

Producción de ácidos orgánicos a partir de acetobacterias aisladas de pulque Organic acids production with acetic bacteria isolated from pulque

T. Romero-Cortes ^a, J.A. Cuervo-Parra ^b, M.M. Armendáriz-Ontiveros ^b, C.G. González-Granillo ^{a,*}

^a Escuela Superior de Apan/Escuela Superior de Ciudad Sahagún, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 43900/43970. Hidalgo, México.

^b Escuela Superior de Apan, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 43900. Hidalgo, México.

Resumen

El pulque es una bebida fermentada tradicional de la cual se han aislado principalmente lactobacilos y levaduras. Sin embargo, en un estado de fermentación avanzado se desarrollan las bacterias ácido acéticas (BAA), las cuales son conocidas por la capacidad de transformar el etanol a ácido acético, y producir otros ácidos orgánicos con diversas aplicaciones industriales. En este estudio, se inocularon muestras de pulque (3-10 días) en medio CARR modificado a 30 °C por 3 días. Las colonias de BAA obtenidas se analizaron e identificaron molecularmente. Las características morfológicas, las micrografías de la microscopía electrónica de barrido (SEM), la oxidación y sobreoxidación observadas en el medio CARR, y la caracterización molecular mostraron que las cepas recuperadas correspondieron a nuevos aislados de la especie *Acetobacter malorum*. Las cepas mostraron una tolerancia al 10-12% de etanol, pero, se detectó mayor producción de ácidos orgánicos con 8-10% de etanol, alcanzando 1.12 ± 0.30 g/L. El análisis por HPLC indicó que *A. malorum* produjo principalmente ácido butírico (37 mg/L). Con estos resultados se observa que los microorganismos presentes en el pulque abren oportunidades para nuevas aplicaciones y/o el desarrollo de tecnologías sustentables

Palabras Clave: *Acetobacter malorum*, ácidos orgánicos, BAA, caracterización molecular, pulque.

Abstract

Pulque is a traditional fermented beverage from which mainly lactobacilli and yeasts have been isolated. However, in an advanced state of fermentation, acetic acid bacteria (AAB) develop. These bacteria are known for their ability to transform ethanol into acetic acid and produce other organic acids with various industrial applications. In this study, pulque samples (3–10 days old) were inoculated in modified CARR medium at 30 °C for 3 days. The obtained AAB colonies were analyzed and molecularly identified. Morphological characteristics, scanning electron microscopy (SEM) micrographs, oxidation and overoxidation observed in the CARR medium, and molecular characterization showed that the recovered strains corresponded to new isolates of the species *Acetobacter malorum*. The strains showed tolerance to 10-12% ethanol, but increased production of organic acids was detected with 8-10% ethanol, reaching 1.12 ± 0.30 g/L. HPLC analysis indicated that *A. malorum* produced mainly butyric acid (37 mg/L). These results show that the microorganisms present in pulque open up opportunities for new applications and/or the development of sustainable technologies.

Keywords: *Acetobacter malorum*, organic acids, AAB, molecular characterization, pulque.

1. Introducción

Las bacterias ácido acéticas (BAA), son microorganismos Gram negativos, que se encuentran principalmente en medios alcohólicos y ácidos (Mamlouk & Gullo, 2013). Las BAA tiene un metabolismo estrictamente aerobio y son reconocidas principalmente por su capacidad de oxidar el etanol en ácido

acético; sin embargo, durante el proceso de oxidación, se liberan otros productos adicionales como; aldehídos, cetonas y ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido isobutírico y ácido butírico; Crotti *et al.*, 2016).

En los últimos años ha crecido el interés por el estudio de los ácidos orgánicos, ya que pueden ser producidos mediante

*Autor para la correspondencia: guadalupe_gonzalez@uaeh.edu.mx

Correo electrónico: romero@uaeh.edu.mx (Teresa Romero-Cortes), alioscha@uaeh.edu.mx, (Jaime Alioscha Cuervo-Parra), maria_armendariz@uaeh.edu.mx (María Magdalena Armendáriz-Ontiveros).



procesos fermentativos, que comprometen mínimamente al ambiente, se obtienen a partir de materiales renovables, y promueven la economía circular al reintegrarlos en la cadena productiva, transformándolos en productos de valor agregado como ácidos orgánicos (Chukwudi *et al.*, 2024; González-Guerra *et al.*, 2025).

