



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la diversidad microbiana y su inferencia funcional durante el proceso de fermentación del pulque para la propuesta de una microbiota central de esta bebida.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en Biociencias Fernando Astudillo Melgar

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Adrián Ochoa Leyva
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dr. Samuel Canizales Quinteros
[Facultad de Química, UNAM; INMEGEN](#)

Cuernavaca, Morelos, noviembre, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



CGEP/PMDCBQ/109C
7B72A0-64E7A35650ED€
Asunto: Jurado de examen

ASTUDILLO MELGAR FERNANDO
Estudiante de Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **23 de agosto de 2023**, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Doctor en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Análisis de la diversidad microbiana y su inferencia funcional durante el proceso de fermentación del pulque para la propuesta de un microbioma central de esta bebida.**", dirigida por el/la Dr(a). **ESCALANTE LOZADA JOSÉ ADELFO**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

LÓPEZ MUNGUIA CANALES AGUSTÍN	PRESIDENTE
FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA AMELIA	SECRETARIA
MARTINEZ ROMERO ESPERANZA	VOCAL
TORRES Y TORRES NIMBE	VOCAL
RUIZ TERÁN FRANCISCO	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 24 de agosto de 2023

Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica y Biología Sintética de Microorganismos (IMBSM) y el Laboratorio de Ingeniería y Tecnología de Enzimas en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Bajo la dirección de:

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

El comité tutorial:

Dr. Adrián Ochoa Leyva

Dr. Samuel Canizales Quinteros

El apoyo técnico:

M.C. Georgina Teresa Hernández Chávez

Q.I. Luz María Martínez Mejía

Dra. Noemí Flores Mejía

C.P. Rubí Margarita Robledo López

M.C. María Elena Rodríguez Alegría

Los estudios de doctorado se realizaron con el apoyo económico de una beca expedida por CONAHCyT (CVU: 746198), además de contar con un apoyo de los proyectos PAPIIT IN211420 e IN227023.

DEDICATORIA.

Dedico esta tesis principalmente a mis padres los cuales han sido y serán mis dos pilares principales. A mi papá, el cual ahora es una estrella en el cielo, le agradezco su cuidado, apoyo y consejos los cuales me han permitido desarrollarme en la vida, además de brindarme un apoyo incondicional a estudiar un posgrado. A mi mamá, la cual siempre me ha cuidado, me ha brindado mucho cariño, comprensión y consuelo en esos momentos difíciles que uno tiene. No me cansaré en agradecerles por sus sacrificios y lucha por brindarme una buena educación y valores los admiro y amo con todo el corazón.

A mis hermanas, mi hermano, mi cuñada, mi cuñado y mis sobrinos. Gracias por todo el apoyo brindado, los consejos, los ánimos y los abrazos que me llenaron y llenan de energía para seguir adelante, los momentos que se preocupaban junto conmigo y por muchas cosas más, gracias.

A mis tíos, mi abuelita y mi prima. Durante mi estancia en Morelos han estado pendiente de mí, sus ánimos, consejos, y mucho más. Toda la energía que a uno le hace falta cuando está lejos del hogar base. Gracias.

Tantas experiencias y situaciones me han hecho valorar mucho a mi familia la cual quiero con todo el corazón.

Fernando Astudillo Melgar.

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Adelfo. Agradezco su confianza, sus consejos, la convivencia, los momentos de risa y especialmente por toda la enseñanza recibida durante mi periodo del doctorado, he podido conocerlo y admirarlo tanto profesionalmente como personalmente, me apoyó mucho en momentos cruciales por lo que le estoy enormemente agradecido.

A mi comité tutorial, Dr. Adrián y Dr. Samuel, que durante todo mi doctorado ayudaron al mejoramiento y desarrollo del proyecto, con sus consejos, observaciones, ánimos y apoyo. Muchas gracias.

A mi jurado de examen, Dra. Amelia, Dr. Agustín, Dra. Esperanza, Dra. Nimbe y Dr. Francisco. Desde que entré al doctorado algunos de ustedes estuvieron en ese jurado de ingreso y confiaron en el proyecto y en mí, además, en esta etapa me han ayudado a pulir los detalles con sus observaciones y sugerencias. Gracias.

El apoyo técnico de la M.C Georgina Hernández, por su apoyo en las técnicas de HPLC y UPLC. A la Q.I. Luz María Martínez, por el apoyo en el área de biología molecular. A la Dra. Noemí Flores, por su apoyo en el área de oligos y biología molecular. A la C.P. Rubí Robledo por la ayuda en el área administrativa. A la M.C. María Elena Rodríguez, por su apoyo en el uso de HPAEC. Al T.L. Fernando González, por su asesoría en el HPLC.

A los doctores que integran el consorcio del laboratorio de Ingeniería Metabólica y Biología Sintética de Microorganismos Dr. Francisco Bolívar, Dr. Guillermo Gosset, Dr. Alfredo Martínez y Dr. Luis Caspeta. Por todo su apoyo y consejos que ayudaron al mejoramiento del proyecto.

Al área de docencia, al Lic. J. Antonio Bolaños, Gloria Villa y la M.C. Lidia Judith Martínez. Por todo su apoyo en agilizar y facilitar los procesos administrativos y escolares para los alumnos, su apoyo es invaluable, muchas gracias.

Al área administrativa, a la C.P. Jaqueline Juárez y María Antonia Gama por estar pendientes y facilitar varios procesos, que sin su apoyo serían muy complejos de desarrollar.

Al Dr. Adelfo y la Maestra Martha. Estoy enormemente agradecido por su apoyo, en muchos aspectos, el conocerlos más allá de forma profesional me ha generado una gran admiración hacia ustedes, muchas gracias por los buenos momentos compartidos, principalmente los congresos, las pláticas y los ánimos, han sido muy valorados, muchas gracias.

Al Dr. Luis, muchas gracias por todas las pláticas de viernes existencial, su ayuda y consejos sobre cualquier tema, tanto académico como personal.

Al Dr. Alfredo, es una persona que ya admiraba y aún no tenía el gusto de conocerlo y cuando tuve la oportunidad de conocerlo lo admiré más, muchas gracias por sus consejos, los momentos de risa y todos las sugerencias que siempre tuvo en bien de darme.

Al Dr. Guillermo, gracias por el apoyo que me ha brindado, sus sugerencias, los ánimos y consejos de seguir en esta área.

Al Dr. Francisco, que siempre apoyó mi proyecto, así como a mi persona, por cuestiones diversas me hubiera gustado convivir más con usted, pero con lo poco que pude tratarlo la admiración que le tengo es mucha.

A Geo y Luzma, por todos los momentos vividos, por las pláticas en el cuarto del HPLC, las pláticas vespertinas, los consejos, los ánimos, los apapachos y por muchas cosas más, su presencia ha sido muy importante en el desarrollo de mi persona tanto profesionalmente como personalmente, les estoy muy agradecido.

A Rubí, que desde el día que llegué al laboratorio me brindó su amistad y confianza, muchos momentos de risa y muchos consejos y apapachos.

A la Dra. Noemí, por las pláticas y momentos compartidos sobre las ideas de desarrollo sustentable, puertas abiertas, entre tantos más.

Al Sr. Manuel, muchas gracias por todos los momentos de risa, las pláticas, su amabilidad y apoyo para muchas cosas.

A la Sra. Aure, estoy enormemente agradecido por todo ese cariño que me ha demostrado, el cual es mutuo, todo su apoyo y ánimo que siempre me ha brindado.

A los integrantes del laboratorio del Dr. Agustín López, muchas gracias por haberme recibido siempre con mucha hospitalidad, me apoyaron y ayudaron en muchas cosas, gracias por los momentos de pláticas, de risas, de desahogo, de muchas experiencias vividas, sobre todo por su amistad, muchas gracias, Maestra Male, Doña Au, Fer, Criss, Sol, Razz, Kari, Silvia, Beto, Raúl, Jazz, Pedro y por supuesto al Dr. Agustín.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, los que están y los que ya se titularon pero formaron parte del desarrollo de mi trabajo de doctorado, no sólo como apoyo académico sino por las convivencias, los saludos, las risas y muchos momentos vividos. Fidel, Ángeles, Caheri, Eliseo, Fabián, Rubén, Daniel, Tlaka, Karla, Paty, Mabel, Alma, Alison, Dulce, Nacho, Juan Carlos, Carlitos, Francisco, Estefa, Richi, Norman, León, Fili, Ross, Mariela, Mariana, Mitzy, Angelica, Nadia, Omar, Lulú, Jaime, Esmeralda, Naty, Irving, Frances, Julián, Emiliano, May.

A mi gran amiga Angélica, que siempre me ha brindado tanto apoyo, desde el momento que nos conocimos has sido una persona maravillosa, me has permitido conocer tu ternura, cariño, entrega y sobre todo tu amistad incondicional, muchas gracias por TODO ♥.

A mi amiga Nadia, que después de todas las aventuras e indecisiones nuestra amistad se fue reforzando cada vez más, muchas gracias por todo, eres una gran persona.

A mis amigos Richi, Norman, Juan Carlos, León, Razz Carlitos, Fabián, Dani, Rubens y Caheri. Su presencia en mi vida ha sido muy grata, llena de muchas enseñanzas, aventuras y alegrías. A mis amigas, Mariela, Lulú, Mitzy, Esme y Estefa. Sus consejos, apapachos y compañía han sido muy importantes para mí, las estimo mucho.

Al Dr. Gerardo Huerta, a la M.C. Daysi, muchas gracias por siempre impulsarme a seguir echándole ganas, por mostrar su cariño hacia mi persona y mi familia, son parte importante de mi desarrollo académico y personal. Muchas gracias, por tanto.

Serán muchos agradecimientos, pero considero que parte de la formación como personas es agradecer y reconocer que el desarrollo exitoso de un proyecto es por la persona que lo realiza, pero también de las personas que nos apoyan, nos rodean y nos brindan su amistad.

Atte. Fernando Astudillo Melgar

ÍNDICE GENERAL.

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
2.1.	Fermentación en alimentos.....	2
2.1.1.	Clasificación de los productos fermentados.....	2
2.2.	Pulque.....	3
2.2.1.	Proceso de elaboración.....	4
2.2.2.	Características.....	5
2.3.	Importancia de la diversidad microbiana.....	6
3.	ANTECEDENTES.....	7
3.1.	Pulque.....	7
3.2.	Magueyes pulqueros.....	12
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
5.	JUSTIFICACIÓN.....	14
6.	HIPÓTESIS.....	15
7.	OBJETIVOS.....	15
7.1.	Objetivo general.....	15
7.2.	Objetivos específicos.....	15
8.	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
8.1.	Diagrama de trabajo.....	18
8.2.	Materiales y métodos.....	19
8.2.1.	Colecta y manejo de muestra.....	19
8.2.2.	Fermentación controlada.....	19
8.2.3.	Composición metabólica de azúcares y ácidos orgánicos del proceso del proceso de fermentación del pulque.....	20
8.2.4.	Extracción de ADN.....	20
8.2.5.	Generación de librerías genómicas.....	21
8.2.6.	Secuenciación.....	22
8.2.7.	Análisis bioinformático.....	22
8.2.8.	Análisis de diversidad y estadísticos.....	22
8.2.9.	Establecimiento de la microbiota central (<i>core</i>) del proceso de fermentación del pulque.....	23
9.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
9.1.	Primera parte: ¿Existe una microbiota central?.....	24
9.1.1.	Muestreo y fermentación.....	24
9.1.2.	Caracterización de parámetros físicos y metabólicos.....	26
9.1.3.	Asignación taxonómica y análisis de diversidad.....	31
9.2.	Segunda parte: ¿Qué tan estable es el <i>core</i> ?.....	37
9.2.1.	Muestreo y fermentación.....	37
9.2.2.	Caracterización de parámetros físicos y metabólicos.....	38
9.2.3.	Asignación taxonómica y análisis de diversidad.....	44
9.3.	Tercera parte: Inferencia funcional del core durante el proceso de fermentación.....	52
10.	CONCLUSIONES.....	57
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
12.	ANEXOS.....	64
13.	PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA Y ACADÉMICA.....	76
14.	EPÍLOGO.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Proceso de elaboración del pulque.	5
Figura 2. Zona de muestreo.	24
Figura 3. Muestras de aguamiel, pulque, metzal y fermentación.	26
Figura 4. Parámetros físicos de la fermentación.	28
Figura 5. Características metabólicas de la fermentación.	29
Figura 6. Identificación de fructooligosacáridos mediante HPAEC-PAD en metzal, aguamiel, tiempos de fermentación y pulque.	30
Figura 7. Identificación taxonómica de bacterias.	32
Figura 8. Identificación taxonómica de hongos.	34
Figura 9. Beta diversidad.	35
Figura 10. Dinámica de las poblaciones del core de bacterias y hongos en las muestras de pulque.	36
Figura 11. Parámetros físicos de la fermentación a través del año.	38
Figura 12. Sólidos totales, biomasa y cenizas de los cuatro muestreos a través del año.	40
Figura 13. Concentración de carbohidratos a través del año.	41
Figura 14. Concentración de ácidos orgánicos y etanol a través del año.	42
Figura 15. Perfil de fructooligosacáridos a través del año en metzal, aguamiel, pulque y durante 6 horas de fermentación.	44
Figura 16. Diversidad bacteriana en cada etapa de la fermentación del pulque para cada muestreo.	47
Figura 17. Diversidad de hongos en cada etapa de la fermentación del pulque para cada muestreo.	48
Figura 18. Beta diversidad de los cuatro muestreos.	49
Figura 19. Alfa diversidad de bacterias y hongos de los 4 muestreos.	50
Figura 20. Dinámica de las poblaciones del core de bacterias y hongos conservados a través de los cuatro muestreos.	51
Figura 21. Esquema de las principales vías metabólicas del <i>core</i> microbiano.	54
Figura 22. Correlación de Spearman entre los metabolitos cuantificados y el <i>core</i>	55

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Microorganismos más abundantes de los trabajos “ómicos” de aguamiel y pulque.	11
Tabla 2. Número de muestras analizadas.	17
Tabla 3. Características ambientales de los días de muestreo.	25
Tabla 4. Fechas y condiciones ambientales de los muestreos.	37
Tabla 5. Abundancia relativa de los géneros más representativos de los 4 muestreos.	46

1. RESUMEN.

El pulque es la bebida fermentada tradicional alcohólica mexicana más estudiada y se elabora a partir de la fermentación fresca de la savia de diferentes especies de agaves (maguey), conocida comúnmente como aguamiel (AM). Uno de los factores que ha tenido relevancia para el estudio del pulque han sido los magueyes y su posible contribución como fuente de microorganismos al aguamiel y al proceso de fermentación hasta la obtención del producto. El objetivo del presente trabajo fue analizar la diversidad microbiana y su inferencia funcional durante el proceso completo de elaboración del pulque, tomando en cuenta el metzal (tejido resultante del raspado del cajete), de la región de Huitzilac, Morelos para proponer una microbiota asociada (core) a esta bebida, así como evaluar su estabilidad a través de 4 momentos durante un año. Se utilizó la secuenciación de amplicones, en el caso de las bacterias se amplificaron las regiones hipervariables V3 y V4 del ADNr 16S y para los hongos la región intergénica 1 entre el ADNr 18S y el 5.8S (ITS1). Los resultados nos permitieron determinar un clúster de microorganismos identificados en los tejidos de la planta (metzal) se identificaron en el aguamiel, pulque comercial y tres tiempos de fermentación. Se determinó que existe un core que además de estar presentes en todas las etapas del proceso de elaboración es estable a través del tiempo (cuatro diferentes momentos en un año). El core está compuesto de 5 géneros de bacterias (*Lactobacillus*, *Zymomonas*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Acetobacter*) y 3 de hongos (*Kazachstania*, *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*) así como 1 OTU del orden de los Saccharomycetales. Se evaluó que los géneros identificados poseen un papel potencial dentro del proceso de elaboración del pulque. Este estudio provee información relevante sobre los potenciales microorganismos responsables de la fermentación del pulque desde la planta hasta la bebida fermentada reforzando la idea de que existe una comunidad microbiana estable temporalmente y a pesar de las variaciones en el perfil fisicoquímico del aguamiel y del pulque fermentado.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. Fermentación en alimentos.

La fermentación es un proceso metabólico regenerador de ATP en el que los productos metabólicos derivados del sustrato son también donadores y aceptores de electrones en condiciones anaeróbicas. Un proceso de fermentación en el área de alimentos se define como el uso de microorganismos para transformar la materia prima en un producto con características bioquímicas y sensoriales diferentes a la materia prima original, a través de reacciones de oxidación, reguladas por la concentración de O₂. Además, dicho proceso elimina sabores no deseados, reduce la energía requerida para cocinarlos y destruye componentes antinutricionales (Tamang et al., 2016; Tang et al., 2017; Rizo et al., 2018). Entre los productos que resultan de la fermentación están el lactato, acetato, etanol y dióxido de carbono. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que, además, se generan compuestos llamados bioactivos, como son algunos péptidos, exopolisacáridos, compuestos fenólicos y vitaminas, entre otros (Marco et al., 2017). Encontramos una gran variedad de productos fermentados que se consumen a nivel mundial, se estima que hay más de 5000 variedades de alimentos fermentados y bebidas alcohólicas comunes y poco comunes (Tamang et al., 2016).

2.1.1. Clasificación de los productos fermentados.

Existen diferentes maneras de clasificar a los productos fermentados, pero una de las más comunes es en base al sustrato de elaboración y se han reportado 9 categorías: cereales, vegetales y bambú, legumbres, raíces y tubérculos, leche, cárnicos, productos de pescado, diversos y bebidas alcohólicas (Tamang et al. 2016).

En México, este último subgrupo tiene un impacto considerable a nivel cultural, social y económico (Romero-Luna et al., 2017). Entre los ejemplos de bebidas alcohólicas tradicionales mexicanas tenemos a la tuba hecha de la savia de las palmeras (Astudillo-Melgar et al., 2019), el tepache, preparado principalmente con pulpa de piña y otros frutos y granos como naranja y maíz (de la Fuente-Salcido et al., 2015) y un gran representante es el pulque, el cual está hecho

de la fermentación de la savia de los magueyes pulqueros del género *Agave* (Escalante et al., 2016).

2.2. Pulque

El pulque es una bebida alcohólica tradicional mexicana la cual está elaborada a partir de savia fresca (aguamiel) extraída de diferentes especies de plantas de agave, también conocido como maguey (Escalante et al., 2016). Existen 4 principales especies de *Agave* que se utilizan para la elaboración del pulque, *A. atrovirens*, *A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. americana* y algunas variedades mismas especies ya mencionadas, siendo los dos primeros conocidos como “magueyes pulqueros” (Jacinto and Garcia, 2000). La distribución que tienen estas plantas a nivel nacional es principalmente en los estados del centro de México, siendo el *A. salmiana* el de mayor distribución (CONABIO 2022).

El pulque ha tenido diversas aplicaciones a través del tiempo y en distintos contextos. Se sabe que no es una bebida de reciente creación ya que existen trabajos donde se ha encontrado su presencia en vasijas que datan de la época prehispánica (200 – 250 a.C.) (Correa-Ascencio et al., 2014). Las civilizaciones mesoamericanas lo consumían como parte de sus rituales sagrados y con fines religiosos para venerar o celebrar a sus deidades. Durante la colonia (1521-1810) su producción se convirtió en una de las principales actividades económicas surgiendo las haciendas pulqueras. Al final de la guerra de independencia las haciendas pulqueras recuperaron su relevancia económica, principalmente con el surgimiento del ferrocarril. Sin embargo, después de la revolución mexicana (1910-1920) la producción del pulque disminuyó tras la destrucción de la estructura de producción de las haciendas pulqueras (Escalante et al., 2016). Además, durante las primeras décadas del siglo XX el consumo de pulque disminuyó debido a una campaña que se generó contra su consumo, así como la falta de inversión en ciencia y tecnología de su producción. En épocas recientes, en el año 2022, el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) reportó una producción de 186,108.11 millones de litros, siendo los estados de Hidalgo (58%), Tlaxcala (23%), Estado de México (9%) y Puebla (6%) los principales productores, seguidos de otros estados como Guerrero,

Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí y Veracruz con el 4% restante de la producción, lo que indica que es un producto cuyo consumo se ha mantenido a través del tiempo. En un contexto de salud se han estudiado los beneficios potenciales que puede traer el consumo de dicha bebida, ya que de manera empírica se sabe que desde la época post-independencia en México que se consumía con fines de salud (Escalante et al., 2016). En años más recientes se han desarrollado investigaciones donde evalúan los diferentes beneficios potenciales hacia la salud humana, destacando el papel específico de diferentes microorganismos aislados del aguamiel y pulque, principalmente de bacterias ácido lácticas, y la presencia de carbohidratos que son fibra soluble, como los fructooligosacáridos (Escalante et al., 2016; Peralta-García et al., 2020; Valdivieso Solís et al., 2021).

2.2.1. Proceso de elaboración.

La elaboración del pulque consta de 4 pasos fundamentales los cuales se describen en la Figura 1. **1. El primer paso es el “castrado” de plantas** que llegan a su edad madura justo antes de la floración, proceso en el que el pedúnculo embrionario floral es destruido y se retiran las hojas centrales cercanas al mismo, de igual modo se retira el material vegetal para la formación de una cavidad o cajete. La cavidad es cubierta con hojas de la misma planta por un periodo de 3 meses a un año. **2. Raspado y extracción de aguamiel.** En este paso el cajete es raspado utilizando una herramienta llamada raspador, el cual tiene forma de cuchara. En esta operación se retiran capas del tejido vegetal de las paredes del cajete permitiendo que la savia fluya y se acumule en la cavidad. Esta operación se realiza dos veces por día (mañana y por la tarde), el aguamiel que se acumula después del raspado por la mañana es colectado por la tarde, se raspan las paredes del cajete nuevamente y el aguamiel acumulado durante la noche es colectado por la mañana. Para la extracción del aguamiel se utiliza un instrumento llamado acocote, el cual se elabora con el fruto seco de una variedad de calabaza, *Lagenaria siceraria*. El aguamiel es succionado oralmente y se deposita en recipientes como botellas de PET, cubetas o bidones en los que es transportado a un tinacal. **3. Desarrollo de la semilla.** Para iniciar una fermentación, se prepara una semilla con aguamiel “de la más alta calidad” según el productor, colocando de 10-50 L de este en una cubeta o recipiente para este fin,

desarrollándose una fermentación espontánea de 1 – 4 semanas. La semilla es utilizada para preparar una segunda semilla o pie de cuba, a la cual se le agrega aguamiel fresco dos veces al día. **4. Fermentación.** La fermentación inicia propiamente con el pie de cuba, el cual se transfiere a una nueva tina, recipiente o tinacal y se agrega aguamiel fresco dos veces al día. La duración de la fermentación y el volumen de producción varía de forma importante de acuerdo con la región geográfica, número de plantas productoras, número de tinacales, etc. La Figura 1 ilustra el proceso, en el que el tiempo de fermentación varía de 3 a 6 horas o bien, de 3 a 12 días (Escalante et al., 2016).



Figura 1. Proceso de elaboración del pulque. El proceso puede variar según las condiciones climatológicas y de la región. Fuente: Modificado de Escalante et al. (2016).

2.2.2. Características.

Dentro de las características sensoriales del pulque destaca que es de color blanco-lechoso, viscoso, de sensación ácida con un contenido de alcohol de 4 a 7° GL. Existen estudios en donde se ha determinado la composición nutrimental (química) que posee dicha bebida. Su contenido en azúcares reductores es bajo (0.1 – 0.8 mg /100 mL de pulque), tiene un pH ácido (3.5 - 4.2), posee minerales como el calcio, y hierro, vitaminas como la riboflavina, tiamina y vitamina C. A nivel microbiológico se ha demostrado que posee bacterias ácido lácticas, ácido acético, levaduras del género *Saccharomyces* y bacterias etanológicas como *Zymomonas mobilis*

(Escalante et al., 2016). Además de los trabajos de investigación se cuentan con dos normas mexicanas (NMX) que describen los parámetros mínimos y máximos que deben tener el aguamiel y el pulque en ciertas características como el pH, cenizas, azúcares reductores, etc. (anexo I). Se infiere que muchas de las características sensoriales que posee el pulque están estrechamente relacionados con la diversidad microbiana que participa en todo el proceso fermentativo.

2.3. Importancia de la diversidad microbiana.

Las interacciones microbianas están entre las principales ventajas de los consorcios ya que definen su estructura y función. La estructura de la comunidad específica que se encontrará en el consorcio dependerá de la fuente de carbono que tengan disponible, la disponibilidad de nutrientes, la producción metabólica o algunas características bioquímicas específicas (Escalante et al., 2015; Tan et al., 2015). En los alimentos, dependiendo la asociación y diversidad microbiana presente puede mejorar o perjudicar las propiedades sensoriales de los mismos, ya que en algunos casos la dominancia de ciertos géneros beneficia al alimento, mientras que en otros casos la presencia de ciertos grupos microbianos son señal de una mala calidad de estos (Zarraonaindia et al., 2015; Zhang et al., 2016).

Existen diferentes técnicas para determinar la diversidad microbiana y se dividen en dos grandes grupos: aquellas que dependen de tener a los microorganismos cultivados, cuya identificación se basa en características macroscópicas, microscópicas pruebas bioquímicas, entre otros. El segundo no depende de tenerlos cultivados, y tiene su base en análisis genéticos como la amplificación de marcadores moleculares (secuencias de ADNr 16S, ADNr 18S y regiones intergénicas en los operones ribosomales) y técnicas llamadas *Fingerprints* (Fakruddin and Bin Mannan, 2013; Rizo et al., 2018). Sin embargo, las primeras metodologías tienen la desventaja que más del 90% de los microorganismos son no cultivables, por lo tanto, estimar la diversidad microbiana sólo con base de dichas técnicas generaría un sesgo en el análisis. En el segundo grupo entre sus mayores limitantes está el alcance que poseen las metodologías, ya que no permiten el entendimiento del papel de microorganismos como parte de un sistema

en donde la relación de características abióticas y bióticas influyen en diversos parámetros de diversidad, como la abundancia relativa (Fakruddin and Bin Mannan, 2013; Rizo et al., 2018).

Por todo lo anterior surgen un conjunto de técnicas denominadas como “ciencias ómicas”, las cuales incluyen el estudio de diversas moléculas involucradas en el desarrollo y mantenimiento de la vida en todos los niveles de organización. De manera específica para estudios de diversidad, la metagenómica es una herramienta que permite dicho análisis a nivel masivo y se tienen 2 opciones, a través de la amplificación de regiones específicas de genes (*Amplicon sequencing*) o mediante la secuenciación del ADN total de la muestra (*Shotgun metagenomics*) (Rizo et al., 2018).

3. ANTECEDENTES

3.1. Pulque.

Uno de los primeros reportes sobre la microbiología del pulque se publica en 1953 en el cual se reportó que los microorganismos responsables de la fermentación de la bebida eran *Lactobacillus* sp. responsable de la fermentación láctica, *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc dextranicum* confiriendo la viscosidad de la bebida (biosíntesis de exopolisacáridos), *Saccharomyces* y *Pseudomonas lindneri* (ahora *Zymomonas mobilis*) responsables de la producción de etanol (Sánchez-Marroquín y Hope, 1953).

