

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

---



---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ESTACIONAL SOBRE EL  
MICROBIOMA INVOLUCRADO EN LA FERMENTACIÓN DEL  
AGUAMIEL Y SU INFLUENCIA EN LAS PROPIEDADES QUÍMICAS  
DEL PULQUE”**

**POR:**

**Q. LUIS FERNANDO SEPULVEDA SAENZ**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

**CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO**

**ENERO DE 2020**

Chihuahua, Chih., a 09 de diciembre de 2020.

**Dr. Ildebrando Pérez Reyes**  
**Secretario de Investigación y Posgrado**  
**Facultad de Ciencias Químicas**  
**Universidad Autónoma de Chihuahua**  
**P r e s e n t e:**

Por medio de la presente me permito informar a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **Evaluación del efecto estacional sobre el microbioma involucrado en la fermentación del aguamiel y su influencia en las propiedades químicas del pulque**, presentada por el estudiante **Luis Fernando Sepúlveda Sáenz** alumno del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología.

Después de la revisión, indicamos al tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, queda la tesis liberada para someterse a la revisión del comité revisor para continuar con los tramites de obtención de grado del estudiante.

**A t e n t a m e n t e**



\_\_\_\_\_  
**Dr. Joan Sebastián Salas Leiva**  
**Co-Director de tesis**



\_\_\_\_\_  
**Dra. Hilda Amelia Piñón Castillo**  
**Directora de tesis**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA

Chihuahua, Chih., a 12 de enero de 2021.

Oficio: 15/CA/SIP/21

**Dr. Ildebrando Pérez Reyes**  
**Secretario de Investigación y Posgrado**  
**Facultad de Ciencias Químicas**  
**Universidad Autónoma de Chihuahua**  
**P r e s e n t e:**

Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **Evaluación del efecto estacional sobre el microbioma involucrado en la fermentación del aguamiel y su influencia en las propiedades químicas del pulque**, presentada por el estudiante **Luis Fernando Sepúlveda Sáenz** alumno del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología.

Después de la revisión, indicamos al tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

**A t e n t a m e n t e**  
**“Por la Ciencia para Bien del Hombre”**

**Dra. Laila Nayzzel Muñoz Castellanos**  
**Asesora de tesis**

**Dra. Reyna Reyes Martínez**  
**Asesora de tesis**

**Dra. Martha Graciela Ruiz Gutiérrez**  
**Asesora de tesis**

**Dr. Joan Sebastián Salas Leiva**  
**Co-Director de tesis**

**Dra. Hilda Amelia Piñón Castillo**  
**Directora de tesis**

**Dr. Ildebrando Pérez Reyes**  
**Secretario de Investigación y Posgrado**



\*\*\*El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
Circuito Universitario  
Campus Universitario #2 C.P. 31125  
Tel. +52 (614) 236 6000  
Chihuahua, Chihuahua, México  
<http://www.fcq.uach.mx>

## AGRADECIMIENTOS

El primer y más grande agradecimiento es para mi madre Rosa Elena S., quien siempre me ha brindado un apoyo y amor incondicional, sus enseñanzas han hecho lo que soy.

El siguiente va a mis compañeros de maestría: Eduardo M., Benjamín H., Carlos T., Jesús R., Omar L. y Sayuri N., por las aventuras que compartimos juntos, su apoyo en lo académico y experimental durante el transcurso de la maestría, y claro: su amistad.

A mis compañeros del laboratorio de Micología: Alejandra J., América H., Cindy V., Aidet G., Alan A., Edna H., Clementina O., Mónica A., Nancy C., Andrea R., Héctor S., Merari M. y Anahí L. Juntos aprendimos, hicimos un gran equipo contra los ácaros y las esporas contaminantes y al mismo tiempo nos hicimos amigos. Además, a mis compañeros de tesis: Carlos H. y Fernanda M. A los compañeros de la facultad: Susana P., Rodrigo S., Daniel H., Rodolfo G., Alejandro S., Julia M., Margarita G. Debo mencionar a la Dra. Laila M. que me permitió trabajar en su laboratorio, al Dr. César G., Dr. Román G y M.C. Alejandra B. que forman también parte del equipo, quienes estuvieron siempre dispuestos a compartir su conocimiento y ayudarnos.

A los nuevos amigos de esta aventura y a los viejos, que siguen ahí.

A los doctores con lo que cursé las materias: Dr. Antonio T., Dra. Carmen G., Dr. Quintín R., Dr. Sigifredo A., Dr. Rubén M., Virginia N., Edward E., Dra. Rocío I., Dr. Iván S. y la Dra. Blanca R. De todos ellos aprendí. También agradezco a los encargados de los laboratorios donde realicé otras actividades y que me permitieron trabajar con ellos.

A mi directora de tesis, la Dra. Hilda Piñón por darme la oportunidad y confianza de tomar este proyecto, ya que durante estos poco más de dos años gran parte de mi vida a girado en torno a esta bebida llamada pulque. A mi codirector el Dr. Joan Salas, y a los asesores del proyecto: Dra. Martha Ruíz, Dra. Reyna Reyes y nuevamente a la Dra. Laila Muñoz.

Debo agradecer también a la Universidad Autónoma de Chihuahua y a la Facultad de Ciencias Químicas, primero porque me permitieron estudiar mi carrera de Químico y luego, unos años después regresar para cursar la Maestría en Biotecnología.

A CONACYT por el programa de becas a posgrado, ya que sin ese apoyo no hubiera sido posible esta segunda estancia en la ciudad de Chihuahua. Finalmente, a todos los *et al.* con los que crucé camino durante mi camino de foranidad.



## I. ÍNDICE

<b>II. ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	iv
<b>III. ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	v
<b>IV. ABREVIATURAS</b> .....	vi
<b>V. RESÚMEN</b> .....	vii
<b>VI. ABSTRACT</b> .....	viii
<b>VII. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>VIII. ANTECEDENTES</b> .....	2
<b>IX. JUSTIFICACIÓN</b> .....	12
<b>X. HIPÓTESIS</b> .....	13
<b>XI. OBJETIVOS</b> .....	13
11.1 Objetivo general .....	13
11.2 Objetivos particulares .....	13
<b>XII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	14
12.1.1 Materiales .....	14
12.1.2 Equipos .....	14
12.2 Metodología .....	15
12.2.1 Toma de muestra .....	15
12.3 Aislamiento e identificación de microorganismos de interés de muestras de aguamiel y pulque .....	16
12.3.1 Aislamiento e identificación de microorganismos .....	16
12.3.2 Identificación de levaduras .....	17
12.3.3 Perfiles RAPDs .....	17
12.3.4 Amplificación de la región ITS mediante PCR .....	18
12.3.5 Purificación de productos de amplificación y secuenciación .....	18
12.4 Análisis bioinformático de las secuencias para la identificación de levaduras .....	19
12.4.1 Identificación de las secuencias .....	19
12.4.2 Alineamiento de secuencias .....	19
12.4.3 Elaboración de árboles filogenéticos .....	19
12.5 Determinación de comunidades microbianas presentes en aguamiel y pulque de las muestras obtenidas en la estación de invierno y verano .....	20
12.6 Determinación de características químicas de aguamiel y pulque .....	20
12.6.1 Determinación de pH .....	21
12.6.2 Determinación de azúcares totales .....	21
12.6.3 Determinación de azúcares reductores .....	22



12.6.4 Determinación de proteínas totales.....	22
12.7 Análisis estadístico .....	23
XIII Resultados .....	25
13.1 Aislamiento y caracterización de microorganismos.....	25
13.2 Aislamiento e identificación de levaduras.....	29
13.2.1 Aislamiento de levaduras .....	29
13.2.2 Identificación de levaduras aisladas .....	31
13.3 Obtención del ADN genómico para el análisis de comunidades fúngicas y bacterianas de aguamiel y pulque .....	47
13.3.1 Resultados del análisis metagenómico para bacterias del aguamiel y pulque .....	48
13.3.2 Resultados del análisis metagenómico para hongos y levaduras del aguamiel y pulque .....	55
13.4 Resultados de pruebas químicas .....	62
13.4.1 Determinación de pH .....	62
13.4.2 Determinación de acidez total.....	63
13.4.3 Determinación de proteínas .....	64
13.4.4 Determinación de azúcares totales .....	65
13.4.4 Determinación de azúcares reductores.....	66
13.5 Relación entre los microorganismos y características químicas .....	68
13.5.1 Correlación de muestras de aguamiel.....	68
13.5.2 Correlación de muestras de pulque .....	70
XIV. DISCUSIÓN .....	72
14.1 Recuento de microorganismos .....	72
14.2 Aislamiento e identificación de levaduras.....	74
14.3 Análisis metagenómico para bacterias en aguamiel y pulque.....	79
14.4 Análisis metagenómico para levaduras en aguamiel y pulque.....	80
14.5 Índices de diversidad .....	82
14.6 Determinaciones químicas .....	83
14.7 Correlación de resultados .....	86
XV. CONCLUSIONES .....	89
XVI. PERSPECTIVAS .....	90
XVII. BIBLIOGRAFÍA .....	91
XVII. ANEXOS.....	102



## II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Conteos de microorganismos para las muestras de la estación de invierno. .	25
Tabla 2. Conteos de microorganismos para las muestras de la estación de verano.....	26
Tabla 3. Morfología macroscópica habitual en las levaduras aisladas.....	29
Tabla 4. Código para la selección de levaduras de aguamiel y pulque. ....	37
Tabla 5. Resultados del alineamiento de las levaduras aisladas en muestras de aguamiel invierno. ....	41
Tabla 6. Resultados del alineamiento de las levaduras aisladas en muestras de aguamiel verano. ....	42
Tabla 7. Resultados del alineamiento de las levaduras aisladas en muestras de pulque invierno.....	43
Tabla 8. Resultados del alineamiento de las levaduras aisladas las muestras de pulque verano.....	44
Tabla 9. Listado de las diferentes levaduras identificadas mediante análisis de su secuencia ITS y las muestras a las que corresponden.....	45
Tabla 10. Número de secuencias reportadas de bacterias en las muestras de aguamiel y pulque.....	48
Tabla 11. Número de secuencias reportadas en las muestras de aguamiel y pulque levaduras.....	55
Tabla 12. Comparativa de levaduras identificadas mediante secuenciación masiva y secuenciación de muestras aisladas. ....	61
Tabla 13. Análisis de pH de muestras de aguamiel y pulque de las estaciones de invierno y verano. ....	62
Tabla 14. Análisis de acidez total de muestras de aguamiel y pulque de las estaciones de invierno y verano. ....	63
Tabla 15. Análisis de proteína de muestras de aguamiel y pulque de las estaciones de invierno y verano. ....	64
Tabla 16. Análisis de azúcares totales de muestras de aguamiel y pulque de las estaciones de invierno y verano.....	65
Tabla 17. Análisis de azúcares reductores de muestras de aguamiel y pulque de las estaciones de invierno y verano.....	66



### III. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Morfología microscópica de bacterias aisladas en agar MRS y GYC. ....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 2. Morfología microscópica de levaduras aisladas en agar SDA y EXM provenientes de muestras de aguamiel y pulque de la estación invierno y verano. ....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 3. Extracción de ADN. ....</b>	<b>31</b>
<b>Figura 4. Patrón RAPD. ....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 5. Dendograma con patrones de bandas por RAPD para las levaduras de invierno. ....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 6. Dendograma con patrones de bandas por RAPD para las levaduras de verano. ....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 7. Dendograma con patrones RAPD con la selección de levaduras de invierno y verano. ....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 8. Amplificación y purificación de ADN de la región ITS 1-2 de las muestras de levaduras aisladas. ....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 9. Árbol filogenético consenso de las secuencias de levaduras y los alineamientos con mayor porcentaje de identidad. ....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 10. Extracción de ADN metagenómico de las muestras de aguamiel y pulque de la estación de invierno y verano. ....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 11. Índices de diversidad alfa para bacterias amplificadas mediante 16S. ....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 12. Diversidad beta mediante similitud de Bray-Curtis para bacterias. ....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 13. Mapa de calor de abundancia de taxonomía con agrupación de muestras a nivel familia para bacterias. ....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 14. Resumen de taxonomía a nivel familia para bacterias. ....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 15. Diagrama de Venn para las familias de bacterias que comparten los grupos de muestras. ....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 16. Índices de diversidad alfa para hongos y levaduras amplificados mediante ITS 1-2. ....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 17. Diversidad beta mediante similitud de Bray-Curtis para levaduras. ....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 18. Mapa de calor de abundancia de taxonomía con agrupación de muestras a nivel familia para levaduras. ....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 19. Resumen de taxonomía a nivel familia para levaduras. ....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 20. Diagrama de Venn para las familias de levaduras que comparten los grupos de muestras. ....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 21. Gráfico bidimensional de análisis de componentes principales para las variables de las muestras de aguamiel. ....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 22. Gráfico bidimensional de análisis de componentes principales para las variables de las muestras de pulque. ....</b>	<b>70</b>





#### IV. ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µL	Microlitros
µM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
cm	Centímetros
g	Gramos
h	Horas
L	Litro
min	Minutos
mL	Mililitro
MPM	Marcador de peso molecular
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ppm	Partes por millón
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPGMA	Método de agrupamiento jerárquico aglomerativo simple
x g	Gravedades



## V. RESÚMEN

El pulque es la bebida fermentada por tradición en México, cuyo consumo data de la época prehispánica, pero que su demanda actualmente ha disminuido. Varios estudios sobre el aguamiel y pulque han determinado los microorganismos que realizan los tres tipos de fermentación presentes, así como las características químicas de estos dos productos. Pero se tiene poca información respecto a las interacciones de estas poblaciones, y de sus microorganismos que podrían ser utilizados en la producción de enzimas, o metabolitos como ácidos orgánicos y bacteriocinas.

En este estudio se analizaron muestras de aguamiel y pulque de la estación de invierno y verano, provenientes de la comunidad de Los Claveles, Guanajuato; a las que se realizó una identificación de microorganismos mediante técnicas tradicionales de cultivo e independientes de cultivo y, determinación de características químicas.

En la secuenciación masiva para bacterias, se encontró un mayor número de secuencias diferentes en el pulque, teniendo a la familia Leuconostocaceae como la predominante y presente en todas las muestras. En las levaduras el mayor número de secuencias diferentes se encontró en el aguamiel y, la familia Saccharomycetaceae predominó en aguamiel y pasó a ser la única en el pulque.

Después del proceso de fermentación del aguamiel, se encontraron diferencias en los recuentos de microorganismos: un aumento de bacterias lácticas y acéticas, y una disminución de bacterias mesófilas, coliformes, Gram- y levaduras. Se aislaron cincuenta y seis levaduras, de las cuales se seleccionaron treinta y siete mediante perfiles RAPDs, logrando la identificación molecular de seis: encontrándose en aguamiel y pulque a *Kluyveromyces marxianus* y *Zygosaccharomyces bailii*; en aguamiel *Candida boidinii*, *Candida sonorensis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Kazachstania spp.* y; en pulque a *Pichia membranifaciens* y *Moesziomyces spp.* No se llevó a cabo el aislamiento e identificación de bacterias. En las características químicas después de la fermentación, hubo una disminución del pH, proteínas, azúcares totales y azúcares reductores y; un aumento del ácido láctico.



## VI. ABSTRACT

Pulque is the traditionally fermented drink in Mexico, whose consumption dates back to pre-Hispanic times, but its demand has now decreased. Several studies on mead and pulque have determined the microorganisms that carry out the three types of fermentation present, as well as the chemical characteristics of these two products. But little information is available regarding the interactions of these populations, and their microorganisms that could be used in the production of enzymes, or metabolites such as organic acids and bacteriocins.

In this study, samples of mead and pulque from the winter and summer seasons were used, from the community of Los Claveles, Guanajuato; to which an identification of microorganisms was carried out through traditional culture and independent culture techniques and, determination of chemical characteristics.

In the massive sequencing for bacteria, a greater number of different sequences were found in pulque, with the Leuconostocaceae family as the predominant and present in all samples. In yeasts, the largest number of different sequences was found in mead and the Saccharomycetaceae family predominated in mead and became the only one in pulque.

After the fermentation process of the mead, differences were found in the counts of microorganisms: an increase in lactic and acetic bacteria, and a decrease in mesophilic, coliform, Gram- bacteria and yeast. Fifty-six yeasts were isolated, of which thirty-seven were selected by RAPDs profiles, achieving the molecular identification of six: found in mead and pulque *Kluyveromyces marxianus* and *Zygosaccharomyces bailii*; in mead *Candida boidinii*, *Candida sonorensis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Kazachstania spp.* and; in pulque *Pichia membranifaciens* and *Moesziomyces spp.* Bacterial isolation and identification was not carried out. In the chemical characteristics after fermentation, there was a decrease in pH, proteins, total sugars and reducing sugars and; an increase in lactic acid.

**Keywords:** microbiome, pulque, fermentation.



## VII. INTRODUCCIÓN

El pulque es una bebida fermentada conocida desde el año 150 a.C. en la región de Mesoamérica (Correa *et al.*, 2014), cuyo consumo alcanzó su punto máximo a mediados del siglo XX en 500 millones de litros por año. Sin embargo, su producción y consumo ha disminuido drásticamente en los últimos 50 años por varias razones: erosión cultural, una percepción del pulque como una bebida de clase baja, no higiénica y calidad variable. Esto debido a que se produce y consume principalmente en áreas rurales donde los agaves silvestres son un recurso natural abundante, pero en gran parte sin explotar (Valadez *et al.*, 2012).

El pulque se produce por un proceso de fermentación discontinua del aguamiel del agave sin agitación y realizado en condiciones no asépticas. Los microorganismos involucrados en la fermentación son los que se presentan naturalmente durante la acumulación del aguamiel en la cavidad del maguey y los incorporados durante la recolección, transporte, preparación de la semilla (o inóculo) y manipulación. En estudios previos de aguamiel y pulque se ha encontrado la presencia de una gran diversidad de bacterias, siendo las principales las bacterias de los géneros *Lactobacillus sp.*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Zymomonas mobilis* y además la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Escalante *et al.*, 2008). La mayoría de estos trabajos se han realizado por técnicas tradicionales de cultivo (Enríquez *et al.*, 2017), por lo que el empleo de técnicas de secuenciación masiva de bacterias y hongos podría brindar nueva información sobre las características de las poblaciones microbianas en el aguamiel y pulque (Villareal *et al.*, 2019).

La caracterización microbiológica de alimentos y bebidas fermentadas de forma artesanal, representa el primer paso para un escalamiento del producto a nivel industrial (Blandino *et al.*, 2003). El principal reto asociado con la industrialización del pulque está relacionado con la disponibilidad natural del sustrato y la necesidad de un proceso de producción y fermentación estandarizado. Sin embargo, en la estabilización de la bebida fermentada, procesos como la pasteurización, filtrado y adición de conservadores, pueden provocar la eliminación de bacterias que aportan a las características organolépticas propias de la bebida (Escalante *et al.*, 2016). Debido



a las propiedades nutrimentales de los alimentos fermentados, y que además son una fuente de enzimas y microorganismos poco estudiados, su caracterización es fundamental (León *et al.*, 2016).

El objetivo de esta investigación fue evaluar las diferencias del microbioma fúngico y microbiano involucrado en la fermentación del aguamiel presentes en la estación de invierno y verano, y como estos cambios tienen influencia en las propiedades químicas del pulque artesanal proveniente de Los claveles, Guanajuato.

## VIII. ANTECEDENTES

### 8.1 El pulque y la planta de agave

El pulque es una bebida tradicional mexicana consumida particularmente en el centro del país, que se obtiene por fermentación de la savia azucarada llamada aguamiel. Es una bebida alcohólica, de color blanco, con olor fuerte y espesa que se obtiene haciendo fermentar el aguamiel de diferentes especies de maguey como lo son: *Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. mapisaga* y *A. salmiana* (Cervantes y Pedroza, 2008). Sobre su nombre, los aztecas llamaban metoctli (vino de agave) al pulque común, o iztacotli (vino blanco) y, poliuhquioctli (vino podrido) a la bebida con sabor desagradable, siendo probable que los conquistadores españoles llamaran pulque al aguamiel recién fermentado (Escalante *et al.*, 2016). Respecto a su origen, los antiguos otomíes ya conocían el pulque y fueron quizás los primeros en elaborarlo desde hace dos mil años. Los mayas lo conocían y los aztecas lo empezaron a producir en el año 1,239 d.C. (Godoy *et al.*, 2003).

La fermentación es una técnica de conservación de alimentos conocida desde la antigüedad por la mayoría de las culturas del mundo. En México existen una gran cantidad de alimentos y bebidas fermentadas como: pulque, atole agrio, pozol, tesgüino, tepache, colonche y chorote, que al ser fermentados de forma artesanal o semicomercial, estos se producen en cantidad limitada. (Quintero *et al.*, 2012).



El pulque se consume en todo el país, pero los principales estados productores y consumidores son: Ciudad de México, Estado de México, Hidalgo, Tlaxcala, Morelos y Michoacán (SAGARPA, 2015). En 2017 la producción nacional del agave pulquero fue de 217.7 millones de litros aportando Hidalgo el 69.6%, con una disminución en la intención de cosecha en 2018 a 186.3 millones de litros y en 2019 a 172.8 millones de litros (SIAP, 2020).

Existen factores ambientales que limitan el crecimiento y productividad de las plantas de agave como son: la radiación solar, temperatura, disponibilidad de agua y disponibilidad de nutrientes (Enríquez, 2008). Dentro de la planta de agave se produce el aguamiel la cual es rica en sacarosa, fructosa, glucosa y polifruktanos (Valadez *et al.*, 2012). La cantidad y tipo de azúcares que contienen las piñas de agave son muy importantes, siendo la fructosa y glucosa los principales azúcares reductores (tienen un grupo carbonilo libre) que son utilizados por las levaduras durante la fermentación para la obtención de etanol (Bautista *et al.*, 2001). En este aspecto, la temperatura tiene una gran influencia, ya que altas temperaturas reducen la producción y acumulación de azúcares debido a que se incrementa la respiración de la planta y, temperaturas bajas disminuyen el metabolismo pudiendo afectar los tejidos de la planta (Cota, 2009).

## 8.2 Proceso de elaboración del pulque

El proceso de fermentación inicia en la piña del agave, donde se encuentran microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas, acéticas, productoras de etanol y exopolisacáridos. La fermentación avanza conforme pasa el tiempo y se presentan cambios importantes como el incremento del porcentaje de alcohol etílico, que varía de 3 a 6%, además de la formación de exopolisacáridos como  $\beta$ -glucanos y dextranos, que aumentan la viscosidad siendo un parámetro para determinar que el aguamiel ya está fermentado (Cervantes *et al.*, 2008).



La elaboración tradicional del pulque no ha variado desde tiempos pre-hispánicos e involucra cuatro pasos que inicia con la selección de las plantas hasta la fermentación del aguamiel:

- a) Castración del maguey: de las plantas maduras de 8 a 10 años, se corta el quiote dejando una cavidad en su interior que se tapa con hojas. Esto es necesario para evitar la brotación floral, sino la planta nunca producirá aguamiel.
- b) Raspado de la cavidad y extracción del aguamiel: al raspar la pared de la cavidad se induce el flujo de savia, por lo que el aguamiel fluye y se acumula en la cavidad. Una planta madura de agave puede producir aguamiel por tres a seis meses hasta que muere (Enríquez *et al.*, 2017)
- c) Preparación de la semilla: el inóculo inicial o semilla para la fermentación se prepara al vaciar pulque fermentado en un contenedor que se llena con aguamiel nuevo, donde inicia la fermentación a temperatura ambiente. Finalmente, la semilla se transfiere a contenedores grandes donde se fermentará el aguamiel recién recolectado.
- d) Fermentación: el aguamiel recién recolectado se filtra para separar insectos, basuras u objetos grandes y se vierte en la tina donde la semilla se transfirió previamente. El tiempo de fermentación varía considerablemente según la calidad del aguamiel, la madurez de la semilla, la estación del año y la región productora, siendo de 3 a 6h hasta tiempo prolongados de 3 a 12 días (Escalante *et al.*, 2016).

### **8.3 Nutrientes y características químicas del aguamiel y pulque**

El aguamiel ligeramente fermentado es apreciado en diferentes regiones de México porque es creencia popular que brinda beneficios para la salud en niños, mujeres embarazadas y ancianos (González *et al.*, 2015). Mientras que el pulque es considerado una bebida saludable por su contenido de nutrientes, dado que puede ser una fuente importante de energía, vitaminas y los aminoácidos esenciales lisina y triptófano. Al consumirse como parte de la dieta, también aporta minerales (Muñiz *et al.* 2013).



La cantidad de estos nutrientes establecen la calidad de la bebida, y se dividen por sus propiedades químicas como lo establece las normas “NMX-V-022-1972. Aguamiel” y “NMX-V-037-1972. Pulque manejado a granel”. Siguiendo estos procedimientos de prueba, Rocha *et al.* (2020) determinaron las características químicas de muestras obtenidas de tres localidades productoras en el Estado de Hidalgo obteniendo en aguamiel valores de: pH 4.83, proteínas 3.70 g/L, sólidos totales 111.0 g/L, azúcares reducidos totales 109.1 g/L, azúcares reducidos directos 23.7 g/L y cenizas 3.76 g/L; y en pulque reportan: pH 4.07, proteínas 3.26 g/L, sólidos totales 18.07 g/L, azúcares reducidos totales 3.5 g/L, azúcares reducidos directos 0.93 g/L y cenizas 2.3 g/L.

El equipo de Espíndola *et al.* (2018) encontraron en el aguamiel de tres entidades del centro del país, una actividad antioxidante de 20.95  $\mu\text{mol}$  equivalente de Trolox/g, y 19.21 mg de fenoles expresados como ácido gálico/g. En el análisis bromatológico de Bautista y Arias (2008) en el aguamiel proveniente de *Agave americana*, obtuvieron 14.82 mg/g de muestra de vitamina C y los minerales: sodio 5.92 mg/g, potasio 14.56 mg/g, magnesio 8.60 mg/g, fósforo 4.20 g/mg, hierro 0.06 g/mg, zinc 0.07 mg/g y cobre 0.03 mg/g.

#### 8.4 Microorganismos presentes en el pulque

Durante la producción del pulque han sido aislados diversos microorganismos de importancia industrial, que producen tres tipos de fermentaciones: ácida por bacterias ácido lácticas (BAL) homo y heterofermentativas como *Lactobacillus acidophilus*, *L. kefir*, *L. acetotolerans*, *L. hilgardii* y *L. plantarum*, alcohólica por *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* que producen etanol y viscosa por *Leuconostoc mesenteroides* productor de dextrano. Además de los mencionados, otros productos de interés biotecnológico que pueden ser aislados como los bactericidas y enzimas hidrolíticas (Escalante *et al.*, 2004).

El sabor y aroma está determinado por la mezcla de compuestos producidos durante el proceso de fermentación dada por los microorganismos presentes naturalmente en la planta de agave, donde los carbohidratos se convierten principalmente a alcohol





etílico, ésteres y ácidos orgánicos (Escalante *et al.*, 2007). Las BAL son bacterias Gram+ que pueden ser homofermentativas y heterofermentativas, teniendo como principales géneros a *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*. Sus principales productos de fermentación es el ácido láctico y otros ácidos orgánicos, que además de contribuir al sabor, ayudan a la preservación de alimentos debido a sus actividades antimicrobianas (Rámirez *et al.*, 2011). En el primer estudio realizado a esta bebida, se aislaron cepas de *Lactobacillus spp.* de pulque, que al ser inocularlas en aguamiel enriquecida con glucosa, se encontró que pueden asimilar hasta el 53% de los azúcares presentes para producir ácido láctico y, que la concentración óptima de azúcares para su crecimiento es en 10% de glucosa (Sánchez y Hope, 1953). Sin embargo, la acumulación de ácido láctico producto del metabolismo de carbohidratos, inhibe el crecimiento de las BAL por la acidificación del citoplasma (Othman *et al.*, 2017)

Las bacterias acéticas son bacilos Gram- ubicuos que tienen como principales géneros a *Acetobacter* y *Gluconobacter*, y tienen la capacidad de convertir el alcohol etílico en ácido acético en presencia de oxígeno. Son bacterias aerobias estrictas que están adaptadas a crecer en ambientes ricos en azúcares y etanol. Si bien se usan para la elaboración de vinagre, son bacterias presentes de forma natural en las uvas y vino, que pueden dañar este último con el avinagrado (Bartowsky y Henschke, 2008).

Las levaduras como *Saccharomyces spp.* y *Kluyveromyces spp.*, se caracterizan por la fermentación de carbohidratos para producir alcohol etílico y se emplean en diversos alimentos fermentados como pan, chucrut, kéfir, vino y otras bebidas alcohólicas. La levadura *Kluyveromyces marxianus* es alternativa biotecnológica por ser termotolerante, tener un crecimiento rápido, emplear varias fuentes de carbono y nitrógeno, además tiene aplicaciones por su secreción de enzimas y la producción de compuestos aromáticos en los alimentos fermentados (Rajkumar *et al.*, 2019). La fermentación espontánea del agave azul es llevada a cabo por una sucesión de poblaciones diferentes de levaduras llamadas no-*Saccharomyces* donde se encuentran las especies: *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspota delbrueckii* y *Hanseniaspora spp.*, las cuales crecen en las primeras etapas del proceso, pero se



inhiben por la concentración de alcohol etílico y la fermentación es continuada por *Saccharomyces cerevisiae* (González *et al.*, 2015).

### **8.5 Identificación de microorganismos por medios dependientes de cultivo**

Determinar la diversidad de microorganismos que constituyen los ecosistemas naturales y artificiales, ha sido una tarea muy difícil que se puede abordar de dos formas: técnicas tradicionales o dependientes de cultivo y técnicas independientes de cultivo (Theron y Cloete, 2000). Por microbiología tradicional, se combina el empleo de medios de cultivo para lograr el aislamiento de microorganismos y su conservación, junto a una posterior identificación con base a sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Botes *et al.*, 2006).

Las metodologías y el costo para realizar los cultivos tradicionales lo hacen una opción accesible, aunque es necesario una selección correcta del medio de cultivo y de las condiciones para el crecimiento. También presenta el inconveniente de requerir mucho tiempo para su identificación y la desventaja de que la mayoría de los microorganismos presentes en la naturaleza no son cultivables en los medios habituales (solo una pequeña fracción del 0.1 al 10% de las bacterias), al requerir cantidades y/o nutrientes muy específicos o bien interacciones con otros microorganismos (Suárez, 2017).

A diferencia de la mayoría de los microorganismos eucariotas, son pocas las bacterias que pueden identificarse únicamente en base a sus características morfológicas (Theron y Cloete, 2000). Y la identificación por características fenotípicas da un resultado probable pero no definitivo, debido a que cepas de la misma especie pueden presentar diferencias en sus características morfológicas y fenotípicas respecto a las cepas de referencia.



### 8.5.1 Medios de cultivo

El objetivo de los medios de cultivo es proporcionar a los microorganismos los nutrientes y condiciones óptimas para su desarrollo, tratando de simular las características del medio natural. Para ello deben tener una selección y cantidades adecuadas de los nutrientes: fuente de carbono, energía, nitrógeno y factores de crecimiento; así como la concentración de oxígeno, temperatura y pH (Gómez y Batista, 2006).

Los medios de cultivos empleados para el conteo de microorganismos en aguamiel y pulque fueron: el agar Man-Rogosa-Shape (MRS) que tiene cofactores que ayudan al crecimiento de bacterias ácido lácticas incluyendo los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. El agar Glucosa-Levadura-Carbonato (GYC) que permite diferenciar bacterias acéticas como *Acetobacter* al formar halos de solubilización de carbonato de calcio cuando se da la producción de ácido acético a partir de etanol del medio. El agar Métodos Estándar es un medio general para la cuenta de microorganismos mesófilos aerobios presentes en alimentos. El agar Rojo Bilis Violeta se emplea para la detección presuntiva de bacterias coliformes principalmente en alimentos. Para ello, el medio de cultivo contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben el crecimiento de bacterias Gram+, además de contar con lactosa e indicador rojo neutro. El agar MacConkey es similar en componentes (solo cambia el digerido de tejido animal por peptona) y aplicación al anterior, ya que permite diferenciar bacterias Gram- y enterobacterias en base a la fermentación de lactosa

### 8.6 Identificación de microorganismos por medios independientes de cultivo

Por las desventajas mencionadas en la sección anterior, se han establecido los métodos genotípicos basados en técnicas moleculares. Estos se basan en la extracción de ácidos nucleicos y una posterior amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y, se caracterizan por una alta sensibilidad y reproducibilidad (Buszewski *et al.*, 2017). Así se puede aislar y hacer crecer un microorganismo de forma tradicional y, por medio de métodos moleculares, identificar



la muestra a nivel de género o especie, o incluso llegar a cepas específicas (Ivey y Phister, 2011).

Los principales genes secuenciados para la identificación molecular son el 16S ribosomal en caso de bacterias o la región ITS 1-2 (Internal Transcriber Spacer) para hongos y levaduras, que incluye el gen 5.8S ribosomal (Bou *et al.*, 2011). La secuenciación del gen 16S ARNr, es considerado el método más preciso y considerado un estándar para la identificación de bacterias a nivel de especie, sin embargo, su costo no permite realizar esta técnica como prueba rutinaria de diagnóstico (Buszewski *et al.*, 2017).

### **8.7 Microbioma y bioinformática**

El microbioma es la comunidad entera de microorganismos presentes (bacterias, arqueas, hongos, protozoos y virus) en un ambiente particular y, la metagenómica es la secuenciación del ADN de todos los microorganismos presentes en una muestra y permite estudiar la estructura y función de estos en una población (Roumpeka *et al.*, 2017). Considerando el tipo de muestra se debe buscar el método que dé la mayor eficiencia y calidad de extracción de ADN, así como evaluar la integridad y cantidad del material genético mediante electroforesis en gel (Kuhn *et al.*, 2017).

En el vino la ecología microbiana es compleja, ya que puede tener un papel tanto positivo como negativo en la calidad final del producto, por esto ha sido bien estudiada. Las técnicas tradicionales para identificar poblaciones de microorganismos han sido reemplazadas por los métodos moleculares, que tienen como ventaja la velocidad y precisión. Una forma para analizar la población directamente de la muestra es mediante la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), donde el ADN se aísla directamente de la fermentación, luego es amplificado por PCR y se separa por electroforesis en gel (Ivey y Phister, 2011).