Los ácidos orgánicos, tienen diversas aplicaciones relevantes; por ejemplo, el ácido láctico que se utiliza en la industria farmacéutica, como electrolito y fuente de minerales; en la industria cosmética, como antimicrobiano y rejuvenecedor de la piel; así como neutralizante, solvente y agente limpiador en la industria química y en la industria alimentaria como acidulante y preservante (García *et al.*, 2010). Mientras que, el ácido butírico es utilizado en la producción de diversos ésteres que se emplean como aditivos en alimentos, perfumes, saborizantes, barnices, productos farmacéuticos y desinfectantes, en la producción de plásticos y plastificantes (Sjöblom *et al.*, 2016). Existen varias cepas bacterianas productoras de ácido butírico, pertenecientes a los géneros *Clostridium*, *Butyrivibrio*, *Butyribacterium*, *Sarcina*, *Eubacterium*, *Fusobacterium* y *Megasphaera* de los cuales, *Clostridium*, *Butyrivibrio* y *Butyribacterium* son los más utilizados (Xu & Jiang, 2011). En los últimos años ha existido un gran interés por conocer la diversidad y caracterización microbiana del pulque, una bebida fermentada tradicional que usualmente se consume por los beneficios que se le atribuyen por la cantidad de metabolitos presentes (vitaminas, azúcares, aminoácidos, proteínas, prebióticos, entre otros; Fernández-Galicia *et al.*, 2024). En dicha bebida, se han identificado 2855 unidades taxonómicas operativas (UTO) de bacterias y 1494 especies de hongos filamentosos mediante la caracterización molecular de los genes ARNr 16S para bacterias y las regiones genéticas ITS1/5.8S/ITS2 para la identificación de secuencias de ADN de hongos (Rocha-Arriaga *et al.*, 2020), muchos de los cuales han mostrado gran potencial en la producción de metabolitos de interés como el etanol (Silva-López *et al.*, 2025). Por lo tanto, en este trabajo, se procedió a aislar acetobacterias provenientes del pulque caracterizarlas bioquímica y molecularmente, y determinar su capacidad para la producción de ácidos orgánicos.

2. Materiales y métodos

2.1. Obtención de la materia prima

Se obtuvieron muestras de 500 mL de pulque natural maduro (3 a 10 días) de tres corridas de una pulquería con relevo generacional (tres generaciones) ubicada en la localidad de Apan (19°42'36" Latitud Norte y 98°27'07" Longitud Oeste, con 2528 metros sobre el nivel del mar), Hidalgo, México. Cada muestra se depositó en una botella de plástico limpia con tapa de rosca para facilitar su transporte y posterior manipulación en el laboratorio.

2.2. Aislamiento de las BAA

El pulque fue sembrado directamente por estriado en cajas de Petri con medio de cultivo CARR modificado (Expresado en g/L: glucosa 3; extracto de levadura 10; azul de timol; agar bacteriológico 20; CaCO₃ 10 y etanol 17.5 mL/L), dejándose

incubar a 30 °C durante 3 días (Romero-Cortes *et al.*, 2012). Posteriormente, se aislaron aquellas colonias que presentaron un color amarillo y un halo de crecimiento colonial transparente alrededor de las mismas, las cuales se incubaron en medio CARR a 30 °C por 5 días.

2.3. Características morfológicas

Las bacterias acéticas aisladas se tiñeron con tinción de Gram y se observaron con un microscopio óptico (Marca AmScope, Modelo 21021663) con el aumento de 100x y se utilizó el filtro AmScope MD130, incluido en el microscopio para la captura de las imágenes. Para las micrografías, 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, la suspensión bacteriana se filtró a través de un filtro Millipore con un tamaño de poro de 0.22 µm, dejándose secar durante 5 días a 28°C. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio electrónico (Marca JEOL JSM, modelo IT 300) en las instalaciones de la Escuela Superior de Apan de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

2.4. Cinética de crecimiento

Las cinéticas microbianas se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL, cada uno con 100 mL de caldo de papa nutritivo (Expresado en g/L: glucosa 10; extracto de levadura 2 g/L; peptona de caseína 2 g; papa 100 g; glicerol 10 mL/L y etanol 40 mL/L), mantenidos en agitación constante a 120 rpm a temperatura de 30 °C. Transcurridas 20 h de incubación, se tomó el 10% de cada matraz y se inoculó en medios de cultivo nuevos bajo las mismas condiciones. A partir de estas muestras, se realizaron diluciones y se sembraron en caldo de papa nutritivo adicionado con agar. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h, tras lo cual se realizó el recuento de colonias viables. Todo el procedimiento se efectuó por triplicado.