En el 2004 se publicó un estudio cuyo objetivo fue caracterizar la diversidad bacteriana del pulque mediante un análisis de ARDRA. Se analizaron muestras de tres lugares, Aculco (Estado de México), Huitzilac (Morelos) y Tizayuca (Hidalgo). Se observó que dos microorganismos se conservaban en las tres localidades, *Lactobacillus acidophilus* y *Leuconostoc mesenteroides*, mientras que otros microorganismos eran específicos de cada muestra analizada (Escalante et al., 2004). En otro trabajo, en el que se caracterizaron las comunidades bacterianas por métodos cultivables y no cultivables presentes en aguamiel, en tres tiempos durante una fermentación y en pulque fermentado de toda la noche de la localidad de Huitzilac, Morelos, Los resultados obtenidos permitieron la detección de varios microorganismos no reportados previamente en los estudios de la microbiología del pulque y algunos otros previamente

reportados de los grupos alfa-, gamma-Proteobacterias y Firmicutes. La diversidad bacteriana presente en el aguamiel estuvo conformada por *Leuconostoc citreum*, *L. mesenteroides*, *L. kimchi*, y las gamma-Proteobacterias *Erwinia rhapontici*, *Enterobacter* spp. y *Acinetobacter radioresistens*. Al inicio de la fermentación (mezcla de aguamiel con pulque) se detectaron lactobacilos homo- y heterofermentativos, algunas alfa-Proteobacterias como *Zymomonas mobilis* y *Acetobacter malorum* y una cantidad importante de levaduras (con respecto a la muestra de aguamiel). Al final de la fermentación la diversidad bacteriana dominante estuvo integrada por lactobacilos homofermentativos identificados como *Lactobacillus acidophilus* y las bacterias ácido lácticas heterofermentativas *L. mesenteroides*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y la alfa-Proteobacteria *A. malorum*. En este trabajo se asociaron nuevos géneros de microorganismos no reportados previamente en el pulque como son *Erwinia*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium* y *Streptococcus* (Escalante et al., 2008).

En el 2016 se publicó una revisión en la cual se analizó la historia, composición y cambios microbiológicos y fisicoquímicos del pulque en diferentes tiempos de fermentación, desde aguamiel hasta pulque, discutiéndose la relevancia histórica, sus características químicas y nutricionales. Además, se presentó un panorama de las vías metabólicas de los principales grupos microbianos identificados tanto en aguamiel como en pulque hasta ese momento, en el cual algunos microorganismos presentaron características probióticas como es el caso de *Leuconostoc mesenteroides*, la producción de fructooligosacáridos y dextranas por *Z. mobilis* las cuales son potenciales prebióticos, dichos exopolisacáridos también fueron descritos en aguamiel y pulque. Esta revisión presentó un panorama general del perfil microbiológico que se había identificado del pulque tanto por técnicas dependientes como independientes de cultivo (Escalante et al., 2016). Posteriormente se evaluaron los cambios en la composición bioquímica y microbiológica del pulque de dos municipios del estado de Michoacán por métodos dependientes de cultivo. En este trabajo se encontró que existe una variación significativa en abundancia (expresada en unidades formadoras de colonias) de bacterias (bacterias ácido-lácticas) y levaduras de un municipio a otro por las diferencias en los procesos de elaboración (Álvarez-Ríos et al., 2020). Además de investigar al aguamiel y al pulque a nivel

metabólico y microbiológico, existe un trabajo donde se evaluó la percepción que tiene la sociedad ante esta bebida. En este trabajo analizaron las pulquerías del municipio de Toluca, Edo. de México, concluyendo que los jóvenes consideran al pulque como un producto no muy agradable por el entorno social donde se vende y no por su sabor, por lo tanto, sugieren hablar más de este para dar a conocer el potencial que posee como producto fermentado y no solo como una bebida alcohólica (Rojas-Rivas and Cuffia, 2020).

La reciente aplicación de técnicas de secuenciación masiva para analizar la diversidad microbiana presente en aguamiel y pulque permitió ampliar el conocimiento que se tenía de los microorganismos asociados al aguamiel y al proceso de elaboración de esta bebida. En uno de los primeros trabajos ómicos, se analizó el bacterioma por medio de “Shotgun” de una única muestra la cual era una mezcla de pulque fermentado por 24 y 48 horas, en el cual reportaron por primera vez algunos géneros pertenecientes a las familias Sphingomonadaceae y Bartonellaceae en pulque, así como el análisis de ciertas enzimas involucradas con la biosíntesis de vitaminas, la glicosil hidrolasa relacionada con la síntesis de polisacáridos, entre otros (Escobar-Zepeda et al., 2020). En el contexto del reporte de Escobar-Zepeda et al. (2020) se analizó por la misma estrategia experimental una muestra de aguamiel obtenida del estado de Morelos, en la cual se encontró que el género bacteriano más abundante fue *Zymomonas* seguido de *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Lactococcus* y *Acinetobacter* principalmente, reforzando la evidencia que existen microorganismos que ya se han reportado en pulque y que están presentes en aguamiel. Se evaluó también el perfil de fructanos y sus cambios durante la acumulación del aguamiel en el cajete y la variación de sacarosa que se tenía dependiendo del tipo de planta y su etapa de producción (Peralta-García et al., 2020). Con un mayor número de muestras y analizando, aguamiel y pulque se analizó la diversidad microbiana de 6 muestras (2 de aguamiel, 2 de pulque y 2 de pulque de punta) del estado de Hidalgo por medio de la secuenciación de librerías de amplicones de las regiones V3-V4 del gen ADNr 16S para bacterias y la Región Intergénica (ITS) para levaduras y hongos. Se encontraron 3 veces más géneros de bacterias y 4 veces más de hongos que los ya reportados. El *Phylum* más dominante fue el de las Proteobacterias representado por los géneros *Sphingomona* y *Acetobacter*, no

encontrando a *Zymomonas* en ninguna de las muestras. En el caso de los hongos los géneros más dominantes fueron, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Dekkera*, *Saccharomyces* y *Kazachstania* (Rocha-Arriaga et al., 2020).

El análisis de la microbiota de una muestra de aguamiel, tres tiempos de fermentación y en una muestra de pulque de toda la noche (15 horas aproximadamente) de la localidad de Huitzilac, Morelos, permitió la identificación de 6 géneros (*Acinetobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Saccharomyces* y *Zymomonas*) y a 10 especies (*Acinetobacter boissieri*, *Acinetobacter nectaris*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gelidum*, *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae*) presentes a $\geq 1\%$ en al menos una etapa del proceso de fermentación. Esta diversidad correlacionó con los cambios en los perfiles de azúcares presentes en el aguamiel y con la producción de etanol y ácido láctico, definiendo por primera vez una propuesta de lo que podría ser el microbioma esencial del pulque presente desde el aguamiel hasta la bebida fermentada. (Chacón-Vargas et al., 2020). De manera general en la - Tabla 1 se muestran los géneros microbianos más abundantes reportados en cada trabajo de aguamiel y/o pulque y que ha utilizado la secuenciación masiva para su análisis. Cabe resaltar que cada trabajo tuvo una estrategia experimental diferente.

Tabla 1. Microorganismos más abundantes de los trabajos “ómicos” de aguamiel y pulque.

Género microbiano	Artículo y estrategia experimental								
	Escobar-Zepeda et al. 2020 ¹		Peralta-García et al. 2020 ²		Rocha-Arriaga et al. 2020 ³		Chacón-Vargas et al. 2020 ⁴		
	<i>Shotgun</i>		<i>Amplicon sequencing</i>		<i>Amplicon sequencing</i>		<i>Shotgun</i>		
	Muestra(s) en donde se identificó								
	AM	PQ	AM	PQ	AM	PQ	AM	PQ	
<i>Zymomonas</i>		X	X		X	X	X	X	X
<i>Leuconostoc</i>		X	X		X	X	X	X	X
<i>Lactobacillus</i>		X			X	X	X	X	X
<i>Lactococcus</i>		X	X		X	X	X	X	X
<i>Acinetobacter</i>			X		X	X	X	X	X
<i>Candida</i>					X	X			
<i>Kluyveromyces</i>					X	X			X
<i>Dekkera</i>					X	X			
<i>Saccharomyces</i>					X	X	X		X
<i>Kazachstania</i>					X	X			

¹ Secuenciamiento de 1 muestra, la cual era mezcla de pulque fermentado por 24 y 48 horas.

² Una única muestra de aguamiel obtenida en invierno.

³ Tres muestras secuenciadas, Aguamiel, Contrapunta y Pulque.

⁴ Análisis de 5 muestras, Aguamiel, Pulque y tiempos de fermentación 0, 3 y 6 horas de fermentación.

Posteriormente se publicó una revisión en la cual se presenta nuevamente el panorama general de las características metabólicas y microbiológicas del pulque, así como las tecnologías actuales utilizadas en la elaboración de dicha bebida resaltando la importancia de los agaves (magueyes pulqueros) para la producción del mismo, explicando los tipos de cultivo que se realizan en el país, además de los pulques comerciales que se están haciendo y los microorganismos aislados del mismo que tienen una relevancia industrial (Valdivieso Solís et al., 2021).

3.2. Magueyes pulqueros.

Para el presente trabajo se considera de gran relevancia estudiar a las plantas de donde se obtiene el aguamiel. En el 2014 se realizó un estudio donde se analizó el microbioma bacteriano de dos especies de agaves *A. salmiana* (maguey pulquero) y *A. tequilana*, a través de la técnica llamada DGGE. Se realizó una evaluación por región de la planta (raíz, hoja, tejido interno y externo) y se descubrió que existe una variabilidad entre géneros dominantes con respecto al tipo de tejido que se analice, si es tejido interno, de hoja o si es de raíz (Desgarenes et al., 2014). Utilizando métodos cultivables e identificando a cada cepa por métodos moleculares, se analizó la composición de bacterias endófitas de las hojas de *A. tequilana* teniendo que los dos grupos principales de bacterias encontrados pertenecen a las *Phyla* Firmicutes (géneros *Leuconostoc* y *Enterococcus*) y Proteobacterias (géneros *Pseudomonas* y *Acinetobacter*) (Martínez-Rodríguez et al., 2014).

El primer estudio utilizando secuenciación masiva de marcadores moleculares como el 16S e ITS se realizó en el 2016, en el cual se analizó la composición fúngica y bacteriana de 2 especies de agaves *A. salmiana* y *A. tequilana*, de diferentes localidades (estados de Guanajuato y Jalisco) y de distintas regiones de la planta, tanto en tejidos internos como superficies. Se concluyó que existe una relación entre la composición bacteriana y la región de la planta analizada, mientras que en los hongos se encontró que el principal factor para establecer una dominancia era la biogeografía. Sin embargo, se logró establecer un “core” (microbiota central) de hongos y bacterias que permanecen constantes a través de todas las plantas y que pueden tener un papel como promotoras de crecimiento para las mismas (Coleman-Derr et al., 2016).

Un trabajo realizado en maguey pulquero (*A. salmiana*) analizó la composición bacteriana endófitas de las pencas y la piña de las plantas con la finalidad de encontrar algún género que se pudiera vincular al proceso de elaboración del pulque. Se demostró que existen 2 microorganismos, *Leuconostoc mesenteroides* y *L. citreum* encontrados como endófitos de la planta y que están presentes en el aguamiel y durante la fermentación del pulque, además de algunas gama proteobacterias (Guerrero-Corona, 2017). Trejo y colaboradores en el 2020 realizaron un estudio de la diversidad morfológica y genética de las especies y “razas” de

agaves pulqueros del estado de Tlaxcala, en el cual encontraron que aún a nivel molecular no es posible diferenciar cambios a nivel de variedad sólo a especie, sin embargo, los autores proponen su trabajo como la base para mejorar la conservación de la diversidad autóctona de las especies y así mejorar la producción del pulque (Trejo et al., 2020).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

A pesar de que se tienen trabajos sobre la diversidad microbiana que está presente en el aguamiel y en el pulque, todos los trabajos previos han reportado el análisis de una muestra en un solo tiempo, de varias muestras de diferente origen geográfico, o el seguimiento de una fermentación de un solo origen. Hay muy poca información sobre los microorganismos que se pudieran transferir desde los tejidos de la planta como el metzal y que se conserven durante su proceso fermentativo y tampoco hay estudios sobre la estabilidad o variación de esta diversidad microbiana entre plantas que inician su producción de aguamiel en diferentes momentos del año. Por lo cual nos generamos dos preguntas, ¿Existe un *core* o microbiota central presente en las paredes del cajete de magueyes pulqueros (metzal) y que se mantenga en el aguamiel y durante la fermentación del pulque? ¿Qué tan estable es este *core*?

5. JUSTIFICACIÓN.

Debido a la falta de un estudio que contemple el análisis de la diversidad microbiana del proceso completo de elaboración del pulque, desde los microorganismos que se transfieren de la planta al aguamiel y se conservan durante la fermentación hasta la obtención de la bebida, así como su estabilidad en diferentes momentos durante un año. Se llevó a cabo la amplificación de las regiones hipervariables V3-V4 del ADNr 16S e ITS1, así como réplicas biológicas por cada secuenciación que permitirán definir los microorganismos responsables de ciertos metabolitos producto de la fermentación, independientemente del momento en el año y del tipo de planta de la cual se obtiene el aguamiel.

Con la información obtenida del trabajo se pretende contribuir con base a la microbiota central (*core*) de una región geográfica, a los microorganismos que se conservan durante todo el proceso de elaboración de la bebida, así como la estabilidad de este y su potencial uso funcional.

6. HIPÓTESIS.

Los microorganismos presentes en la comunidad microbiana asociada al tejido vegetal del cajete (metzal) en etapas tempranas de producción de aguamiel de magueyes de la localidad de Huitzilac, Morelos, se mantendrán a través del proceso de elaboración del pulque y se conservarán a lo largo de un año.

7. OBJETIVOS.

7.1. Objetivo general.

Analizar la diversidad microbiana y su inferencia funcional durante el proceso completo de elaboración del pulque de la región de Huitzilac, Morelos para conocer la microbiota central de esta bebida, así como evaluar su estabilidad a través 4 momentos durante un año.

7.2. Objetivos específicos.

- Conocer la microbiota central (*core*) *in silico*.
- Evaluar la estabilidad de la microbiota central durante un año.
- Analizar la composición metabólica durante el proceso de elaboración del pulque: azúcares, etanol, ácidos orgánicos, fructooligosacáridos y parámetros físicos como oxígeno disuelto y biomasa.
- Correlacionar el *core* con los metabolitos cuantificados.

8. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

Tipo de estudio: Observacional transversal, es decir, en un análisis de un momento específico en el tiempo y comparativo porque se analizaron en diferentes momentos en el tiempo.

Modelo de estudio: Tejido vegetal y aguamiel colectado de 3 plantas de *Agave salmiana* que inician su etapa de producción de una región geográfica (Huitzilac, Morelos) y pulque elaborado en condiciones controladas a partir del aguamiel colectado y pulques del productor (controles) de la región geográfica ya mencionada,

Tipo de muestreo: Por conveniencia y disponibilidad de magueyes del productor.

Criterios de selección: Inclusión. Se incluyeron las agaves que no presentaron daños visibles y que estuvieron en época de producción de aguamiel (5-10 años aprox.) Exclusión. Se excluyeron los agaves que presentaron daños visibles en su estructura o que ya no estuvieran en periodo de producción de aguamiel. Eliminación. Muestras de tejido o aguamiel que se contaminaron por mal manejo o transporte de estas.

Consideraciones éticas y de bioseguridad.

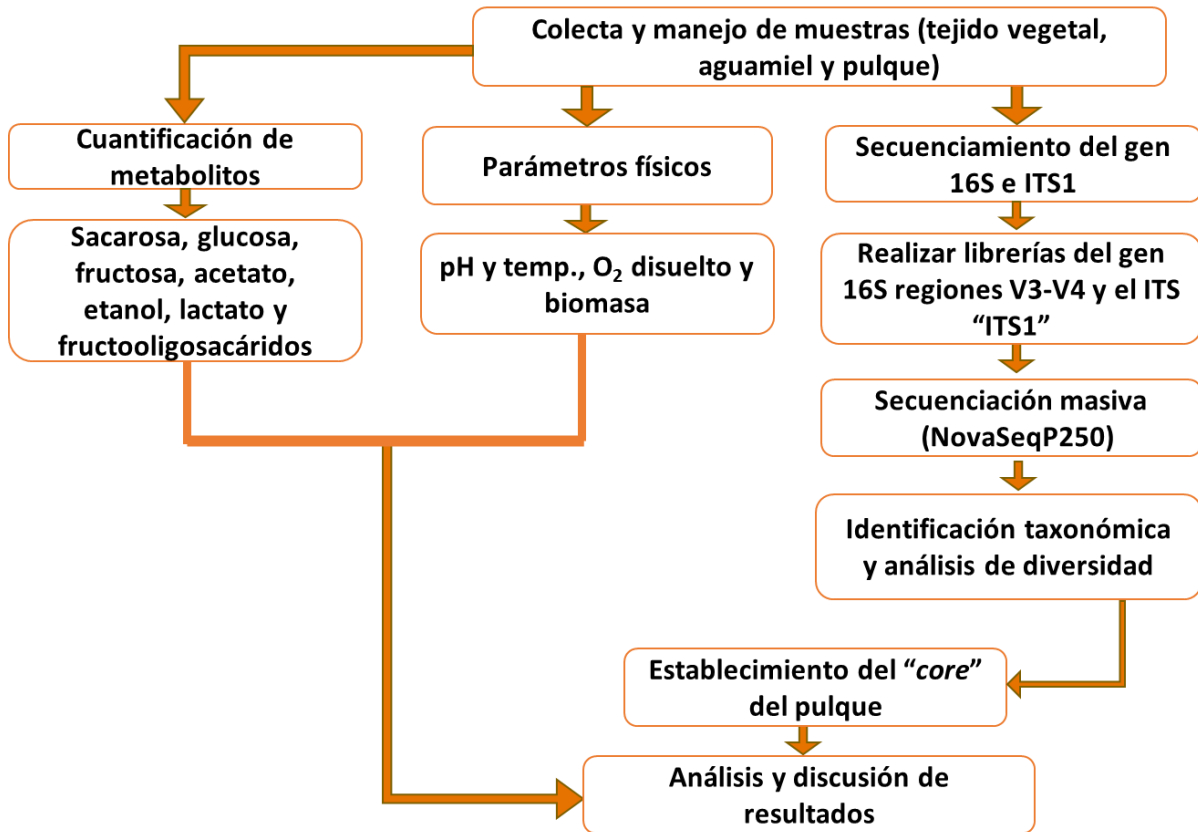
Las muestras de tejido vegetal, aguamiel y pulque fueron adquiridas con la previa autorización del productor, sin generar daños ni a las plantas ni interfiriendo con su producción diaria, así mismo según la NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio en la lista de especies en riesgo, el *Agave salmiana* no se encuentra amenazado ni en peligro de extinción. El manejo de sustancias al momento de los experimentos fue bajo los parámetros de seguridad que establece la NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.

Tamaño de la muestra: Se analizaron un total de 90 muestras distribuidas como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 2. Número de muestras analizadas.

		Origen de la muestra	No. de muestras
Primera parte del proyecto: ¿Existe una microbiota central?	Un único momento en el año	Metzal (tejido vegetal de los magueyes)	3
		Aguamiel	3
		Tiempos de fermentación (0, 3 y 6 horas.)	9
		Pulque comercial	3
		Origen de la muestra	No. de muestras
Segunda parte del proyecto: Estabilidad de la microbiota central	Primer periodo de muestreo	Metzal (tejido vegetal de los magueyes)	3
		Aguamiel	3
		Tiempos de fermentación (0, 3 y 6 horas.)	9
		Pulque comercial	3
	Segundo periodo de muestreo	Metzal (tejido vegetal de los magueyes)	3
		Aguamiel	3
		Tiempos de fermentación (0, 3 y 6 horas.)	9
		Pulque comercial	3
	Tercer periodo de muestreo	Metzal (tejido vegetal de los magueyes)	3
		Aguamiel	3
		Tiempos de fermentación (0, 3 y 6 horas.)	9
		Pulque comercial	3
	Cuarto periodo de muestreo	Metzal (tejido vegetal de los magueyes)	3
		Aguamiel	3
		Tiempos de fermentación (0, 3 y 6 horas.)	9
		Pulque comercial	3
TOTAL			96

8.1. Diagrama de trabajo.



8.2. Materiales y métodos.

8.2.1. Colecta y manejo de muestra.

Todas las muestras se colectaron del municipio de Huitzilac, Morelos. Se seleccionaron 3 agaves distribuidos al azar que no presentaron daños visibles; como fisuras, perforaciones, manchas que indiquen necrosis o la presencia de plagas. Las colectas se realizaron durante la mañana, es decir el aguamiel correspondió al acumulado de la noche anterior, se colectaron entre 1 y 2 L aproximadamente por cada planta y se transportaron al laboratorio en recipientes estériles y en frío para su análisis. Después de la recolección del aguamiel, se tomó el tejido de raspado llamado “metzal”, en el caso de las muestras comerciales de pulque usadas como semilla o iniciadores de la fermentación, el manejo y transporte fue el mismo ya descrito.

A las muestras de tejido vegetal (metzal) se les realizó una extracción de microorganismos por medio de exprimido, para esto se exprimieron 50 g de tejido con un exprimidor metálico estéril, el líquido que se obtuvo fue centrifugado a 1,000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante fue colocado en un tubo nuevo y limpio y se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min, el sobrenadante fue almacenado para el análisis de metabolitos y una parte del pellet fue almacenado en glicerol al 80% en una proporción 1:1 pellet-glicerol y otra porción del mismo fue almacenada a -20°C para la extracción de ADN.

8.2.2. Fermentación controlada.

La fermentación se realizó en condiciones de laboratorio en una relación 2:3 aguamiel-semilla (pulque) por 6 horas a 28°C sin agitación. Se tomaron 10 mL de muestra de aguamiel y pulque, además de los tiempos 0, 3 y 6 horas de fermentación. Todas las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm por 20 minutos. El pellet y el sobrenadante de cada muestra se congelaron a -20°C para su posterior análisis.

8.2.3 Composición metabólica de azúcares y ácidos orgánicos del proceso del proceso de fermentación del pulque.

La cuantificación de azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa y glicerol) fue por UPLC (Waters Acquity RI detector, Waters Acquity UPLC class Sample Manager FTN, Waters Acquity Quaternary Solvent Manager) con una columna Aminex HPX-87P con un detector de IR (índice de refracción), como fase móvil se empleó acetonitrilo al 70% con un flujo de 0.6 mL/min, una temperatura de la columna de 85°C y 20 µL de volumen de inyección. Para los ácidos orgánicos (lactato, acetato y succinato) y etanol se ocupó el HPLC (Waters 2410 IR, Waters 996 PDA, Waters 717 plus Autosampler, Waters 600 Controller) y la columna Aminex HPX 87H con un detector PDA (Waters 996) de UV 210 nm con fase móvil de ácido sulfúrico 3mM, un flujo de 0.6 mL/min, una temperatura de la columna de 60°C y 20 µL de volumen de inyección. Finalmente, para la detección de los fructooligosacáridos (FOS) se ocupó la Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detector de pulso amperométrico (HPAEC-PAD)(Dionex ICS-5000+ SP, Dionex ICS-5000+ DC, Dionex Ultimate 3000 Autosampler) y la columna Dionex CarboPac™ PA200 con una fase móvil de 99 % NaOH 0.09 M y 1% (acetato de sodio 0.5 M y NaOH 0.09 M en una proporción 1:1), con un flujo en gradiente de 0.5 mL/min y un volumen de inyección de 2.5 µL.

El pH se determinó con 1 mL de muestra empleando un potenciómetro modelo HI2211 pH/ORP Meter de Hanna Instruments. La temperatura se determinó con un termómetro de mercurio marca ERTCO (Cat. No.613). La biomasa se cuantificó por el método de peso seco según la NMX-V-017-1970 y la AOAC (anexo II).

Los parámetros de porcentaje de oxígeno disuelto (% OD) y porcentaje de dióxido de carbono (% CO₂) se midieron utilizando un reactor Applikon Biotechnology modelo *my-control* con un volumen de 250 mL de la mezcla 2:3 aguamiel pulque sin agitación.

8.2.4 Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN de las muestras de metzal, aguamiel y pulque se usó el kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep siguiendo las indicaciones del proveedor, añadiendo un paso de lisis enzimática con Lisozima -A (aproximadamente 0.2 mg/por tubo) e incubada por 30

minutos por una hora a 37°C antes de la lisis mecánica descrita en el manual del proveedor (anexo III). Se buscó que se obtuviera una concentración adecuada (superior a los 20 ng/μL) y una calidad igual o mayor a 1.8 en la relación A_{260}/A_{280} . La integridad del ADN se verificó en geles de agarosa al 1% (anexo IV).

Una vez que se tuvieron la cantidad y calidad requeridas para la generación de las librerías genómicas se mandaron las muestras de ADN a procesar a la Unidad de Secuenciación Masiva del IBT y a NOVOGENE, según fue el caso.

8.2.5 Generación de librerías genómicas.

Para la amplificación de las regiones hipervariables V3 y V4 del gen ADNr 16S en el caso de las bacterias y de los hongos la región Intergénica 1 ITS1 localizada entre los genes de 5.8S y el 18S ADNr se utilizaron los oligos que se muestran en el archivo anexo V. Las librerías genómicas fueron realizadas por la institución/compañía a la que se mandaron las muestras de ADN las cuales siguieron los protocolos de *Illumina* ([Next-Generation Sequencing \(NGS\) | Explore the technology \(illumina.com\)](https://www.illumina.com/nextgen/next-generation-sequencing-technology.aspx)). De manera general, el proceso consiste en una primera amplificación de los fragmentos correspondientes (ADNr 16S o ITS1) por PCR en la que se añadieron secuencias no homólogas a la región de interés, conocidas como secuencias adaptadoras de *Illumina*, bajo las siguientes condiciones: una temperatura de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, con 25 ciclos, de los cuales la desnaturalización fue de 95°C por 30 segundos, la alineación a 55°C por 30 segundos y una elongación de 72°C por 30 segundos y finalmente una elongación final de 72°C por 5 minutos. Posteriormente se realizó una segunda PCR en la que se añadieron secuencias de código de barra que hibridan con las secciones no homologas de los primeros fragmentos amplificados bajo las siguientes condiciones: una temperatura de desnaturalización de 95°C por 3 minutos, con 8 ciclos de los cuales la desnaturalización fue de 95°C por 30 segundos, la alineación a 55°C por 30 segundos y una elongación de 72°C por 30 segundos y una elongación final de 72°C por 5 minutos. Una vez que se obtuvieron las librerías, se normalizaron y fueron secuenciadas mediante las tecnologías MiSeq (primera parte del proyecto) y NovaSeq (Segunda parte del proyecto).

