



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento El Hombre y su Ambiente
Licenciatura en Biología

Informe de Conclusión de Servicio Social
por Investigación

**Influencia de las cáscaras de *Physalis* spp. (tomate verde)
en el cambio de las comunidades de levaduras del pulque
a partir de su uso tradicional como método de
preservación**

Que presenta

Montserrat Argumedo Espindola
(2192052503)

ASESORA INTERNA

Dra. María Teresa Núñez Cardona (14473)
Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco
Departamento El Hombre y su Ambiente

ASESOR EXTERNO

Dr. César Iván Ojeda Linares (111603)
Universidad Nacional Autónoma México
Laboratorio de Etnobiología Ecológica,
Jardín Botánico, UNAM

Ciudad de México, agosto de 2024

Índice

Resumen	3
1. Introducción	4
2. Planteamiento del problema y Justificación	5
3. Objetivos	6
3.1. Objetivo General	6
3.2. Objetivos Específicos.....	6
4. Antecedentes	6
5. Materiales y métodos	10
5.1. Área de estudio y colecta de muestras	10
5.2. Diseño experimental.....	12
5.2.1. Obtención de cálices de <i>Physalis</i> spp.....	12
5.2.2. Esterilización superficial de los cálices de <i>Physalis</i> spp.	13
5.2.3. Cambios fisicoquímicos	13
5.2.4. Estudio microbiológico y caracterización de la carga microbiana de levaduras del pulque	14
5.2.5. Análisis estadísticos	16
6. Resultados	16
7. Discusión	21
8. Conclusiones	23
Agradecimientos	23
9. Referencias	24
Visto Bueno de los Asesores	30

Resumen

El pulque es una bebida fermentada tradicional de origen prehispánico, elaborada a base de aguamiel de agaves pulqueros como *Agave salmiana*, *A. mapisaga*, *A. americana* y *A. atrovirens*, característicos del Valle de México. Debido a la actividad microbiana que se presenta durante la fermentación y a la corta vida de anaquel que tiene esta bebida, ha llevado a que los productores empleen diversos métodos para su conservación, como la pasteurización, la ultrafiltración o la adición de conservadores. No obstante, estos procesos modifican las características sensoriales y funcionales distintivas y aceptadas por los consumidores habituales de pulque. Una de las técnicas tradicionales empleadas para conservar el pulque es la adición de la cáscara de tomate verde (*Physalis* spp.) permitiendo comercializar esta bebida por más tiempo y poder trasladarla a localidades lejanas. Al no existir estudios, que aborden las implicaciones microbiológicas de agregar la cáscara de tomate verde (*Physalis* spp.), ni que documenten los cambios en los parámetros fisicoquímicos que esta práctica pueda generar en la conservación del pulque. Esta investigación consistió en analizar los cambios que se presentan en la comunidad de levaduras en el pulque al agregar la cáscara de *Physalis* spp. de tres muestras de pulque comercializado en diferentes pulquerías de la Ciudad de México. A partir de los resultados obtenidos se puede afirmar que la adición de cáscara de *Physalis* spp. a las diferentes muestras de pulque tuvo un efecto sobre el pH, el cual disminuyó en todas las muestras, para las UFC/mL se observó una disminución en las muestras experimentales de Singuilucan y San Isidro, y en lo que a la diversidad macro-morfológica refiere después del tratamiento de *Physalis* spp. esta diversidad se redujo. Por lo que, la adición de la cáscara de *Physalis* spp. al pulque provoca una restricción en el crecimiento de cierto grupo de levaduras, además que el uso empírico de la cáscara de *Physalis* spp. como método de conservación si tiene una base de conocimiento ecológico tradicional.

Palabras clave: Pulque, cáscara de *Physalis* spp., método de conservación, restricción en el crecimiento, uso empírico.

1. Introducción

Dentro de las bebidas más importantes en la cultura mexicana, se encuentran aquellas que son elaboradas con plantas del género *Agave*. Las especies *Agave salmiana*, *A. mapisaga*, *A. americana* y *A. atrovirens*, características del Valle de México conocidas como agaves pulqueros (Alfaro-Rojas *et al.*, 2007; Nieto-Aquino *et al.*, 2016; García-Mendoza *et al.*, 2019; Cortazar-Martínez *et al.*, 2021), son empleados para la producción de una bebida alcohólica fermentada tradicional, de origen prehispánico, llamada pulque u *octli* (Vino en *Nahuatl*). Esta bebida tiene un característico color blanco, consistencia viscosa, espesa, olor fuerte, ligeramente ácido, y con alto valor nutricional. En México el pulque es considerado la bebida fermentada más antigua y tradicional; anteriormente consumida sólo por sacerdotes, gobernantes y dioses, y utilizada religiosamente para rituales o de forma medicinal (Torres-Nieto, 2013).

La elaboración del pulque es realizada por los tlachiqueros, la mayoría de ellos, son los responsables de seleccionar el agave, obtener el aguamiel o savia y llevar el proceso de fermentación. El aguamiel presenta diversos microorganismos, los cuales prevalecen durante su recolección, transporte, inoculación y manipulación, confiriéndole sus propiedades características (Cervantes-Contreras y Pedroza-Rodríguez, 2007; Martínez-Madrid, 2015; Ballesteros-Rodríguez y Sánchez-Teyer, 2021; Medina-Mendoza *et al.*, 2023; Flores-Rodríguez y Miranda-López, 2023). En el proceso de fermentación, el tlachiquero realiza diversas acciones que tienen implicaciones en los aspectos sensoriales del producto final. Además, ellos realizan distintas prácticas para mantener esta bebida estable, incluso después de completar la fermentación alcohólica y no permitir la transición a una fermentación acética. Una de las prácticas que realizan los productores para extender el tiempo de vida del pulque es el uso de la cáscara del tomate verde (*Physalis* spp.) (Campos-Pastelin *et al.*, 2019).

En años recientes los productores han empleado la pasteurización, la filtración y adición de aditivos como, agentes preservativos, texturizantes, antioxidantes y colorantes para extender la vida de anaquel del pulque, permitiendo así que el pulque se distribuya a grandes distancias, inclusive a mercados foráneos como a Estados Unidos y Europa, envasado en latas. No obstante, estos procesos reducen el contenido prebiótico y probiótico. Algo semejante ocurre cuando se agrega aguardiente de caña al 85%, esto permite conservar el pulque en barricas durante un año

(Herrera en 1879; Arroyo-Cruz y Reynoso-Ocampo, 2016; Cortazar-Martínez *et al.*, 2021). Además, diferentes estudios sugieren que, mantener el pulque a bajas temperaturas (-3°C), es una forma de conservación, ya que, detiene el crecimiento bacteriano y reduciendo las reacciones bioquímicas, permitiendo incrementar la vida útil, sin afectar las características fisicoquímicas más importantes del pulque (Arroyo-Cruz y Reynoso-Ocampo, 2016; Cortazar-Martínez *et al.*, 2021), no obstante, es un método más caro para volúmenes pequeños.

En general, diversas especies vegetales se utilizan como métodos de preservación posterior a la fermentación, como el ajeno en distintas bebidas fermentadas o el lúpulo en la cerveza. No obstante, a la fecha, existen escasos estudios que aborden las implicaciones microbiológicas de usar estas plantas como preservadores en diversos alimentos fermentados, tal es el caso del uso de la cáscara del tomate verde para conservar de manera óptima bebidas tradicionales como el pulque. En este sentido, el presente estudio aborda las implicaciones de usar la cáscara del tomate verde como un método de preservación del pulque.

2. Planteamiento del problema y Justificación

Las estrategias de conservación son cruciales para mantener la calidad, seguridad y vida útil de diversos productos alimenticios y el cómo se emplean para prevenir el deterioro, la contaminación bacteriana y la degradación química, garantizando a los consumidores productos con características sensoriales atractivas y seguras para su consumo. En el caso de las bebidas fermentadas, al contar con microorganismos metabólicamente activos como bacterias y levaduras, es probable que cambios externos o incluso diferentes procesos de sucesión, de la microbiota en las bebidas, pueden provocar su deterioro. En líquidos, se emplean distintos métodos de conservación tales como la pasteurización, la filtración o el uso de agentes conservadores que ayudan a controlar el crecimiento microbiano, garantizando la seguridad y longevidad de las bebidas, permitiendo mantener la calidad del producto.