2.5. Caracterización molecular

Las BAA fueron sembradas por duplicado en cajas de Petri con medio CARR y rotuladas con los números de cepa: TRC-B6 y TRC-B7. Las cepas fueron enviadas al Laboratorio de Servicios Genómicos (LabSerGen) del CINVESTAV (Irapuato, Guanajuato, México) donde se realizó la secuenciación de los pares de nucleótidos mediante la técnica de fluorescencia y desarrollo de oligonucleótidos de acuerdo al procedimiento propuesto por Campion & Canul (2004). Las secuencias de ADN obtenidas fueron comparadas mediante alineamiento por pares de secuencias utilizando el programa BLASTN, con secuencias del gen 16S ARNr de otras bacterias disponibles en la base de datos del GenBank del NCBI (Zhang *et al.*, 2000).

Además, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias, considerando secuencias filogenéticas relacionadas (Larkin *et al.*, 2007). A partir de este alineamiento, se construyó un árbol filogenético empleando el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) con soporte estadístico Bootstrap de 1000

repeticiones, utilizando el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

2.6. Determinación indirecta de los ácidos orgánicos

Las BAA se inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de caldo papa. Para determinar la tolerancia al etanol (C_2H_6O) se evaluaron diferentes concentraciones (2, 4, 6, 8, 10 y 12% v/v), a una temperatura de 30 °C 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-Pimienta, 1996).

$$\text{Ácido acético } (g/L) = \frac{mL \text{ gastados de NaOH} \times N \times 60.052}{mL \text{ de muestra}} \quad (1)$$

Donde 60.052 representa el peso molecular del ácido acético.

2.7. Cuantificación de ácidos orgánicos por HPLC

La cuantificación de ácidos orgánicos se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC; modelo Thermo Scientific Finnigan Surveyor), compuesto por una bomba Surveyor (LC Plus), un automuestrador y un detector de índice de refracción (RI Surveyor Plus). Para la separación de la muestra se utilizó una columna cromatografía (modelo Phenomenex ROA Organic Acid 00H-0138-K0; 150 x 7.8 mm) y como fase móvil una solución de ácido sulfúrico (0.005 N) a un flujo constante de 0.6 mL/min. La columna se mantuvo a 60 °C y el detector a 40 °C. Las muestras fueron diluidas en una proporción 1:10 y posteriormente filtradas utilizando filtros de membrana de PTFE (Phenex, 25 mm, poro de 0.45 µm) antes de su inyección al equipo. Las concentraciones de ácidos orgánicos se calcularon a partir de curvas de calibración generadas con mezclas estándar (Sigma-Aldrich) de ácido láctico, ácido acético y ácido isobutírico, con soluciones en un rango de concentración de 2,000 a 8,000 ppm y para el ácido isobutírico, con un intervalo de 250 a 3,000 ppm.

2.8. Conservación por congelación

Las cepas de BAA fueron cultivadas en matraces Erlenmeyer con 100 mL de caldo de papa a 120 rpm e incubadas a 30 °C durante 22 h. Posteriormente, se transfirieron 10 mL del cultivo a un nuevo medio fresco y se mantuvieron a las mismas condiciones. Tras 72 h de incubación, las muestras fueron centrifugadas a 5,000 rpm durante 20 min en tubos falcón de 50 mL. Este procedimiento se repitió hasta obtener el pellet celular. El sobrenadante se decantó, mientras que al pellet se le adicionaron 44 mL de caldo de papa con glicerol al 10% (v/v) como crioprotector. La mezcla fue homogeneizada mediante agitación con vortex durante algunos minutos. Finalmente, se distribuyeron alícuotas de 700 µL en tubos Eppendorf, los cuales fueron almacenados a -20 °C (Thermo Fisher Scientific, modelo HFU600A63), hasta su uso posterior.