8.2.6 Secuenciación.

Para la primera parte del proyecto la secuenciación se realizó mediante un equipo de *MiSeq*, 2x250 en la unidad de secuenciación masiva del Instituto de Biotecnología de la UNAM y para la segunda parte se realizó en un equipo *NovaSeqP250*, 2x250 en la empresa NOVOGENE.

8.2.7 Análisis bioinformático.

La calidad de las secuencias se revisó con el programa FASTQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). La identificación y limpieza de las secuencias quiméricas se hizo utilizando el algoritmo `parallel_identify_chimeric_seqs.py` con el programa QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) versión 1.9.1, el cual se utilizó para la asignación taxonómica y permitió generar tablas de OTUs (unidades taxonómicas operacionales), así como los cálculos de alfa y beta diversidad tomando de referencia la base de datos *SILVA_132* y utilizando un filtrado de 0.01% en abundancias (Navas-Molina et al., 2015). El emparejamiento de las secuencias de bacterias se hizo mediante la función de SeqPrep y la asignación taxonómica por el sistema cerrado para las bacterias. El análisis la Región Intergénica 1 (ITS1) se realizó utilizando la base de datos para ITS de UNITE 2020 (Abarenkov et al. 2020); el emparejamiento de las secuencias se realizó por SeqPrep y la asignación taxonómica, por el sistema abierto.

8.2.8 Análisis de diversidad y estadísticos.

Los índices de alfa diversidad que se realizaron son Simpson (dominancia y equidad), Shannon (diversidad), Chao1 (*singletons*) y *Observed_otus* (riqueza). Con un análisis de Kruskal Wallis y una prueba *post hoc* Dunn Con, se buscaron diferencias significativas entre las muestras. Para el caso de la beta diversidad se realizó una matriz de Bray-Curtis junto con un PCoA (Análisis de coordenadas principales) (`beta_diversity.py`), así como un análisis de correlación de Spearman con un intervalo de confianza del 95%.

Para determinar si existen diferencias significativas en los metabolitos cuantificados a través del año se utilizó un ANOVA de 2 vías con una prueba de Tukey con una confiabilidad del 0.05.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 8.0. Los cálculos de los índices de diversidad alfa y beta se utilizaron los algoritmos del QIIME `alpha_diversity.py` y `beta_diversity.py`.

8.2.9 Establecimiento de la microbiota central (*core*) del proceso de fermentación del pulque.

Se define como “core” a los miembros de una comunidad microbiana que se encuentra en todas las condiciones, estadios, momentos o sitios asociados a un hábitat (Desgarenes et al., 2014). Su selección (microbiota central) se hizo con base en los resultados bioinformáticos obtenidos, tanto los géneros más abundantes, la permanencia que tienen desde el metzal hasta el producto final y principalmente aquellos microorganismos que se conserven en todas las muestras y momentos con una abundancia relativa igual o mayor al 0.01%, debido a que se determinó que con esta corte se pueden descartar OTUs que sean quimeras, errores de secuenciación o cuyas abundancias sean muy bajas y no tengan un impacto significativo en el ecosistema (Navas-Molina et al., 2015).

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

9.1. Primera parte: ¿Existe una microbiota central?

9.1.1 Muestreo y fermentación.

Para determinar primeramente si existen microorganismos (el *core*) que se compartan en el proceso de elaboración del pulque, desde las paredes del cajete en las plantas hasta el producto final. Se analizaron 3 magueyes que estaban en las primeras etapas de producción (después de que fueron castrados) de los cuales se colectó *in situ* el aguamiel de la mañana, correspondiente a la acumulada de la noche anterior, posteriormente se rasparon las paredes del cajete con lo que se obtuvo el tejido vegetal llamado metzal (Figura 2). Además, se colectó pulque obtenido del tinacal que el productor tenía de aproximadamente 12 horas de fermentación, el cual fue utilizado como semilla. Las colectas se hicieron en tres días distintos (1 agave diferente por día) y se evaluaron en 3 tiempos de fermentación T0, T3 y T6 haciendo un total de 18 muestras analizadas (Tabla 3). Se seleccionaron diferentes agaves, que cumplieron con las características deseadas (en edad de producción de aguamiel, sin plagas ni daños).

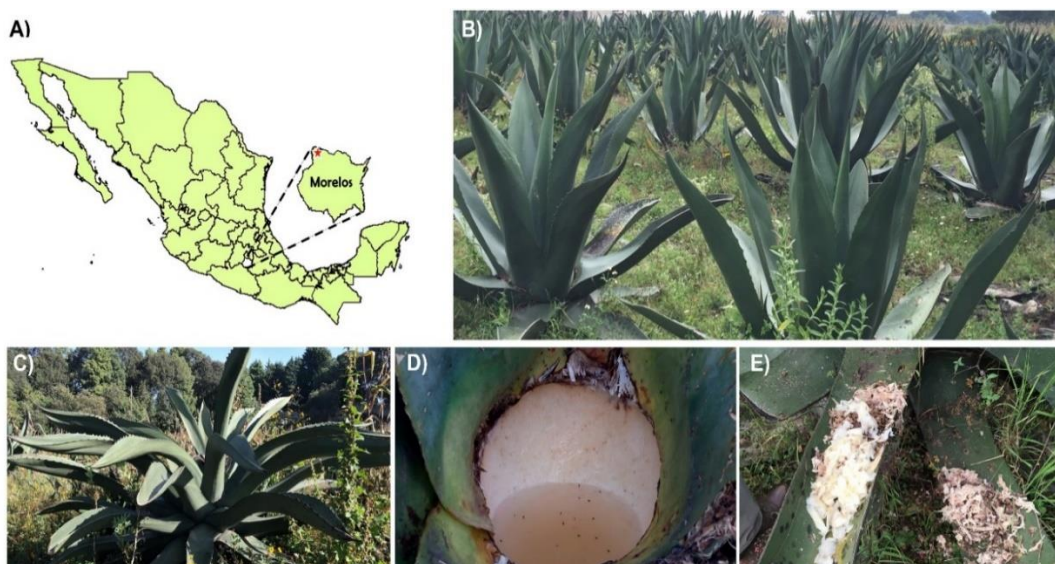


Figura 2. Zona de muestreo. (A) Huitzilac, Morelos (estrella roja). (B) Zona de cultivo de los magueyes pulquero. (C) Uno de los tres magueyes usados para la colecta de aguamiel y metzal. (D) Cajete, donde se acumula el aguamiel después del raspado de las paredes. (E) Muestra del tejido llamado metzal.

Tabla 3. Características ambientales de los días de muestreo.

Parámetro	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3
Fecha	7/11/2019	11/11/2019	14/11/2019
Temperatura ambiental	22°C	21°C	20°C
Humedad	87%	89%	88%
Presión ambiental	732 atm	731 atm	731 atm
Clima	Neblina	Soleado	Nublado

Los datos fueron adquiridos de MeteoRed.mx, el cual se consultó el 14 de noviembre del 2019.

De aguamiel se obtuvo en promedio 1.2 L y de pulque (semilla) 3 L que se fermentaron en una proporción 2:3 aguamiel/pulque del mismo modo como se describió en (Chacón-Vargas et al., 2020). El aguamiel colectado presentó un color blanco transparente, de aroma dulce y viscoso, el pulque era de un tono blanco lechoso, con espuma y aroma a alcohol (Figura 3A). Durante el proceso fermentativo se observó en todos los casos un incremento en la cantidad de espuma conforme el tiempo transcurría, de igual modo ocurrió un cambio de coloración de un tono blanco transparente a un blanco lechoso, (Figura 3B), esto último concordando con las características del pulque descritas en Escalante et al. 2016. En el caso del metzal lo observamos de una tonalidad café claro de apariencia fibrosa como se muestra en la Figura 3C y sin presencia de hongos o daños.

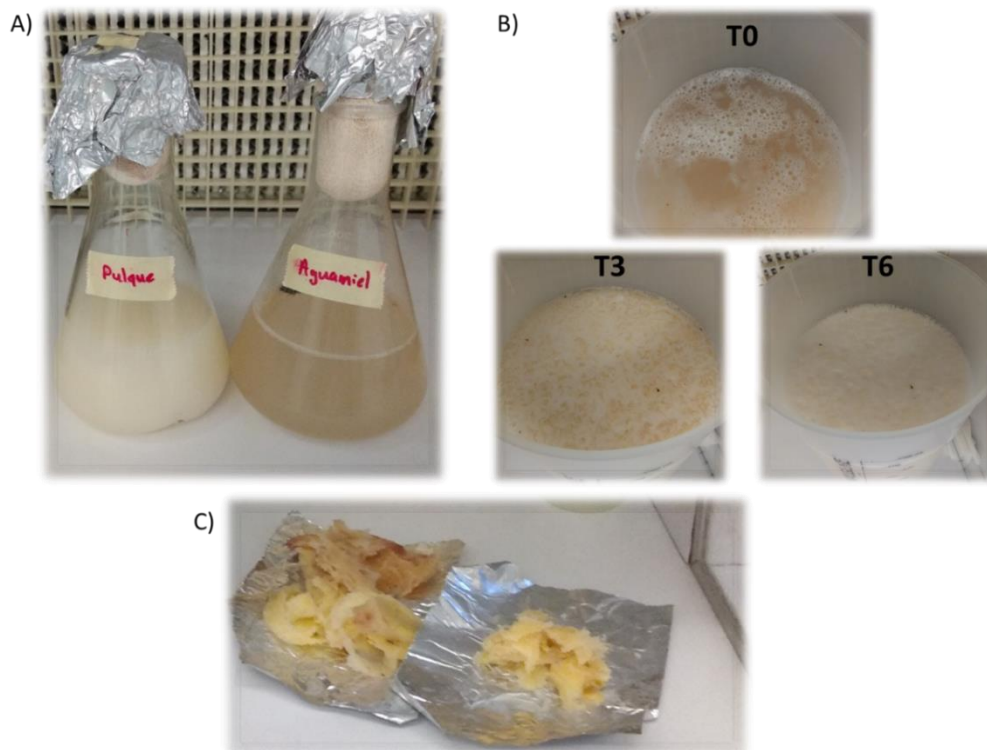


Figura 3. Muestras de aguamiel, pulque, metzal y fermentación. (A) Muestras de aguamiel y pulque (B) Tiempos de fermentación 0, 3 y 6 horas. (C) 50 gramos de metzal.

9.1.2 Caracterización de parámetros físicos y metabólicos.

La cuantificación de los parámetros físicos de las 3 fermentaciones en laboratorio mostró que las muestras analizadas presentaron un valor similar en el pH, %OD y %CO₂. Se observó una disminución en los valores de estos parámetros conforme se desarrolló la fermentación. El valor promedio de pH más alto fue de 4.5 en el aguamiel, mientras que el más bajo fue de 4.0 en el T6, cumpliendo con las características descritas en la NMX-V-037-1972. En el caso del porcentaje de oxígeno disuelto pasó de 3.5 en el tiempo cero a 0.8% en el tiempo 6; en caso similar el %CO₂ disminuyó de 0.03 a 0.019% del T0 al T6 (Figura 4A). La disminución del pH es indicador del metabolismo de los microorganismos principalmente, por la producción de los ácidos orgánicos (Escalante et al., 2016; Astudillo-Melgar et al., 2019). Los parámetros de O₂ disuelto y porcentaje de CO₂ no habían sido cuantificados en los trabajos previos, siendo éste el primero en describirlos.

La biomasa promedio más alta se obtuvo en el aguamiel con 121.8 g/L disminuyendo hasta 34.73 g/L en el pulque, esta disminución en la biomasa podría deberse a la desaparición o consumos de los carbohidratos transformados en productos de fermentación como ácidos orgánicos y principalmente etanol y CO₂ los cuales se volatilizan por la técnica utilizada para la determinación de biomasa (peso seco) generando una pérdida de aproximadamente 61.18 g/L, además de la hidrólisis de los fructooligosacáridos (FOS) y posiblemente de polímeros como las dextranas y levanas producidos durante la fermentación, sin embargo, esta hipótesis aún tendría que ser verificada. La cantidad de cenizas que está compuesta por la parte de minerales tuvo una concentración promedio de 224 mg/100 mL durante todo el proceso fermentativo (Figura 4B), dicho valor está dentro de los parámetros reportados en la NMX-V-022-1972.

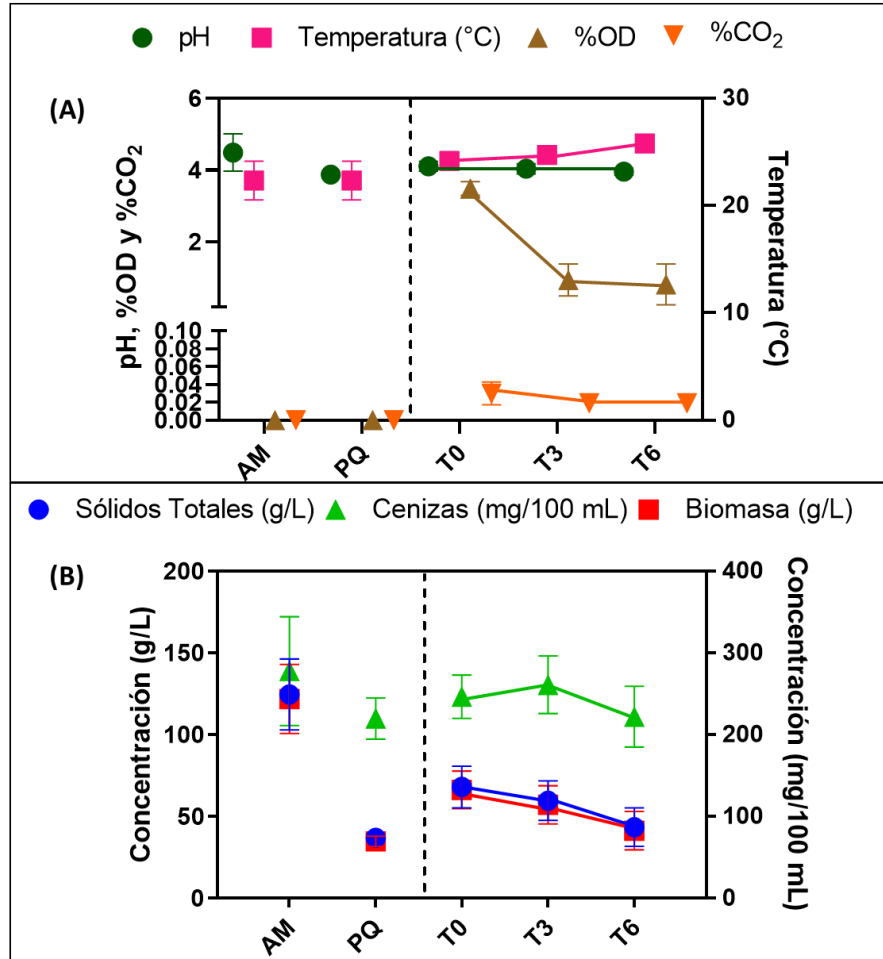


Figura 4. Parámetros físicos de la fermentación. (A) Parámetros físicos. (B) Biomasa, sólidos totales y cenizas. Las gráficas representan el promedio de triplicados.

El contenido de ácidos láctico, acético y succínico, al igual que el etanol son los principales productos de fermentación cuantificados. El ácido láctico fue uno de los más abundantes, principalmente en el metzal con 11.8 g/L, mientras que en las demás muestras no rebasó los 4 g/L. El etanol fue el segundo metabolito más abundante incrementando del aguamiel al pulque con 5.6 a 33.3 g/L respectivamente. El ácido acético y el ácido succínico tuvieron valores promedio aproximados de 2 g/L durante toda la fermentación, estas mediciones coinciden con lo determinado en un trabajo previo donde describen que ningún ácido orgánico supera los 4 g/L (Chacón-Vargas et al., 2020) (Figura 5A). Tomando en cuenta la concentración promedio

de los carbohidratos se encontró que la sacarosa fue el carbohidrato más abundante en las muestras de aguamiel, con casi 58 g/L, mientras que conforme se desarrolló la fermentación ésta se hidrolizó hasta casi terminarse y quedar con 0.3 g/L residual. Tanto en la glucosa como en la fructosa se observó un incremento en el T0 y T3, posteriormente, en T6 una disminución del 59.2 % en el caso de la glucosa y del 18.41 % para la fructosa. Finalmente, el glicerol producido principalmente por el metabolismo de las levaduras se cuantificó con un máximo en el T6 de 1.72 g/L (Figura 5B).

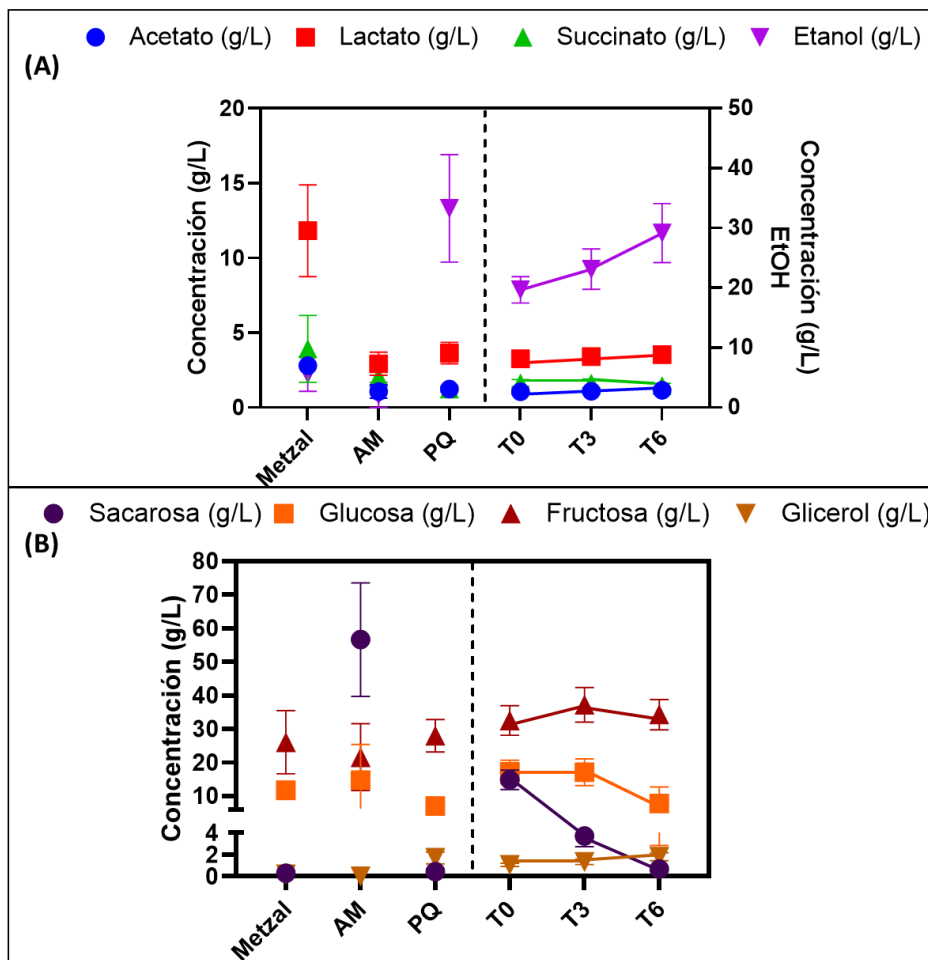


Figura 5. Características metabólicas de la fermentación. (A) Ácidos orgánicos y etanol. (B) Carbohidratos. Las gráficas representan el promedio de triplicados.

Los FOS identificados durante la fermentación fueron la nistosa (Glu-Fru3), fructosilnistosa (Glu-Fru4) y la kestohexosa (Glu-Fru5). Se observó un mayor número de FOS en las muestras de metzal, disminuyendo conforme se desarrolló el proceso fermentativo (Figura 6). El efecto de la hidrólisis de la sacarosa y la desaparición de los FOS se ha reportado como efecto de la acción de los microorganismos (Peralta-García et al., 2020) así como las concentraciones de azúcares que se pueden obtener al inicio de la fermentación en el aguamiel y en el pulque (Escalante et al., 2016; Chacón-Vargas et al., 2020).

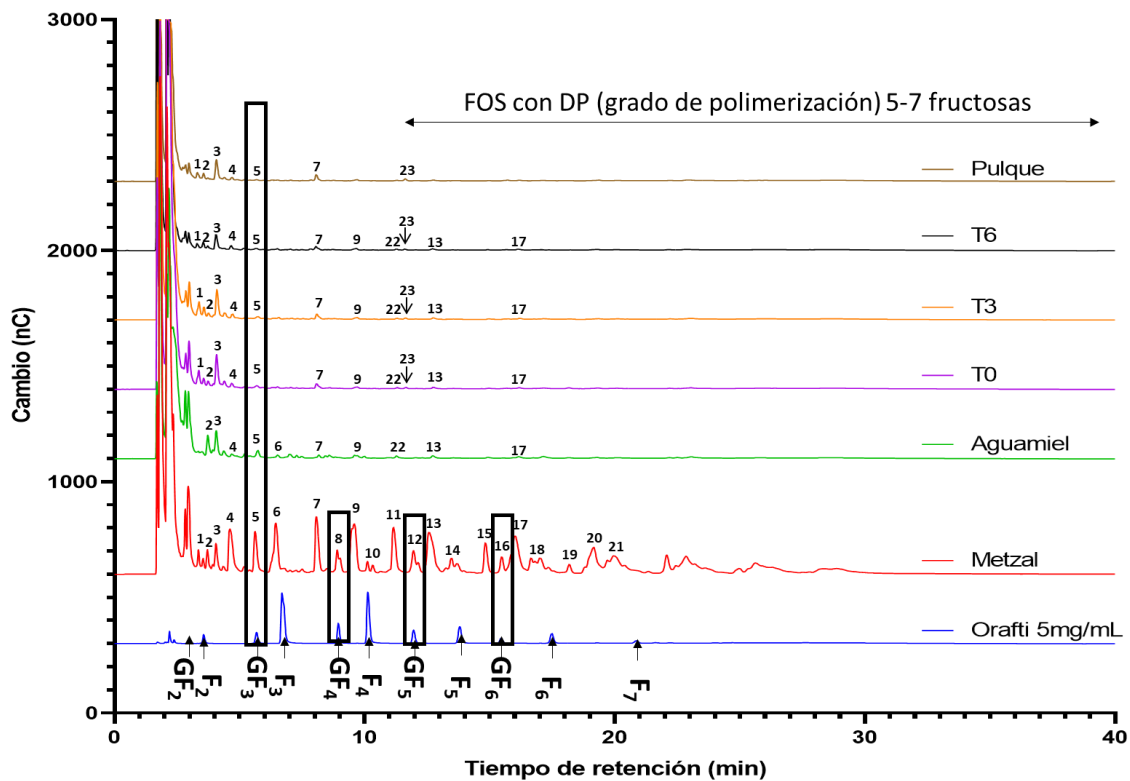


Figura 6. Identificación de fructooligosacáridos mediante HPAEC-PAD en metzal, aguamiel, tiempos de fermentación y pulque. Los rectángulos negros muestran los FOS identificados en las muestras analizadas. El número en los picos (1-23) en los cromatogramas muestran todos los FOS identificados. La línea azul corresponde al estándar de FOS utilizada (Orafti): GF2: 1-Ketosa, F2: Inulobiosa, GF3: Nistosa, F3: Inulotriosa, GF4: Fructosil-nistosa, F4: Inulotetrosa, GF5: Kestohexosa, F5: Inulopentosa, GF6: Kestohexosa, F6: Inulohexosa, y F7: Inuloheptosa. El cromatograma de cada muestra es el

promedio de los análisis individuales, por ejemplo, metzal= promedio del metzal 1, metzal 2 y metzal 3.

9.1.3 Asignación taxonómica y análisis de diversidad.

La secuenciación de las regiones hipervariables V3-V4 del gen ADNr 16S de todas las muestras analizadas (metzal, AM, tiempos de fermentación y muestra de pulque) resultó en un total de 1,098,819 de secuencias de bacterias las cuales fueron limpiadas y asignadas taxonómicamente con la base de datos de SILVA_132 al 97 % de identidad y con un corte de 0.01 % de abundancia relativa para descartar OTUs que sean quimeras, errores de secuenciación o cuyas abundancias fueron muy bajas y no tienen un impacto significativo en el ecosistema (Navas-Molina et al., 2015). Se identificaron 8 géneros que se mantuvieron en todas las muestras analizadas con una abundancia relativa promedio del 83% del total. *Zymomonas* fue el más abundante (58.76%) seguido de *Lactococcus* (8.04%), *Weissella* (7.08%), *Acetobacter* (5.4%), *Leuconostoc* (3.91%), *Obesumbacterium* (0.38%), *Gluconobacter* (0.06%) y *Lactobacillus* (0.05%) (Figura 7). Estos géneros ya se habían reportado en diferentes trabajos, sin embargo, algunos sólo estaban presentes en el aguamiel, otros en el pulque o en tiempos de fermentación (Escalante et al., 2016; Chacón-Vargas et al., 2020; Rocha-Arriaga et al., 2020; Valdivieso Solís et al., 2021a). De los géneros de bacterias que identificamos en esta parte del trabajo se compararon con los reportados en el estudio de Chacón-Vargas y colaboradores en el 2020, debido a que este antecedente analizó muestras de la misma región geográfica; coincidiendo con los géneros *Zymomonas*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, y en baja abundancia (>1% de abundancia relativa) están *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Obesumbacterium*, siendo *Weissella* el único género que no se tuvo en común, la asignación taxonómica a nivel de especie se presenta en el archivo anexo VI. Analizando la beta diversidad con el método de Bray-Curtis se observó que las muestras de aguamiel y metzal comparten la presencia de las bacterias y los tiempos de fermentación con el pulque utilizado como semilla (Figura 9A).