Así mismo, las bebidas que son transportadas a largas distancias y bajo diferentes condiciones ambientales pueden afectar su estabilidad por ello, los métodos de conservación ayudan a mantener la integridad del producto durante su transporte y almacenamiento, permitiendo una distribución y conservación del producto. En el caso del pulque, el metabolismo activo de la

microbiota puede transitar de una bebida alcohólica a un vinagre, debido a la proliferación de bacterias con un metabolismo acético, haciendo de esta bebida no apta para su consumo. No obstante, los productores emplean estrategias para evitar su deterioro como es el caso de agregar cáscara de tomate verde para garantizar que el pulque se mantenga en óptimo estado y sea seguro para su consumo. A pesar de que esta práctica es común entre los productores de pulque, a la fecha existen pocos estudios que permita entender, los cambios en la dinámica microbiológica que se generan al agregar la cáscara de tomate verde y sobre la importancia de los compuestos de esta cáscara como agente de conservación.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Analizar los cambios que se presentan en la comunidad de levaduras en el pulque al agregar cáscaras de tomate verde (*Physalis* spp.) como conservador.

3.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar el número de levaduras presentes en tres muestras de pulque de diferentes pulquerías de la Ciudad de México.
- Determinar si la cáscara de *Physalis* spp. influye en la comunidad de levaduras presentes en el pulque.
- Comparar los cambios fisicoquímicos (pH, °Bx y densidad) que se presentan en el pulque al agregar la cáscara de *Physalis* spp.

4. Antecedentes

La fermentación es un proceso complejo, debido a que, es el resultado de la interacción de tres componentes: 1) La materia prima, esta puede ser de origen vegetal (plantas, granos, frutas) o de origen animal (lácteos, carnes); 2) los microorganismos del ambiente o aquellos que son agregados deliberadamente y que, metabólicamente realizan la fermentación y 3) los grupos humanos que realizan la fermentación; estos últimos, impulsan el proceso y valoran los productos

finales que se obtienen a través de la fermentación (Carbonero-Zalduegui, 1975; Puerta-Quintero, 2013; Wacher-Rodarte, 2014; Ojeda-Linares *et al.*, 2021).

La fermentación es un proceso metabólico mediante el cual microorganismos como bacterias, levaduras (hongos) descomponen sustancias orgánicas complejas, generalmente carbohidratos, en compuestos más simples como ácidos orgánicos, gases o alcohol, a menudo en ausencia de oxígeno. La fermentación es crucial para crear una variedad de productos y también puede aprovecharse para conservar los alimentos y mejorar su valor nutricional (Tamang y Kailasapathy, 2010). Las bacterias lácticas tales como *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp. predominan en fermentaciones lácticas, generalmente aquellas que involucran como materia prima sustratos vegetales o lácteos. También un grupo constante en fermentaciones alcohólicas son las levaduras, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, asociada a la producción de bebidas como los vinos, cervezas, pero también a otros productos como el pan (Vázquez y Dacosta, 2007; Puerta-Quintero, 2013; Rivera-Yunga, 2022; Martín y Manuel-Ayuso, 2023).

La presencia de los diversos grupos microbianos en combinación con diferentes sustratos que se pueden emplear para la fermentación, permiten la diversificación de más de 3,500 alimentos fermentados que se encuentran alrededor del mundo, reflejándose en productos como: el yogurt, queso, pan, salsa de soja, kimchi; o bebidas como: cerveza, vino, sidra, kvass, entre otros (Ferrari *et al.*, 2020; Ojeda-Linares *et al.*, 2021). Estos productos alimenticios, además de integrar un papel importante, han incrementado su valor nutricional, proporcionando diferentes beneficios a la salud como: mejora en la digestibilidad de proteínas, alivio a la intolerancia a la lactosa, reducción de niveles de antinutrientes y alérgenos o el incremento en componentes fenólicos y vitaminas (Ojeda-Linares *et al.*, 2021; Martín y Manuel-Ayuso, 2023).

Las bebidas fermentadas, son ampliamente estudiadas, particularmente las que involucran la fermentación alcohólica (Quintero-Salazar *et al.*, 2012; Martín y Manuel-Ayuso, 2023). Mundialmente en pequeñas localidades se realizan diferentes “bebidas fermentadas tradicionales” o artesanales (Quintero-Salazar *et al.*, 2012). En México, no existe un registro exacto de las bebidas fermentadas, por ello, se estima que existe una producción entre 172 a 200 bebidas fermentadas,

destacando: el *colonche*, *tuba*, *pulque*, *tepache*, entre otras (Villalobos, 2007; Quintero-Salazar *et al.*, 2012; Ojeda-Linares *et al.*, 2021; Navarrete-Torres y García Muñoz-Aparicio, 2021).

Dentro de las bebidas más importantes en la cultura mexicana, son aquellas elaboradas con las plantas del género *Agave*, también conocido como maguey. Este es endémico de América, con un total de 210 especies, de las cuales, en México, hay 159 (Nieto-Aquino *et al.*, 2016; García-Mendoza *et al.*, 2019). Estas especies al ser plantas xerófitas crecen en el altiplano central de México, de clima semiárido, árido y frío; adaptándose a largos periodos de sequía y a las altas temperaturas, evitan la erosión del suelo, promueven la recuperación de suelos degradados y la retención de humedad; hospederos de gusanos blancos y rojos (*chinicuales* o *tecol*) y de larvas de hormigas o *escamoles* (Colunga-García Marín *et al.*, 2007; Flores-Morales *et al.*, 2009; CONABIO, 2021).

Una bebida tradicional fermentada de origen prehispánico en México es el *octli* (del náhuatl vino), o pulque; considerada sagrada, debido a que era utilizada de manera religiosa, para rituales o de forma medicinal, y solo era consumida por sacerdotes, gobernantes y dioses, por ello era llamada “bebida de los dioses” (Torres-Nieto, 2013). Su origen se asocia a la diosa *Mayahuel*, quien habría creado el primer maguey con sus huesos para después enseñar el proceso para la obtención del aguamiel.

El pulque, a lo largo del tiempo ha tenido diferentes nombres proporcionados por los pueblos, ya sea: “intoxicante ritual, bebida medicinal, líquido sacrificial, vino blanco o sagrado, el *teometl* (agave divino o planta de Dios), leche de *Mayahuel*”. Por lo anterior es considerada la más antigua y tradicional bebida del pueblo mexicano (Villalobos, 2007; Martínez-Madrid, 2015; Nieto-Aquino *et al.*, 2016; Navarrete-Torres y García Muñoz-Aparicio, 2021).

El pulque se obtiene del agave o maguey pulquero, principalmente de las especies *Agave salmiana*, *A. mapisaga*, *A. americana* y *A. atrovirens*, características del Valle de México, Estado de México y los estados de Tlaxcala, Hidalgo y Puebla, aunque también se les puede encontrar en San Luis Potosí, Michoacán, Querétaro, Morelos, Guanajuato, Veracruz y Oaxaca (Alfaro-Rojas *et al.*, 2007; Cortazar-Martínez *et al.*, 2021). Estas especies, se caracterizan por medir dos o más

metros de altura, poseer las hojas más grandes del género, de coloración verde a glauco grisáceo; alcanzando la madurez fisiológica entre ocho a 15 años. Al llegar esta, al agave se le quita el quiote o tallo floral, creando una cavidad en el interior de la piña o *mezontete*, dejándola añejar durante seis meses, y extrayéndose antes de la floración, para que el agave produzca aguamiel o savia, *necutli* (miel), de buena calidad; caracterizada por ser un líquido dulce o ácido, ligeramente alcalino, incoloro y con ligero olor herbáceo, rico en minerales y carbohidratos digeribles, proteínas y fructosa. Con ayuda de un “acocote” (calabaza larga y seca, con orificios en ambos extremos, *Lagenaria* spp.), se extrae el aguamiel fresco; para filtrar y verter en recipientes con aguamiel ya fermentado, conocido como “semilla”, esto sirve como inóculo acelerando el proceso de fermentación, de 20 o 25 días a 36 horas, aproximadamente (Flores-Morales *et al.*, 2009; Martínez-Madrid, 2015; Nieto-Aquino *et al.*, 2016; Ballesteros-Rodríguez y Sánchez-Teyer, 2021; Cortazar-Martínez *et al.*, 2021; Medina-Mendoza *et al.*, 2023).

El pulque es una bebida alcohólica, de característico color blanco, consistencia viscosa y espesa, de olor fuerte y ligeramente ácido, con un grado de alcohol entre 4 y 7° GL, rango de pH aproximado de 3.5 a 4.2, y componentes principales como, sacarosa, ácido pantoténico, proteína, aminoácidos, entre otros. Proporcionando beneficios nutricionales como, aporte en vitaminas B y C, proteínas, minerales y aminoácidos esenciales, calcio, hierro y antioxidantes; considerándolo como un alimento de alto valor nutricional. Además, que su consumo es efectivo para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales e inflamatorias, además de prevenir la constipación y la diarrea (Martínez-Madrid, 2015; Ballesteros-Rodríguez y Sánchez-Teyer, 2021; Cortazar-Martínez *et al.*, 2021; Medina-Mendoza *et al.*, 2023; Flores-Rodríguez y Mrianda-López en 2023).