3. Resultados y discusión

3.1. Características macroscópicas y microscópicas de las BAA

Las colonias de las acetobacterias (Fig. 1A) fueron reconocidas debido a la solubilidad de $CaCO_3$ en el medio CARR modificado formando un halo transparente alrededor de las colonias y un cambio de color pasando de azul a amarillo por la oxidación del etanol al ácido después de 96 horas (Fig. 1B), y posteriormente retornó al color azul (Fig. 1C) por la oxidación del ácido acético. Lee *et al.* (2024) aislaron 42 cepas puras según el tamaño de las zonas claras formadas alrededor de la colonia y observaron que las características morfológicas de las cepas puras identificadas para el género *Acetobacter* fueron bacilos Gram-negativos, aerobios obligados y con la capacidad de formación de biopelículas.

Sahoo *et al.* (2020) aislaron cepas de acetobacterias provenientes de residuos de manzana y grana empleando medio CARR. Estos cultivos mostraron un cambio de color de verde a amarillo en las primeras 24 h, retornando al color verde después de las 72 h como resultado de una sobreoxidación del ácido acético a CO_2 y H_2O , identificando que las características observadas son propias de las cepas del género *Acetobacter*.

Las características morfológicas observadas bajo microscopio óptico y tinción de Gram mostraron que las colonias aisladas fueron bacilos Gram negativos (Fig. 2A). Mientras que, las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) permitió identificar que las BAA muestran una morfología elipsoidal, aisladas o en pares, sin la presencia de flagelos, lo cual indica que carecen de movilidad (Fig. 2B). Las dimensiones promedio fueron de 0.63 µm de ancho por 1.38 µm de largo, valores ligeramente diferentes a los previamente reportados (0.9 x 1.1-1.3 µm) por Cleenwerck *et al* (2002).

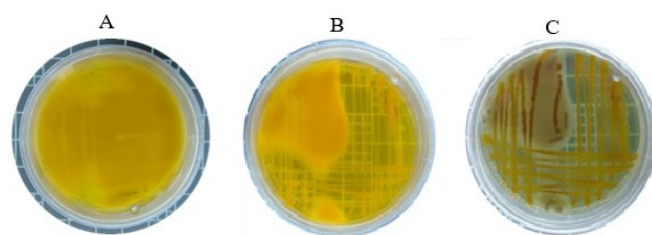


Figura 1: Colonias de BAA en medio CARR modificado (A), solubilización del $CaCO_3$ por la producción de ácidos a las 72 h (B), oxidación de los ácidos a las 168 h (C).

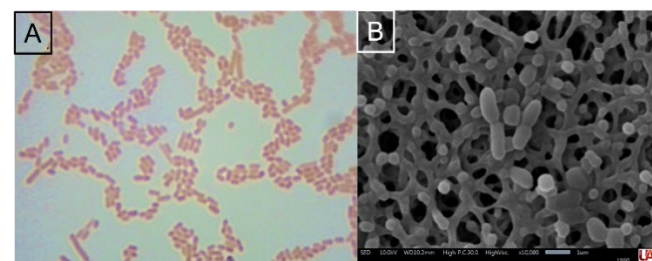


Figura 2: BAA Gram negativa (A). Micrografía de BAA a 10,000x (B).

De acuerdo con las características morfológicas descritas, la tinción de Gram, la oxidación y la sobreoxidación observadas en el medio CARR modificado permitieron

determinar que las colonias aisladas corresponden al género de *Acetobacter* sp.

3.2. Cinética de crecimiento de las BAA aisladas

Para identificar el comportamiento en las diferentes etapas de crecimiento a lo largo del tiempo (latencia, exponencial, estacionaria y de muerte), se construyó la curva de crecimiento de las colonias aisladas de acetobacterias mediante el recuento de colonias viables en placa utilizando caldo de papa. Tal como se muestra en la Fig.3, durante las primeras 6 horas se observó un crecimiento lento y constante, con un promedio de 1.45×10^3 UFC/mL, lo que indica la presencia de una fase de latencia. Este comportamiento podría atribuirse a la transferencia del cultivo desde un medio nutricionalmente rico (caldo de papa nutritivo) hacia un medio más pobre (PDA), generando un retraso en el inicio del crecimiento (Madigan *et al.*, 2015). A las 10 horas, el conteo celular alcanzó un valor de 2.42×10^3 UFC/mL.

