidez de la membrana de las células aumentó significativamente al modificarse la composición y

conformación de los ácidos grasos de la membrana después de la exposición al etanol. Además, sus resultados mostraron que las células cultivadas en un medio con concentraciones de etanol relativamente altas fueron más vulnerables al PEF.

1.5.5 Identificación y análisis del gen 16S

Las secuencias nucleotídicas codificantes de los genes de los ARN ribosomales (ARNr) constituyen herramientas útiles para la identificación y clasificación de los organismos (Mohammadi & Amini, 2015). En particular el gen 16S del ARNr, se encuentra presente en todos los organismos procariotas (bacterias y arqueas), siendo una región ampliamente utilizada en los estudios filogenéticos. Por tanto, constituye una herramienta muy útil para la identificación taxonómica de los diferentes grupos de bacterias. Este gen cuenta con varias regiones conservadas, que son comunes a un gran número de especies bacterianas, siendo posible mediante PCR su amplificación para posteriormente identificar los amplicones generados por secuenciación y su análisis.

En un estudio realizado por Escalante y colaboradores (2008), se aisló e identificó la cepa *Acetobacter malorum* del pulque natural mediante la secuenciación del gen 16S rDNA. Posteriormente, en 2023, Astudillo-Melgar y su equipo aislaron e identificaron cepas como *Acetobacter cibonongensis* y *Acetobacter pasteurianus* provenientes del pulque natural, utilizando el mismo método de secuenciación del gen 16S rDNA. Ambos estudios realizaron sus respectivas tomas de muestras en Huitziloc, Morelos, México.

1.5.6 Conservación

Actualmente, la conservación de cultivos microbianos ha tomado gran importancia en líneas de investigación, en la industria alimentaria y farmacéutica, donde las BAA desempeñan un papel activo (Fuentes *et al.*, 2003; Hurtado *et al.*, 2011; Parra, 2023). Por lo que no solo se busca mantener la viabilidad de las cepas, sino también conservar su estabilidad genética, principalmente su actividad metabólica, ya que la producción de metabolitos secundarios es de gran interés en procesos biotecnológicos (Gerard, 2015).

La preservación de cepas bacterianas es un proceso que tiene como objetivo primordial mantener la viabilidad de las colonias de interés, minimizando los cambios genéticos. Este proceso se fundamenta en la inactivación metabólica del microorganismo y puede llevarse a cabo a corto, mediano y largo plazo (Gutiérrez-Jiménez *et al.*, 2015). Es

importante señalar que la metodología para preservar bacterias ha sido poco estudiada, por lo que, no existe un método de conservación único que sea efectivo para todos los cultivos (Gerard, 2015; Acosta-Ovallos, 2019).

1.5.6.1 Conservación de BAA

El creciente conocimiento sobre las características fisiológicas, bioquímicas y genéticas de las BAA, ha promovido innovaciones en la biotecnología y en procesos fermentativos. Como resultado, las colecciones microbianas de BAA se han convertido en fuentes esenciales para la selección de cultivos con propiedades deseables para aplicaciones biotecnológicas. El objetivo principal de la conservación de las BAA es mantener su viabilidad, evitando cambios en su morfología, fisiología o genética. No obstante, se ha observado que estas bacterias presentan inestabilidad genética, lo que trae consigo mutaciones espontáneas (De Vero *et al.*, 2017). Estas mutaciones pueden llevar a deficiencias en varias propiedades fisiológicas, como la resistencia al ácido acético y la oxidación del etanol (Gerard, 2015; Barrao & Barja, 2017).

1.5.6.1.1 Conservación por congelación

Esta técnica consiste en un método fisicoquímico en el que las células bacterianas son congeladas en suspensión en un líquido que contiene usualmente un agente crioprotector, y se almacenan a temperaturas por debajo de los 0°C, lo que provoca la congelación del agua. De esta manera, al no tener acceso las células al agua líquida, su crecimiento se detiene (García-López & Uruburu-Fernández, 2000). En un estudio realizado por Sokollek y colaboradores, utilizaron el 20% de extracto de malta como crioprotector y nitrógeno líquido (mantenido a una temperatura por debajo de los -195.8°C) para poder mantener viables las colonias de las BAA (Cuervo-Parra *et al.*, 2016), en sus resultados concluyeron que este método fue eficaz para la conservación de las cepas de BAA evaluadas (Sokollek *et al.*, 1998).

En otro estudio realizado por Gullo y colaboradores (2012), estudiaron la cultivabilidad y viabilidad de la cepa *A. pasteurianus* AB0220 después de 9 años de conservación con glicerol al 35% y a -80 °C. Para ello evaluaron la oxidación del etanol y la asimilación del acetato mediante el uso de un medio Carr modificado. Los resultados

mostraron que la oxidación del etanol a ácido acético fue estable, al igual que la asimilación del acetato (Gullo *et al.*, 2012).

1.5.6.1.2 Conservación por liofilización

La liofilización, o criodesecación, es uno de los métodos más comunes para la conservación de microorganismos a largo plazo (Morgan *et al.*, 2006). Este método de conservación se realiza en dos etapas: congelación rápida del cultivo y la posterior eliminación del agua por sublimación (De Vero *et al.*, 2017). Las cepas liofilizadas pueden ser almacenadas a temperatura ambiente (15-25°C), reduciendo con ello los costos energéticos para su almacenamiento (Acosta-Ovallos, 2019). Sin embargo, es fundamental la suspensión de las cepas en un medio que contenga un crioprotector que las proteja contra lesiones por congelación y desecación, así como también evitar la formación de cristales de hielo o la desecación total que daña el ADN (García-López & Uruburu-Fernández, 2000; De Vero *et al.*, 2017; Acosta-Ovallos, 2019). Al aplicar esta metodología, las BAA pueden mantener su viabilidad después de un año (Sokollek & Hammes, 1997).

1.5.7 Estabilidad genética de las BAA

La estabilidad genética de las BAA puede verse comprometida por eventos aleatorios tales como las mutaciones o las alteraciones en la secuencia del ADN. Eventos que pueden desencadenar procesos evolutivos y alterar funciones vitales, como: la oxidación del etanol, la resistencia al ácido acético y la producción de celulosa (Azuma *et al.*, 2009). Por otro lado, la inserción de transposones, y de elementos genéticos móviles, ha sido identificada como una causa de cambios fenotípicos en estas funciones. Aunque aún se necesita más investigación para comprender completamente la inestabilidad genética, se ha detectado una cantidad considerable de transposones en el genoma de muchas cepas de BAA, como en *Gluconobacter oxydans* 621H (Azuma *et al.*, 2009; De Vero *et al.*, 2017). Además, en varias cepas de BAA, ha sido reportado una secuencia de inserción ISEcp1 perteneciente a la familia IS1380, en el gen del citocromo c (Arenas-Hernández *et al.*, 2022). Esta secuencia ha sido relacionada con la pérdida de actividad de alcohol deshidrogenasa, en la cepa NCI 1380 de *A. pasteurianus*, y en la cepa 1023 de *A. aceti*, lo que sugiere que dicha secuencia está distribuida en todas las BAA (Takemura *et al.*, 1991). Lo cual puede indicar que la transposición de este elemento puede ser una causa significativa de la inestabilidad genética

de estas bacterias. De igual forma, Azuma y colaboradores (2009) investigaron la mutabilidad de la cepa IFO 3283 de *A. pasteurianus* (NBRC 3283), la cual forma un complejo celular multifenotípico, con la presencia de tres mutaciones de un solo nucleótido y cinco inserciones de transposones.

JUSTIFICACIÓN

El pulque es una bebida fermentada artesanal tradicional de la región centro de México, en esta bebida, se encuentran diversas especies de microorganismos, incluyendo las bacterias ácido-acéticas (BAA), conocidas principalmente por su capacidad de transformar el etanol a ácido acético, sin embargo, estas bacterias también pueden producir otros ácidos orgánicos, los cuales tienen una amplia área de aplicación en diversas industrias como la alimentaria, química, textil y farmacéutica, o bien aplicaciones antimicrobianas, en la nutrición animal y tratamiento de aguas residuales. Aunque existen estudios previos donde se han identificado distintas especies de BAA provenientes del pulque, no se han encontrado estudios donde mencionen su capacidad específica para producir ácidos orgánicos, por lo tanto, es importante aislar y caracterizar BAA nativas del pulque con el objetivo de aprovechar su potencial en la producción de ácidos orgánicos.

HIPÓTESIS

Las bacterias ácido-acéticas que se encuentran de forma natural en el pulque artesanal producen diferentes ácidos orgánicos dependiendo del sustrato y las condiciones del proceso.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Aislar cepas de bacterias acéticas del pulque natural y caracterizarlas mediante técnicas de microscopía, bioquímicas y de biología molecular para la producción de ácidos orgánicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Emplear técnicas de microbiología para aislar acetobacterias presentes en el pulque natural.
- Aplicar pruebas bioquímicas para identificar las características morfológicas y bioquímicas de las bacterias aisladas.
- Realizar la caracterización molecular por medio de la secuenciación por PCR del gen 16S ADNr bacteriano de las acetobacterias aisladas.
- Utilizar un medio de cultivo optimizado para producir ácido acético a partir de las acetobacterias aisladas.
- Estimar la acidez del ácido acético obtenido mediante la técnica de titulación ácido-base.
- Determinar la concentración de ácidos orgánicos utilizando la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).
- Implementar métodos de conservación adecuados para las bacterias acéticas aisladas y así mantener su viabilidad.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materia prima

Se utilizó pulque natural con un tiempo de madurez de 3 a 10 días, el cual fue proporcionado por la pulquería “Don Andy” localizada en Apan, Hidalgo, México. La muestra de 500 ml de pulque fue depositada en una botella de plástico limpia con rosca para facilitar su transporte.

3.2 Aislamiento de las BAA a partir de pulque natural

El pulque natural se sembró de manera directa por estriado en cajas Petri con medio de cultivo CAAR modificado (**Tabla 6**) y se incubaron a 28°C durante 3 días. Las colonias que presentaron un color amarillo y un halo de crecimiento colonial transparente alrededor de las mismas fueron aisladas en medio CAAR modificado e incubadas a 28°C por 5 días.

Tabla 6. Medio CAAR modificado.

| Reactivo | Cantidad |
|---|-----------|
| Glucosa | 3 g/L |
| Extracto de levadura | 10 g/L |
| Azul de timol | 0.04 g/L |
| Agar bacteriológico | 20 g/L |
| Etanol | 17.5 ml/L |
| Carbonato de Calcio (CaO ₃) | 10 g/L |

Esterilizar a 120°C durante 15 minutos. El etanol se agrega después de esterilizar.

Fuente: (Romero-Cortes *et al.*, 2012).

3.2.1 Características morfológicas.

Las BAA se inocularon en medio CAAR e incubaron por 5 días a 28°C. Posteriormente, se realizó una tinción de Gram, y las muestras fueron observadas con un microscopio óptico (Marca AmScope, Modelo 2101663) con el aumento de 100X y se utilizó el filtro AmScope MD130, incluido en el microscopio para la captura de las imágenes.

Para determinar el tamaño y la presencia de flagelos de las cepas de las acetobacterias aisladas, las células fueron fijadas con formaldehído al 10%, tamponadas con buffer de

fosfatos a un pH 7.0 (Bozzola, 2013) y ácido tánico al 3% durante 72 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las células fueron filtradas a través de un filtro Millipore de 0.22 μm , el cual se dejó secar a 28°C durante 5 días. Las imágenes de microscopio electrónico de barrido (SEM) fueron tomadas con un microscopio electrónico (Marca JEOL, modelo IT 300) en las instalaciones de la Escuela Superior de Apan, Hidalgo, México.

3.3 Cinética de crecimiento de las BAA

El crecimiento de las BAA se realizó en dos matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 100 mL de caldo de papa (**Tabla 7**). Los matraces se mantuvieron en agitación a 130 rpm a temperatura ambiente, después de 20 h se tomó 1 mL de cada uno de los matraces y se agregaron a nuevos medios de cultivo, a partir de este proceso se inició a registrar la cinética de crecimiento de los microorganismos mediante el recuento viable en placa sobre medio PDA. Se incubó a 28°C durante 2 días y se contaron las colonias aisladas. El procedimiento se realizó por duplicado.

Tabla 7. Caldo de papa.

| Reactivo | Cantidad |
|----------------------|-----------------|
| Glucosa | 10 g/L |
| Extracto de levadura | 2 g/L |
| Glicerol | 10 ml/L |
| Peptona de caseína | 2 g/L |
| Etanol | 40 ml/L |
| Papa | 100 g/L |

Esterilizar a 120°C durante 15 minutos. El etanol y glicerol se agregan después de esterilizar.

Fuente: (Romero-Cortes *et al.*, 2012).

3.4 Caracterización molecular de las BAA

La caracterización molecular de las BAA se realizó en cajas Petri con medio CAAR modificado, por triplicado para cada cepa aislada; se rotularon con los siguientes números de cepa: TRC-B6 y TCR-B7. Las cepas fueron enviadas al Laboratorio de Servicios Genómicos (LabSerGen) del CINVESTAV (Irapuato, Guanajuato, México) para su secuenciación. Las secuencias de ADN obtenidas fueron sometidas a un alineamiento por pares de secuencias con el programa BLAST, comparándolas con secuencias de ADN del

gen 16S en la base de datos del GenBank del NCBI (Zhang *et al.*, 2000). Además, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias, con el programa Clustal X versión 2 (Larkin *et al.*, 2007), contra secuencias de BAA relacionadas disponibles en las bases de datos del GenBank, del NCBI. Una vez obtenida la información del alineamiento de estas secuencias, se realizó el análisis filogenético, generando un árbol por el método de Neighbour-Joining (Saitou & Nei, 1987) con el programa de MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013) con el soporte del método estadístico bootstrap, usando 1000 repeticiones.

3.5 Determinación indirecta del ácido producido

Las BAA fueron inoculadas en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de caldo de papa (**Tabla 7**). Para determinar la tolerancia al etanol se evaluaron las siguientes concentraciones al 2%, 4%, 6%, 8%, 10% y 12%, dejando fermentar a temperatura ambiente durante 20 h y se tomaron muestras de 2 mL cada 2 h. El contenido de ácido se midió por titulación con NaOH 0.1 N y fenolftaleína como indicador (Romero-Cortes *et al.*, 2012). La concentración de acidez (basado en ácido acético) se obtuvo mediante la siguiente fórmula (Nuño, 1996):

$$\text{Ácido acético (g/L)} = \frac{\text{mL gastados de NaOH} \times \text{N} \times 60.052}{\text{mL de muestra}}$$

Donde 60.052 representa el peso molecular del ácido acético.

3.6 Cuantificación de ácidos orgánicos por HPLC

Las BAA fueron inoculadas en caldo de papa (**Tabla 7**) a temperatura ambiente y 130 rpm durante 22 h. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 10 mL para inocular en medio alcohólico con distintas concentraciones de etanol (6, 8 y 10%), que fueron seleccionadas después de realizar varias pruebas preliminares y se incubaron durante de 96 h, los medios fueron centrifugados a 5,000 rpm durante 20 minutos en tubos falcón de 50 mL, el sobrenadante se depositó en otro tubo falcón etiquetado con el porcentaje de etanol correspondiente, se dejó en refrigeración y luego en congelación (-86 °C). Las muestras fueron enviadas al CIATEJ (Mérida, Yucatán, México), para realizar la cuantificación de los ácidos orgánicos mediante HPLC.

3.6.1 Cuantificación del ácido por HPLC

Para la cuantificación de ácidos orgánicos, se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Marca Thermo Scientific Finnigan Surveyor (HPLC). El sistema HPLC consistió en una bomba Surveyor LC Plus, auto muestreador y detector RI Surveyor Plus. La separación se llevó a cabo usando una columna Phenomenex ROA Organic acid (00H-0138-K0 de 150 x 7.8 mm), H₂SO₄ 0.005 N, como fase móvil. La temperatura de la columna se mantuvo a 60°C, con un flujo de 0.6 mL/min y la temperatura del detector fue de 40°C. Las muestras fueron previamente diluidas 1:10 y filtradas antes de la inyección empleando filtros de acrodisco PTFE PHENEX, 25 mm, 0.45 µm de poro. Las concentraciones de ácidos orgánicos se determinaron a partir de curvas de calibración elaboradas con una mezcla de estándares de ácido láctico, ácido acético y ácido isobutírico (todos de Sigma-Aldrich) de concentraciones a partir de 2,000 ppm hasta 8,000 ppm y una curva de calibración a partir de estándar de ácido butírico (Sigma Aldrich) a partir de 250 a 3,000 ppm.

3.7 Conservación por congelación

Para la conservación de las cepas, estas fueron inoculadas en un matraz Erlenmeyer con 100 mL de caldo de papa (**Tabla 7**) durante 22 h, después se tomó una alícuota de 10 mL para inocular en un medio nuevo. Posterior a 72 h, el medio se centrifugó a 5,000 rpm durante 20 min en un tubo falcón de 50 mL, este procedimiento se repitió hasta obtener el pellet. El sobrenadante fue depositado en otro tubo falcón, mientras que el pellet se le agregó 4 mL de caldo papa con glicerol al 10% como crioprotector (**Tabla 8**). El tubo se llevó a vortex por unos minutos hasta obtener una mezcla homogénea, después se depositaron 700 µL en 6 tubos Eppendorf manteniéndolos en congelación a -20°C (Thermo Fisher Scientific, mod. HFU600A63), hasta su uso posterior.

3.8 Conservación por liofilización

Las BAA fueron inoculadas en dos matraces Erlenmeyer con 100 mL de caldo de papa (**Tabla 7**) durante 22 h en agitación a 130 rpm, después se vaciaron 50 mL de cultivo en 4 tubos falcón estériles llevándolos a centrifugación a 5,000 rpm durante 20 minutos. En otros dos matraces con 100 mL de crioprotector (**Tabla 9**) fue agregado el pellet y se vació en 4 bolsas ziploc dejándolas congelar. Una vez congeladas las muestras, estas fueron

colocadas en un liofilizador (Marca Labconco, Modelo 700401030), a condiciones 2.0 mBar, -50°C, por 120 h.

Tabla 8. Medio de conservación por congelación.

| Reactivo | Cantidad |
|----------------------|-----------------|
| Glucosa | 10 g/L |
| Extracto de levadura | 2 g/L |
| Glicerol | 100 ml/L |
| Peptona de caseína | 2 g/L |
| Etanol | 40 ml/L |
| Papa | 100 g/L |

Esterilizar a 120°C durante 15 minutos. El etanol y glicerol se agregan después de esterilizar.

Fuente: Romero-Cortes *et al.*, 2012.

Tabla 9. Crioprotector.

| Reactivo | Cantidad |
|----------------------|-----------------|
| Glucosa | 10 g/L |
| Extracto de levadura | 2 g/L |
| Glicerol | 10 ml/L |
| Peptona de caseína | 2 g/L |
| Etanol | 40 ml/L |
| Papa | 100 g/L |
| Leche descremada | 100 ml/L |

Esterilizar a 120 °C durante 15 minutos. El etanol y glicerol se agregan después de esterilizar.

Fuente: (Romero-Cortes *et al.*, 2012).

3.9 Control de viabilidad de la BAA conservada por congelación

El control de la viabilidad de las BAA congeladas se realizó después de un período de 90 días. Las BAA se descongelaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se homogeneizaron en vortex. Se procedió a inocular 2 mL de caldo de papa (**Tabla 7**) con 50 µL de la muestra descongelada, se dejó incubar a 29°C por 24 horas, después se tomaron 20 µL para inocular un nuevo tubo con 2 mL de caldo de papa.

Se procedió a inocular por duplicado 2 mL de caldo de papa, con 20 μ L de la muestra descongelada (**Tabla 8**), se dejó incubar a 29°C por 24 horas, después se realizaron diluciones a las 48 y 72 horas. Se tomaron 10 μ L para sembrar en cajas de Petri con medio de cultivo CAAR y se incubaron durante 7 días a 29°C.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento de Bacterias Ácido Acéticas (BAA)

En la muestra de pulque analizada en medio CAAR (**Figura 3A**), las colonias de bacterias del ácido acético fueron reconocidas debido a la solubilidad de CaCO_3 , formando así un halo claro transparente alrededor de las colonias (**Figura 3B**), dicho proceso se le conoce como irisación, el cual sucede por la acidificación del medio (Yamada *et al.*, 1999; Seearunruangchai *et al.*, 2004). Además, en el medio CAAR se observó un cambio de color inicial de amarillo a azul después de 96 h por la oxidación del etanol a ácido. Sin embargo, como el ácido acético se oxida a CO_2 y H_2O , se produjo un retorno al color amarillo tras un periodo de incubación prolongado (APÉNDICE A) (Mukadam *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2018).