Diversos estudios, indican que, mientras esta bebida se encuentra en el agave, como aguamiel, presenta diversos microorganismos autóctonos, los cuales prevalecen durante su recolección, transporte, inoculación y manipulación, así mismo estos fluctúan transformando y confiriendo una mayor cantidad de propiedades fisicoquímicas, sensoriales y nutricionales, características de esta bebida (Cervantes-Contreras y Pedroza-Rodríguez, 2007; Martínez-Madrid, 2015; Matías-Luis *et al.*, 2019; Ballesteros-Rodríguez y Sánchez-Teyer, 2021; Medina-Mendoza *et al.*, 2023; Flores-Rodríguez y Mrianda-López, 2023).

Al existir una escasa información documentada del proceso de elaboración del pulque, los tlachiqueros, continúan realizando esta práctica de forma tradicional de acuerdo con las diferentes regiones de procedencia, obteniendo variaciones en sus propiedades características (Ballesteros-Rodríguez y Sánchez-Teyer, 2021). Así mismo, los tlachiqueros continúan buscando y realizando distintas prácticas para mantener y conservar sin refrigeración, comercializar o trasladar esta bebida a diferentes lugares más allá del lugar de producción, inclusive después de completar la fermentación alcohólica y no permitir la transición a una fermentación acética. No obstante, poca información se ha recopilado para identificar qué actividades realizan los tlachiqueros y las repercusiones que estas acciones tienen en la comunidad microbiana. Particularmente, en campo se ha observado el uso de la cáscara del tomate verde (*Physalis* spp.) como un método de preservación posterior a la fermentación.

Campos-Pastelin *et al.* (2019) señalan que en la región de la Cañada Oaxaqueña se cuenta con conocimiento empírico acerca del uso del cáliz acrescente del tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*) para evitar la fermentación del pulque y así poder transportarlo de un lugar a otro (Campos-Pastelin *et al.*, 2019).

Identificar las implicaciones del uso de la cáscara del tomate como método de preservación del pulque es importante en términos prácticos, pues puede sugerir que las cáscaras de tomate tienen propiedades antimicrobianas que permitan mantener estable la fermentación del pulque. Así mismo, en términos teóricos aporta nuevas perspectivas al manejo microbiano por parte de los productores, así como a procesos de selección inconsciente de comunidades microbianas.

5. Materiales y métodos

5.1. Área de estudio y colecta de muestras

Se obtuvieron tres muestras de 1.0 L de pulque de diferentes establecimientos (pulquerías) de la Ciudad de México, a) Singuilucan para la Pulquería “Santa Patrona”, b) San Isidro para la Pulquería “Los Primos del Valle”, y c) Tlaxcala para la Pulquería “La Tlaxcalteca” (Fig. 1). En la Tabla 1, se muestra la ubicación, el lugar en donde se elaboró el pulque, las horas de fermentación y el conservante, sustancia que se le adiciona al pulque para prolongar su comercialización, las

cuales fueron compradas el mismo día. Posteriormente, estas fueron llevadas al Laboratorio de Micromicetos, en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBUNAM), Ciudad de México, para posteriormente realizar los análisis.

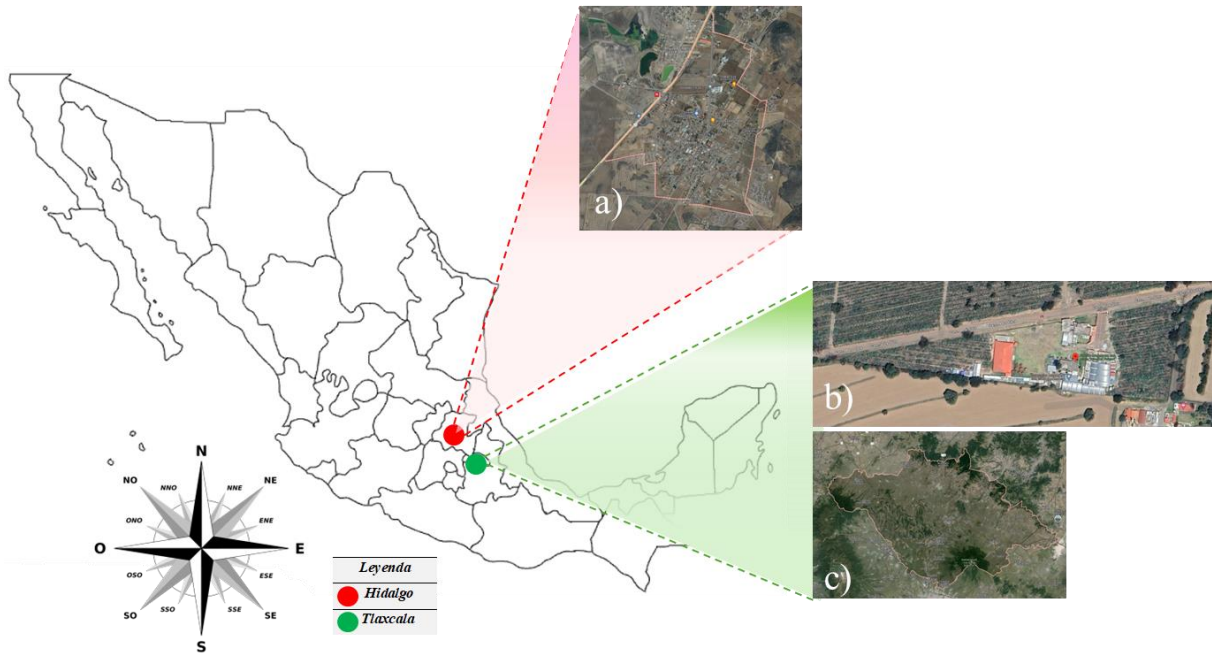


Figura 1. Mapa del área de estudio en México, los puntos rojos y verdes son los sitios en donde se elabora el pulque que se recolecto en la Ciudad de México.

Tabla 1. Procedencia de las muestras de pulque.

<i>Muestra de pulque</i>	<i>Pulquería</i>	<i>Ubicación (Alcaldía)</i>	<i>Origen del pulque (muestra)</i>	<i>Horas de fermentación</i>	<i>Conservante</i>
a) Singuilucan	“Santa Patrona”	Gustavo A. Madero	Singuilucan, estado de Hidalgo	72 h	2 tazas de azúcar
b) San Isidro	“Los Primos del Valle”	Benito Juárez	San Isidro, estado de Tlaxcala	72 h	Se desconoce
c) Tlaxcala	“La Tlaxcalteca”	Cuauhtémoc	Estado de Tlaxcala	72 h	Se desconoce

5.2. Diseño experimental

Una vez en el laboratorio, se colocaron 35 mL de cada muestra de pulque con 72 h de fermentación en tubos Falcon estériles de 50 mL, por duplicado. Con la finalidad de evaluar la influencia que tiene el cáliz de *Physalis* spp., en el crecimiento de las levaduras del pulque (Fig. 2), las muestras se clasificaron como a) control (muestras con pulque solo) y b) experimentales (muestras con pulque adicionadas con 0.4 g del cáliz de *Physalis* spp.). Esto se realizó, debido a lo observado en campo, ya que, a 1 L de pulque se le agrega una cáscara entera de *Physalis* spp., debido a esto se realizaron las proporciones para el experimento. Una vez adicionada la cáscara a los tubos Falcón (muestras experimentales) se dejaron en reposo por 3 h a temperatura ambiente.

5.2.1. Obtención de cálices de *Physalis* spp.

Los cálices de *Physalis* spp., se adquirieron mediante la compra de tomate verde con cáscara, en el Mercado de Cuauhtepac en la Alcaldía Gustavo A. Madero, Ciudad de México. Las cáscaras fueron separadas de los frutos y conservadas en refrigeración, debido a que fueron utilizadas un día después de la separación.