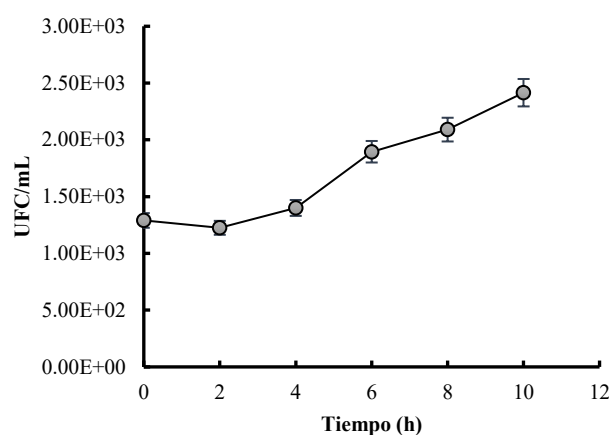


Figura 3: Cinética de crecimiento de *A. malorum*.

El cálculo de la velocidad específica de crecimiento arrojó un valor de $0.0879 \pm 0.0095 \text{ h}^{-1}$ a 30°C (Fig. 4). La velocidad de crecimiento está directamente relacionada con la velocidad de acetificación (Davies, 2015). Este resultado es congruente con los datos reportados por De Ory *et al.* (1998), quienes documentaron valores de $0.0584 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$ a 25°C y $0.0944 \pm 0.04 \text{ h}^{-1}$ a 30°C , lo cual indica que el valor obtenido en este estudio se encuentra dentro del intervalo previamente descrito.

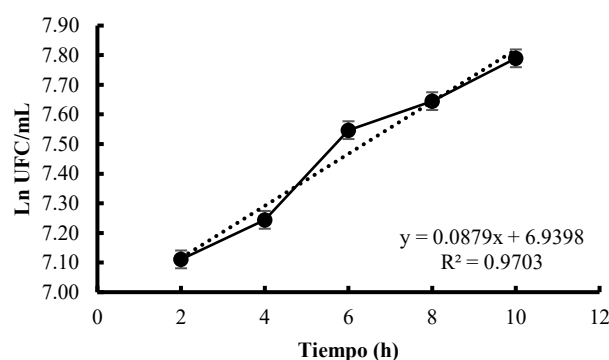


Figura 4: Velocidad específica de crecimiento acumulado de *A. malorum*.

3.3. Caracterización molecular de las BAA aisladas

Se caracterizaron dos secuencias nuevas de nucleótidos de BAA (TRC-B6 y TRC-B7) aisladas de pulque. La amplificación se realizó utilizando los cebadores 27F y 1525R (Menasria *et al.*, 2024). Los fragmentos amplificados tuvieron longitudes de 1,472 y 1,478 pb, y fueron depositados en la base de datos del GenBank con los números de acceso PP377884 y PP377885, respectivamente. Las secuencias obtenidas se compararon mediante el programa BLAST (v2.15.0) con secuencias de *Acetobacter* depositadas en el GenBank (Zhang *et al.*, 2000), mostrando una similitud del 99.86% y 99.87% con la cepa *A. malorum* EW-m con el número de acceso EU096228 aislada de *Drosophila* (Ryu *et al.*, 2008).

Posteriormente, se realizó un análisis filogenético generando un árbol por el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) con el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) con el soporte del método estadístico bootstrap, usando 1000 repeticiones, incluyendo 19 secuencias representativas del género *Acetobacter* y usando la secuencia de *Bacillus subtilis* (KM659218) como grupo externo. El árbol filogenético (Fig. 5) reveló tres clados principales (I, II, III). Las secuencias TRC-B6 y TRC-B7 se agruparon en el clado I junto con cepas de *A. malorum* (EU096228, JN004205 y DQ523495) provenientes de *Drosophila* (Ryu *et al.*, 2008; Barata *et al.*, 2011), y de cacao fermentado (Nielsen *et al.*, 2007). Confirmando la identificación morfológica previa de las cepas como nuevos aislamientos de *A. malorum* para México.