Los microorganismos asociados a con los sabores y olores característicos del aguamiel son desconocidos a la fecha, además esta diversidad microbiana también determina la calidad, vida útil y características físico-químicas del aguamiel (Enríquez



*et al.*, 2017). La mayoría de los estudios enfocados en la diversidad de microorganismos presentes de forma nativa en el aguamiel, se han basado en métodos dependientes de cultivo, por lo que la diversidad microbiana no ha sido completamente caracterizada y se conoce poco de los microorganismos presentes que no son cultivables, así como de los cambios de esta microbiota dependiendo de la especie de agave y de la temporada del año (Villareal *et al.*, 2019).

Otra técnica es la secuenciación por fragmentos al azar o shotgun, que rompe el genoma de un organismo en pequeños fragmentos que luego son secuenciados y alineados para formar y reconstruir el genoma. Este tipo de secuenciación tiene como principal ventaja la posibilidad de analizar la comunidad microbiana tanto de bacterias y hongos, y realizar inferencias con base a la cantidad de genes presentes (Filippis *et al.*, 2016). La secuenciación del metagenoma de alto rendimiento, no se había aplicado hasta recientemente para estudiar la diversidad microbiana y metabólica en la fermentación del aguamiel (Chacón *et al.*, 2020).

Las herramientas de bioinformática permiten procesar estas grandes cantidades de datos para obtener su taxonomía, visualizar la composición y calcular índices de biodiversidad (Boylen *et al.*, 2019). Otras funciones de estos programas es la visualización de secuencias de nucleótidos, el alineamiento múltiple de secuencias, comparación de secuencias de genes, aplicar algoritmos para inferir árboles evolutivos y estimar distancias genéticas (Kumar *et al.*, 2018).

Las características de una comunidad microbiana en un nicho determinado, se definen por la diversidad que toman en cuenta el número de especies presentes y su abundancia relativa. Para comparar la diversidad microbiana se han desarrollado herramientas bioinformáticas como los índices alfa., (la riqueza biológica de un determinado hábitat) (Kim *et al.*, 2017) entre algunos se encuentran: índice Chao 1, se basa en que muchas especies sólo están representadas por pocos individuos en una muestra (especies raras), comparadas con las especies comunes que pueden tener muchos individuos. El índice Shannon expresa la uniformidad de las especies de la muestra, el valor H no tiene límite, pero suele estar entre 2 y 3, considerándose los valores menores a 2 bajos en diversidad. El índice Simpson (D) mide la probabilidad



de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a una misma especie y cuanto más se acerca el valor de  $D$  a 1, mayor es la diversidad (Moreno, 2001).

La diversidad beta es el grado de cambio o reemplazo en la composición de especies entre diferentes comunidades. Uno de los métodos para medirla es la disimilitud de Bray-Curtis que cuantifica la disimilitud (diferencia) de composición entre sitios diferentes, en base a los recuentos en cada sitio. Los valores van de 0 (ambos sitios tienen la misma composición) a 1 (los sitios no comparten ninguna especie) (Moreno, 2001).



## IX. JUSTIFICACIÓN

Debido a que durante la elaboración del pulque se llevan a cabo tres tipos de fermentación: ácida, alcohólica y viscosa, el conocimiento de los microorganismos presentes tiene un interés biotecnológico e industrial por su capacidad de producir metabolitos como: alcohol etílico, ácido láctico, enzimas hidrolíticas y exopolisacáridos. Tener una identificación de los principales microorganismos involucrados podría generar a futuro nuevas estrategias para simplificar y mejorar el inóculo iniciador, estandarizar el procedimiento de producción, llevar a cabo un mejor procedimiento de industrialización. El realizar un estudio de bioprospección a los microorganismos presentes en la fermentación ayudaría a encontrar posibles aplicaciones adicionales en procesos industriales para la producción de enzimas o metabolitos secundarios. Además, el aislar los microorganismos permitirá estudiar las capacidades metabólicas de los mismos para su posterior aplicación en otros procesos industriales.



## **X. HIPÓTESIS**

La variación en las comunidades microbianas presentes en la estación de invierno y verano, son causantes de los cambios en las características químicas durante el proceso de fermentación del aguamiel.

## **XI. OBJETIVOS**

### **11.1 Objetivo general**

Evaluar las diferencias estacionales del microbioma involucrado en la fermentación del aguamiel y su influencia en las propiedades químicas del pulque artesanal proveniente de Los claveles, Guanajuato.

### **11.2 Objetivos particulares**

- 1) Identificar bacterias, hongos y levaduras presentes en aguamiel y pulque de las estaciones de verano e invierno.
- 2) Determinar las comunidades microbianas presentes en el aguamiel y pulque de invierno y verano por métodos independientes de cultivo.
- 3) Determinar las propiedades químicas del aguamiel de agave y pulque de invierno y verano y, correlacionar los resultados con las comunidades microbianas.





## XII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 12.1.1 Materiales

- Material de laboratorio variado
- Reactivos de laboratorio variados
- Cajas Petri desechables (BD)
- Medios de cultivo en polvo: Métodos estándar, Rojo bilis violeta, MacConkey, Dextrosa Sabouraud y Extracto de malta (BD)
- Caldo de cultivo Dextrosa Sabouraud (BD)
- Micropipetas de 10  $\mu$ L marca BioRad, 200  $\mu$ L y 1,000  $\mu$ L (Eppendorf)
- Puntillas desechables para micropipeta de 10  $\mu$ L, 200  $\mu$ L y 1,000  $\mu$ L (Axygen)
- Microtubos de plástico de 200  $\mu$ L y 1.5 mL (Axygen)
- Buffer TAE 50X y agarosa en polvo (BioRad)
- Cebador M13, ITS1 e ITS2 (Sigma-Aldrich)
- Mezcla DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)
- Kit de extracción de ADN "Quick-DNA Fungal-Bacterial Miniprep Kit" y "DNA Miniprep Kit" (Zymo Research).
- Kit de purificación "GFX PCR DNA and Gel band purification kit" (Illustra)

### 12.1.2 Equipos

- Mechero Bunsen
- Incubadora de 28 °C y 37 °C Shel Lab (Sheldon Manufacturing)
- Campana UV UV3-HEPA (UVP)
- Potenciómetro UB-10 (Denver Instrument)
- Incubadora con agitación (Innova 4300)



- Centrifuga 5804R (Eppendorf)
- Microcentrifuga Z 167M (Hermle)
- Cámara de electroforesis y fuente de poder (BioRad)
- Termociclador SureCycler 8800 (Agilent Technologies)
- Transiluminador Gel Logic 200 Image System (Kodak)
- Espectrofotómetro Genesys 8 (Spectronic)
- Lector de microplacas Varioskan Flash (Thermo Scientific)

## 12.2 Metodología

### 12.2.1 Toma de muestra

Las muestras de aguamiel y pulque fueron obtenidas del poblado Los Claveles, Guanajuato (coordenadas de longitud 100.894444 y latitud 21.320833, a 2,000m sobre el nivel del mar). Esta localidad es parte del municipio Dolores Hidalgo en Guanajuato, donde en el año del 2019 se reportan temperaturas máximas y mínimas 26.1 a -1.8 °C con un promedio de 12.2 °C para el mes de Diciembre y, de 29.3 a 10.5 °C con promedio de 19.9 °C para Julio del 2019 (Centro de Ciencias Atmosféricas, Guanajuato). La radiación solar promedio en 2019 para 97.9 W/m<sup>2</sup> en Diciembre y en Julio de 162.5 W/m<sup>2</sup>. En el registro de lluvias se tiene un rango promedio de 0.2 mm para Diciembre y 3.0 mm de precipitación para Julio (CONAGUA, 2019).

Se tomaron tres muestras de aguamiel y pulque de días no consecutivos del mes de Diciembre del 2018 y Julio del 2019, de acuerdo con las recomendaciones de la NOM-109-SSA1-1994, todo el material e instrumentos para la toma de muestra fueron esterilizados para prevenir contaminación externa. Las muestras líquidas de aguamiel y pulque para el aislamiento de microorganismos se almacenaron tubos cónicos con glicerol al 50%, y en botes de plástico las muestras destinadas a pruebas químicas. Ambos se transportaron congelados hasta ciudad Chihuahua, Chihuahua donde se mantuvieron en congelación a -20 °C para su procesamiento posterior. Para acortar el nombre de las muestras se le asignó un código: aguamiel= A, pulque= P, invierno= i,



verano= v, y al final se agregó el día en que fue tomada la muestra; por ejemplo, la muestra que corresponde a aguamiel invierno del día 25 de Diciembre sería Ai25.

### **12.3 Aislamiento e identificación de microorganismos de interés de muestras de aguamiel y pulque**

#### **12.3.1 Aislamiento e identificación de microorganismos**

Se preparó la muestra según el procedimiento de la NOM-110-SSA1-1994, realizando primero una dilución primaria (con 1 mL de muestra con 9 mL de agua peptonada) para tener una distribución uniforme de los posibles microorganismos presentes en la muestra y después diluciones decimales hasta  $10^{-3}$ , que fueron posteriormente inoculadas en medios de cultivo específicos por triplicado:

##### a) Bacterias

Para determinar la presencia de bacterias se inoculó con 100  $\mu$ L de las diluciones preparadas en el procedimiento anterior mediante la técnica de extensión en superficie por triplicado en cajas Petri con agares selectivos, incubados por 24-48 h a 28°C y 37 °C según el tipo de microorganismos. Se contaron las colonias características de acuerdo a la norma NOM-113-SSA1-1994 para el caso de coliformes (colonias rojo oscuro generalmente con un halo de precipitación) y para los demás agares siguiendo las indicaciones del fabricante. El aislamiento de colonias de interés se realizó de acuerdo a su morfología macro y microscópicas.

##### b) Levaduras

Según lo indicado en la NOM-111-SSA1-1994, los microorganismos inoculados en el medio de cultivo se incubaron a 28 °C por 72 h y se realizó el conteo de colonias características (presencia de micelio en hongos) en un rango de 15 a 125. Para el primer conteo de hongos y levaduras, se usó el agar Dextrosa Sabouraud que tiene alta cantidad de dextrosa y un pH bajo que lo vuelven selectivo para hongos y levaduras, y se usó de antibiótico clindamicina para inhibir el crecimiento de bacterias. Por último, se realizó una segunda inoculación en el agar Extracto de Malta, tiene una



alta concentración de maltosa y un pH bajo que se acidificó con ácido tartárico o láctico, para favorecer el crecimiento de hongos y levaduras y, el uso de clindamicina.

### 12.3.2 Identificación de levaduras

Se aislaron colonias características de levaduras (colonias de tamaño grandes, color blanco, de textura cremosa y opacas) mediante la técnica de resiembra por estría abierta. Después, diferenciando su morfología microscópica y macroscópica se realizó una selección de cada una de las seis muestras de aguamiel y seis de pulque. Las colonias seleccionadas se pusieron a crecer por duplicado en tubos cónicos con 7 mL de caldo Dextrosa Sabouraud por 24 h a 27 °C en una agitadora incubadora a 90 rpm. Estos se centrifugaron a 4,844 x g por 5 min, dejando la pastilla de uno para conservación de la cepa en glicerol y el segundo para extracción de ADN.

La extracción de ADN genómico de las levaduras aisladas se realizó siguiendo los pasos del kit “Quick-DNA Fungal-Bacterial miniprep kit” de ZymoBIOMICS que consiste en lisis mecánica, filtrado por columna, lavado y elución de ADN en 50 µL de agua libre de ADN/ARNasas. La presencia y calidad de ADN se observó mediante electroforesis en gel: cargando 1 µL de muestra en gel de agarosa al 1.0% y usando el marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder como guía. La cámara de electroforesis se corrió a 70 V por un tiempo de 60 min.

### 12.3.3 Perfiles RAPDs

Para la amplificación de ADN polimórfico de levaduras se utilizó el cebador inespecífico M13 (GAGGGTGGCGTTCT) (Andrighetto *et al.*, 2000). Se realizó una mezcla de reacción en un volumen final de 20 uL empleando: 10 uL de mezcla DreamTaq Green Master Mix (1X), 1.6 uL de cebador M13 (40 uM), 0.8 uL de muestra de ADN (25-70 ng) y agua pura 7.6 uL. En el termociclador se realizaron treinta y cinco ciclos con las siguientes condiciones: calentamiento inicial a 95 °C por 10 min, desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 45 °C por 1 min, elongación a 72



°C por 2 min y elongación final a 72 °C por 7 min y conservación a 4 °C por un tiempo indefinido (García, 2017).

Se realizaron un conjunto de seis amplificaciones para cubrir todas las extracciones de ADN de las cepas de levaduras para revisar el patrón de bandas. Se empleó el marcador 1k DNA Ladder y las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 1.2% y, se dejó correr a 60 V por 120 min.

Teniendo las fotografías de perfiles RAPDs de las extracciones de ADN de todas las levaduras, se comparó el patrón de bandas mediante el programa “GelJ v2.0” (Heras *et al.*, 2015) en búsqueda de la presencia de bandas en posición similar. Para realizar las comparaciones y descartar los patrones iguales, se empleó el método de similitud de Dice y realizando el agrupamiento con el algoritmo UPGMA (Heras *et al.*, 2016) con una tolerancia de 1.0.

#### **12.3.4 Amplificación de la región ITS mediante PCR**

La región ITS 1-2 de las levaduras, se amplificó mediante el conjunto de cebadores universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). En la mezcla de reacción de 50uL de volumen final se empleó: 25 uL de mezcla DreamTaq Green Master Mix (1X), 2.0 uL de cebador ITS1 (50 uM), 2.0 uL de cebador ITS2 (50 uM), 2.0 uL de muestra de ADN (50-140 ng) y agua pura 19.0 uL. En el termociclador se realizaron treinta y cinco ciclos con las condiciones: calentamiento inicial a 95°C por 10 min, desnaturalización a 95°C por 45 s, alineamiento a 56°C por 50 s, elongación a 72° C por 30 s y elongación final a 72°C por 10 min y conservación a 4°C por un tiempo indefinido. Del producto de amplificación se cargó 1 µL en un gel de agarosa preparado al 1.2%, ajustando la cámara de electroforesis a 70V por 80 min.

#### **12.3.5 Purificación de productos de amplificación y secuenciación**

Las muestras con productos de amplificación de la región ITS 1-2 de levaduras fueron purificadas con el kit comercial “GFX PCR and Gel Band Purification kit” de que tiene



como pasos: captura de la muestra, lavado y elución en 25µL de agua libre de ADN/ARNasa. Se cargó 1 µL de muestra purificada en gel de agarosa al 1.2% para corroborar su presencia después del procedimiento.

A cada muestra se le midió la relación de absorbancia A260/230 con el equipo NanoDrop 2000 para cuantificar la cantidad y calidad de ADN (Anexo 17.5) resultante después de la purificación y, conocer que fuera el adecuado para el servicio de secuenciación.

## **12.4 Análisis bioinformático de las secuencias para la identificación de levaduras**

### **12.4.1 Identificación de las secuencias**

Los electroferogramas de la secuenciación Sanger se visualizaron con el programa Chromas v2.6.6 (Technelysium, 2018), se recortó los extremos con baja calidad y fueron exportadas las secuencias de nucleótidos a formato Fasta. El alineamiento local se realizó mediante la herramienta BLAST usando la base de datos del NCBI disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (NCBI Resource Coordinators, 2013), buscando las similitudes con mejor porcentaje de cobertura e identidad.

### **12.4.2 Alineamiento de secuencias**

Para trabajar con las secuencias se utilizó el programa MEGA v10.1.7 (Kumar *et al.*, 2018), donde se cargaron los archivos con las secuencias de las muestras de levaduras junto a las secuencias de las levaduras de la base de datos con las que obtuvieron mayor similitud y se realizó un alineamiento múltiple con el algoritmo de ClustalW.

### **12.4.3 Elaboración de árboles filogenéticos**

En MEGA se construyó el árbol filogenético inicial (el primero que se hace en base al algoritmo seleccionado) mediante el algoritmo de Neighbor-Join y BioNJ y, a partir de



este se realizó el árbol consenso con el modelo de Máxima verosimilitud (Kishino, H y Hasegawa, M., 2001) con el modelo de Tamura-Nei, dejando las opciones por defecto y el método de soporte bootstrap con un valor de 1,000 (Guindon, S. y Gascuel, O., 2003) para validar los nodos del árbol. Este consiste de que a partir del árbol inicial se crean replicas al azar y se evalúa el número de veces que cada nodo aparece, creando finalmente el árbol consenso con la más probabilidad de reflejar el proceso evolutivo real.

### **12.5 Determinación de comunidades microbianas presentes en aguamiel y pulque de las muestras obtenidas en la estación de invierno y verano**

Se realizó la extracción de ADN genómico a todas las muestras de aguamiel y pulque de forma directa empleando el kit "DNA Miniprep kit" de Zymo Research, siguiendo el protocolo del producto que consiste en: lisis mecánica, filtración, remoción de inhibidores y elución en 25  $\mu$ L de agua libre de ADN/RNAsas. La presencia de material genético se corroboró en un gel de agarosa al 0.8% cargando 1  $\mu$ L de muestra junto a 1  $\mu$ L de buffer de carga, estableciendo los parámetros de la cámara de electroforesis a 70V por 60 min. Las muestras se cuantificaron con el equipo Nanodrop 2000 para revisar la cantidad de ADN y relación de absorbancia 260/280 y 260/230.

Las muestras se secuenciaron mediante la plataforma Illumina en ZymoBIOMICS en California, Estados Unidos. Para la amplificación emplearon el juego de cebadores 16S V3-V4 para bacterias e ITS 1-2 para hongos y levaduras utilizando el secuenciador Illumina MiSeq. El servicio incluyó un análisis bioinformático que consiste en: limpieza de secuencias, asignación de taxonomía, gráficas de composición, diversidad alfa y beta que fueron hechos con el programa Qiime v1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010)

### **12.6 Determinación de características químicas de aguamiel y pulque**

Como tratamiento previo, las muestras fueron centrifugadas para remover los sólidos no solubles y quitar la turbidez. En tubos cónicos de 50 mL se centrifugó a 9,688 x g (10,000 rpm) por cinco minutos, se decantó, volvió a centrifugar y finalmente decantó en un tubo cónico limpio para su posterior uso y conservación.



Cada determinación se realizó con las muestras a temperatura ambiente. Las curvas de calibración y determinación de las muestras se realizaron por triplicado para pH, ácidos orgánicos, proteínas y azúcares reductores. Para los azúcares totales la determinación se realizó quintuplicado en muestras de invierno y por octuplicado para las muestras de verano. Los resultados se reportan como media con su desviación estándar.

### **12.6.1 Determinación de pH**

Se vació las muestras de aguamiel y pulque a temperatura ambiente en vasos de precipitado y con un potenciómetro previamente calibrado (con buffer pH 4 y 7), colocando el electrodo en el centro sin tocar las paredes del recipiente y se tomó la lectura de pH.

### **12.6.2 Determinación de azúcares totales**

La determinación de azúcares totales se realizó mediante el método de ácido sulfúrico- fenol en la cual, el primer reactivo realiza la hidrólisis de los carbohidratos y el segundo genera la reacción colorimétrica (Dubois *et al.*, 1956). Primero se realizó una solución patrón de glucosa a 2 g/L con la cual se prepararon diluciones a 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg/mL para la curva de calibración. Cada muestra de aguamiel y pulque se diluyó de 500 a 5,000 veces para que la absorbancia quede dentro del rango de la curva. Para la determinación, en tubos de ensaye se vació 200  $\mu$ L de muestra, 400  $\mu$ L de fenol al 5% y 600  $\mu$ L de ácido sulfúrico concentrado sobre la muestra (evitando que caiga por la pared del tubo), se dejó reposar por 10 min, luego se agitó por 30 s y se pasó a enfriar en hielo. Finalmente, pasados 10 min se vació a una celdilla de plástico y se leyó en espectrofotómetro a 490 nm (Ávila *et al.*, 2012). En el procedimiento se realizaron ocho repeticiones para las muestras de aguamiel y pulque de invierno y cinco repeticiones para las de verano con el fin de reducir el error del procedimiento.





### 12.6.3 Determinación de azúcares reductores

Se realizó mediante el método Miller (1959), en el cual se usa el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) el cual es reducido en por azúcares reductores desarrollando un cambio de color de la solución que varía del amarillo al café y leyéndose en espectrofotómetro (Miller, 1959). Primero se realizó una solución patrón de glucosa a 2 g/L y a partir de ella, diluciones a 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.6 y 2.0 g/L para la curva de calibración. Cada muestra de aguamiel y pulque se diluyó de 5 a 10 veces para que la absorbancia quede dentro del rango de la curva. En tubos de ensayo se vertió 100  $\mu$ L de muestra y 100  $\mu$ L de solución del reactivo DNS, se agitaron los tubos y deja en ebullición por 5 min, pasado el tiempo se agregó 1 mL de agua y dejó enfriar en hielo por 15 min. Finamente se vació a una celda de plástico y leyó en espectrómetro a 540 nm (Ávila *et al*, 2012).

### 12.6.4 Determinación de proteínas totales

El método de Bradford se basa en la unión del reactivo azul brillante de Coomassie G-250 a los grupos amino de las proteínas mediante interacciones Van der Waals, lo que produce un cambio de color de la muestra de rojo a azul (Bradford, M., 1976). Se realizó primero un patrón de albúmina bovina sérica a 2.0 mg/mL para hacer una dilución a 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 y 1.4 mg/mL para la curva de calibración. Se siguió el protocolo del fabricante del reactivo de Bradford para microplaca (Sigma Aldrich catálogo B6916), en que en cada pocillo se vertió 5  $\mu$ L de la muestra y 250  $\mu$ L del reactivo de Bradford, se agitó por 30 s y se incubó a temperatura ambiente de 5 a 45 min para ser leído en lector de microplacas Varioskan Flash a una absorbancia de 595 nm.



## 12.7 Análisis estadístico

Para los recuentos de microorganismos y las determinaciones químicas, los valores no siguen normalidad y presentan dependencia entre las muestras de aguamiel y pulque, por lo que se optó por realizar pruebas no paramétricas. Para el análisis de los datos se tomó como factor: aguamiel y pulque; y como niveles: invierno y verano, con tres réplicas de días no consecutivos. Para decidir si el resultado es estadísticamente significativo, se consideró un valor  $P \geq 0.05$  no significativo, valor  $P < 0.05$  como significativo y valor  $P < 0.01$  altamente significativo.

### 12.7.1 Recuento de microorganismos

Para los recuentos de microorganismos se empleó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon con un nivel de significancia de 0.05, para saber si el cambio en el número de microorganismos después de la fermentación en las muestras de invierno y verano fue significativo. El cálculo fue hecho en el programa XLSTAT 2020 (Addinsoft, LLC)

### 12.7.2 Determinaciones químicas

En las determinaciones químicas, se realizó la prueba de Friedman empleando el programa XLSTAT 2020 (Addinsoft, LLC), para saber si hay una diferencia significativa (con un nivel de significancia de 0.05) entre los tratamientos: aguamiel invierno, aguamiel verano, pulque invierno y pulque verano, además de una comparación múltiple por Nemenyi para agrupar los datos.

### 12.7.2 Índices de diversidad

Con los datos de variantes de secuencias de amplicones (ASV), se calcularon los índices de diversidad Chao 1, Simpson y Shannon para las muestras de aguamiel y pulque utilizando el programa PAST v4.03 (Hammer *et al.*, 2001). Empleando el mismo programa, se determinó la diversidad beta utilizando el índice de similaridad de Bray-Curtis para representarlo mediante escalado multidimensional no métrico (NMDS).



### 12.7.3 Correlación de resultados

Dado el gran número de variables y a la dependencia de las muestras se optó por realizar un análisis de componentes principales, que tiene por objetivo reducir la dimensión de los datos con la menor pérdida de cantidad de información. Lo cual se logra al crear combinaciones de variables independientes llamadas componentes principales. Esto permite en un conjunto de datos grandes, que la máxima cantidad de varianza se puedan explicar con el menor número de componentes.

En el programa PAST v4.03 (Hammer *et al.*, 2001) se realizó el de análisis de componentes principales con matriz de correlación y la opción de cálculo entre grupos. Las veinte variables se agruparon en cuatro: determinaciones químicas (pH, acidez, proteínas, azúcares totales y azúcares reductores), recuentos microbiológicos (Bacterias lácticas, Bacterias acéticas, Bacterias mesófilas, Bacterias coliformes, Bacterias Gram-, Levaduras 1 y Levaduras 2), diversidad bacterias (secuencias bacterias, índice Chao 1 bacterias, Shannon bacterias y Simpson bacterias) y diversidad levaduras (secuencias levaduras, índice Chao 1 levaduras, Shannon levaduras y Simpson levaduras).

Independiente a esto se realizó una prueba de correlación de Spearman (con un nivel de significancia de 0.05) con el programa Minitab 17.1 (Minitab, LLC), para medir la relación entre conjuntos de dos variables y ver si es estadísticamente significativa para todo el conjunto de datos.

### XIII Resultados

#### 13.1 Aislamiento y caracterización de microorganismos

Se usaron medios de cultivos generales y selectivos en sólido para contar e identificar los grupos de microorganismos con características en común. Después del periodo de incubación apropiado según el tipo de microorganismo se realizó el recuento en los medios de cultivo, cuyos resultados se presentan en la Tabla 1 y 2.

La Tabla 1 corresponde a las muestras de la estación de invierno, tanto de aguamiel, como de pulque:

**Tabla 1. Conteos de microorganismos para las muestras de la estación de invierno.**

Agar	Ai21	Ai23	Ai25	Pi21	Pi23	Pi25
Bacterias lácticas	65.33x10 <sup>4</sup> ±5.86x10 <sup>4</sup>	0.72x10 <sup>4</sup> ±0.11x10 <sup>4</sup>	0.89x10 <sup>4</sup> ±0.45x10 <sup>4</sup>	9.33x10 <sup>4*</sup> ±2.25x10 <sup>4</sup>	0.70x10 <sup>4*</sup> ±0.17x10 <sup>4</sup>	0.45x10 <sup>4*</sup> ±0.01 x10 <sup>4</sup>
Bacterias acéticas	6.27x10 <sup>4</sup> ±0.47x10 <sup>4</sup>	2.97x10 <sup>4</sup> ±1.05x10 <sup>4</sup>	3.37x10 <sup>4</sup> ±0.38x10 <sup>4</sup>	0.040 x10 <sup>4*</sup> ±0.01 x10 <sup>4</sup>	0.05 x10 <sup>4*</sup> ±0.01x10 <sup>4</sup>	0.002 x10 <sup>4*</sup> ±0
Mesófilos aerobios	6.27x10 <sup>4</sup> ±0.47x10 <sup>4</sup>	6.27x10 <sup>4</sup> ±1.67x10 <sup>4</sup>	3.87x10 <sup>4</sup> 1.00x10 <sup>4</sup>	0.70x10 <sup>4</sup> ±0.17x10 <sup>4</sup>	14.13x10 <sup>4</sup> ±6.75x10 <sup>4</sup>	2.09x10 <sup>4</sup> ±0.65x10 <sup>4</sup>
Bacterias coliformes	0.17x10 <sup>4</sup> ±0.20x10 <sup>4</sup>	0.01x10 <sup>4</sup> ±0.001x10 <sup>4</sup>	0.16x10 <sup>4</sup> ±0.005x10 <sup>4</sup>	Ausente*	<0.001*	<0.001*
Bacterias Gram-	0.13x10 <sup>4</sup> ±0.02 x10 <sup>4</sup>	137.33 ±0.002x10 <sup>4</sup>	0.10x10 <sup>4</sup> ±0.01 x10 <sup>4</sup>	Ausente*	<0.001*	Ausente*
Hongos-levaduras 1	8.90x10 <sup>4</sup> ±1.08x10 <sup>4</sup>	0.19x10 <sup>4</sup> ±0.003x10 <sup>4</sup>	7.23x10 <sup>4</sup> ±0.57x10 <sup>4</sup>	1.20x10 <sup>4*</sup> ±0.13x10 <sup>4</sup>	0.09 x10 <sup>4*</sup> ±0.006x10 <sup>4</sup>	0.20x10 <sup>4*</sup> ±0.03x10 <sup>4</sup>
Hongos-levaduras 2	0.19x10 <sup>4</sup> ±0.05x10 <sup>4</sup>	0.042x10 <sup>4</sup> ±0.008x10 <sup>4</sup>	0.65 x10 <sup>4</sup> ±0.006x10 <sup>4</sup>	12.96x10 <sup>4*</sup> ±1.67x10 <sup>4</sup>	0.69x10 <sup>4*</sup> ±0.30x10 <sup>4</sup>	0.11x10 <sup>4*</sup> ±0.03x10 <sup>4</sup>

*Identificación muestras:* Ai21= aguamiel 21 Diciembre, Ai23= aguamiel 23 Diciembre, Ai25= aguamiel 25 Diciembre, Pi21= pulque 21 Diciembre, Pi23= pulque 23 Diciembre y Pi25= pulque 25 Diciembre.

\* Indica grupos de muestras con un conteo significativamente diferente después de la fermentación.

Analizando los recuentos en la estación invierno tras el proceso de fermentación (aguamiel contra pulque) se encontró: una disminución significativa para bacterias lácticas y; altamente significativa para bacterias acéticas, bacterias coliformes, bacterias Gram-, hongos y levaduras 1 y hongos y levaduras 2. Y son iguales estadísticamente para las bacterias mesófilas (Anexos 17.1).

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en las muestras de la estación de verano, de aguamiel y pulque.

**Tabla 2. Conteos de microorganismos para las muestras de la estación de verano.**

Agar	Av12	Av14	Av17	Pv12	Pv14	Pv17
Bacterias lácticas	1.05x10 <sup>4</sup> ±0.08x10 <sup>4</sup>	7.57x10 <sup>4</sup> ±0.71x10 <sup>4</sup>	2.66x10 <sup>4</sup> ±0.47x10 <sup>4</sup>	3.70x10 <sup>4</sup> ±1.56x10 <sup>4</sup>	5.73x10 <sup>4</sup> ±1.99x10 <sup>4</sup>	3.83x10 <sup>4</sup> ±0.90x10 <sup>4</sup>
Bacterias acéticas	2.23x10 <sup>4</sup> ±0.64x10 <sup>4</sup>	10.40x10 <sup>4</sup> ±2.46x10 <sup>4</sup>	1.35x10 <sup>4</sup> ±0.32x10 <sup>4</sup>	0.062 x10 <sup>4</sup> * ±0.01x10 <sup>4</sup>	2.66x10 <sup>4</sup> * ±0.47x10 <sup>4</sup>	0.14x10 <sup>4</sup> * ±0.03x10 <sup>4</sup>
Mesófilos aerobios	30.03x10 <sup>4</sup> ±2.06x10 <sup>4</sup>	43.73x10 <sup>4</sup> ±1.11x10 <sup>4</sup>	0.57x10 <sup>4</sup> ±0.07x10 <sup>4</sup>	6.53x10 <sup>4</sup> * ±2.37x10 <sup>4</sup>	0.90x10 <sup>4</sup> * ±0.70x10 <sup>4</sup>	0.64x10 <sup>4</sup> * ±0.11x10 <sup>4</sup>
Bacterias coliformes	0.002x10 <sup>4</sup> ± 0.0007x10 <sup>4</sup>	0.007x10 <sup>4</sup> ±0.0003x10 <sup>4</sup>	0.007x10 <sup>4</sup> ±0.001x10 <sup>4</sup>	<0.001*	Ausente*	Ausente*
Bacterias Gram-	0.002x10 <sup>4</sup> ±0.001x10 <sup>4</sup>	0.011x10 <sup>4</sup> ±0.002x10 <sup>4</sup>	0.008x10 <sup>4</sup> ±0.009x10 <sup>4</sup>	<0.001*	<0.001*	Ausente*
Hongos-levaduras 1	8.90x10 <sup>4</sup> ±1.08x10 <sup>4</sup>	7.23x10 <sup>4</sup> ±0.58x10 <sup>4</sup>	0.12x10 <sup>4</sup> ±0.01x10 <sup>4</sup>	0.19x10 <sup>4</sup> ±0.003x10 <sup>4</sup>	0.99x10 <sup>4</sup> ±0.36x10 <sup>4</sup>	11.40x10 <sup>4</sup> ±3.20x10 <sup>4</sup>
Hongos-levaduras 2	8.10x10 <sup>4</sup> ±0.87x10 <sup>4</sup>	0.75x10 <sup>4</sup> ±0.16x10 <sup>4</sup>	0.08x10 <sup>4</sup> ±0.03x10 <sup>4</sup>	0.23x10 <sup>4</sup> ±0.02x10 <sup>4</sup>	0.48x10 <sup>4</sup> ±0.22x10 <sup>4</sup>	10.53x10 <sup>4</sup> ±0.50x10 <sup>4</sup>

*Identificación muestras:* Av12= aguamiel 12 Julio, Av14= aguamiel 14 Julio, Av17= aguamiel 17 Julio, Pv12= pulque 12 Julio, Pv14= pulque 14 Julio y Pv17= pulque 17 Julio.

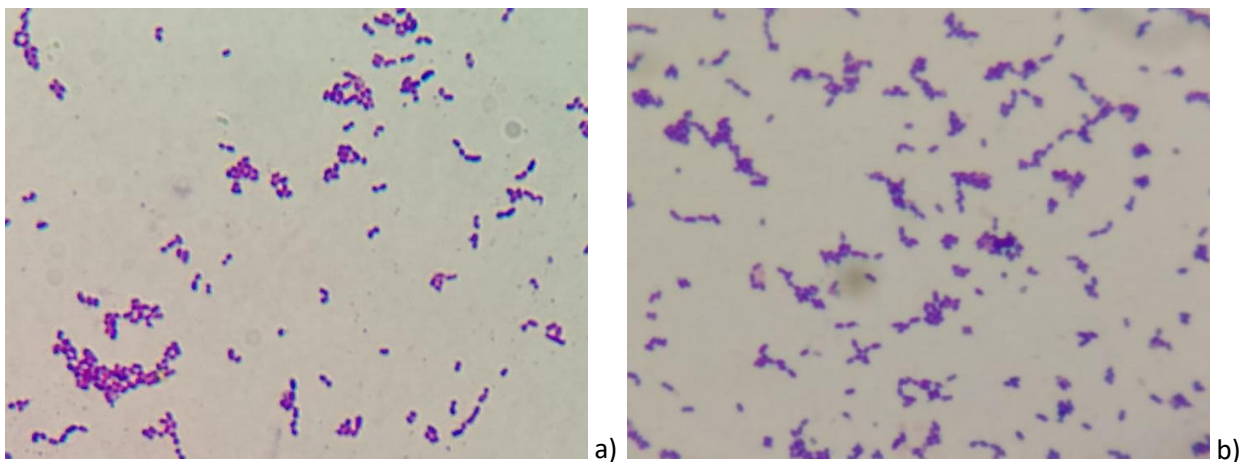
\* Indica grupos de muestras con un conteo significativamente diferente después de la fermentación.