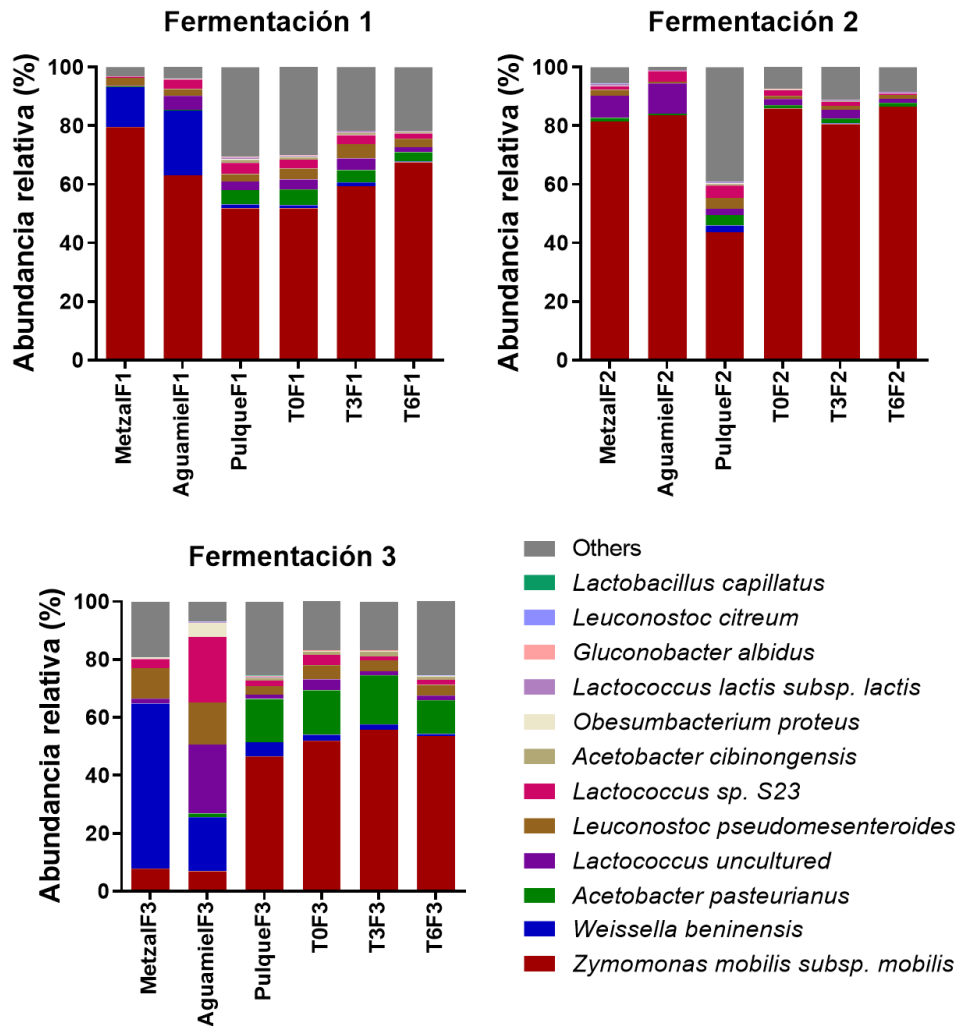


Figura 7. Identificación taxonómica de bacterias. La asignación se realizó utilizando la base de datos de SILVA132. Las gráficas representan las bacterias con más del 0.01% de abundancia relativa en todas las muestras analizadas.

Como resultado de la secuenciación de la Región Intergénica 1 (ITS1) se obtuvieron 3,107,428, de secuencias asignadas en 134 OTUs de hongos tanto levaduriformes como filamentosos. Sin embargo, 116 de éstos tenían una abundancia relativa menor al 0.01%. Cinco hongos fueron los que se conservaron en todas las muestras analizadas y representan más del 90% de la

abundancia relativa total. El género más abundante fue *Saccharomyces* (70.07 %) seguido de *Kluyveromyces* (18.13 %), *Kazachstania* (10.84 %), *Hanseniaspora* (0.27 %) y un OTU del orden de los Saccharomycetales (0.27 %) (Figura 8). La asignación taxonómica a nivel de especie se presenta en el archivo anexo VII. Al igual que con las bacterias estos géneros ya se habían asociado con el pulque y el aguamiel, sin embargo, en los trabajos previos de pulque en donde se utilizó la secuenciación masiva no coinciden en el género dominante, en uno se reporta que es *Saccharomyces* (Chacón-Vargas et al., 2020) y en el otro es *Kluyveromyces* (Rocha-Arriaga et al., 2020). Comparando los hongos identificados con el trabajo de Chacón-Vargas et. al 2020, sólo se compartieron 2 de los 4 géneros identificados, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*. Analizando las similitudes entre las fermentaciones encontramos nuevamente un comportamiento parecido al de las bacterias. Las muestras de tiempos de fermentación y pulque comercial están más asociadas que las de aguamiel y metzal (Figura 9B).

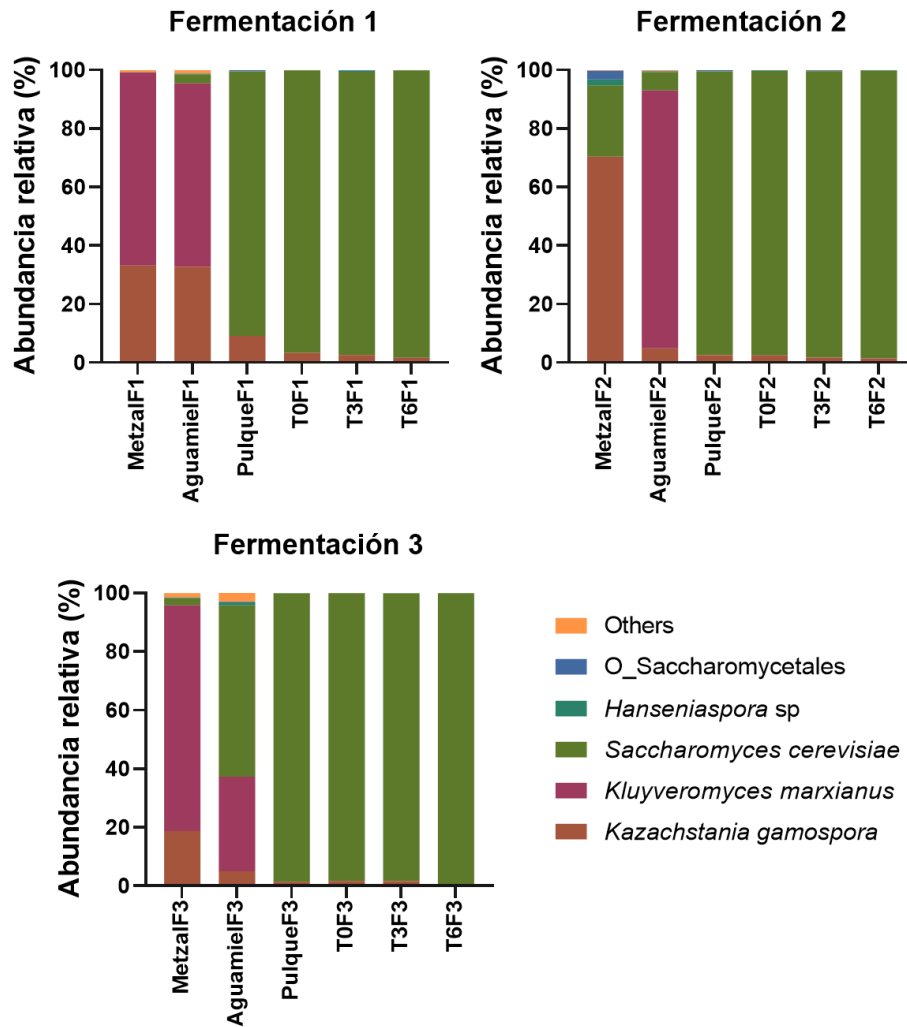


Figura 8. Identificación taxonómica de hongos. La asignación se realizó utilizando la base de datos UNITE 2021. Las gráficas representan los hongos con más del 0.01% de abundancia relativa en todas las muestras analizadas.

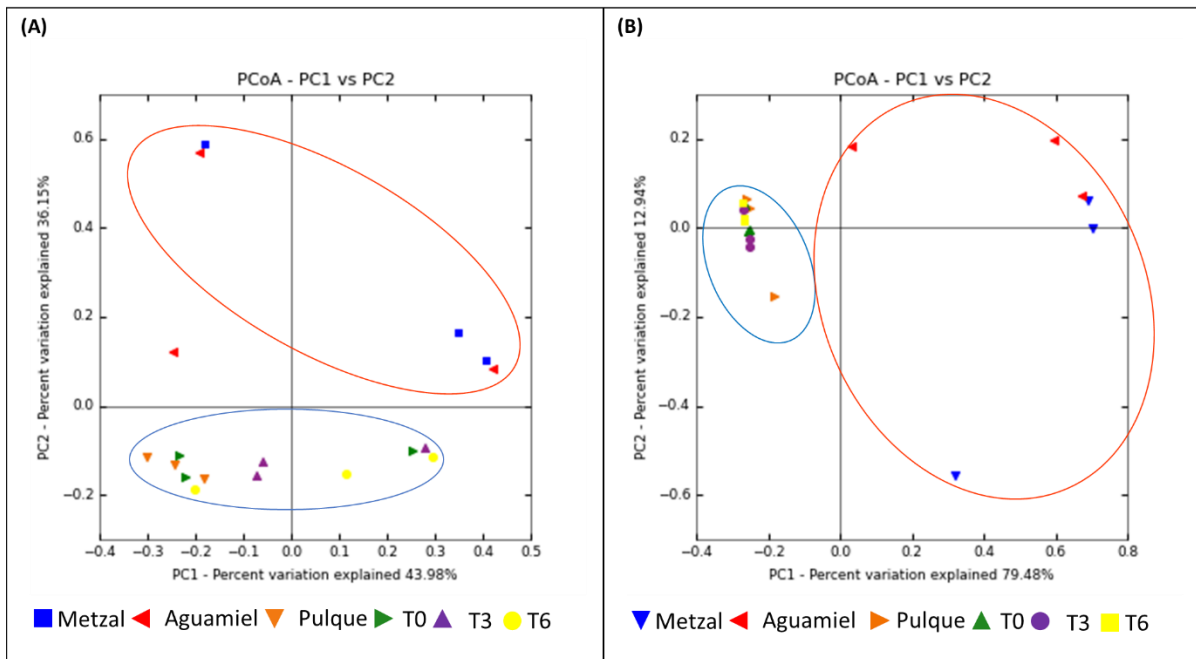


Figura 9. Beta diversidad. (A) Bacterias. (B) Hongos. PCoA con base al análisis de Bray-Curtis. El círculo rojo muestra la asociación entre el aguamiel y las muestras de metzal, mientras que el círculo azul muestra la asociación entre los tiempos de fermentación y el pulque comercial.

Con esto pudimos determinar que existe un *core*, tanto de bacterias como de hongos que estuvieron presentes en todas las muestras y etapas de la fermentación del pulque, el *core* está integrado por 8 géneros de bacterias y 4 de levaduras, así como un OTU del orden Saccharomycetales, siendo estos los géneros de mayor abundancia relativa de las muestras (Figura 10). Las bacterias y los hongos que correspondieron a la sección de otros se especifican en el anexo VI y VII respectivamente.

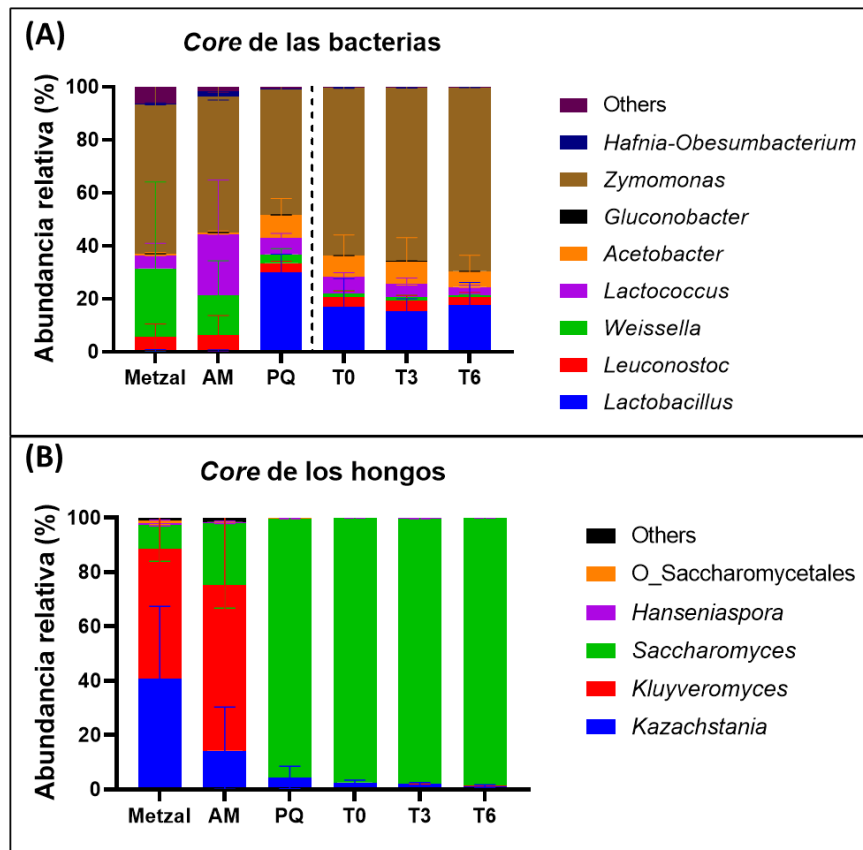


Figura 10. Dinámica de las poblaciones del core de bacterias y hongos en las muestras de pulque. Las gráficas representan el promedio de las abundancias relativas de las 3 fermentaciones.

En la siguiente parte del trabajo se evaluó si la presencia de los microorganismos que conforman al *core* encontrado en esta primera parte del trabajo se mantiene a través de un año evaluándolos en 4 puntos durante el mismo, en la misma región geográfica (Huitzilac, Morelos).

9.2. Segunda parte: ¿Qué tan estable es el *core*?

9.2.1. Muestreo y fermentación.

Se realizaron todas las colectas correspondientes a 4 momentos en el año con aproximadamente 3 meses de separación entre cada muestreo. Cada muestra se tomó por triplicado para cada uno de los elementos evaluados (metzal, aguamiel, T0, T3, T6 y pulque). El proceso de fermentación se realizó conforme lo descrito en la primera parte. Las fechas y condiciones de los muestreos están descritas en la Tabla 4.

Tabla 4. Fechas y condiciones ambientales de los muestreos.

Muestreo	Parámetro	Primera colecta	Segunda colecta	Tercera colecta
Primero	Fecha	03/05/2021	27/05/2021	10/06/2021
	Temperatura	12°C	12°C	12°C
	Humedad	52%	80%	74%
	Presión	1015 hPa	1017 hPa	1020 hPa
	Clima	Soleado	Mayormente Nublado	Mayormente nublado
Segundo	Fecha	19/08/2021	30/08/2021	02/09/2021
	Temperatura	21°C	13°C	12°C
	Humedad	84%	86%	91%
	Presión	1017 hPa	1018 hPa	1018 hPa
	Clima	Parcialmente nublado	Lluvia	Nublado
Tercero	Fecha	08/11/2021	11/11/2021	15/11/2021
	Temperatura	12°C	12°C	11°C
	Humedad	64%	62%	66%
	Presión	1023 hPa	1018 hPa	1023 hPa
	Clima	Parcialmente nublado	Parcialmente nublado	Soleado
Cuarto	Fecha	24/01/2022	03/02/2022	08/02/2022
	Temperatura	8°C	8°C	8°C
	Humedad	74%	58%	68%
	Presión	1016 hPa	1015 hPa	1019 hPa
	Clima	Parcialmente nublado	Soleado	Parcialmente nublado

9.2.2. Caracterización de parámetros físicos y metabólicos.

Para las determinaciones de pH, porcentaje de oxígeno disuelto (% OD) y del porcentaje de dióxido de carbono (% CO₂), de manera general, las 3 fermentaciones tuvieron un comportamiento similar en los parámetros medidos a través de los 4 momentos en el año. El pH disminuyó conforme se desarrolló la fermentación; pasando de 5.2 en aguamiel a 3.8 en pulque. El % OD a excepción del segundo muestreo donde se observó un incremento de 0.2 en el T0 a 0.6 en el T6, mientras que el % CO₂ tuvo un incremento del T0 al T3, cuyo valor se mantuvo estable durante el resto de la fermentación, obteniendo un máximo de 0.019% (Figura 11). Dentro de las diferencias observables por cada muestreo se tuvo un incremento en el pH inicial, es decir, en el primer muestreo el aguamiel fue más ácido que en el cuarto. En el caso del %CO₂ y % OD los valores se mantuvieron similares.

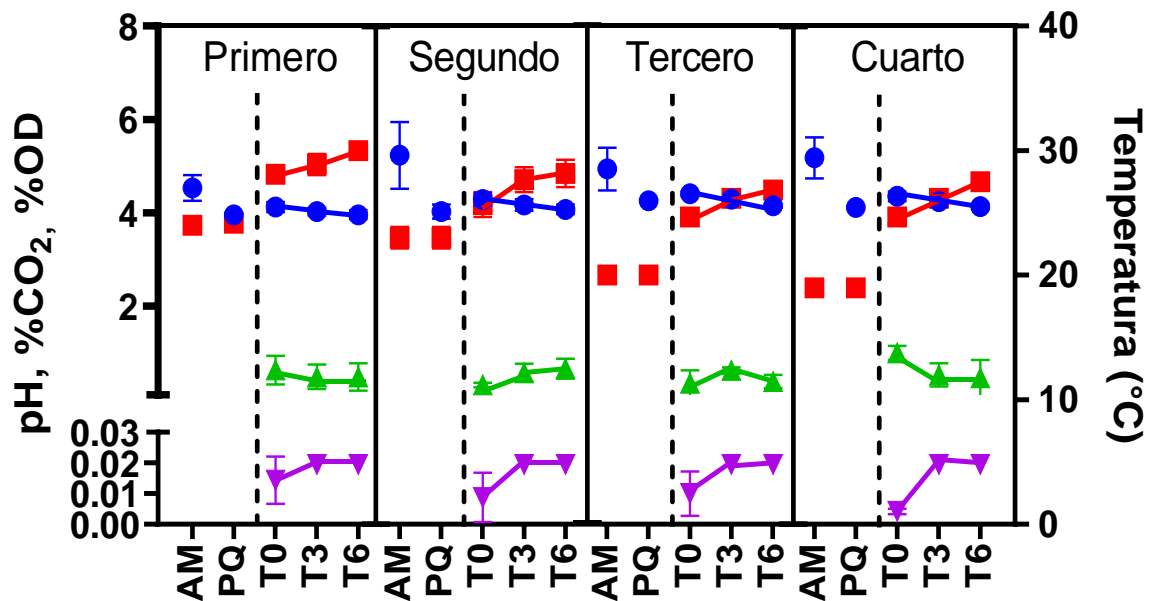


Figura 11. Parámetros físicos de la fermentación a través del año. Las gráficas representan el promedio de los triplicados cuantificados. Del lado derecho de la línea punteada se muestran los valores de las variables continuas pertenecientes al proceso de fermentación, del lado izquierdo son los valores del aguamiel y pulque obtenidos.

Para determinar si estos cambios observados tenían una significancia estadística se realizó un ANOVA de dos vías con una prueba de Tukey con un 95 % de confiabilidad, resultando que ninguno de los 3 parámetros evaluados presentó diferencias significativas a través del año. En general todos los parámetros coinciden con lo previamente reportado para el pulque, aguamiel y con los resultados observados para el análisis del proceso de fermentación en la primera parte de este proyecto (Escalante et al., 2016; Chacón-Vargas et al., 2020; Astudillo-Melgar et al., 2023).

Con respecto a los sólidos totales y biomasa, de manera general se observó una disminución en la cantidad de estos parámetros conforme avanza el año, presentando mayores valores en los primeros meses y menores en los últimos, siendo el aguamiel la muestra que presentó los valores más altos en los tres parámetros analizados y el pulque con los valores más bajos. En el caso de las cenizas se mantuvieron con una concentración promedio constante a excepción del último muestreo donde se observó un ligero incremento. Los sólidos totales van de los 128 g/L (aguamiel) a los 32 g/L (pulque) al igual que la biomasa, mientras que las cenizas se mantienen en un rango de 200 ± 50 mg/100mL (Figura 12). Realizando un ANOVA de dos vías con una prueba de Tukey con 95% de confiabilidad se determinó que únicamente existen cambios significativos en las cenizas del cuarto muestreo con una $p < 0.0002$. No existen muchos trabajos que comparen a detalle la cantidad de sólidos totales que debe tener el pulque o el aguamiel, sólo a nivel nacional la NMX-V-022-1972 establece que el aguamiel debe tener un rango entre 300-430 mg /100 mL de cenizas o menos de 100 mg /100 mL (Escalante et al., 2016). Comparando estos resultados con los publicados en la primera parte del presente proyecto se encontró que los valores promedio de los sólidos totales, biomasa y cenizas son muy cercanos con variaciones de ± 10 g/L.

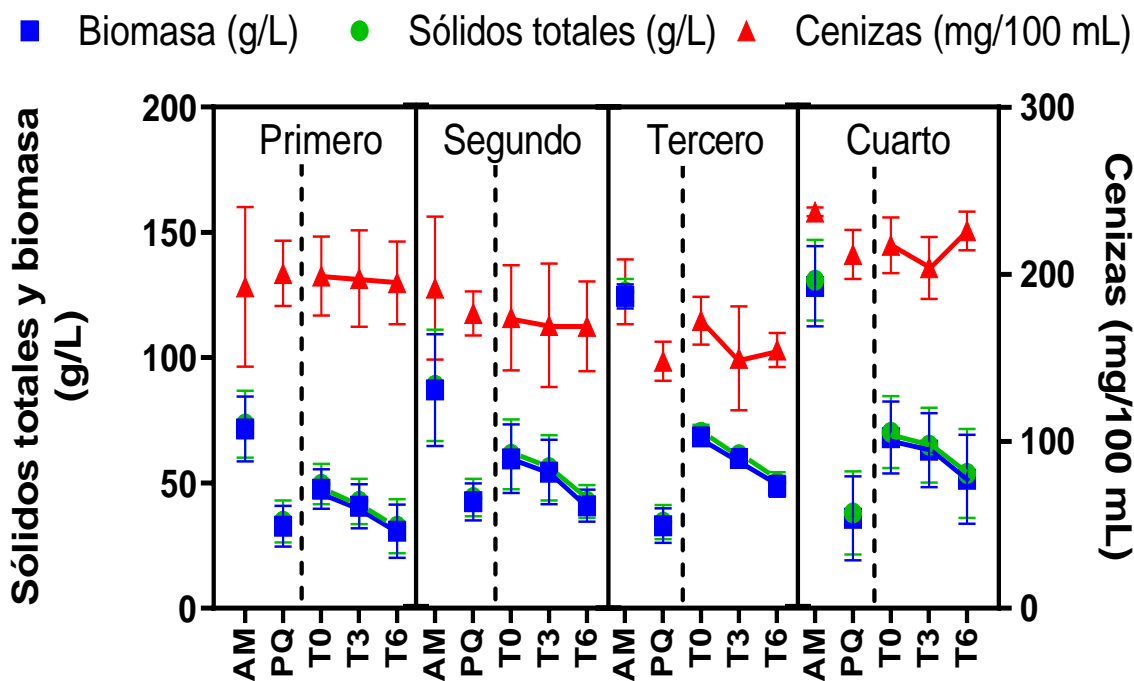


Figura 12. Sólidos totales, biomasa y cenizas de los cuatro muestreos a través del año. Las gráficas representan el promedio de los triplicados cuantificados. Del lado derecho de la línea punteada se muestran los valores de las variables continuas pertenecientes al proceso de fermentación, del lado izquierdo son los valores del aguamiel y pulque obtenidos.

Los azúcares, ácidos orgánicos y etanol fueron cuantificados en 12 fermentaciones para cada muestra: Metzal, AM, T0, T3, T6 y PQ, por cada muestreo y por triplicado. Para cada uno de los 4 muestreos se observó una tendencia similar, en todas las muestras de aguamiel el azúcar más abundante fue la sacarosa, mientras que del pulque y el metzal fue la fructosa; en el caso de los tiempos de fermentación se observó un decremento en la glucosa y sacarosa, un incremento en el etanol y una concentración menor de 4 g/L en los ácidos orgánicos (Figuras 12 y 13). El promedio de los carbohidratos en sus concentraciones máximas de los 4 muestreos fue de 56 g/L (aguamiel) hasta casi 0.5 g/L (T6 y pulque) para la sacarosa, 10 g/L de glucosa y 22 g/L de fructosa, mientras que el glicerol estuvo no mayor a 4 g/L (Figura 13).

● Sacarosa (g/L) ▲ Glucosa (g/L) ■ Fructosa (g/L) ▼ Glicerol (g/L)

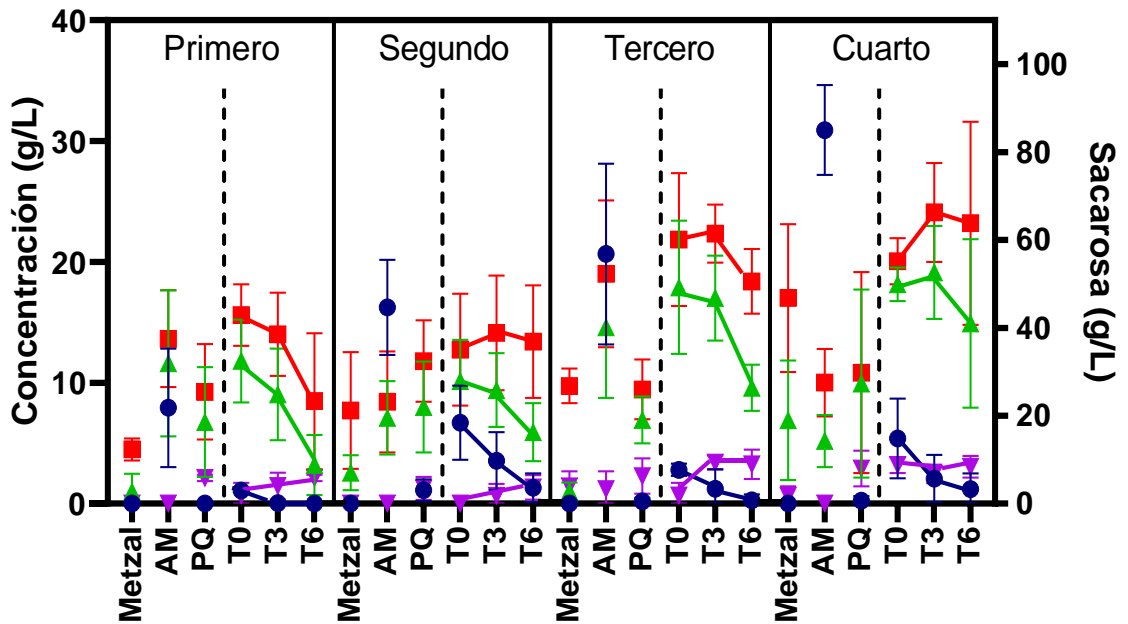


Figura 13. Concentración de carbohidratos a través del año. Las gráficas representan el promedio de los triplicados cuantificados. Del lado derecho de la línea punteada se muestran los valores de las variables continuas pertenecientes al proceso de fermentación, del lado izquierdo son los valores del aguamiel y pulque obtenidos.

Con respecto a los ácidos orgánicos en las muestras de aguamiel, pulque y tiempos de fermentación se obtuvieron cantidades menores o iguales a 4 g/L. En el caso de las muestras de metzal se obtuvieron concentraciones máximas de 7 g/L de ácidos orgánicos siendo el ácido láctico el de mayor concentración (Figura 14).