En un estudio realizado por Sahoo *et al.*, (2020), se aislaron trece cepas de BAA termotolerantes a partir de residuos de granada y manzana utilizando medio Carr. Los resultados indicaron que los medios Carr cambiaron de color verde a amarillo después de 24 h y luego volvieron al color verde después de 72 h debido a la sobreoxidación, confirmando que las cepas pertenecen al género *Acetobacter* sp.

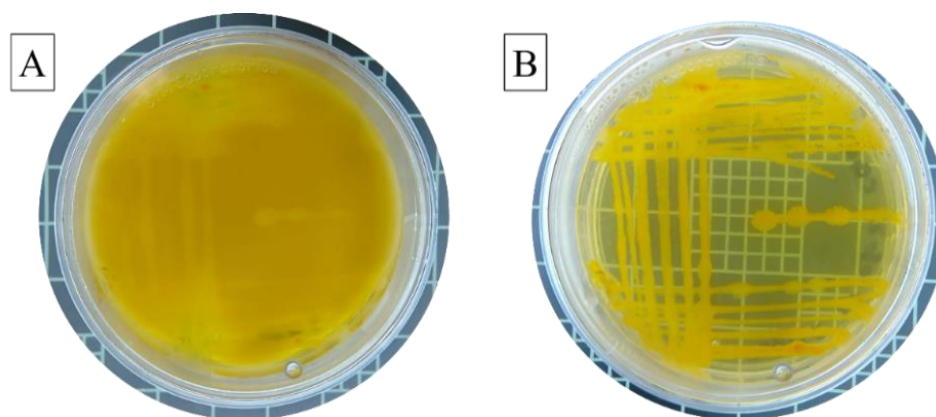


Figura 3. Colonias de BAA en medio de cultivo CAAR. (A) Aisladas de la bebida de pulque, y (B) con solubilidad del CaCO_3 .

4.1.1 Características morfológicas de las BAA aisladas

En la **Figura 4**, se muestra las bacterias aisladas de la muestra de pulque natural, donde se lograron distinguir bacilos Gram negativos, de manera aislada, en pares o en cadenas, con tamaño variable.

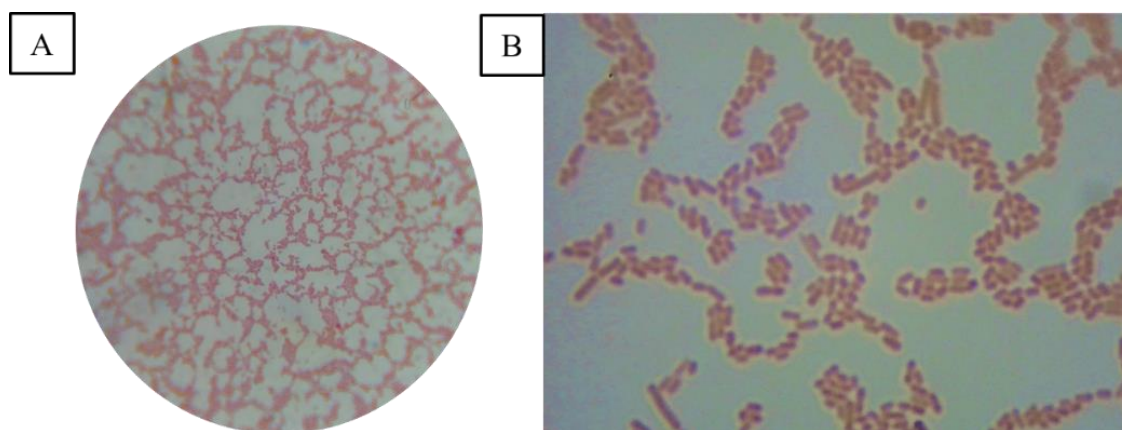


Figura 4. Tinción de Gram de la bacteria aislada. (A) vista con aumento de 100X (B) y foto tomada con filtro AmScope (MD130).

De acuerdo con las características morfológicas, la oxidación etanol y la sobreoxidación observadas en el medio CAAR permitieron determinar que la bacteria aislada pertenece al género *Acetobacter* sp.

4.1.1.1 Morfología de *A. malorum*

El microscopio electrónico de barrido (SEM) reveló que las cepas de BAA (TRC-B6 y TRC-B7) aisladas tienen una forma elipsoidal, ya sea aislada o en pares. No se identificaron flagelos, lo que indica que son células no móviles (**Figura 5**). Además, el tamaño promedio de las bacterias observadas fue de aproximadamente 0.63 μm de ancho por 1.38 μm de largo, por lo que difiere ligeramente con los valores 0.9 x 1.1-1.3 μm reportados en trabajos previos (Cleenwerck *et al.*, 2002).

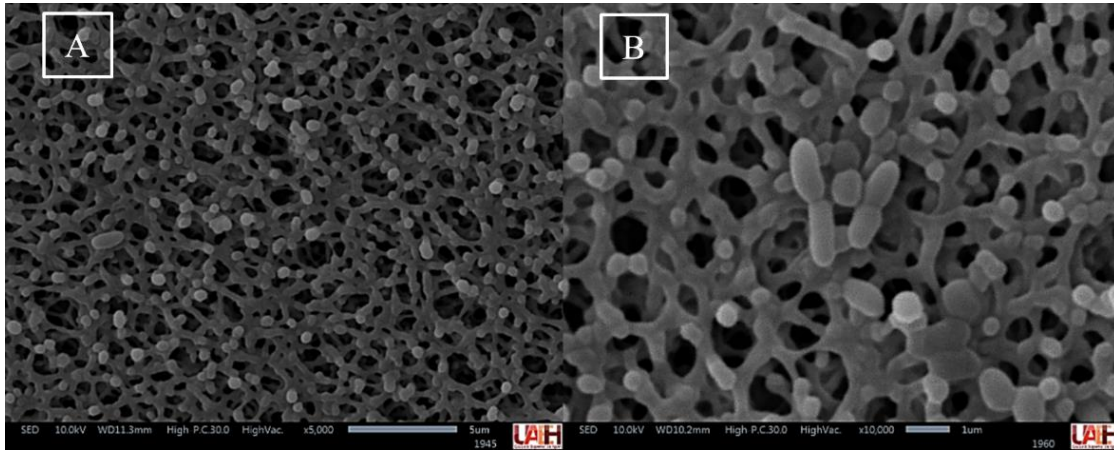


Figura 5. Imagen SEM de *A. malorum* cepa TRC-B7 que muestra detalles de las células bacterianas. (A) vistas a 5,000X (B) y a 10,000X.

4.2 Cinética de crecimiento de las BAA

Mediante recuento viable en placa sobre medio PDA (APÉNDICE B) se realizó la curva de crecimiento de las colonias aisladas de *A. malorum*. Como se puede observar en la **Figura 6**, durante las primeras 6 horas el crecimiento de las colonias se mantuvo lento y constante en un promedio de 1.45×10^3 UFC/mL, lo que demuestra que hubo una fase de latencia, este comportamiento probablemente sucedió por la transferencia del cultivo bacteriano de un medio rico (caldo de papa nutritivo) a uno más pobre (PDA) (empobrecimiento del medio), provocando un crecimiento tardío (Madigan *et al.*, 2015) y alcanzando un valor de 2.42×10^3 UFC/mL a las 10 horas.

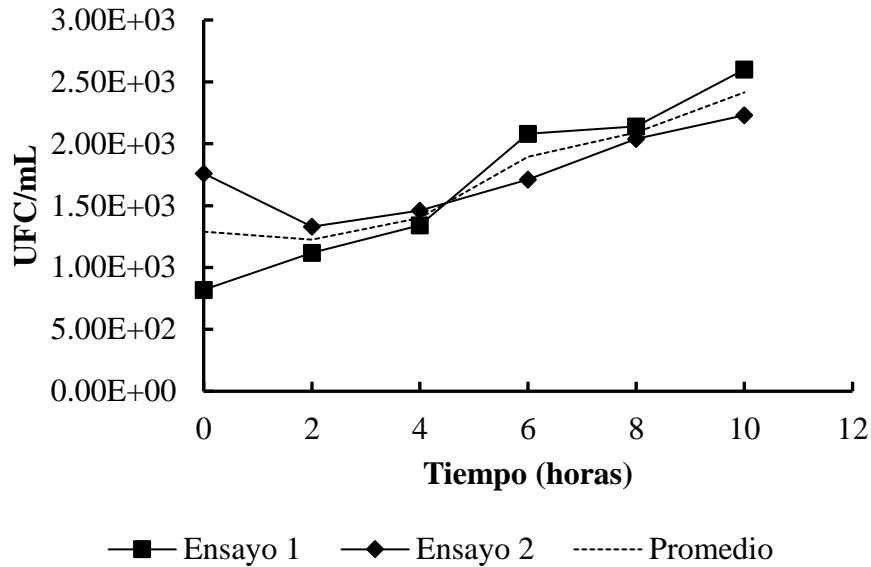


Figura 6. Cinética de crecimiento acumulado de *Acetobacter malorum*.

En la **Figura 7** se puede observar el cálculo de la velocidad específica de crecimiento, resultando de 0.0879 h^{-1} a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Comparando con los valores De Ory y colaboradores (1998), quienes obtuvieron velocidades específicas de crecimiento de 0.0584 ± 0.01 a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y 0.0944 ± 0.04 a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, se puede concluir que el resultado de esta investigación se encuentra dentro del rango reportado por ellos.

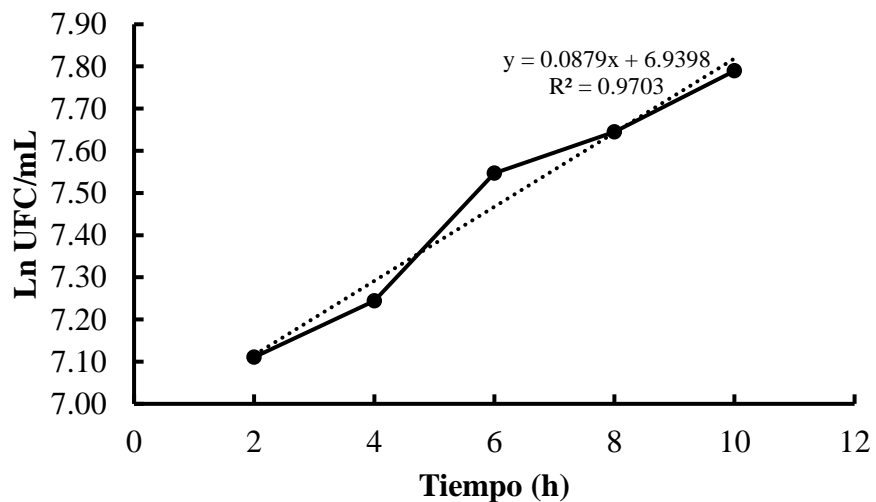


Figura 7. Velocidad específica de crecimiento de *Acetobacter malorum*.

4.3 Caracterización molecular de la BAA

En este trabajo, se caracterizó un total de dos secuencias nuevas de nucleótidos de BAA, pertenecientes al género *Acetobacter*, junto con secuencias adicionales procedentes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biothechnology Information, NCBI) del GenBank. Para la amplificación de la región del gen 16S del ARNr de las bacterias aisladas de la muestra de pulque, se utilizó el par de primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1525R (5'-AAGGAGGTGWTCCARCC-3') (Menasria *et al.*, 2024). Posteriormente, la taxonomía de los aislados de las cepas TRC-B6 y TRC-B7 se realizó con el programa BLAST (v2.15.0), mediante su comparación con secuencias de BAA disponibles en la base de datos del GenBank del NCBI (Zhang *et al.*, 2000). Obteniéndose un porcentaje de similitud de 99.86 a 99.87% para las dos secuencias analizadas, con la secuencia de la accesión EU096228 de la cepa EW-m de *Acetobacter malorum*, aislada del intestino medio de *Drosophila*, en Corea del Sur (Ryu *et al.*, 2008). La longitud de los fragmentos amplificados de las cepas de *A. malorum* identificadas en este trabajo fue de 1472 y 1478 pares de bases (pb), las cuales posteriormente fueron depositadas en la base de datos del GenBank con los siguientes números de accesión PP377884 y PP377885. El análisis realizado con el programa BLAST confirmó la identificación morfológica previa de las dos cepas de las BAA aisladas de la muestra de pulque, ubicando así a los dos aislados dentro del género *Acetobacter*, correspondiendo a nuevos reportes de *A. malorum* para México.

Las secuencias del gen 16 ARNr seleccionadas para este estudio tuvieron una longitud de entre 834 y 1,541 pb y la longitud de la secuencia consenso para el alineamiento de secuencias múltiples fue de 1,554 pb. El análisis filogenético para la región 16S del ARNr de las cepas mexicanas de *A. malorum* y otras 18 secuencias de bacterias relacionadas del GenBank, se realizó con el método estadístico Neighbor-joining (NJ) generando el siguiente árbol filogenético (**Figura 8**).

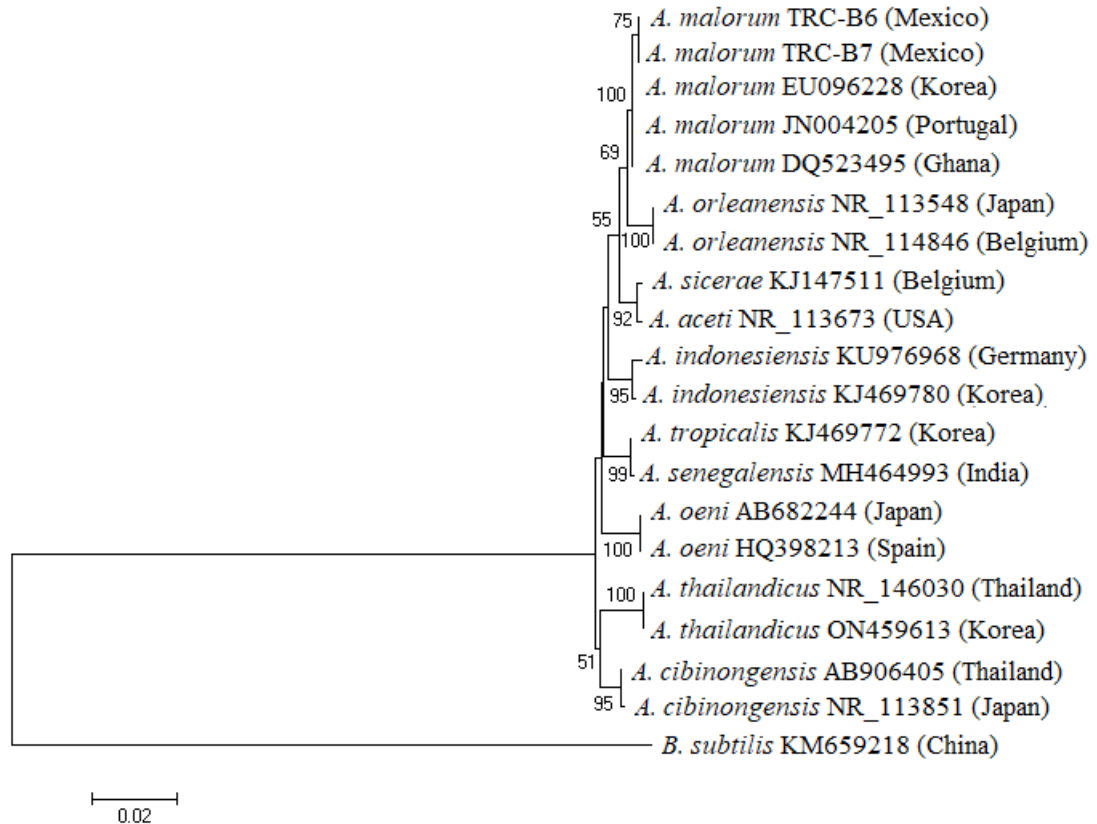


Figura 8. Árbol filogenético de *Acetobacter malorum*.

El análisis filogenético reveló tres clados principales (I, II y III), representados por secuencias de BAA del género *Acetobacter*, respaldado por el método estadístico de filogenia bootstrap, utilizando 1000 repeticiones aleatorias. Para inferir relaciones filogenéticas, el árbol se enraizó utilizando la secuencia KM659218 de *Bacillus subtilis* como un grupo externo (You & Zhang, 2014). En la **Figura 8**, se muestra el mejor árbol generado, que tiene una longitud total de sus ramas = 0.34566222.

En la parte superior del clado I, se ubicaron las secuencias de *A. malorum* aisladas en este trabajo con un valor de soporte estadístico de bootstrap de 75. Las cuales, a su vez se ubicaron junto a las accesiones EU096228, JN004205 y DQ523495 de *A. malorum*, aisladas de muestras de *Drosophila* (Ryu *et al.*, 2008; Barata *et al.*, 2011) y de cacao fermentado (Nielsen *et al.*, 2007) en Corea, Portugal y Gana, respectivamente. Con un valor de soporte estadístico bootstrap de 100, lo cual confirma la identificación morfológica previa de las cepas TRC-B6 y TRC-B7 como nuevos aislamientos de *A. malorum* para México. En una

rama hermana se ubicaron las secuencias NR_113548 y NR_114846 de *A. orleanensis*, aisladas en Bélgica (Cleenwerck *et al.*, 2002) y Japón (Lino *et al.*, 2012) con un valor de soporte estadístico de 100. Estas dos ramas a su vez obtuvieron un valor de soporte estadístico de 69. Por otro lado, en la parte inferior del mismo clado I, en otra rama separada se ubicaron las secuencias KJ147511 y NR_113673 de *A. sicerae* y *A. aceti* la primera aislada en Bélgica de una muestra de cidra (Li *et al.*, 2014), y de los Estados Unidos de Norteamérica la segunda accesión (Nakagawa *et al.*, 2014a). Con un valor de soporte estadístico de 92. A su vez, todas las secuencias del clado I, obtuvieron un valor de soporte estadístico bootstrap de 55, lo cual es lógico al tratarse de diferentes especies dentro del mismo género *Acetobacter*.

En el clado II, se ubicaron en la parte superior con un valor de soporte estadístico de 95, dos secuencias de *A. indonesiensis*. La primera aislada de una muestra de sangre humana en Alemania (Kohlmann, 2016), y la segunda de una muestra de vinagre en Corea del Sur (Ryu *et al.*, 2014a). En la parte central del clado II, se ubicaron las secuencias de las accesiones KJ469772 y MH464993 de *A. tropicalis* y *A. senegalensis*, aisladas en Corea del Sur y la India, procedentes de muestras de vinagre y frutas fermentadas, respectivamente (Ryu *et al.*, 2014b; Uma *et al.*, 2018). Con un valor de soporte estadístico bootstrap de 99. En la parte inferior del mismo clado, con un valor estadístico bootstrap de 100, se ubicaron las secuencias de las accesiones AB682244 y HQ398213 de *A. oeni* aisladas en España y Japón (Macian, 2010; Nakagawa *et al.*, 2011).

Por último, en la parte inferior del árbol filogenético con un valor de soporte estadístico bootstrap de 51, se ubicaron dos secuencias de *A. thailandicus* (NR_146030 y ON459613), aisladas en Tailandia y Corea del Sur (Pitiwittayakul *et al.*, 2015a; Heo *et al.*, 2022), y dos secuencias de *A. cebinongensis* aisladas en Tailandia y Japón (Nakagawa *et al.*, 2014b; Pitiwittayakul *et al.*, 2015b). Soportados por valores bootstrap altos de 100 y 95, respectivamente.