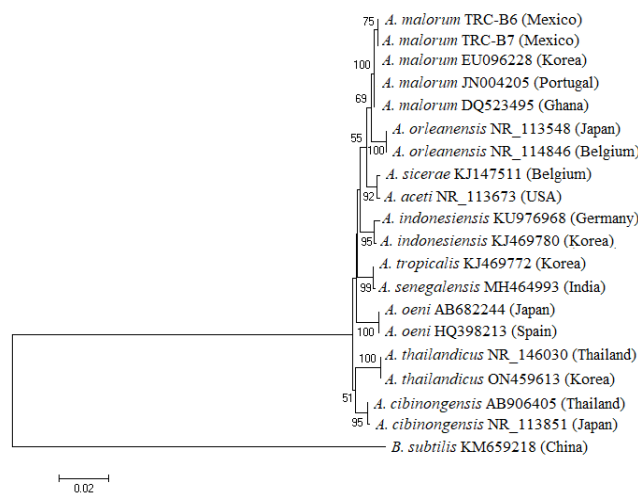


Figura 5: Análisis filogenético realizado para las cepas de *A. malorum* mediante el método Neighbor-Joining basado en la alineación del ARNr 16S.

3.4. Tolerancia de A. malorum al etanol

Las cepas de *A. malorum* fueron capaces de crecer cuando la concentración de etanol superó el 10-12% (v/v). Sin embargo, se observó una mayor producción de ácido con 8 y 10% de etanol ($1.12 \pm 0.30 \text{ g/L}$), a diferencia del 12% ($0.97 \pm 0.30 \text{ g/L}$) que mostró una disminución en la producción de ácido (Fig. 6). Lee *et al.* (2024), observaron tasas de crecimiento superior al 100% en concentraciones de etanol de 8-10% en cepas de *A. pasteurianus* (SFT-2, 13, 14 y 17), *A.*

orientalis (SFT-10), *A. cibinongensis* (SFT-12), *A. pomorum* (SFT-32) y *Gluconobacter oxydans* (SFT-26 y 27), lo que indicó una alta tolerancia al alcohol. En otro trabajo, Es-sbata *et al.* (2021) reportan que *A. malorum* mostró tolerancia a la mayor concentración de etanol (12%) pero una baja producción de ácido acético.

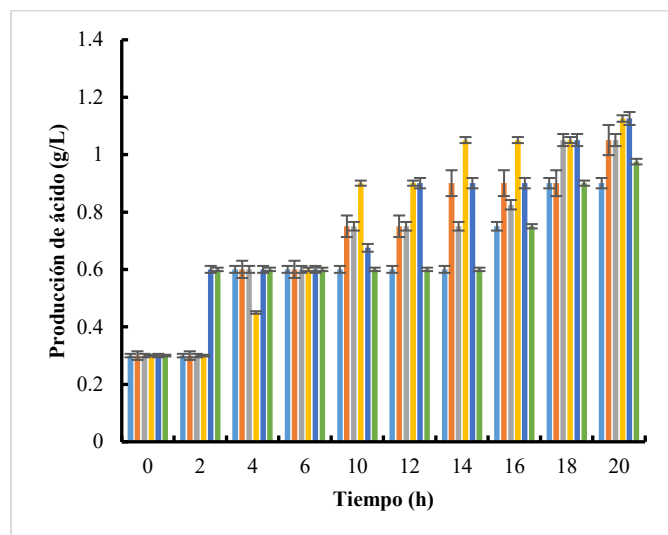


Figura 6: Producción de ácido a diferentes concentraciones de etanol. 2% (■), 4% (■), 6% (■), 8% (■), 10% (■) y 12% (■).

3.5. Cuantificación de ácidos orgánicos por HPLC

El análisis de los sobrenadantes de las muestras provenientes de fermentaciones con distintos porcentajes de etanol (6, 8 y 10%), realizado mediante HPLC y con la inclusión de controles internos, evidenció que las cepas caracterizadas de *A. malorum* poseen la capacidad de producir otros ácidos diferentes al ácido acético (Fig. 7).