En los recuentos para las muestras de la estación de verano después de la fermentación hay: una disminución altamente significativa para las bacterias acéticas, bacterias mesófilas, bacterias coliformes y bacterias Gram-. Mientras que son iguales estadísticamente los conteos de: bacterias lácticas, hongos y levaduras 1 y hongos y levaduras 2 (Anexos 17.1).

Al analizar los conteos en el pulque después de la fermentación, se observa que el número de bacterias lácticas aumenta ligeramente en invierno, pero se mantienen en la misma magnitud el valor en verano. Las bacterias mesófilas aerobias disminuyen en el pulque de invierno y verano. Los conteos de bacterias coliformes y bacterias Gram negativas ya que comparten microorganismos tienen un comportamiento similar: son mayores en invierno, pero en ambas estaciones pasan a estar ausentes después de

la fermentación. En el caso de los dos agares para hongos filamentosos y levaduras, solo se encontró la presencia de levaduras (junto con bacterias Gram positivas) y, los valores entre muestras son muy variables, pero tomando los promedios de grupos, en el pulque de invierno y verano son menores las levaduras.

De los microorganismos observados, los de mayor interés por sus aplicaciones son aquellos que crecieron en el agar MRS que corresponde a posibles bacterias lácticas (Figura 1a), el agar GYC para bacterias acéticas (Figura 1b), agar Dextrosa Sabouraud y Extracto de malta para hongos y levaduras (Figura 2).



**Figura 1. Morfología microscópica de bacterias aisladas en agar MRS y GYC.** a) Bacilos cortos Gram+ aislados en agar MRS y vistos en objetivo de 100X, b) Bacilos cortos Gram+ aislados en agar GYC y vistos en objetivo de 100X.

En el agar selectivo GYC para bacterias acéticas (que son bacilos Gram negativos) se basa en que, al incluir alcohol etílico en el medio, estas bacterias lo usan como sustrato para producir ácido acético que solubiliza el carbonato de calcio presente. Si bien, se logró el aislamiento de bacterias con un halo alrededor de la colonia, se encontraron únicamente bacilos Gram positivos.

Para la correlación de Spearman (Anexos 17.9) se anotaron aquellos que tienen un valor significativo. Se observa una correlación positiva entre las bacterias acéticas y las bacterias Gram negativas (0.661;  $p=0.019$ ), una relación negativa fuerte entre las bacterias coliformes y los conteos de hongos y levaduras 2 (-0.813;  $p=0.001$ ). Finalmente, los conteos en el agar para hongos y levaduras número 1 y 2 tienen una correlación positiva (0.727) y es significativo estadísticamente ( $p=0.007$ ).



En general se puede decir que después de la fermentación tanto en muestras de invierno y verano, se incrementa el número de las bacterias lácticas y acéticas, disminuye los mesófilos aerobios, las bacterias coliformes, bacterias Gram negativas y las levaduras.

## 13.2 Aislamiento e identificación de levaduras

### 13.2.1 Aislamiento de levaduras

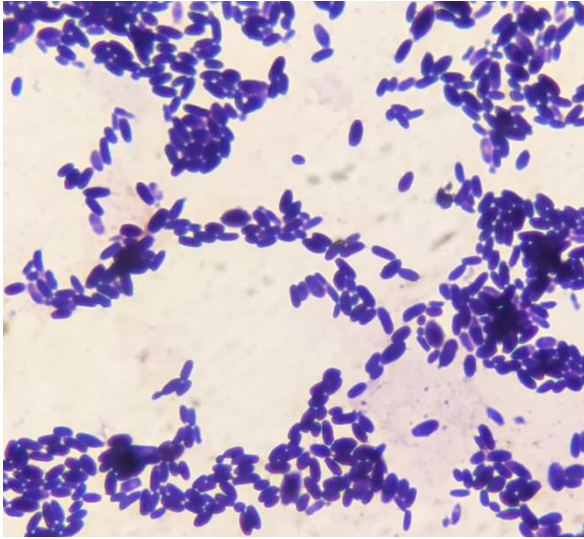
La morfología macroscópica es uno de los aspectos para la identificación de los microorganismos y un paso para la selección de las colonias. De las muestras de aguamiel y pulque de la estación invierno y verano, se pudieron identificar cinco formas diferentes para las colonias de levaduras aisladas (Tabla 3).

**Tabla 3. Morfología macroscópica habitual en las levaduras aisladas.**

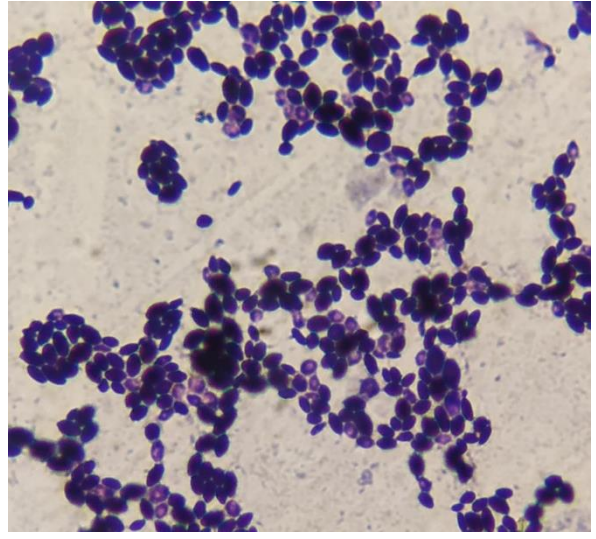
Levadura	Forma	Borde	Elevación	Transmite luz	Superficie	Color
Forma 1	Circular	Entero	Convexa	No	Cremosa	Amarillo
Forma 2	Circular	Entero	Convexa	No	Cremosa	Blanco
Forma 3	Irregular	Irregular	Crateriforme	No	Cremosa	Blanco
Forma 4	Irregular	Irregular	Elevada	No	Cremosa	Blanco
Forma 5	Circular	Entero	Convexa	No	Cremosa	Amarillo

La morfología microscópica permite diferenciar que las colonias aisladas sean de levaduras o bacterias y, que el cultivo este puro. Se observó la gemación característica, así como dos formas: la típica ovoide de gran tamaño y, una forma bacilar con pseudohifas (Figura 2).

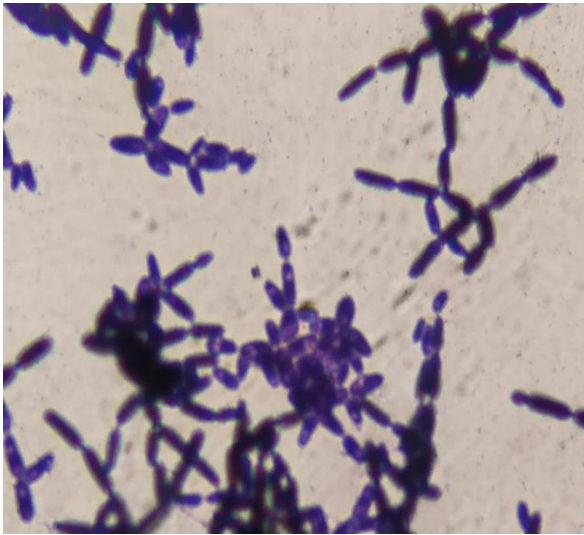




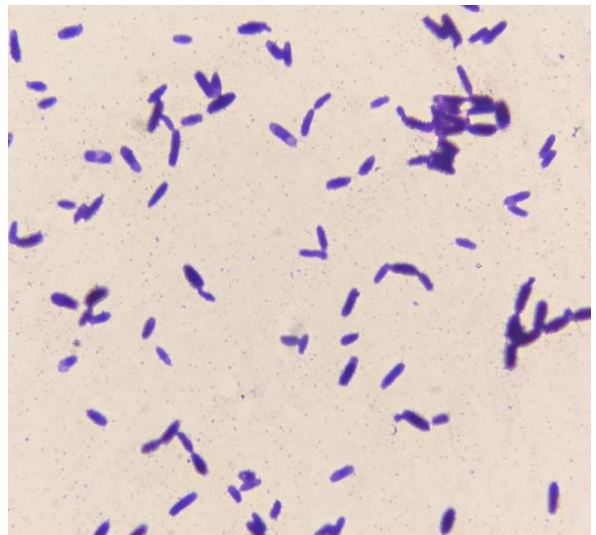
a)



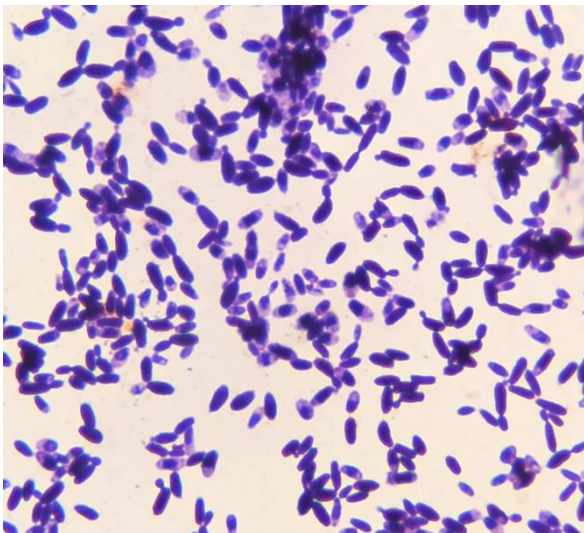
b)



c)



d)



e)

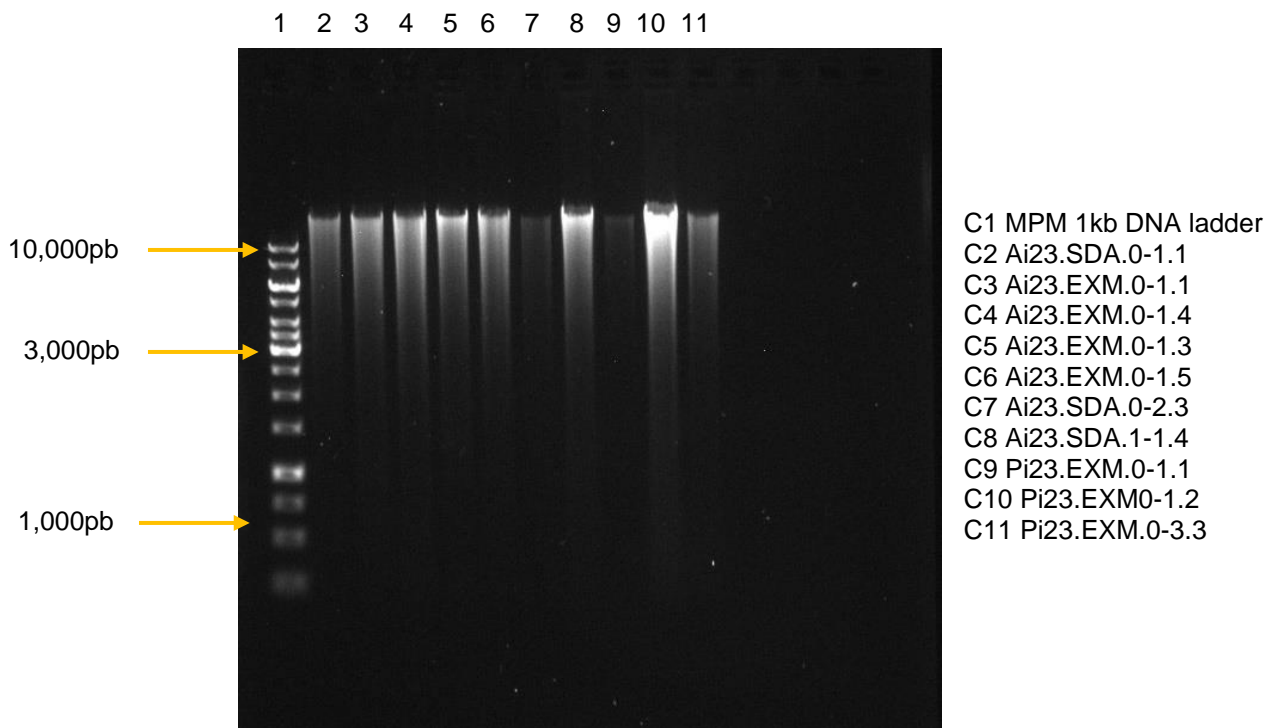
**Figura 2. Morfología microscópica de levaduras aisladas en agar SDA y EXM provenientes de muestras de aguamiel y pulque de la estación invierno y verano. a) Levadura forma 1, b) Forma 2, c) Forma 3, d) Forma 4 y, e) Forma 5. A las colonias se les aplicó tinción de Gram y fueron observadas en microscopio con un aumento de 100X.**

### 13.2.2 Identificación de levaduras aisladas

Para la identificación de las levaduras aisladas a partir de muestras de aguamiel y pulque de las estaciones invierno y verano, se llevaron a cabo varios pasos, los cuales se describen a continuación.

#### 13.2.2.1 Extracción de ADN de levaduras

La presencia de ADN se corroboró mediante electroforesis en gel. En la Figura 3 se observa la presencia de ADN en todos los carriles para las extracciones de las muestras de aguamiel y pulque del 23 de Diciembre.



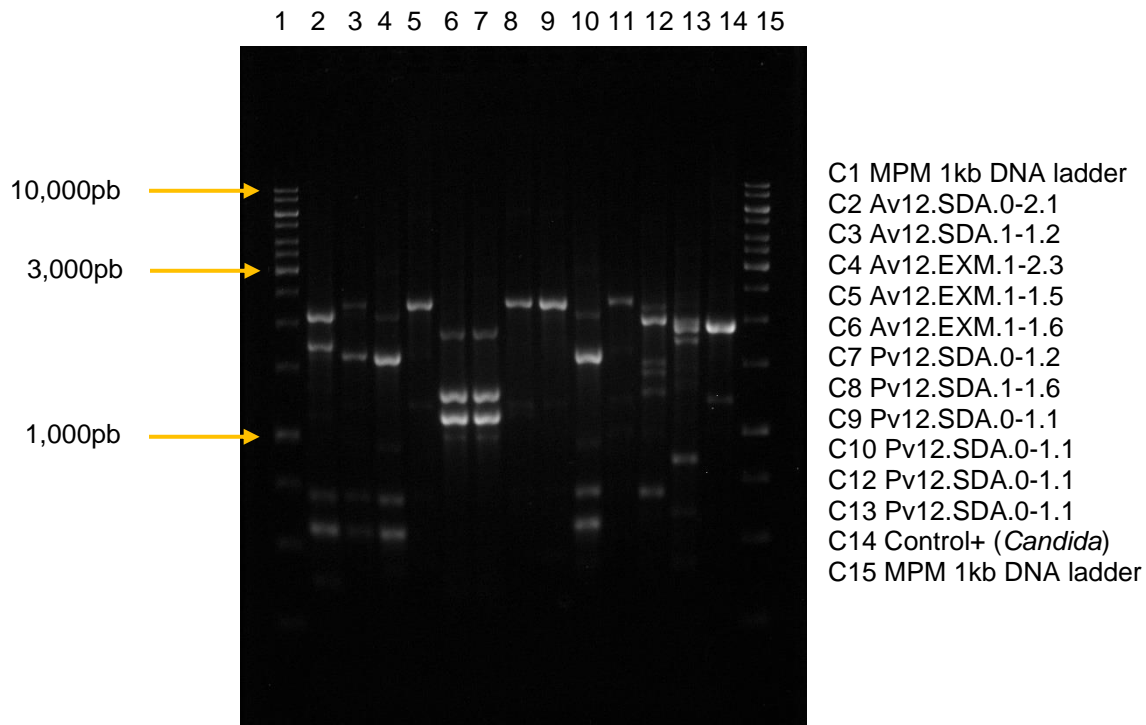
**Figura 3. Extracción de ADN.** En los carriles (indicados del C2 al C11) se observan las muestras de levaduras aisladas de aguamiel y pulque del 23 de Diciembre en gel de agarosa al 1.0%. Ai23= aguamiel 23 Diciembre y Pi23= pulque 23 Diciembre.

Al ser una extracción de ADN total, la mayor cantidad de muestra se encuentra por encima del marcador de peso molecular. Todas las muestras tuvieron el mismo tiempo de crecimiento y de lisis, aun así hay bandas tenues que indican una menor cantidad de material genético y; una degradación en todas. En la sección de Anexos 17.2 se

encuentran las fotografías de las demás muestras (correspondiente al 21 y 25 de Diciembre y, del 12, 14 y 17 de Julio).

### 13.2.2.2 Selección de cepas de levaduras a secuenciar

En la Figura 4, se muestra el patrón de bandas RAPD para las muestras de aguamiel y pulque del 12 de Julio. En ella se observa la presencia o ausencia de bandas, también se aprecia como las bandas en los carriles 6-7 y 8-9 son aparentemente iguales lo que indica que puede ser el mismo microorganismo en diferentes muestras. En la sección de Anexos (17.3) se encuentran las fotografías de las muestras restantes.



**Figura 4. Patrón RAPD.** En los carriles (marcados del C2 al C14) se cargaron las muestras de amplificación RAPD de las levaduras de aguamiel y pulque del 12 de Julio en gel de agarosa al 1.5%. Av12= aguamiel 12 Julio y Pv12= pulque 12 de Julio.

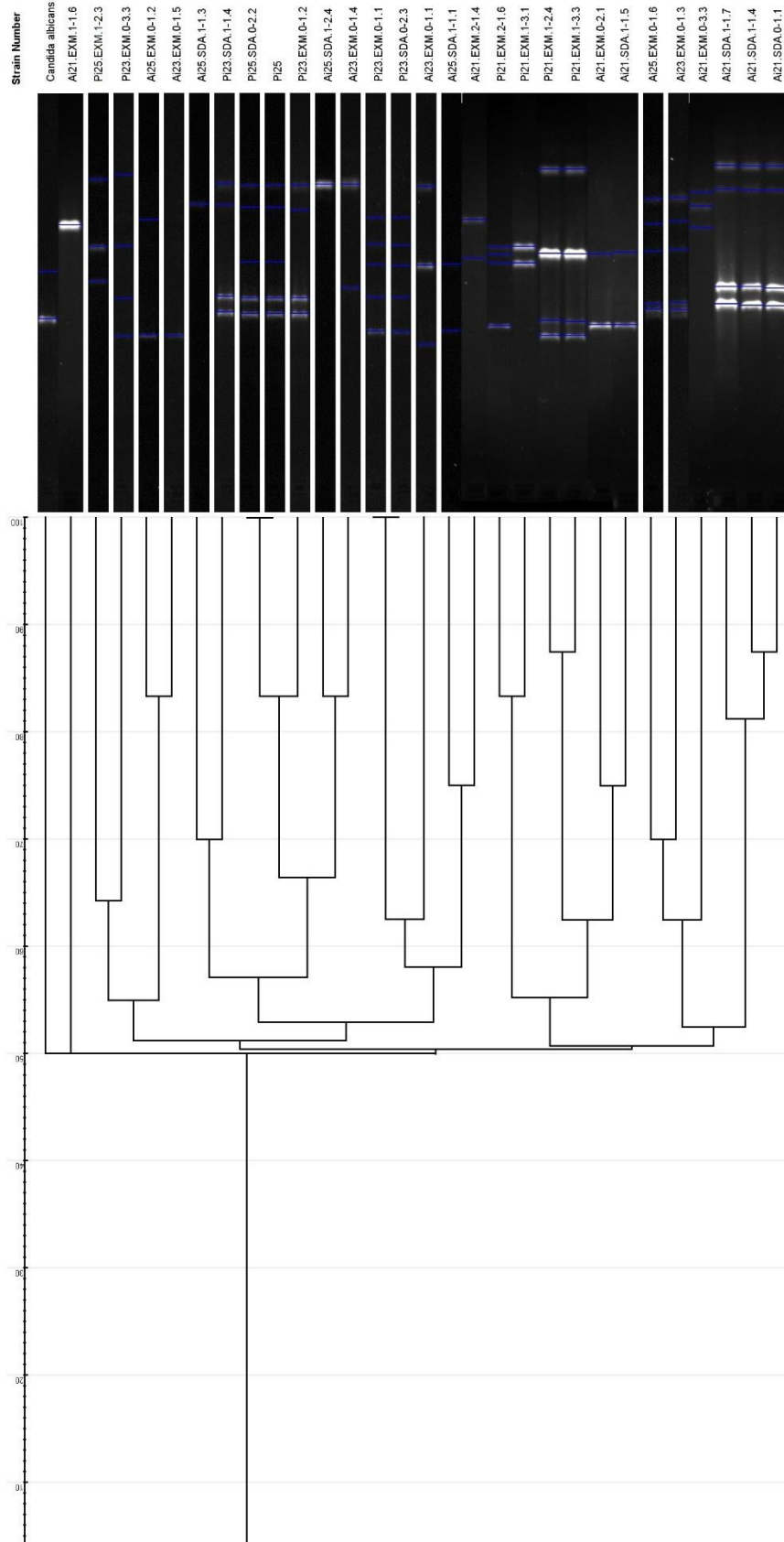
Se comparó primero las muestras de levaduras de aguamiel y pulque de la temporada de invierno (Figura 5). En ella se formaron dos clados principales a una distancia de 50% de similitud, de las cuales se hacen subdivisiones para llegar a un total de catorce



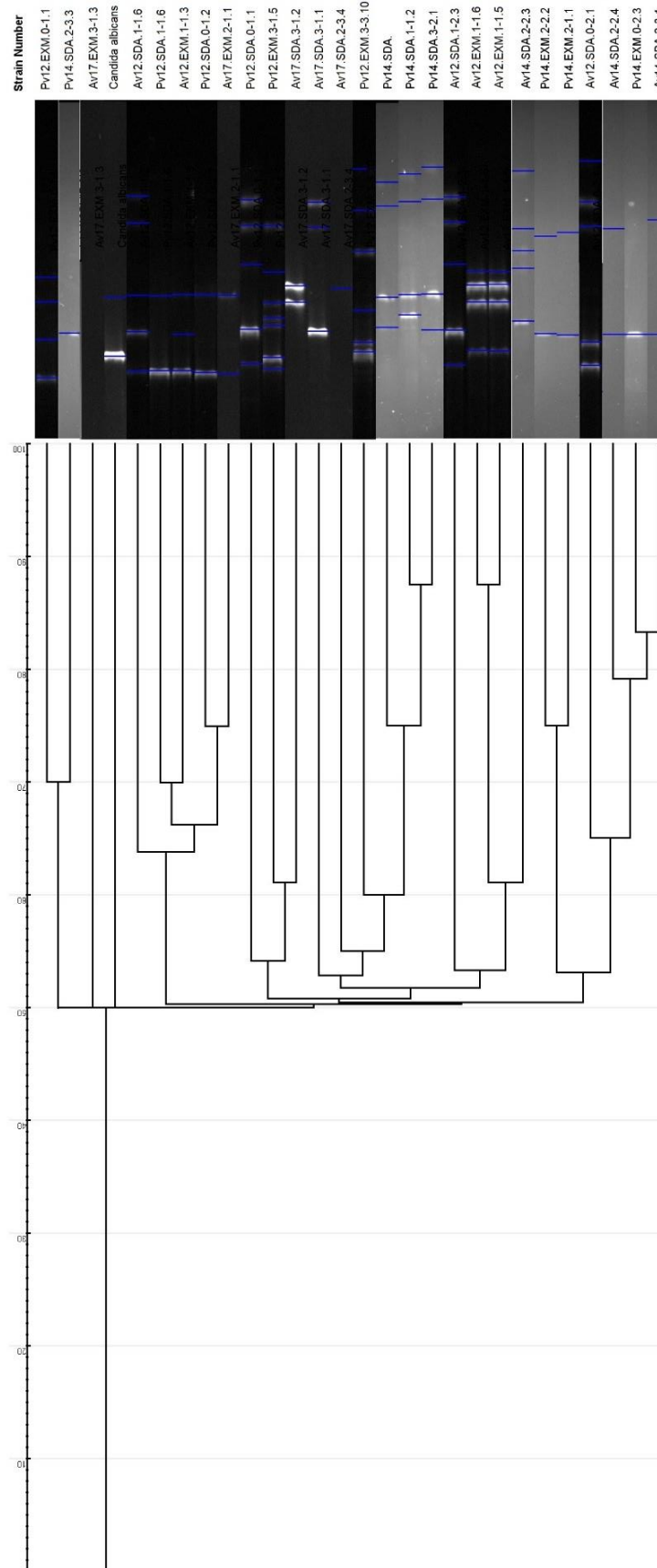
clados (que corresponde a las muestras con mayor similitud) con distancias entre 65 a 87, además llegando dos hasta el 100% y quedando dos muestras por fuera del árbol al no tener similitud con las demás. Se obtuvieron 21 patrones diferentes de un total de 31 en base a los agrupamientos.

Se realizó lo mismo con las muestras de levaduras de la estación de verano (Figura 6), después de las subdivisiones se forman un total de 18 clados con distancias de 65 a 88. Teniendo 17 patrones diferentes de las 27 muestras.

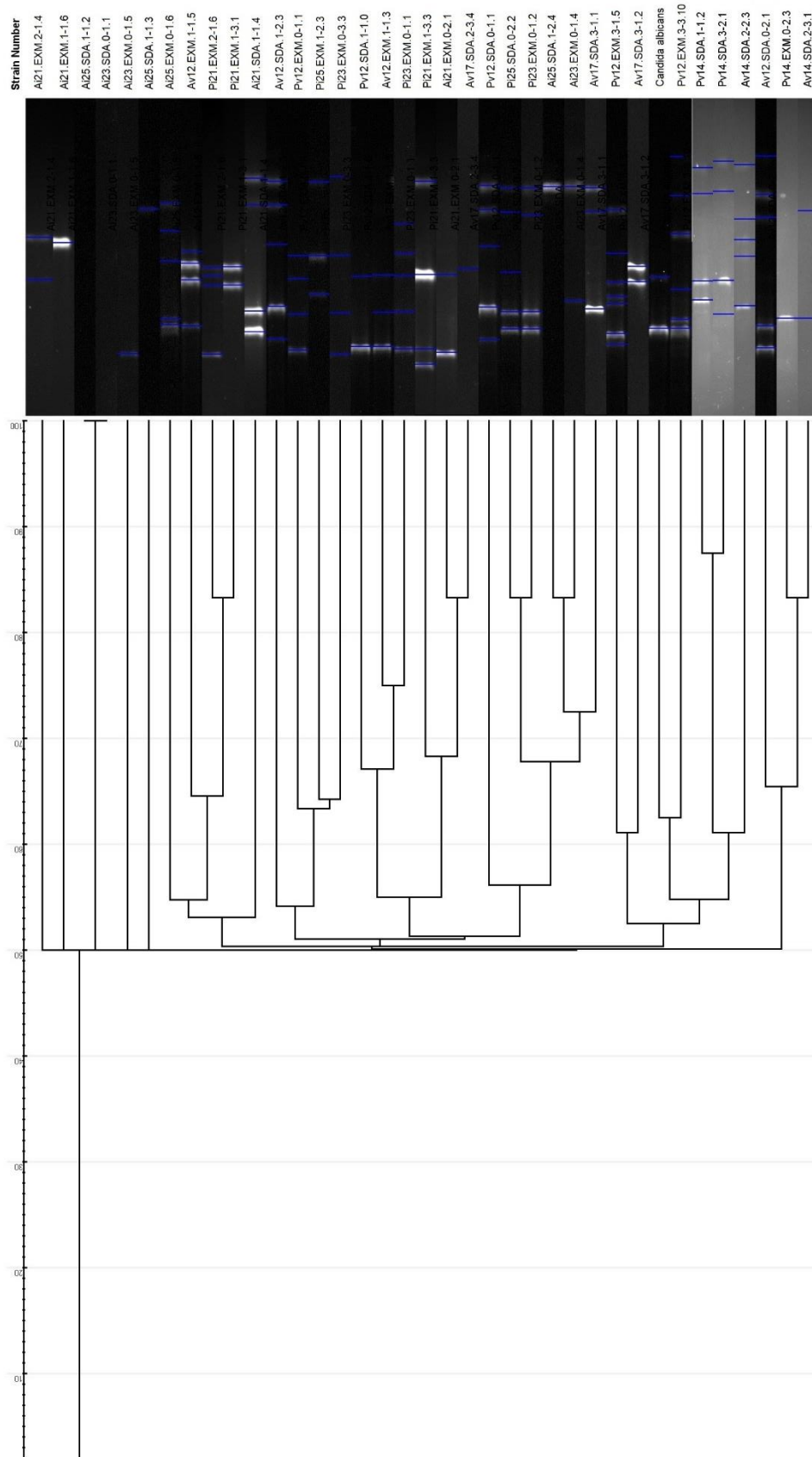
Finalmente, se realizó una tercera comparación entre la selección de muestras de la estación invierno contra la de verano (Figura 7). Se formaron 21 clados con distancias de 75 a 88. De este análisis se obtuvieron un total de 37 levaduras (solo se encontró un patrón repetido entre ambas estaciones), teniendo mayor número de patrones diferentes en las muestras de aguamiel con 21 y 16 para las muestras de pulque.



**Figura 5. Dendrograma con patrones de bandas por RAPD para las levaduras de invierno. Se comparan los patrones por semejanza de las muestras de aguamiel y pulque de la estación invierno.**



**Figura 6. Dendrograma con patrones de bandas de RAPD para las levaduras de verano. Se comparan los patrones por semejanza de las muestras de aguamiel y pulque de la estación verano.**



**Figura 7. Dendrograma con patrones RAPD con la selección de levaduras de invierno y verano. Se compara la selección de patrones de bandas por RAPD para las muestras de aguamiel y pulque de la estación de invierno y verano.**



En la Tabla 4 se lista la selección de muestras de levaduras, las veces que se encontró el patrón de bandas y un código que se le asignó para facilitar su identificación.

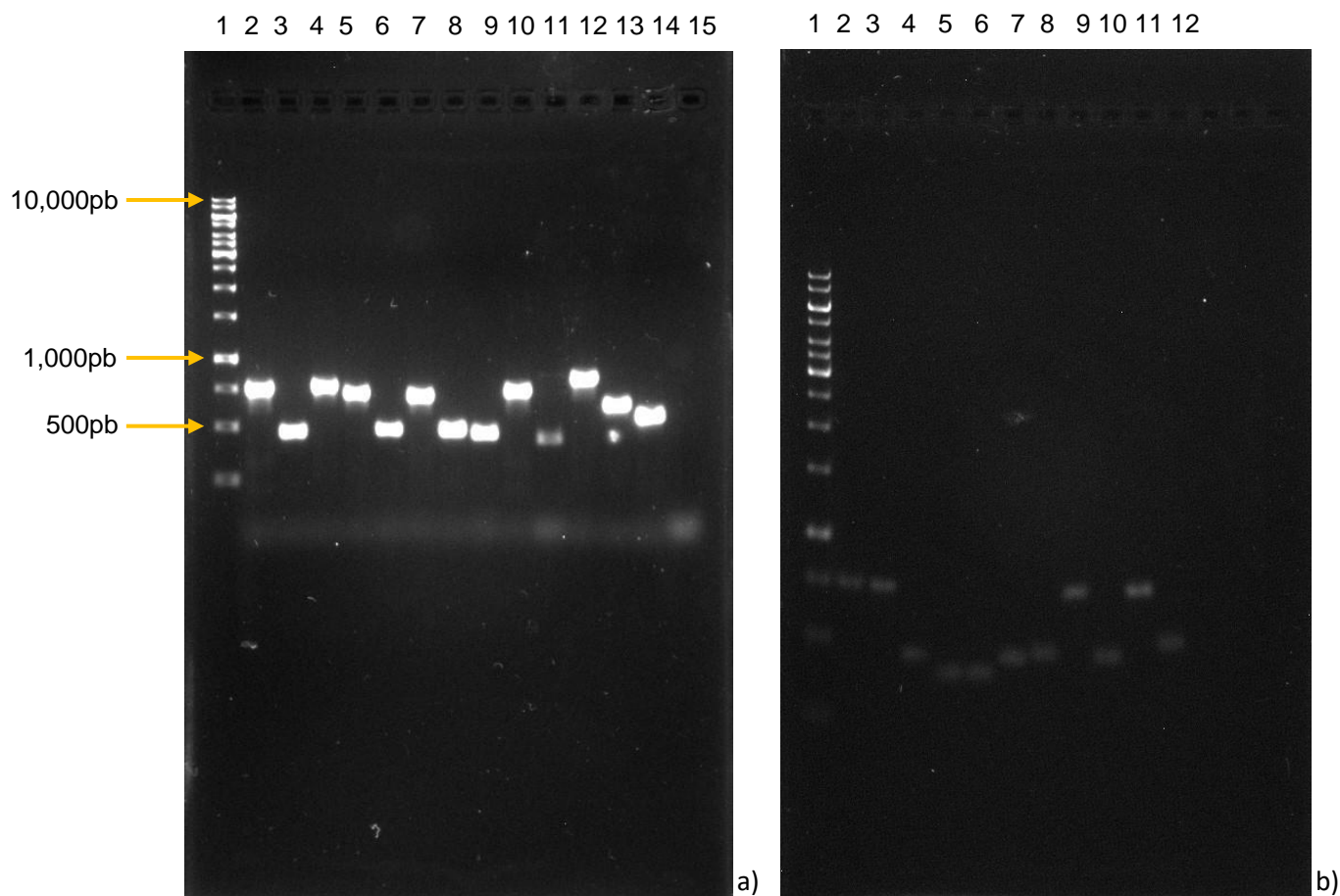
**Tabla 4. Código para la selección de levaduras de aguamiel y pulque.**

Muestra	Presencia	Código
Ai21.SDA.1-1.4	3	Ai01
Ai21.EXM.0-2.1	2	Ai02
Ai21.EXM.2-2.4	2	Ai03
Ai21.EXM.1-1.6	1	Ai04
Ai23.SDA.0-1.1	1	Ai05
Ai23.SDA.0-1.4	1	Ai06
Ai23.EXM.0-1.5	1	Ai07
Ai25.SDA.0-1.1	1	Ai08
Ai25.SDA.1-1.2	1	Ai09
Ai25.SDA.1-1.3	1	Ai10
Ai25.SDA.1-2.4	1	Ai11
Ai25.SDA.0-1.6	2	Ai12
Av12.SDA.0-2.1	1	Av01
Av12.SDA.1-2.3	1	Av02
Av12.EXM.0-1.3	1	Av03
Av12.EXM.1-1.5	2	Av04
Av14.SDA.2-3.1	2	Av05
Av14.SDA.2-2.3	1	Av06
Av17.SDA.3-1.1	1	Av07
Av17.SDA.3-1.2	1	Av08
Av17.SDA.2-3.4	1	Av09
Pi21.EXM.1-3.1	1	Pi01
Pi21.EXM.1-3.3	2	Pi02
Pi21.EXM.2-1.6	1	Pi03
Pi23.EXM.0-3.3	2	Pi04
Pi25.SDA.0-2.2	2	Pi05
Pi25.EXM.0-1.1	1	Pi06
Pi25.EXM.0-1.2	2	Pi07
Pi25.EXM.1-2.3	1	Pi08
Pv12.SDA.0-1.1	1	Pv01
Pv12.SDA.1-1.6	3	Pv02
Pv12.EXM.0-1.1	1	Pv03
Pv12.EXM.3-1.5	1	Pv04
Pv12.EXM.3-3.10	1	Pv05
Pv14.EXM.0-2.3	1	Pv06
Pv14.SDA.1-1.2	1	Pv07
Pv14.SDA.3-2.1	1	Pv08



### 13.2.2.3 Amplificación de la región ITS de levaduras

El ADN de las levaduras seleccionadas fue amplificado mediante los cebadores ITS1-ITS4 (Metodología 8.2.6) y, los tamaños de los fragmentos amplificados se encontraron en un rango que va de ~500-700pb. En la Figura 8a se observan las muestras amplificadas de aguamiel invierno, donde de la presencia de una sola banda indica que no hubo amplificaciones inespecíficas o que no está contaminada la muestra. Mientras que la intensidad está relacionada con la cantidad de ADN sintetizado y, las bandas de diferentes tamaños podrían indicar que son microorganismos diferentes ya que es una amplificación de una región variable del genoma (resto de fotografías en Anexos 17.4).