4.4 Tolerancia de *A. malorum* al etanol

Se estudió la tolerancia al etanol de las cepas de *A. malorum* aisladas a diferentes concentraciones (2, 4, 6, 8, 10 y 12% v/v) a temperatura ambiente durante 20 h, con ello se midió la producción indirecta de ácido acético por valoración con NaOH 0.1 N y

fenolftaleína (**Figura 9**). Los resultados mostraron que *A. malorum* fue capaz de crecer cuando la concentración de etanol supera el 10-12% (v/v). Sin embargo, se obtuvo mayor concentración de ácido acético al 8 y 10% de etanol (1.12 ± 0.30 g/L), a diferencia del 12% (0.97 ± 0.30 g/L) que induce una disminución en la producción de ácido acético en comparación con las concentraciones anteriores.

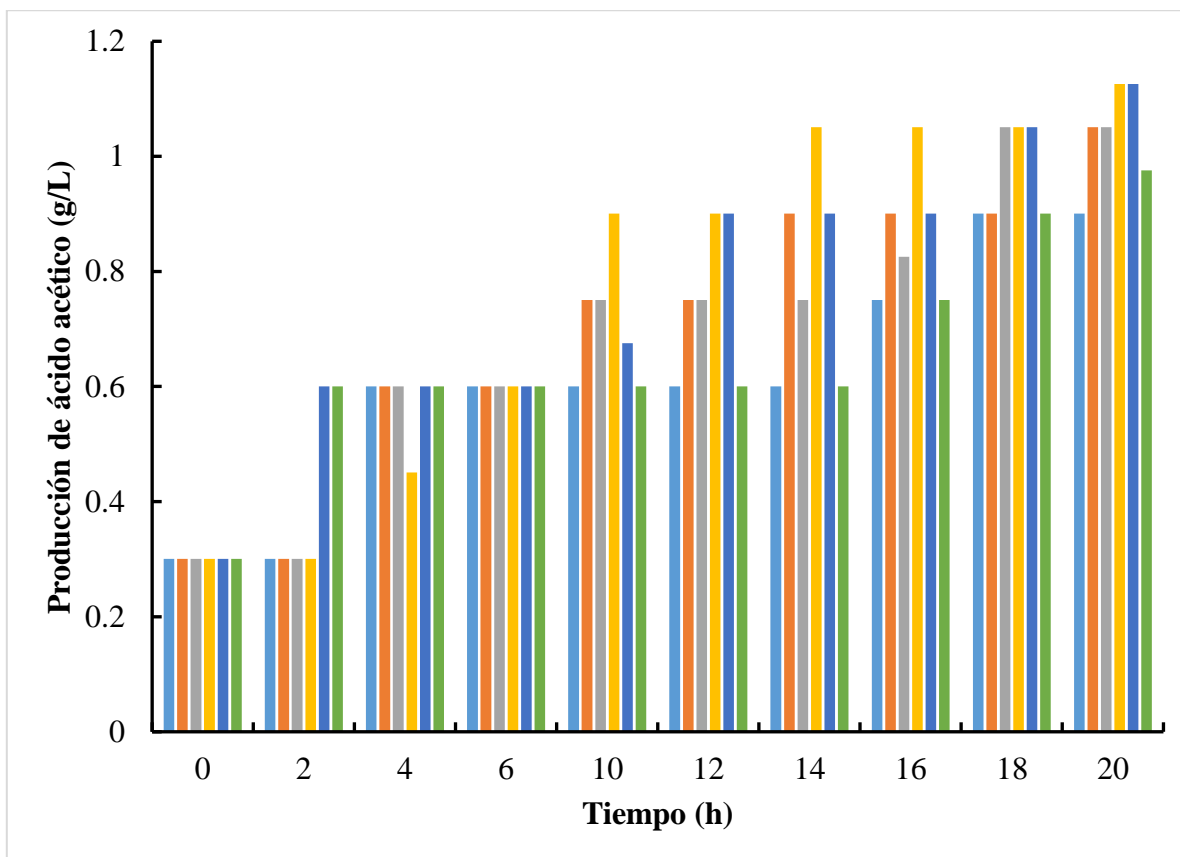


Figura 9. Concentración de ácido acético a través del tiempo a diferentes concentraciones de etanol como sustrato. ■ 2%, ■ 4%, ■ 6%, ■ 8%, ■ 10% y ■ 12%.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los valores reportados por otros autores donde *A. malorum* mostró tolerancia a la mayor concentración de etanol (12%) pero con una menor producción de ácido acético (Es-sbata *et al.*, 2021). En otro trabajo, El-Askri *et al.* (2022), estudiaron la tolerancia de seis aislados del género *Acetobacter* al pH y reportaron que el pH ideal para las cepas identificadas como *A. fabarum* y *A. pasteurianus* fue de 5. En el mismo estudio se encontró que la producción óptima de ácido acético se obtuvo a una concentración del 1% (v/v) para las cepas de FAGD1, FAGD10 y FAGD18, y del 3% (v/v) para GCM2, GCM4 y GCM15. Estas cepas fueron capaces de tolerar una

concentración de ácido acético de hasta el 6% (v/v). La cinética de producción de las seis cepas evaluadas mostró los mayores niveles de crecimiento y producción de ácido acético a 30°C.

Chen y cols. (2016), aislaron de vinagre chino Pei, siete cepas de *A. pasteurianus* con tolerancia a temperaturas superiores a 40°C y concentraciones de etanol superiores al 10% (v/v). Donde la cepa AAB4 fue la que produjo el mayor rendimiento de producción de ácido en condiciones de prueba de etanol (4%) y alta temperatura (30-40°C), manteniendo también una relación de transformación alcohol-ácido de más del 90.5% a 30°C y diferentes concentraciones iniciales de etanol (4-10%). Siendo estas cepas valiosas para la producción de vinagre en países con altas temperaturas estivales.

4.4.1 Conversión de etanol a ácido

La conversión de etanol en ácido acético por parte de las BAA se considera el proceso principal en la fermentación del vinagre (El-Askri *et al.*, 2022). En este trabajo se comprobó que los mejores resultados se obtuvieron cuando se utilizó la concentración de 6, 8 y 10% de etanol con las cepas TRC-B6 y TRC-B7 de *A. malorum*, observándose los mejores resultados a partir de las 10 horas con la concentración de etanol del 8% en las condiciones probadas. Al respecto, Gil y cols. (2020) estudiaron la acidez del vinagre de raíz de campanilla con un aislado de *A. pasterianus*, sus resultados mostraron un aumento de 0.23 a 0.37% el día inicial a 5.41 y 5.59% el día 10 y 15, respectivamente.

4.5 Caracterización y cuantificación del ácido producido por HPLC

Después de haber analizado mediante HPLC con controles internos (APÉNDICE E), los sobrenadantes de las muestras obtenidas de la fermentación con diferentes % de etanol (6, 8 y 10) con la cepa de *A. malorum*, se observó que la cepa caracterizada tiene la capacidad de producir otros ácidos orgánicos diferentes al ácido acético (**Tabla 10**).

Tabla 10. Cuantificación del ácido producido por las BAA por HPLC.

| Código | Análisis | Resultado |
|--------------|---------------------------------|-----------|
| AM (Testigo) | Ácidos orgánicos totales (mg/L) | *** |
| | Ácido láctico (mg/L) | ND |
| | Ácido acético (mg/L) | ND |

| | | |
|-----------------|---------------------------------|-------------|
| | Ácido isobutírico (mg/L) | ND |
| | Ácido butírico (mg/L) | ND |
| AM (6%) | Ácidos orgánicos totales (mg/L) | 36 |
| | Ácido láctico (mg/L) | 10.2 |
| | Ácido acético (mg/L) | ND |
| | Ácido isobutírico (mg/L) | ND |
| | Ácido butírico (g/100 g) | 25.8 |
| AM (8%) | Ácidos orgánicos totales (mg/L) | 40.3 |
| | Ácido láctico (mg/L) | 11.2 |
| | Ácido acético (mg/L) | ND |
| | Ácido isobutírico (mg/L) | ND |
| | Ácido butírico (g/100 g) | 29.1 |
| AM (10%) | Ácidos orgánicos totales (mg/L) | 43.4 |
| | Ácido láctico (mg/L) | 5.4 |
| | Ácido acético (mg/L) | ND |
| | Ácido isobutírico (mg/L) | ND |
| | Ácido butírico (mg/L) | 37.9 |

ND: No detectado, ***: Sin datos.

El etanol se produce por fermentación, al igual que otros compuestos, como: el butanol, el isobutanol y los ácidos acético, antranílico, succínico y butírico (Liu *et al.*, 2018). En particular, el ácido butírico se utiliza en la fabricación de productos farmacéuticos, perfumes, plásticos, plastificantes y combustibles, así como en la fabricación de ésteres de butirato, como el butirato de celulosa, importantes productos químicos finos y biocombustibles como el butanol y el butirato de butilo (Sjöblom *et al.*, 2016). Los ejemplos más representativos de especies de bacterias productoras de butirato son: *Clostridium butiricum*, *Clostridium kluyveri*, *Clostridium pasteurianum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Butyrivibrio fibrisolventes*, y *Eubacteria limosum* (Seedorf *et al.*, 2008). Druaux y colaboradores (1997) sugirieron el posible uso de alcoholes para la producción de ácido carboxílico mediante cepas de *Acetobacter aceti* (para ácido butírico a partir de butanol) y *Gluconobacter oxydans* (para ácido propiónico a partir de n-propanol).

4.6 Control de viabilidad de las BAA conservadas por congelación

La conservación por congelación de las BAA, se realizó con glicerol al 10% como crioprotector y se almacenaron en tubos Eppendorf a -20°C , el control de la viabilidad de las cepas congeladas se llevó a cabo después de 90 días.

Las BAA conservadas por congelación, fueron capaces de crecer en medio CAAR, y solubilizar el CaCO_3 , sin embargo, no realizaron una irisación completa del medio en comparación con las cepas antes de ser conservadas (**Figura 10**). De acuerdo con Gherna (2010), menciona que no es recomendable la congelación a -20°C para conservar las células ya que puede dañarlas y con ello afectar su viabilidad, también sugiere el uso del glicerol al 15% para células en general.

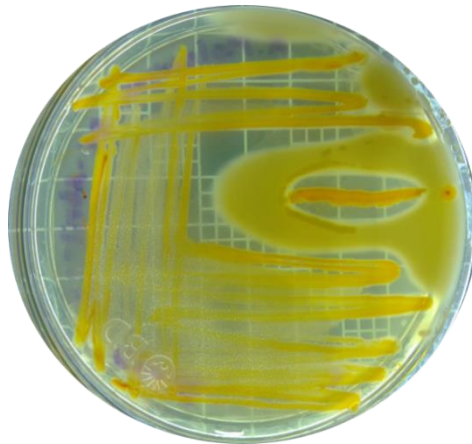


Figura 10. Crecimiento de *A. malorum* en medio CAAR después de ser conservada por congelación y almacenada a -20°C .

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

El aguamiel y el pulque promueven el crecimiento de diversas poblaciones microbianas, las cuales utilizan sus compuestos como fuente de carbono y energía para la producción celular y la formación de productos de fermentación. Las bacterias ácido acéticas (BAA) utilizan el etanol como principal sustrato para la producción de ácido acético. En este trabajo:

1. Se logró caracterizar 2 cepas del género *Acetobacter* a partir de una muestra de pulque y se caracterizaron mediante técnicas bioquímicas, microscópicas y de biología molecular.
2. Las cepas identificadas de BAA (TRC-B6 y TRC-B7) solubilizaron el CaCO_3 en el medio. Se identificaron, como bacilos Gram negativos.
3. La tolerancia a la concentración de etanol superó el 12% (v/v). Sin embargo, se obtuvo mayor producción de ácido acético al 8 y 10% de etanol (1.12 ± 0.30 g/L).
4. Se observó por HPLC que las cepas caracterizadas tienen la capacidad de producir otros ácidos orgánicos, diferentes al ácido acético.
5. Las cepas aisladas se identificaron molecularmente como nuevos aislados de *Acetobacter malorum*. Las cuales tienen la capacidad de producir ácidos orgánicos de interés industrial, como ácido butírico.

REFERENCIAS

- Acosta-Ovallos, A. K. (2019). Evaluación de técnicas de conservación para microorganismos de importancia en microbiología industrial en el Cepario de la Universidad de Santander. Tesis de Licenciatura. Santander. Santander, Colombia. 98 pp.
- Agronoticias. (2023). En México existen 160 especies de Agave; 40 se usan para la obtención de aguamiel. Programma Comunicación S.A. de C.V. Consultado [10/06/2024]. En línea: <https://agronoticias.com.mx/2023/03/27/en-mexico-existen-160-especies-de-agave-40-se-usan-para-la-obtencion-de-aguamiel/>
- Álvarez-Ríos, G., Figueredo Urbina, C., & Casas, A. (2020). Physical, chemical, and microbiological characteristics of pulque: management of a fermented beverage in Michoacán, Mexico. *Foods*, 9, 361.
- Arenas-Hernández, M. M. P., Romano-Valerio, A. Del P., & Acevedo-Ocampo, C. (2022). Integrón bacteriano. Estructura, resistencia antibiótica y aplicaciones benéficas. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 30(87), e3631.
- Astudillo-Melgar, F., Hernández Chávez, G., Rodríguez Alegría, M. E., Bolívar, F., & Escalante, A. (2023). Analysis of the microbial diversity and population dynamics during the pulque fermentation process. *Fermentation*, 9(4), 342.
- Azuma, Y., Hosoyama, A., Matsutani, M., Furuya, N., Horikawa, H., Harada, T., Hirakawa, H., Kuhara, S., Matsushita, K., Fujita, N., & Shirai, M. (2009). Whole-genome analyses reveal genetic instability of *Acetobacter pasteurianus*. *Nucleic Acids Research*, 37(17), 5768-5783.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2011). *The role of Drosophila sp. In the development of sour rot grape disease*. Consultado [13/03/2024]. En línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JN004205>
- Barrao, C. A., & Barja, F. (2017). Acetic acid bacteria strategies contributing to acetic acid resistance during oxidative fermentation. En: I. Y. Sengun (Ed.), *Acetic Acid*

Bacteria: Fundamentals and Food Applications. Food Science & Technology, Boca Raton, EE. UU. 92-119 pp.

Bozzola, J. J. (2013). Conventional specimen preparation techniques for scanning electron microscopy of biological specimens. In: Kuo, J. (Eds.). *Electron Microscopy: Methods and Protocols*. 3rd ed., Vol. 1117, Humana Press. Totowa, New Jersey, EE. UU. 133-150 pp.

Campos, Q. I. (2010). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas del pulque con capacidad probiótica. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. 87 pp.

Campos, I., Escalante, A., & Giles-Gómez, M. (2009). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas del pulque con capacidad probiótica. En: XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Productos de Alcoholes y Levaduras. 21 a 26 de junio, 2009, Acapulco, Guerrero, México. Consultado [11/06/2024]. En línea: http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/ÁREA_III/CIII30.pdf

Carr, J. G., & Shimwell, J. L. (1961). The acetic acid bacteria, 1941–1961. *Antonie van Leeuwenhoek*, 27(1), 386-400.

Castro, R. D., Hernández, S. H., & Yáñez, F. J. (2015). Probiotic properties of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from aguamiel of *Agave salmiana*. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 7, 107–117.

Cervantes-Contreras, M., & Pedroza, A. M. (2008). Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia de Raman. *Superficies y Vacío*, 20(3), 1-5.

Chacón-Vargas, K., Torres, J., Giles Gómez, M., Escalante, A., & Gibbons, J. G. (2020). Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Sci. Rep*, 10(1), 15115.

- Chellapandian, M., Larios, C., Sanchez-Gonzalez, M., & Lopez-Munguia, A. (1998). Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from 'pulque', a traditional Aztec alcoholic beverage. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(1-2), 51-56.
- Chen, Y., Bai, Y., Li, D., Wang, C., Xu, N., & Yong, H. Y. (2016). Screening and characterization of ethanol-tolerant and thermotolerant acetic acid bacteria from Chinese vinegar Pei. *World J Microbiol Biotechnol*, 32(1), 14.
- Cleenwerck, I., & De Vos, P. (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 2-14.
- Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D., & Swings, J. (2002). Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1551-1558.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2021). Diversidad biológica magueyes. Biodiversidad mexicana. Consultado [10/06/2024].
En línea:
<https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/magueyes/diversidad-magueyes>
- Cortazar-Martínez, A., Gómez Rodríguez, T., & Ortíz Yescas, G. (2022). Tecnología del frío aplicada a la conservación de un producto artesanal del estado de Hidalgo (pulque). En: Muñoz, I. C. A., Vargas, V. T., Karthik, T. V. K., Alfaro, P. B., & F. García, F. E. (Eds), *Convergencia de la ciencia: una visión multidisciplinaria. La Tecnología y su Injerencia Ante los Restos del 2021*. Colegio de Ciencias y Artes de Tabasco. Tabasco, México. 39-43 pp.
- Crotti, E., Chouaia, B., Alma, A., Favia, G., Bandi, C., Bourtzis, K., & Daffonchio, D. (2016). Acetic acid bacteria as symbionts of insects. In: Matsushita, K., Toyama, H., Tonouchi, N., & Okamoto K. A. (Eds.), *Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology*. Springer, EE. UU. pp. 121-142.

- Cuellar, C. K. E., & Rosas, D. L. M. (2019). Obtención de una bebida alcoholica a partir del aguamiel de cabuya negra (*Agave americana* L.) y cabuya blanca (*Fucraea andina*) aromatizada con cedró (*Aloysia citriodora*) y toronjil (*Melissa officinalis*). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Hermilio Valdizán. Hermilio Valdizán, Perú. 106 pp.
- Cuervo-Parra, J. A., López-Pérez, P. A., & Romero-Cortes, T. (2016). Criobiología: Criopreservación de microorganismos y de otras fuentes biológicas a bajas temperaturas. Editorial Publica, España. 112 pp.
- De Ory, I., Romero, L., & Cantero, D. (1998). Modelling the kinetics of growth of *Acetobacter aceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 49, 189–193.
- De Vero, L., Gullo, M., & Giudici, P. (2017). Preservation of Acetic Acid Bacteria. In: Sengun, I. Y. (Eds.), *Acetic Acid Bacteria: Fundamentals and Food Applications*. CRC Press. Wales, England. 193-212 pp.
- Druaux, D., Mangeot, G., Endrizzi, A., & Belin, J.-M. (1997). Bacterial bioconversion of primary aliphatic and aromatic alcohols into acids: effects of molecular structure and physico-chemical conditions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 68(2), 214-218.
- El-Askri, T., Yatim, M., Sehli, Y., Rahou, A., Belhaj, A., Castro, R., Durán-Guerrero, E., Hafidi, M., & Zouhair, R. (2022). Screening and characterization of new *Acetobacter fabarum* and *Acetobacter pasteurianus* strains with high ethanol-thermo tolerance and the optimization of acetic acid production. *Microorganisms*, (10)9, 1741.
- Enríquez-Salazar, M. I., Veana, F., Aguilar, C. N., de la Garza, I., Lopez, M. G., Rutiaga Quiñones, O. M., Morlett, J., & Rodriguez, R. (2017). Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from *Agave salmiana* and *A. atrovirens* during different seasons of year. *Food Sci Biotechnol*, 26(4), 1003-1011.

- Escalante, A., López, S. D. R., Velázquez, G. J. E., Gómez, G. M., Bolívar, F., & López, M. A. (2016). Pulque, a traditional mexican alcoholic fermented beverage: historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1026.
- Escalante, A., Giles, G. M., Esquivel, G., Matus, A. V., Moreno, T. R., López, M. A., & Lappe, O. P. (2012). Pulque fermentation. In: Hui Y. H., & Özgül-Evranoz E., (Eds.), *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology*. CRC Press Inc. Boca Ratón, FL, EE. UU. pp. 691-706.
- Escalante, A., Giles Gómez, M., Hernández, G., Córdova Aguilar, M. S., López Munguía, A., Gosset, G., & Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int J Food Microbiol*, 124(2), 126-134
- Escalante, A., Rodríguez, M. E., Martínez, A., López Munguía, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235(2), 273-279.
- Es-sbata, I., Lakhlifi, T., Yatim, M., El-Abid, H., Belhaj, A., Hafidi, M., & Zouhair, R. (2021). Screening and molecular characterization of new thermo- and ethanol-tolerant *Acetobacter malorum* strains isolated from two biomes Moroccan cactus fruits. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 68(3), 476-485.
- Euzéby, J. P. (1987). LPSN bacterio.net. [Consultado 12/06/2024]. En línea: <http://www.bacterio.net/-allnamesdl.html>
- Fuentes, R. L. E., Tapia, H. A., Jiménez, S. T., Mascarúa, E. M. A., Santoyo, P. Y., Caso, V. L. R., Romero, H. H. T., Cajica, E. M. del R., León, B. D., Rosales, P. M., Fügemann, M. P., & Castillo, R. M. G. (2003). Bacterias acéticas: diversidad e interacción con las plantas. *Elementos: Ciencia y Cultura*. 10(049), 47-51.
- García-Arce, Z. P., & Castro-Muñoz, R. (2021). Exploring the potentialities of the Mexican fermented beverage: pulque. *Journal of Ethnic Foods*, 8,35.