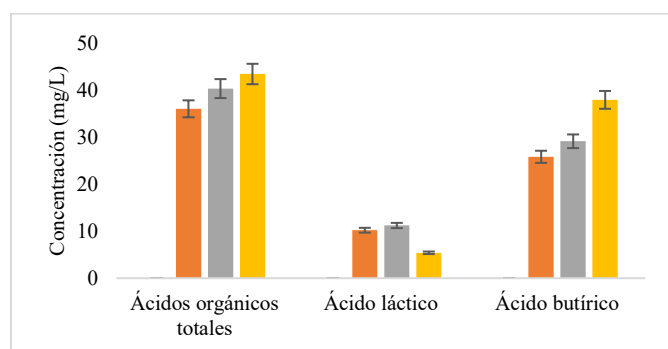


Figura 7. Producción de ácidos orgánicos por *A. malorum* a diferentes concentraciones de etanol, Testigo (■), 6% (■), 8% (■), 10% (■).

Es-sbata *et al.* (2022) reportaron que el vinagre producido por *A. malorum* presentó una mayor concentración de ácido butírico y de otros compuestos volátiles en comparación con el producido por *Gluconobacter oxydans*.

3.6. Viabilidad de *A. malorum*

La conservación por congelación de *A. malorum* se realizó empleando glicerol al 10% como agente crioprotector. Las

cepas TRC-B6 y TRC-B7 fueron almacenadas en tubos Eppendorf a una temperatura de -20°C y posteriormente a -86°C , y su viabilidad fue evaluada transcurridos los 90 días. Posteriormente, las cepas recuperadas conservaron su capacidad para crecer en medio CARR modificado y pudieron solubilizar CaCO_3 . Sin embargo, no realizaron una irisación completa del medio (Fig. 7). De acuerdo con Gherna (2010), no se recomienda la congelación lenta a -20°C para preservar células, ya que esta temperatura puede causar daños estructurales que afecten su viabilidad. Además, sugiere emplear glicerol al 15% para células en general.

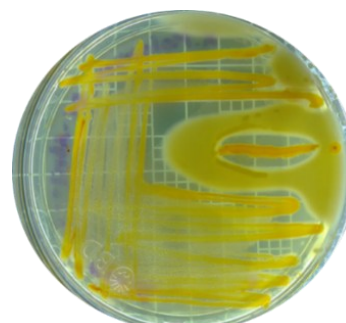


Figura 7: Crecimiento de *A. malorum* en medio CARR después de ser conservada por congelada y almacenada a -20°C .

4. Conclusiones

El pulque es una bebida fermentada tradicional que usualmente se consume por los beneficios que se les atribuye a los diversos microorganismos presentes. En este estudio se resalta la identificación bioquímica y molecular de *Acetobacter malorum*, así como su capacidad para producir ácidos orgánicos (ácido láctico, ácidos isobutírico y ácido butírico) diferentes al ácido acético, incluso en presencia de altas concentraciones de etanol. Sin embargo, se requiere profundizar en las vías metabólicas y ajustar variables durante el crecimiento de *A. malorum* para determinar si la producción de estos ácidos orgánicos es la óptima. Los resultados aquí descritos muestran la importancia de conocer la diversidad microbiana de dicha bebida para darle un aprovechamiento racional y la apertura para el desarrollo de nuevos metabolitos y/o desarrollo de tecnologías sustentables.

Referencias

- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. & Loureiro, V. (2011). The role of *Drosophila* sp. in the development of sour rot grape disease. Consultado [02/06/2025]. En línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JN004205>
- Bozzola, J. J. (2013). Conventional Specimen Preparation Techniques for Scanning Electron Microscopy of Biological Specimens. In: Kuo, J. (Ed.), *Electron Microscopy: Methods and Protocols*. Vol. 1117. Humana Press. Totowa, New Jersey, EE. UU. Ch. 7, 133-150 pp.
- Campion, R. & Canul, J. C. (2004). Métodos físico-químicos en biotecnología: secuenciación de ácidos nucleicos. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de México. Cuernavaca NOR. 47 pp.
- 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.
- Chukwudi, P., Umeugokwe, P. I., Ike, N. E. & Amaefule, B. C. (2024). The effects of organic acids on broiler chicken nutrition: A review. *Animal Research and One Health*. 3(1), 43-53.