**Figura 8. Amplificación y purificación de ADN de la región ITS 1-2 de las muestras de levaduras aisladas.** a) Amplificación de muestras de levaduras de aguamiel invierno cargadas en un gel de agarosa al 1.2% (C1 MPM 1kb DNA Ladder, C2 Ai01, C3 Ai02, C4 Ai03, C5 Ai04, C6 Ai05, C7 Ai06, C8 Ai07, C9 Ai08, C10 Ai9, C11 Ai10, C12 Ai11, C13 Ai12, C14 Control+ (Candida) y C15 Control- (agua)). b) Purificación de muestras de las levaduras de pulque verano e invierno cargadas en un gel de agarosa al 1.2% (C1 MPM 1kb DNA Ladder, C2 Pv06, C3 Pv07, C4 Pv08, C5 Pi01, C6 Pi02, C7 Pi03, C8 Pi04, C9 Pi05, C10 Pi06, C11 Pi07 y C12 Pi08). Ai= aguamiel invierno, Pv= pulque verano y, Pi= pulque invierno.



Se corroboró en una nueva electroforesis que, después de la purificación se mantuvo la muestra (Figura 8b). Esta imagen corresponde a parte de las muestras de pulque verano e invierno (Anexos 17.5), en la que se aprecia que hay una pérdida en la cantidad de todas las muestras ya que las bandas son mucho más tenues, por lo que se cuantificó la cantidad de ADN restante (Anexos 17.6).



#### **13.2.2.4 Identificación de las levaduras**

En la Tabla 5, 6, 7 y 8 se presentan los resultados de los alineamientos obtenidos con la base de datos de BLAST de las diferentes cepas que se secuenciaron (secuencias en Anexos 17.7). En la primera columna corresponde al código de la muestra seguido del tamaño aproximado en base al gel y el tamaño de la secuencia limpia. En la cuarta columna está la o las levaduras con las que la muestra comparte mayor identidad, prefiriendo las opciones con porcentaje mayor de cobertura (total de la secuencia que se alineó), mayor porcentaje de identidad (porcentaje de nucleótidos iguales) y menor Valor-E (probabilidad de que se dé un alineamiento al azar). Tomando las tres características previas como un criterio de calidad de la secuencia, se descartó la secuencia de las muestras: Av05, Pi03, Pi06 y Pv02, procediendo a realizar un árbol filogenético con las 29 secuencias restantes.

**Tabla 5. Resultados del alineamiento de las levaduras aisladas en muestras de aguamiel invierno.**

Muestra	Tamaño en gel	Tamaño secuencia	Resultado	Cobertura	Identidad	Valor-E	Número acceso
Ai01	≈740pb	690pb	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , CBS:1554	100%	99.57%	0.0	KY103808.1
Ai02	≈480pb	364pb	<i>Pichia sp.</i> , NYNU 161119	100%	92.86%	2e-158	MF136068.1
			<i>Candida ethanolica</i> , JK_T4K1	100%	87.80%	3e-128	LN613149.1
Ai03	≈760pb	726pb	<i>Kazachstania sp.</i> , NYNU 161111	98%	100.00%	0.0	MF136070.1
			<i>Kazachstania gamospora</i> , CBS:10328	100%	93.43%	0.0	KY103642.1
Ai04	≈730pb	667pb	<i>Candida boidinii</i> , CBS:6056	100%	99.40%	0.0	KY101981.1
			<i>Candida boidinii</i> , ATCC 62809	100%	99.40%	0.0	FJ914929.1
Ai05	≈440pb	358pb	<i>Clavispora opuntiae</i> , URM7229	100%	96.41%	4e-166	KX811206.1
			<i>Candida intermedia</i> , CN-25	90%	95.43%	2e-143	MF278340.1
Ai06	≈730pb	643pb	<i>Wickerhamomyces bovis</i> , CBS:2616	79%	87.19%	4e-154	NR_154968.1
			<i>Candida yuanshanica</i> , CBS:10589	77%	83.78%	2e-127	KY102522.1
Ai07	≈480pb	399pb	<i>Pichia sp.</i> , NYNU 161119	98%	91.84%	2e-169	MF136068.1
			<i>Candida ethanolica</i> , CBS:8084	100%	86.39%	2e-134	LN613149.1
Ai08	≈510pb	436pb	<i>Pichia cactophila</i> , CBS 6926	100%	100.00%	0.0	MK394167.1
			<i>Candida inconspicua</i> , YB009	99%	100.00%	0.0	KR089895.1
Ai09	≈780pb	695pb	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , CBS:7858	100%	99.28%	0.0	KY103837.1
Ai10	≈490pb	396pb	<i>Wickerhamiella pararugosa</i> , CBS 1010	82%	93.29%	8e-144	MH545932.1
			<i>Candida rugosa</i> , CBS 1948	82%	93.29%	8e-144	JX245060.1
Ai11	≈890pb	796pb	<i>Candida sonorensis</i> , CBS:11159	99%	99.75%	0.0	KY102407.1
Ai12	≈720pb	593pb	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , CBS:316	100%	99.83%	0.0	KY104874.1

**Tabla 6. Resultados del alineamiento de las levaduras aisladas en muestras de aguamiel verano.**

Muestra	Tamaño en gel	Tamaño secuencia	Resultado	Cobertura	Identidad	Valor-E	Número acceso
Av01	≈740pb	689pb	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , CBS:7858	99%	99.71	0.0	KY103837.1
Av02	≈740pb	433pb	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , Cbm1	99%	92.56%	0.0	MT187614.1
			<i>Kluyveromyces marxianus</i> , NRRL Y-6860	100%	92.38%	0.0	CP023460.1
Av03	≈450pb	422pb	<i>Pichia sp.</i> , NYNU 161119	94%	99.75%	0.0	MF136068.1
			<i>Candida ethanolica</i> , CBS:8084	100%	93.22%	2e-175	KY102080.1
Av04	≈400pb	360pb	<i>Clavispora lusitaniae</i> , WM03.457	100%	96.68	9e-168	KP131863.1
			<i>Candida intermedia</i> , Cand-AAE-EG017	100%	96.12%	2e-164	MH581191.1
Av05	≈440pb	436pb	<i>Rhizoctonia solani</i> , Uttarakannada	7%	100.0%	8e-05	MT158433.1
			<i>Aspergillus flavus</i> , NF	7%	100.0%	8e-05	MK271279.1
Av06	≈740pb	602pb	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> , AT-52	99%	92.19%	0.0	MF189725.1
			<i>Zygosaccharomyces bailii</i> , ATCC 42476	99%	92.03%	0.0	JX458102.1

**Tabla 7. Resultados del alineamiento de las levaduras aisladas en muestras de pulque invierno.**

Muestra	Tamaño en gel	Tamaño secuencia	Resultado	Cobertura	Identidad	Valor-E	Número acceso
Pi01	≈380pb	368pb	<i>Clavispora lusitaniae</i> , WM03.457	100%	96.50	4e-171	KP131863.1
			<i>Candida intermedia</i> , Cand-AAE-EG017	100%	96.22%	7e-169	MH581191.1
Pi02	≈390pb	368pb	<i>Clavispora opuntiae</i> , URM7229	99%	96.23%	2e-169	KX811206.1
			<i>Candida intermedia</i> , CN-25	88%	95.44%	3e-143	MF278340.1
Pi03	≈430pb	436pb	<i>Pyxidiophora microspora</i> , MG200	7%	100.00%	2e-05	MG438314.1
			<i>Phaeomoniella sp.</i> , GSM2	7%	100.00%	2e-05	KF128848.1
Pi04	≈450pb	434pb	<i>Pichia cactophila</i> , CBS 6926	99%	99.54%	0.0	MK394167.1
			<i>Candida inconspicua</i> , YB009	99%	99.54%	0.0	KR089895.1
Pi05	≈690pb	696pb	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , CBS:7858	100%	99.43	0.0	KY103837.1
Pi06	≈440pb	439pb	<i>Guignardia sp.</i> , GSL1_3_1	7%	100.00%	6e-06	KF128820.1
			<i>Aspergillus sp.</i> , 6-6	7%	100.00%	6e-06	HM535361.1
Pi07	≈710pb	688pb	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , CBS:7858	100%	99.56	0.0	KY103837.1
Pi08	≈500pb	456pb	<i>Pichia membranifaciens</i> , CBS:1330	100%	98.47%	0.0	KY104630.1



**Tabla 8. Resultados del alineamiento de las levaduras aisladas las muestras de pulque verano.**

Muestra	Tamaño en gel	Tamaño secuencia	Resultado	Cobertura	Identidad	Valor-E	Número acceso
Pv01	≈720pb	633pb	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , CBS:7858	100%	92.59%	0.0	KY103837.1
Pv02	≈460pb	437pb	<i>Cercospora canescens</i> , Cer59	8%	100.00%	2e-06	MN795667.1
			<i>Guignardia sp.</i> , GSL2_5_4	8%	100.00%	2e-06	KF128830.1
Pv03	≈470pb	424pb	<i>Pichia sp.</i> , NYNU 161119	93%	99.24%	0.0	MF136068.1
			<i>Candida ethanolica</i> , CBS:8084	100%	93.02%	6e-175	KY102080.1
Pv04	≈760pb	771pb 231pb	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> , ATCC 38923	100%	97.0%	0.0	JX458097.1
Pv05	≈780pb	759pb	<i>Moesziomyces aphidis</i> , DA8	99%	99.74%	0.0	MN396741.1
			<i>Moesziomyces bullatus</i> , HMAS73871	99%	99.73%	0.0	MK027046.1
Pv06	≈730pb	699pb	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , CBS:7858	99%	99.28%	0.0	KY103837.1
Pv07	≈720pb	696pb	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , CBS:7858	100%	99.43%	0.0	KY103837.1
Pv08	≈440pb	439pb	<i>Pichia manshurica</i> , AV1	35%	83.44%	1e-38	MH279643.1
			<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , W21	36%	80.98%	1e-32	KF441723.1

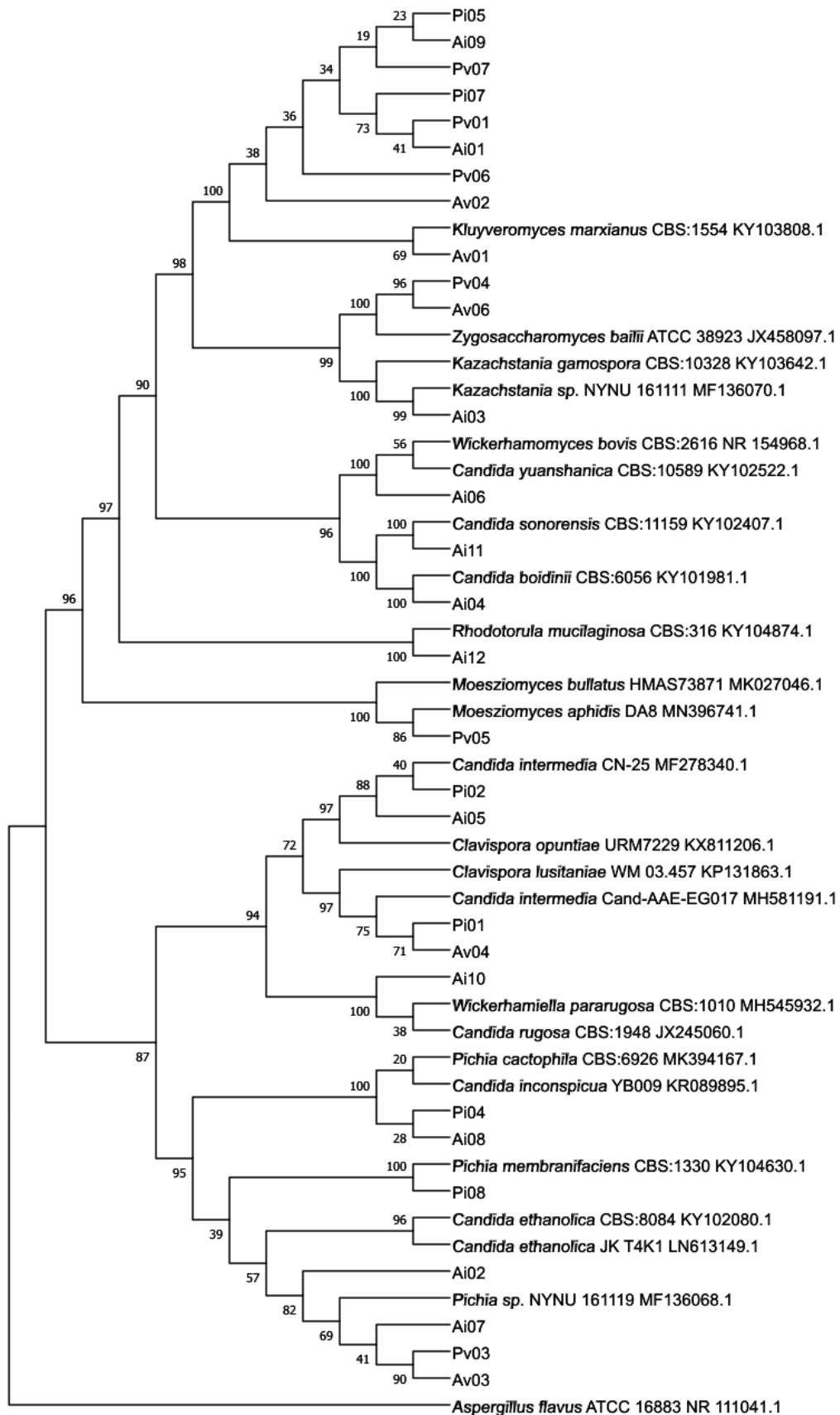
En la Tabla 9 se muestran las catorce levaduras diferentes encontradas y a que muestras corresponden. De estas, seis pudieron ser identificadas a nivel de especie por secuenciación de la región ITS 1-2: *Kluyveromyces marxianus*, *Candida boidinii*, *Candida sonorensis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Pichia membranifaciens* y, dos a nivel de género. Mientras que no fue posible identificar seis secuencias, debido a que pueden corresponder a dos especies.

**Tabla 9. Listado de las diferentes levaduras identificadas mediante análisis de su secuencia ITS y las muestras a las que corresponden.**

Muestra	Microorganismo
Ai01, Ai09, Av01, Av02, Pi05, Pi07, Pv01, Pv06, Pv07	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
Ai02, Ai07, Av03, Pv03	<i>Pichia sp.</i> , <i>Candida ethanolica</i>
Ai03	<i>Kazachstania sp.</i> , <i>Kazachstania gamospora</i>
Ai04	<i>Candida boidinii</i>
Ai05, Pi02	<i>Clavispora opuntiae</i> , <i>Candida intermedia</i>
Ai06	<i>Wickerhamomyces bovis</i> , <i>Candida yuanshanica</i>
Ai10	<i>Wickerhamiella pararugosa</i> , <i>Candida rugosa</i>
Ai11	<i>Candida sonorensis</i>
Ai12	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
Av04, Pi01	<i>Clavispora lusitaniae</i> , <i>Candida intermedia</i>
Av06, Pv04	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>
Pi04	<i>Pichia cactophila</i> , <i>Candida inconspicua</i>
Pi08	<i>Pichia membranifaciens</i>
Pv05	<i>Moesziomyces aphidis</i> , <i>Moesziomyces bullatus</i>

Una vez que se llevó a cabo el alineamiento de las secuencias obtenidas por BLAST, se emplearon las 53 secuencias (secuencias de levaduras y las secuencias con mayor identidad) para realizar el árbol filogenético consenso de la Figura 9, cuyo objetivo es establecer la relación de parentesco entre las especies. En este árbol se muestran los mayores porcentajes de agrupación después de las repeticiones para cada ramificación, con un total de 34 clados. En los extremos siempre quedan las muestras agrupadas en el mismo clado que la secuencia con la que tuvieron mayor porcentaje de identidad, o en el caso de muestras repetidas éstas se agrupan en varios clados siempre adyacentes a esta secuencia. No se observa que las secuencias se agrupen por géneros.

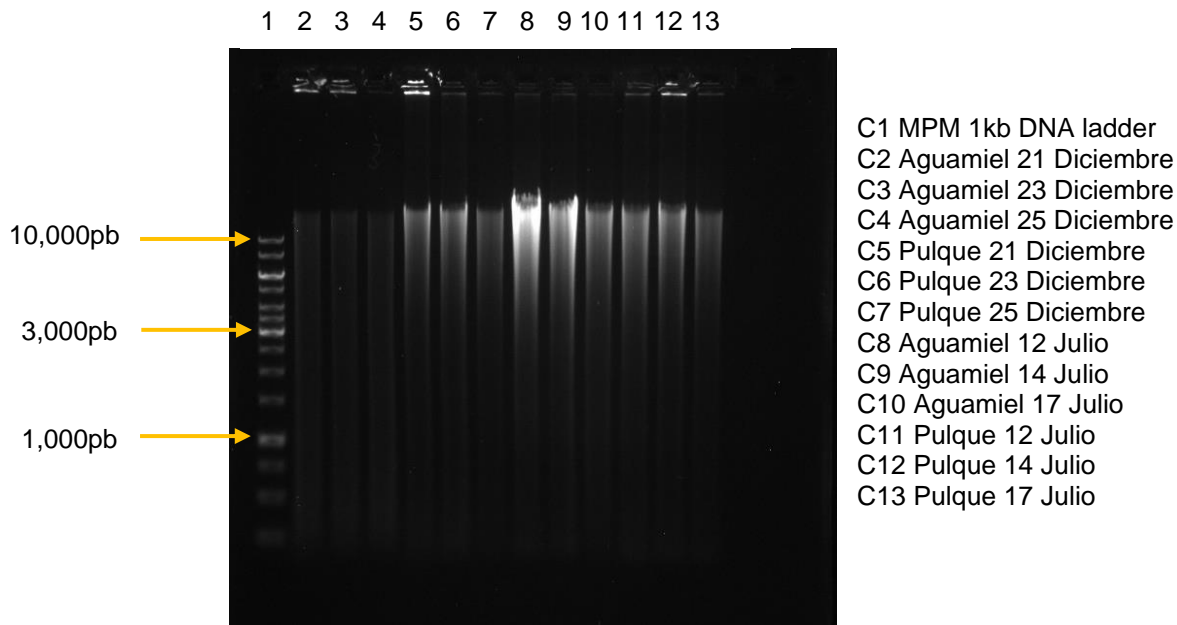




**Figura 9. Árbol filogenético consenso de las secuencias de levaduras y los alineamientos con mayor porcentaje de identidad. Se realizó mediante el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei con un bootstrap de 1,000.**

### 13.3 Obtención del ADN genómico para el análisis de comunidades fúngicas y bacterianas de aguamiel y pulque

Se comprobó la presencia y calidad de la extracción de ADN de las doce muestras de forma cualitativa mediante electroforesis en gel (Figura 10). Es importante que las extracciones cumplan con ciertas características para que la secuenciación sea confiable. Se obtuvo material genético de todas las muestras el cual se encuentra debajo del pozo y por encima del marcador de peso molecular, notándose en mayor cantidad en el grupo de aguamiel verano y en poca cantidad para aguamiel invierno. Además, todas las muestras presentan degradación, en especial las del aguamiel invierno.



**Figura 10. Extracción de ADN metagenómico de las muestras de aguamiel y pulque de la estación de invierno y verano.** Las muestras se cargaron en un gel de agarosa al 0.8%.

Las características de las muestras de ADN requeridas son una cantidad de  $\geq 20$  ng/ $\mu$ L en un volumen de 20  $\mu$ L, una relación de absorbancia de A260/280 de  $\geq 1.7$  (valores  $< 1.6$  indican contaminación de compuestos aromáticos y  $> 2.1$  la presencia de ARN) y A260/230 de  $\geq 1.7$  (un valor  $< 1.5$  indica contaminación con sales, carbohidratos o fenoles), lo cual se revisó previo a su secuenciación (Anexos 17.8).

### 13.3.1 Resultados del análisis metagenómico para bacterias del aguamiel y pulque

Con base a los datos de secuenciación se realizaron los índices de diversidad. Cada muestra de aguamiel invierno (Ai21, Ai23 y Ai25) tiene entre ocho o nueve secuencias de bacterias diferentes cada una, siendo la mitad o menos de lo encontrado en los demás grupos de muestras (Tabla 10). Se debe tomar en cuenta que, aunque hay taxones diferentes en una muestra, estos pueden estar presentes en las demás.

**Tabla 10. Número de secuencias reportadas de bacterias en las muestras de aguamiel y pulque.**

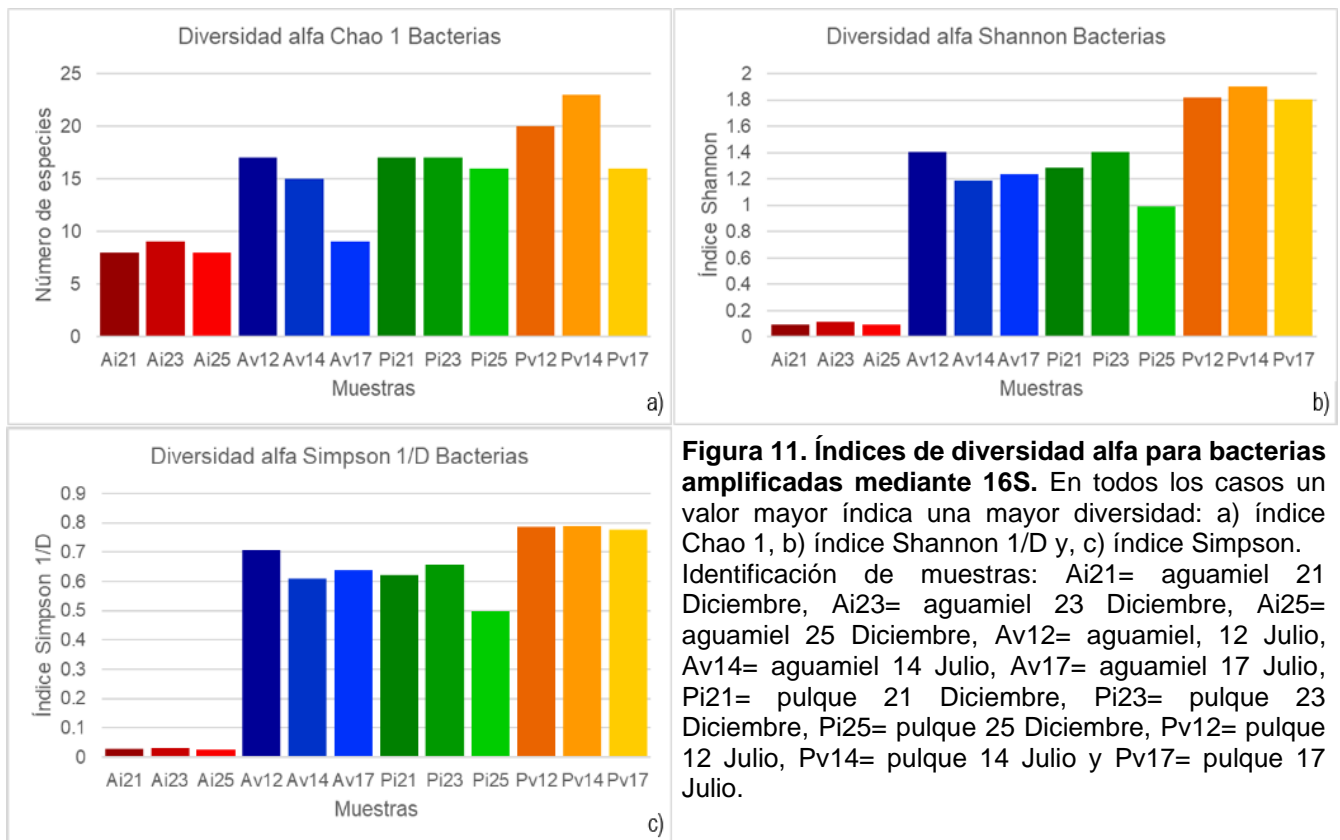
Muestra	Secuencias (filtradas)	Secuencias únicas
Ai21	31,993	8
Ai23	31,396	9
Ai25	32,401	8
Av12	30,427	17
Av14	26,576	15
Av17	25,653	9
Pi21	26,694	17
Pi23	28,459	17
Pi25	32,706	16
Pv12	31,706	20
Pv14	33,349	23
Pv17	9,662	16

Se tienen varios índices de diversidad alfa, el primero es Chao 1 (Figura 11a) los valores coinciden con el número de especies diferentes por muestra, siendo mayor en las muestras de pulque verano e invierno, seguido de aguamiel verano y con la menor diversidad se encuentra en las muestras de aguamiel invierno.

Para el índice Shannon (Figura 11b) se observa que las muestras de aguamiel invierno tienen una diversidad muy baja, las muestras de aguamiel verano y pulque invierno tienen una diversidad baja (menor a dos) y, las muestras de pulque verano son las que tienen mayor diversidad.

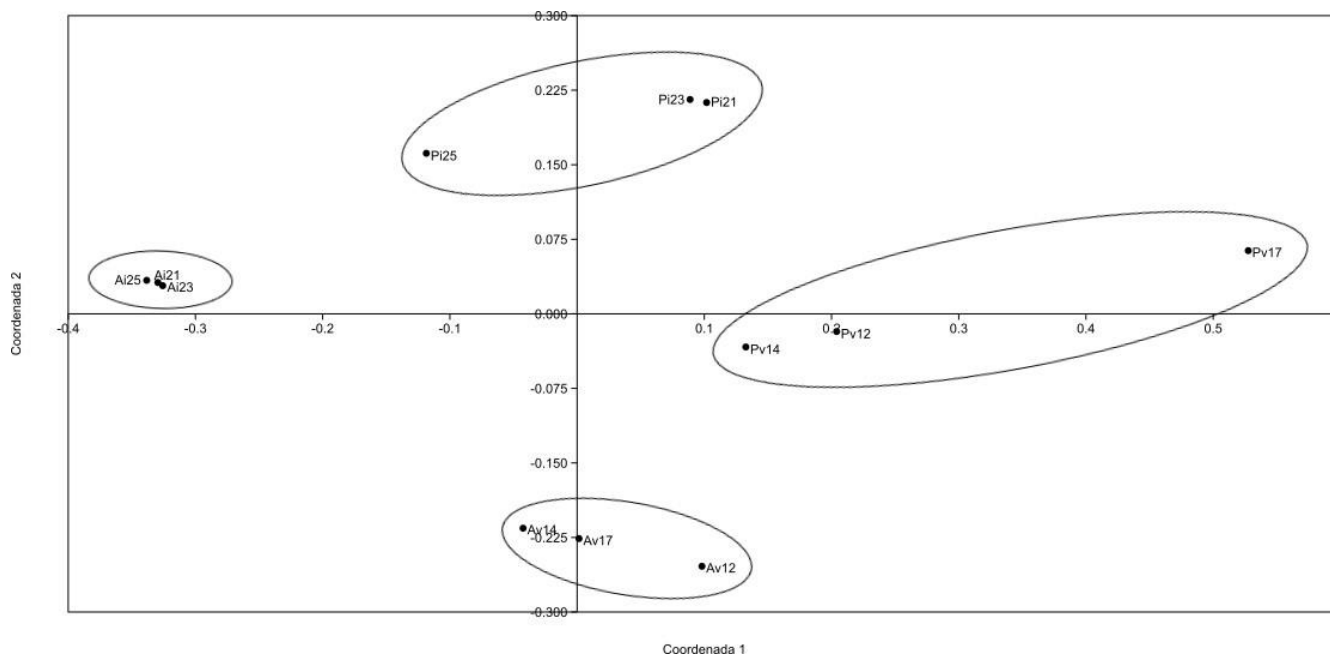
En el índice Simpson (D) (Figura 11c) el grupo de aguamiel invierno queda con la menor diversidad. Estando el resto de las muestras con valores entre 0.5 y 0.8, siendo mayor para el pulque verano.

En general el comportamiento de los tres índices de diversidad alfa para las bacterias es el mismo. Coinciden que el grupo de aguamiel invierno (Ai21, Ai23 y Ai25) es el que tiene menor diversidad de especies. Los grupos de aguamiel verano (Av12, Av14 y Av17) y pulque invierno (Pi21, Pi23 y Pi25) tienen una diversidad similar y, finalmente son las muestras del pulque verano (Pv12, Pv14 y Pv17) las que tienen la mayor diversidad.



**Figura 11. Índices de diversidad alfa para bacterias amplificadas mediante 16S.** En todos los casos un valor mayor indica una mayor diversidad: a) índice Chao 1, b) índice Shannon 1/D y, c) índice Simpson. Identificación de muestras: Ai21= aguamiel 21 Diciembre, Ai23= aguamiel 23 Diciembre, Ai25= aguamiel 25 Diciembre, Av12= aguamiel, 12 Julio, Av14= aguamiel 14 Julio, Av17= aguamiel 17 Julio, Pi21= pulque 21 Diciembre, Pi23= pulque 23 Diciembre, Pi25= pulque 25 Diciembre, Pv12= pulque 12 Julio, Pv14= pulque 14 Julio y Pv17= pulque 17 Julio.

La diversidad beta se realizó mediante el índice de similitud de Bray-Curtis representado mediante un gráfico de escalado multidimensional no métrico (NMDS). Las distancias se sustituyen por rangos por lo que los ejes son arbitrarios y, los objetos ordenados más cerca unos de otros son más similares a los ordenados más lejos (Figura 12).



**Figura 12. Diversidad beta mediante similitud de Bray-Curtis para bacterias.** Se representan por puntos las muestras de aguamiel y pulque de las estaciones invierno y verano para bacterias amplificadas mediante 16S.

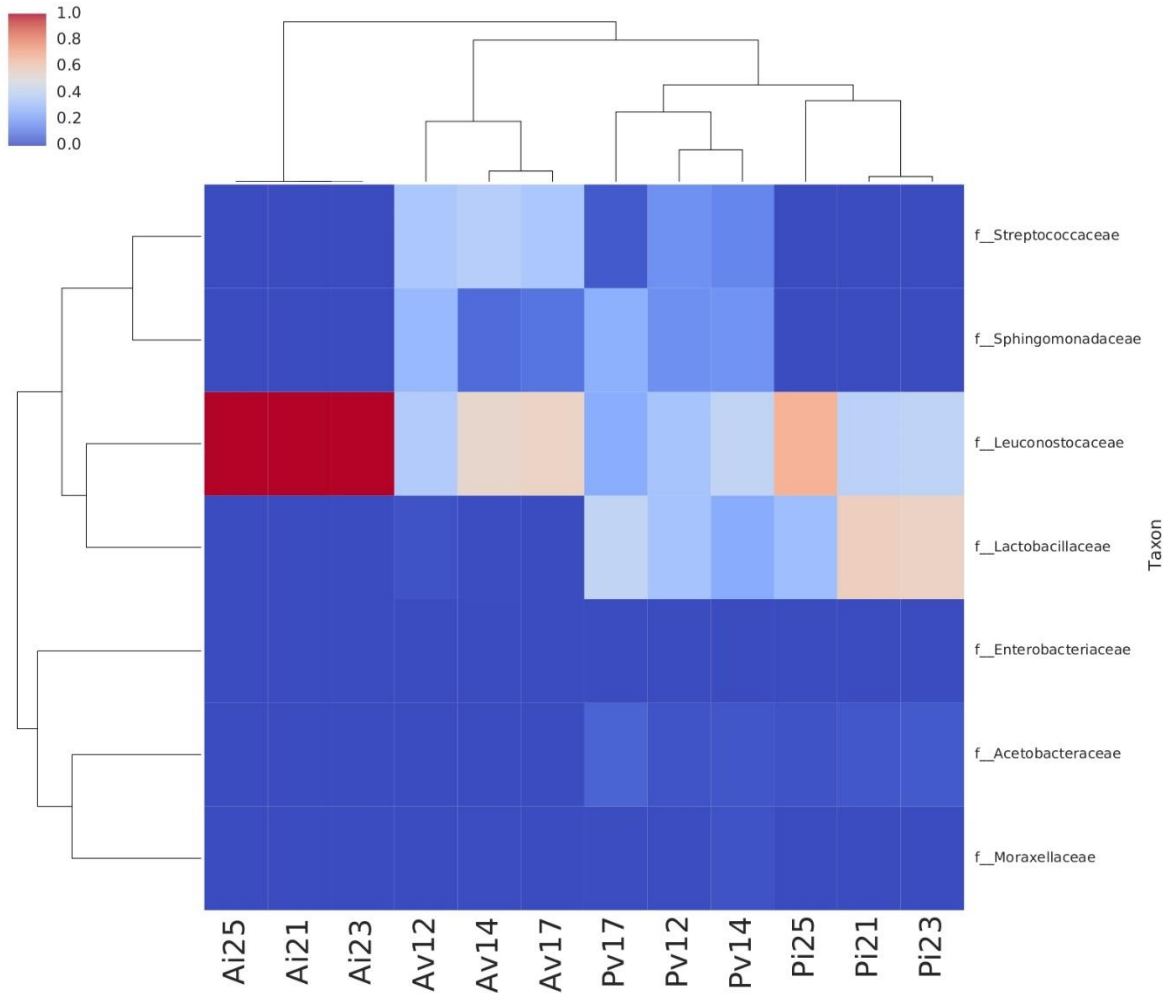
Al lado izquierdo del gráfico se tiene el grupo de aguamiel invierno (Ai21, Ai23 y Ai25) ( $\approx X = -0.35, Y = 0.37$ ) prácticamente solapadas lo que indica que estas muestras son muy similares, y tienen taxones en común. En la parte superior se encuentra el grupo de pulque invierno, guardando una gran relación las muestras del día 21 y 23 de Diciembre ( $\approx 0.1, 0.225$ ), estando un poco separados de la muestra del día 25. En el inferior se agrupan las muestras del grupo de aguamiel verano ( $\approx 0.0, -0.225$ ). Del lado derecho, se encuentra el pulque del día 12 y 14 de Julio ( $\approx 0.15, 0.0$ ) y muy separado del grupo sin similitud, la muestra del 17 de Julio ( $\approx 0.55, 0.37$ ) la cual no tienen.