- García-Fournier, P. (2007). *Los hñähñü del Valle del Mezquital: maguey, pulque y alfarería*. ENAH, INAH, CONACyT. *Cuicuilco*, 14,41, 323-326.
- García-García, I., Santos-Dueñas, I. M., Jiménez-Ot, C., Jiménez-Hornero, J. E., & Bonilla-Venceslada, J. L. (2009). Vinegar Engineering. In: Solieri, L., & Giudici, P. (Eds.), *Vinegars of the World*. Springer, Milan, Italia. pp. 97-120.
- García-López, M. D., & Uruburu-Fernández, F. (2000). La conservación de cepas microbianas. *SEM*, 30, 12-16.
- Gerard, L. M. (2015). Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de vinagres de frutas. Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de València. València, España. 264 pp.
- Gherna, R. L. (2010). Culture Preservation. In M. C. Flickinger (Ed.), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*.
- Gil, N. Y., Gwon, H. M., Yeo, S. H., & Kim, S. Y. (2020). Metabolite profile and immunomodulatory properties of bellflower root vinegar produced using *Acetobacter pasteurianus* A11-2. *Foods*, 9(8), 1063.
- Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R. M., Stephan, M. P., Teixeira, K. R., Döbereiner, J., & De Ley, J. Y. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39, 361–364.
- Gomes, R. J., Borgues, M. F., Rosa, M. F., Castro Gómez, R. J., & Spinosa, W. A. (2018). Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. *Food Technology Biotechnology*, 56(2), 139-151.
- González-Benito, Á. (2005). Application of molecular techniques for identification and enumeration of acetic acid bacteria. Tesis de doctorado. Universitat Rovira i Virgili. Xarxa, España. 166 pp.
- González, M. F., Vázquez, C. P., Jaimez, O. J., & Zúñiga, J. M. A. (2016). Potencial probiótico de bacterias aisladas del pulque: una revisión. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 924-930

- Gutiérrez-Jiménez, J., Luna-Cazás, L. M., Mendoza-Orozco, M. I., Díaz-Marina, G. de J., Burguete-Gutiérrez, J. C., & Feliciano-Guzmán, J. M. (2015). Organización, mantenimiento y preservación de la colección de cultivos bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35, 95-102.
- Gullo, M., Mamlouk, D., De Vero, L., & Giudici, P. (2012). *Acetobacter pasteurianus* strain AB0220: cultivability and phenotypic stability over 9 years of preservation. *Current Microbiology*, 64, 576-580.
- Gutiérrez-Rodríguez, E. K. (2015). Detección de lactobacilos aislados del pulque con capacidad probiótica. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México. 96 pp.
- Guzmán-Pedraza, R., & Contreras-Esquivel, J. C. (2018). Aguamiel and its fermentation: science beyond tradition. *Mexican Journal of Biotechnology*, 3(1), 1-22.
- Heo, J., Won, M., Kwon, S.W. (2022). GenBank Direct Submission (10-MAY-2022). Consultado [21/03/2024]. En línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/ON459613>
- Herrera-Solórzano, M. C. (2008). Identificación polifásica de levaduras y bacterias ácido lácticas aisladas de aguamiel, pulque y semilla. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California, México. 71 pp.
- Hommel, R. K. (2014). *Acetobacter*; characteristics of the genus *Acetobacter*. In: Encyclopedia of Food Microbiology. Batt, C. A., & Tortorello, L. M. (Eds). Academic Press, Ithaca, NY, USA. 3-10 pp.
- Hurtado, M. M. A., Ramos, P. I. M., Parrado, S. D. S., & Guzmán, A. H. E. (2011). Aislamiento e identificación de bacterias ácido acéticas en materia prima y tren de fermentación en el Ingenio Providencia S.A. *Revista Tecnicana*. 27, 4-10.
- Ingram, L. (1990). Ethanol tolerance in bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 9(4), 305-319.

- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., & Swings, J. (2006). The family Acetobacteraceae: the genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* and *Kozakia*. *Prokaryotes*, 5, 163-200.
- Kim, S. H., Jeong, W. S., Kim, S. Y., & Yeo, S. H. (2023). Quality and functional characterization of acetic acid bacteria isolated from farm-produced fruit vinegars. *Fermentation*, 9(5), 447.
- Kohlmann, R. (2016). *Acetobacter indonesiensis* bacteremia in a child with metachromatic leukodystrophy. GenBank Direct Submission (24-MAR-2016). Consultado [20/03/2024]. En línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KU976968>
- Komagata, K., Iino, T., & Yamada, Y. (2014). The family Acetobacteraceae. In: E. R. *et al.* (Ed.), *The Prokaryotes - Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Springer. Verlag, Berlin, Alemania. pp. 545-577.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Li, L., Wieme, A., Spitaels, F., Balzarini, T., Nunes, O. C., Manaia, C. M., Van Landschoot, A., De Vuyst, L., Cleenwerck, I., & Vandamme, P. (2014). *Acetobacter sicerae* sp. nov., isolated from cider and kefir, and identification of species of the genus *Acetobacter* by dnaK, groEL and rpoB sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(7), 2407-2415
- Lino, T., Suzuki, R., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K., & Uchimura, T. (2012). *Acetobacter okinawensis* sp. nov., *Acetobacter papayae* sp. nov., and *Acetobacter persicus* sp. nov.; novel acetic acid bacteria isolated from stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan. *J Gen Appl Microbiol*, 58(3), 235-243.
- Liu, S., Duncan, S., Qureshi, N., & Rich, J. (2018). Fermentative production of butyric acid from paper mill sludge hydrolysates using *Clostridium tyrobutyricum* NRRL B-67062/RPT 4213. *Biocat. Agricult. Biotechnol*, 14, 48–51.

- Lynch, K. M., Wilkinson, S., Daenen, L., & Arendt, E. K. (2021) An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *International Journal of Food Microbiology*, 345, 109-128.
- Macian, M. C. (2010). Spanish Type Culture Collection – CECT. GenBank Direct Submission (11-OCT-2010). Consultado [21/03/2024]. En línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/HQ398213>
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D. (2015). *Biología de los microorganismos*. Pearson. Londres, Reino Unido. 1128 pp.
- Mamlouk , D., & Gullo, M. (2013). Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian J Microbiol*, 53(4), 377-384.
- Matías L. G., Peña-Caballero, V., Reyna-González, W., Domínguez-Díaz, L. R., & Martínez-Hernández, J. J. (2019). Valor nutricional y medicinal del pulque. *JONNPR*, 4(12), 1291-1303.
- Medina-Mendoza, C., Roldán-Cruz, E. I., & Vázquez-Jahuey, M. (2022). Caracterización fisicoquímica, microbiológica y organoléptica del aguamiel y pulque del Alto Mezquital, Hidalgo. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 19(4), 448–462.
- Menasria, T., Monteoliva-Sánchez, M., Benammar, L., Mabrouka, B., Ammar, A., Hacène, H., González-Paredes, A., & Aguilera, M. (2024). Culturable halophilic bacteria inhabiting Algerian saline ecosystems: a source of promising features and potentialities. *World J Microbiol Biotechnol*, 35, 132.
- Mercanoglu-Taban, B., & Saichana, N. (2017). Physiology and biochemistry of acetic acid bacteria. En: Sengun, I. Y. (Eds.). *Acetic Acid Bacteria*. Taylor & Francis Group. Wales, England. 71-91 pp.
- Mohammadi, A., & Amini, Y. (2015). Molecular characterization and identification of *Acrostalagmus luteoalbus* from Saffron in Iran. *Agriculture Science Developments*, 4(2), 16-18.
- Morgan, C., Herman, N., White, P., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 183-193.

- Mukadam, T., Punjabi, K., Deshpande, S., Vaidya, S., & Chowdhary, A. (2016). Isolation and characterization of bacteria and yeast from kombucha tea. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(6), 32-41.
- Nakagawa, Y., Muramatsu, Y., Miyashita, M., Sugimoto, M., Yoshino, M., & Kamakura, Y. (2011). NITE Biological Resource Center (NBRC). GenBank Direct Submission (10-NOV-2011). Consultado [21/03/2024]. En línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB682244>
- Nakagawa, Y., Muramatsu, Y., Miyashita, M., Sugimoto, M., Yoshino, M., & Kamakura, Y. (2014a). NITE Biological Resource Center (NBRC). GenBank Direct Submission (23-APR-2014). Consultado [20/03/2024]. En línea: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_113673
- Nakagawa, Y., Muramatsu, Y., Miyashita, M., Sugimoto, M., Yoshino, M., & Kamakura, Y. (2014b). NITE Biological Resource Center (NBRC). GenBank Direct Submission (23-APR-2014). Consultado [21/03/2024]. En línea: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_113851
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S., & Holzapfel, W. H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analyzed using culture-dependent and culture-independent method. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 168-186.
- Niu, D., Wang, L-H., Zeng, X-A., Wen, Q-H., Brennan, S. C., Tang, Z-S., & Wang, M-S. (2019). Effect of ethanol adaption on the inactivation of *Acetobacter* sp. by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 52, 25-33.
- Nuño-Pimienta, R. M. (1996). Optimización de pH y agitación para el crecimiento de *Acetobacter aceti* empleando la: metodología de superficie de respuesta. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. 108 pp.
- Parra, M. A. (2023). La detección de bacterias acéticas en vinos: problemática y desarrollo de un test rápido de predicción. Tesis Doctoral. Universidad de la Rioja. Rioja, España. 141 pp.

- Pérez, E.V.H., Cuervo-Parra, J.A., Tamayo, R.L., Gutiérrez, A.M.P., Romero-Cortes, T. 2023. Herramientas para la producción del aguamiel y microestructura del raspado. In: Maguey aguamiel/pulque: una visión para el desarrollo territorial. Roldán, C.E.I., Medina, M.C. (Eds.). El Colegio del Estado de Hidalgo, Primera edición, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, México. pp. 121-146.
- Pitiwittayakul, N., Yukphan, P., Chaipitakchonlatarn, W., Yamada, Y., & Theeragool, G. (2015a). *Acetobacter thailandicus* sp. nov., for a strain isolated in Thailand. *Annals of Microbiology*, 65(4), 1855-1863.
- Pitiwittayakul, N., Yukphan, P., Sintuprapa, W., Yamada, Y., & Theeragool, G. (2015b). Identification of acetic acid bacteria isolated in Thailand and assigned to the genus *Acetobacter* by groEL gene sequence analysis. *Annals of Microbiology*, 65(3), 1557-1564.
- Raspor, P., & Goranovič, D. (2008). Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Crit Rev Biotechnol*, 28(2), 101-124.
- Romero-Cortes, T., Robles-Olvera, V., Rodriguez-Jimenez, G., & Ramírez-Lepe, M. (2012). Isolation and characterization of acetic acid bacteria in cocoa fermentation. *African Journal of Microbiology*, 6(2), 339-347.
- Ryu, J. H., Kim, S. H., Lee, H. Y., Bai, J. Y., Nam, Y. D., Bae, J. W., Lee, D. G., Shin, S. C., Ha, E. M., & Lee, W. J. (2008). Innate immune homeostasis by the Homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science*, 319(5864), 777-782.
- Ryu, M., Jeon, S., Oh, H., Kim, Y.S., Jeong, D.Y., & Uhm, T.B. (2014a). Production of acetic acid from *Acetobacteria*. GenBank Direct Submission (15-FEB-2014). Consultado [20/03/2024]. En línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ469780>
- Ryu, M., Jeon, S., Oh, H., Kim, Y.S., Jeong, D.Y., & Uhm, T.B. (2014b). Production of acetic acid from *Acetobacteria*. GenBank Direct Submission (15-FEB-2014). Consultado [21/03/2024]. En línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KJ469772.1>

- Sahoo, B. K., Mishra, R. R., & Behera, B. C. (2020). Isolation and identification of thermotolerant acetic acid bacteria from waste fruits. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 9(2), 209-213.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2018). El pulque más que tradición es pura nutrición. Gobierno de México. Consultado [10/06/2024]. En línea: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-pulque-mas-que-tradicion-es-pura-nutricion-176177#:~:text=Informaci%C3%B3n%20de%20la%20Biblioteca%20Digital,C%20y%20del%20complejo%20B.&text=Adem%C3%A1s%20cuenta%20con%20propiedades%20medicinales,Protecci%C3%B3n%20de%20la%20flora%20intestinal>
- Seearunruangchai, A., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Thawai, C., Itoh, T., & Yamada, Y. (2004). Identification of acetic acid bacteria isolated from fruits collected in Thailand. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50(1), 47–53.
- Seedorf, H., Fricke, W. F., Veith, B., Brüggemann, H., Liesegang, H., Strittmatter, A., Miethke, M., Buckel, W., Hinderberger, J., Li, F., Hagemeyer, C., Thauer, R. K., & Gottschalk, G. (2008). The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), 2128-2133.
- Sengun, I. Y. (2017). *Acetic acid bacteria fundamentals and food applications*. Food Science & Technology, Boca Raton, EE. UU.
- Shang-Tian, Y., Mingrui, Y., Wei-Lun, C., & I-Ching, T. (2013). Anaerobic fermentations for the production of acetic and butyric acids. En: *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers*. Shang-Tian, Y., El-Enshasy, H. A., & Thongchul, N. (Eds.). John Wiley & Sons., New Jersey, EE. UU. 351-374 pp.

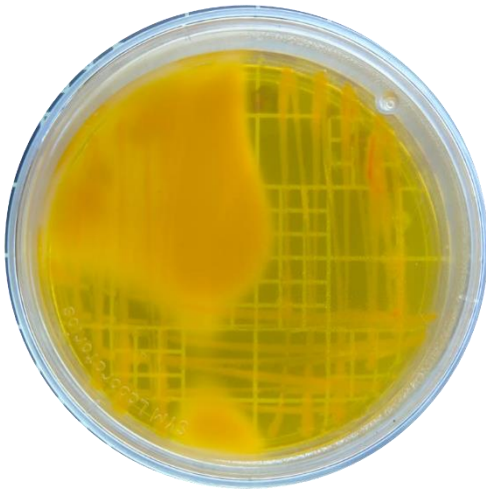
- Sjöblom, M., Matsakas, L., Christakopoulos, P., & Rova, U. (2016). Catalytic upgrading of butyric acid towards fine chemicals and biofuels. *FEMS Microbiology Letters*, 363(8), 1-7.
- Sokollek, S. J., & Hammes, W. P. (1997). Description of a starter culture preparation for vinegar fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*, 20(3), 481-491.
- Sokollek, S. J., Hertel, C., & Hammes, W. P. (1998). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology*, 60(3), 195-206.
- Takemura, H., Horinouchi, S., & Beppu, T. (1991). Novel insertion sequence IS1380 from *Acetobacter pasteurianus* is involved in loss of ethanol-oxidizing ability. *Journal of Bacteriology*, 173(22), 7070-7076.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol*, 30(12), 2725-2729.
- Trček, J., & Barja, F. (2015). Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 137–144.
- Uma M.S., Amutha, S., Soon-Wo, K., & Anandham, R. (2018). Microbial diversity in fermented fruit mix. GenBank Direct Submission (12-JUN-2018). Consultado [21/03/2024]. En línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MH464993>
- Vadequímica. (2023). Aplicaciones del ácido acético en diferentes industrias. Consultado [11/06/2024]. En línea: <https://www.vadequimica.com/blog/todos-los-articulos/aplicaciones-del-acido-acetico.html>
- Vidra, A., & Németh, Á. (2017). Bio-produced acetic acid: a review. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 62(3), 245-256.
- Yamada, Y., Hosono, R., Lisdiyanti, P., Widyastuti, Y., Saono, S., Uchimura, T., & Komagata, K. (1999). Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45, 2328.

- Yamada, Y., & Kondo, K. (1984). *Gluconoacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 30, 297-303.
- Yamada, Y., & Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 15-24.
- You, C., & Zhang, C. (2014). Culturable bacteria isolated from tobacco rhizospheric soil. GenBank Direct Submission (27-SEP-2014). Consultado [21/03/2024]. En línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KM659218>
- Young, J. P. W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organism. In: Stacey, G., Burris, R. H., & Evans, H. J., (Eds.), *Biological Nitrogen Fixation*. Chapman & Hall, New York, EE. UU. pp. 43-86.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. A. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol*, 7(1-2), 203-214.
- Zheng, Y., Chang, Y., Zhang, R., Song, J., Xu, Y., Liu, J., & Wang, M. (2018). Two-stage oxygen supply strategy based on energy metabolism analysis for improving acetic acid production by *Acetobacter pasteurianus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 49(9), 781-788.

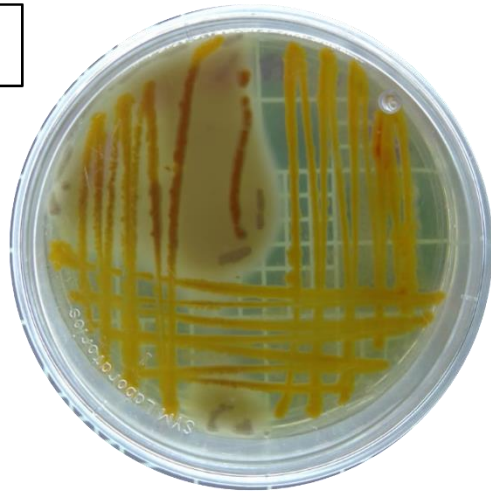
APÉNDICE A

Cambio de color del medio CAAR. Durante (A) 72 h, (B) 96 h, y (C) 168h.

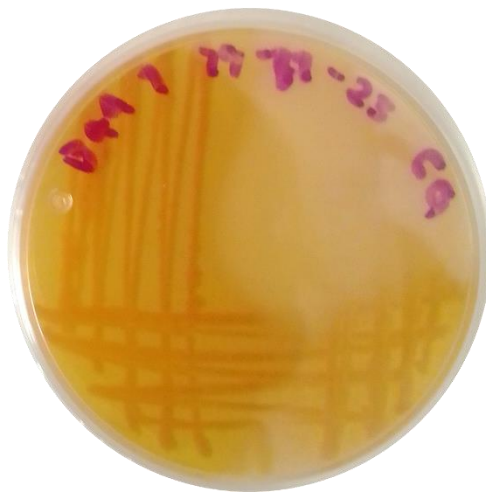
A



B



C



APÉNDICE B

Datos de la cinética de crecimiento.

| Horas | UFC/mL | | |
|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Matraz 1 | Matraz 2 | Promedio |
| 0 | 8.20E+02 | 1.76E+03 | 1.29E+03 |
| 2 | 1.12E+03 | 1.33E+03 | 1.23E+03 |
| 4 | 1.34E+03 | 1.46E+03 | 1.40E+03 |
| 6 | 2.08E+03 | 1.71E+03 | 1.90E+03 |
| 8 | 2.14E+03 | 2.04E+03 | 2.09E+03 |
| 10 | 2.60E+03 | 2.23E+03 | 2.42E+03 |

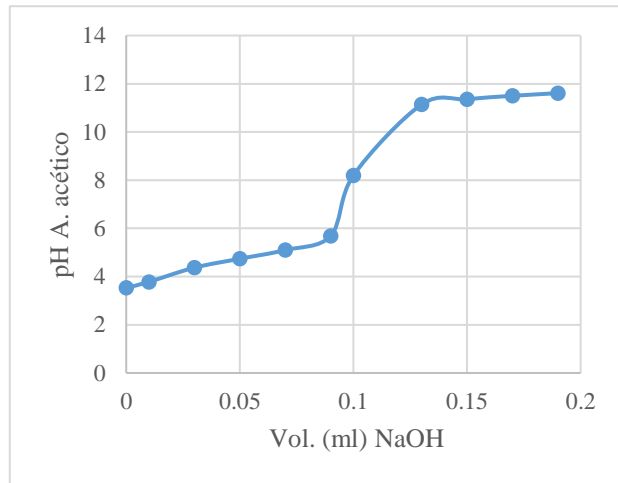
APÉNDICE C

Datos de las titulaciones del ácido acético.