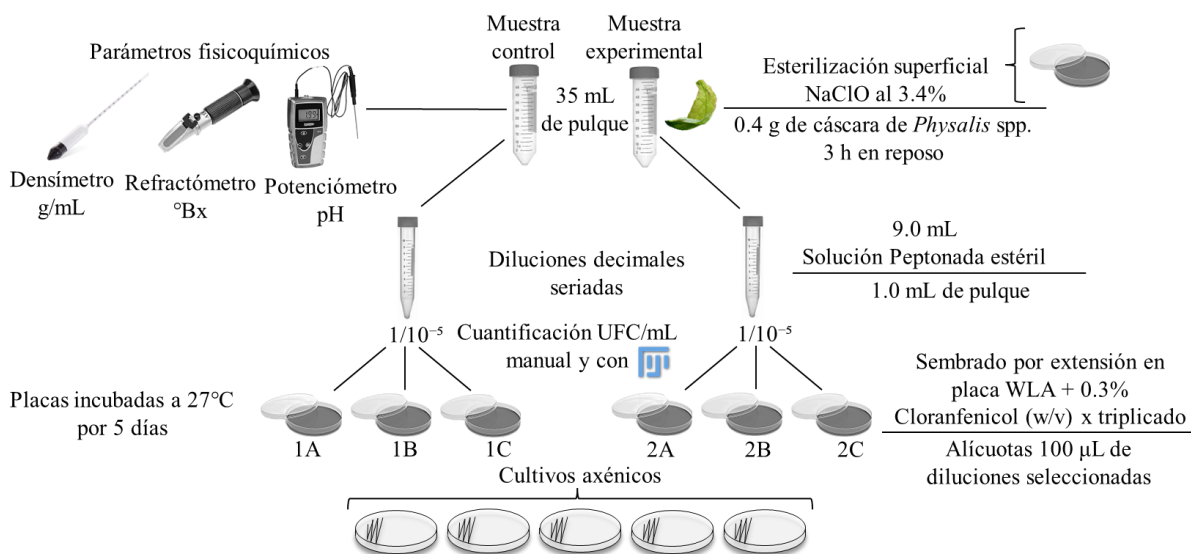


Figura 2. Diseño experimental de la influencia de la cáscara de *Physalis* spp. en el cambio de las comunidades de levaduras en el pulque.

5.2.2. Esterilización superficial de los cálices de *Physalis* spp.

La esterilización superficial de los cálices de *Physalis* spp. se realizó en el laboratorio, siguiendo el procedimiento que se indica en la figura 3 descrito por Rodrigues, (1994), con el propósito de erradicar la mayor cantidad de microorganismos.

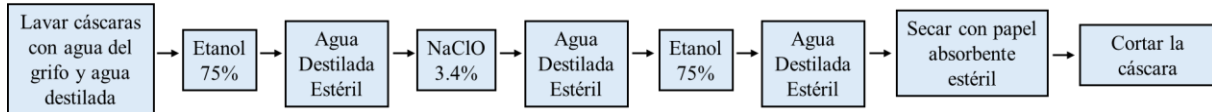


Figura 3. Esterilización superficial. Se tomaron los cálices de *Physalis* spp., se pesaron a tubos Falcon estériles de 50 mL se prepararon soluciones de NaClO al 3.4%, (con 1.7 mL de Hipoclorito de sodio, marca Cloralex, y 48.3 mL de H₂O agua destilada, Etanol al 75%, (37.5 mL de etanol y 12.5 mL de H₂O), agua destilada estéril y agua del grifo o de la red de agua potable, posteriormente cada tubo fue rotulado.

Para corroborar la esterilización correcta de los cálices de *Physalis* spp., se inoculó 100 μ L del último tubo de agua de enjuague que se empleó para la esterilización de los cálices en placas WL Agar más 0.3% de Cloranfenicol (w/v) por método de extensión de placa. La inoculación de las placas se realizó por triplicado, y se incubaron durante cinco días a 27 °C.

5.2.3. Cambios fisicoquímicos

Se realizó el registro de los cambios fisicoquímicos en las muestras control y experimentales. Para medir el pH se empleó un potenciómetro modelo PH-TDS METER (marca PH Y TDS-3, China), se realizó la medición del pH de cada una de las muestras. La concentración total de azúcares disueltos en cada una de las muestras fue obtenida por medio de un refractómetro portátil marca ATC, China, y medida en grados Brix (°Bx); así mismo, para calcular la densidad de cada una de las muestras, se utilizó la siguiente ecuación:

Ecuación:

$$\rho = m / v$$

$$\rho = m / v = (3.07 \text{ g} - 1.96 \text{ g}) / (1.0 \text{ mL}) = (1.11 \text{ g}) / (1.0 \text{ mL}) = 1.11 \text{ g/mL}$$

Con la finalidad de obtener la densidad de las muestras (control y experimentales), se utilizó el peso de un criovial (1.96 g), al cual se le agregó 1.0 mL de las muestras, posteriormente se pesó, obteniendo la masa en conjunto de las muestras y el criovial (3.07 g). Obtener el peso de las muestras de pulque los datos 3.07 g y 1.96 g se restaron, por último, el peso de las muestras de pulque (1.11 g) se dividen entre el volumen del pulque (1.0 mL) obtenido así la densidad de las muestras (1.11 g/mL).

5.2.4. Estudio microbiológico y caracterización de la carga microbiana de levaduras del pulque

Diluciones decimales seriadas

El contraste de las comunidades de levaduras presentes en las muestras control y experimental, se realizó a partir de diluciones decimales seriadas. Se agregó 1.0 mL de cada muestra a un tubo Falcon con 9.0 mL de solución Peptonada estéril (0.5 g de Peptona, 4.25 g de NaCl y 500 mL de H₂O), obteniendo la dilución 1/10¹ con un volumen final de 10 mL, ejerciendo una agitación final, homogeneizando la muestra. Posteriormente, se realizó la segunda dilución (1/10²) con 1.0 mL de la muestra previa. Así sucesivamente se prepararon hasta llegar a la dilución 1/10⁵.

Cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL)

Con el propósito de caracterizar la carga microbiana en la comunidad de levaduras proveniente de las muestras (control y experimental), se realizó la cuantificación de las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), esta evaluación permitió determinar el número de células microbianas involucradas en la fermentación.

Con el objetivo de aislar las colonias de levaduras presentes en el pulque se hicieron aislamientos al azar, estas fueron sembradas por método de extensión en placa con alícuotas de 100 µL de las diluciones 1/10⁴ y 1/10⁵ (previamente agitadas) en placas Petri (con 40.1 g de Medio Nutritivo WL Agar (Alpha BioSciences, MD, EUA), 500 mL de H₂O d), adicionado con 0.3% (w/v) de Cloranfenicol (Sigma México). El Cloranfenicol es un antibiótico el cual restringe el

crecimiento de bacterias, mientras que el WL permite observar el crecimiento y la macro morfología de las levaduras presentes del pulque.

La inoculación de las placas se realizó por triplicado, y fueron incubadas a 27 °C (temperatura óptima para el crecimiento de las levaduras) durante cinco días, observando estas diariamente para realizar la cuantificación de las UFC/mL de forma manual y con el programa Image J (Wayne Rasband, 2023).

Cultivos axénicos

A partir la identificación fenotípica de las colonias (color, forma, elevación, borde, opacidad y textura) de cada uno de los triplicados, fueron seleccionadas aquellas colonias que presentaron una macro-morfología diferente, las cuales se observaron en el microscopio óptico, modelo Wetzlar 21, Helmut Hund GmbH, Alemania. Con la finalidad de revisar que estas no tuvieran contaminación, para así ser aisladas y resembradas por la técnica de estriado en el mismo medio de cultivo en el cual se aislaron, este proceso se repitió con cada una de las colonias seleccionadas, e incubadas a 27 °C durante cuatro días.

Los cultivos axénicos de levaduras se resembraron por la técnica de estriado en GELP Agar (con 10 g de Glucosa, 5 g de Peptona, 2.5 g de Extracto de Levadura, 10 g de Agar, y 500 mL H₂O d) y se incubaron a 27 °C durante tres días.

Conservación de los cultivos axénicos

Se realizó la conservación a mediano y largo plazo de los aislados de levaduras:

a) Conservación a mediano plazo.

Este proceso se realizó a partir de los cultivos axénicos sembrados en el medio GELP Agar, los cuales, con un asa bacteriológica esterilizada, se recolectaron las células para traspasarlas a crioviales de 5 mL con agua destilada estéril, hasta la obtención de una suspensión cargada, por duplicado. Los crioviales se etiquetaron y conservaron en refrigeración a 4 °C.

b) Conservación a largo plazo.

Este proceso se realizó a partir de los cultivos axénicos sembrados en medio GELP Agar, los cuales, con un asa bacteriológica esterilizada, se recolectaron las células para traspasarlas a crioviales de 1.8 mL con 1.7 mL de GELP (con 2.6 g de Glucosa, 0.65 g de Extracto de Levadura, 1.3 g de Peptona, 130 mL de H₂O d) adicionado con 25% de Glicerol, es decir, 32.5 mL; realizado por duplicado. Los crioviales se etiquetaron y colocaron en una criocaja etiquetada, la cual se colocó en refrigeración a 4 °C por 10 min, para posteriormente ser trasladada a un congelador a -20 °C durante 10 min y por último se transfirieron a un ultracongelador a -80°C para su conservación.