Se observa que las muestras de los cuatro grupos: aguamiel invierno, aguamiel verano, pulque invierno y pulque verano se localizan en puntos similares, pero en



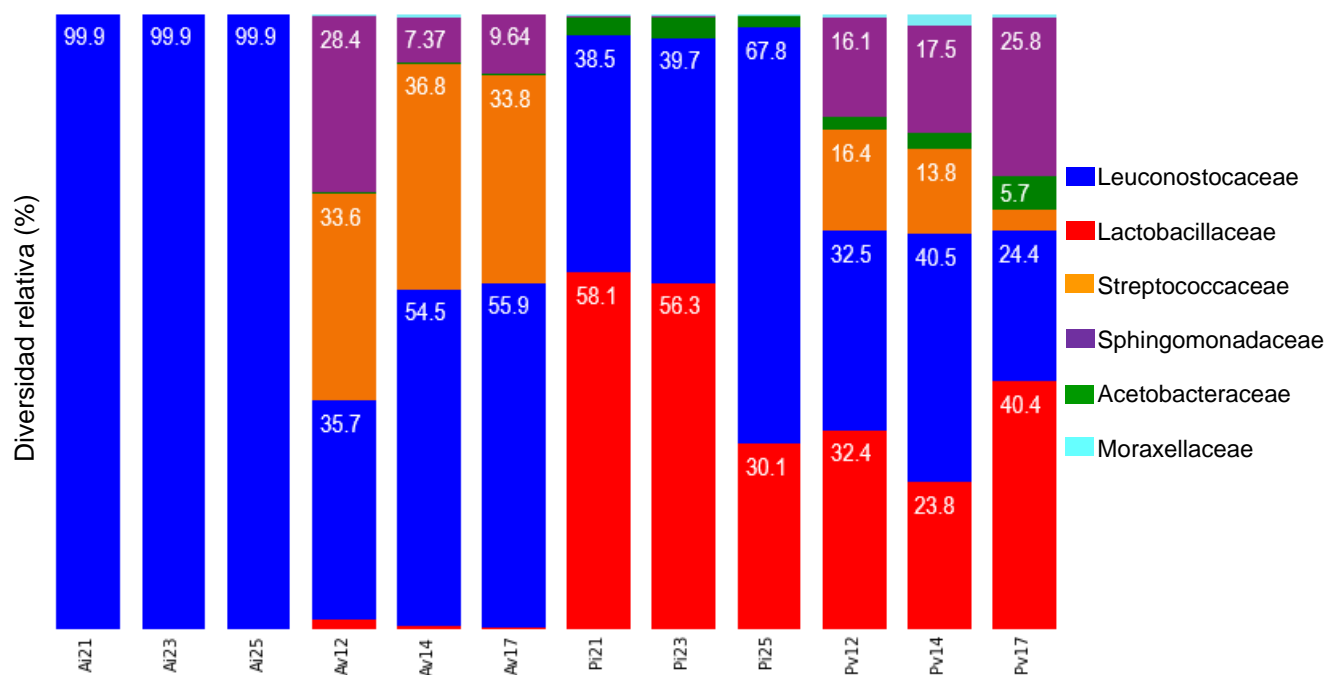
cuadrantes distintos lo que nos dice que los taxones identificados entre muestras son parecidos, pero no comparten similitud ni con el producto ni la temporada.

En la Figura 13 se muestra el mapa de calor de abundancia relativa para las doce muestras, llegando la identificación a nivel de siete familias diferentes. La familia de Streptococcaceae y Sphingomonadaceae tienen presencia en aguamiel y pulque de verano con valores de 0.2 a 0.4. La familia Leuconostocaceae es la única presente en todas las muestras, siendo mayor en el grupo de aguamiel invierno con un valor de 1.0. La familia Lactobacillaceae se encuentra en pulque de verano e invierno con una presencia de 0.4 a 0.6 y la Acetobacteraceae con 0.2 en las mismas muestras. Finalmente, la familia Enterobacteriaceae y Moraxellaceae, tienen una presencia reducida en todas las muestras ( $\leq 0.1$ ).



**Figura 13. Mapa de calor de abundancia de taxonomía con agrupación de muestras a nivel familia para bacterias.** Las zonas de color rojo y naranja indican una mayor presencia, en cambio las diferentes tonalidades de azul pueden tener valores tan bajos como 0.1% o una ausencia de la familia en esa muestra en los tonos más oscuros.

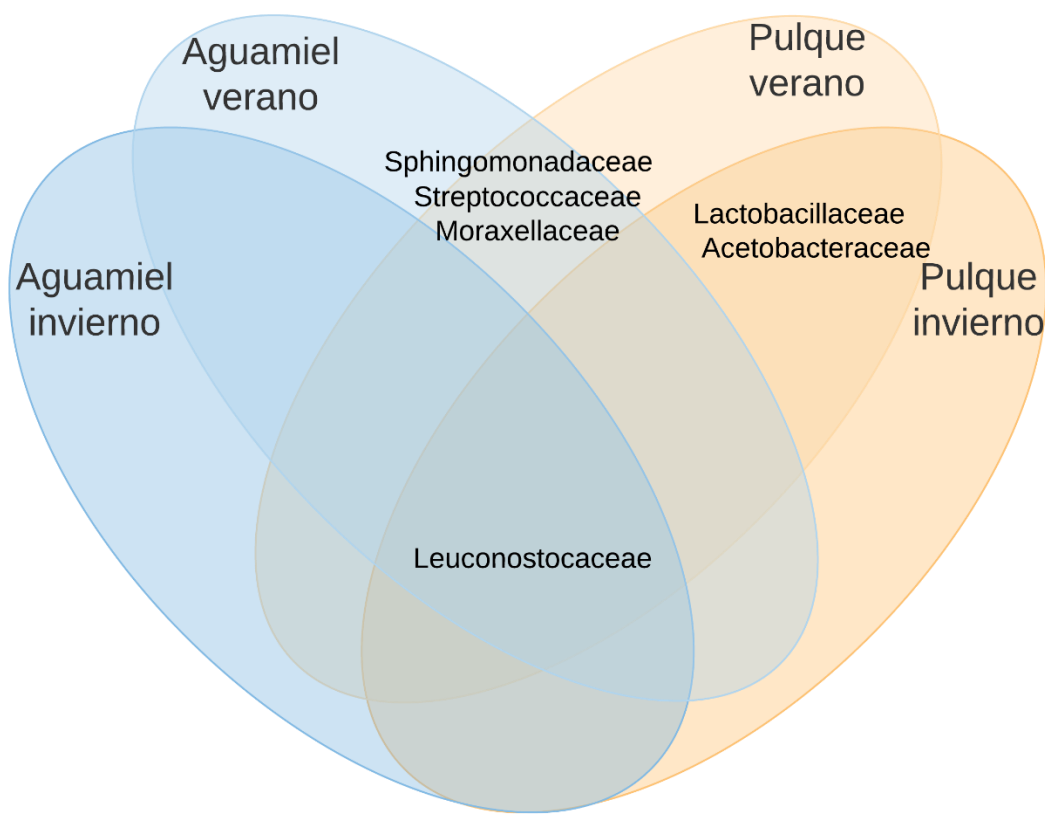
En la Figura 14 se presentan los resultados de taxonomía. Es un gráfico por colores similar al mapa de calor, donde cada muestra tiene una barra en el eje X y secciones de color que representan el porcentaje de las familias presentes en el eje Y. Solo la familia Leuconostocaceae (con los géneros *Leuconostoc*, *Weissella* y *Fructobacillus*) con 57.4% del total está presente en todas las muestras. Las cinco familias restantes se encuentran en nueve muestras (están ausentes en las muestras de aguamiel invierno). Siguiendo el porcentaje de presencia, el segundo lugar lo tiene la familia Lactobacillaceae (con el género *Lactobacillus* detectado en la secuenciación) que presenta un 20.3%. El tercer lugar con 11.5% corresponde a la familia Streptococcaceae (con el género *Lactococcus*) y el cuarto es Sphingomonadaceae con 8.8% donde se detectó el género *Zymomonas*, que es una importante bacteria productora de alcohol etílico. Las tres familias restantes tienen una presencia muy reducida y corresponden a Acetobacteraceae (incluye *Acetobacter* que al fermentar produce ácido acético) con 1.6%, Moraxellaceae (género *Alkanindiges*) con 0.3% y finalmente Enterobacteriaceae (presenta los géneros *Enterobacter*, *Hafnia* y *Rahnella*) con 0.1%.



**Figura 14. Resumen de taxonomía a nivel familia para bacterias.** Las barras del eje X corresponde a las muestras y el eje Y al porcentaje relativo de cada familia.



La Figura 15 es el diagrama de Venn para bacterias, en donde se indican las familias encontradas mediante la secuenciación y las que son compartidas entre muestras. Se observa que la familia *Leuconostocaceae* está presente en los cuatro grupos de muestras, siendo además la única en aguamiel invierno. Para los grupos de aguamiel y pulque verano, estos comparten las familias *Streptococcaceae*, *Sphingomonadaceae* y *Moraxellaceae*. Los grupos de pulque invierno y verano comparten las familias *Lactobacillaceae* y *Acetobacteraceae*. Los grupos de pulque invierno y verano comparten las familias *Lactobacillaceae* y *Acetobacteraceae*.



**Figura 15. Diagrama de Venn para las familias de bacterias que comparten los grupos de muestras.** De lado izquierdo se muestran los grupos de aguamiel invierno y verano y, del derecho el pulque invierno y verano, las familias de microorganismos que comparten se encuentran en las zonas de unión entre los óvalos.

### 13.3.2 Resultados del análisis metagenómico para hongos y levaduras del aguamiel y pulque

El número de secuencias totales después del filtrado y las secuencias diferentes para cada muestra (pueden estar presentes en otras muestras y repetirse) en la amplificación para levaduras se muestran en Tabla 11. Se nota que el número de especies diferentes es el doble o más en aguamiel de ambas estaciones respecto al pulque. Sin embargo, el número de secuencias leídas tiene un promedio similar entre aguamiel y pulque.

**Tabla 11. Número de secuencias reportadas en las muestras de aguamiel y pulque levaduras.**

Muestra	Secuencias (filtradas)	Secuencias finales únicas
Ai21	39,666	16
Ai23	42,734	20
Ai25	44,320	18
Av12	46,522	15
Av14	39,971	15
Av17	47,940	19
Pi21	40,501	7
Pi23	42,449	8
Pi25	39,362	7
Pv12	42,149	7
Pv14	45,252	8
Pv17	42,174	5

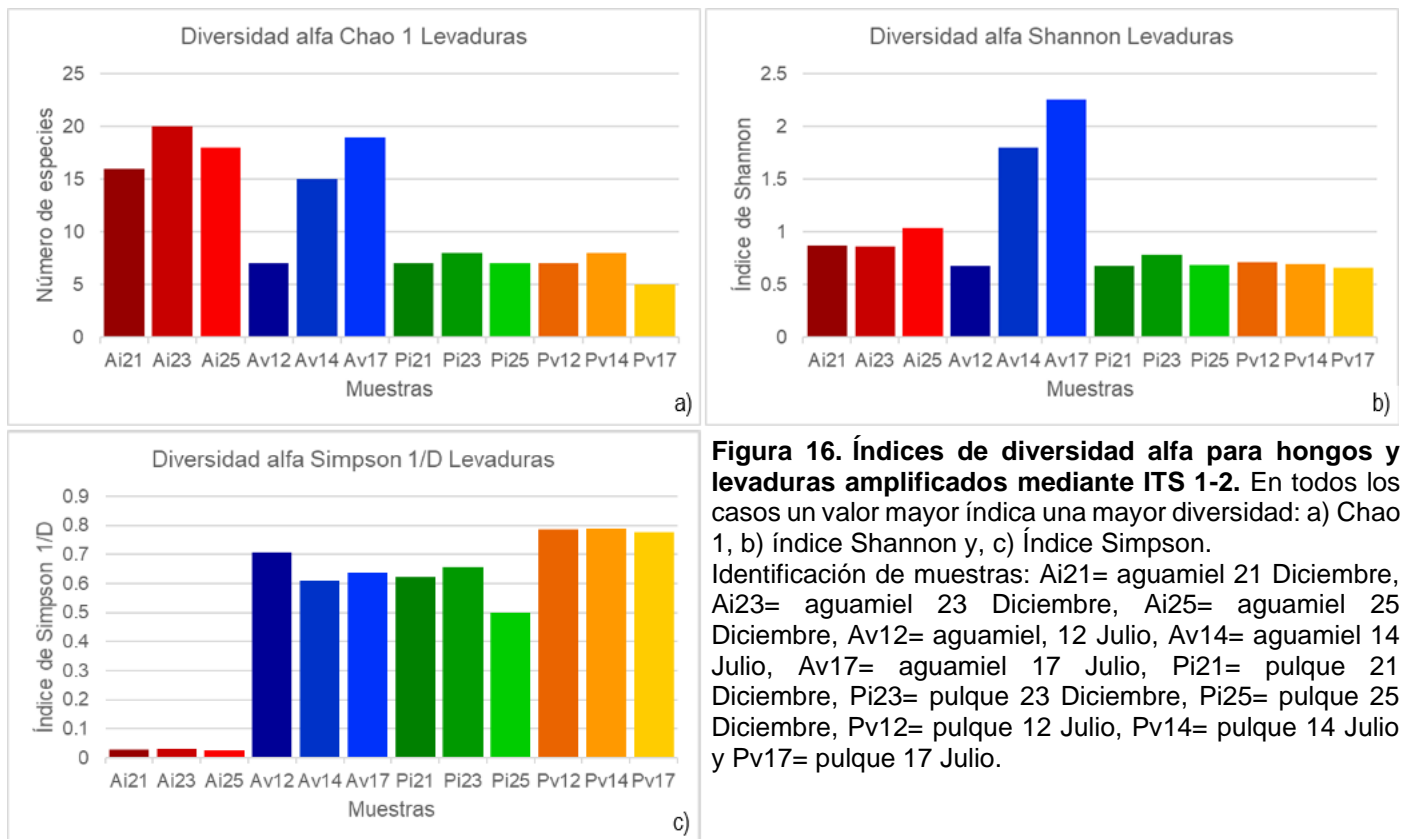
En la diversidad alfa para hongos y levaduras, la primera gráfica corresponde al índice Chao 1 (Figura 16a), que corresponde al número de especies observadas donde se aprecia que los grupos de aguamiel de la estación verano tienen un número mayor (de 15 a 20) que los de pulque correspondientes (de 5 a 8).

Para el índice Shannon (Figura 16b) el pulque invierno y verano tienen menor diversidad con un valor  $\leq 1.0$ , le sigue el aguamiel invierno con un valor ligeramente

mayor y el aguamiel verano es el único grupo que se considera diverso con valores de  $\approx 2.5$ .

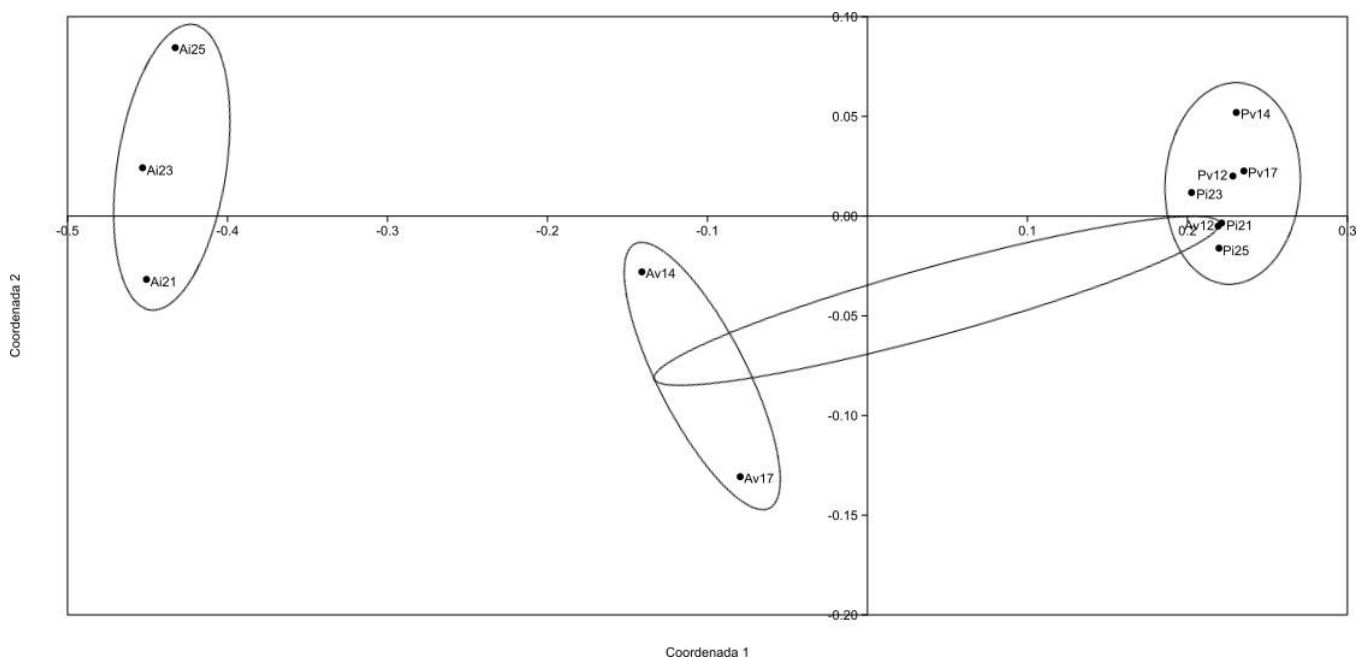
En el índice Simpson (Figura 16c) los grupos de pulque invierno y verano tienen con un valor similar la menor diversidad de  $\approx 0.37$ , seguido del aguamiel invierno y con la mayor diversidad las muestras de aguamiel verano con valores de  $\approx 0.75$ .

Tanto el índice Shannon y Simpson tienen un comportamiento muy similar: muestran una mayor diversidad para el grupo de aguamiel verano, seguido, pero con menor valor el aguamiel invierno y, con una menor diversidad el pulque de invierno y verano con valores muy similares.



**Figura 16. Índices de diversidad alfa para hongos y levaduras amplificadas mediante ITS 1-2.** En todos los casos un valor mayor indica una mayor diversidad: a) Chao 1, b) índice Shannon y, c) Índice Simpson. Identificación de muestras: Ai21= aguamiel 21 Diciembre, Ai23= aguamiel 23 Diciembre, Ai25= aguamiel 25 Diciembre, Av12= aguamiel, 12 Julio, Av14= aguamiel 14 Julio, Av17= aguamiel 17 Julio, Pi21= pulque 21 Diciembre, Pi23= pulque 23 Diciembre, Pi25= pulque 25 Diciembre, Pv12= pulque 12 Julio, Pv14= pulque 14 Julio y Pv17= pulque 17 Julio.

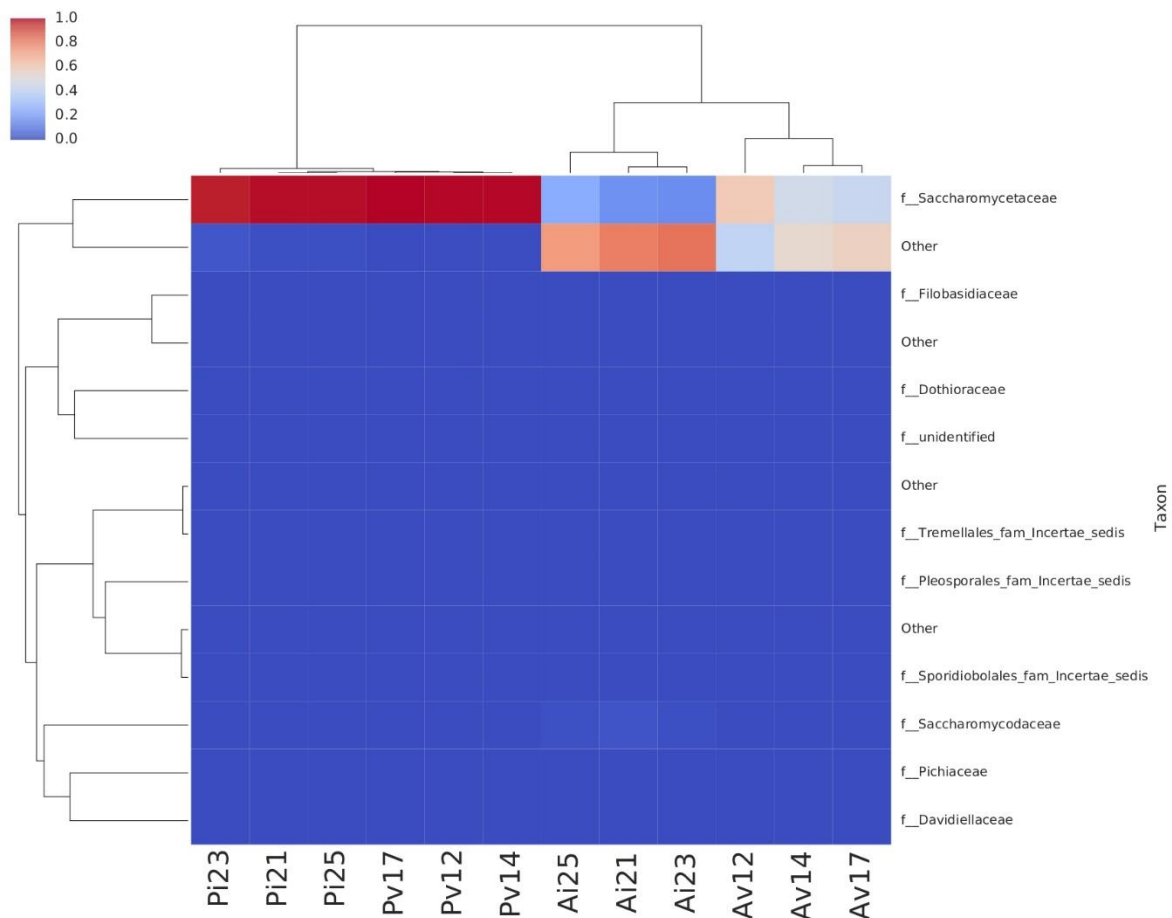
En la diversidad beta (Figura 17) se observa el agrupamiento de las muestras de aguamiel invierno (Ai21, Ai23 y Ai25) del lado izquierdo del gráfico en las coordenadas  $\approx X= 0.45$ ,  $Y= -0.25$ , lo cercano de las muestras indica que guardan similitud, pero tienen diferencias con el paso de los días. En la parte inferior del gráfico y dispersas se encuentran las muestras de aguamiel verano del 14 y 17 de Julio ( $\approx -0.15$ ,  $-0.10$ ). La muestra del día 12 de Julio está en el otro extremo del gráfico ( $\approx 0.2$ ,  $0.0$ ), lo que indica que no guarda ninguna relación con las anteriores. En cambio es muy similar a las muestras de pulque de ambas estaciones. Del lado derecho hay un agrupamiento entre las muestras de pulque invierno (Pi21, Pi23 y Pi25;  $\approx 0.2$ ,  $0.0$ ) y pulque verano (Pv12, Pv14 y Pv17;  $\approx 0.2$ ,  $0.025$ ), por lo que los taxones identificados entre muestras de pulque son los más similares entre su grupo y también entre estaciones.



**Figura 17. Diversidad beta mediante similitud de Bray-Curtis para levaduras.** Se representan por puntos las muestras de aguamiel y pulque de las estaciones invierno y verano para bacterias amplificadas mediante ITS 2.

Esto muestra que, en el caso de levaduras, para el pulque su diversidad es prácticamente la misma independiente de la temporada. Además, no guardan relación con los taxones de aguamiel, a excepción de la muestra de aguamiel del 12 de Julio. En el caso de los grupos de aguamiel, estos no tienen relación entre estación.

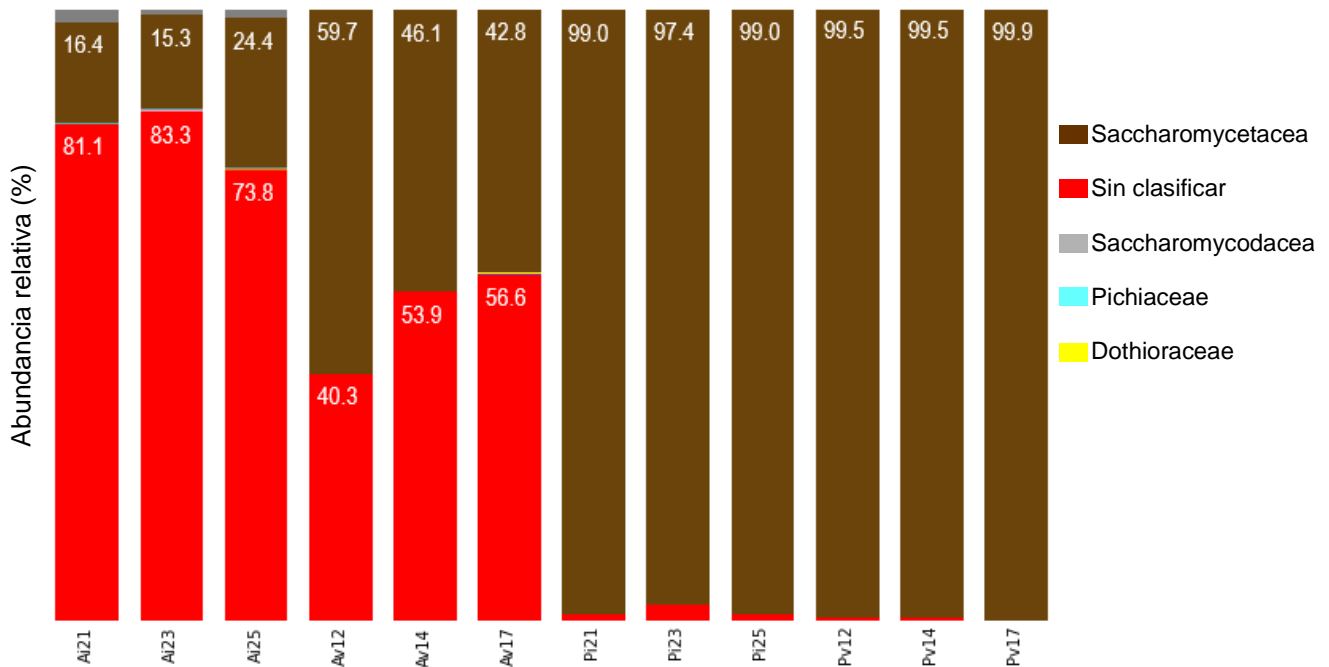
El mapa de calor para las muestras de levaduras corresponde a la Figura 18. Cada columna representa una muestra y las filas son las familias encontradas por la secuenciación. Se observa que la familia Saccharomyceteae está presente en todas las muestras y en mayor cantidad en el pulque (de 0.8 a 1.0). El segundo grupo con mayor presencia es el de 'Sin clasificar' que está en las muestras de aguamiel (de 0.4 a 0.6), que agrupa todas las secuencias que sí bien fueron amplificadas no pudieron ser identificadas. Las demás familias tienen valores bajos que van de 0.1% (Sporidiobolales) a 1.0% (Saccharomycetaceae), que no se pueden despreciar por incluir a géneros de levaduras de importancia.



**Figura 18. Mapa de calor de abundancia de taxonomía con agrupación de muestras a nivel familia para levaduras.** Las zonas de color rojo y naranja indican una mayor presencia, en cambio las diferentes tonalidades de azul pueden tener valores tan bajos como 0.1% o una ausencia de la familia en esa muestra en los tonos más oscuros.

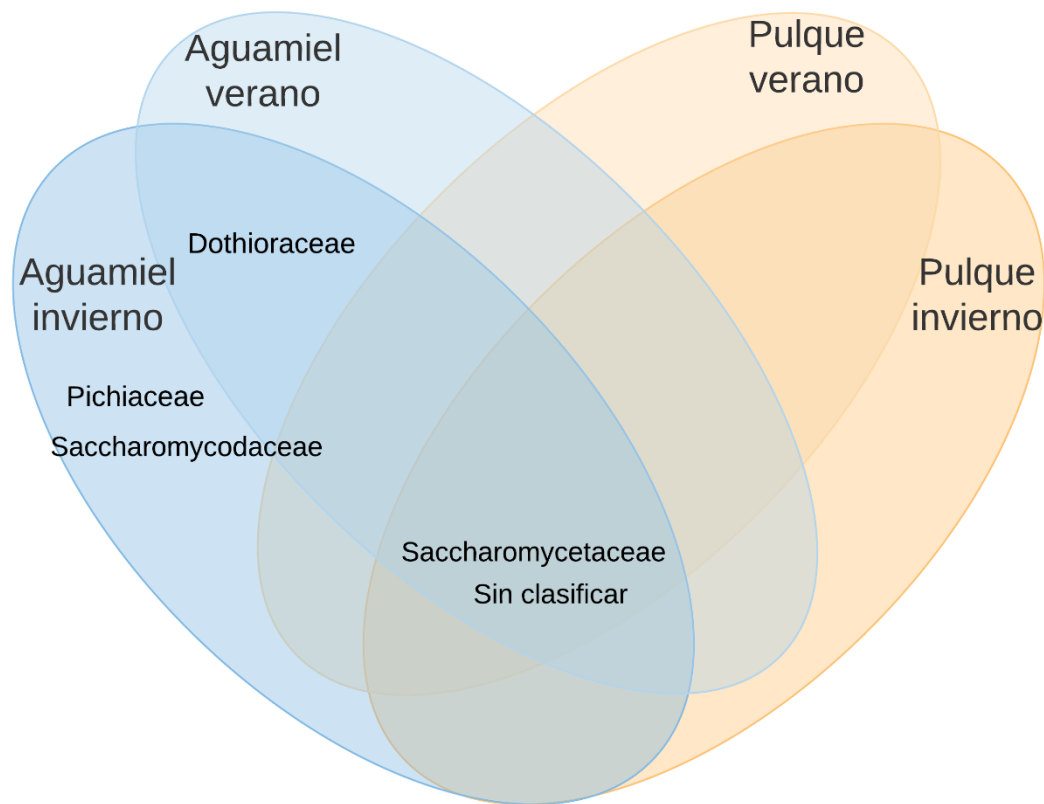
En la Figura 19 se presentan los resultados de las familias presentes en las muestras de pulque y aguamiel. La familia con mayor porcentaje de abundancia y la única presente en todas las muestras es la Saccharomycetaceae con un total del 66.6%. Es importante notar que en aguamiel su porcentaje va del 15.3% al 59.7% mientras que en el pulque, el porcentaje va del 97.4 al 99.9% de las secuencias.

Dentro de la familia Saccharomycetaceae la secuenciación detectó los géneros *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* como dominantes y en un porcentaje reducido a *Zygosaccharomyces*. El segundo lugar en porcentaje es el “Sin clasificar” con 32.9% que engloba todas las secuencias que fueron amplificadas, pero no pudieron ser identificadas. Este grupo está presente en todas las muestras excepto la de Pulque 17 de Julio. El tercer porcentaje lo tiene la familia Saccharomycodaceae con 0.4% con el género *Hanseniaspora*. Las familias Davidiellaceae, Dothioraceae, Filobasidiaceae, Sporidiobolaceae y Pichiaceae tienen una presencia solo en algunas muestras y representan juntos el 0.14% del total, pero incluyen a géneros identificados de *Rhodotorula spp.* y *Pichia spp.* que también fueron encontrados en los aislamientos individuales de levaduras.



**Figura 19. Resumen de taxonomía a nivel familia para levaduras.** Las barras del eje X corresponde a las muestras y el eje Y al porcentaje relativo de cada familia.

En la Figura 20 se muestran las familias de levaduras compartidas por las diferentes muestras. Además de las secuencias marcadas como ‘Sin clasificar’, la única familia que se comparte en los cuatro grupos de muestras es la Saccharomycetaceae, siendo también la única presente en pulque de invierno y verano. El aguamiel de verano presenta únicamente la familia Dothioraceae que, a su vez es compartida con el aguamiel de invierno. El aguamiel de invierno presenta las familias Saccharomycodaceae y Pichiaceae. El aguamiel de invierno también presenta las familias Saccharomycodaceae y Pichiaceae.



**Figura 20. Diagrama de Venn para las familias de levaduras que comparten los grupos de muestras.** De lado izquierdo se muestran los grupos de aguamiel invierno y verano y, del derecho el pulque invierno y verano, las familias de microorganismos que comparten se encuentran en las zonas de unión entre los óvalos.

La Tabla 12 tiene el fin de comparar rápidamente las familias de levaduras identificadas en los resultados ya descritos. En la secuenciación masiva se identificaron más familias. En estos resultados se encontraron las familias Saccharomycetaceae, Davidiellaceae, Dothioraceae y Filobasidiaceae, que no lograron aislarse por metodologías tradicionales. Sin embargo, se logró el aislamiento e identificación de *Moesziomyces spp.*, que pertenece a la familia Ustilaginaceae la cual no se encontró por secuenciación masiva.