0 horas

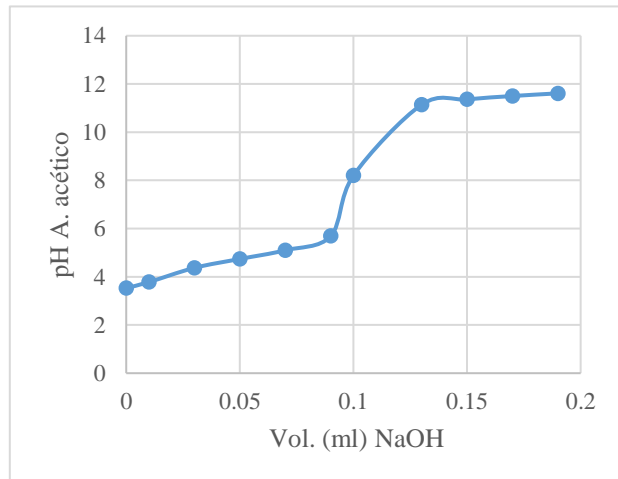
2%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.53 |
| 0.01 | 3.78 |
| 0.03 | 4.37 |
| 0.05 | 4.74 |
| 0.07 | 5.1 |
| 0.09 | 5.69 |
| 0.1 | 8.2 |
| 0.13 | 11.14 |
| 0.15 | 11.36 |
| 0.17 | 11.5 |
| 0.19 | 11.61 |



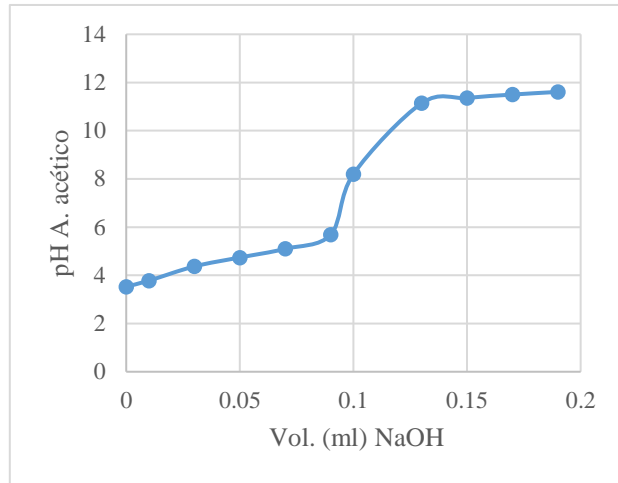
4%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.53 |
| 0.01 | 3.78 |
| 0.03 | 4.37 |
| 0.05 | 4.74 |
| 0.07 | 5.1 |
| 0.09 | 5.69 |
| 0.1 | 8.2 |
| 0.13 | 11.14 |
| 0.15 | 11.36 |
| 0.17 | 11.5 |
| 0.19 | 11.61 |



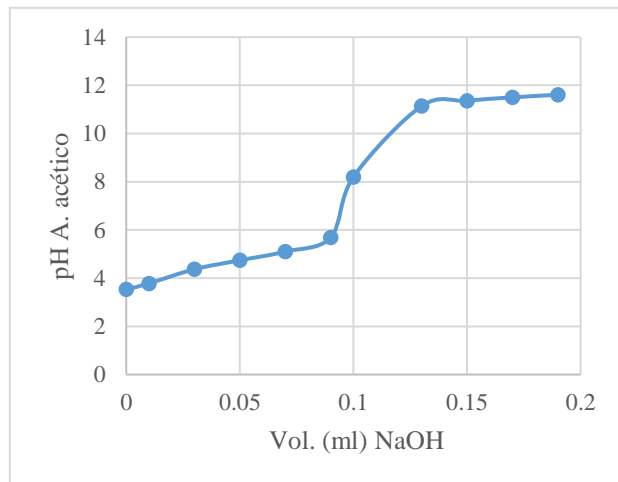
6%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.53 |
| 0.01 | 3.78 |
| 0.03 | 4.37 |
| 0.05 | 4.74 |
| 0.07 | 5.1 |
| 0.09 | 5.69 |
| 0.1 | 8.2 |
| 0.13 | 11.14 |
| 0.15 | 11.36 |
| 0.17 | 11.5 |
| 0.19 | 11.61 |



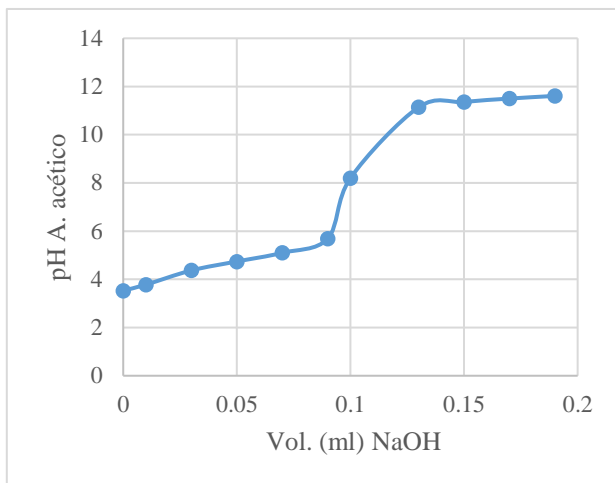
8%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.53 |
| 0.01 | 3.78 |
| 0.03 | 4.37 |
| 0.05 | 4.74 |
| 0.07 | 5.1 |
| 0.09 | 5.69 |
| 0.1 | 8.2 |
| 0.13 | 11.14 |
| 0.15 | 11.36 |
| 0.17 | 11.5 |
| 0.19 | 11.61 |



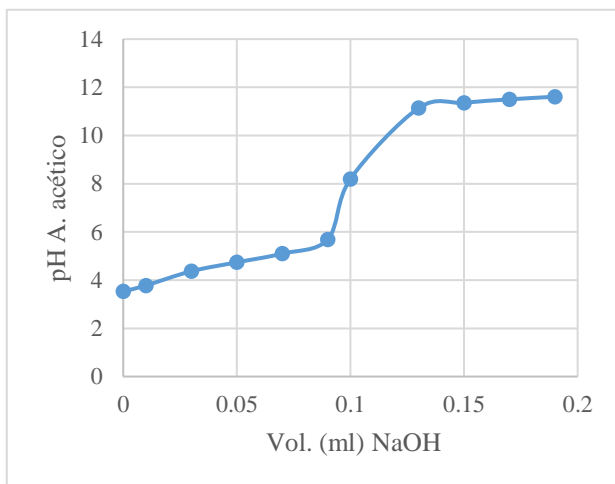
10%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.53 |
| 0.01 | 3.78 |
| 0.03 | 4.37 |
| 0.05 | 4.74 |
| 0.07 | 5.1 |
| 0.09 | 5.69 |
| 0.1 | 8.2 |
| 0.13 | 11.14 |
| 0.15 | 11.36 |
| 0.17 | 11.5 |
| 0.19 | 11.61 |



12%

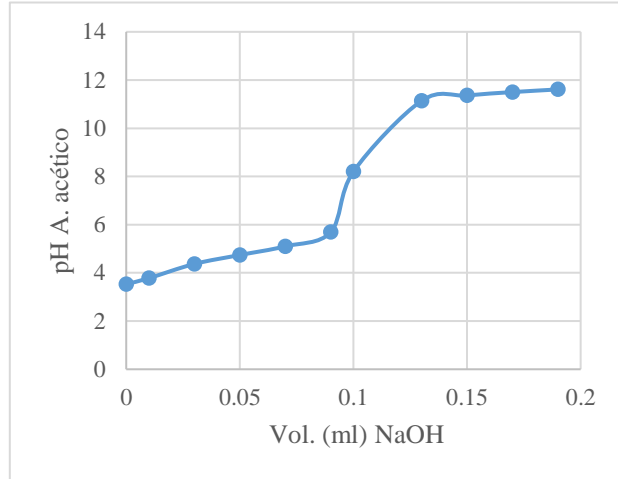
| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.53 |
| 0.01 | 3.78 |
| 0.03 | 4.37 |
| 0.05 | 4.74 |
| 0.07 | 5.1 |
| 0.09 | 5.69 |
| 0.1 | 8.2 |
| 0.13 | 11.14 |
| 0.15 | 11.36 |
| 0.17 | 11.5 |
| 0.19 | 11.61 |



2 horas

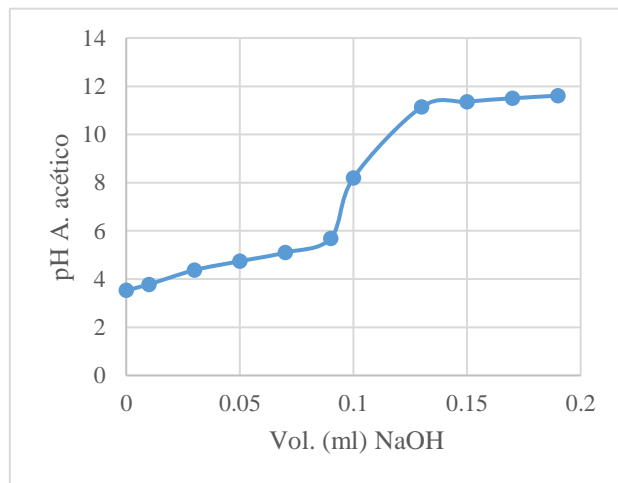
2%

| Volumen | pH |
|----------------|--------------|
| 0 | 3.53 |
| 0.01 | 3.78 |
| 0.03 | 4.37 |
| 0.05 | 4.74 |
| 0.07 | 5.1 |
| 0.09 | 5.69 |
| 0.1 | 8.2 |
| 0.13 | 11.14 |
| 0.15 | 11.36 |
| 0.17 | 11.5 |
| 0.19 | 11.61 |



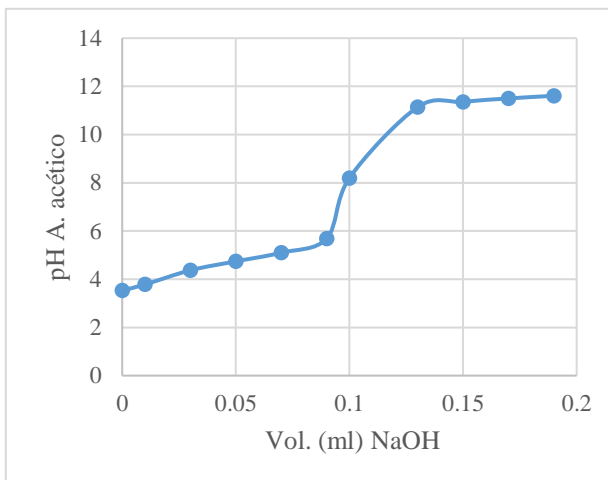
4%

| Volumen | pH |
|----------------|--------------|
| 0 | 3.53 |
| 0.01 | 3.78 |
| 0.03 | 4.37 |
| 0.05 | 4.74 |
| 0.07 | 5.1 |
| 0.09 | 5.69 |
| 0.1 | 8.2 |
| 0.13 | 11.14 |
| 0.15 | 11.36 |
| 0.17 | 11.5 |
| 0.19 | 11.61 |



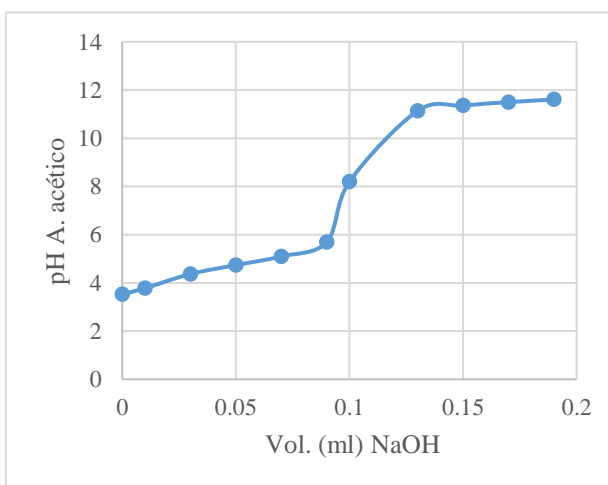
6%

| Volumen | pH |
|----------------|--------------|
| 0 | 3.53 |
| 0.01 | 3.78 |
| 0.03 | 4.37 |
| 0.05 | 4.74 |
| 0.07 | 5.1 |
| 0.09 | 5.69 |
| 0.1 | 8.2 |
| 0.13 | 11.14 |
| 0.15 | 11.36 |
| 0.17 | 11.5 |
| 0.19 | 11.61 |



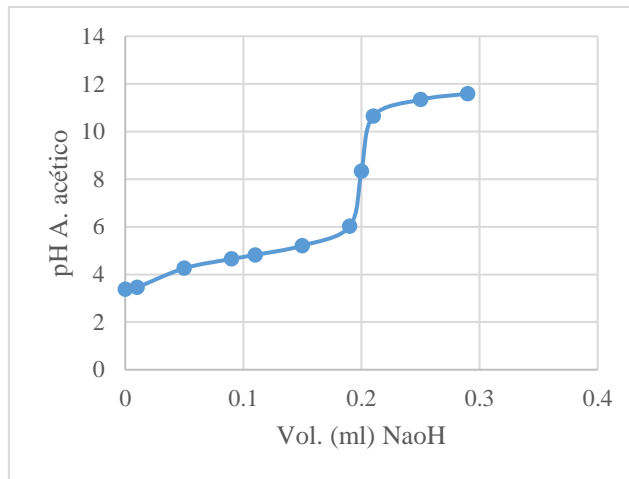
8%

| Volumen | pH |
|----------------|--------------|
| 0 | 3.53 |
| 0.01 | 3.78 |
| 0.03 | 4.37 |
| 0.05 | 4.74 |
| 0.07 | 5.1 |
| 0.09 | 5.69 |
| 0.1 | 8.2 |
| 0.13 | 11.14 |
| 0.15 | 11.36 |
| 0.17 | 11.5 |
| 0.19 | 11.61 |



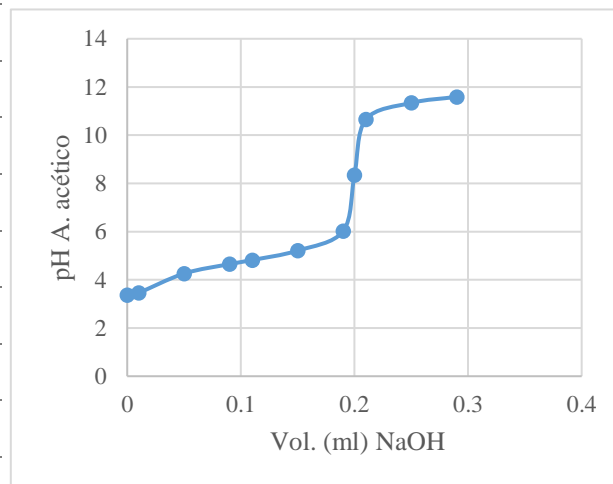
10%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



12%

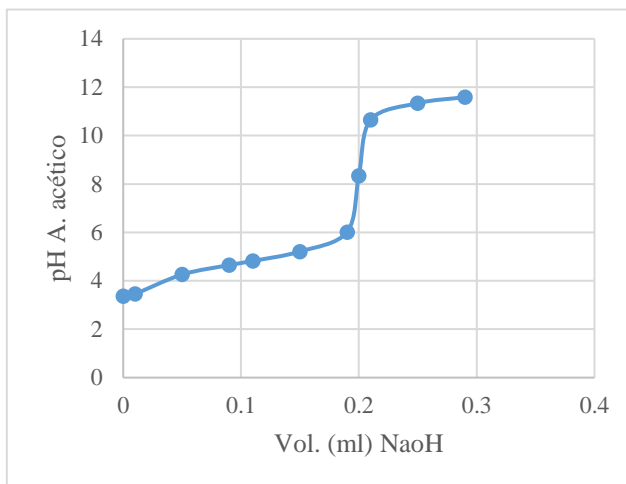
| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



4 horas

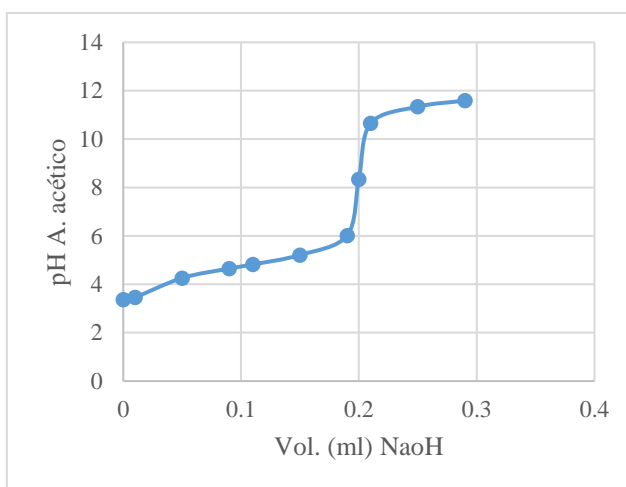
2%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



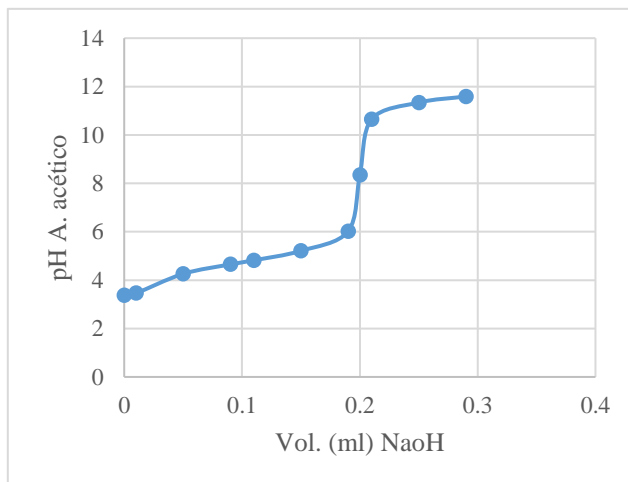
4%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



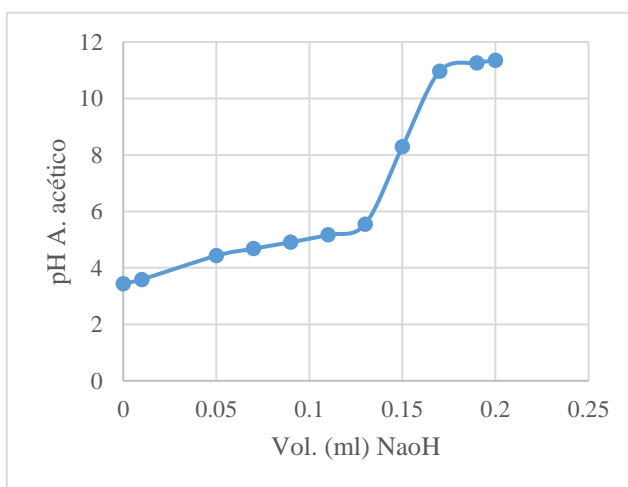
6%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



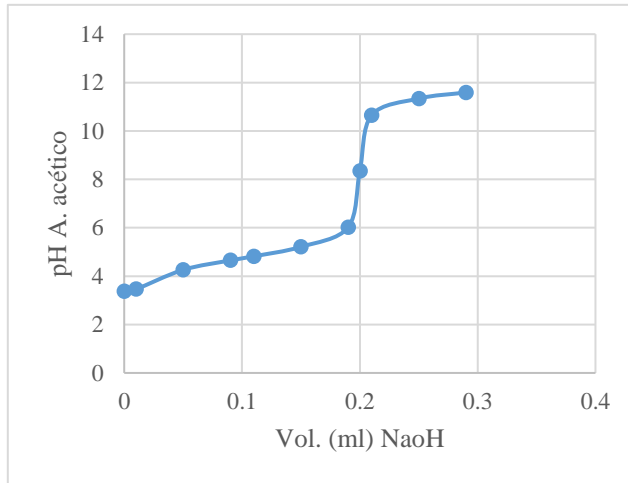
8%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.44 |
| 0.01 | 3.59 |
| 0.05 | 4.43 |
| 0.07 | 4.68 |
| 0.09 | 4.91 |
| 0.11 | 5.17 |
| 0.13 | 5.55 |
| 0.15 | 8.29 |
| 0.17 | 10.96 |
| 0.19 | 11.26 |
| 0.2 | 11.35 |