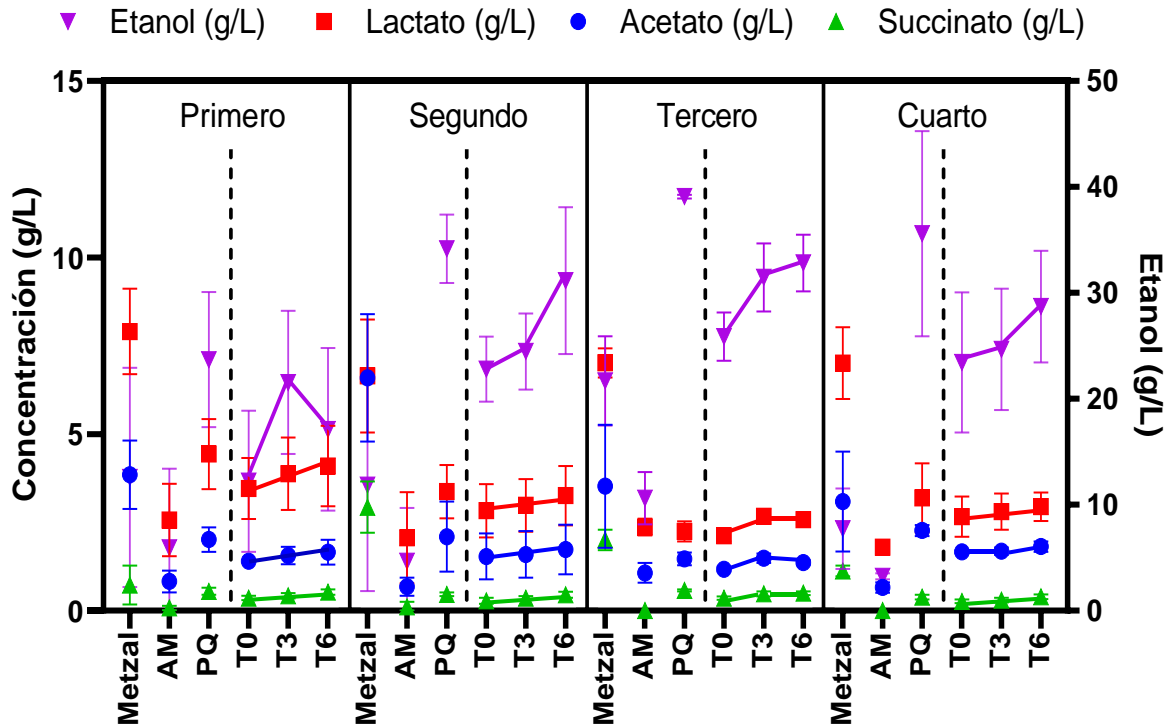


Figura 14. Concentración de ácidos orgánicos y etanol a través del año. Las gráficas representan el promedio de los triplicados cuantificados. Del lado derecho de la línea punteada se muestran los valores de las variables continuas pertenecientes al proceso de fermentación, del lado izquierdo son los valores del aguamiel y pulque obtenidos.

Para evaluar si estas tendencias observadas tenían cambios significativos, por cada muestreo se realizó también una ANOVA de 2 vías con 95% de confiabilidad en la cual se encontró que el primer muestreo fue el que presentó menor concentración de sacarosa y etanol y mayor cantidad de lactato; mientras que la tercero fue el muestreo con mayor concentración de fructosa y etanol. En trabajos previos se reportó la concentración de azúcares, etanol y ácidos orgánicos en los cuales cambia principalmente en la cantidad de azúcares iniciales en el aguamiel y en el T0 de fermentación (Chacón-Vargas et al., 2020; Astudillo-Melgar et al., 2023), sin embargo, se ha reportado que la composición de la savia puede cambiar con respecto a la estacionalidad, temporalidad, tipo de planta y hora de colecta (Peralta-García et al., 2020).

En el caso de la identificación del perfil de fructooligosacáridos, se observaron cambios en los 4 muestreos, de manera general se identificaron a la 1-kestosa (Glu-Fru2), inulobiosa (Fru2), fructosilnistosa (Glu-Fru4), inulotetrosa (Fru4), kestoheptosa (Glu-Fru5), inulopentosa (Fru5) y kestoheptosa (Glu-Fru6), de los cuales la mayoría de éstos estuvieron presentes en el segundo muestreo. Los FOS se analizaron con el método de Ward con el índice de similitud euclidiano y se encontró que los perfiles del primer y último muestreo se agrupan y por otra parte el segundo y el tercero también presentaron agrupación, una posible explicación a las agrupaciones antes descritas podría ser el factor temporalidad, debido a que el primer y cuarto muestreo coincidieron con la temporada de secas mientras que la segunda y la tercera correspondieron a la temporada de lluvias (Figura 15). La variación en el perfil de fructooligosacáridos en el tiempo puede ser el resultado de la dilución, consumo o hidrólisis durante el proceso de acumulación de aguamiel en el cajete después del raspado de la planta o durante el desarrollo de la fermentación (Peralta-García et al., 2020). Además de la presencia de enzimas como invertasas e inulinasas que pueden ser secretadas por la misma planta o por los microorganismos del aguamiel y que pueden ser estables hasta por 5 meses (Ortiz-Basurto et al., 2008).

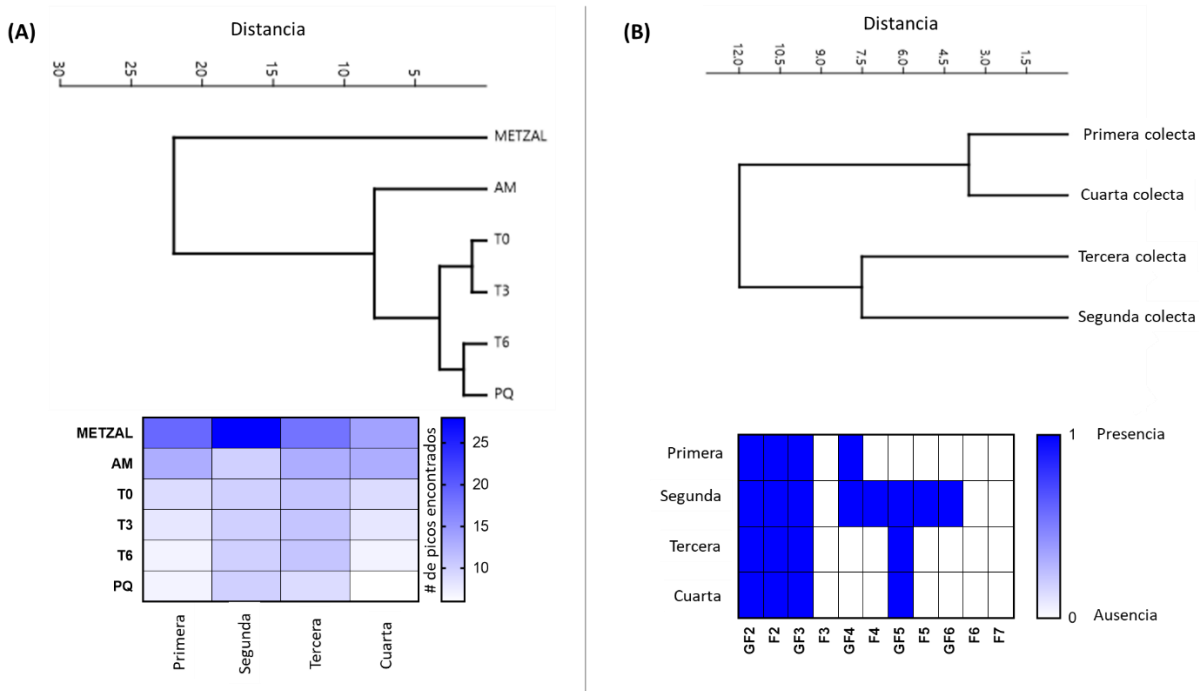


Figura 15. Perfil de fructooligosacáridos a través del año en metzal, aguamiel, pulque y durante 6 horas de fermentación. (A) El cladograma muestra las similitudes de las muestras con respecto al número de picos identificados como FOS, mientras que el mapa de calor muestra los cambios a través del tiempo. (B) El cladograma muestra las similitudes de las muestras con respecto a los cuatro muestreos, mientras que el mapa de calor muestra los FOS que se identificaron del estándar que se tenía. Para el análisis se usó el método de Ward con el índice de similitud euclidiano.

Una vez que se determinaron los cambios en los parámetros físicos, carbohidratos y los principales metabolitos producto de la fermentación para cada muestreo, se procedió con el análisis de la secuenciación a partir de marcadores moleculares para identificar a las bacterias y hongos de todas las muestras.

9.2.3 Asignación taxonómica y análisis de diversidad.

Como resultado de la secuenciación de las regiones hipervariables V3-V4 del gen ADNr 16S, se obtuvieron más de 12,344,832 de secuencias de los 4 muestreos. Todas las librerías cuentan

con más de 100 000 lecturas lo cual es lo mínimo que se ha presentado en trabajos previos para un análisis de diversidad en bebidas fermentadas (Astudillo-Melgar et al., 2019). Del total de secuencias y después asignarlas taxonómicamente se filtraron los datos con un corte del 0.01% para descartar quimeras, errores de secuenciación y OTUs que no tengan un impacto significativo en el ecosistema (Navas-Molina et al., 2015), obteniendo una asignación máxima de 54 OTUs (variable entre cada muestreo). El análisis de la primera muestra (mayo de 2021) se asignaron 16 géneros más abundantes, 11 en el segundo (agosto de 2021), 10 del tercero (noviembre de 2021) y 9 del cuarto (enero de 2022). Los géneros representativos de las muestras son *Zymomonas*, (como bacteria etanológica); *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* (dentro de las bacterias ácido lácticas); *Acetobacter* (dentro de las bacterias ácido acéticas) y otro tipo de proteobacterias y enterobacterias (Figura 16), las especies bacterianas que forman el *core* se encuentran en el anexo VIII. En la Tabla 5 observamos el porcentaje de la abundancia relativa al que correspondió cada uno de estos géneros por muestreo y observamos una tendencia en la cual los géneros *Leuconostoc* y *Lactococcus* están en mayor abundancia (>5%) en las muestras de aguamiel que durante el tiempo de fermentación o en el pulque mismo.

Tabla 5. Abundancia relativa de los géneros más representativos de los 4 muestreos.

Muestreo	Muestra	<i>Lactobacillus</i>	<i>Zymomonas</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Acetobacter</i>
		Abundancia relativa (%)				
Primero	Metzal	14.97	35.13	17.10	4.10	0.67
	AM	14.67	30.27	21.67	5.70	0.50
	PQ	55.30	11.77	3.60	2.20	2.33
	T0	41.33	19.07	4.57	2.20	2.43
	T3	46.20	14.97	2.73	1.77	1.47
	T6	57.53	11.80	1.87	1.40	1.37
Segundo	Metzal	10.73	43.53	17.27	8.90	0.63
	AM	11.27	33.33	23.93	17.83	0.67
	PQ	51.80	31.60	4.03	3.70	2.93
	T0	38.90	37.53	7.00	7.07	2.03
	T3	40.97	39.67	4.07	6.07	1.60
	T6	45.70	40.37	2.63	5.20	1.00
Tercero	Metzal	22.83	58.83	8.57	5.90	1.07
	AM	29.00	47.67	12.10	6.33	1.27
	PQ	37.20	34.47	12.90	7.40	3.77
	T0	29.30	43.43	10.83	7.80	1.97
	T3	30.67	45.43	10.43	6.07	1.87
	T6	35.80	44.50	8.90	5.80	1.27
Cuarto	Metzal	6.60	38.73	6.97	30.83	2.43
	AM	7.17	33.33	16.37	32.97	3.70
	PQ	59.87	19.47	3.23	6.03	7.70
	T0	51.63	26.23	3.93	8.57	5.87
	T3	54.67	25.73	3.80	8.27	4.07
	T6	57.27	25.43	3.37	8.03	2.93

Los dos géneros dominantes en todas las muestras son *Zymomonas* y *Lactobacillus*, estos ya han sido reportados como de los más dominantes en muestras de aguamiel y pulque. (Chacón-Vargas et al., 2020), sobre todo en el caso particular del pulque reportan a *Zymomonas* como el género más abundante (Chacón-Vargas et al., 2020), sin embargo, existe otro trabajo en donde el género más abundante es *Sphingomonas*(Rocha-Arriaga et al., 2020).

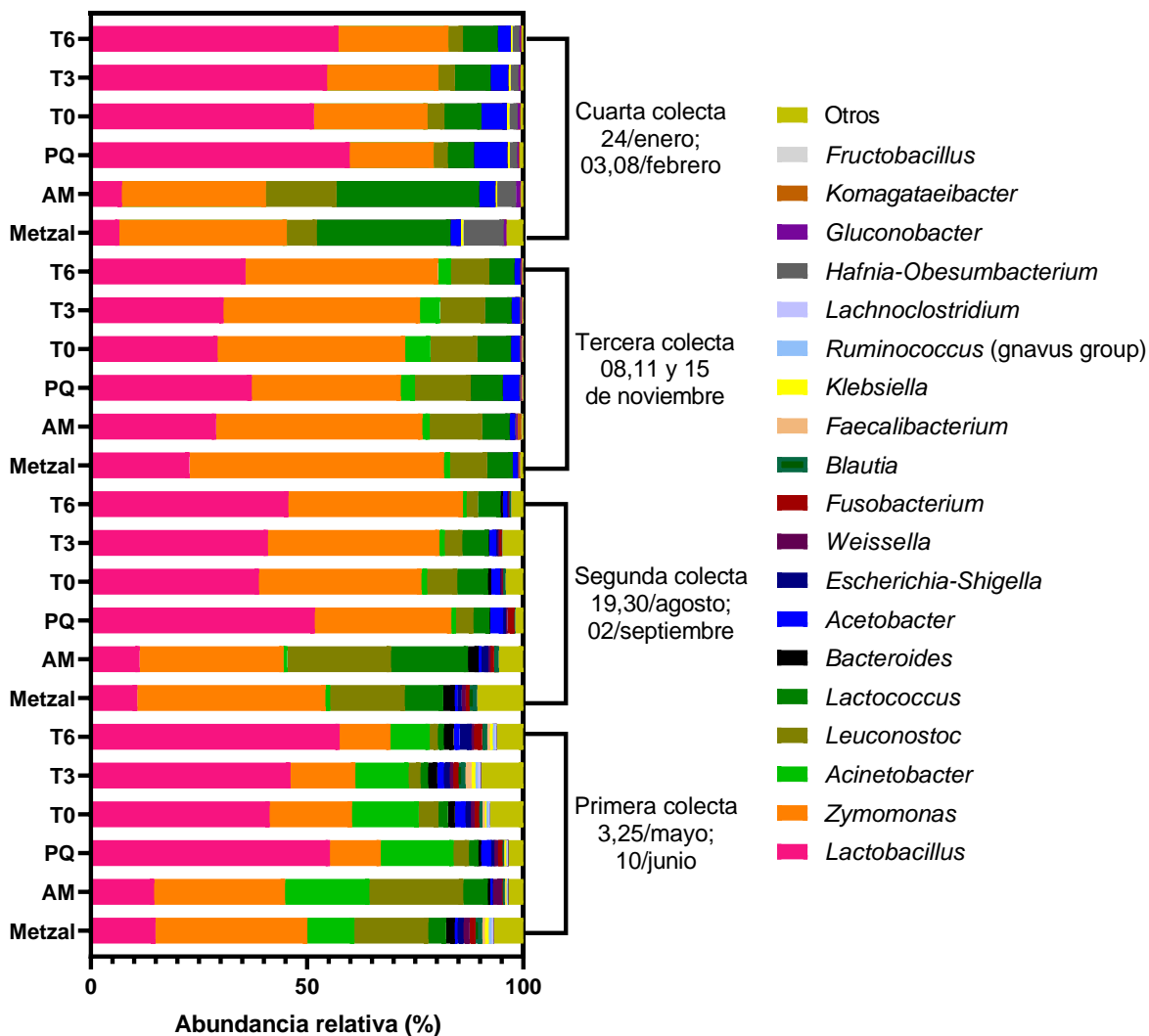


Figura 16. Diversidad bacteriana en cada etapa de la fermentación del pulque para cada muestreo. Las gráficas representan las bacterias con más del 0.01% de abundancia relativa.

Como resultado de la secuenciación de la Región Intergénica 1 (ITS1) se obtuvieron más de 11,486,000 secuencias. Se realizó la asignación taxonómica por el método "open" obteniendo un máximo de 51 OTUs de hongos levaduriformes y filamentosos (variable entre cada muestreo), haciendo un filtrado en la abundancia del 0.01% quedaron 8 OTUs para el primer muestreo, 7 para el segundo y 5 para el tercero y cuarto (Figura 17). Se identificaron a *Kluyveromyces marxianus* y *Kazachstania gamospora* como las dos levaduras más dominantes

en todas las muestras de los 4 muestreos, estos géneros ya se han reportado con anterioridad en trabajos de pulque en diferentes abundancias dependiendo del estudio y de la región del cual se estudiaron, sin embargo los dos géneros más dominantes en general de hongos levaduriformes han sido *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus* (Escalante et al., 2016; Chacón-Vargas et al., 2020; Rocha-Arriaga et al., 2020). Los resultados obtenidos no coinciden con lo previamente reportado, donde *Saccharomyces cerevisiae* es la especie de hongo más abundante durante el proceso fermentativo del pulque y en la semilla (pulque) (Chacón-Vargas et al., 2020).

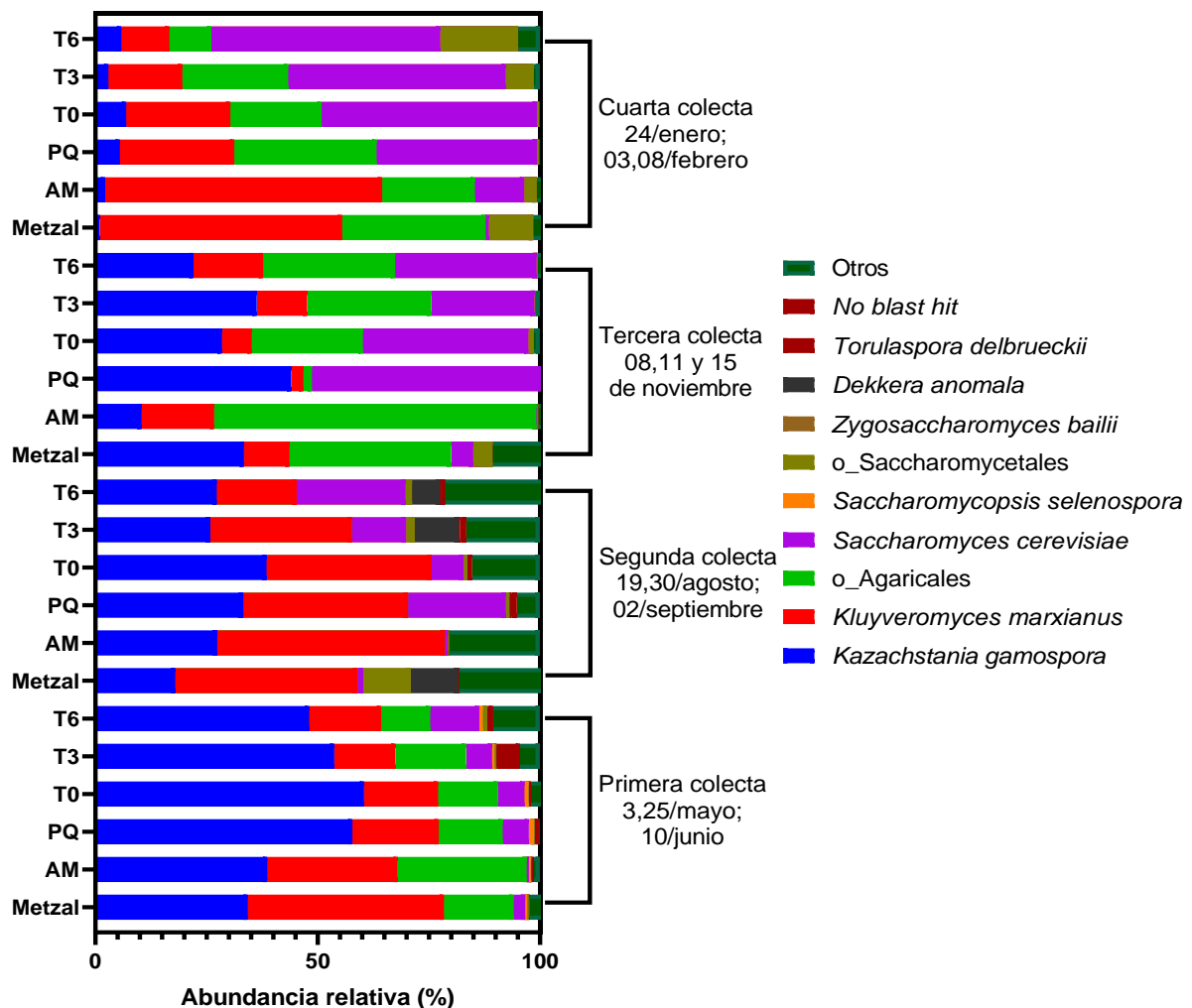


Figura 17. Diversidad de hongos en cada etapa de la fermentación del pulque para cada muestreo. Las gráficas representan a los hongos con más del 0.01% de abundancia relativa.

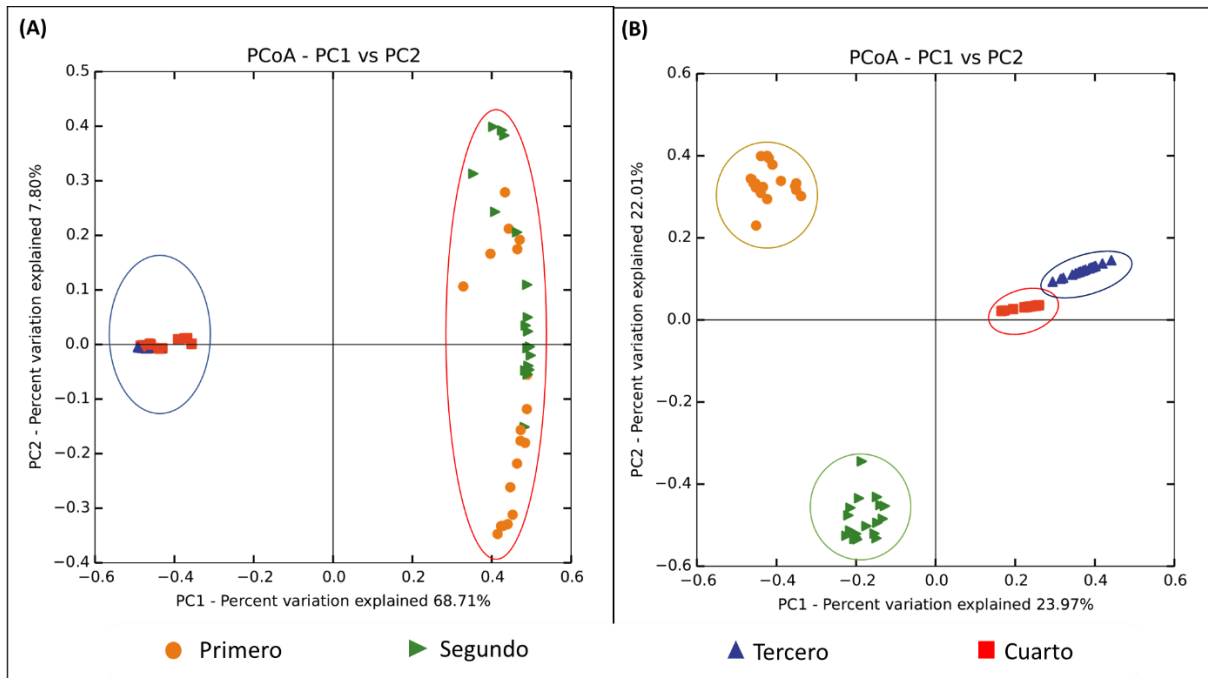


Figura 18. Beta diversidad de los cuatro muestreos. (A) Bacterias, (B) Hongos). PCoA con base al análisis de Bray-Curtis. Los círculos de colores representan la agrupación de los muestreos.

Por el método de Bray-Curtis acoplado a un análisis estadístico de Coordenadas principales (PCoA) se analizaron la diferencias o similitudes en la diversidad por cada muestreo, en el caso de las bacterias se observó una asociación entre el primer y segundo muestreo, y otro grupo formado por el tercer y cuarto muestreo (Figura 18A). Esta agrupación se asocia con el número de OTUs identificados y la abundancia relativa de aquellos que tuvieron menos dominancia, ya que el tercer y cuarto muestreo tuvieron 10 y 9 OTUs identificados respectivamente los cuales tenían un porcentaje de la abundancia relativa mayor que en los muestreos 1 y 2. En el caso de los hongos podemos ver una clara agrupación por muestreo, lo cual nos indica que en el caso de las bacterias se mantienen más estables a través del tiempo, tanto en lo relativo a la presencia como a la abundancia de las mismas (Figura 18B). Por el contrario, los hongos se ven afectados por la diversos factores como pudieran ser la estacionalidad y la temporalidad ya que a pesar de tener géneros compartidos la abundancia relativa de los mismos no es igual.

Calculando la alfa diversidad con los índices de Chao1, Shannon, Simpson y *Observed_Otus* se analizó el comportamiento de la diversidad (la dominancia, la equidad, etc.)(anexo IX). En la Figura 19A observamos que en el caso de las bacterias el primer muestreo presentó la mayor diversidad, pero principalmente por la presencia de OTUs con baja abundancia relativa mientras que en el tercer muestreo tuvo menor diversidad, pero con mayor dominancia. En el caso de los hongos tienen variación en los 4 muestreos, pero el segundo fue el de mayor diversidad y el cuarto el de menor diversidad, en este caso se podría asociar que los hongos se ven beneficiados con la presencia de lluvias (meses de agosto y septiembre, segundo muestreo) y afectado por las temporadas de secas (meses de enero-febrero, 4° muestreo) (Figura 19B), la tabla de valores de cada muestra de alfa diversidad se encuentran en el archivo anexo IX.

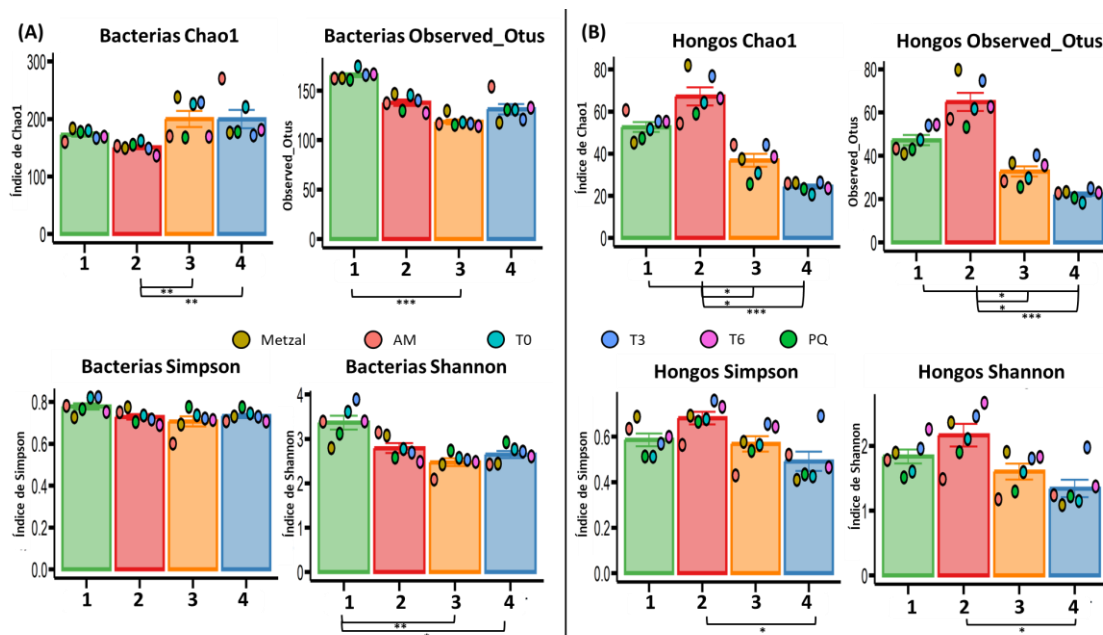


Figura 19. Alfa diversidad de bacterias y hongos de los 4 muestreos. (A) Bacterias. (B) Hongos. Las gráficas representan el promedio de los triplicados de los índices de cada muestra y por cada muestreo. Se realizó un análisis de Kruskal Wallis y una prueba post hoc Dunn Con para determinar diferencias significativas: * <0.05; ** <0.001; ***<0.0001.