**Tabla 12. Comparativa de levaduras identificadas mediante secuenciación masiva y secuenciación de muestras aisladas.**

Familia	Secuenciación masiva	Secuenciación individual
Saccharomycetaceae	Si ( <i>Saccharomyces spp.</i> , <i>Kluyveromyces spp.</i> , <i>Zygosaccharomyces spp.</i> )	Si ( <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Zygosaccharomyces bailii</i> , <i>Candida boidinii</i> , <i>Candida sonorensis</i> , <i>Kazachstania spp.</i> )
Saccharomycodaceae	Si ( <i>Hanseniaspora spp.</i> )	No
Davidiellaceae	Si	No
Dothioraceae	Si	No
Filobasidiaceae	Si	No
Pichiaceae	Si ( <i>Pichia spp.</i> )	Si ( <i>Pichia membranifaciens</i> )
Sporidiobolaceae	Si ( <i>Rhodotorula spp.</i> )	Si ( <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> )
Ustilaginaceae	No	Si ( <i>Moesziomyces spp.</i> )
Sin clasificar	Si	Si



## 13.4 Resultados de pruebas químicas

### 13.4.1 Determinación de pH

Los valores de pH de aguamiel y pulque de las estaciones de invierno y verano se observan en la Tabla 13. El promedio del pH baja en el pulque de invierno un 25.95% y en verano un 15.25%, respecto al valor del aguamiel correspondiente.

Las medianas de los productos analizados (Ai, Av, Pi y Pv), muestran que la disminución del pH es estadísticamente significativa ( $p=0.006$ ). Mientras que el valor de pH inicial del aguamiel es significativamente más alto, el aguamiel verano tiene un valor intermedio en sus medianas, pero ambos disminuyen por la acidificación (debido al aumento de ácido láctico y acético) y llegan a un pH significativamente igual en ambas estaciones (Anexos 17.8).

**Tabla 13. Análisis de pH de muestras de aguamiel y pulque de las estaciones de invierno y verano.**

Muestra	pH	Promedio pH*	Mediana pH**
Ai21	5.58±0.02	5.57±0.43	5.58 <sup>B</sup>
Ai23	6.04±0.04		
Ai25	5.15±0.01		
Av12	4.11±0.01	4.98±1.15	4.55 <sup>AB</sup>
Av14	4.55±0.02		
Av17	6.29±0.04		
Pi21	4.23±0.02	4.18±0.06	4.17 <sup>A</sup>
Pi23	4.15±0.02		
Pi25	4.13±0.03		
Pv12	4.20±0.02	4.22±0.09	4.20 <sup>A</sup>
Pv14	4.14±0.01		
Pv17	4.32±0.02		

\*Media  $\pm$  desviación estándar por estación-producto. \*\*Comparación de medianas, donde letras diferentes representan medianas significativamente ( $p<0.05$ ) diferentes.

### 13.4.2 Determinación de acidez total

El resultado de la titulación de los ácidos orgánicos presentes expresado como ácido láctico se muestran en la Tabla 14. Después de la fermentación hay un aumento en el promedio de la acidez del 82.57% para la época de invierno y del 53.85% para verano.

El aumento en la acidez en los productos es significativo estadísticamente ( $p=0.0001$ ) en las medianas; y en su comparación las muestras de aguamiel se y pulque se agrupan por separado, lo que indica que la diferencia significativa entre las medianas está dado por el proceso de fermentación.

**Tabla 14. Análisis de acidez total de muestras de aguamiel y pulque de las estaciones de invierno y verano.**

Muestra	Ácido láctico (g/L)	Promedio ácido láctico (g/L)*	Mediana ácido láctico (g/L)**
Ai21	0.9±0.0	0.92±0.51	0.9 <sup>A</sup>
Ai23	0.42±0.10		
Ai25	1.44±0.0		
Av12	3.96±0.0	2.16±1.60	1.62 <sup>A</sup>
Av14	1.62±0.0		
Av17	0.9±0.0		
Pi21	5.7±0.10	5.28±1.46	5.76 <sup>B</sup>
Pi23	3.66±0.10		
Pi25	6.48±0.0		
Pv12	4.38±0.10	4.68±0.3	4.68 <sup>B</sup>
Pv14	4.98±0.10		
Pv17	4.68±0.0		

\*Media ± desviación estándar por estación-producto. \*\*Comparación de medianas, donde letras diferentes representan medianas significativamente ( $p<0.05$ ) diferentes.

### 13.4.3 Determinación de proteínas

La cuantificación de proteína para cada muestra, se anotan en la Tabla 15. En los promedios se aprecia que hay una cantidad muy similar de proteínas en el aguamiel de ambas temporadas y que disminuye un 66.66% para las muestras de invierno y 56.25% para las muestras de verano.

El análisis estadístico para las medianas muestra que la disminución en la cuantificación de proteínas es estadísticamente significativa ( $p \leq 0.0001$ ) para los productos revisados. La comparación de medianas indica que no hay diferencias significativas en los grupos del mismo producto: aguamiel y pulque, pero que tampoco lo hay entre el aguamiel invierno y el pulque verano que son los que tienen los valores centrales.

**Tabla 15. Análisis de proteína de muestras de aguamiel y pulque de las estaciones de invierno y verano.**

Muestra	Proteínas (mg/mL)	Promedio Proteínas (mg/mL)*	Mediana Proteínas (mg/mL) **
Ai21	0.204±0.038	0.15±0.05	0.13 <sup>AB</sup>
Ai23	0.111±0.015		
Ai25	0.135±0.019		
Av12	0.097±0.008	0.16±0.09	0.13 <sup>A</sup>
Av14	0.124±0.009		
Av17	0.257±0.034		
Pi21	0.038±0.004	0.05±0.01	0.04 <sup>C</sup>
Pi23	0.054±0.008		
Pi25	0.048±0.004		
Pv12	0.047±0.008	0.07±0.02	0.07 <sup>BC</sup>
Pv14	0.076±0.012		
Pv17	0.078±0.007		

\*Media ± desviación estándar por estación-producto. \*\*Comparación de medianas, donde letras diferentes representan medianas significativamente ( $p < 0.05$ ) diferentes.

### 13.4.4 Determinación de azúcares totales

La cuantificación de las muestras se observa en la Tabla 16. Se observa en los promedios que la gran cantidad de azúcares totales por litro en el aguamiel disminuye de forma muy notoria a un 89.40% en invierno y un 67.64% en verano.

**Tabla 16. Análisis de azúcares totales de muestras de aguamiel y pulque de las estaciones de invierno y verano.**

Muestra	Azúcares totales (g/L)	Promedio Azúcares totales (g/L)*	Mediana Azúcares totales (g/L)**
Ai21	183.39±15.86	177.04±8.03	176.20 <sup>A</sup>
Ai23	168.02±18.68		
Ai25	179.72±6.46		
Av12	196.48±13.83	169.97±59.85	203.66 <sup>A</sup>
Av14	101.45±8.40		
Av17	211.99±9.97		
Pi21	17.11±0.91	18.76±1.51	19.37 <sup>B</sup>
Pi23	19.10±2.40		
Pi25	20.07±2.81		
Pv12	20.927±1.67	55.00±43.92	39.04 <sup>B</sup>
Pv14	39.511±1.92		
Pv17	104.56±15.19		

\*Media ± desviación estándar por estación-producto. \*\*Comparación de medianas, donde letras diferentes representan medianas significativamente ( $p < 0.05$ ) diferentes.

Al revisar los valores de la determinación para cada muestra se notan promedios similares y buenas desviaciones estándar (entre 3-11% respecto al promedio) en aguamiel y pulque de invierno. En cambio, para el aguamiel y pulque verano sí bien la desviación estándar sigue los mismos porcentajes los promedios entre muestras son más variables, lo que hace que afecta al promedio general y hace que desviación estándar sean muy grande para los grupos de la estación verano. Para los datos individuales, los valores de la muestra de aguamiel del 14 de Julio y pulque del 17 Julio son muy diferentes a los de su grupo.

Las medianas tienen una disminución que es significativa estadísticamente ( $p \leq 0.0001$ ), teniendo una agrupación los productos que corresponden a aguamiel y el pulque en otra.

#### 13.4.4 Determinación de azúcares reductores

Los valores de la determinación para cada muestra de aguamiel y pulque, se muestran la Tabla 17. Se observa que en el promedio de la determinación entre aguamiel y pulque de la estación de invierno no hay un cambio apreciable (-9.12%). Sin embargo, sí en la estación de verano donde el aguamiel empieza con un valor alto de azúcares reductores 33.87g/L que es más de doce veces mayor que el promedio de invierno (2.72g/L) y tiene una disminución del 66.46% después de la fermentación.

**Tabla 17. Análisis de azúcares reductores de muestras de aguamiel y pulque de las estaciones de invierno y verano.**

Muestra	Azúcares reductores (g/L)	Promedio Azúcares reductores (g/L)*	Mediana Azúcares reductores (g/L)**
Ai21	2.60±0.32	2.59±0.17	2.68 <sup>C</sup>
Ai23	2.74±0.35		
Ai25	2.41±0.32		
Av12	38.36±7.20	33.87±7.20	32.82 <sup>A</sup>
Av14	37.69±4.22		
Av17	25.56±4.90		
Pi21	3.69±0.35	2.85±0.73	2.61 <sup>BC</sup>
Pi23	2.45±0.16		
Pi25	2.41±0.34		
Pv12	6.09±2.74	11.36±7.21	8.98 <sup>AB</sup>
Pv14	8.40±1.74		
Pv17	19.58±5.88		

\*Media ± desviación estándar por estación-producto. \*\*Comparación de medianas, donde letras diferentes representan medianas significativamente ( $p < 0.05$ ) diferentes.

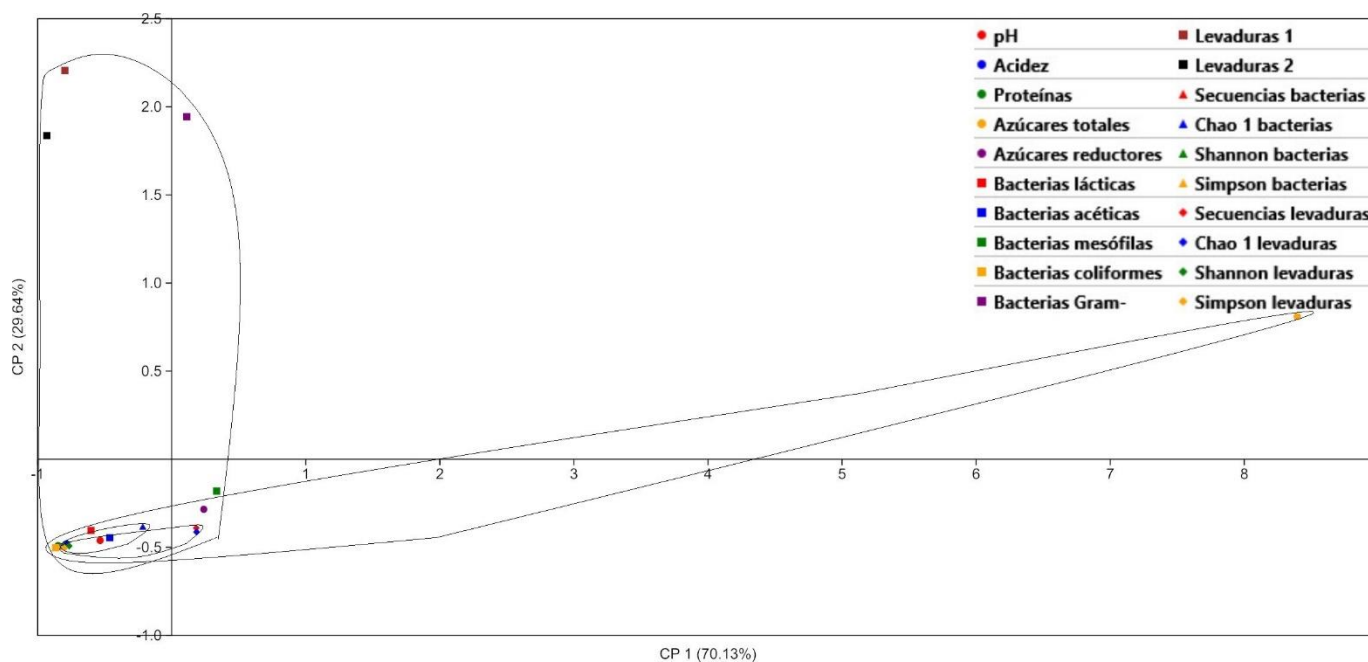


La prueba estadística muestra que hay una diferencia significativa en las mediciones ( $p \leq 0.0001$ ) de al menos una de las medianas de un producto. Las agrupaciones son diferentes entre cada producto, pero se observa que la mediana mayor está en el aguamiel de verano cuyo paso a pulque verano no es significativo al compartir una letra. Igual sucede con el grupo de aguamiel invierno y pulque invierno.

## 13.5 Relación entre los microorganismos y características químicas

### 13.5.1 Correlación de muestras de aguamiel

Se realizó un análisis de componentes principales utilizando las veinte variables del estudio y agrupándolas en determinaciones químicas, recuento de microorganismos, diversidad de bacterias y diversidad de levaduras. En la Figura 21 se muestra de forma gráfica el análisis de componentes principales, donde el primer componente principal explica el 70.13% de la variabilidad de los datos y el segundo componente principal el 29.64%, para un total del 99.77%. La variable dominante de forma positiva en el primer componente es azúcares totales ( $X = 8.4$ ,  $Y = 0.8$ ), mientras que existe una correlación negativa en forma de agrupamiento ( $\approx 0.0$ ,  $-0.5$ ) con la diversidad de bacterias y levaduras, las pruebas químicas restantes y la mitad de los conteos de microorganismos. Para el segundo componente principal hay un agrupamiento positivo de algunos recuentos (Levaduras 1, Levaduras 2 y Bacterias Gram-) ( $\approx -0.5$ ,  $2.0$ ) (Anexos 17.9).



**Figura 21. Gráfico bidimensional de análisis de componentes principales para las variables de las muestras de aguamiel.** Se grafican las veinte variables del CP1 (eje X) contra las del CP2 (eje Y).



Se realizó la prueba de correlación de Spearman para medir la relación estadística entre dos variables (Anexos 17.10). Solo los valores que fueron estadísticamente significativos, se enlistan a continuación. Empezando por las pruebas químicas, la determinación de pH tiene una correlación positiva con el número de secuencias de levaduras (0.870;  $p=0.024$ ) y el índice Chao 1 de levaduras (0.886;  $p=0.019$ ). Y una correlación negativa con la variable acidez (-0.899;  $p=0.015$ ), lo que indica que mientras el primero aumenta lo segundo disminuye.

Para la acidez, hay una correlación positiva con el recuento de Hongos y Levaduras 2 (0.812;  $p=0.05$ ), el número de secuencias de levaduras (0.882;  $p=0.029$ ) y el índice Chao 1 de levaduras (0.899;  $p=0.015$ ).

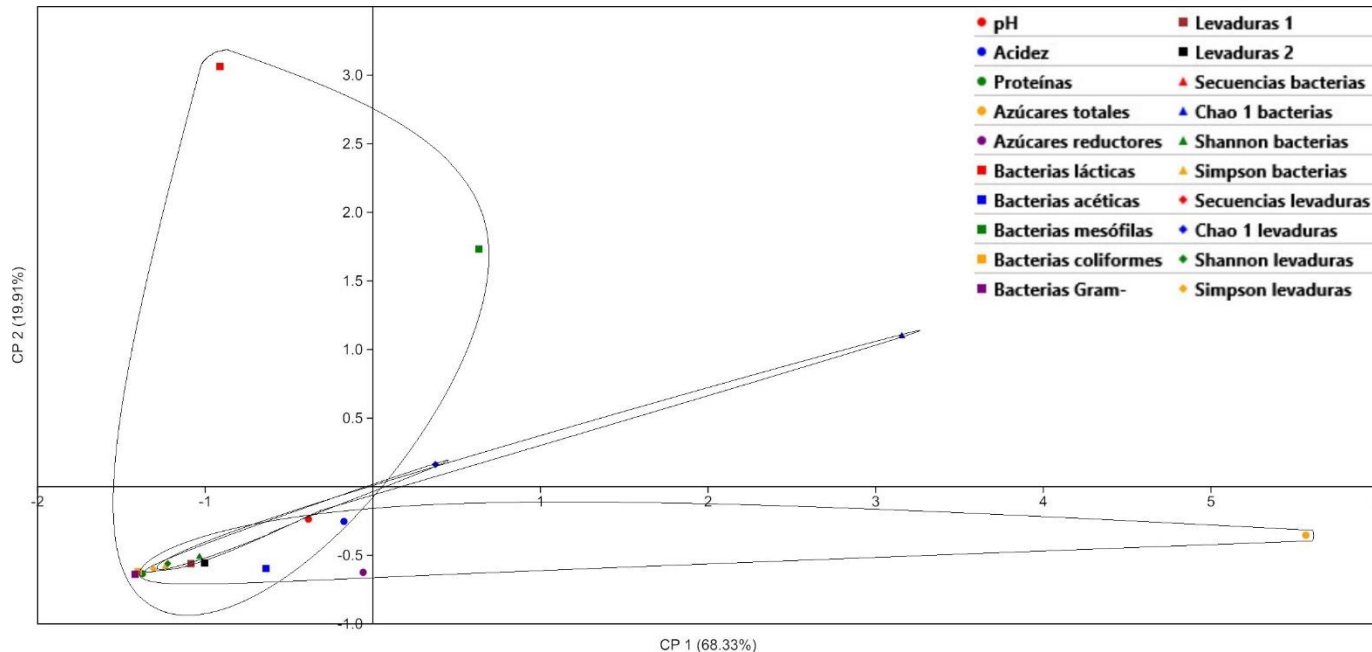
La determinación de proteínas no muestra relación significativa con el resto de las variables. Los azúcares totales solo tienen una relación negativa con las bacterias acéticas (-0.943,  $p=0.05$ ).

En cambio, los azúcares reductores tienen una correlación positiva con el conteo de Hongos y Levaduras 2 (0.829;  $p=0.042$ ), y muy fuerte con las secuencias de bacterias (0.971;  $p=0.001$ ), los índices Chao 1 de bacterias (0.971;  $p=0.001$ ), Shannon de bacterias (0.943;  $p=0.005$ ) y Simpson de bacterias (0.943;  $p=0.005$ ). Y además una correlación negativa fuerte con las bacterias coliformes (-0.928;  $p=0.008$ ) y las bacterias Gram- (-0.886;  $p=0.019$ ).



### 13.5.2 Correlación de muestras de pulque

El cálculo y agrupamientos de variables se hizo del mismo modo que el apartado anterior. En la Figura 22 se muestran las variables del análisis de componentes principales para las muestras de pulque. El primer componente principal explica el 68.33% de la variabilidad de los datos y el segundo el 19.91%, para un total del 88.24%. En el primer componente las variables que más aportan de forma positiva a la variación de los datos es azúcares totales ( $X= 5.6, Y= -0.3$ ), seguido del número de secuencias para bacterias y el índice Chao 1 de bacterias que están solapados (3.2, 1.1), de igual forma se observa un agrupamiento en el lado negativo del eje X ( $\approx -1.3, -0.5$ ) con el resto de determinaciones químicas, parte de los recuentos de microorganismos, la diversidad de bacterias y la diversidad de levaduras. En el segundo componente, las variables que más aportan de forma positiva son el recuento de bacterias ácido lácticas (3.1, -0.9) y el de bacterias mesófilas (1.7, 0.6) (Anexos 17.9).



**Figura 22. Gráfico bidimensional de análisis de componentes principales para las variables de las muestras de pulque.** Se grafican las veinte variables del CP1 (eje X) contra las del CP2 (eje Y).



En la correlación de Spearman se tiene que la determinación de pH y de proteínas no tiene relación con las demás variables.

La acidez solo tiene una correlación negativa con el índice Simpson de levaduras (-0.996;  $p= 0.019$ ). Los azúcares totales solo tienen una correlación negativa con las bacterias lácticas (-0.829;  $p= 0.042$ ). Los azúcares reductores tienen una relación positiva con bacterias acéticas (0.886;  $p= 0.019$ ) y una fuertemente negativa con las bacterias coliformes (-0.986;  $p=0.000$ ) (Anexos 17.10).



## XIV. DISCUSIÓN

Los alimentos y bebidas fermentadas son los que para su elaboración han intervenido microorganismos o enzimas, que provocan cambios bioquímicos y sensoriales deseables en los alimentos. La fermentación de alimentos es uno de los usos más antiguos de la biotecnología y aporta una gran variedad de alimentos, además de nutrientes como proteínas y aminoácidos, y probióticos. Estos han cambiado de un proceso natural a una selección y mejora de los microorganismos empleados, siendo los más importantes las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus spp.* y *Leuconostoc spp.*, los hongos *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* y levaduras del género *Saccharomyces spp.* (Campbell, 1994).

### 14.1 Recuento de microorganismos

Junto a las levaduras, el grupo de bacterias ácido lácticas y ácido acéticas se consideran microorganismos autóctonos del aguamiel, que están en menor cantidad en un inicio y su número aumenta en el pulque ya que intervienen en el producto dando la fermentación alcohólica, ácida y acética respectivamente (González *et al.*, 2015). Este comportamiento lo reportan también Cervantes y Pedroza (2008), donde hay un aumento del conteo durante la conversión de aguamiel a pulque de *Leuconostoc spp.*, *Zymomonas spp.* y *Saccharomyces spp.*, de forma similar Escalante *et al.* (2007) encuentran que durante el proceso de fermentación se incrementa el conteo de bacterias ácido lácticas, bacterias aerobias mesófilas y levaduras. Sin embargo, al revisar los conteos de microorganismos en nuestra investigación, se observa un comportamiento diferente: tanto las bacterias ácido lácticas, bacterias acéticas y levaduras, mantienen o disminuyen su conteo después de la fermentación.

Las bacterias lácticas en aguamiel fueron  $2.23 \times 10^5$  UFC/mL para invierno y  $3.76 \times 10^4$  UFC/mL en verano; valor menor que las  $3.2 \times 10^8$  UFC reportadas de Escalante *et al.* (2007) pero mayor que las 720 UFC/mL de Cervantes y Pedroza (2008). En el pulque disminuyó a  $3.49 \times 10^4$  UFC/mL para la época de invierno y sube a  $4.50 \times 10^4$  UFC/mL en verano; mientras que los resultados de Escalante *et al.* (2008) están en la misma



magnitud para ambos productos, con  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL en pulque, valor similar a las  $3.4 \times 10^8$  UCF/mL de Cervantes y Pedroza (2008).

Las bacterias mesófilas aerobias en aguamiel invierno son  $5.47 \times 10^4$  UFC/mL y  $2.48 \times 10^5$  UFC/mL en verano y;  $1.3 \times 10^7$  UFC/mL reportadas de Escalante *et al.* (2008). En pulque tenemos  $5.64 \times 10^4$  UFC/mL en invierno y  $9.54 \times 10^3$  UFC/mL en verano; contra las  $3.5 \times 10^7$  UFC/mL Escalante *et al.* (2008)

Para levaduras se realizó conteos en dos medios de cultivo: para aguamiel invierno se encontró  $5.44 \times 10^4$  UFC/mL y 977 UFC/mL en agar SDA y EXM respectivamente y; en aguamiel verano  $5.42 \times 10^4$  UFC/mL y  $2.98 \times 10^4$  UFC/mL. En aguamiel  $1.7 \times 10^5$  UFC/mL Cervantes y Pedroza (2008) y Escalante *et al.* (2008) reportan  $3.1 \times 10^4$  UFC/mL. En pulque invierno  $4.98 \times 10^3$  UFC/mL y  $4.59 \times 10^4$  UFC/mL en agar SDA y EXM respectivamente; en verano  $4.20 \times 10^4$  UFC/mL y  $3.75 \times 10^4$  UFC/mL (SDA/EXM). En pulque un valor de  $5.0 \times 10^9$  UFC/mL (Cervantes y Pedroza, 2008) y  $1.4 \times 10^7$  UFC/mL de (Escalante *et al.*, 2008).

Las bacterias acéticas se considera que actúan hacia el final de la fermentación, ya que su sustrato es el alcohol etílico producido previamente por las levaduras. En las levaduras, aunque disminuye su diversidad y conteo, aún se encuentran en el pulque ya que intervienen durante el proceso de fermentación alcohólica y su crecimiento se ve auto inhibido por la cantidad de etanol producido (González *et al.*, 2015). En un estudio realizado en el mezcal, Páez *et al.* (2013) mencionan que en las etapas iniciales de la fermentación hay una gran diversidad de microorganismos; donde bacterias ácido lácticas y levaduras no- *Saccharomyces* tienen un lugar importante en la producción de compuestos volátiles, luego se da una sucesión de especies durante el proceso de producción y al final de la fermentación *Saccharomyces cerevisiae* se convierte en la levadura dominante.

El cambio más drástico fue el caso de las bacterias coliformes y Gram- que, de estar presentes en el aguamiel, tuvieron conteos muy bajos o nulos en las muestras de pulque. No se encontró referencia bibliográfica a recuentos de estos microorganismos en aguamiel y pulque. Se ha reportado que durante el proceso de fermentación hay una competencia de nutrientes, producción de etanol y sobre todo una disminución del



pH, lo que limita el crecimiento de microorganismos como las bacterias coliformes y, favorece el de otros como las bacterias ácido lácticas que producen bacteriocinas (Larrea *et al.*, 2012).

En el caso del mezcal (que es un destilado de la planta de agave) se menciona que interactúa una comunidad de microorganismos; donde levaduras no- *Saccharomyces* producen ácido cítrico el cual puede ser usado por diversas especies de bacterias ácido lácticas, las cuales se encuentran en todas las etapas de la fermentación y, que aportan características organolépticas; mientras que bacterias acéticas han sido observadas al final del proceso (Narváez, 2010).

En el tequila producido de forma tradicional, se sabe que existe una sucesión de las bacterias y levaduras presentes durante la fermentación de mostos no estériles (Télez *et al.*, 2012). De forma similar en el vino tradicional, pueden crecer multitud de microorganismos, pero debido al pH bajo y alto contenido de azúcares, son las bacterias ácido lácticas, bacterias acéticas y levaduras los principales microorganismos capaces de crecer en el jugo de uva (Rainieri & Pretorius, 2000). Es importante mencionar que al momento de obtener (y congelar) las muestras no se conoció que tan avanzado estaba el proceso de fermentación del pulque y, que en las levaduras aisladas no se encontró a *Saccharomyces spp.* (pero si en la secuenciación masiva) que actúa al final de la fermentación (Díaz *et al.*, 2009), por lo que es posible que correspondan a las primeras horas del proceso de fermentación, lo que podría explicar la diferencia en las poblaciones presentes.

#### **14.2 Aislamiento e identificación de levaduras**

En los agares Dextrosa Sabouraud y Extracto de malta que tienen una alta concentración de carbohidratos, un pH bajo, y a pesar de que se empleó clindamicina como antibiótico para disminuir el crecimiento bacteriano, al aislar colonias en búsqueda de levaduras se encontraron también bacilos Gram+. Estos podrían ser bacterias lácticas ya que tienen una tolerancia al alcohol (Pittet *et al.*, 2011) a pH bajos y resistencia a antibióticos; y al tener disponible una gran cantidad de glucosa del



medio pudieron fermentarla en ácido láctico (Da Silva *et al.*, 2014). Otra posibilidad es que sean bacterias acéticas, ya que son microorganismos presentes de forma natural en el aguamiel y que pueden crecer en medios con estas condiciones (Mathur y Singh, 2005; Narváez *et al.*, 2010). Esto representa un problema ya que, al contar y aislar colonias se pueden confundir las pertenecientes a levaduras con colonias de bacterias. Las fichas técnicas del agar SDA (marca BD, HiMedia Labs y Britania) mencionan que los ingredientes de la fórmula inhiben levemente el crecimiento de bacterias, pero cepas de referencia de *Lactobacillus casei*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* tienen un gran crecimiento, por lo que recomiendan las formulaciones adicionadas con cloranfenicol, gentamicina con cloranfenicol o penicilina G con estreptomina para muestras muy contaminadas.

Después de la extracción de ADN de las levaduras aisladas y la selección de muestras que presentaron un patrón de bandas RAPDs diferentes, la secuenciación mostró que varias muestras pertenecen al mismo microorganismo. El cebador M13 ha sido empleado para este uso tanto en bacterias y levaduras, e incluso se reporta que ha permitido identificar bacterias ácido lácticas cuando se conocen los patrones de cepas conocidas (Rossetti y Giraffa, 2005). Sin embargo, en este estudio realizar la técnica con un solo cebador fue insuficiente. El empleo de dos o más cebadores, como M13 y RF2 produce una mejor diferenciación en los patrones RAPDs en levaduras (Andrighetto *et al.*, 1999). Varios estudios sobre la reproducibilidad y exactitud del bandeo de la técnica de RAPD muestran que los fragmentos observados no siempre corresponden a los esperados, y que factores como el origen de la muestra y cantidad de ADN, los reactivos y condiciones del termociclador influyen en la repetibilidad (Pérez *et al.*, 1998). Una alternativa es el uso de otro tipo de marcadores moleculares más sensibles, como los perfiles RFLP que combinan una amplificación de la región ITS 1-2 con una digestión enzimática, permiten identificar especies de levaduras en base a sus patrones de bandas (Granchi *et al.*, 1999)

Finalmente, la secuenciación de la región ITS 1-2 permitió identificar a seis levaduras a nivel de especie y dos a nivel de género; mientras que ocho secuencias no pudieron ser identificadas al poder corresponder a dos especies. La levadura más abundante



fue *Kluyveromyces marxianus* que participa en la etapa primaria de fermentación alcohólica. Esta levadura también ha sido aislada de aguamiel por Cruz *et al.* (2006) quienes la reportan como un microorganismo con potencial biotecnológico al ser una gran productora de inulinasa, además de lactasa y pectinasas. Lane y Morrissey (2010) comparan a *Kluyveromyces marxianus* con otros miembros de su género, donde destacan su capacidad única de metabolizar inulina (que no está presente en otras levaduras y hongos), así como habilidad compartida con *Kluyveromyces lactis* de usar lactosa. Esta capacidad no ha sido descrita en *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura tiene además tiempos de crecimiento rápidos de  $\approx 70$  minutos, una termotolerancia para crecer hasta  $52^{\circ}\text{C}$  y una capacidad alta para secretar enzimas. Al ser un microorganismo GRAS (de sus siglas en inglés) y junto a las características mencionadas, le dan un gran potencial biotecnológico a esta levadura de ser empleada en la industria (Rajkumar *et al.*, 2019)

La mayoría de levaduras aisladas de las muestras de aguamiel y pulque que fueron identificadas por la secuenciación de la región ITS 1-2, corresponden a levaduras reportadas previamente en investigaciones sobre pulque y productos fermentados similares: aguamiel (Verdugo *et al.*, 2011; Villareal *et al.*, 2019) y mezcal (Arrizon *et al.*, 2012).

Los resultados mostraron que además de la levadura *Kluyveromyces marxianus*, en este trabajo también se identificaron las levaduras: *Candida boidinii*, *Candida sonorensis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Pichia membranifaciens* las cuales ya han sido identificadas en productos fermentados. En bebidas de agave (tequila, mezcal y pulque) se han reportado a *Candida spp.*, *Clavispora lusitaniae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens* y *Pichia spp* (Lappe *et al.*, 2008). Estas levaduras tienen como productos de fermentación: etanol, ácidos orgánicos, dextranos, vitaminas, aminoácidos, alcoholes superiores, ésteres y aldehídos. En estudios metagenómicos de aguamiel se reportó la presencia de *Kluyveomyces marxianus* y *Kazachstania zonata* durante todo el año, y la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* en muestras de verano (Villareal *et al.*, 2019).



En el estudio sobre levaduras de mezcal de Arrizon *et al.*, (2012) encuentran actividad enzimática de fructanasa en *Candida boidinii* cuando es inducida con levano y; que *Rhodotorula mucilaginosa* tiene actividad enzimática con fructanos de *Agave tequilana* (ATF). Esto se da cuando crecen ambas en medio líquido.

En bebidas fermentadas de maíz en el continente americano, Chávez *et al.*, (2020) reportan a *Wickerhamomyces anomalus*, además de *Zygosaccharomyces fermentati*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia membranifaciens*, *Clavispora lusitaniae* y varias especies de *Candida*.

La *Wickerhamiella pararugosa* (basónimo *Candida pararugosa*) y otras de sus especies han sido identificadas en bebidas destiladas por su capacidad de fermentar a altas temperaturas (Avchar *et al.*, 2019). La base de datos del NCBI, muestra que secuencia de la región ITS 1-2 de la levadura anterior coincide en un alto porcentaje con *Candida rugosa*, la cual ha sido encontrada en comunidades de levaduras en tequila (Lachance, 1995).

En el caso de *Candida sonorensis* (basónimo *Torulopsis sonorensis*), si bien es una levadura común en tejido de cactus necrótico y capaz de usar metanol (Ganter *et al.*, 2017) no se encontraron referencias sobre su aislamiento en bebidas fermentadas.

Se ha aislado *Zygosaccharomyces bailii* en aguamiel de *Agave salmiana* previo a la fermentación, *Clavispora lusitaniae* en el cultivo iniciador y *Kluyveomyces marxianus* durante todo el proceso (Verdugo *et al.*, 2011).

Sobre *Pichia cactophila*, es la levadura más común en tallos de cactus (Starmer *et al.*, 2003) y comparte un porcentaje alto con la secuencia de *Candida inconspicua* (basónimo *Torulopsis inconspicua*), que en cambio sí ha sido aislada en de bebidas tradicionales fermentadas: tepache (a base de piña) (Romero *et al.*, 2017) y de granos de cocoa (Sánchez *et al.*, 2015). Finalmente, para *Moesziomyces aphidis* y *Moesziomyces bullatus* (de forma similar, por la secuencia no se puede definir a cuál corresponde) ambas especies han sido aisladas en cidrerías (Lorenzini *et al.*, 2018).





Como se mencionó, hubo ocho secuencias que al realizar el alineamiento con la base de datos del NCBI, no se pudieron identificar, donde a pesar de que el porcentaje de alineamiento es alto, el resultado puede corresponder a dos levaduras diferentes.