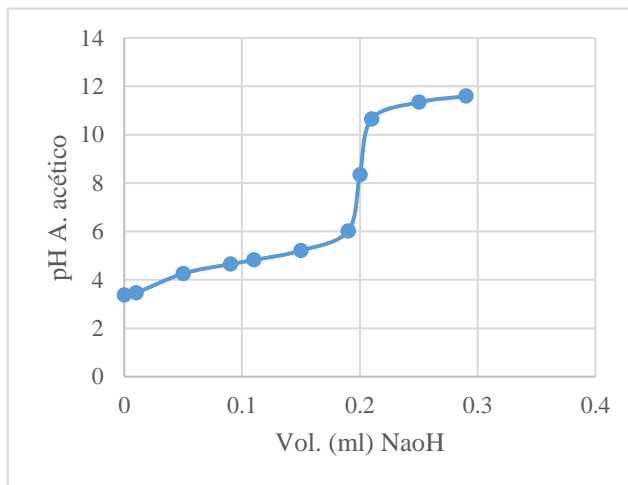
10%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



12%

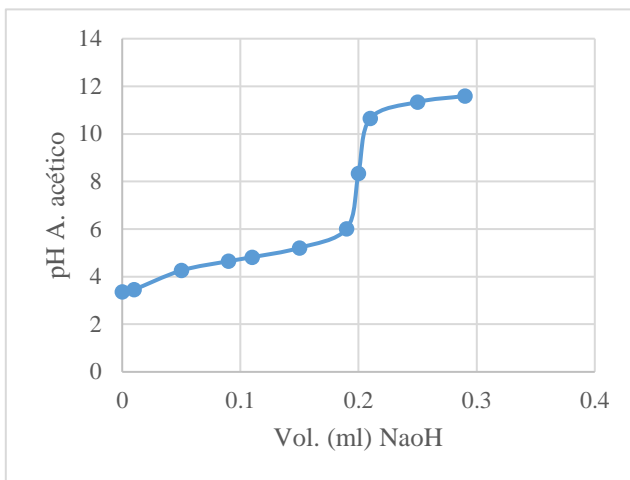
| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



6 horas

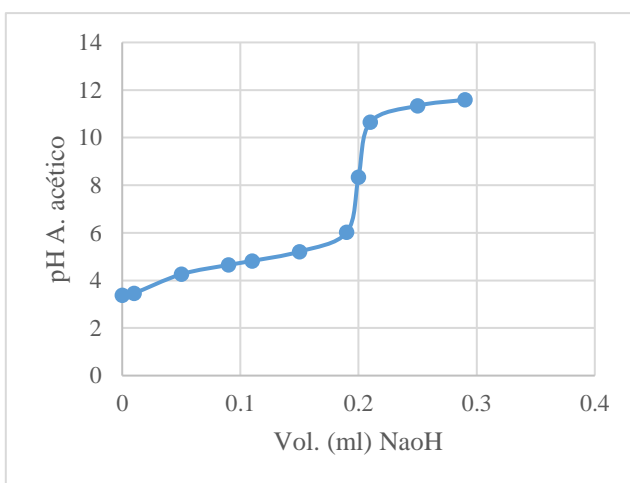
2%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



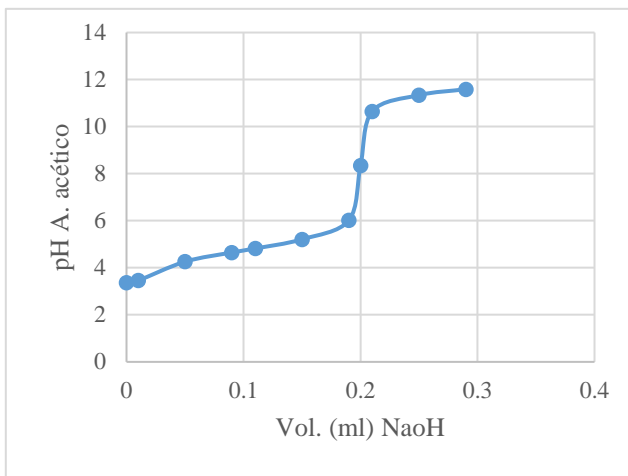
4%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



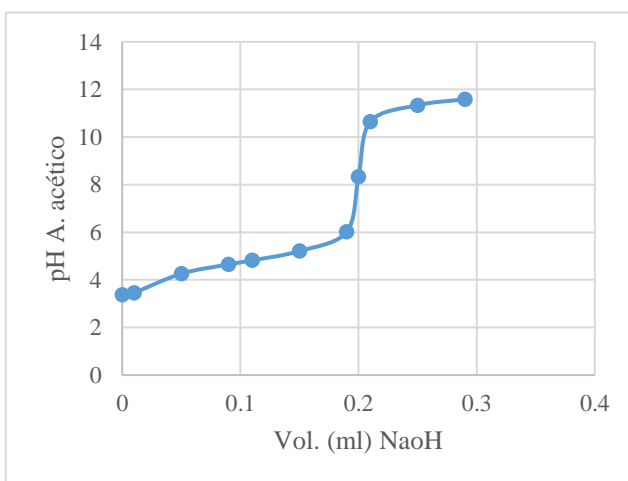
6%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



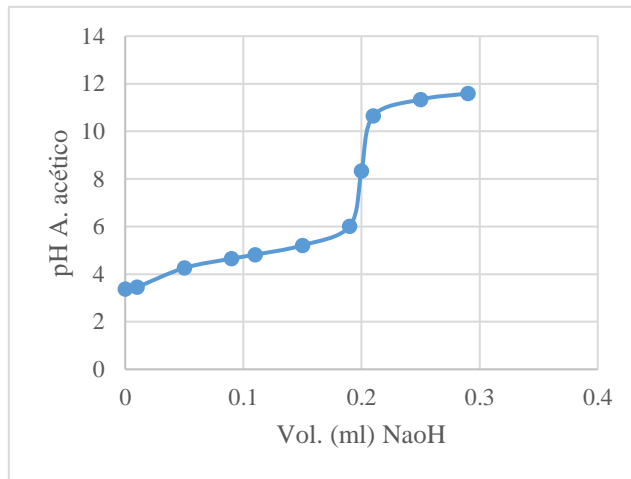
8%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



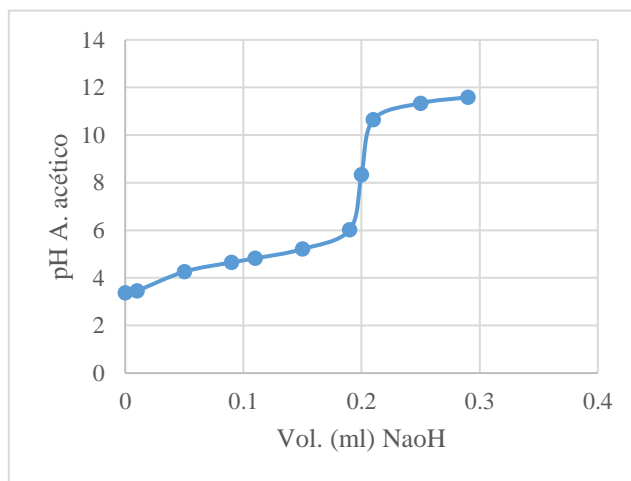
10%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



12%

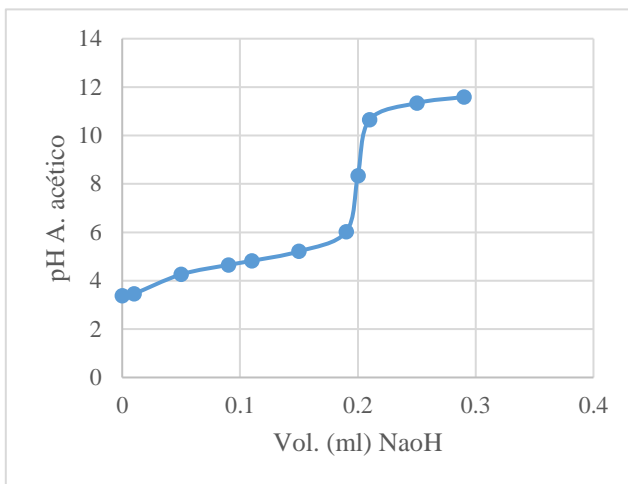
| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



10 horas

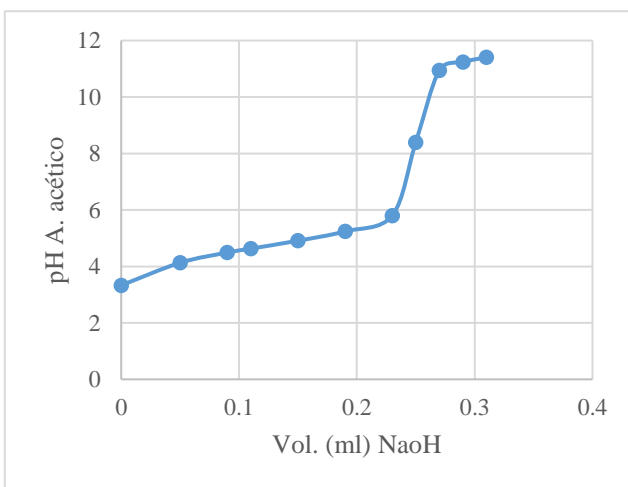
2%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



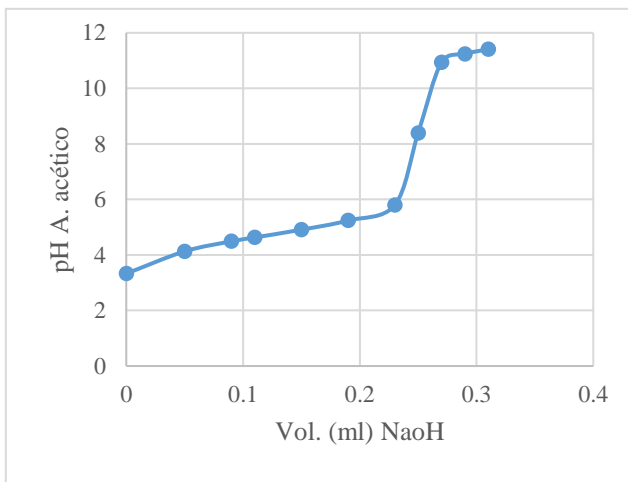
4%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.33 |
| 0.05 | 4.13 |
| 0.09 | 4.49 |
| 0.11 | 4.63 |
| 0.15 | 4.91 |
| 0.19 | 5.24 |
| 0.23 | 5.8 |
| 0.25 | 8.39 |
| 0.27 | 10.94 |
| 0.29 | 11.24 |
| 0.31 | 11.41 |



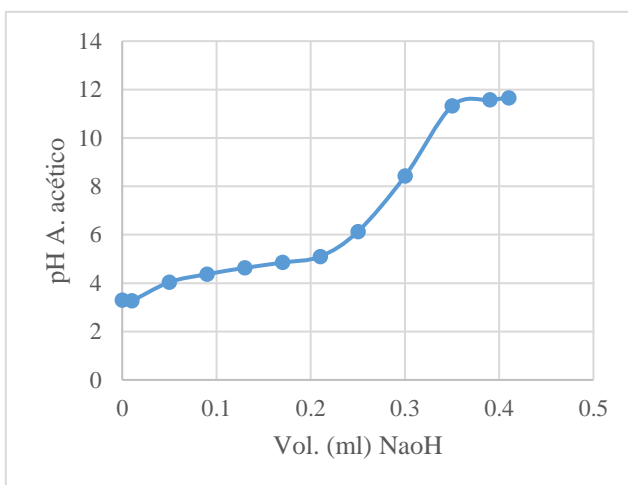
6%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.33 |
| 0.05 | 4.13 |
| 0.09 | 4.49 |
| 0.11 | 4.63 |
| 0.15 | 4.91 |
| 0.19 | 5.24 |
| 0.23 | 5.8 |
| 0.25 | 8.39 |
| 0.27 | 10.94 |
| 0.29 | 11.24 |
| 0.31 | 11.41 |



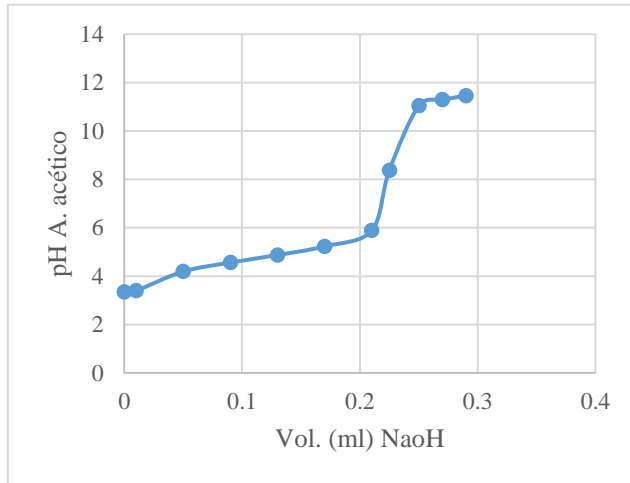
8%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.29 |
| 0.01 | 3.27 |
| 0.05 | 4.04 |
| 0.09 | 4.37 |
| 0.13 | 4.63 |
| 0.17 | 4.85 |
| 0.21 | 5.1 |
| 0.25 | 6.13 |
| 0.3 | 8.42 |
| 0.35 | 11.32 |
| 0.39 | 11.57 |
| 0.41 | 11.65 |



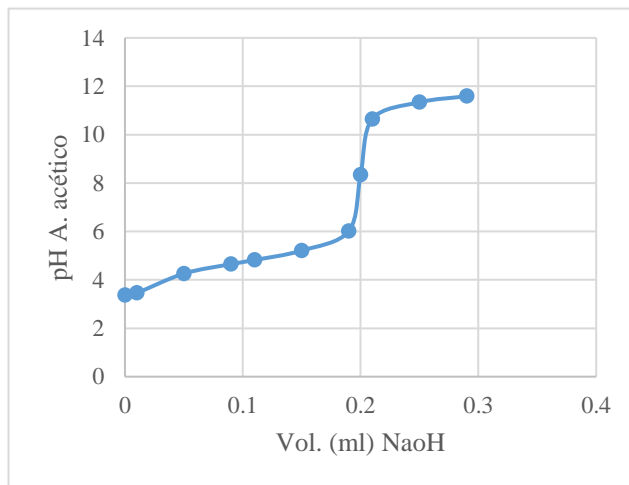
10%

| Volumen | pH |
|----------------|--------------|
| 0 | 3.35 |
| 0.01 | 3.4 |
| 0.05 | 4.19 |
| 0.09 | 4.56 |
| 0.13 | 4.87 |
| 0.17 | 5.23 |
| 0.21 | 5.88 |
| 0.225 | 8.37 |
| 0.25 | 11.04 |
| 0.27 | 11.29 |
| 0.29 | 11.45 |



12%

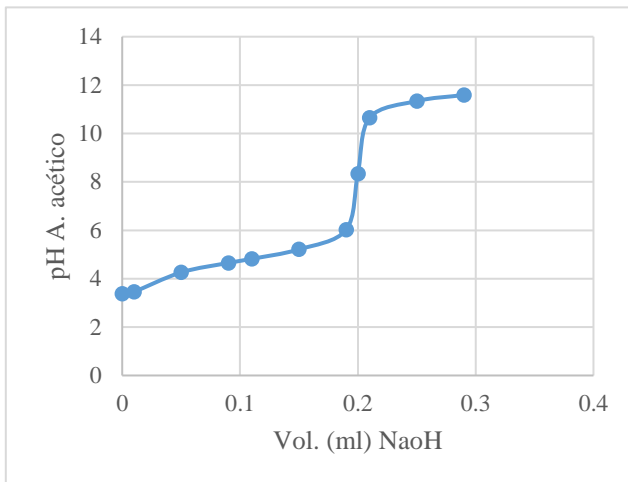
| Volumen | pH |
|----------------|--------------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



12 horas

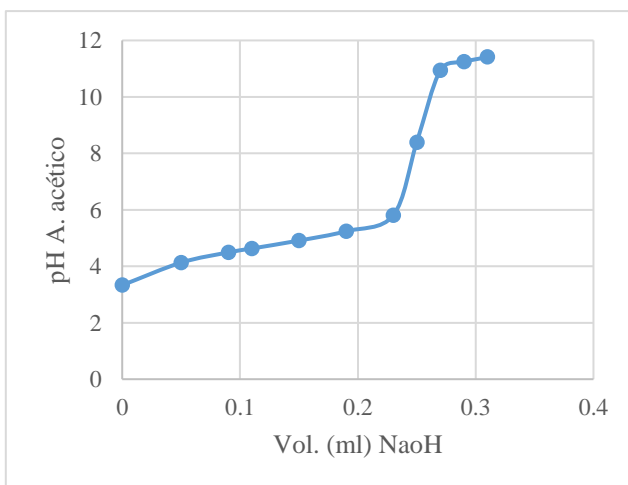
2%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



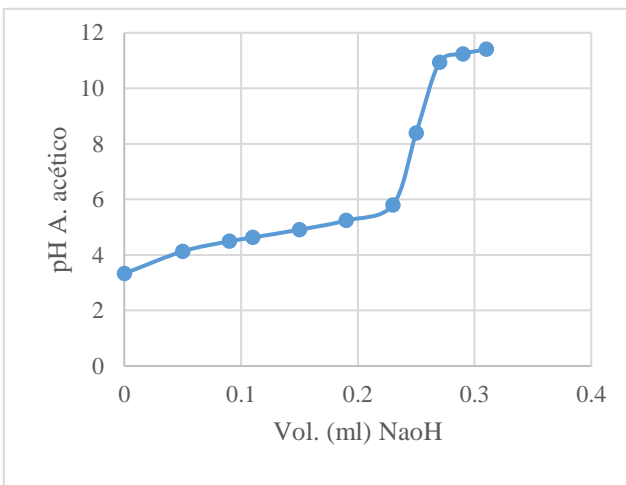
4%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.33 |
| 0.05 | 4.13 |
| 0.09 | 4.49 |
| 0.11 | 4.63 |
| 0.15 | 4.91 |
| 0.19 | 5.24 |
| 0.23 | 5.8 |
| 0.25 | 8.39 |
| 0.27 | 10.94 |
| 0.29 | 11.24 |
| 0.31 | 11.41 |



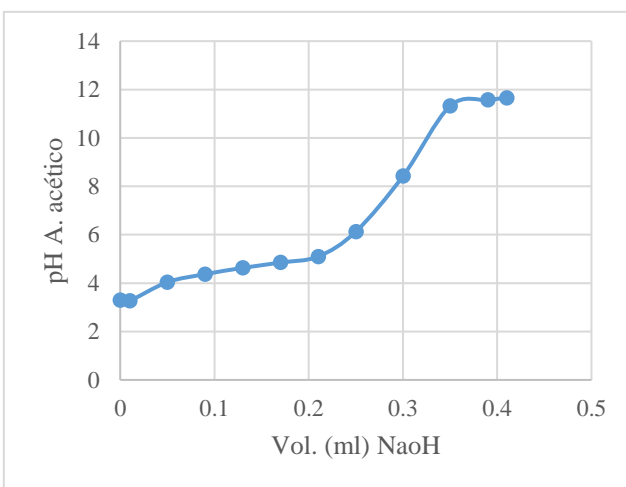
6%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.33 |
| 0.05 | 4.13 |
| 0.09 | 4.49 |
| 0.11 | 4.63 |
| 0.15 | 4.91 |
| 0.19 | 5.24 |
| 0.23 | 5.8 |
| 0.25 | 8.39 |
| 0.27 | 10.94 |
| 0.29 | 11.24 |
| 0.31 | 11.41 |