De acuerdo con resultados de diversidad bacteriana y de hongos, los microorganismos que pudieran ser considerados como el *core* del proceso completo de elaboración del pulque desde el metzal, aguamiel y en todos los pasos de la fermentación, así como durante todo el año con un porcentaje de abundancia relativa mayor al 0.01% se representan en la Figura 20 y en la tabla en el anexo X.

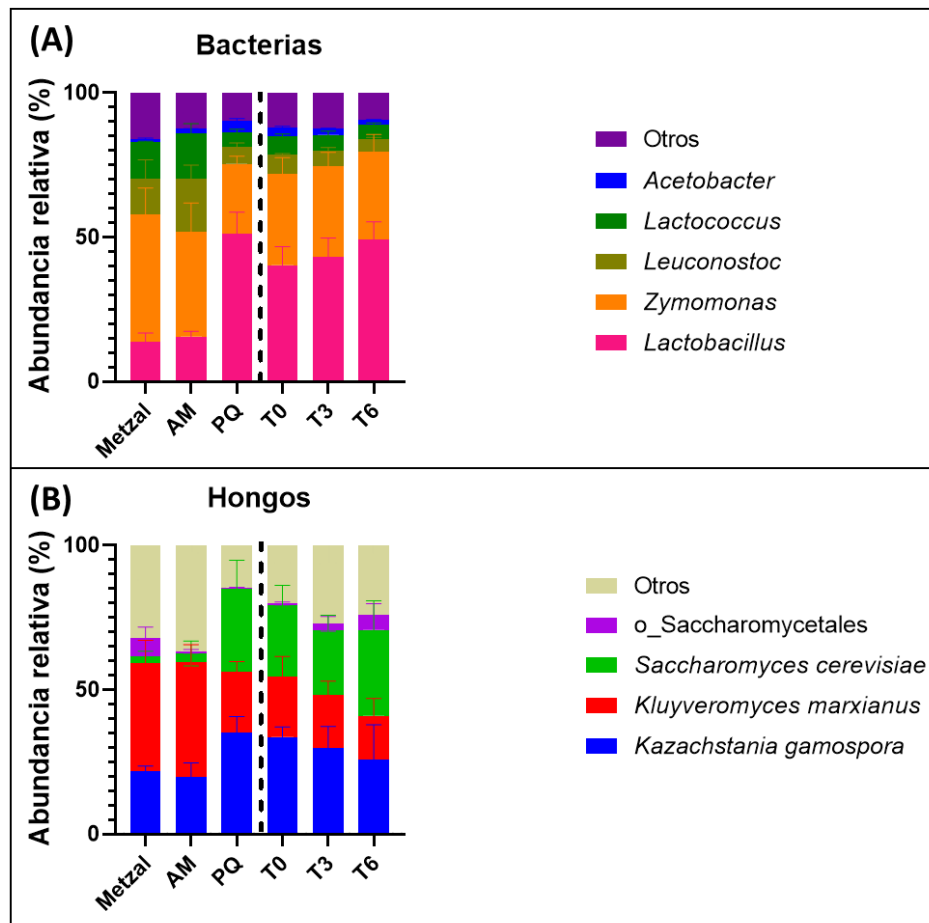


Figura 20. Dinámica de las poblaciones del core de bacterias y hongos conservados a través de los cuatro muestreos. (A) Bacterias. (B) Hongos. Las gráficas representan el promedio de las 12 fermentaciones realizadas durante 4 momentos en el año.

Los géneros bacterianos más abundantes fueron *Lactobacillus* y *Zymomonas*, lo cual coincide con lo reportado con trabajos previos del pulque (Chacón-Vargas et al., 2020; Escobar-Zepeda et al., 2020), con la diferencia el género de *Lactobacillus* tiene mayor abundancia relativa en este trabajo. Caso similar sucedió en los hongos, los géneros pertenecientes al *core* ya se

reportaron, Chacón-Vargas et al. 2020, no encuentran al género *Kazachstania*, mientras que *Saccharomyces* tuvo una dominancia (con respecto a los hongos) en todas las muestras analizadas (Chacón-Vargas et al., 2020), en el trabajo de Rocha-Arriaga en el 2020, donde se describió que *Saccharomyces* no era el género dominante de los hongos y *Kluyveromyces* y *Kazachstania* tenían mayor abundancia relativa (Rocha-Arriaga et al., 2020). Con respecto a la primera parte de este trabajo el *core* se mantuvo un 70% puesto que los géneros *Weissella*, *Gluconobacter*, *Obesumbacterium* y *Hanseniaspora* encontrados como parte del *core* desaparecieron o tuvieron una abundancia relativa menor al 0.01% en algunos de los muestreos realizados durante el año.

La probabilidad de que los microorganismos que se proponen como la microbiota asociada al proceso completo de elaboración del pulque de Huitzilac, Morelos (Figura 20) pudieran ser los mismos en general del pulque se sustenta en un trabajo realizado en el 2017, donde se analizó la microbiota asociada a los agaves, entre ellos el *Agave salmiana*, el cual es un maguey pulquero y fue el utilizado en este trabajo. Sus resultados sustentan la hipótesis de que el *core* de bacterias (a nivel de familia) principalmente, asociadas a esta planta es compartido por al menos 2000 Km de distancia (Fonseca-García et al., 2017). Sin embargo, esto aún se tendría que evaluar experimentalmente.

9.3. Tercera parte: Inferencia funcional del core durante el proceso de fermentación.

Una vez establecidos los miembros del *core* se analizó su potencial uso funcional de estos microorganismos dentro del proceso fermentativo del pulque (Figura 21). El consumo de la sacarosa junto con la producción del etanol se asocia principalmente a *Zymomonas* y *Saccharomyces*. Esta asociación se viene estudiando desde los trabajos de Sánchez-Marroquín and Hope en 1953 (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953). Ambos microorganismos transportan e hidrolizan la sacarosa, glucosa y fructosa por la vía de Entner-Duodoroff en el caso de *Zymomonas* (Swings and De Ley, 1977; Sprenger, 1996; Yang et al., 2016) y la de Emden-Meyerhoff-Parnas en el de *Saccharomyces*, la cual direcciona el flujo de carbono a la fermentación alcohólica (Walker and Stewart, 2016). *Saccharomyces* se ha reportado como productora de ácido succínico producido por el brazo reductor del ciclo de los ácidos

tricarboxílicos mientras que el glicerol que también fue detectado en este trabajo, pero en bajas concentraciones, se propone como un producto de las reacciones del balance redox o como respuesta fisiológica al estrés osmótico (Walker and Stewart, 2016). El glicerol también se ha reportado que contribuye a la viscosidad de bebidas fermentadas (Walker and Stewart, 2016). El género *Leuconostoc* ha sido ampliamente reportado en aguamiel y pulque (Sánchez-Marroquín and Hope, 1953; Chacón-Vargas et al., 2020; Rocha-Arriaga et al., 2020), tiene la capacidad de internalizar la sacarosa a través de una permeasa y con una enzima intracelular (sacarosa fosforilasa) la convierte en D-fructosa y α -D-glucosa-1-fosfato (Dols et al., 1997), además de catabolizar la glucosa a través de la transcetolasa y las vías heterofermentativas que producen ácido láctico etanol y ácido acético. *Lactobacillus* y *Lactococcus* catabolizan la glucosa y fracciones de fructosa en la cual dependiendo de la especie puede ser homofermentativa o heterofermentativa produciendo ácidos láctico, acético y etanol (Escalante et al., 2016; Pérez-Armendáriz and Cardoso-Ugarte, 2020). *Acetobacter* es considerado un género productor de ácido acético principalmente por la oxidación del etanol, además de algunas moléculas de sabor como la dihidroxiacetona producida a partir del glicerol (Mamlouk and Gullo, 2013). *Kluyveromyces marxianus* es una levadura que produce etanol, glicerol a partir de sacarosa, glucosa y fructosa (Karim et al., 2020), además de producir enzimas como lipasas, β -galactosidasas e inulinasas las cuales podrían ser las principales responsables de la hidrólisis de los fructooligosacáridos; producción de bioetanol, y compuestos aromáticos (Karim et al., 2020). *Kazachstania gamospora* es otra levadura encontrada como una de las principales y más abundantes que está asociada con la producción de compuestos aromáticos (3-metil-1-butanol, 1-hexil-acetato y fenetil-2-metilbutirato) (Zhou et al., 2017).

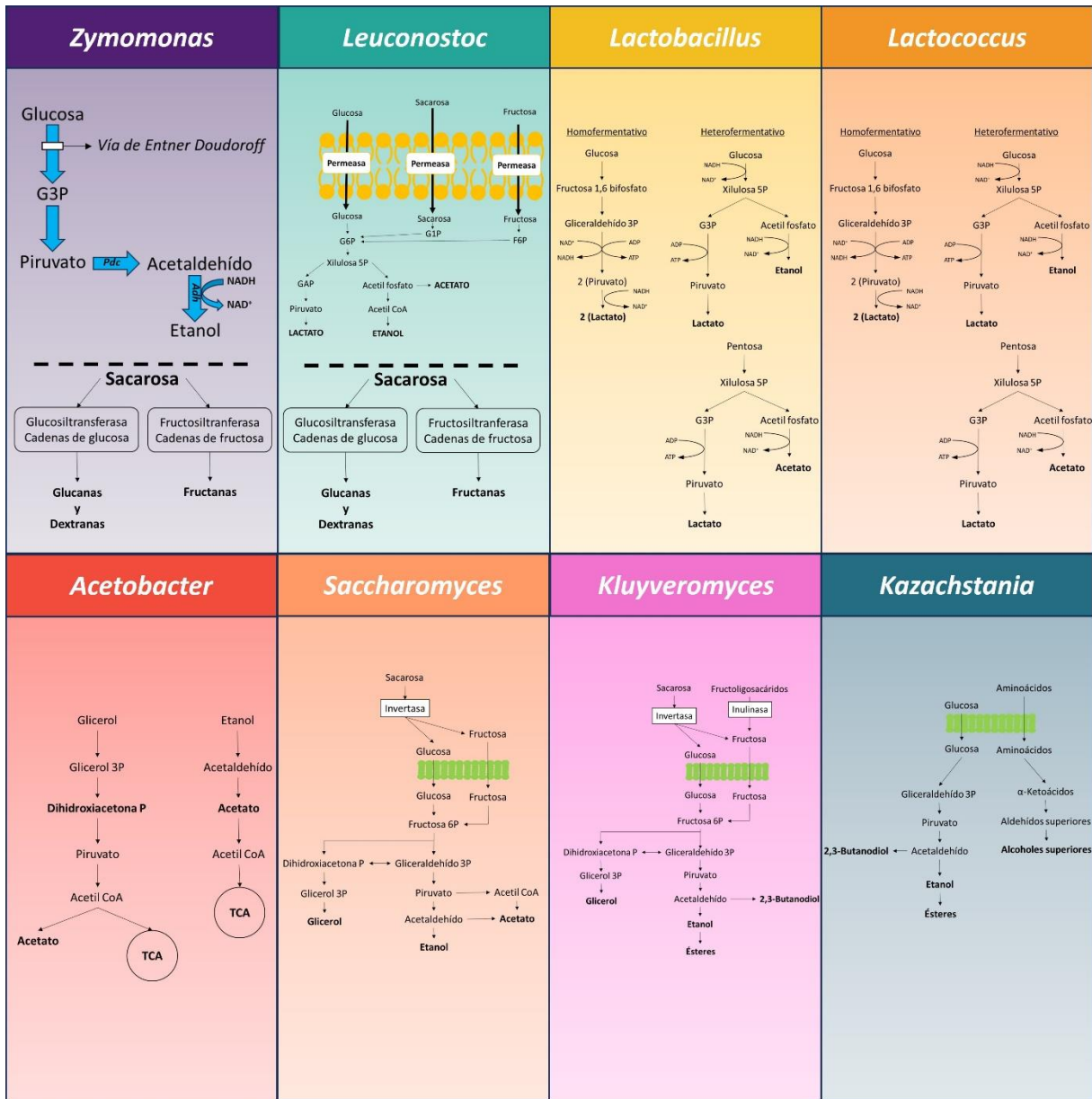


Figura 21. Esquema de las principales vías metabólicas del core microbiano. En esta figura se representan el potencial uso funcional de los microorganismos pertenecientes al core dentro del proceso fermentativo del pulque.

Todos los microorganismos que pertenecen al core propuesto en este trabajo ya fueron descritos en trabajos previos, ya sea en aguamiel y/o pulque de diferentes regiones del país, sin embargo, nunca se había evaluado su presencia durante diferentes etapas de un proceso, así como su estabilidad a través del año, sólo existían reportes puntuales.

Comparando el promedio de las abundancias relativas de los microorganismos de los 4 muestreos con el promedio de la concentración obtenida de los ácidos orgánicos y del etanol en todos los muestreos, se realizó una correlación de Spearman para analizar si existe una correlación entre los metabolitos y el aumento o disminución de la abundancia relativa de los microorganismos (Figura 22).

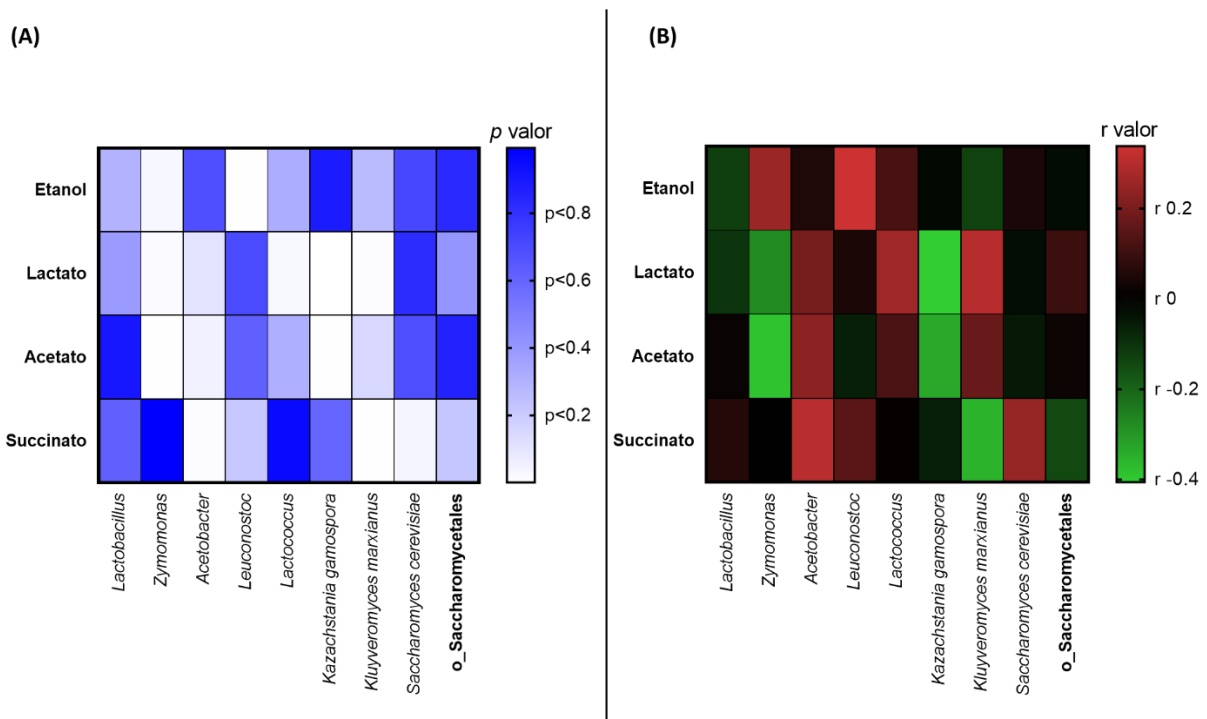


Figura 22. Correlación de Spearman entre los metabolitos cuantificados y el core. (A) Valor de p . (B) Valor de r . En análisis se realizó con el promedio de las concentraciones y abundancias relativas de los cuatro muestreos.

Tomando en cuenta de que se trata del promedio de los valores de los 4 muestreos se obtuvieron valores de r relativamente bajos. Sin embargo, observamos correlaciones esperadas con base a lo reportado en la literatura. *Zymomonas* posee una correlación positiva y significativa con la producción de etanol; *Lactococcus* y *Leuconostoc* presentan una correlación positiva con la producción de ácido láctico y etanol respectivamente. *Acetobacter*

dio una correlación positiva y significativa a la presencia de ácido acético. Con las levaduras vimos que *Saccharomyces* no dio una correlación significativa con el etanol, pero si con el ácido succínico, *Kluyveromyces* con la producción de ácido láctico mientras que *Kazachstania* mostró una correlación negativa con la presencia de ácido láctico y acético lo cual sugiere la abundancia relativa de dicha levadura se ve afectada con la presencia de esos metabolitos. Comparando con un análisis similar realizado por Chacón-Vargas et al. en el 2020, se encontró que para el etanol se tuvo una correlación positiva y significativa con el género *Zymomonas*, pero no con *Saccharomyces*, al igual que en el presente trabajo, lo que refuerza la importante que tiene *Zymomonas* para producción del etanol (Chacón-Vargas et al., 2020). Con el resto de los géneros como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus*, las correlaciones variaron, lo cual puede deber que en este trabajo se tomaron en cuenta las cantidades de ácidos orgánicos y etanol que tenían las muestras de las plantas (metzal).

De manera general respaldamos el potencial uso de los microorganismos que integran al *core* con nuestros datos experimentales y con la información teórica encontrada en los trabajos previos. Con el conocimiento generado en este trabajo se podrá evaluar si el *core* propuesto es el necesario para generar una bebida con características similares al pulque tradicional, así mismo evaluar la cantidad mínima necesaria de microorganismos (del *core*) que sean capaces de producir pulque. Además de confirmar si es un *core* general que representa al pulque de México e identificar grupos microbianos que sean característicos de cada zona.

10. CONCLUSIONES.

De manera general se concluye que existe un *core* de microorganismos que se conserva durante todo el proceso de elaboración del pulque, es decir, desde las paredes del cajete en las plantas de maguey hasta el producto final, cuya estabilidad es de al menos el 70% en cuanto a presencia de los microorganismos y con variaciones en la abundancia entre las muestras analizadas. El *core* de microorganismos del pulque presentan una correlación positiva entre su abundancia y las principales características fisicoquímicas de la bebida.

El *core* de microorganismos que se mantiene a través de todo el proceso de elaboración del pulque está compuesto por 8 géneros de bacterias (*Lactobacillus*, *Zymomonas*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Weissella*, *Gluconobacter* y *Obesumbacterium*) y 4 de levaduras (*Kluyveromyces*, *Kazachstania*, *Saccharomyces* y *Hanseniaspora*), así como un OTU del orden Saccharomycetales. La estabilidad del *core* a través del año fue del 70%, ya que los géneros *Weissella*, *Gluconobacter*, *Obesumbacterium* y *Hanseniaspora* mostraron una disminución en su abundancia relativa menor a 0.01%. Sin embargo, los demás géneros representaron el mayor porcentaje de abundancia relativa del total de todos los microorganismos identificados a través del año. Los parámetros físicos como la biomasa, minerales (cenizas), %O₂ y %CO₂ no presentan cambios significativos entre los muestreos, por lo cual estimamos que son variables que no tienen un impacto significativo en la diversidad microbiana encontrada. La biomasa se asoció principalmente a la cantidad de materia orgánica como los carbohidratos cuantificados que se hidrolizan y consumen durante la fermentación. La cuantificación de los metabolitos pertenecientes a cada muestreo demostró que la principal diferencia es la cantidad de sacarosa en aguamiel y la cantidad de etanol en las muestras de pulque analizadas, observándose en el primer muestreo una menor concentración de etanol y mayor acidez; mientras que el tercer muestreo presentó la mayor cantidad de etanol. Se identificaron 8 fructooligosacáridos presentes en todas las muestras analizadas: AM, PQ, T0, T3 y T6. Se correlacionó el *core* microbiano con los metabolitos cuantificados encontrado correlaciones positivas con la producción de etanol en *Zymomonas* y de ácido láctico con *Lactococcus*,

mostrando que los microorganismos del *core* tienen un potencial rol en la elaboración del pulque.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Álvarez-Ríos, G. D., Figueredo-Urbina, C. J., and Casas, A. (2020). Physical, chemical, and microbiological characteristics of pulque: Management of a fermented beverage in Michoacán, Mexico. *Foods* 9. doi: 10.3390/foods9030361.
- Astudillo-Melgar, F., Hernández-Chávez, G., Rodríguez-Alegría, M. E., Bolívar, F., and Escalante, A. (2023). Analysis of the microbial diversity and population dynamics during the pulque fermentation process. *Fermentation* 9, 342. doi: 10.3390/fermentation9040342.
- Astudillo-Melgar, F., Ochoa-Leyva, A., Utrilla, J., and Huerta-Beristain, G. (2019). Bacterial diversity and population dynamics during the fermentation of palm wine from Guerrero Mexico. *Front Microbiol* 10, 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2019.00531.
- Chacón-Vargas, K., Torres, J., Giles-Gómez, M., Escalante, A., and 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, 1–13. doi: 10.1038/s41598-020-71864-4.
- Coleman-Derr, D., Desgarenes, D., Fonseca-Garcia, C., Gross, S., Clingenpeel, S., Woyke, T., et al. (2016). Plant compartment and biogeography affect microbiome composition in cultivated and native *Agave* species. *New Phytol.* 209, 798–811. doi: 10.1111/nph.13697.
- Correa-Ascencio, M., Robertson, I. G., Cabrera-Cortés, O., Cabrera-Castro, R., and Evershed, R. P. (2014). Pulque production from fermented agave sap as a dietary supplement in Prehispanic Mesoamerica. 111. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* doi: 10.1073/pnas.1408339111.
- de la Fuente-Salcido, N. M., Castañeda-Ramírez, J. C., García-Almendárez, B. E., Bideshi, D. K., Salcedo-Hernández, R., and Barboza-Corona, J. E. (2015). Isolation and characterization of bacteriocinogenic lactic bacteria from M-Tuba and Tepache, two traditional fermented beverages in México. *Food Sci Nutr* 3, 434–442. doi: 10.1002/fsn3.236.
- Desgarenes, D., Garrido, E., Torres-Gomez, M. J., and Partida-Martinez, L. P. (2014). Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated *Agave* species. *FEMS Microbiol Ecol* 90, 844–857. doi: 10.1111/1574-6941.12438.
- Dols, M., Chraïbi, W., Remaud-Simeon, M., Lindley, N. D., and Monsan, P. F. (1997). Growth and energetics of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 during metabolism of various sugars and their consequences for dextransucrase production.
- Escalante, A. E., Rebolleda-Gómez, M., Benítez, M., and Travisano, M. (2015). Ecological perspectives on synthetic biology: insights from microbial population biology. *Front Microbiol* 6, 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2015.00143.

- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., et al. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *Int J Food Microbiol* 124, 126–134. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003.
- Escalante, A., Rodríguez, M. E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., and Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Lett* 235, 273–279. doi: 10.1016/j.femsle.2004.04.045.
- Escalante, A., Soto, D. R. L., Gutiérrez, J. E. V., Giles-Gómez, M., Bolívar, F., and López-munguía, A. (2016). Pulque, a Traditional Mexican Alcoholic Fermented Beverage: Historical, Microbiological, and Technical Aspects. *Front Microbiol* 7, 1–18. doi: 10.3389/fmicb.2016.01026.
- Escobar-Zepeda, A., Montor, J. J., Olvera, C., Sanchez-Flores, A., and Lopez-Munguia, A. (2020). An extended taxonomic profile and metabolic potential analysis of pulque microbial community using metagenomics. *SDRP J Food Sci Technol* 5, 83–97. doi: 10.25177/jfst.5.2.ra.10637.
- Fakruddin, M., and Bin Mannan, S. K. (2013). Methods for analyzing diversity of microbial communities in natural environments. *Ceylon J Sci* 42, 19–33. doi: 10.4038/cjsbs.v42i1.5896.
- Fonseca-García, C., Desgarenes, D., Flores-Núñez, V. M., and Partida-Martínez, L. P. (2017). “The microbiome of desert CAM plants: lessons from amplicon sequencing and metagenomics,” in *Metagenomics: Perspectives, Methods, and Applications* (Elsevier), 231–254. doi: 10.1016/B978-0-08-102268-9.00012-4.
- Guerrero-Corona, D. (2017). Estudio de la diversidad de bacterias endófitas del maguey pulquero.[Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio de tesis de la UNAM, <https://ru.dgb.unam.mx/handle/20.500.14330/TES01000756927>.
- Jacinto, R. J., and Garcia, E. D. M. (2000). Remoción cuticular (“mixiote”) y desarrollo foliar en los agaves pulqueros (*Agave salmiana* y *A. mapisaga*). *Bol Soc Bot México*, 66, 73–79. doi: 10.17129/botsci.1613
- Karim, A., Gerliani, N., and Aïder, M. (2020). *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. *Int J Food Microbiol* 333, 1–24. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818.
- Mamlouk, D., and Gullo, M. (2013). Acetic acid bacteria: Physiology and carbon sources oxidation. *Indian J Microbiol* 53, 377–384. doi: 10.1007/s12088-013-0414-z.
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligne, B., et al. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Curr Opin Biotechnol* 44, 94–102. doi: 10.1016/j.copbio.2016.11.010.