- 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*. Vol I. Springer, EE. UU., Ch. 5, pp. 121-142.
- Davies C. V. 2015. Estudio de los procesos biotecnológicos de acetificación para la producción de vinagre de naranja y vinagre de arándanos. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 189-193.
- Escalante, A., López, S. D. R., Velázquez, G. J. E., Giles-Gómez, M., Bolívar, F. & López-Munguía, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1026.
- Es-sbata, I., Castro, R., Durán-Guerrero, E., Zouhair, R. & Astola, A. (2022). Production of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) vinegar in submerged culture using *Acetobacter malorum* and *Gluconobacter oxydans*: Study of volatile and polyphenolic composition. *Food Composition and Analysis*, 112.
- Es-sbata, I., Lakhli, 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.
- Fernández-Galicia, Y. V., Sagamaga-Villegas, L. M., Salas-González, J. M., & Portillo-Vázquez, M. (2024). El pulque: una perspectiva desde los agronegocios. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 15(7), e3380. <https://doi.org/10.29312/remexca.v15i7.3380>.
- García, C. A., Arrázola, G. S. & Durango, A. M. (2010). Producción de ácido láctico por vía biotecnológica. *Temas Agrarios*, 15(2), 9-26.
- Gherna, R. L. (2010). Culture Preservation. In M. C. Flickinger (Ed.), *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. Vol. VII. John Wiley & Sons Inc., New York, pp. 1-18.
- González-Guerra, G. M., Gómez-Castro, F. I., Villagómez-Ibarra, J., Martínez-Cortés, O. I., Gamiño-Arroyo, Z., Hernández, S. & García-García, J. C. (2025). Ácidos orgánicos y su importancia en el desarrollo sostenible. *Digital Ciencia@uaqro*, 18(1), 9-34.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547–1549.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., López, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- Lee, D.-H., Kim, S.-H., Lee, C.-Y., Jo, H.-W., Lee, W.-H., Kim, E.-H., Choi, B.-K., & Huh, C.-K. (2024). Screening of Acetic Acid Bacteria Isolated from Various Sources for Use in Kombucha Production. *Fermentation*, 10(1), 18. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010018>.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. & Stahl, D. (2015). *Biología de los microorganismos*. Pearson. Londres, Reino Unido.
- Mamlouk, D. & Gullo, M. (2013). Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53, 377-384.
- Menasria, T., Monteoliva-Sánchez, M. & Benenmar, M. (2024). Culturable halophilic bacteria inhabiting Algerian saline ecosystems: a source of promising features and potentialities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 132.
- Nielsen, D. S., Teniola, O. D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T. S. & Holzapfel, H. (2007). The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analyzed using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 114(2), 168-186.
- Nuño-Pimienta, R. M. (1996). Optimización de pH y agitación de para el crecimiento de *Acetobacter aceti* empleando la metodología de superficie de respuesta. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. 108 pp.
- Rocha-Arriaga, C., Espinal-Centeno, A., Martínez-Sánchez, S., Caballero-Pérez, J., Alcaraz, L. D. & Cruz-Ramírez, A. (2020). Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a biocultural resource of Mexico. *Microbiological Research*, 241, 126593.
- Romero-Cortes, T., Robles-Olvera, V., Rodríguez-Jiménez, 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.
- Sahoo, B. K., Mishra, R. R. & Behera, B. C. (2020). Isolation and identification of thermotolerant acetic bacteria from waste fruits. *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, 9(2), 209-2013.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Silva-López, N. L., Martínez-Hernández, S., & Figueredo-Urbina, C. J. (2025). Microorganismos asociados al aguamiel en el agave pulquero en Hidalgo, México. *Padi Boletín Científico De Ciencias Básicas E Ingenierías Del ICBI*, 12(24), 92–101. <https://doi.org/10.29057/icbi.v12i24.12206>
- 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.
- Xu, Z. & Jiang, L. 2011. capítulo 20. Butyric Acid. In: Moreira A. & Bai F. (Eds) *Comprehensive Biotechnology* (pp. 235-243) Pergamon.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, I. & Miller, W. A. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(2), 2013-214.