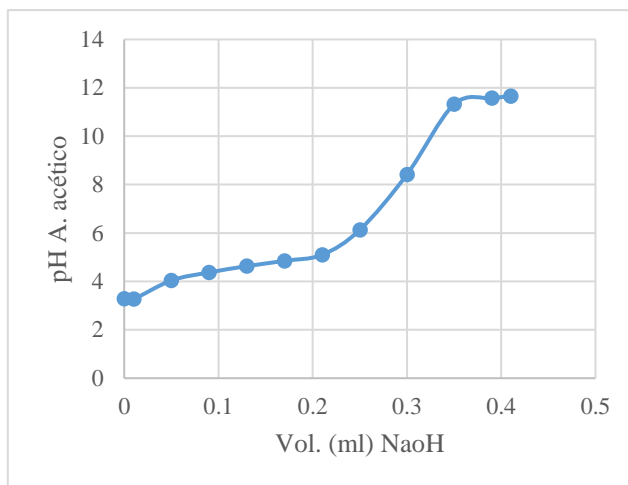
8%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.29 |
| 0.01 | 3.27 |
| 0.05 | 4.04 |
| 0.09 | 4.37 |
| 0.13 | 4.63 |
| 0.17 | 4.85 |
| 0.21 | 5.1 |
| 0.25 | 6.13 |
| 0.3 | 8.42 |
| 0.35 | 11.32 |
| 0.39 | 11.57 |
| 0.41 | 11.65 |



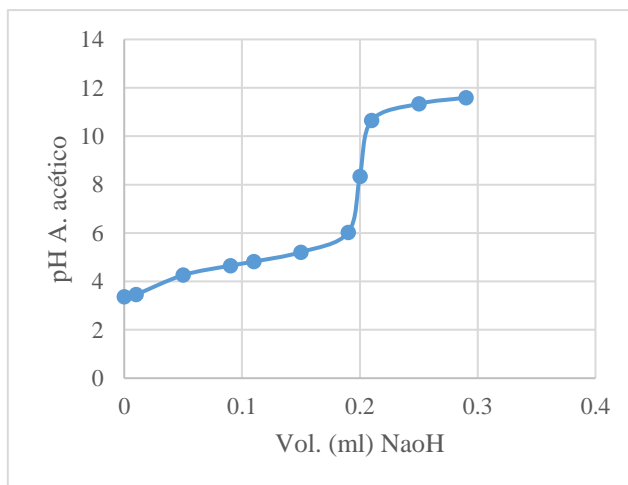
10%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.29 |
| 0.01 | 3.27 |
| 0.05 | 4.04 |
| 0.09 | 4.37 |
| 0.13 | 4.63 |
| 0.17 | 4.85 |
| 0.21 | 5.1 |
| 0.25 | 6.13 |
| 0.3 | 8.42 |
| 0.35 | 11.32 |
| 0.39 | 11.57 |
| 0.41 | 11.65 |

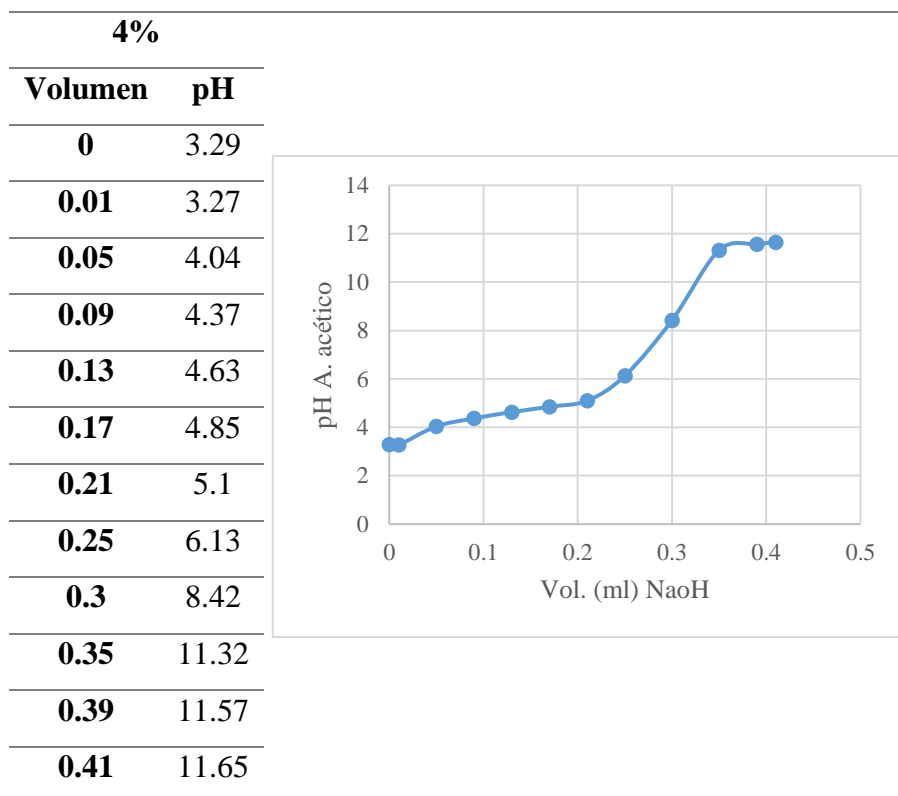
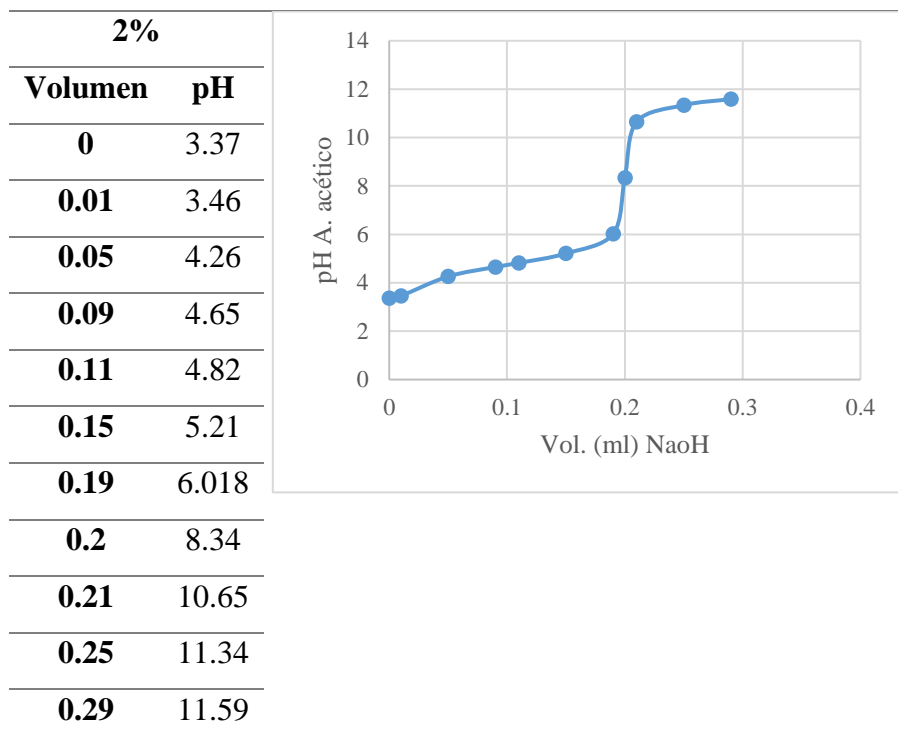


12%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |

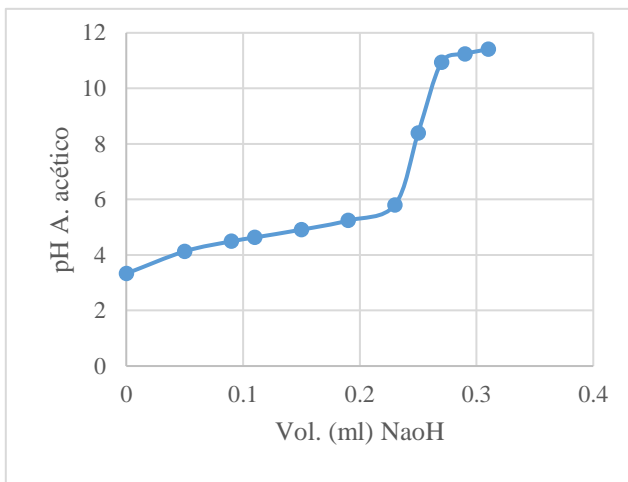


14 horas



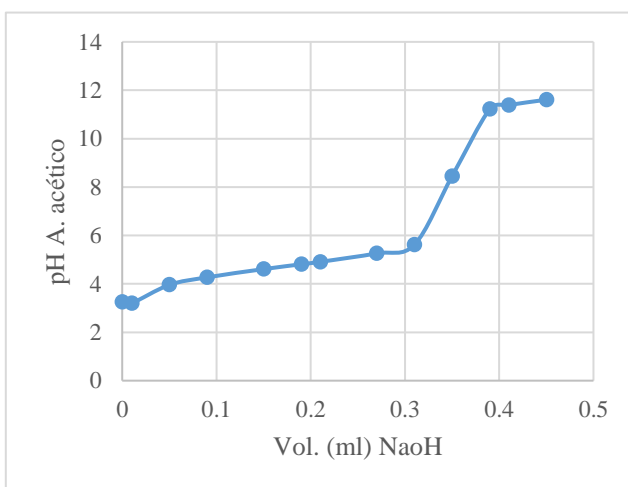
6%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.33 |
| 0.05 | 4.13 |
| 0.09 | 4.49 |
| 0.11 | 4.63 |
| 0.15 | 4.91 |
| 0.19 | 5.24 |
| 0.23 | 5.8 |
| 0.25 | 8.39 |
| 0.27 | 10.94 |
| 0.29 | 11.24 |
| 0.31 | 11.41 |



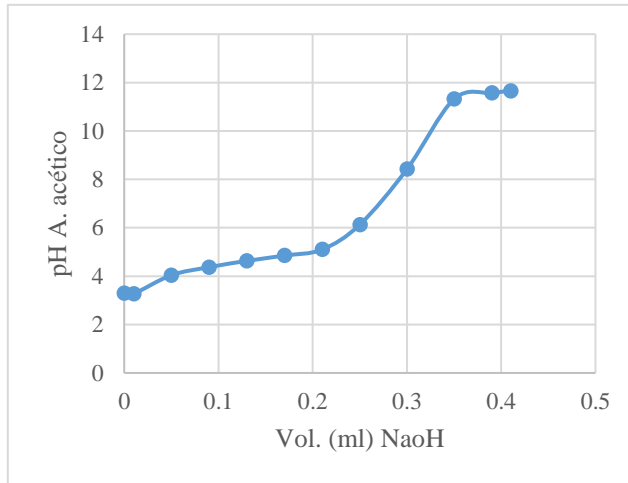
8%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.25 |
| 0.05 | 3.96 |
| 0.09 | 4.27 |
| 0.15 | 4.61 |
| 0.19 | 4.81 |
| 0.27 | 5.26 |
| 0.31 | 5.62 |
| 0.35 | 8.45 |
| 0.39 | 11.22 |
| 0.41 | 11.39 |
| 0.45 | 11.61 |



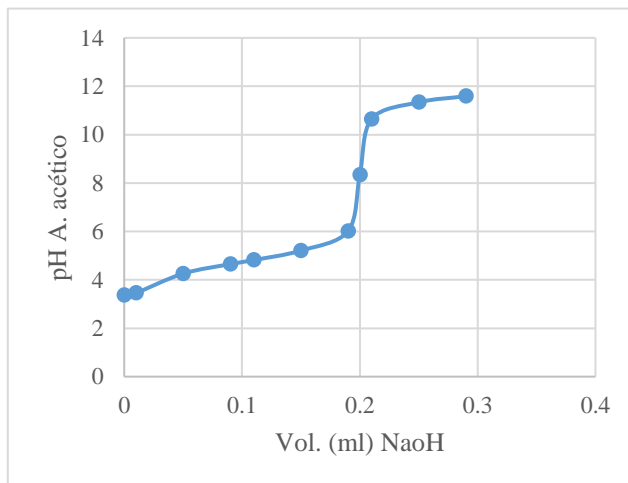
10%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.29 |
| 0.05 | 4.04 |
| 0.09 | 4.37 |
| 0.13 | 4.63 |
| 0.17 | 4.85 |
| 0.21 | 5.1 |
| 0.25 | 6.13 |
| 0.3 | 8.42 |
| 0.35 | 11.32 |
| 0.39 | 11.57 |
| 0.41 | 11.65 |



12%

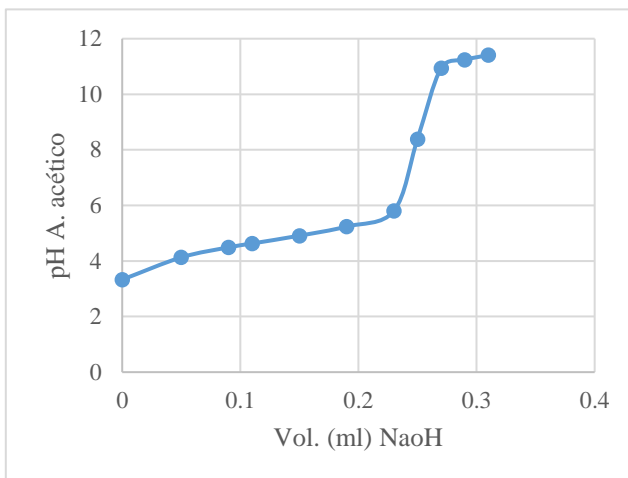
| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.37 |
| 0.01 | 3.46 |
| 0.05 | 4.26 |
| 0.09 | 4.65 |
| 0.11 | 4.82 |
| 0.15 | 5.21 |
| 0.19 | 6.018 |
| 0.2 | 8.34 |
| 0.21 | 10.65 |
| 0.25 | 11.34 |
| 0.29 | 11.59 |



16 horas

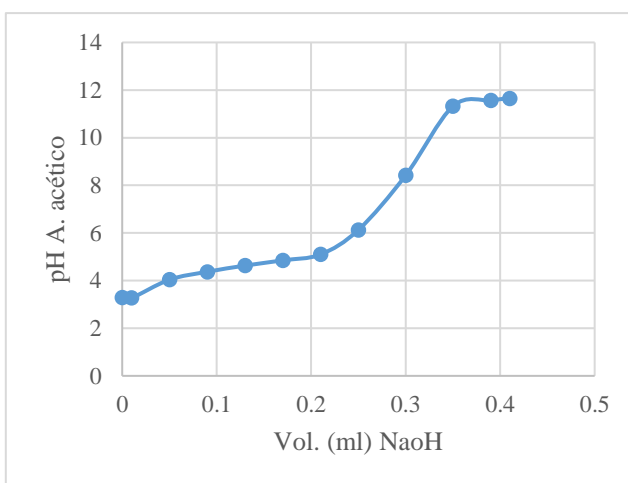
2%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.33 |
| 0.05 | 4.13 |
| 0.09 | 4.49 |
| 0.11 | 4.63 |
| 0.15 | 4.91 |
| 0.19 | 5.24 |
| 0.23 | 5.8 |
| 0.25 | 8.39 |
| 0.27 | 10.94 |
| 0.29 | 11.24 |
| 0.31 | 11.41 |



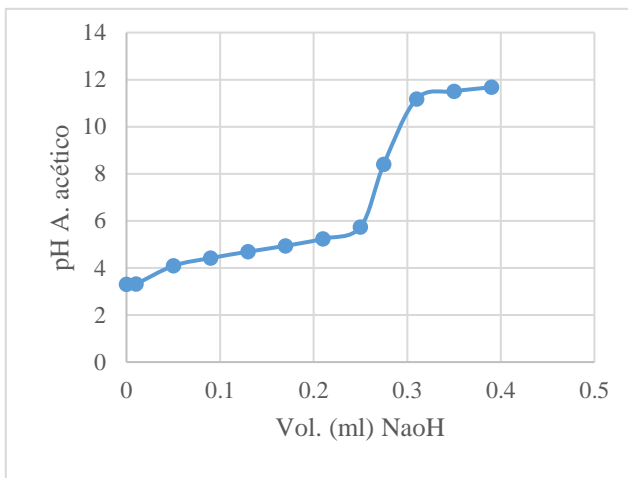
4%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.29 |
| 0.05 | 4.04 |
| 0.09 | 4.37 |
| 0.13 | 4.63 |
| 0.17 | 4.85 |
| 0.21 | 5.1 |
| 0.25 | 6.13 |
| 0.3 | 8.42 |
| 0.35 | 11.32 |
| 0.39 | 11.57 |
| 0.41 | 11.65 |



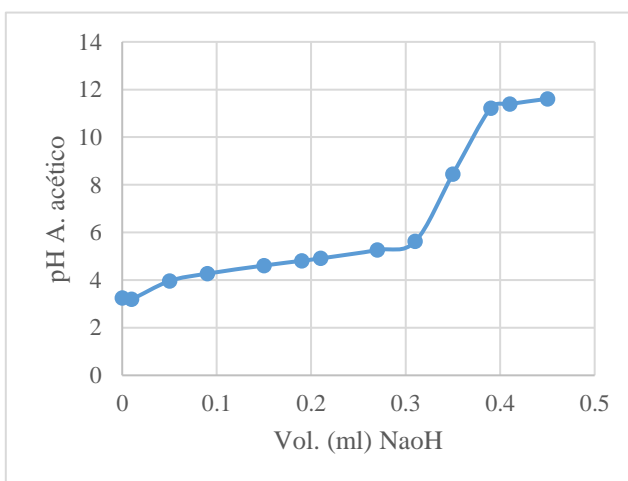
6%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.31 |
| 0.05 | 4.09 |
| 0.09 | 4.42 |
| 0.13 | 4.69 |
| 0.17 | 4.94 |
| 0.21 | 5.24 |
| 0.25 | 5.74 |
| 0.275 | 8.41 |
| 0.31 | 11.18 |
| 0.35 | 11.5 |
| 0.39 | 11.68 |



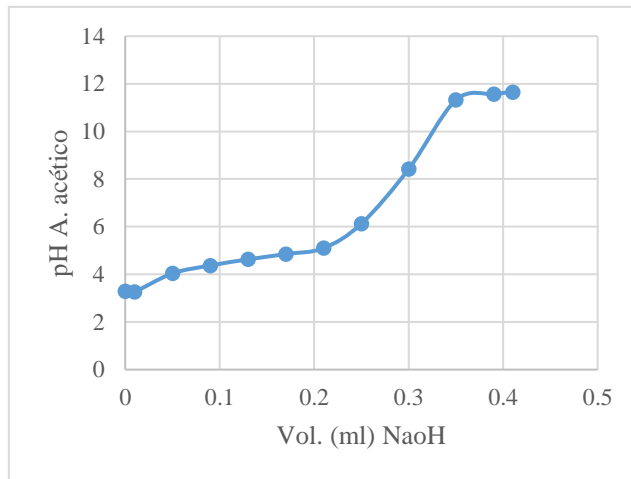
8%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.25 |
| 0.05 | 3.96 |
| 0.09 | 4.27 |
| 0.15 | 4.61 |
| 0.19 | 4.81 |
| 0.27 | 5.26 |
| 0.31 | 5.62 |
| 0.35 | 8.45 |
| 0.39 | 11.22 |
| 0.41 | 11.39 |
| 0.45 | 11.61 |



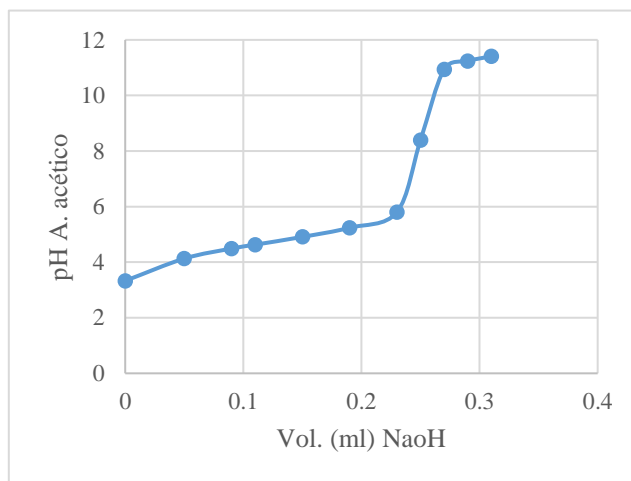
10%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.29 |
| 0.05 | 4.04 |
| 0.09 | 4.37 |
| 0.13 | 4.63 |
| 0.17 | 4.85 |
| 0.21 | 5.1 |
| 0.25 | 6.13 |
| 0.3 | 8.42 |
| 0.35 | 11.32 |
| 0.39 | 11.57 |
| 0.41 | 11.65 |