5.2.5. Análisis estadísticos

Se realizó una prueba de *t* de Student utilizando Microsoft Excel 2010, a los valores de las UFC/mL obtenidas de la cuantificación entre las muestras control y experimental de las diluciones 1/10⁵ con el fin de determinar si existía una diferencia significativa en estas.

6. Resultados

Esterilización superficial de los cálices de *Physalis* spp.

Los resultados obtenidos de las placas inoculadas con 100 µL del agua de enjuague de las cáscaras de tomate esterilizadas superficialmente corroboran que no se desarrolló ninguna UFC/mL. Es decir, la esterilización de *Physalis* spp. fue correcta. (Fig. 4).

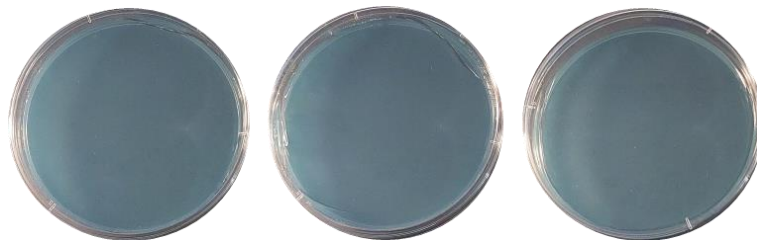


Figura 4. Placas de esterilización superficial de *Physalis* spp.

Evaluación de parámetros fisicoquímicos

Los datos obtenidos de los parámetros fisicoquímicos del pH, la densidad y la concentración total de azúcares disueltos ($^{\circ}\text{Bx}$), en las diferentes muestras fueron registrados en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos de las muestras de pulque.

<i>Pulque</i>	<i>Control</i>			<i>Experimental</i>		
	<i>pH</i>	<i>•Bx</i>	<i>Densidad</i>	<i>pH</i>	<i>•Bx</i>	<i>Densidad</i>
Singuilucan	3.36	10	1.13	3.26	10	1.16
San Isidro	3.66	15	1.16	3.56	15	1.17
Tlaxcala	4.06	15	1.11	3.96	15	1.14

Como se puede observar en la tabla 2, el pH disminuyó a 0.1 en las muestras experimentales. La concentración total de azúcares disueltos ($^{\circ}\text{Bx}$) en las muestras control y experimentales no presentaron diferencias. En la densidad se observó un ligero incremento, de 0.01 a 0.03 g/mL en las muestras experimentales.

Influencia de las cáscaras de *Physalis* spp. en las UFC/mL de levaduras en las muestras experimentales

La cáscara de *Physalis* spp. tuvo un efecto en el valor promedio de las UFC/mL en diluciones $1/10^5$ de las muestras control y experimentales de levaduras presentes en las muestras de pulque. Por lo que, el estadístico de t al mostrar valores de 2.18 y un p valor de 0.09, demostrando que sí hay un cambio en el número de levaduras en las muestras experimentales en relación a las muestras control (Fig. 5).

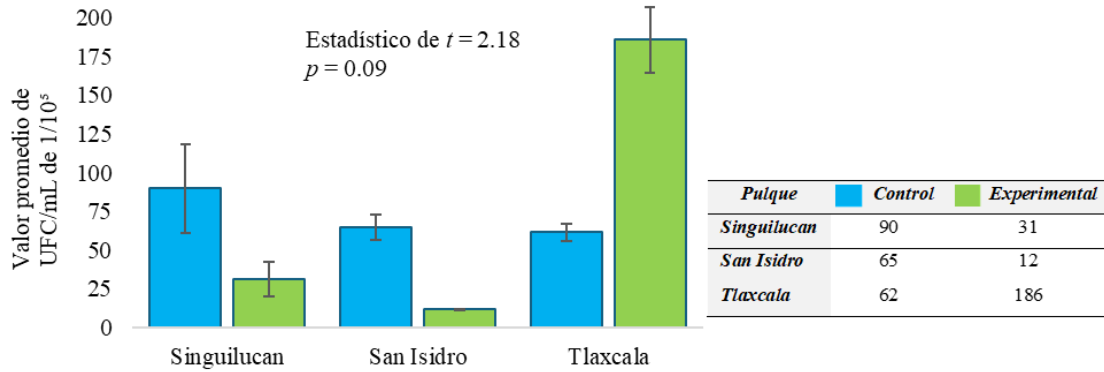


Figura 5. Valor promedio de las UFC/mL de las muestras control y experimentales de las diferentes muestras de pulque.

En la figura 4, se observa que en las muestras experimentales de Singuilucan y San Isidro el valor promedio de UFC/mL disminuyó en comparación con el valor reportado para las muestras control, mientras que, en el caso de las muestras Tlaxcala se observó un incremento significativo en el valor promedio de las UFC/mL en comparación con el control, con una dominancia de levaduras del género *Rhodotorula*. Con base en esta información se realizó un esquema comparativo de las UFC de las levaduras en placas de las muestras control y experimentales con la cáscara de *Physalis* spp. esterilizada superficialmente (Fig. 6).

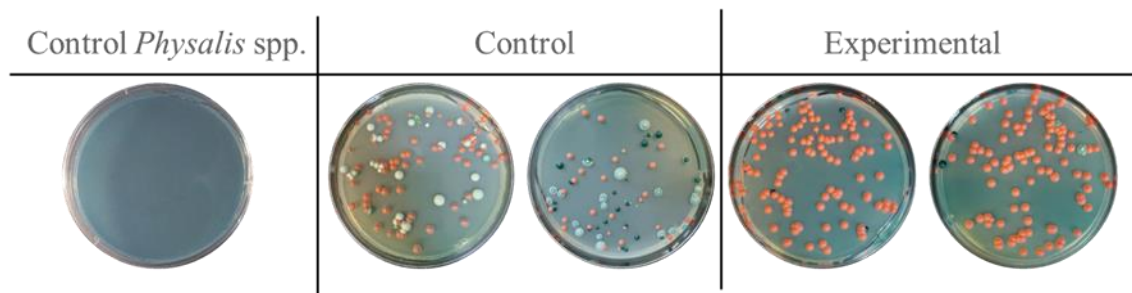


Figura 6. UFC de levaduras en medio Nutritivo WL Agar + 0.3% (w/v) Cloranfenicol inoculadas por extensión en placa, muestras de cáscara de *Physalis* spp. esterilizada, control y experimentales de pulque.

Identificación de la diversidad macro-morfológica de las colonias de levaduras aisladas de las diferentes muestras de pulque

A partir del aislamiento de colonias por sus características macro-morfológica se elaboró la tabla 3, además de realizar una gráfica comparativa (figura 7), en la cual se muestra la diversidad macro-morfológica de las diferentes levaduras en las muestras de pulque, tanto control como experimentales. Donde se observaron que las muestras control de Singuilucan tuvieron siete macro-morfológicas diferentes y cinco en experimentales, mientras que para San Isidro contaron cinco en el control y dos en las experimentales y para Tlaxcala se observaron cuatro en el control y tres en las experimentales.

Tabla 3. Diversidad macro-morfológica de las diferentes muestras de pulque.

<i>Pulque</i>	<i>Diversidad macro-morfológica</i>	
	<i>Control</i>	<i>Experimental</i>
<i>Singuilucan</i>	8	5
<i>San Isidro</i>	6	3
<i>Tlaxcala</i>	4	4