- Martínez-Rodríguez, J. C., Mora-Amutio, M. De, Plascencia-Correa, L. A., Audelo-Regalado, E., Guardado, F. R., Hernández-Sánchez, E., et al. (2014). Cultivable endophytic bacteria from leaf bases of *Agave tequilana* and their role as plant growth promoters. *Braz J Microbiol* 45, 1333–1339.
- Navas-Molina, J. A., Peralta-Sánchez, J. M., González, A., McMurdie, P. J., Vázquez-Baeza, Y., Xu, Z., et al. (2015). Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Meth Enzymol* 531, 371–444. doi: 10.1016/B978-0-12-407863-5.00019-8. Advancing.
- Ortiz-Basurto, R. I., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dormer, M., and Belleville, M. P. (2008). Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *J Agric Food Chem* 56, 3682–3687. doi: 10.1021/jf072767h.
- Peralta-García, I., González-Muñoz, F., Elena, R. A. M., Sánchez-Flores, A., and López Munguía, A. (2020). Evolution of fructans in aguamiel (*Agave sap*) during the plant production lifetime. *Front Nutr* 7. doi: 10.3389/fnut.2020.566950.
- Pérez-Armendáriz, B., and Cardoso-Ugarte, G. A. (2020). Traditional fermented beverages in Mexico: Biotechnological, nutritional, and functional approaches. *Food Res Int* 136, 109307. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109307.
- Rizo, J., Guillén, D., Farrés, A., Díaz-Ruiz, G., Sánchez, S., Wachter, C., Rodríguez Sanoja, R. (2018). Omics in traditional vegetable fermented foods and beverages. *Crit Rev Food Sci Nutr* 0, 1–19. doi: 10.1080/10408398.2018.1551189.
- Rocha-Arriaga, C., Espinal-Centeno, A., Martínez-Sánchez, S., Caballero-Pérez, J., Alcaraz, L. D., and Cruz-Ramírez, A. (2020). Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a biocultural resource of Mexico. *Microbiol Res* 241. doi: 10.1016/j.micres.2020.126593.
- Rojas-Rivas, E., and Cuffia, F. (2020). Identifying consumers' profile and factors associated with the valorization of pulque: A traditional fermented beverage in Central Mexico. *Food Science and Technology International* 26, 593–602. doi: 10.1177/1082013220917554.
- Romero-Luna, H. E., Hernández-Sánchez, H., and Dávila-Ortiz, G. (2017). Traditional fermented beverages from Mexico as a potential probiotic source. *Ann Microbiol* 67, 577–586. doi: 10.1007/s13213-017-1290-2.
- Sánchez-Marroquín, A., and Hope, P. H. (1953). Agave juice: Fermentation and chemical composition studies of some species. *J Agric Food Chem* 1, 246–249. doi: 10.1021/jf60003a007.

- Sprenger, G. A. (1996). Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. *FEMS Microbiol Lett* 145, 301–307. doi: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08593.x.
- Swings, J., and De Ley, J. (1977). The biology of *Zymomonas*. *Bacteriol Rev* 41, 1–46.
- Tamang, J. P., Watanabe, K., and Holzapfel, W. H. (2016). Review : Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front Microbiol* 7, 1–28. doi: 10.3389/fmicb.2016.00377.
- Tan, B., Fowler, S. J., Laban, N. A., Dong, X., Sensen, C. W., Foght, J., et al. (2015). Comparative analysis of metagenomes from three methanogenic hydrocarbon-degrading enrichment cultures with 41 environmental samples. *ISME J* 4, 1–18. doi: 10.1038/ismej.2015.22.
- Tang, J., Tang, X., Tang, M., Zhang, X., Xu, X., and Yi, Y. (2017). Analysis of the bacterial communities in two liquors of soy sauce aroma as revealed by high-throughput sequencing of the 16S rRNA V4 hypervariable region. *Biomed Res Int* 2017, 1–9. doi: 10.1155/2017/6271358.
- Trejo, L., Reyes, M., Cortés-Toto, D., Romano-Grande, E., and Muñoz-Camacho, L. L. (2020). Morphological diversity and genetic relationships in pulque production agaves in Tlaxcala, Mexico, by means of unsupervised learning and gene sequencing analysis. *Front Plant Sci* 11, 1–14. doi: 10.3389/fpls.2020.524812.
- Valdivieso Solís, D. G., Vargas Escamilla, C. A., Mondragón Contreras, N., Galván Valle, G. A., Gilés-Gómez, M., Bolívar, F., et al. (2021a). Sustainable production of pulque and maguey in Mexico: current situation and perspectives. *Front Sustain Food Syst* 5, 1–19. doi: 10.3389/fsufs.2021.678168.
- Walker, G. M., and Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages* 2. doi: 10.3390/beverages2040030.
- Yang, S., Fei, Q., Zhang, Y., Contreras, L. M., Utturkar, S. M., Brown, S. D., Escalante, A. (2016). *Zymomonas mobilis* as a model system for production of biofuels and biochemicals. *Microb Biotechnol* 9, 699–717. doi: 10.1111/1751-7915.12408.
- Zarraonaindia, I., Owens, S. M., Weisenhorn, P., West, K., Hampton-Marcell, J., Lax, S., et al. (2015). The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. *mBio* 6, 1–10. doi: 10.1128/mBio.02527-14.
- Zhang, J., Wang, X., Huo, D., Li, W., Hu, Q., Xu, C., et al. (2016). Metagenomic approach reveals microbial diversity and predictive microbial metabolic pathways in Yucha, a traditional Li fermented food. *Sci Rep* 6, 1–9. doi: 10.1038/srep32524.
- Zhou, N., Schifferdecker, A. J., Gamero, A., Compagno, C., Boekhout, T., Piškur, J., et al. (2017). *Kazachstania gamospora* and *Wickerhamomyces subpelliculosus*: Two alternative baker's

yeasts in the modern bakery. *Int J Food Microbiol* 250, 45–58. doi:
10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.013.

12. ANEXOS.

I. Normas Mexicanas del aguamiel y pulque.

NMX-V-022-1972. Aguamiel.			
Especificaciones	Tipo I		Tipo II
	Mínimo	Máximo	No mayor de:
pH	6.6	7.5	4.5
Densidad grados Baumé	5	7	4.5
Índice de refracción (20°C)	59	100	27
Sólidos totales g/100 mL	13	17	7
Azúcares reductores totales (en glucosa) g/100 mL.	8	12	6
Azúcares reductores directos (en glucosa) g/100 mL	2	3	3
Gomas (en glucosa) g/100 mL	2	6	0.2
Proteínas mg/100 mL	300	600	100
Cenizas mg/100 mL	300	430	180
Acidez mg 1000 mL (como ácido láctico)	0.90	1.03	4.00

NMX-V-037-1972. Pulque manejado a granel.				
Especificaciones	Tipo I		Tipo II	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Grado refractométrico (20°C)	32	345	25	---
Índice de refracción (20°C)	1,3390	1,3406	1,3365	1,3380
pH	>3.7	4.2	3.5	4.0
Acidez total (ácido láctico) g/100 mL	0.40	0.75	0.40	0.70
Reductores totales (glucosa) g/100 mL	0.10	0.80	0.20	0.50
Grado alcohólico por volumen	6	9	4.0	0.6

13. La información se obtuvo de: Microsoft Word - NMX-V-037-1972.doc (gotomexico.today).

Microsoft Word - NMX-V-022-1972.doc (gotomexico.today)

II. Cuantificación de biomasa por peso seco.

1. Lavar los crisoles de 15 mL y ponerlos en peso constante durante toda la noche a 95 °C.
2. Después de mínimo 12 horas, sacar los crisoles del horno y dejarlos enfriar durante media hora en el desecador por 30 minutos.
3. Pesar en una balanza analítica con un error de +0.1 mg.
4. Colocar 9-10 mL de volumen de muestra (pulque/aguamiel) en cada crisol.
5. Dejar evaporar todo el líquido a baño maría a 90°C aproximadamente.
6. Una vez que el líquido esté lo mayor posible evaporado (hasta generar un jarabe muy viscoso), se deja en el horno toda la noche a 90-95°C durante 12 horas.
7. Sacar y dejar enfriar durante 30 min en el desecador y pesar en la balanza analítica.
8. Encender la mufla a 575°C.
9. Colocar los crisoles en la mufla durante 15 minutos, sacar, transportar en el desecador y dejar enfriar durante 30 minutos en el mismo.
10. Colocar los crisoles en baño maría a 90 °C aproximadamente y colocar en cada crisol 3 mL de agua milliQ y dejar consumir en su totalidad.
11. Subir la temperatura de la mufla a 675°C
12. Colocar los crisoles nuevamente durante 5 horas o hasta obtener cenizas de color blanco (una hora antes de las 5 horas se recomienda subir la temperatura 100°C).
13. Pasadas las 5 horas, se sacan los crisoles y se deja enfriar por una hora para posteriormente pesar en la balanza analítica.

$$\text{Solidos totales} = \frac{X_o - X_y}{V} \times 100$$

$$\text{Cenizas} = \frac{M_o - M_y}{V} \times 100$$

$$\text{Biomasa} = \text{Sólidos totales} - \text{Cenizas}$$

III. Extracción de ADN con el kit Zymo BIOMICS DNA Miniprep.

Antes de iniciar con el protocolo del proveedor se realiza una lisis enzimática con lisozima A.

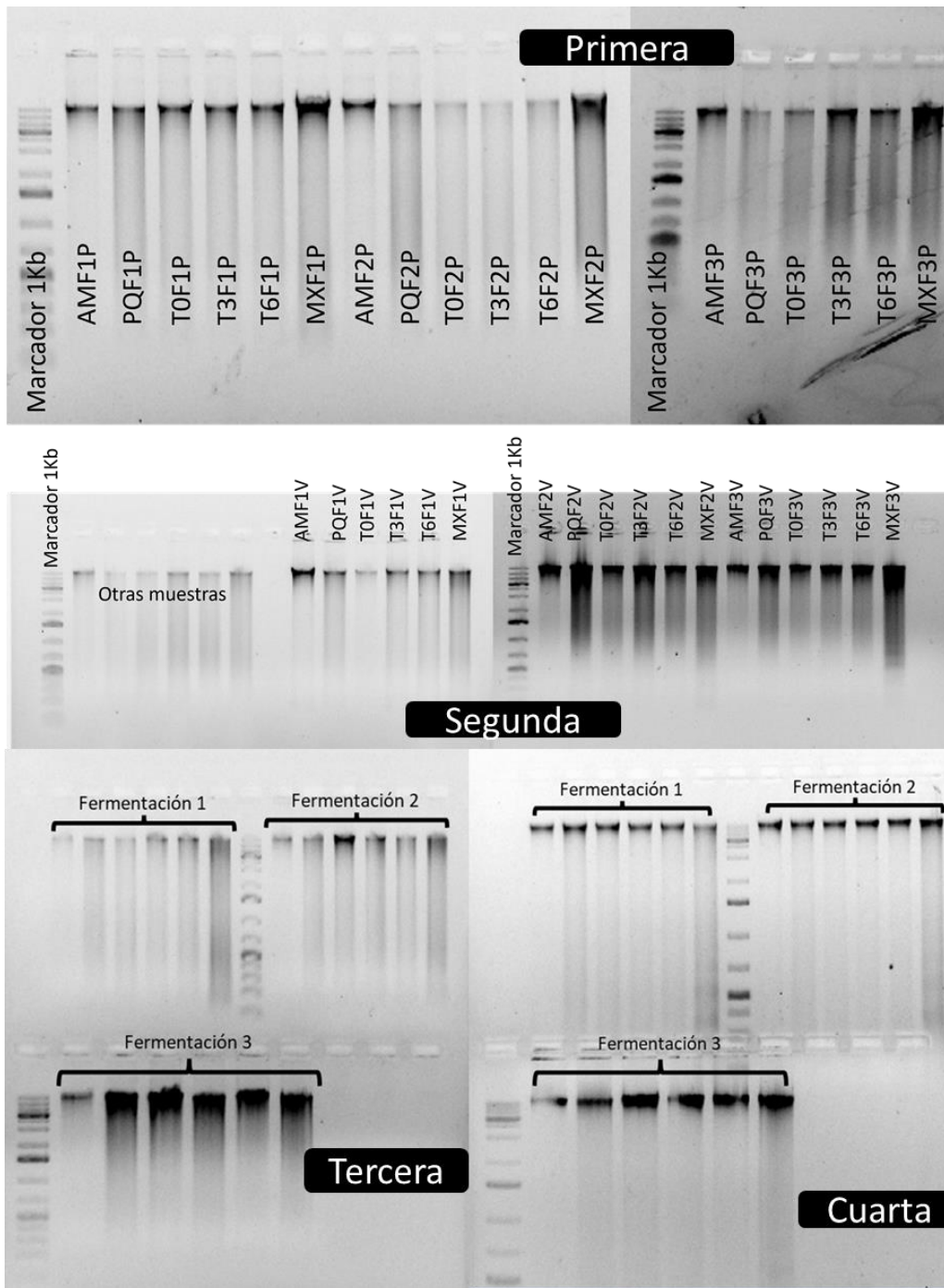
1. En un microtubo de colecta de 2 mL poner 1.8 mL del cultivo en estudio y centrifugar a 10,000 x g por 1 min y descartar el sobrenadante. A la pastilla celular se le agregan 250 μ L de buffer TE pH 8 más la Lisozima A (aproximadamente 0.2 mg/por tubo) e incubar a 37°C por 1 hora.

Protocolo proveedor, es importante seguir el protocolo aquí descrito puesto que en versiones recientes el proveedor ha modificado el proceso de extracción.

2. Agregar el producto de la lisis enzimática a un tubo ZR BashingBead Lysis (0.1 & 0.5 mm) y adicionar 750 μ L de la solución Lysis solution y cerrar.
3. Asegurar los tubos de lisis y agitar por 5 minutos a velocidad máxima (se usó un equipo Vortex).
4. Centrifugar los tubos ZR BashingBead Lysis (0.1 & 0.5 mm) en una microcentrífuga a 10,000 x g por un minuto.
5. Transferir 400 μ L de sobrenadante a un Zymo-Spin III-F Filter en un Collection Tube y centrifugar a 8,000 x g por 1 minuto. Descartar el Zymo-Spin III-F Filter.
6. Agregar 1,200 μ L de la solución ZymoBiomics DNA Binding Buffer al sobrenadante resultante del paso anterior y mezclar bien.
7. Transferir 800 μ L de la mezcla del paso 6 a un tubo "Zymo-Spin IICR Column en un Collection Tube y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto.
8. Descartar el sobrenadante del Collection Tube y repetir nuevamente el paso 7 hasta terminar con el volumen.
9. Agregar 400 μ L de ZymoBIOMICS DNA Wash Buffer 1 al Zymo-Spin IICR Column en un nuevo Collection Tube y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto y descartar el sobrenadante.
10. Agregar 700 μ L de ZymBIOMICS DNA Wash Buffer 2 al Zymo-Spin IICR Column en un Collection Tube y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto y descartar el sobrenadante.
11. Agregar 200 μ L de ZymBIOMICS DNA Wash Buffer 2 al Zymo-Spin IICR Column en un Collection Tube y centrifugar a 10,000 x g por 1 minuto.
12. Transferir el Zymo-Spin IICR Column en un tubo nuevo y limpio de 1.5 mL y agregar 100 μ L de ZymoBIOMICS DNase/RNase Free Water (previamente puesta a 60°C) directamente a la membrana del al Zymo-Spin IICR Column e incubar por 1 minuto. Centrifugar a 10,000 x g por un minuto para eluir el ADN.
13. Colocar un Zymo-Spin III-HRC Filter en un nuevo Collection Tube y agregar 600 μ L de ZymoBIOMICS HRC Prep Solution. Centrifugar a 8,000 x g por 3 minutos.

14. Transferir el ADN eluido al tubo preparado Zymo-Spin III-HRC Filter en un tubo limpio de 1.5 mL y centrifugar exactamente a 16,000 x g por 3 minutos.

IV. Geles de extracción de ADN (Segunda parte).



V. Oligos utilizados para la amplificación de las regiones de interés.

	Región V3-V4 gen ADNr 16S	Región intergénica entre el 18S y el 5.8S ADNr	
	Tamaño esperado de 550 pb	Tamaño esperado de 145-695 pb	
Forward	5'CCTACGGGNGGCWGCAG	F1 CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA F2 CTCGGTCATTTAGAGGAAGTAA F3 CTTGGTCATTTAGAGGAACTAA F4 CCCGGTCATTTAGAGGAAGTAA F5 CTAGGCTATTTAGAGGAAGTAA F6 CTTAGTTATTTAGAGGAAGTAA F7 CTACGTCATTTAGAGGAAGTAA F8 CTTGGTCATTTAGAGGTCGTAA	Secuenciación MiSeq
Reverse	5'GACTACHVGGGTATCTAATCC	R1 GCTGCGTTCTTCATCGATGC R2 GCTGCGTTCTTCATCGATGG R3 GCTACGTTCTTCATCGATGC R4 GCTGCGTTCTTCATCGATGT R5 ACTGTGTTCTTCATCGATGT R6 GCTGCGTTCTTCATCGTTGC R7 GCGTTCTTCATCGATGC	
Forward	5'CCTAYGGGRBGCASCAG	5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	Secuenciación NovaSeq
Reverse	5'GGACTACNNGGGTATCTAAT	5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC	

VI. Identificación bacteriana de la primera parte del proyecto.

Core							Otros						
Pulque	T6	T3	T0	Agua miel	Metal		Pulque	T6	T3	T0	Agua miel	Metal	
47.35%	69.25%	65.24%	63.18%	51.27%	56.29%	<i>Zymomonas mobilis subsp. mobilis</i>	0.46%	0.07%	0.14%	0.21%	1.46%	2.23%	<i>Weissella ghanensis</i>
7.86%	5.32%	7.63%	7.29%	0.73%	0.52%	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	2.20%	1.59%	2.81%	3.02%	12.91%	3.09%	<i>Lactococcus uncultured</i>
3.00%	2.63%	3.36%	3.25%	5.79%	5.12%	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	3.00%	2.63%	3.36%	3.25%	5.79%	5.12%	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
0.85%	0.58%	0.87%	0.68%	0.04%	0.03%	<i>Acetobacter cibinongensis</i>	0.14%	0.05%	0.09%	1.67%	0.24%	0.24%	<i>Obesumbacterium proteus</i>
0.50%	0.29%	0.32%	0.24%	0.24%	0.23%	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	0.09%	0.05%	0.10%	0.07%	0.01%	0.05%	<i>Gluconobacter albidus</i>
0.07%	0.05%	0.06%	0.05%	0.04%	0.04%	<i>Leuconostoc citreum</i>	0.10%	0.02%	0.05%	0.04%	0.03%	0.05%	<i>Lactobacillus capillatus</i>
0.04%	0.02%	0.03%	0.04%	0.02%	5.52%	<i>Allium ampeloprasum (leek)</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.33%	0.33%	<i>Arachis duranensis</i>
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.08%	<i>Cypripedium macranthos</i>	0.05%	0.02%	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%	<i>Drosophila kikkawai</i>
0.24%	0.13%	0.10%	0.16%	0.02%	0.00%	<i>Lactobacillus acetolerans</i>	0.03%	0.01%	0.03%	0.01%	0.00%	0.00%	<i>Lactobacillus brevis</i>
0.03%	0.01%	0.03%	0.01%	0.01%	0.00%	<i>Lactobacillus camelliae</i>	0.03%	0.01%	0.01%	0.01%	0.00%	0.00%	<i>Lactobacillus faeni</i>
4.68%	2.74%	2.26%	1.96%	0.01%	0.00%	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	0.94%	0.48%	0.42%	0.58%	0.07%	0.12%	<i>Lactobacillus nagelii</i>
0.04%	0.02%	0.03%	0.01%	0.00%	0.00%	<i>Lactobacillus pentosus</i>	0.04%	0.04%	0.06%	0.02%	0.00%	0.02%	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
0.32%	0.27%	0.28%	0.21%	0.01%	0.02%	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	0.72%	0.19%	0.24%	0.32%	0.10%	0.22%	<i>Lactobacillus senioris</i>
0.04%	0.02%	0.03%	0.01%	0.00%	0.00%	<i>Lactobacillus similis</i>	0.50%	0.21%	0.37%	0.29%	0.00%	0.00%	<i>Lactobacillus similis</i>
4.09%	1.59%	3.10%	1.92%	0.00%	0.00%	<i>Lactobacillus similis DSM 23365</i>	1.75%	1.08%	1.04%	0.86%	0.01%	0.01%	<i>Lactobacillus sp. rennanqilly19</i>
0.17%	0.11%	0.12%	0.09%	0.00%	0.00%	<i>Lactobacillus uncultured</i>	0.07%	0.04%	0.02%	0.02%	0.00%	0.00%	<i>Lactobacillus uncultured</i>
16.02%	10.62%	7.15%	10.36%	0.09%	0.04%	<i>Lactobacillus uncultured</i>	0.56%	0.50%	0.52%	0.53%	0.01%	0.03%	<i>Leuconostoc uncultured</i>
2.83%	0.35%	1.10%	1.12%	13.54%	23.56%	<i>Weissella beninensis</i>	0.01%	0.00%	0.00%	0.02%	0.05%	0.05%	<i>Weissella uncultured</i>
0.00%	0.01%	0.01%	0.02%	0.02%	0.05%	<i>Lactococcus sp. INBio_4514B</i>	0.02%	0.02%	0.03%	0.02%	0.02%	0.00%	<i>Acetobacter uncultured</i>
0.02%	0.02%	0.02%	0.03%	0.00%	0.00%	<i>Acetobacter unidentified</i>	0.02%	0.01%	0.02%	0.02%	0.00%	0.00%	<i>Acetobacter unidentified</i>
0.04%	0.02%	0.03%	0.02%	0.00%	0.02%	<i>Gluconacetobacter azotocaptans</i>	0.02%	0.01%	0.02%	0.01%	0.02%	0.03%	<i>Gluconobacter marbifer</i>
0.20%	0.10%	0.14%	0.12%	0.03%	0.04%	<i>Gluconacetobacter sp. AXB(X)</i>	0.08%	0.02%	0.06%	0.06%	0.71%	0.16%	<i>Buttiauxella agrestis</i>
0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.24%	0.00%	<i>Escherichia coli</i>	0.02%	0.01%	0.01%	0.22%	0.02%	0.02%	<i>Hafnia-Obesumbacterium</i>
0.02%	0.01%	0.01%	0.01%	0.20%	0.03%	<i>Kluyvera ascorbata</i>	0.41%	0.06%	0.09%	0.11%	0.59%	0.23%	<i>Acinetobacter uncultured</i>

La tabla representa los OTUS englobados como "Otros".

VII. Identificación de hongos de la primera parte del Proyecto.

	Core					Otros												
	<i>Kazachstania gamsopora</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Hanseniaspora sp.</i>	o_Saccharomycetales	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Penicillium sp.</i>	<i>Botrytis caroliniana</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	o_Hypocreales	p_Ascmycota	<i>Rectipilus sp.</i>	o_Agaricales	<i>Erythrobasidium hasegawianum</i>	<i>Malassezia globosa</i>	<i>Malassezia restricta</i>	<i>Naganishia albida</i>	k_Fungi
Metzal	40.76 %	47.67 %	8.96%	0.72%	1.01%	0.01%	0.05%	0.00%	0.01%	0.01%	0.00%	0.32%	0.39%	0.00%	0.08%	0.01%	0.00%	0.00%
Aguamie I	14.22 %	61.04 %	22.63 %	0.46%	0.14%	0.09%	0.48%	0.10%	0.01%	0.05%	0.06%	0.11%	0.05%	0.05%	0.02%	0.40%	0.07%	0.03%
T0	2.52%	0.02%	97.30 %	0.09%	0.06%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%
T3	1.97%	0.05%	97.65 %	0.19%	0.12%	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
T6	1.23%	0.02%	98.63 %	0.07%	0.04%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
Pulque	4.37%	0.01%	95.26 %	0.08%	0.24%	0.00%	0.00%	0.00%	0.03%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

La tabla representa los OTUS englobados como "Otros".