La secuenciación de la región ITS 1-2 (que incluye las dos regiones hipervariables del espaciador transcrito interno y el gen de la subunidad menor ribosomal 5.8S) es uno de los principales genes para la identificación de hongos ambientales (Brown *et al.*, 2014). Sin embargo, a veces no resulta suficiente y es necesario amplificar otras regiones del genoma. En estos casos, puede resultar útil la secuenciación de la región D1/D2 de la subunidad grande (LSU) la cual ha sido utilizado para identificar la mayoría de las levaduras ascomicetos. No obstante, hay taxones muy relacionados que no muestran una suficiente divergencia para diferenciarlos y se emplea la secuenciación de la subunidad pequeña (SSU) como alternativa (Daniel y Meyer, 2003).

Se observaron dos casos de alineamientos donde las secuencias pueden corresponder a levaduras del mismo género con diferente especie (*Kazachstania sp.* con *Kazachstania gamospora* y, *Moesziomyces aphidis* con *Moesziomyces bullatus*) y, seis donde la secuencia puede pertenecer a dos levaduras de diferente género (*Pichia sp.* con *Candida ethanolica*, *Clavispora opuntiae* con *Candida intermedia*, *Wickerhamomyces bovis* con *Candida yuanshanica*, *Wickerhamiella pararugosa* con *Candida rugosa*, *Clavispora lusitaniae* con *Candida intermedia* y *Pichia cactophila* con *Candida inconspicua*). Esta gran similitud entre pares de secuencias dada por compartir la mayoría de los nucleótidos hace que también en el árbol filogenético de levaduras (Resultados 13.2.2.4), las especies queden agrupadas en los mismos clados como si fueran muestras diferentes con gran similitud pudiendo dar lugar a una mala interpretación.

La *Wickerhamiella pararugosa* y otras de sus especies necesitan ser identificadas mediante la secuenciación simultánea de la región ITS y LSU (Avchar *et al.*, 2019). En el estudio de levaduras de cactus de Starmer *et al.*, (2003) realizaron un cladograma con las secuencias de los dominios D1/D2 de la subunidad mayor de ADNr (LSU) donde se muestra la gran similitud entre *Pichia cactophila* con *Candida inconspicua* y, de *Candida ethanolica* con *Pichia deserticola* al estar cada pareja agrupada. En el



extenso trabajo de identificación de levaduras de Kurtzman y Robnett (1998) se muestra que secuenciando la parte del gen 26S que contiene a la subunidad mayor ribosomal (LSU) es otra posible forma de identificarlas molecularmente y, sugieren que cepas con sustituciones mayores al 1% en sus secuencias son especies diferentes.

### 14.3 Análisis metagenómico para bacterias en aguamiel y pulque

El análisis de secuenciación masiva mostró que las bacterias ácido lácticas son las predominantes en aguamiel y pulque de ambas estaciones. Se ha descrito la dinámica de las bacterias ácido lácticas en la fermentación de la savia de palma para la producción de vino de palma, en donde: *Weissella cibaria*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* y *Lactobacillus fermentum* se encuentran en las primeras etapas de la fermentación y su población disminuye o desaparece con el transcurso de los días. Mientras que la presencia de *Fructobacillus durionis* y *Leuconostoc mesenteroides* dominan durante todo el proceso de fermentación (Kouamé *et al.*, 2020).

La familia Leuconostocaceae está muy presente en aguamiel, identificándose en las secuencias a la especie *Leuconostoc spp.* Esta familia incluye cuatro géneros de bacterias ácido lácticas (*Fructobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella*) que son heterofermentativas, y crecen mejor en medios que contienen glucosa con fructosa; produciendo lactato y manitol respectivamente (Lonvaud, 2014). Luego su porcentaje disminuye para dar paso a la familia Lactobacillaceae en el pulque, identificando a *Lactobacillus spp.* Solo en el grupo de muestras se verano se detectó la familia Streptococcaceae, identificándose a *Lactococcus spp.*, estas tres bacterias lácticas son reportadas habitualmente en aguamiel y pulque (Cervantes *et al.*, 2008).

El cambio en el porcentaje de secuencias, parece indicar que la fermentación la inician ciertas especies que van disminuyendo y dando paso a que sea continuada por otras. En la revisión bibliográfica de Escalante *et al.* (2016) se menciona que en estudios realizados en pulque se han encontrado las especies *Leuconostoc mesenteroides*, *L.*



*kimchi*, *L. citreum* y *Lactococcus lactis* en aguamiel y, *Lactobacillus acidophilus* y *Leuconostoc mesenteroides*.

En la familia Sphingomonadaceae (que no se encontró en aguamiel de invierno y tuvo una presencia muy limitada en pulque de esa estación) se identificó a *Zymomonas mobilis* que es una bacteria importante en fermentación por su alta capacidad de producir alcohol etílico, en la misma revisión se menciona como un microorganismo encontrado en el pulque (Escalante *et al.*, 2016).

En el estudio metagenómico mediante la técnica de PCR-DGGE de Villareal *et al.* (2019) con aguamiel de las cuatro estaciones del año, que tienen constante una población bacteriana de *Lactococcus sp.*, *Pediococcus sp.* y *Trichococcus sp.* En invierno solo encuentran la presencia adicional de *Leuconostoc pseudomesenteroides*, mientras que en verano observan una mayor diversidad de especies diferentes con: *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc fallax*, *Pediococcus sp.* y *Enterococcus casseliflavus*.

#### **14.4 Análisis metagenómico para levaduras en aguamiel y pulque**

En los resultados de secuenciación masiva de la región ITS 2, se encontró que la mayor diversidad de levaduras se encuentra en el aguamiel. Cuando se hace el análisis de comunidades bacteriana se encuentra que la mayor diversidad se encuentra en el pulque. Sin embargo, para el grupo de aguamiel invierno, los índices de diversidad muestran un comportamiento distinto (ya te que toman en cuenta además de las especies diferentes, el número de secuencias leídas): tiene el mayor número de taxones distintos pero índices de diversidad bajos. Esto se debe a que tiene un número de secuencias totales es menor, y al cambiar la proporción, baja el valor del índice y lo acerca a los grupos de pulque que tienen menor diversidad. Esto se puede corroborar con la gráfica de taxonomía, donde vemos que las secuencias 'Sin clasificar' para aguamiel invierno representan el 79.4% y en aguamiel de verano son el 50.26%, dejando la otra mitad de lecturas a especies de la familia Saccharomycetaceae.



Esta diferencia en las secuencias sin clasificar, hace que al comparar los grupos de aguamiel invierno con el de aguamiel verano tengan un índice de diversidad diferente a pesar de tener un número de taxones similares.

Las secuencias de levaduras sin clasificar son muchas en aguamiel de invierno y verano, se observa un porcentaje pequeño de la familia Saccharomycodaceae en aguamiel y el porcentaje restante es completado por la familia Saccharomycetaceae, la cual en pulque pasa a ocupar casi la totalidad de las secuencias detectadas.

Los resultados de secuenciación masiva se pueden corroborar con la identificación de las levaduras aisladas en este trabajo. Se identificaron las familias: Saccharomycetaceae, Saccharomycodaceae, Davidiellaceae, Dothioraceae, Filobasidiaceae, Pichiaceae, Sporidiobolaceae; de las cuales: Saccharomycetaceae, Pichiaceae, Sporidiobolaceae y Ustilaginaceae se lograron aislar e identificar.

Las principales dos levaduras en el aguamiel y pulque fueron *Saccharomyces cerevisiae*, y *Kluyveromyces marxianus*, que pertenecen a la familia Saccharomycetaceae y comparten como principal característica su capacidad de producir alcohol etílico. Estas mismas levaduras se han reportado en aguamiel en la investigación de Cruz *et al.* (2006) y Verdugo *et al.* (2011), mientras que los resultados de metagenoma de Villareal *et al.* (2019), *Kluyveromyces marxianus* se encuentran en las cuatro estaciones, mientras que *Kazachstania zonata* solo se observó en primavera y *Saccharomyces cerevisiae* en invierno.

Ambas levaduras fueron identificadas mediante secuenciación masiva, pero en los aislamientos solo se encontró a *Kluyveromyces marxianus*. Se sabe que *Kluyveromyces marxianus* forma parte del grupo de levaduras no-*Saccharomyces* las cuales actúan primero en las fermentaciones alcohólicas estando su desarrollo limitado por la concentración de etanol, para dar paso a levaduras con mayor tolerancia como lo es *Saccharomyces cerevisiae* (Díaz *et al.*, 2009). Ya que el medio de cultivo es apropiado para el crecimiento de las dos especies, una explicación es que las muestras de pulque podrían ser frescas (no tienen el tiempo de fermentación suficiente para que se de esta sucesión de microorganismos) y de esta forma, aunque se encuentren ambas especies en las muestras predominaría *Kluyveromyces marxianus*,



lo que coincide con que fue la levadura de las muestras aisladas que se encontró en más ocasiones.

Mientras la microbiología tradicional permite el aislamiento axénico y cultivo de bacterias y levaduras, presenta el inconveniente de requerir mucho tiempo para su identificación y la desventaja de que la mayoría de los microorganismos presentes en la naturaleza no son cultivables en los medios habituales, al requerir cantidades o nutrientes muy específicos o bien interacciones con otros microorganismos (Suárez, 2017). En cambio, la secuenciación masiva presenta varias ventajas: es independiente del cultivo, permite la lectura simultánea de miles de secuencias de microorganismos incluyendo los poco representados y permitiendo llegar a una identificación a nivel de género o incluso de especie (Hernández *et al.*, 2019).

#### 14.5 Índices de diversidad

Los resultados que obtuvimos de secuenciación masiva están separados por el tipo de microorganismos y muestra. Así para bacterias, los promedios de los índices de diversidad fueron (en orden de Chao 1, Simpson y Shannon): 8.33, 0.03 y 0.10 en aguamiel invierno, 13.67, 0.65 y 1.28 en aguamiel verano; en pulque invierno son 16.67, 0.59 y 1.23, y para pulque verano 19.67, 0.78 y 1.84. En el caso de levaduras encontramos (siguiendo los índices el mismo orden): 18, 0.42 y 0.92 en aguamiel invierno, en aguamiel verano 13.67, 0.66 y 1.58; para el pulque invierno 7.33, 0.38 y 0.71 y, finalmente 6.67, 0.38 y 0.69 en el pulque verano.

En los índices de diversidad Enríquez *et al.* (2017) en aguamiel invierno obtuvieron: 21.09, 0.09 y 2.1 en Chao 1, Simpson y Shannon respectivamente y; en verano 24.75, 0.09 y 2.01. En el estudio de Villareal *et al.* (2019) la diversidad en aguamiel para la estación de invierno fue: 15.08, 0.08 y 1.93 para los índices de Chao 1, Simpson y Shannon y; en verano: 15.08, 0.04 y 2.43. En nuestros resultados para bacterias, es notorio que la diversidad en el índice Chao 1 es mayor para la estación verano en ambos productos (siendo superior en aguamiel); Enríquez *et al.* (2017) encuentran también mayor diversidad de especies en verano, solo que ellos manejan los datos de



bacterias, hongos y levaduras en un mismo valor. Villareal *et al.* (2019) tratan manejan los datos de la misma forma, pero no encuentran diferencia entre las dos estaciones. En los índices Simpson y Shannon, tenemos mayor diversidad en verano, en cambio para Enríquez *et al.* (2017) no hay diferencia entre estaciones y en los resultados de Villareal *et al.* (2019) el aumento es ligero en verano.

El aumento de diversidad (dado por un número mayor de especies raras) en la estación de verano en el aguamiel, es atribuido por Villareal *et al.* (2019) a la exposición de las plantas a una mayor cantidad de luz solar y con ello una temperatura que facilita el crecimiento de diferentes microorganismos. En la investigación que realizamos se encontró que, en el aguamiel la diversidad es mayor para bacterias y disminuye con la fermentación, siendo el caso contrario de las levaduras cuya mayor diversidad está presente en el pulque. Este manejo separado de los datos da un resultado importante pero no permite bien una comparación con los pocos estudios de diversidad en aguamiel, además de que no se encontró una referencia que lo haga en pulque.

#### **14.6 Determinaciones químicas**

Es importante conocer las características químicas del aguamiel y pulque de los principales estados productores para determinar si existen diferencias derivadas del clima o la variedad de la planta (Espíndola *et al.* 2018). Aparte de la falta de más investigaciones, estas suelen enfocarse solo a aguamiel o pulque, y a determinar características microbiológicas dejando de lado las características químicas, por lo que no hay estudios comparativos que asocien los productos, con las estaciones del año y su región.

No existe una Norma Oficial Mexicana (NOM) que determine las especificaciones microbiológicas y químicas para la producción del aguamiel y pulque, pero sí dos Normas Mexicanas (NMX NMX-V-022-1972 y NMX-V-037-1972) de aplicación recomendada que dan un rango de parámetros (Anexos 17.7) a las características químicas de estos productos, que es útil para comparar los resultados obtenidos al igual que los reportados en otras investigaciones.



En el caso de las NMX aparte de ser información no actualizada hace casi cincuenta años, los métodos de prueba son diferentes, no aplican a ambos productos y además no se hace mención específica a la variedad de los agaves, región o clima para los cuales aplica dichos valores. En esta investigación, se prefirió con base a la bibliografía el uso de técnicas basadas en espectrofotometría: Bradford (proteínas), Dubois (azúcares reductores) y Miller (azúcares totales).

El valor de pH 5.57 para invierno y 4.98 verano encontrado en aguamiel (Tabla 13) es más de una unidad menor que el recomendado por norma (6.6-7.5), Enríquez *et al.* (2017) reportan un pH de 6.40/5.59 (invierno/verano respectivamente), pero similar a lo reportado por Tapia, O. (2016) en *Agave salmiana* con 4.77 sin especificar la estación. En pulque se encontró un pH de 4.18/4.22 dentro del límite superior de 3.7 a 4.2 de la norma y similar al promedio de 4.04 reportado por Álvarez, G., Figueredo, C., y Casas, A. (2020).

En la acidez total (Tabla 14) se obtuvo 0.92 g/L en invierno y 2.16 g/L en verano de ácido láctico en aguamiel cercano a los 0.9-1.03 g/L de norma. En el pulque el valor obtenido fue de 5.28 g/L en invierno y 4.68 g/L en verano en muestras de pulque, valor dentro de los 4.0-7.5 g/L de norma. Solo en el caso de la determinación de pH y acidez total, se empleó la metodología correspondiente a las NMX. Los agaves y plantas suculentas realizan un tipo diferente de fotosíntesis llamado metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), en el que almacenan el dióxido de carbono durante la noche como ácido málico y es liberado en la mañana siguiente, el cual está relacionado directamente con un aumento de la acidez que depende de la radiación fotosintética, lo que explica porque en verano los valores de pH y acidez total son mayores (Geytan y Melgarejo, 2005).

La proteína en ambos productos se encontraron valores muy bajos (Tabla 15) respecto a los reportados: se encontró 0.15 g/L en invierno y 0.16 g/L en la estación de verano en aguamiel; en lugar de los 3.0 g/L de la norma y los 1.75 g/L de Tapia, O (2016), pero más de acorde a los obtenidos por Enríquez *et al.* (2017) con 0.65/0.32 g/L (invierno/verano) en *Agave salmiana*. Para pulque se obtuvo 0.05 g/L en invierno y 0.07 g/L en verano sin tener un valor de referencia de norma; y los 3.1 g/L de León



*et al* (2012); que menciona es pulque en la zona metropolitana del país, pero sin especificar la planta de origen. El contenido de sólidos solubles totales está relacionado con la cantidad de proteínas por la transformación de CO<sub>2</sub> en azúcares asociado a temperaturas bajas durante las noches de meses frescos (Pimienta, Zañudo y García, 2006).

En azúcares totales (Tabla 16) se obtuvo 177.04 g/L en invierno y 169.97 g/L en verano para aguamiel contra los 80-120 g/L de la norma; mientras que Enríquez *et al.* (2017) determinaron 219.09/158.63 g/L (invierno/verano) y, los 30.26 g/L de Tapia, O. (2016). En el pulque se encontró 18.76 g/L en invierno y 55.00 g/L en verano contra los 1.0-8.0 g/L de la norma y los 35.0 g/L de León *et al.* (2012).

Para la determinación de azúcares reductores (Tabla 17) se tienen 2.59 g/L en invierno y 33.87 g/L en verano en aguamiel, siendo el primero mucho menor a los 20-30 g/L dados por la norma pero más cercano a los 4.48 g/L reportados por Tapia, O. (2016); en cambio Enríquez *et al.* (2017) tienen valores similares a la norma con 23.10 g/L y 25.78 g/L de azúcares reductores en aguamiel. En el pulque se obtuvo 2.85 g/L en invierno y 11.36 g/L en verano sin referencia con la norma u otra investigación. Estas diferencias se pueden relacionar a que, durante el ciclo de vida del *Agave tequilana* se dan cambios en las cantidades de azúcares totales, azúcares reductores y fructosa por los cambios en el grado de polimerización de los fructanos (González *et al.*, 2012).

Comparando de forma global los resultados de determinaciones químicas se observa que tras la fermentación siempre hay una disminución de los nutrientes en especial lo que son los azúcares totales, lo que se esperaría tras ser usados durante el crecimiento de los microorganismos. Para mantener la osmorregulación la planta realiza una hidrólisis de los fructanos, lo que disminuye el grado de polimerización, pero esta hidrólisis también está relacionada con las enzimas producidas por los microorganismos presentes en el aguamiel (Enríquez *et al.*, 2017). Al observar las determinaciones entre estaciones, el único valor que no cambia después de la fermentación, es el de azúcares reductores en invierno que se mantiene bajo en ambos productos. García *et al.* (2013) mencionan que los carbohidratos reductores totales





disminuyen en época de lluvias, ya que se diluyen por el aumento de la succulenta (tejido de reserva de agua en las hojas) del agave y, de forma inversa la pérdida de agua de épocas secas concentra los componentes químicos de la planta.

Los fructanos son utilizados para el crecimiento de la planta, como fuente de reserva frente a condiciones adversas y, su cantidad está asociada a la edad de la planta: aumenta con su crecimiento hasta la madurez y, empiezan a disminuir con la senescencia (Mellado y López, 2012). Es necesario considerar también la afección del clima como explicación del bajo valor de azúcares reductores en las muestras de invierno, ya que los registros indican que en el mes de Diciembre se tienen la menor cantidad de radiación solar, lluvia y temperaturas más bajas del año. Durante el invierno las temperaturas bajas provocan que el metabolismo de la planta disminuye (Enríquez, J., 2008) por lo que la producción de carbohidratos se podría dirigir hacia la formación de reservas como fructanos (cuya presencia y uso por los microorganismos sí se refleja en la disminución de azúcares totales) y con menor producción de azúcares sencillos.

#### **14.7 Correlación de resultados**

El análisis de los dos primeros componentes principales muestra que la variable que tiene la mayor influencia, son los azúcares totales, seguido del número de microorganismos (cuyos grupos varía según el producto); explicando entre estos dos componentes el 99.7% de la variabilidad de los datos para el aguamiel y un 88.24% del pulque. Mientras que en las gráficas de ambos se observa que hay un agrupamiento y en varios casos solapamiento de los valores para las determinaciones químicas restantes (pH, acidez, proteínas y azúcares reductores), el conteo de microorganismos (que no forman parte del componente principal de ese producto), la diversidad de bacterias y la diversidad de levaduras.

En el aguamiel, los conteos de microorganismos que forman parte del componente principal (porque los datos tienen más variabilidad) son: bacterias Gram-, hongos y levaduras 1 y, hongos y levaduras 2; en las etapas iniciales de la fermentación actúan



levaduras no- *Saccharomyces* que son capaces de emplear los fructanos del Agave (Núñez *et al.*, 2016). Sin embargo, la correlación de Spearman no muestra una relación significativa de los azúcares totales con estas variables. Al revisar los datos de secuenciación masiva del aguamiel, se observa una diferencia entre las dos estaciones: en invierno solo está presente la familia Lactobacillaceae (99.9%); mientras que en verano su porcentaje baja y se nota la presencia de otras familias como la Sphingomonadaceae con un 15.67%, en la que se identifica la secuencia de la bacteria Gram- *Zymomonas mobilis* que participa en la fermentación alcohólica. Los datos de hongos y levaduras, en aguamiel invierno el 18.7% de las secuencias pertenecen a la familia Saccharomycetaceae y el resto a secuencias sin clasificar; mientras que en verano el porcentaje de esta familia sube 49.53% y disminuye el de las secuencias sin identificar.

En el pulque se da un cambio en los microorganismos, ya que son los conteos de bacterias lácticas y bacterias mesófilas los que dan parte de la variabilidad. La correlación de Spearman muestra una relación significativa entre los azúcares totales con la variable de bacterias lácticas; cuya principal actividad metabólica es la degradación de carbohidratos como fuente de energía para su crecimiento y supervivencia (Hayek e Ibrahim, 2013). Las secuencias identificadas de bacterias en secuenciación masiva, muestran que en pulque de invierno está dominado por la familia Lactobacillaceae (48.17%) y Leuconostocaceae (48.63%); que en verano disminuyen a valores de 32.2% y 32.47% respectivamente, y aparece la familia Sphingomonadaceae (19.8%), que incluye géneros de bacterias Gram- que crecen en condiciones ambientales.

Existen trabajos donde se determinan las características microbiológicas y/o químicas: aislamiento de bacterias en pulque (Escalante *et al.*, 2004, Escalante *et al.*, 2008 y León *et al.*, 2012), levaduras de aguamiel y pulque (Estrada *et al.*, 2001), bacterias, levaduras y etanol (Cervantes y Pedroza, 2008), características químicas del aguamiel (Ortiz *et al.*, 2008) o metagenoma del aguamiel (Enríquez *et al.*, 2017; Villareal *et al.*, 2019). No se encontró bibliografía respecto a investigaciones que traten de integrar la determinación de microorganismos y características químicas tanto de



aguamiel y pulque en distintas épocas del año y correlacionarlas, por lo que esta investigación aporta innovación al tema.



## XV. CONCLUSIONES

- 1) En aguamiel existe una mayor diversidad de levaduras con respecto al pulque. Siendo en el pulque la familia Saccharomycetaceae la única representante, y a la cual pertenecen las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces marxianus*; que fue la segunda más abundante en los medios de cultivo.
  
- 2) La diversidad bacteriana es mayor después de la fermentación, esto es en el pulque, independientemente de la estación del año. Las familias Leuconostocaceae, Lactobacillaceae y Streptococcaceae son las predominantes, incluyen bacterias ácido lácticas que confieren características organolépticas de sabor, olor, acidez y preservación a los alimentos fermentados.
  
- 3) Las determinaciones químicas de las muestras de aguamiel y pulque muestran diferencias por la fermentación, no por el cambio estacional; a excepción de los azúcares reductores, los cuales aumentan significativamente en verano. Esto se debe a que en durante esta estación, la planta de agave tiene mejores condiciones para su desarrollo y produce azúcares sencillos; en cambio en el clima frío formaría carbohidratos de reserva.
  
- 4) Las características químicas, específicamente el valor de azucares totales y los cambios en el recuento de microorganismos; son los que aportan mayor variación en el análisis de componentes principales en aguamiel y pulque, sin importar la estación del año.



## XVI. PERSPECTIVAS

Para realizar nuevos conteos, aislamientos y conservación de cepas de bacterias acéticas y levaduras, se recomienda la adición de antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas. Así como probar con otros agares selectivos, como podría ser el agar comercial Dextrosa Sabouraud con gentamicina y cloranfenicol para levaduras.

Inocular en más medios de cultivos para buscar otros microorganismos de interés como son *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* ya que ambos son productores de alcohol etílico y, se encontraron en los resultados de secuenciación masiva.

Se recomienda para otros estudios de selección de microorganismos, utilizar más de un cebador tipo RAPD como podría ser la combinación de M13 y RF2, para poder definir con mayor seguridad las posibles diferentes muestras previo a la secuenciación.

A las ocho levaduras aisladas que no pudieron ser identificadas mediante la región ITS 1-2, se puede secuenciar el gen de la subunidad mayor ribosomal (LSU) y, de esta forma con la información de ambas secuencias obtener una correcta identificación molecular.

Como investigación derivada, se pueden realizar estudios de producción de enzimas y metabolitos secundarios a las levaduras aisladas e identificadas, en especial a *Kluyveromyces marxianus* para revisar un potencial uso biotecnológico.

Se pueden realizar más pruebas químicas para caracterizar las muestras de aguamiel y pulque como lo son determinación de alcohol etílico y ácidos orgánicos. De igual forma hay pruebas más específicas como los aminoácidos libres o determinar los tipos de carbohidratos presentes como los fructanos.



## XVII. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, G., Figueredo, C., & Casas, A. (2020). Physical, chemical, and microbiological characteristics of pulque: management of a fermented beverage in Michoacán, México. *Foods*, 9 (3), 361-378. DOI: 10.3390/foods9030361
- Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G. & Lombardi, A. (2000). Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters in Applied Microbiology* 2000, 30, 5–9.
- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A. y Monsan, P. (2010). Purification and substrate specificities of a fructanase from *Kluyveromyces marxianus* isolated from the fermentation process of Mezcal. *Bioresource Technology*, 102, 3298–3299.
- Arrizon, J., Morel, S., Gschaedler, A. y Monsan, P. (2012). Fructanase and fructosyltransferase activity of non-Saccharomyces yeast isolated from fermenting musts of Mezcal. *Bioresource Technology*, 110, 560-565. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.01.112
- Avchar, R., Groenewald, M. & Baghela. (2019). *Wickerhamiella shivajii* sp. nov., a thermotolerant yeast isolated from distillery effluent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69, 3262–3267. DOI: 10.1099/ijsem.0.003616
- Ávila, R., Rivas, B., Hernández, R. & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias*. 12 (4), 129-135.
- Bartowsky, E. y Henschke, P. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine- a review. *International Journal of Food Microbiology*, 125 (1), 60-70. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.016
- Bautista, J., García, L., Salcedo, R. & Parra, L. (2001). Azúcares en agaves (*Agave tequilana* Weber) cultivados en el estado de Guanajuato. *Acta Universitaria*, 11 (1), 3.
- Bautista, N. y Arias, G. (2008). Estudio bromatológico de aguamiel de *Agave americana* L. (maguey). *Ciencia e investigación*, 11 (2), 1-6.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M., Pandiella, S., Cantero, D. y Webb, C. (2003). Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* 36, 527–543. DOI: 10.1016/S0963-9969(03)00009-7



- Bolyen, E., Rideout, J., Dillon, M. et al (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37, 852-857. DOI: 10.1038/s41587-019-0209-9
- Botes, A., Todorov, S., Mollendorff, J. Botha, A. y Dicks, L. (2006). Identification of lactic acid bacteria and yeast from boza. *Process Biochemistry*, 42, 267–270. DOI: 10.1016/j.procbio.2006.07.015
- Bou, G., Fernández, A., García, C., Sáenz, J. y Valdez, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29 (8), 601-608. DOI: 10.1016/j.eimc.2011.03.012
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- Brown, S., Rigdon, A. y Jumpponen, A. (2014). Analyses of ITS and LSU gene regions provide congruent results on fungal community responses. *Fungal Ecology*, 2014, 1-4. DOI: 10.1016/j.funeco.2014.02.002
- Buszewski, B., Rogowska, A., Pomastowski, P., Zloch, M. y Railean, V. (2017). Identification of microorganisms by modern analytical techniques. *Journal of AOAC International*, 100 (6), 1607-1623. DOI: 10.5740/jaoacint.17-0207
- Campbell, G. (1994). Fermented foods- a world perspective. *Food Research International*, 27, 253-257. DOI: 10.1016/0963-9969(94)90093-0
- Caputi, Jr. A., Ueda, M., & Brown, T. (1968). Spectrophotometric determination of ethanol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 19 (3), 160-165.
- Centro de Ciencias Atmosféricas, Universidad de Guanajuato. Climatología de Dolores Hidalgo, Gto. Consultado el 10 de Junio del 2019 <http://www.ccaug.ugto.mx/Reportes/hdolores.pdf>
- Cervantes-Contreras, M & Pedroza-Rodríguez, A. (2008). Caracterización microbiológica del pulque y cuantificación de su contenido de etanol mediante espectroscopia Raman. *Superficies y vacío*, 20 (3), 1-5.



- Chacón, K., Torres, J., Giles, M., Escalante, A. y Gibbons, J. (2020). Genomic profiling of bacterial and fungal communities and their predictive functionality during pulque fermentation by whole-genome shotgun sequencing. *Scientific Reports*, 10, 1-13. DOI: 10.1038/s41598-020-71864-4
- Correa, M., Robertson, I., Cabrera, O., Cabrera, R. y Evershed, R. (2014). Pulque production from fermented agave sap as a dietary supplement in Prehispanic Mesoamerica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (39), 14223-14228. DOI: 10.1073/pnas.1408339111
- Cota, F. (2009) Manual técnico. Agave azul tequilana su manejo. GROPE. México. 10.
- Cruz, A., Olvera, J, García, M. y Gómez, L. (2006). Inulinase-hyperproducing strains of *Kluyveromyces sp.* isolated from aguamiel (*Agave* sap) and pulque. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22, 115.
- Da Silva, S., Vitolo, M., Domínguez, J. & Pinheiro, R. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocins producer among lactic acid bacteria. (2014). *Food Research International*, 64, 527-536. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.07.041
- Daniel, H. y Meyer, W. (2003). Evaluation of ribosomal RNA and actin gene sequences for the identification of ascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 86 (1–2), 61-78. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00248-4
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28 (3), 350-356. DOI: 10.1021/ac60111a017
- Enríquez, J. (2008). La propagación y crecimiento de Agaves. Fundación Produce Oaxaca, A.C. *Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca*, 46.
- Enríquez, M., Veana, F., Aguilar, C., De la Garza, I., López, M., Rutiaga, O., Morlett, J. & Rodríguez, R. (2017). Microbial diversity and biochemical profile of aguamiel collected from *Agave salmiana* and *A. atrovirens* during different seasons of year. *Food Science Biotechnology*, 26(4), 1003–1011. DOI: 10.1007/s10068-017-0141-z
- Escalante, A., Giles, M., Hernández, G., Córdova, M., López, A., Gosset, G. y Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional





Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 126-127.

- Escalante, A., López, D., Velázquez, J., Giles, M., Bolívar, F. y López, A. (2016). Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage: historical, microbiological, and technical aspects. *Frontiers in microbiology*, 7, 1026. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01026
- Escalante, A., Rodríguez, M., Martínez, R., López, A., Bolívar, F. y Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, 235, 273–279. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.04.045
- Espíndola, V., Trejo, M., Lira, A. y Pascual, S. (2018). Caracterización de aguamiel y jarabe de agave originario del Estado de México, Hidalgo y Tlaxcala. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3, 522-528.
- Estrada, A., Cruz, A., Lappe, P., Ulluo, M., García, M. & Gómez, L. (2001). Isolation and identification of killer yeast from *Agave* sap (aguamiel) and pulque. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17, 557-560.
- Ganter, P., Morais, P. y Rosa, C. (2017). Yeasts in Cacti and Tropical Fruit. *Yeast in Natural Ecosystems: Diversity*, 225-264. DOI: 10.1007/978-3-319-62683-3\_8
- García, C., Enríquez, J., Velasco, V., Ruíz, J., Virginia, G., Ángeles, C., & Aquino, D. (2013). Nutrientes y carbohidratos en plantas de *Agave angustifolia* Haw. y *Agave karwinskii* Zucc. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6, 1161-1173.
- García, Marta. (2017). Estudio de la biodiversidad bacteriana asociada a nódulos de *Lotus corniculatus* y análisis de los procesos de infección, nodulación y producción vegetal inducidos por cepas del género. *Universidad de Salamanca*, tesis doctoral, 59-60.
- Geydan, T. y Melgarejo, L. (2005). Metabolismo ácido de las crasuláceas. *Acta Biológica Colombiana*, 10 (2), 3-15.
- Godoy, A., Herrera, T. & Ulloa, M. (2003). Más allá del pulque y el tepache, las bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México. *Universidad Nacional Autónoma de México*. México. 42.



- Gómez, G. y Batista, C. (2006). Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales*, 27 (3), 17-24.
- González, I., Estarrón, M. y Díaz, D. (2015). Fermentative capabilities and volatile compounds produced by *Kloeckera/Hanseniaspora* and *Saccharomyces* yeast strains in pure and mixed cultures during *Agave tequilana* juice fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108, 525–536. DOI: 10.1007/s10482-015-0506-3
- González, L., Jaramillo, M., Bernardino, A. y Mora, R. (2012). Influence of the harvest age on fructan content and fructosyltransferase activity in *Agave atrovirens* karw pine. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 4 (5), 110-119. DOI: 10.5897/IJPPB12.012
- González, R., Azaola, A., Mayorga, L., Reyes, A., Shah, N. y Espinoza, Y. (2015) Isolation, identification and partial characterization of a *Lactobacillus casei* strain with bile salt hydrolase activity from pulque. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7, 242–248. DOI: 10.1007/s12602-015-9202-x
- Granchi, L., Bosco, M., Messini, A. y Vincenzini, M. (1999). Rapid detection and quantification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR–RFLP analysis of the rDNA ITS region. *Journal of Applied Microbiology*, 87 (6), 949-956. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00600.x
- Guindon S., Dufayard J., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W. & Gascuel O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59 (3), 307-21. DOI:10.1093/sysbio/syq01
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52 (5), 696-704.
- Hammer, Ø, Harper, D. y Ryan, P. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4 (1), 1-9.