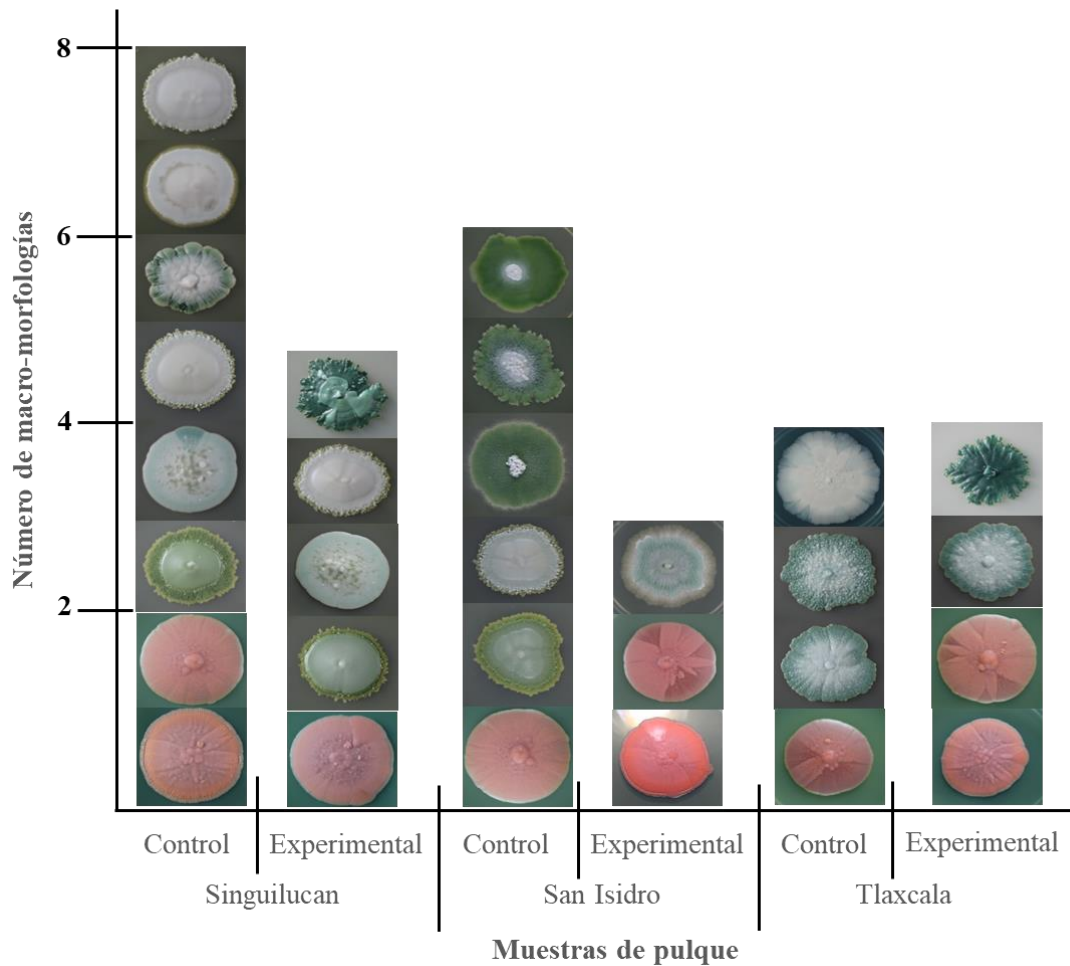


Figura 7. Diversidad macro-morfológica de las diferentes colonias de levaduras de las muestras de pulque.

De acuerdo con la tabla 3, se realizó una gráfica comparativa (Fig. 8) en la cual se muestra la diversidad macro-morfológica de las diferentes colonias de levaduras aisladas en las diferentes muestras de pulque, tanto control como experimental, observado una mayor diversidad de macro-morfológica en las muestras control, con un total de 13 colonias, mientras que las experimentales se obtuvieron ocho colonias.

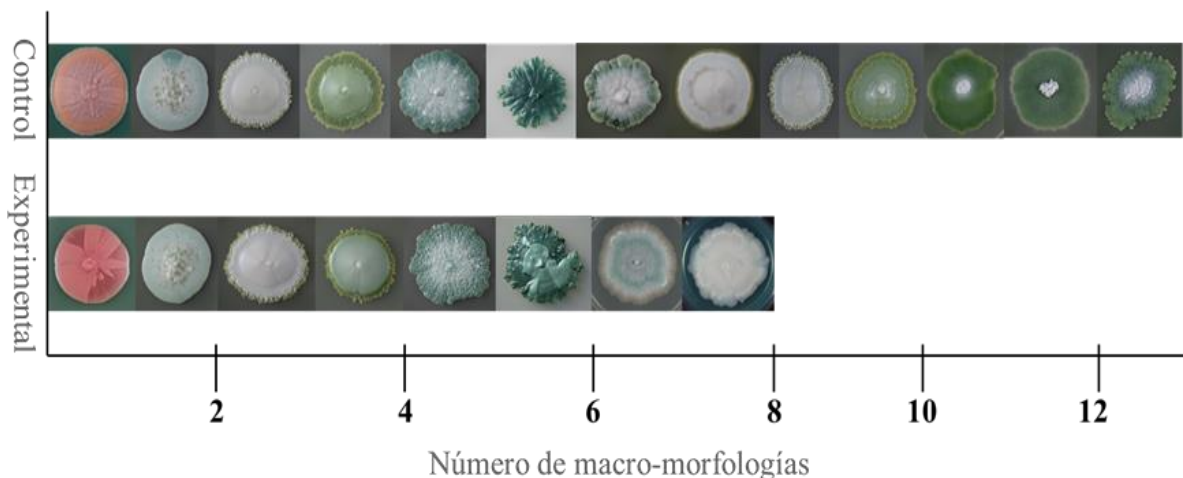


Figura 8. Diversidad macro-morfológica de las colonias de levaduras aisladas en medio Nutritivo WL Agar, aisladas de las muestras de pulque control y experimentales de las tres diferentes localidades.

7. Discusión

El pH disminuyó a 0.1 en todas las muestras experimentales, lo que puede explicarse, ya que en la literatura se ha registrado que las diferentes estructuras de *Physalis* spp. (hojas, cáscara, fruto, etc.) pueden acidificar diversos sustratos. Esto debido a que el género *Physalis* tiene importantes compuestos fitoquímicos como fenólicos, carotenoides, esteroides, monoterpénos, además de compuestos antioxidantes, ácidos flavonoides, polifenoles, glicósidos, taninos, alcaloides, saponinas y aminoácidos (Dostert *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2017; Campos-Pastelin *et al.*, 2019; Pérez-Herrera *et al.*, 2019; Filippi *et al.*, 2020; Uriol y Espinoza 2021; González-Pérez y Guerrero-Beltrán, 2021; Alcaciega-Farinango y Pazmiño-Salazar, 2022; Piña-Dumoulin *et al.*, 2023).

De ahí que, las distintas especies de *Physalis* spp. producen compuestos antibacterianos, fungicidas o fungistáticos, así como antioxidantes, los cuales pueden limitar el crecimiento de algunos microorganismos, como son las levaduras, principalmente en grupos *Saccharomyces*, como lo observado en las UFC/mL las cuales disminuyeron en las muestras experimentales de Singuilucan y San Isidro (Göztok y Zengin, 2013; Torabzadeh y Panahi, 2013; Khan *et al.*, 2017; Campos-Pastelin *et al.*, 2019; Campos-Pastelin *et al.*, 2019; Filippi *et al.*, 2020).

Se ha registrado que *Physalis ixocarpa* es una buena alternativa para el control de levaduras modificadoras de alimentos, o levaduras indeseables en la producción de bebidas alcohólicas (Campos-Pastelin *et al.*, 2019). Del mismo modo, Filippi *et al.*, 2020, mencionan que la acción antifúngica a partir de los ácidos cafeico, clorogénico y ferúlico y el flavonoide quercetina, dependerá de la composición química de la matriz vegetal de la que se obtuvo el extracto, así como la composición química del fruto al que se aplicó el extracto, influyen en la acción antifúngica ejercida por el extracto, que puede ser fungicida y/o fungistática. Igual que, Torabzadeh y Panahi en 2013, demostraron que los extractos de *Physalis alkekegensis* tiene capacidad fúngica y fungistática contra levaduras y hongos filamentosos. Así mismo, el extracto metanólico presenta un buen potencial de acción contra las bacterias Gram positivas (Helvacı *et al.*, 2010). Además, Göztek y Zengin en 2013, encontraron que el jugo de fruta de *P. peruviana* presentó actividad antimicrobiana contra la mayoría de bacterias, levaduras y dermatofitos. Sugiriendo que los extractos pueden poseer compuestos con propiedades antibacterianas y antifúngicas.

La diversidad macro-morfológica con el tratamiento de *Physalis* spp. se redujo, como se observa en la tabla 3. No obstante, las levaduras del género *Rhodotorula* persisten en las tres muestras experimentales y fue la levadura dominante en las muestras de pulque de Tlaxcala, donde las UFC/mL se incrementaron notablemente. Esto puede deberse al antagonismo que este género tiene contra otros géneros de levaduras (Akhtyamova y Sattarova, 2013; Nunes *et al.*, 2013; Diya *et al.*, 2019; Gharaghani *et al.*, 2020).

El género *Rhodotorula* pertenece al grupo de basidiomicetos con pigmentos microbianos, como los carotenoides de colores rosados, incluye un grupo heterogéneo de hongos con diversas características, como la resistencia a metales pesados, al estrés oxidativo, la producción de enzimas y carotenoides (Nunes *et al.*, 2013; Gharaghani *et al.*, 2020; Oreamuno-Fonseca y Umaña-Rojas, 2023; Idris *et al.*, 2023; Zavala-Aranda, 2023). Idris *et al.*, 2023, demostraron que la pigmentación de *Rhodotorula mucilaginosa* es importante para su supervivencia y la resistencia, ya que, al haber una inhibición reversible de la pigmentación y despigmentación por Naftifina (agente antifúngico de alilamina sintética), *R. mucilaginosa* mostró una menor supervivencia y crecimiento ante condiciones adversas, como la resistencia al calor y ciertos químicos. Se consideraban tradicionalmente saprófitos no virulentos y microorganismos contaminantes comunes. No

obstante, en las últimas dos décadas, estas levaduras han surgido como patógenos oportunistas (Nunes *et al.*, 2013; Gharaghani *et al.*, 2020; Idris *et al.*, 2023). Esta especie de levaduras, entre otras, pueden erradicarse por calor o mediante tratamientos de alta presión y baja temperatura que tienen aplicaciones como alternativa al calor en la esterilización de alimentos; también pueden prevenirse utilizando conservadores químicos como los ácidos débiles y el dióxido de azufre (Walker y Van-Dijck, 2006).