12%

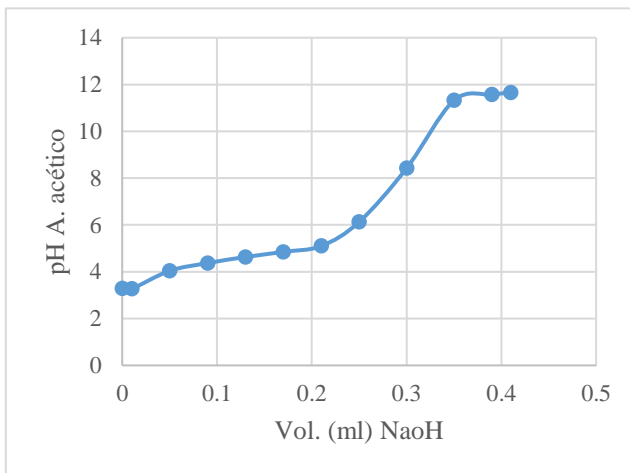
| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.33 |
| 0.05 | 4.13 |
| 0.09 | 4.49 |
| 0.11 | 4.63 |
| 0.15 | 4.91 |
| 0.19 | 5.24 |
| 0.23 | 5.8 |
| 0.25 | 8.39 |
| 0.27 | 10.94 |
| 0.29 | 11.24 |
| 0.31 | 11.41 |



18 horas

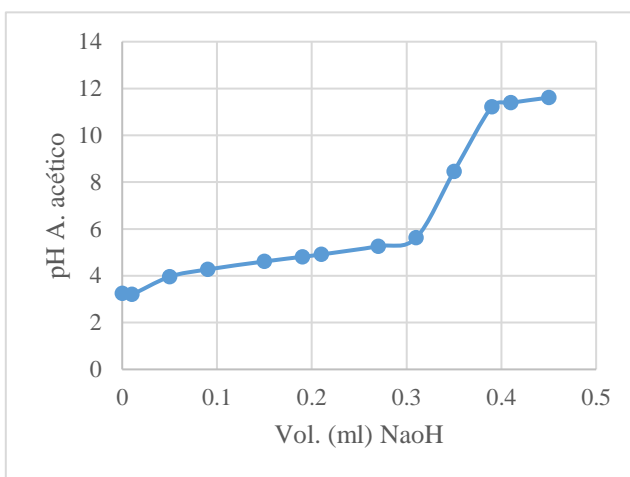
2%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.29 |
| 0.05 | 4.04 |
| 0.09 | 4.37 |
| 0.13 | 4.63 |
| 0.17 | 4.85 |
| 0.21 | 5.1 |
| 0.25 | 6.13 |
| 0.3 | 8.42 |
| 0.35 | 11.32 |
| 0.39 | 11.57 |
| 0.41 | 11.65 |



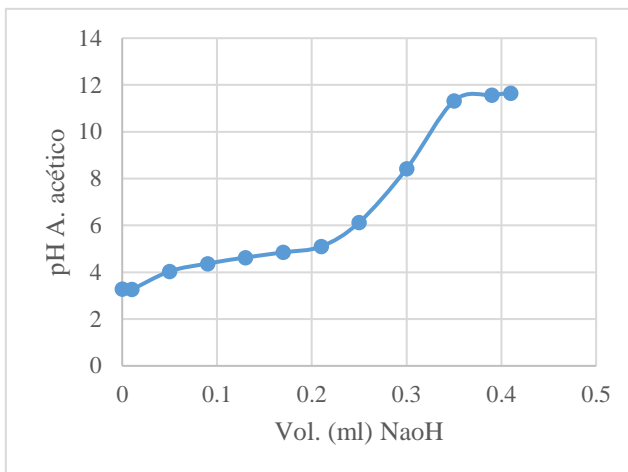
4%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.25 |
| 0.05 | 3.96 |
| 0.09 | 4.27 |
| 0.15 | 4.61 |
| 0.19 | 4.81 |
| 0.21 | 4.91 |
| 0.27 | 5.26 |
| 0.31 | 5.62 |
| 0.35 | 8.45 |
| 0.39 | 11.22 |
| 0.41 | 11.39 |
| 0.45 | 11.61 |



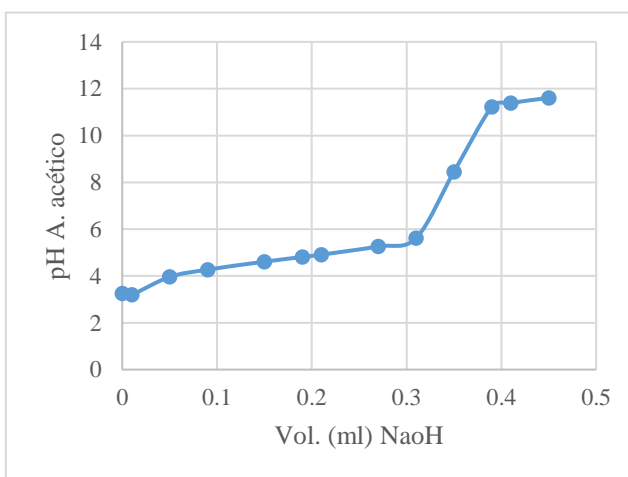
6%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.29 |
| 0.05 | 4.04 |
| 0.09 | 4.37 |
| 0.13 | 4.63 |
| 0.17 | 4.85 |
| 0.21 | 5.1 |
| 0.25 | 6.13 |
| 0.3 | 8.42 |
| 0.35 | 11.32 |
| 0.39 | 11.57 |
| 0.41 | 11.65 |



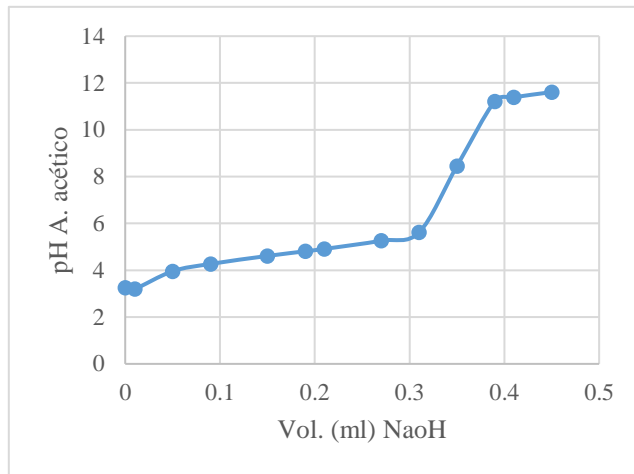
8%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.25 |
| 0.05 | 3.96 |
| 0.09 | 4.27 |
| 0.15 | 4.61 |
| 0.19 | 4.81 |
| 0.27 | 5.26 |
| 0.31 | 5.62 |
| 0.35 | 8.45 |
| 0.39 | 11.22 |
| 0.41 | 11.39 |
| 0.45 | 11.61 |



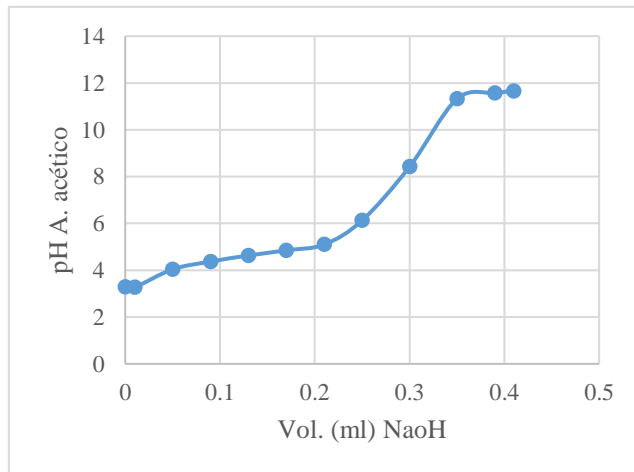
10%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.25 |
| 0.05 | 3.96 |
| 0.09 | 4.27 |
| 0.15 | 4.61 |
| 0.19 | 4.81 |
| 0.27 | 5.26 |
| 0.31 | 5.62 |
| 0.35 | 8.45 |
| 0.39 | 11.22 |
| 0.41 | 11.39 |
| 0.45 | 11.61 |

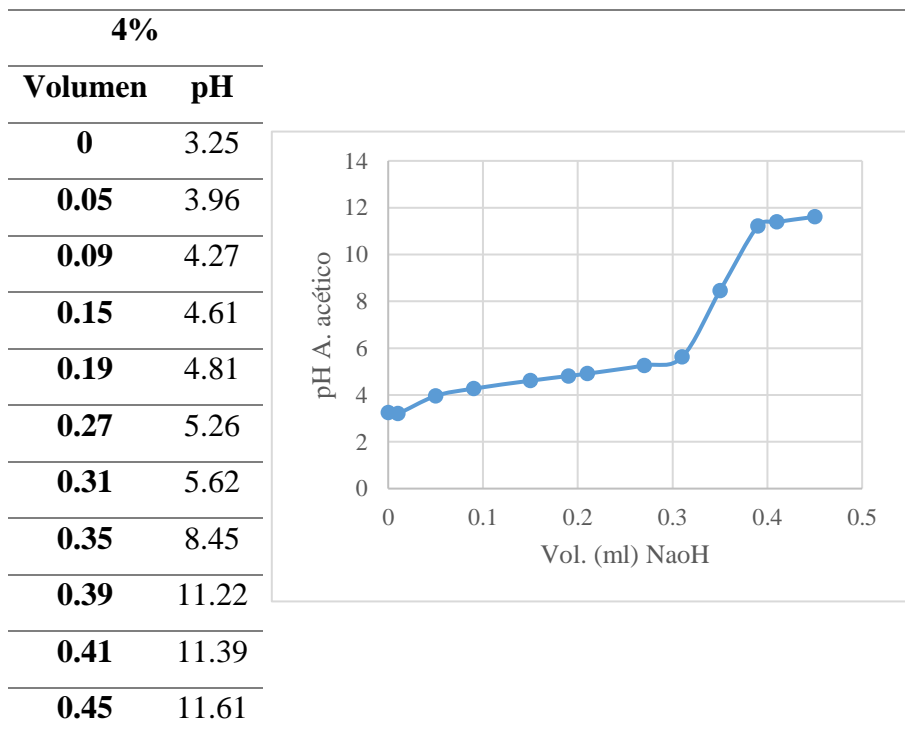
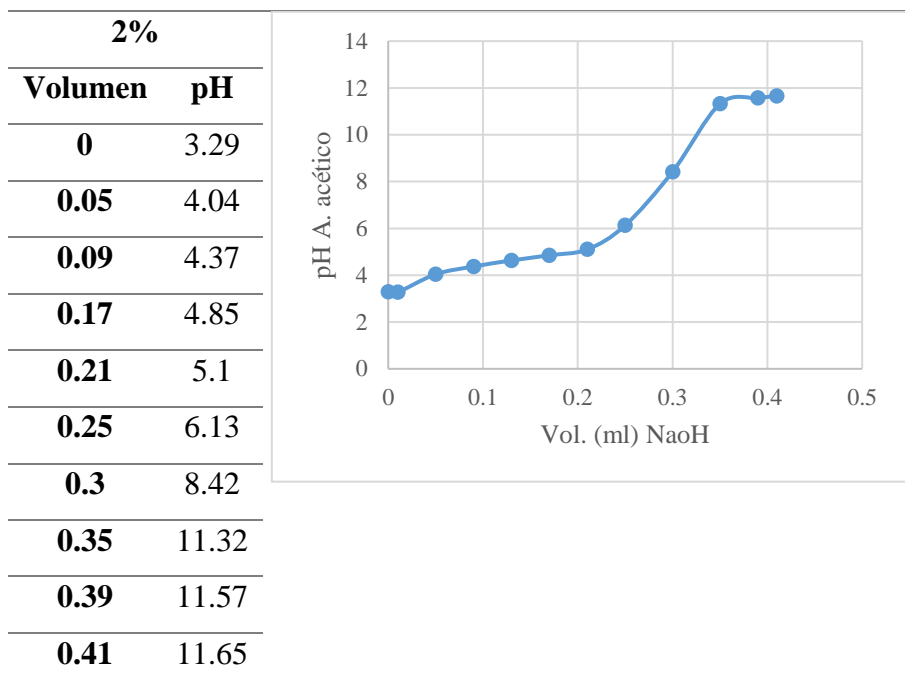


12%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.29 |
| 0.01 | 3.27 |
| 0.05 | 4.04 |
| 0.09 | 4.37 |
| 0.13 | 4.63 |
| 0.17 | 4.85 |
| 0.21 | 5.1 |
| 0.25 | 6.13 |
| 0.3 | 8.42 |
| 0.35 | 11.32 |
| 0.39 | 11.57 |
| 0.41 | 11.65 |

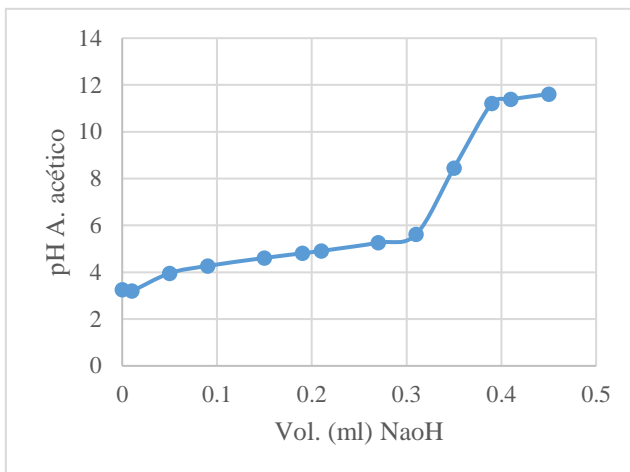


20 horas



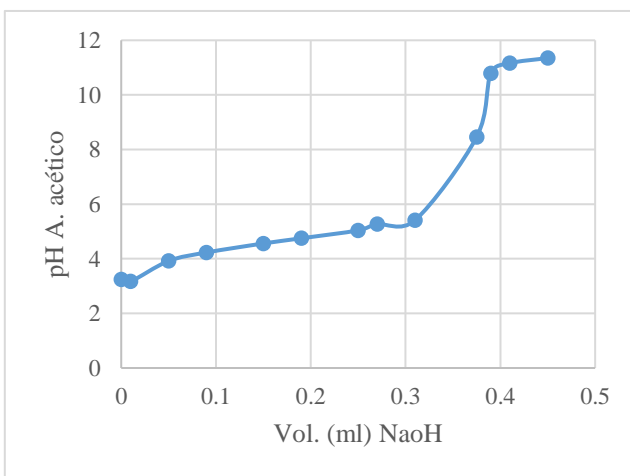
6%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.25 |
| 0.05 | 3.96 |
| 0.09 | 4.27 |
| 0.15 | 4.61 |
| 0.19 | 4.81 |
| 0.27 | 5.26 |
| 0.31 | 5.62 |
| 0.35 | 8.45 |
| 0.39 | 11.22 |
| 0.41 | 11.39 |
| 0.45 | 11.61 |



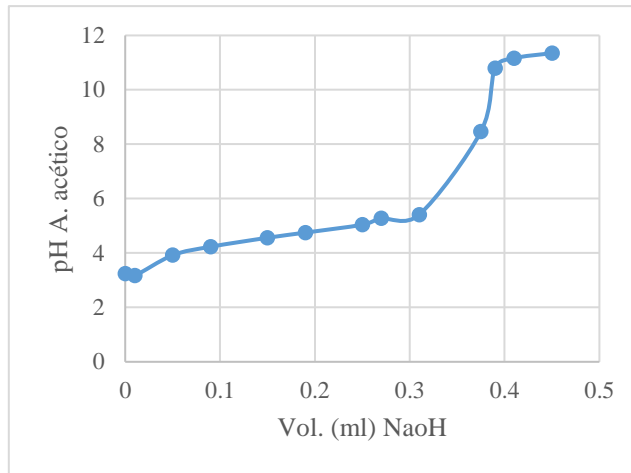
8%

| Volumen | pH |
|----------------|-----------|
| 0 | 3.24 |
| 0.05 | 3.92 |
| 0.09 | 4.23 |
| 0.15 | 4.56 |
| 0.19 | 4.75 |
| 0.25 | 5.04 |
| 0.27 | 5.27 |
| 0.31 | 5.41 |
| 0.375 | 8.46 |
| 0.39 | 10.79 |
| 0.41 | 11.16 |
| 0.45 | 11.35 |



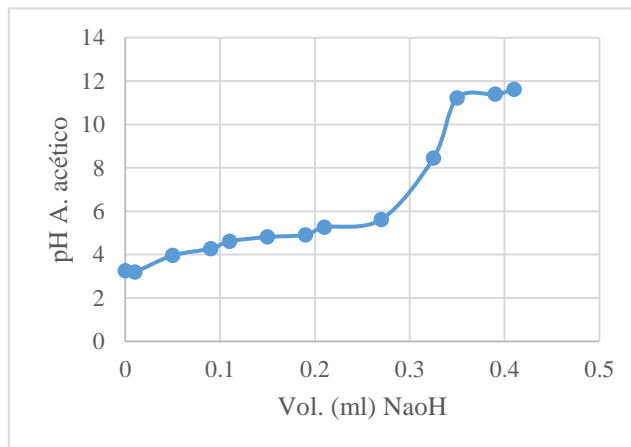
10%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.24 |
| 0.05 | 3.92 |
| 0.09 | 4.23 |
| 0.15 | 4.56 |
| 0.19 | 4.75 |
| 0.25 | 5.04 |
| 0.27 | 5.27 |
| 0.31 | 5.41 |
| 0.375 | 8.46 |
| 0.39 | 10.79 |
| 0.41 | 11.16 |
| 0.45 | 11.35 |



12%

| Volumen | pH |
|---------|-------|
| 0 | 3.25 |
| 0.05 | 3.96 |
| 0.09 | 4.27 |
| 0.11 | 4.61 |
| 0.15 | 4.81 |
| 0.19 | 4.91 |
| 0.21 | 5.26 |
| 0.27 | 5.62 |
| 0.325 | 8.44 |
| 0.35 | 11.22 |
| 0.39 | 11.39 |
| 0.41 | 11.61 |



APÉNDICE D

Datos de la concentración del ácido

| Porcentaje de etanol en el medio | | | | | | |
|--|---------|---------|----------|----------|----------|----------|
| Horas | 2% | 4% | 6% | 8% | 10% | 12% |
| Concentración de ácido acético producido | | | | | | |
| 0 | 0.30026 | 0.30026 | 0.30026 | 0.30026 | 0.30026 | 0.30026 |
| 2 | 0.30026 | 0.30026 | 0.30026 | 0.30026 | 0.60052 | 0.60052 |
| 4 | 0.60052 | 0.60052 | 0.60052 | 0.45039 | 0.60052 | 0.60052 |
| 6 | 0.60052 | 0.60052 | 0.60052 | 0.60052 | 0.60052 | 0.60052 |
| 10 | 0.60052 | 0.75065 | 0.75065 | 0.90078 | 0.675585 | 0.60052 |
| 12 | 0.60052 | 0.75065 | 0.75065 | 0.90078 | 0.90078 | 0.60052 |
| 14 | 0.60052 | 0.90078 | 0.75065 | 1.05091 | 0.90078 | 0.60052 |
| 16 | 0.75065 | 0.90078 | 0.825715 | 1.05091 | 0.90078 | 0.75065 |
| 18 | 0.90078 | 0.90078 | 1.05091 | 1.05091 | 1.05091 | 0.90078 |
| 20 | 0.90078 | 1.05091 | 1.05091 | 1.125975 | 1.125975 | 0.975845 |

APÉNDICE E

Curvas de calibración de ácidos orgánicos por HPLC