VIII. Especies identificadas de los géneros bacterianos pertenecientes al *core* (segunda parte del proyecto).

<i>Core</i>	Abundancia Relativa (%)
<i>Lactobacillus</i> uncultured bacterium	26.70%
<i>Lactobacillus similis</i> DSM 23365 = JCM 2765	3.75%
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1.08%
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> TMW 1.1304	1.03%
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	0.75%
<i>Lactobacillus</i> sp. <i>rennanqilfy19</i>	0.73%
<i>Lactobacillus similis</i>	0.70%
<i>Lactobacillus nagelii</i> DSM 13675	0.55%
<i>Lactobacillus brevis</i>	0.08%
<i>Lactobacillus</i> sp.	0.05%
<i>Lactobacillus</i> sp. SW201	0.05%
<i>Leuconostoc</i> uncultured bacterium	8.20%
<i>Leuconostoc</i> sp. THK-X10	0.23%
<i>Leuconostoc citreum</i>	0.20%
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	0.10%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0.05%
<i>Lactococcus</i> uncultured bacterium	7.70%
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	0.50%
<i>Lactococcus garvieae</i> subsp. <i>garvieae</i>	0.10%
<i>Lactococcus</i> uncultured1	0.10%
<i>Lactococcus</i> sp. S23	0.03%
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	2.30%
<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> NCIMB 11163	33.03%

IX. Valores de alfa diversidad (Segunda parte del proyecto)

Índice de diversidad/Muestra	Chao1	Shannon-Winner	Simpson	Observed_otus
Primera				
Bacterias				
Metzal n=3	170.20±28.39	2.79±0.42	0.73±0.06	162.67±34.56
Aguamiel n=3	169.81±20.29	3.39±0.18	0.78±0.05	162.33±22.50
Pulque n=3	174.22±10.80	3.11±0.22	0.76±0.04	161.00±7.21
T0 n=3	181.17±9.05	3.61±0.29	0.82±0.02	174.33±11.93
T3 n=3	168.72±3.40	3.89±0.38	0.82±0.01	165.67±3.06
T6 n=3	170.28±2.50	3.40±0.33	0.75±0.00	166.67±1.53
Hongos				
Metzal n=3	45.25±20.70	1.90±0.22	0.69±0.04	41.00±15.52
Aguamiel n=3	60.67±15.31	1.78±0.38	0.63±0.08	43.33±17.62
Pulque n=3	47.30±13.88	1.52±0.96	0.51±0.35	43.00±10.58
T0 n=3	51.58±16.53	1.60±0.97	0.51±0.33	47.33±14.84
T3 n=3	55.28±21.10	1.96±1.29	0.57±0.37	54.00±19.70
T6 n=3	55.17±20.88	2.25±1.50	0.60±0.40	54.33±20.82
Segunda				
Bacterias				
Metzal n=3	152.12±10.50	3.08±0.43	0.77±0.02	146.67±11.85
Aguamiel n=3	145.40±15.86	3.14±0.89	0.75±0.08	137.33±14.43
Pulque n=3	148.59±13.17	2.57±0.22	0.70±0.03	129.67±9.81
T0 n=3	156.48±11.63	2.77±0.18	0.74±0.04	145.33±10.21
T3 n=3	149.82±2.90	2.69±0.12	0.72±0.02	140.00±6.08
T6 n=3	142.33±11.50	2.48±0.12	0.69±0.03	127.33±5.13
Hongos				
Metzal n=3	81.89±7.52	2.36±0.29	0.69±0.09	79.67±9.02
Aguamiel n=3	54.36±22.21	1.49±0.29	0.56±0.09	57.00±21.79

Pulque n=3	58.94±19.40	1.90±0.30	0.66±0.06	53.33±16.20
T0 n=3	64.25±18.65	2.10±0.03	0.68±0.03	61.67±19.66
T3 n=3	76.80±9.15	2.46±0.19	0.76±0.03	74.67
T6 n=3	66.33±35.92	2.66±1.39	0.73±0.19	62.67±37.29

Tercera

Bacterias

Metzal n=3	246.07±45.40	2.42±0.15	0.69±0.02	129.67±20.82
Aguamiel n=3	161.25±16.54	2.09±0.41	0.60±0.11	116.33±11.59
Pulque n=3	196.37±49.44	2.74±0.18	0.78±0.02	115.33±11.15
T0 n=3	191.38±70.19	2.57±0.09	0.74±0.02	118.00±9.85
T3 n=3	205.28±53.15	2.53±0.07	0.72±0.02	116.67±9.29
T6 n=3	168.24±32.25	2.48±0.16	0.71±0.04	114.3.46

Hongos

Metzal n=3	37.44±12.74	1.91±0.74	0.58±0.19	36.67±13.65
Aguamiel n=3	44.17±17.75	1.17±0.25	0.43±0.11	28.33±6.66
Pulque n=3	25.64±10.28	1.30±0.33	0.54±0.05	25.67±8.02
T0 n=3	30.73±5.22	1.60±0.26	0.56±0.07	29.67±4.51
T3 n=3	44.15±11.30	1.81±0.35	0.66±0.08	40.33±9.02
T6 n=3	38.57±10.32	1.83±0.24	0.64±0.09	35.67±6.51

Cuarta

Bacterias

Metzal n=3	161.79±34.60	2.44±0.27	0.73±0.04	117.67±19.35
Aguamiel n=3	268.61±3.10	2.43±0.21	0.71±0.06	154.00±26.51
Pulque n=3	185.28±46.32	2.92±0.39	0.78±0.09	130.67±14.74
T0 n=3	234.29±45.30	2.76±0.35	0.75±0.09	130.67±11.93
T3 n=3	163.36±33.37	2.71±0.45	0.73±0.12	120.67±9.02
T6 n=3	192.43±20.45	2.61±0.48	0.71±0.14	132.67±14.98

Hongos

Metzal n=3	26.17±3.69	1.09±0.10	0.41±0.06	23.33±3.79
------------	------------	-----------	-----------	------------

Aguamiel n=3	25.83±4.65	1.24±0.20	0.52±0.03	22.67±3.51
Pulque n=3	23.25±8.01	1.22±0.80	0.43±0.30	20.67±5.51
T0 n=3	20.58±9.06	1.15±0.81	0.42±0.32	18.33±6.43
T3 n=3	26.33±5.51	1.97±0.39	0.69±0.08	25.00±4.58
T6 n=3	23.58±5.92	1.38±0.69	0.47±0.24	23.00±6.08

X. Core de microorganismos del proceso de elaboración del pulque.

Microorganismos	% Abundancia Relativa				% Total
	Primera	Segunda	Tercera	Cuarta	
<i>Lactobacillus</i>	38.33	33.23	30.80	39.53	35.47
<i>Zymomonas</i>	20.50	37.67	45.72	28.16	33.01
<i>Leuconostoc</i>	8.59	9.82	10.62	15.78	11.20
<i>Lactococcus</i>	2.89	8.13	6.55	6.28	5.96
<i>Acetobacter</i>	1.46	1.48	1.87	4.45	2.32
					87.97
<i>Kazachstania gamospora</i>	48.85	28.39	29.16	4.09	27.62
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	23.25	36.03	10.29	32.22	25.45
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5.29	11.29	24.84	32.79	18.55
o_Saccharomycetales	0.32	2.64	1.05	6.23	2.56
					74.18

13. PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA Y ACADÉMICA.

1. **Artículo original:** Fernando Astudillo-Melgar, Georgina Teresa Hernández-Chávez, María Elena Rodríguez-Alegría, Francisco Bolívar, Adelfo Escalante. Analysis of the microbial diversity and population dynamics during the pulque fermentation process. Fermentation-Basel. 2023, 9, 342. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040342> Factor de impacto JCR 2022: 3.7. Q2. ISSN: 2311-5637. Publicado en línea 29 de marzo de 2023.
2. **Artículos de divulgación:**
 - a. Astudillo,F., Escalante-Lozada,J,A (2022). Los beneficios de una bebida prehispánica en nuestros días: pulque para todos (Primera Parte). La Unión de Morelos, 21 de febrero.
 - b. Astudillo,F., Escalante-Lozada,J,A (2022). Los beneficios de una bebida prehispánica en nuestros días: pulque para todos (segunda y última parte). La Unión de Morelos, 28 de febrero.
3. **Actividad académica:** Se impartió el curso de Ingeniería de Vías Metabólicas en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas (PMDCB) en el periodo de septiembre-diciembre del 2020.
4. **Congresos:**
 - a. 5° Congreso Internacional de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos. Zapopan, Jalisco. Ponencia oral. 12-15 de octubre del 2022.
 - b. V International Symposium on Agave. Mérida, Yucatán. Ponencia oral. 8-10 de junio del 2022.
 - c. XX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero. Cartel. 11-15 de septiembre del 2023.

5. Capítulo de libro:

Fernando Astudillo Melgar, Martha Giles Gómez, Francisco Bolívar y Adelfo Escalante. Análisis de la diversidad microbiana y su inferencia funcional durante el proceso de fermentación del pulque para la definición de un microbioma central de esa bebida. Los agaves y sus derivados. Tendencias científicas, uso sostenible y patrimonio.

6. Divulgación científica.

4° día de puertas abiertas IBT. 23 de marzo del 2023.

Visita guiada del grupo 2 del Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Oriente en el Instituto de Biotecnología el 19 de septiembre del 2023 como parte de las actividades de divulgación y comunicación de la ciencia del Instituto de Biotecnología.

Visita guiada del grupo 1 del Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Oriente en el Instituto de Biotecnología el 21 de septiembre del 2023 como parte de las actividades de divulgación y comunicación de la ciencia del Instituto de Biotecnología.

7. Formación de recursos humanos.

Codirección de un trabajo terminal de nivel licenciatura de la UAM Cuajimalpa. 23 de enero del 2020.

Kristhian Becerril Rojas Reconstrucción de la red metabólica del microbioma del pulque. Asesores: - M.C Fernando Astudillo Melgar, Dr. Adelfo Escalante Lozada. Junio del 2021.

Codirección de 1 tesis de licenciatura.

Aydee Citlali Román Galindo, Brian Eulalio Cárdenas Hernández. Actividad antioxidante de metabolitos producidos por bacterias aisladas de la Tuba

Guerrerense. Director: Dr. Gerardo Huerta Beristaín, Codirector: M.C. Fernando Astudillo Melgar. Julio del 2020.

Revisor y evaluador de tesis de licenciatura:

Itzel Rodríguez Sánchez. Metabolitos de microorganismos aislados de la Tuba guerrerense con actividad antibacteriana contra cepas de interés clínico. Tesis para obtener el Título De Licenciada En Biotecnología. Noviembre del 2020.

8. Impartición de clases a nivel licenciatura, especialidad y maestría.

Durante el doctorado colaboré con la Universidad Autónoma de Guerrero y la Universidad de Santander de Bogotá, Colombia, impartiendo algunos temas de diversas unidades de aprendizaje como bioquímica, bioinformática, biocatálisis y microbiología.


EVIDENCIAS:

Artículo original.



Article

Analysis of the Microbial Diversity and Population Dynamics during the Pulque Fermentation Process

Fernando Astudillo-Melgar, Georgina Hernández-Chávez, María Elena Rodríguez-Alegria, Francisco Bolívar and Adelfo Escalante * 

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62210, Morelos, Mexico

* Correspondence: adelfo.escalante@ibt.unam.mx

Abstract: Pulque is the most-studied traditional Mexican alcoholic beverage prepared by fermentation of the fresh sap (aguamiel, AM) extracted from different *Agave* species (maguey) cultivated for pulque production. This beverage has been produced mainly in the Central Mexico Plateau since pre-Columbian times. In this contribution, we report the analysis of the bacterial and fungal diversity through 16S rRNA gene V3–V4 fragment amplicon and ITSr1 sequencing associated with the tissue of the walls (metzal) of the cavity or cajete, where the sap accumulates in producing plants for its daily extraction, in AM, and during four fermentation stages for pulque production. The results led to determining which microorganisms detected in the plant tissue are present in AM and maintained during the fermentation process. The results showed that eight bacterial OTUs (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactococcus*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Zymomonas*, and *Obesumbacterium*) and five fungal OTUs (*Kazachstania*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, and the OTU O_Saccharomycetales) were present from metzal to AM and during all the stages of the fermentation analyzed. The detected diversity was considered the microbial core for pulque fermentation, comprising up to ~84% of the total bacterial diversity and up to ~99.6% of the fungal diversity detected in the pulque produced from three plants of *A. salmiana* from the locality of Huitzilac, Morelos, Mexico. This study provides relevant information on the potential microorganisms responsible for pulque fermentation, demonstrating that the core of microorganisms is preserved throughout the elaboration process and their association with the AM and fermented beverage physicochemical profile.



Citation: Astudillo-Melgar, F.; Hernández-Chávez, G.; Rodríguez-Alegria, M.E.; Bolívar, F.; Escalante, A. Analysis of the Microbial Diversity and Population

Keywords: pulque; traditional fermented beverage; maguey; microbial core; massive sequencing; 16S rRNA V3–V4; ITSr1

[Fermentation](#) | [Free Full-Text](#) | [Analysis of the Microbial Diversity and Population Dynamics during the Pulque Fermentation Process \(mdpi.com\)](#)



FERNANDO ARTURO Y ALEJO ESCOBAR

El Estado de México, Morelos, la zona rural de la ciudad de México, Cuicuilco, Michoacán, Chiapas, Veracruz e incluso en Chihuahua. En la actualidad los pulques se elaboran principalmente en Morelos...

Esta publicación fue enviada por el comité editorial de la Academia de Ciencias de México.



FERNANDO ARTURO Y ALEJO ESCOBAR

El Estado de México, Morelos, la zona rural de la ciudad de México, Cuicuilco, Michoacán, Chiapas, Veracruz e incluso en Chihuahua. En la actualidad los pulques se elaboran principalmente en Morelos...

Esta publicación fue enviada por el comité editorial de la Academia de Ciencias de México.

Los beneficios de una bebida prehispánica en nuestros días: pulque para todos (Primera Parte)

El pulque es una bebida que ha sido reconocida por sus beneficios para la salud. En esta primera parte se exploran sus propiedades y usos tradicionales.



El pulque es una bebida que ha sido reconocida por sus beneficios para la salud. En esta segunda parte se exploran sus propiedades y usos tradicionales.

Los beneficios de una bebida prehispánica en nuestros días: pulque para todos (Primera Parte) | Academia de Ciencias de Morelos, A.C (acmor.org)



FERNANDO ARTURO Y ALEJO ESCOBAR

El pulque es una bebida que ha sido reconocida por sus beneficios para la salud. En esta segunda parte se exploran sus propiedades y usos tradicionales.

Esta publicación fue enviada por el comité editorial de la Academia de Ciencias de México.



El pulque es una bebida que ha sido reconocida por sus beneficios para la salud. En esta tercera parte se exploran sus propiedades y usos tradicionales.

Los beneficios de una bebida prehispánica en nuestros días: pulque para todos (segunda y última parte).

El pulque es una bebida que ha sido reconocida por sus beneficios para la salud. En esta última parte se exploran sus propiedades y usos tradicionales.



El pulque es una bebida que ha sido reconocida por sus beneficios para la salud. En esta última parte se exploran sus propiedades y usos tradicionales.

Los beneficios de una bebida prehispánica en nuestros días: pulque para todos (segunda y última parte) | Academia de Ciencias de Morelos, A.C (acmor.org)

Actividad académica.



Se extiende el presente reconocimiento al
M en Biociencias Fernando Astudillo Melgar
Instituto de Biotecnología, UNAM
por la coordinación del curso de posgrado:
Ingeniería de vías metabólicas

Impartido en el Posgrado en Ciencias Bioquímicas-UNAM, durante el semestre 2021-1

Cuernavaca, Morelos a 9 de febrero de 2021
IBt UNAM

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Responsable del Curso

Congresos.

GOBIERNO DE MÉXICO | CONACYT | Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) | CIATEJ | Tecnológico de Monterrey | ALIMENTOS FUNCIONALES Y NUTRACÉUTICOS

En el marco del 5º Congreso Internacional de Alimentos Funcionales y Nutraceuticos, el comité organizador otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a:

Astudillo-Melgar F, Bolívar F, Escalante A

Por su valiosa participación en la **presentación oral** del trabajo titulado "Análisis microbiano del proceso completo de elaboración del pulque para la definición de un inóculo"
8-10 de junio de 2022; Guadalajara, Jalisco, México

Gustavo A. González Aguilar	Aarón F. González Córdova	Janet A. Gutiérrez Uribe	Daniel A. Jacobo Velázquez	Luis A. Mojica Contreras	Adrián Hernández Mendoza



El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología
y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

FERNANDO ASTUDILLO MELGAR

Por haber participado en el Simposio Internacional de Agave ISA V con
la Conferencia titulada:

COMPARISON OF THE PULQUE ASSOCIATED MICROBIOME FROM TWO DIFFERENT
AGAVES

Mérida Yucatán, 14 de octubre del 2022

Dra. Rosa María Camacho Ruíz
Presidenta V Simposio Internacional de
Agave



LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

EXTIENDE LA CONSTANCIA A:

Fernando Astudillo-Melgar, Georgina Hernández-Chávez, María Elena Rodríguez-Alegría, Francisco Bolívar,
Adelfo Escalante

Por su participación en la sesión de carteles con el trabajo:

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA Y DINÁMICA DE LAS POBLACIONES DURANTE EL
PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL PULQUE

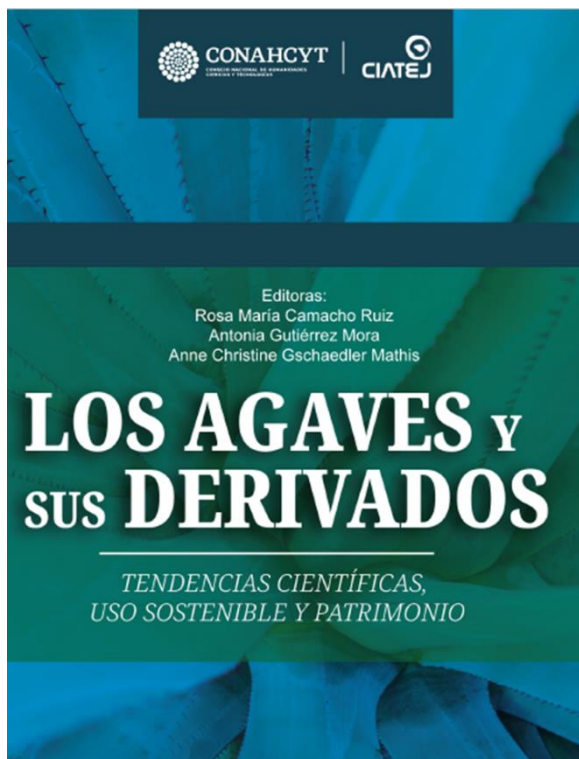
Ixtapa Zihuatanejo, Gro, a 11 - 15 de septiembre del 2023

DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA
PRESIDENTA MDN 2022-2024

DR. LUIS FLORES COTERA
PRESIDENTE DEL CONGRESO

DRA. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN
SECRETARIA MDN 2022-2024

Capítulo de libro.



2.1 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA Y SU INFERENCIA FUNCIONAL DURANTE EL PROCESO DE FERMENTACIÓN DEL PULQUE PARA LA DEFINICIÓN DE UN MICROBIOMA CENTRAL DE ESA BEBIDA

Fernando Astudillo Melgar¹, Martha Giles Gómez², Francisco Bolívar³ y Adelfo Escalante⁴

RESUMEN

El pulque es una bebida fermentada tradicional alcohólica elaborada a partir de la fermentación de la savia o agnamiel de varias especies de maguey (*Agave*) cultivados para la producción de esta bebida. Para su producción, el agnamiel colectado de plantas en etapa de producción es agregado a un recipiente o contenedor en el que se desarrolla la fermentación y que contiene una semilla o pulque previamente fermentado. La fermentación de esta bebida resulta de la actividad de una microbiota compleja y naturalmente asociada al agnamiel y a la semilla. La aplicación de estrategias de secuenciación masiva basadas en la secuenciación de amplicones y del metagenoma de esta bebida de muestras colectadas, principalmente de la localidad de Huitzilac, Morelos, ha permitido identificar y definir una microbiota que se puede considerar como el microbioma central de la bebida y que está presente en las paredes del cajete o cavidad de la planta en la que se acumula el agnamiel, en la savia y durante las diferentes etapas de producción de la bebida. Este microbioma está conformado por los géneros bacterianos *Zymomonas*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

¹ Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Av. Universidad 2001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, México. 62210

² Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria, Corporación, Ciudad de México, México. 04510

⁴ adelfo.escalante@ibt.unam.mx

Divulgación científica.





Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

a: Fernando Astudillo Melgar

Por su participación en la visita guiada del grupo 1 del **Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Oriente** en el Instituto de Biotecnología el **21 de septiembre del presente** como parte de **las actividades de divulgación y comunicación de la ciencia del Instituto de Biotecnología.**

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuernavaca, Morelos; a 22 de septiembre de 2023.

DRA. MARÍA BRENDA VALDERRAMA BLANCO
SECRETARIA DE VINCULACIÓN



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA OTORGA LA PRESENTE

CONSTANCIA

a: Fernando Astudillo Melgar

Por su participación en la visita guiada del grupo 2 del **Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Oriente** en el Instituto de Biotecnología el **19 de octubre del presente** como parte de **las actividades de divulgación y comunicación de la ciencia del Instituto de Biotecnología.**

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuernavaca, Morelos; a 20 de octubre de 2023.

DRA. MARÍA BRENDA VALDERRAMA BLANCO
SECRETARIA DE VINCULACIÓN

Formación de recursos humanos.



Comunidad académica
comprometida con el desarrollo
humano de la sociedad.

Ciudad de México a 22 de Enero de 2021

Asunto: Asesoría de Proyecto Terminal

Coordinación de la Licenciatura en Ingeniería Biológica Presente

Por medio de la presente notifico que inscribiré el siguiente Proyecto Terminal bajo la asesoría del M.C. Fernando Astudillo Melgar y Dr. José Adolfo Escalante Lozada.

Título del Proyecto

Trimestre(s)

Tipo de Proyecto

- Experimental
 Teórico
 Teórico-Experimental

Lugar de realización

Alumno

Matricula

Firma del Alumno

M.C. Fernando Astudillo Melgar
Vo.Bo. Asesor 1

Mtro. Miguel Sergio Hernández Jiménez
Tutor




ACTA INDIVIDUAL DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo las dieciséis horas del día cuatro de marzo del año dos mil veinte, en el local designado para tal fin, ante los profesores: Dr. Gerardo Huerta Beristáin, Mc. Fernando Astudillo Melgar, Dr. Arturo Ramírez Peralta y Dra. Patricia Álvarez Fitz, integrantes del Jurado calificador, se llevó a cabo la presentación del **Segundo Seminario** de la tesis titulada: "**Actividad antioxidante de metabolitos producidos por bacterias aisladas de la tuba Guerrerense**", presentado por los CC. **Aydee Citlalii Román Galindo** y **Brian Eulalio Cárdenas Hernández**, para obtener el título de **Licenciado en Biotecnología**.

Después de examinar el escrito y hacer el análisis correspondiente, como miembro del Jurado **apruebo** y autorizo la impresión final la tesis. Una vez que los interesados satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento Escolar vigente, procederá la presentación del examen profesional.

INTEGRANTE DEL JURADO CALIFICADOR



Mc. Fernando Astudillo Melgar
Codirector de Tesis

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo las 09:00 horas del día 18 de diciembre del año 2019, los profesores: Dr. Gerardo Huerta Beristáin, Mc. Daysi Navez González, Mc. Fernando Astudillo Melgar y Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán, que integran el jurado de la tesis "**Metabolitos de microorganismos aislados de la Tuba guerrerense con actividad antibacteriana contra cepas de interés clínico**" que presenta la C. **Itzel Rodríguez Sánchez** para obtener el título de **Licenciada en Biotecnología**. Después de examinar el escrito y hacer el análisis correspondiente, los miembros del jurado aprobaron la tesis y autorizaron la impresión final de la misma. Una vez que los interesados satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento Escolar Vigente, procederá a la presentación del examen profesional.

JURADO CALIFICADOR



Dr. Gerardo Huerta Beristáin
Director de tesis



Mc. Daysi Navez González
Co-Director de tesis



Mc. Fernando Astudillo Melgar



Dr. Miguel Ángel Mendoza Catalán



DIRECCIÓN 2018 - 2021



Dr. Oscar Del Moral Hernández
Director de la FCQB

Impartición de clases.

Estimado Profesor

Dr. (c). Fernando Astudillo Melgar

Laboratorio de Ingeniería de Vías Metabólicas y Biología de Sistemas.

Instituto de Biotecnología-IBT

Universidad Nacional Autónoma de México-UNAM

Ciudad.

Deseando que se encuentre muy bien.

Soy **Carlos Alberto Montenegro Herrera**, Docente del programa de **Microbiología Industrial** y gestor de Internacionalización en el semestre 2023A.

El motivo del presente es confirmar su participación en la clase espejo programada para el **día 15 de mayo** del año en curso, para la asignatura de **Ecología Microbiana**, en coparticipación con el profesor **Dr. Carlos Montenegro**.

Sin más por el momento, aprovecho esta oportunidad para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,

Carlos Alberto Montenegro Herrera

Microbiólogo Industrial, **MSc**, PhD.



Carlos Alberto Montenegro Herrera
Profesor Microbiología Industrial
Calle 70 55 – 210 Bucaramanga, Santander
+60 (7) 651 65 00
car.montenegro@mail.udes.edu.co
www.udes.edu.co



Universidad Autónoma de Guerrero
Facultad Ciencias Químico Biológicas
PE de Biotecnología

La Academia de Biotecnología concede este

RECONOCIMIENTO

A: M.C. Fernando Astudillo Melgar

Por fungir como revisor de los trabajos innovadores del Proyecto Biotecnológico Integrador desarrollados durante el ciclo escolar 2018-2019, y que fueron presentados en la sala de usos múltiples de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la UAGro



Se extiende el presente a los 24 días del mes de junio del año 2019.



UAGro
FCQB - Coordinación del Programa
Educativo de Biotecnología
ADMINISTRACIÓN 2018 - 2021
Dr. Carlos Ortuño Pineda
Coordinador del PE de Biotecnología


Dr. Gerardo Huerta Beristain
Presidente de La Academia de
Biotecnología

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



Facultad de Ciencias | Maestría en
Químico Biológicas | Biociencias

Otorgan la presente:

CONSTANCIA

A: M.C. FERNANDO ASTUDILLO MELGAR

Por la presentación del tema "Fuentes de biocatalizadores" como parte del curso de Biocatálisis, impartido en la Maestría en Biociencias, el día 8/10/2020.



Dra. Natividad Castro Alarcón
Coordinadora de la Maestría en Biociencias

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



COORDINACIÓN DEL POSGRADO CIEM

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: M.C. Fernando Astudillo Melgar

Por la presentación del tema "Análisis del microbioma", impartido en la Especialidad en Microbiología, el día 04 de marzo de 2021.



Dr. Jorge Antonio Pérez Saldaña
Coordinador Especialidad en Microbiología

Petaquillas, Guerrero, abril de 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



COORDINACIÓN DEL POSGRADO CIEM

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: MC. Fernando Astudillo Melgar

Por la presentación del tema "Análisis de Microbioma", impartido en la Especialidad en Microbiología, el día 04 de marzo de 2022.



Dr. Jorge Antonio Pérez Saldaña
Coordinador Especialidad en Microbiología

Petaquillas, Guerrero, MX. marzo de 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO



COORDINACIÓN DEL POSGRADO CIEM

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: MC. FERNANDO ASTUDILLO MELGAR

Por impartir la conferencia magistral "Análisis de Microbioma" en la Especialidad en Microbiología, el día 24 de febrero de 2023, con una duración de 3 horas.



Dr. Jorge Antonio Pérez Saldaña
Coordinador Especialidad en Microbiología

Petaquillas, Guerrero, Mex. Febrero de 2023

14. EPÍLOGO



La leyenda de Mayahuel

Mayahuel es la diosa azteca del maguey y del pulque, considerada como la madre de los cuatrocientos conejos o centzon totochtin, que representan las diferentes formas de embriaguez. Según la leyenda, Mayahuel era una joven diosa que vivía en el cielo con su abuela, una de las tzitzimime o estrellas demoníacas que atacaban la tierra durante los eclipses. Un día, el dios Quetzalcóatl, en forma de pájaro, la convenció de bajar a la tierra con él y le enseñó el secreto del maguey, del que se podía extraer el aguamiel. Juntos se escondieron en un árbol, pero la abuela de Mayahuel los descubrió y envió a las tzitzimime para matarlos. Quetzalcóatl logró escapar, pero Mayahuel fue despedazada y sus restos se convirtieron en los primeros magueyes. Quetzalcóatl, lleno de tristeza, hizo que de cada maguey brotara el pulque, la sangre de Mayahuel, para que los hombres pudieran beberla y recordarla.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. "Un regalo de los dioses: el agave"

El descubrimiento del pulque

Es el historiador Alva Ixtlilóchitl quien narra cómo Papantzin, padre de Xóchitl, descubrió mientras caminaba por unos magueyales un líquido que escurría de la base de una de estas plantas. Al acercarse, un ratón de campo salió corriendo luego de haber perforado la base de esta planta. Papantzin tomó algo de este líquido, que es aguamiel, y lo llevó a su casa. Luego de algunos días, Papantzin notó que el líquido cambió de color, textura y aroma, y al probarlo se percató de que su sabor era distinto y delicioso, además de que lo hacía sentir un tanto más alegre. Es así que decide ofrecer un poco de este néctar a su rey, Papantzin, y lo hace acompañado de su esposa y de su hija Xóchitl. Al probarlo, el rey queda muy complacido con la bebida y su hija y decide proponerle a su padre que se quede a vivir en el palacio para ser educada y recibir atenciones. Con el tiempo, ella procrea un hijo con Tepalcatzin, a quien llamaron Meconetzin quien ya en la adultez se convertirá en el último rey tolteca, conocido como Topiltzin.

Publicado por: Colectivo El Tinacal en 11:24



Encontramos uno de los puntos en los que la leyenda, la historia y la ciencia convergen. Desde épocas prehispánicas el pulque nos ha brindado elementos de cultura, tradiciones e incluso de salud. Hoy en día, con ayuda de la ciencia seguimos investigando los misterios que tiene esta bebida, además de comprobar científicamente lo que por años se ha sabido de forma empírica. Tanto en la leyenda como en nuestra historia, se creía que “el/los” encargados de generar el pulque eran los magueyes, con la investigación realizada en este trabajo estamos más cerca de poder asegurar esto, además de identificar de manera concreta y específica a los encargados de la fermentación del pulque. Continuemos con estos estudios que realzan nuestras tradiciones y abren una puerta a todo un mundo de conocimientos, desarrollo biotecnológico e innovación.

Fernando Astudillo Melgar