8. Conclusiones

La adición de la cáscara de *Physalis* spp. al pulque inhibe el crecimiento de cierto grupo de levaduras. A partir de los resultados obtenidos del actual estudio, se puede confirmar que la adición de la cáscara de *Physalis* spp. a las diferentes muestras de pulque tiene un efecto sobre los parámetros fisicoquímicos, en las UFC/mL y en la diversidad macro-morfológica. El presente estudio es una aportación para sentar las bases científicas del uso empírico, tradicional de la cáscara de *Physalis* spp. como método de preservación, lo que permite prolongar la vida de anaquel y conservar la calidad del pulque por un mayor tiempo.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAM-X), por impulsar mi desarrollo en el conocimiento. Al laboratorio de Micromicetos, del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBUNAM), por facilitar sus instalaciones para realizar este estudio.

Agradezco al Dr. César I. Ojeda Linares y a la Dra. Patricia E. Lappe-Oliveras y a la Dra. María Teresa Núñez Cardona por tutoría ante esta investigación. Principalmente al Dr. César I. Ojeda Linares, por compartir su conocimiento en todo momento, además de brindarme gran apoyo siempre que lo necesité. También agradezco la participación del Maestro en Ciencias Rodrigo Arredondo-Fernández por su apoyo técnico. A mis padres por proporcionándome su apoyo y cariño incondicionales.

9. Referencias

- Alcaciega-Farinango, A.E., y Pazmiño-Salazar, M.E. (2022). Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de uvilla (*Physalis peruviana*) y diente de león (*Taraxacum officinale*) en una formulación para desinfección de alimentos. Universidad Politécnica Salesiana. Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. pp 85.
- Alfaro-Rojas, G., Legaria-Solano, J., y Rodríguez-Pérez, J. (2007). Diversidad genética en poblaciones de agave pulquero (*Agave* spp.) del nororiente del Estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30(1):1-12.
- Arroyo-Cruz, C., y Reynoso-Ocampo, C. (2016). Efecto de las bajas temperaturas en las características fisicoquímicas del pulque (*Agave salmiana* Xamini). *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 3(6):19-24.
- Akhtyamova, N., y Sattarova, R. K. (2013). Endophytic yeast *Rhodotorula rubra* strain TG-1: antagonistic and plant protection activities. *Biochem Physiol*. 2(1):104. DOI: <https://doi.org/10.4172/2168-9652.1000104>
- Ballesteros-Rodríguez, E., y Sánchez-Teyer, L.F. (2021). El pulque: probiótico ancestral. *Elementos*, 28(121):3-6.
- Campos-Pastelin, J.M., Gonzáles-Montiel, L., Victoriano-Juárez, E., y Aguilar-Uscanga, M.G. (2019). Capítulo 8. Aprovechamiento de la cáscara de tomate verde (*Physalis ixocarpa*) para obtención de componentes antimicrobianos. Construcción de conocimiento multidisciplinario a partir de la educación y el emprendimiento. Universidad del Papaloapan. Educación Superior/Libros Universitarios. México. pp 127 - 140.
- Campos-Pastelin, J.M., Victoriano-Juárez, E., González-Montiel, L., y Altairano-Fortoul, R. (2019). Evaluación antimicrobiana del extracto hexánico del cáliz acrescente de *Physalis ixocarpa*. Investigación y Desarrollo en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad de la Cañada, Instituto de Farmacobiología. 4. pp 5. Obtenido de: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/2/30.pdf>
- Casas-Acevedo, A., Aguilar-González, C., De la Garza-Toledo, H., Morlett-Chávez, J., Montet, D., y Rodríguez-Herrera, R. (2015). Importancia de las levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación de bebidas alcohólicas. *Investigación y Ciencia*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 23(65):73-79.

- Cervantes-Contreras, M., y Pedroza-Rodríguez, A.M. (2007). El Pulque: Características Microbiológicas y Contenido Alcohólico Mediante Espectroscopia Raman. *Nova*. 5(8):135-146. DOI: <https://doi.org/10.22490/24629448.382>
- Colunga-García Marín, P., Zizumbo-Villarreal, D., y Martínez-Torres, J. (2007). Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural. pp 229-248. *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. Mérida, Yucatán, México. Sistema de Centros Públicos de Investigación del CONACYT. DOI: <https://doi.org/10.22490/24629448.382>
- CONABIO. (2020). Qué nos aportan los tomates verdes. Recuperado en diciembre de 2023. Obtenido de Biodiversidad mexicana. CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad): https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/que-nos-aportan/N_tomates
- CONABIO. (2021). Qué nos aportan los agaves. Recuperado en noviembre de 2023. Obtenido de Biodiversidad mexicana. CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad): https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/que-nos-aportan/N_agaves
- Cortazar-Martínez, A., Gómez-Rodríguez, T., y Ortíz-Yescas, G. (2021). Capítulo 6. Tecnología del frío aplicada a la conservación de un producto artesanal del Estado de Hidalgo (pulque). pp 39-43. *Convergencia de la ciencia: una visión multidisciplinaria. “La tecnología y su injerencia ante los retos del 2021”*. Escuela Superior Tizayuca. Editorial CCAT (Colegio de Ciencias y Artes de Tabasco).
- Diya S., Karnelia, P., Chinmay S., Gairik M., Mayurakshi N., Samrat, G., Abhisek, D., Anindita, S., y Sucheta, T. (2019). A unique life-strategy of an endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* JGTA-S1—a comparative genomics viewpoint. *DNA Research*. 26(2):131-146 DOI: <https://doi.org/10.1093/dnares/dsy044>
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., La Torre, A.C., y Weigend, M. (2012). Hoja botánica: Aguaymanto (*Physalis peruviana* L.). Giacomotti Comunicación Gráfica S.A.C. D38/08-17. Lima, Perú. Primera Edición. DOI: <http://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/188>
- Ferrari, A., Vinderola, G., y Weill, R. (2020). Alimentos fermentados: microbiología, nutrición, salud y cultura. Capítulo 12. *El Papel de los Alimentos Fermentados en la Alimentación*. 1a. ed.

Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto de Danone del Cono Sur. pp 323-335. ISBN 978-987-15312-2-5.

- Filippi, D., Rodrigues, L.B., Priamo, W.L., Chiomento, J.L.T., y Friedrich, M.T. (2020). Phenolic compounds in fisalis (*Physalis peruviana* Linneus) extracts and action of the extracts on the phytopathogen *Botrytis cinerea* Pers. *Brazilian Journal of Development*. 6(10):78370-78385.
- Flores-González, B. (2019). Rendimiento de especies silvestres de *Physalis* en invernadero y campo abierto en función de la superficie foliar. Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Ciencias Agrícolas. pp 89.
- Flores-Morales, A., Castañeda-Hidalgo, E., Sánchez-Pérez, F.J., Romero-Aguilar, L., y Ruiz-Luna, J. (2009). Mecanismos de conservación y uso del maguey pulquero (*Agave salmiana*) en el altiplano mexicano. *SOMAS AC*.
- Flores-Rodríguez, E., y Mrianda-López, R. (2023). Caracterización fisicoquímica y sensorial del pulque producido en la zona sur del estado de Guanajuato. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 8(1):363-368.
- Gasaly, N., Riveros, K., y Gotteland M. 2020. Fitoquímicos: una nueva clase de prebióticos. *Revista Chilena de Nutrición*. 47(2). pp 317-327. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182020000200317>
- Gharaghani, M., Taghipour, S. y Zarei Mahmoudabadi, A. (2020). Molecular identification, biofilm formation and antifungal susceptibility of *Rhodotorula* spp. *Molecular Biology Reports*. 47(11):8903–8909. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05942-1>
- García-Mendoza, A., Franco-Martínez, I., y Sandoval-Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de *Agave* (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. *Acta Botánica Mexicana* 126.
- González-Pérez, J.E. y Guerrero-Brltrán, J.A. (2021). Tomatillo or husk tomato (*Physalis philadelphica* and *Physalis ixocarpa*): A review. *Scientia Horticultutae*. 288, 110306. ISSN 0304-4238. Obtenido de: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423821004131?casa_token=Sv2oQYNquwEAAAAA:61Gcsif8JQND0ewlGsNpTWyR1EAjQSlrSvq_8T26ywYB8J8txYO3G6lkPcuCJFiwhlpmN1J8RDEG#bib0030
- Göztok, F., y Zengin, F. (2013). The antimicrobial activity of *Physalis peruviana* L. *Bitlis Eren University Journal of Science and Technology*. 3(1):15-17. DOI: <https://doi.org/10.17678/beuscitech.47134>

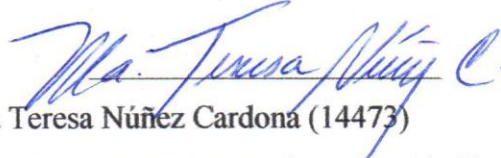
- Helvacı, S., Kökdil, G. Kawai, M. Duran, N., Duran, G. y Güvenç A. (2010). Antimicrobial activity of the extracts and physalin D from *Physalis alkekengi* and evaluation of antioxidant potential of physalin D. *Pharmaceutical Biology*. 48(2):142-150, DOI: <https://doi.org/10.3109/13880200903062606>
- Idris, N.F.B., Jia, Q., Lu, H., Guo, Y., Wang, Y., Hao, R. y Tu, Z. (2023). Reduced survival and resistance of *Rhodotorula mucilaginosa* following inhibition of pigment production by Naftifine. *Curr Microbiol* 80. pp 285. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03388-9>
- Khan, E., Bakht, J. y Kan B.M. 2017. In vitro antifungal, antioxidant and HPLC analysis of the extracts of *Physalis phailadelphica*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 12(3):313-318.
- Martín, H., y Manuel-Ayuso, L. (2023). Las bebidas fermentadas en España. Efectos sobre la salud, pautas de consumo e impacto de la publicidad. (Documento de trabajo). Fundación Alternativas. (217)1. pp. 113.
- Martínez-Madrid, L. (2015). Pulque. Alimentos y bebidas de los pueblos indígenas de México. (Primera ed.). México, D.F. Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas.
- Martínez, M., Pantoja-Hernández, Y., y Herrera-García, A. (2022). Colecta de *Physalis* (Solanaceae) al norte del Trópico de Cáncer. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ciencias Naturales. Informe final SNIB-CONABIO, Proyecto No. RG 002/Proyecto Agrobiodiversidad Mexicana GEF 9380. Ciudad de México. pp 57.
- Matías-Luis, G., Peña-Caballero, V., Reyna-González, W., Domínguez-Díaz, L.R., y Martínez-Hernández, J.J. (2019). Valor nutricional y medicinal del pulque. *JONNPR*, 4(12):1291-1303. DOI: <https://doi.org/10.19230/jonnpr.3148>
- Medina-Mendoza, C., Roldán-Cruz, E.I., y Vázquez-Jahuey, M. (2023). Caracterización fisicoquímica, microbiológica y organoléptica del aguamiel y pulque del Alto Mezquital, Hidalgo. *Agricultura, Sociedad Y Desarrollo*. 19(4). pp. 448–462. DOI: <https://doi.org/10.22231/asyd.v19i4.1412>
- Navarrete-Torres, M., y García Muñoz-Aparicio, C. (2021). El pulque es la bebida de los dioses con valor y tradición milenaria. *Journal of Tourism and Heritage Research*. 4(1):19-36.
- Nieto-Aquino, R., Vargas-Monter, J., Rodríguez-Ortega, A., Jiménez-Pérez, V., Hernández-Callejas, J., y Ortíz-Balderas, M. (2016). El cultivo del maguey pulquero (*Agave salmiana*) en el Valle de Mezquital. Francisco I. Madero, Hidalgo. Universidad Politécnica de Francisco I. Madero.

- Nunes, J.M., Bizerra, F.C., Ferreira, R.C. y Colombo, A.L. (2013). Molecular Identification, Antifungal Susceptibility Profile, and Biofilm Formation of Clinical and Environmental *Rhodotorula* Species Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57(1). pp 382–389. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01647-12>
- Ojeda-Linares, C., Álvarez-Ríos, G.D., Figueredo-Urbina, C.J., Islas, L.A., Lappe-Oliveras, P., Nabhan, G.P., Torres-García, I., Vallejo, M., y Casas, A. (2021). Traditional Fermented Beverages of Mexico: A Biocultural Unseen Foodscape. *Foods*. 10(10),2390. pp 31. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10102390>
- Oreamuno-Fonseca, P., y Umaña-Rojas, G. (2023). Caracterización de levaduras asociadas al moho del pedúnculo de piña en poscosecha. *Agronomía Costarricense*, 47(2). pp 9-22.
- Pérez-Herrera, A., Martínez-Gutiérrez, G.A., León-Martínez, F.M., y Sánchez-Medina, M.A. (2019). The effect of the presence of seeds on the nutraceutical, sensory and rheological properties of *Physalis spp.* fruits jam: a comparative analysis. *Food Chemistry* (125141). pp 29. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125141>
- Piña-Dumoulin, G.J., Peña-Lomelí, A., García-Mateos, M.D.R., Martínez-Damián, M.T., Lozoya-Saldaña, H., y Rodríguez-Pérez, J.E. (2023). Compuestos bioactivos en frutos cultivados y silvestres de *Physalis spp.* *Revista fitotecnica mexicana*. 46(1). pp 11-19.
- Puerta-Quintero, G.I. (2013). Fundamentos del proceso de fermentación en el beneficio del café. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé). Avance Técnico No. 402. ISSN 0120-0178. pp 12.
- Quintero-Salazar, B., Bernáldez-Camiruaga, A.I., Dublán-García, O., Barrera-García, V.D., y Favila-Cisneros, H.J. (2012). Consumo y conocimiento actual de una bebida fermentada tradicional en Ixtapan del Oro, México: la sambumbia. *Alteridades*. 22(44):115-129. Obtenido de: <https://www.scielo.org.mx/pdf/alte/v22n44/v22n44a8.pdf>
- Rivera-Yunga, G.L.A. (2022). Identificación taxonómica de una especie de levaduras, presente en el fruto de joyapa (*Macleania rupestris* (Kunth) A.C.Sm.), con las mejores características para la fermentación alcohólica. Universidad Politécnica Salesiana. Ecuador. pp 70.
- Rodrigues, K.F. (1994). The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*, 86(3):376-385.
- Tamang, J. P., y Kailasapathy, K. (Eds.). (2010). *Fermented foods and beverages of the world*. CRC press. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814887-7.00010-1>

- Torabzadeh, P., y Panahi, P. (2013). Evaluation of Antifungal Activity of *Physalis alkekengi* L. Extracts on *Microsporium canis*, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Nocardia asteroides*. Middle East Journal of Scientific Research, 13(7). pp 926-929.
- Torres-Nieto, M. (2013). El pulque: Un producto turístico gastronómico sustentable. *OPENAIRE*. pp 21.
- Vázquez H.J. y Dacosta O: (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. Ingeniería, Investigación y Tecnología. 8(4). pp 249-259.
- Villalobos, L. (2007). Las bebidas indígenas fermentadas y los patrones de consumo de alcohol de los grupos étnicos. *El Cotidiano*. 22(146). pp 5-11.
- Uriol, D. y Espinoza, M. 2021. Actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de frutos de “aguaymanto” (*Physalis peruviana* L.) y de hojas de “eucalipto” (*Eucalyptus globulus* Labill.) frente a *Staphylococcus aureus*. *Arnaldoa*. 28(1):115-124. DOI: <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.281.28106>
- Wachter-Rodarte, C. (2014). La Biotecnología Alimentaria Antigua: Los Alimentos Fermentados. *RDU. Revista Digital Universitaria* 15(8). pp 14.
- Walker, G.M., y Van-Dijck, P. (2006). Chapter 5. Physiological and molecular responses of yeasts to the environment. pp. 111-152. *Yeasts in food and beverages*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Wayne Rasband. (2023). Image Processing and Analysis in Java (ImageJ). [Software de computación]. <https://imagej.net>
- Zavala-Aranda, S.D. (2023). Producción de carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* en un sistema de fermentación electrostática. Facultad de Química. Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, México. pp 63. Obtenida de: <http://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/4342>

Visto Bueno de los Asesores

ASESORA INTERNA



Dra. María Teresa Núñez Cardona (14473)
Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco
Departamento El Hombre y su Ambiente

ASESOR EXTERNO



Dr. César Iván Ojeda Linares (111603)
Universidad Nacional Autónoma México
Laboratorio de Etnobiología Ecológica, Jardín Botánico, UNAM