- Hayek, S. e Ibrahim, S. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and nutrition sciences*, 4 (11A), 73-78. DOI: 10.4236/fns.2013.411A010
- Heras, J, Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C. y Zarazaga, M. (2016). A survey of tools for analysing DNA fingerprints. *Briefings in Bioinformatics*, 17 (6), 903-911. DOI: 10.1093/bib/bbv016
- Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozaon, C., Torres, C. & Zarazaga, M. (2015). GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics volume*, 16, 1-8. DOI: 10.1186/s12859-015-0703-0
- Hernández, M., Quijada, N., Rodríguez, D. y Eiros, J. (2019). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología.*, 52 (2), 150-161. DOI: 10.1016/j.ram.2019.06.003
- Ivey, M. y Phister, T. (2011). Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38, 1619–1634. DOI: 10.1007/s10295-011-1020-x
- Kim, B., Shin, J., Guevara, R., Lee, H., Kim, D., Seol, K., Lee, J., Kim, H. e Isaacson, R. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 27 (12), 2089-2093. DOI: 10.4014/jmb.1709.09027
- Kim, D, Chon, J., Kim, H., & Seo, Kun, H. (2019). Development of a novel selective medium for the isolation and enumeration of acetic acid bacteria from various foods. *Food Control*, 106, 1-5. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106717
- Kishino, H. & Hasegawa, M. (2001). Maximum Likelihood. *Encyclopedia of Genetics*. Academic Press. 1157-1160 DOI: 10.1006/rwgn.2001.0803
- Kouamé, H., Aké, M., Assohoun, N., Djé, M. y Djéni, N. (2020). Dynamics and species diversity of lactic acid bacteria involved in the spontaneous fermentation of various palm tree saps during palm wine tapping in Côte d'Ivoire. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36 (64), 1-12. DOI: 10.1007/s11274-020-02832-3



- Kuhn, R., Böllmann, J., Krahl, K., Bryant, I. y Martienssen, M. (2017). Comparison of ten different DNA extraction procedures with respect to their suitability for environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 143, 78-86. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.10.007
- Kumar. S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549. DOI:10.1093/molbev/msy096
- Kurtzman, C. & Robnett, C. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331-371. DOI: 10.1023/a:1001761008817
- Lachance, Marc-André. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68, 151-160.
- Lane, M. y Morrissey, J. (2010). *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24, 17-26. DOI: 10.1016/j.fbr.2010.01.001
- Lappe Oliveras, P., Moreno Terrazas, R., Arrizón Gaviño, J., Herrera Suárez, T., García Mendoza, A. y Gschaedler Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled *Agave* beverages. *FEMS Yeast Research*, 8, 1037–1038
- Larrea, J., Rojas, M., Romeu, B., Rojas, N. & Heydrich, M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44 (3), 24-34.
- Lathar, P., Sharma, A. & Thakur, I. (2010). Isolation and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of wild yeast species from 17 different fruits. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 1 (8), 146-151.
- León, D., Calderón, B., Martínez, A., Sánchez, E., Zulatto, A., Camacho, I., Arredondo. A., & Salgado, R. (2013). Formulación y optimización de un medio de cultivo económico para *Lactobacillus* con potencial probiótico aislado del pulque. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*, 12, 133-144.
- Lonvaud, A. (2014). Leuconostocaceae Family. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Academic Press, 455-465. DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00185-3
- Lorenzini, M., Simonato, B. & Zapparoli, G. (2018). Yeast species diversity in apple juice for cider production evidenced by culture-based method. *Folia Microbiologica* 63, 677–684. DOI: 10.1007/s12223-018-0609-0



- Mamlouk, D., Gullo, M. (2013). Acetic Acid Bacteria: Physiology and Carbon Sources Oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53, 377–384 (2013). DOI: 10.1007/s12088-013-0414-z
- Mathur, S. y Sing, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105 (3), 281-295. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008
- Mellado, E. & López, M. (2012). Fructan metabolism in *A. tequilana* Weber blue variety along its developmental cycle in the field. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 60 (47), 11704–11713. DOI: 10.1021/jf303332n
- Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicyc acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31 (3), 426-428.
- Moreno, C. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad*. Zaragoza, España, Editorial CYTED.
- Muñiz, D., Rodríguez, R., Rodríguez, R., Contreras, J. y Aguilar, C. (2013). Producción artesanal del aguamiel: una bebida tradicional mexicana. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 5 (19), 12-19. M&T-Manuales y Tesis SEA, 1. 84.
- Narváez, J., Rojas, R., Rodríguez, I., Larralde, C. (2010). Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with Mezcal fermentation. *Current Microbiology*, 61, 444–450. DOI: 10.1007/s00284-010-9636-z
- NCBI Resource Coordinators. (2013). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 41, 8-20. DOI:10.1093/nar/gks1189
- Norma Mexicana. (1972). NMX-V-022-1972. Aguamiel. Dirección general de normas. 1-4.
- Norma Mexicana. (1972). NMX-V-037-1972. Pulque manejado a granel. Dirección general de normas. 1-7.
- Norma oficial mexicana. (1994). NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Secretaria de salud.



- Norma oficial mexicana. (1994). NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Secretaria de salud.
- Norma oficial mexicana. (1994). NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos totales en placa. Secretaria de salud.
- Núñez, M., Páez, J., Rutiaga, O., Rutiaga, O., González, S. y Soto, N. (2016). Performance of mixtures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts during alcoholic fermentation of *Agave duranguensis* juice. *Food microbiology*, *54*, 91-97. DOI: 10.1016/j.fm.2015.10.011
- Ortiz, R., Pourcelly, G., Doco, T., Williams, P., Dornier, M. & Belleville, M. (2008). Analysis of the main components of the aguamiel produced by the maguey-pulquero (*Agave mapisaga*) throughout the harvest period. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 3682–3687. DOI: 10.1021/jf072767h
- Othman, M., Ariff, A., Ríos, L. y Halim, M. (2017). Extractive fermentation of lactic acid in lactic acid bacteria cultivation: a review. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1-7. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02285
- Páez, J., Arias, A., Rutiaga, O., Barrio, E. y Soto, N. (2013). Yeasts isolated from the alcoholic fermentation of *Agave duranguensis* during mezcal production. *Food Biotechnology*, *27*, 342–356. DOI: 10.1080/08905436.2013.840788
- Pérez, T., Albornoz, J. & Domínguez, A. (1998). An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, *7*, 1347-1357. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00484.x
- Pilippis, F., Parente, E y Ercolini, D. (2016). Metagenomics insights into food fermentations. *Microbial Biotechnology*, *10* (1), 91-102. DOI: 10.1111/1751-7915.12421
- Pimienta, E., Zañudo, H. y García, J. (2006). Fotosíntesis estacional en plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *Agrociencia*, *40* (6), 699-709.
- Pittet, V., Morrow, K. y Ziola, B. (2017). Ethanol tolerance of lactic acid bacteria, including relevance of the exopolysaccharide gene *gtf*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *69* (1), 57-61. DOI: 10.1094/ASBCJ-2011-0124-01



- Quintero, B., Bernáldez, A., Dublán, O., Barrera, D. y Favila, H. (2011). Consumo y conocimiento actual de una bebida fermentada tradicional en Ixtapan del Oro, México: la sambumbia. *Alteridades*, 22 (44), 115-129.
- Rainieri, S. & Pretorius, I. (2000). Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology*, 50, 15-31.
- Rajkumar, A., Varela, J., Juergens, H., Daran, J. y Morrissey, J. (2019). Biological parts for *Kluyveromyces marxianus* synthetic biology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7 (97), 1-15. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00097
- Rocha, C., Espinal, A., Martínez, S., Caballero, J., Alacarez, L. y Cruz, A. (2020). Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a biocultural resource of Mexico. *Microbiological Research*. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126593
- Romero, H., Hernández, H. & Dávila, G. (2017). Traditional fermented beverages from Mexico as a potential probiotic source, *Annals of Microbiology*, 67, 577-586. DOI: 10.1007/s13213-017-1290-2
- Rossetti, L y Giraffa, G. (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 135-144. DOI: 10.1016/j.mimet.2005.03.001
- Roumpeka, D., Wallace, R., Escalettes, F., Fotheringham, I. & Watson, M. (2017). A review of bioinformatics tools for bio-prospecting from metagenomic sequence data. *Frontiers in Genetics*, 8 (23), 1-10. DOI: 10.3389/fgene.2017.00023
- Sánchez, A. y Hope, P. (1953). Agave juice, fermentation and chemical composition studies of some species. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1 (3), 246–249. DOI: 10.1021/jf60003a007
- Sánchez, A., Segura, L., Kirchmayr, M., Orozco, I., Lugo, E. & Gschaedler, A. (2015). Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31, 359-369. DOI: 10.1007/s11274-014-1788-8
- Sánchez, A., Terán, J., and Piso, J. (1957). Estudios sobre la microbiología del pulque. -XVIII.- Datos químicos de la fermentación de aguamiel con cultivos puros. *Revista de la Sociedad Química de México*, 1, 167–174.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2015). Pulque, bebida de los dioses. Consultado el 21 de noviembre del 2018.



- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018). Maguey pulquero: el estado de Hidalgo destacó en 2017 con 69.6% de la producción nacional. Consultado el 21 de noviembre del 2018.
- SIAP. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola (2019). <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Consultado el 02 de junio del 2019.
- Starmer, W., Schmedicke, R., & Lachance, M. (2003), The origin of the catus-yeast community. *FEMS Yeast Research*, 3, 441-448.
- Suárez, A. (2017). Microbioma y secuenciación masiva. *Revista Española de Quimioterapia*, 30 (5), 305-311.
- Téllez, P., Peraza, F., Feria, A. & González, A. (2012). Optimización del proceso de fermentación para la producción de tequila, utilizando la metodología de superficie de respuesta (msr). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11 (1), 163-176.
- Theron, J. y Cloete, T. (2000). Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Reviews in Microbiology*, 26 (1), 37-57. DOI: 10.1080/10408410091154174
- Valadez, R., Bravo-Villa, G., Santos-Sánchez, N., Velasco-Almendarez, S. & Montville, T. (2012). The artisanal production of Pulque, a traditional beverage or the mexican highlands. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 4, 140-142.
- Verdugo, A., Segura, L., Kirchmayr, M., Ramírez, P. & Gschaedler, A. (2011). Yeast communities associated with artesanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100, 497-506. DOI: 10.1007/s10482-011-9605-y
- Villareal, S., Enríquez, M., Michel, M., Flores, A., Montañez, J., Aguilar, N. & Rodríguez R. (2019). Metagenomic microbial diversity in aguamiel from two *Agave* especies during 4-year seasons. *Food Biotechnology*, 33 (1), 1-16. DOI: 10.1080/08905436.2018.1547200



## XVII. ANEXOS

### 17.1 Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para recuentos de microorganismos

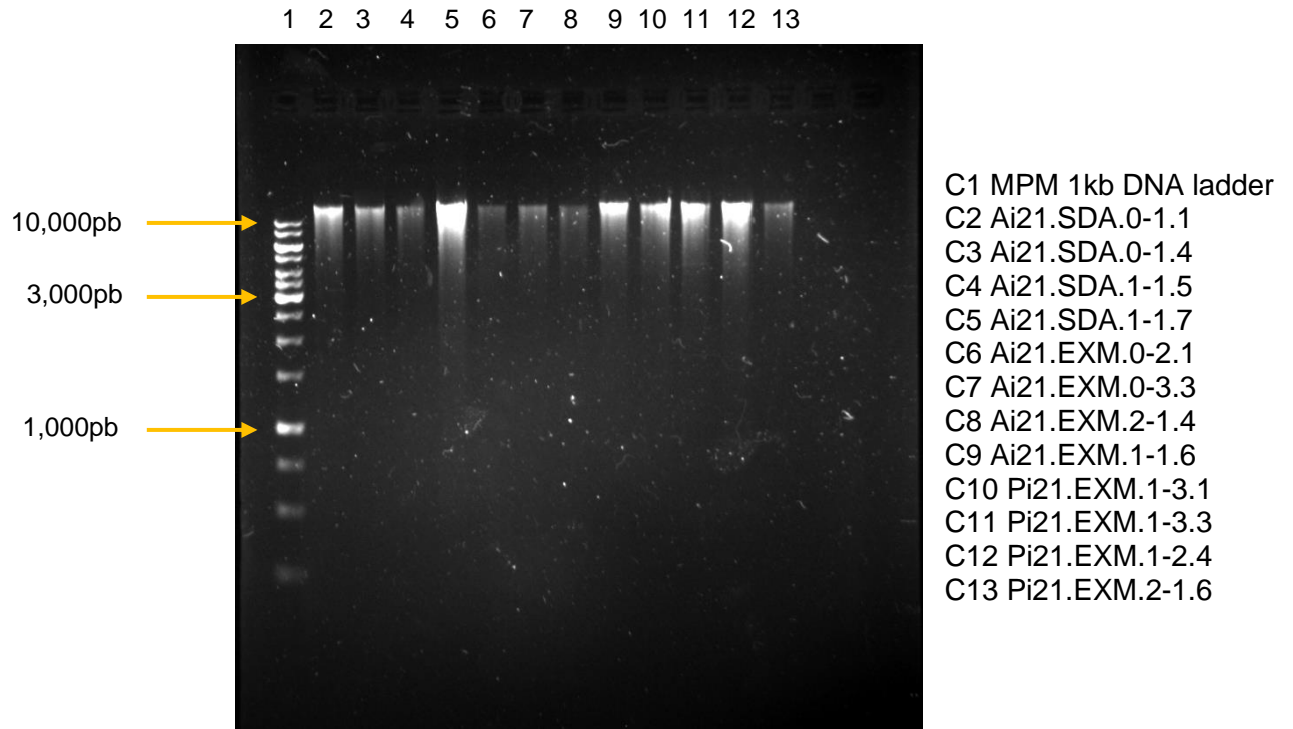
**Tabla 18.** Prueba de Wilcoxon para recuentos de microorganismos en la estación de invierno.

Microorganismo	Variable	Signos	Wilcoxon
Bacterias lácticas	Ai-Pi	0.180	0.020
Bacterias acéticas	Ai-Pi	0.004	0.004
Bacterias mesófilas	Ai-Pi	0.508	0.820
Bacterias coliformes	Ai-Pi	0.004	0.004
Bacterias Gram-	Ai-Pi	0.004	0.004
Hongos y levaduras 1	Ai-Pi	0.004	0.004
Hongos y levaduras 2	Ai-Pi	0.004	0.004

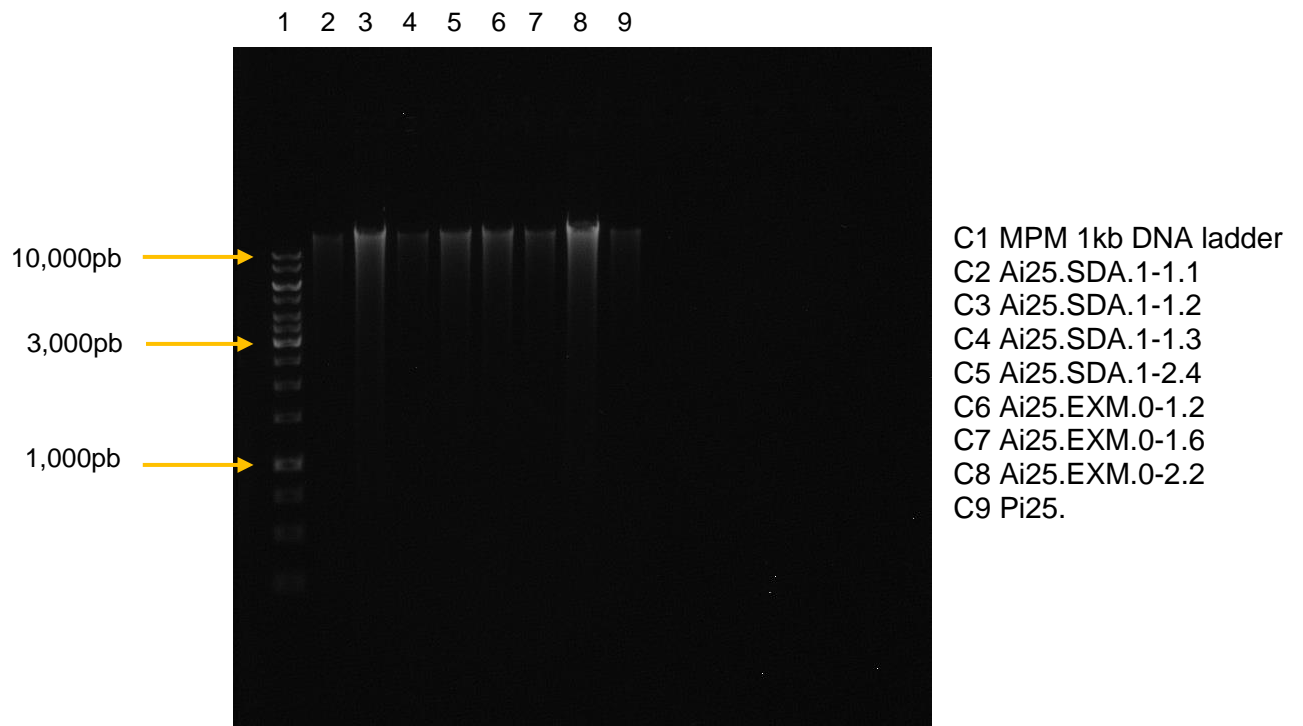
**Tabla 19.** Prueba de Wilcoxon para recuentos de microorganismos en la estación de verano.

Microorganismo	Variable	Signos	Wilcoxon
Bacterias lácticas	Av-Pv	0.508	0.213
Bacterias acéticas	Av-Pv	0.004	0.004
Bacterias mesófilas	Av-Pv	0.004	0.004
Bacterias coliformes	Av-Pv	0.004	0.004
Bacterias Gram-	Av-Pv	0.004	0.004
Hongos y levaduras 1	Av-Pv	0.508	1.000
Hongos y levaduras 2	Av-Pv	0.508	0.910

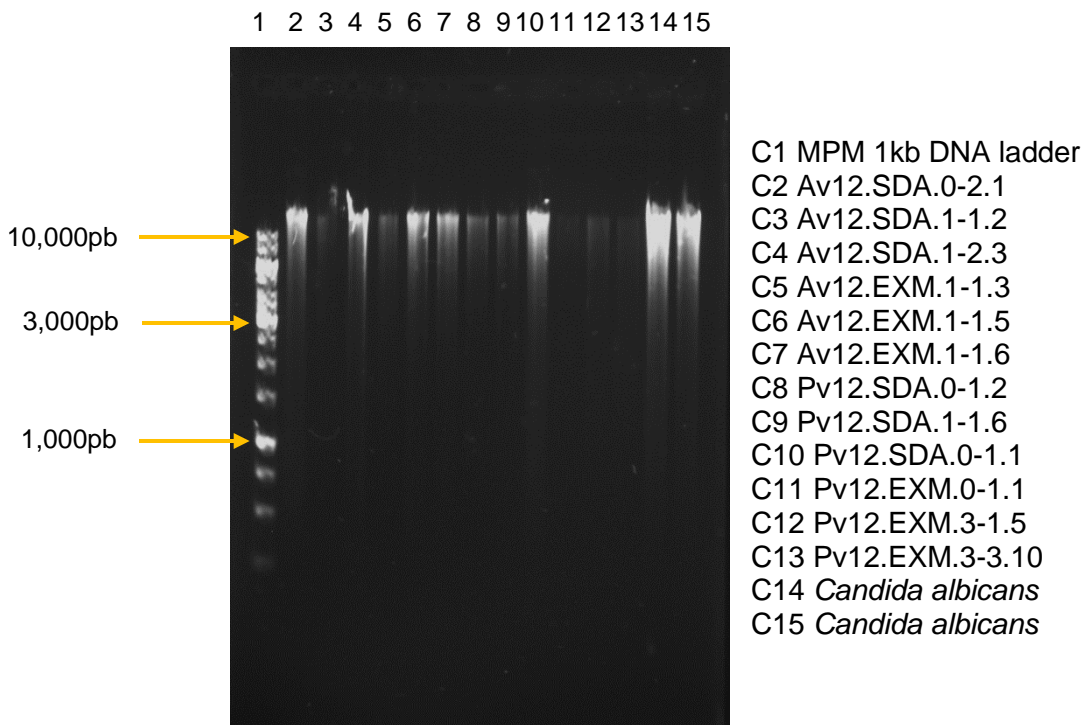
## 17.2 Extracción de ADN de las muestras de levaduras



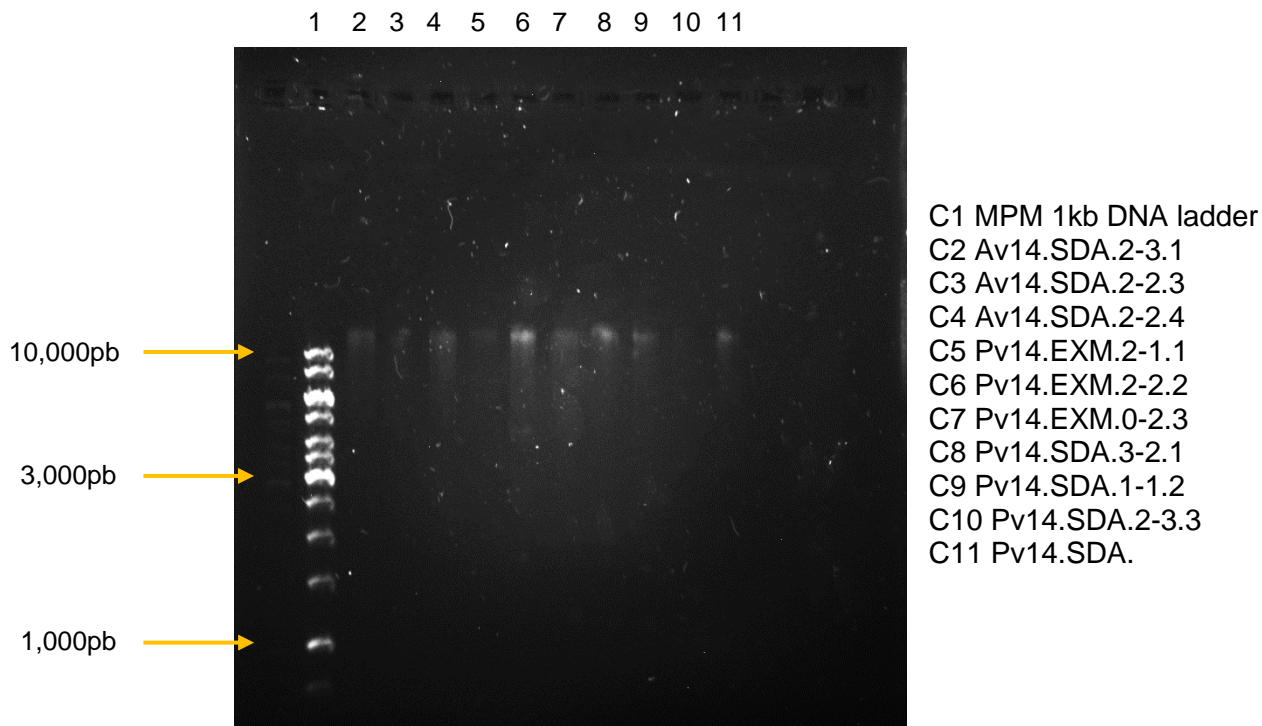
**Figura 23.** Extracción de ADN de las levaduras aisladas de aguamiel y pulque del 21 de Diciembre en gel de agarosa al 1.0%.



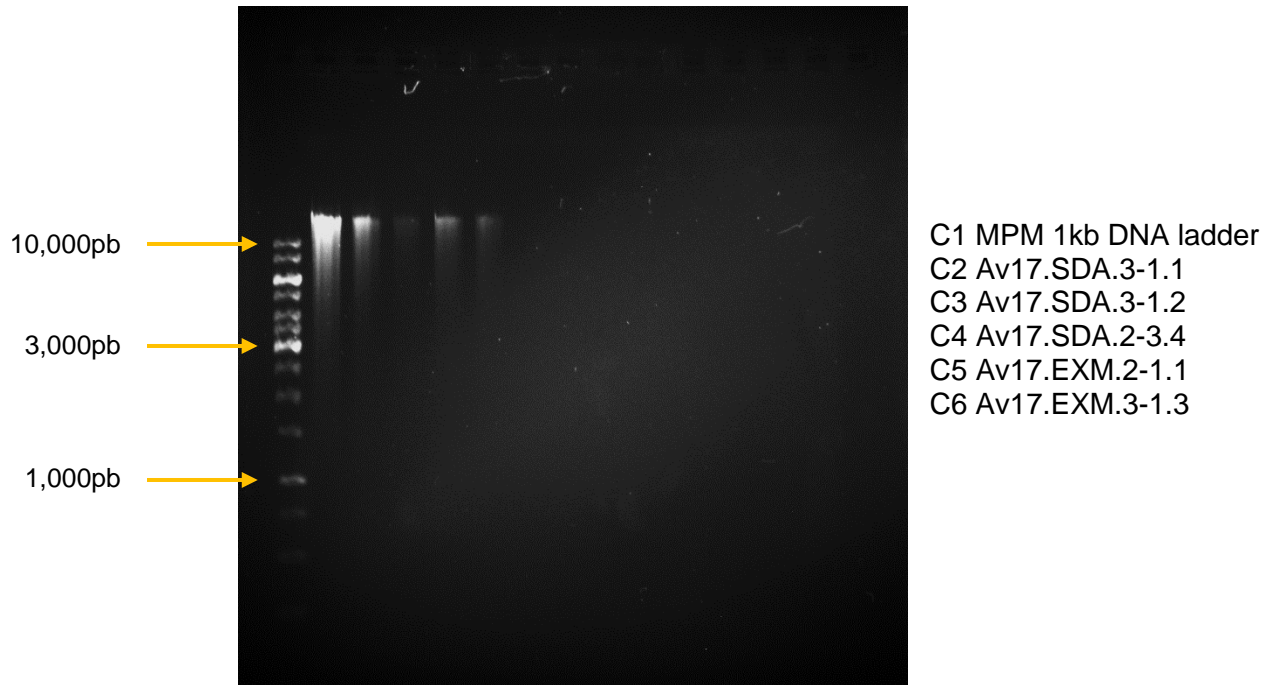
**Figura 24.** Extracción de ADN de las levaduras aisladas de aguamiel y pulque del 25 de Diciembre en gel de agarosa al 1.0%.



**Figura 25.** Extracción de ADN de las levaduras aisladas de aguamiel y pulque del 12 de Julio en gel de agarosa al 1.0%.

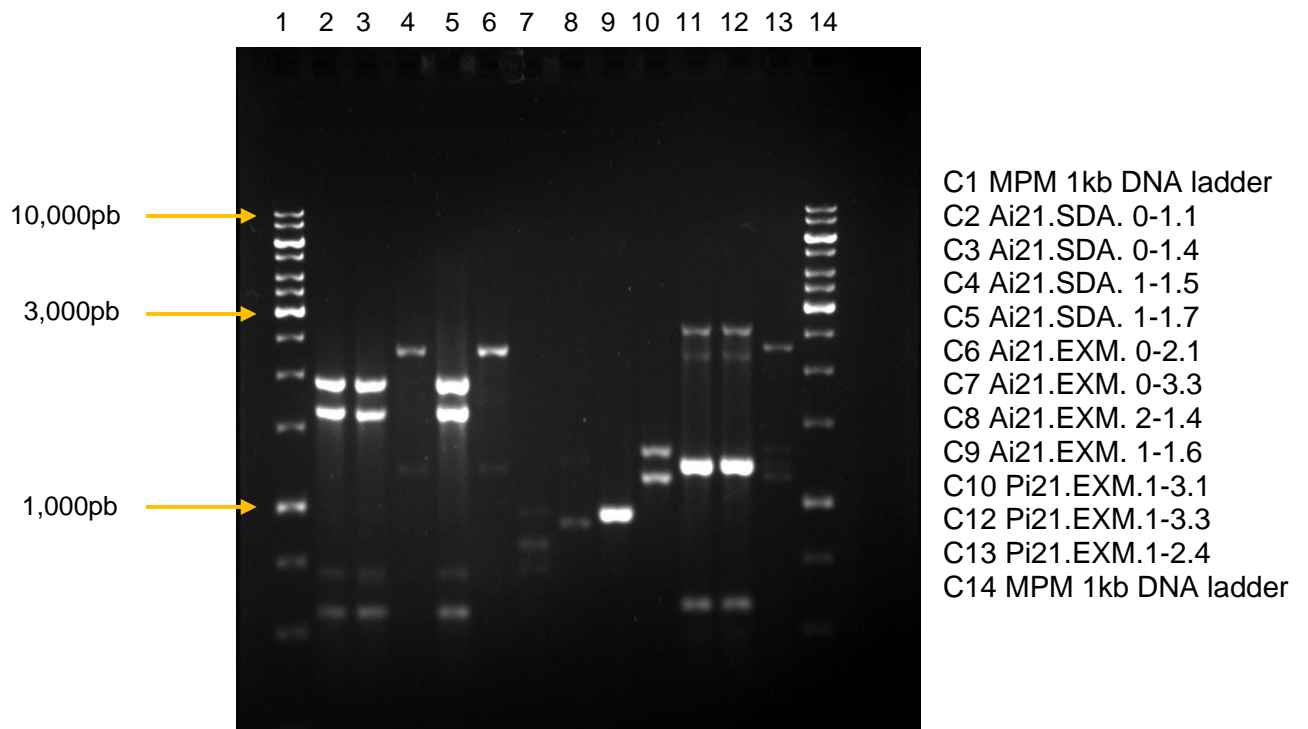


**Figura 26.** Extracción de ADN de las levaduras aisladas de aguamiel y pulque del 14 de Julio en gel de agarosa al 1.0%.

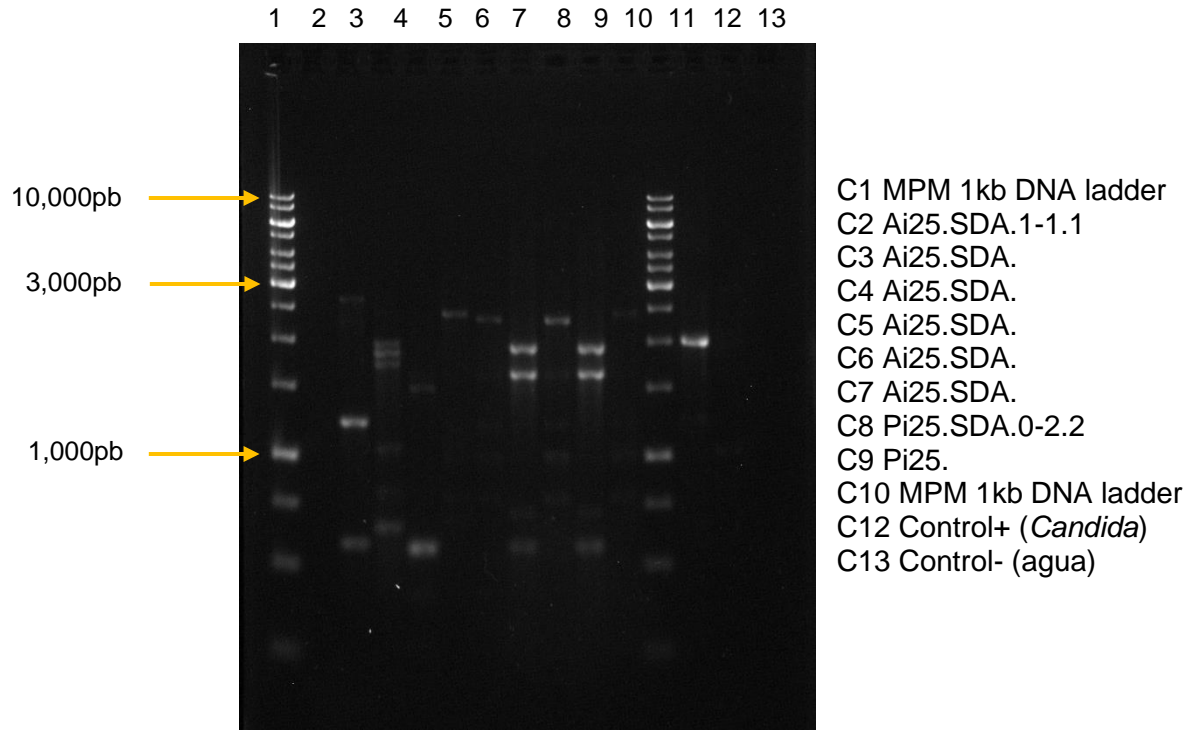


**Figura 27.** Extracción de ADN de las levaduras aisladas de aguamiel y pulque del 17 de Julio en gel de agarosa al 1.0%.

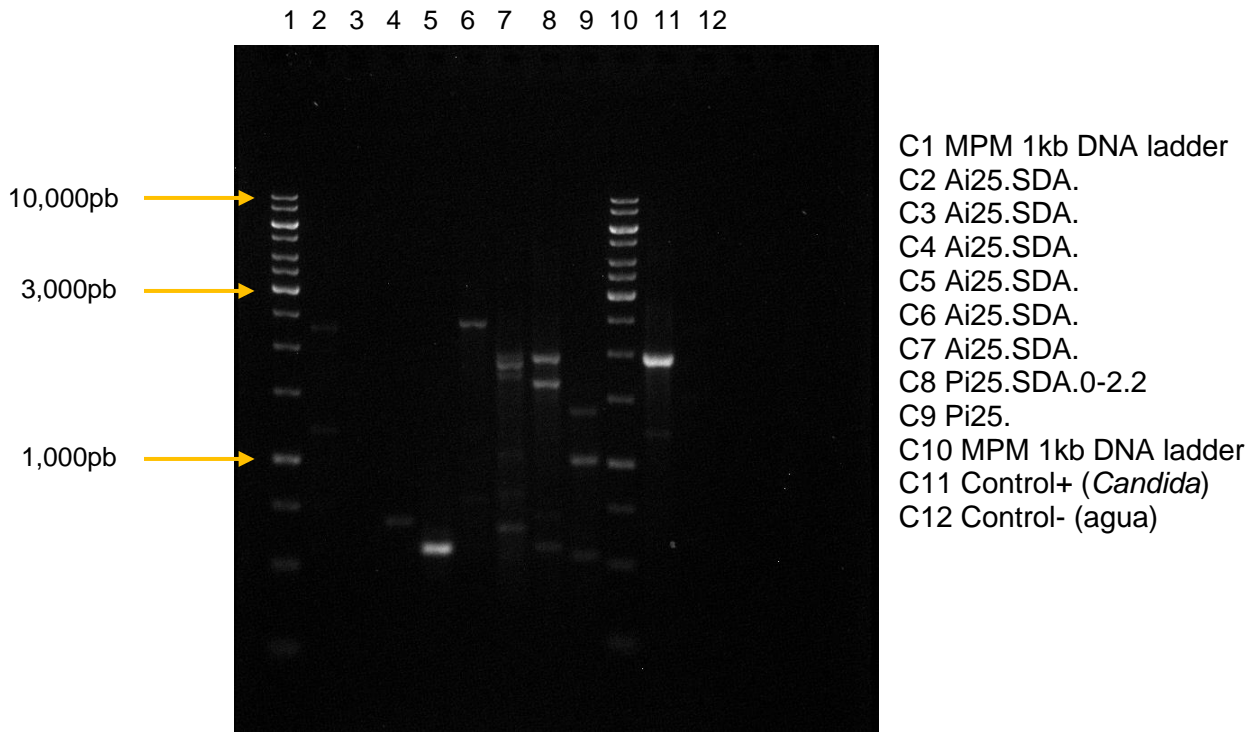
### 17.3 Patrones RAPD de las muestras de levaduras



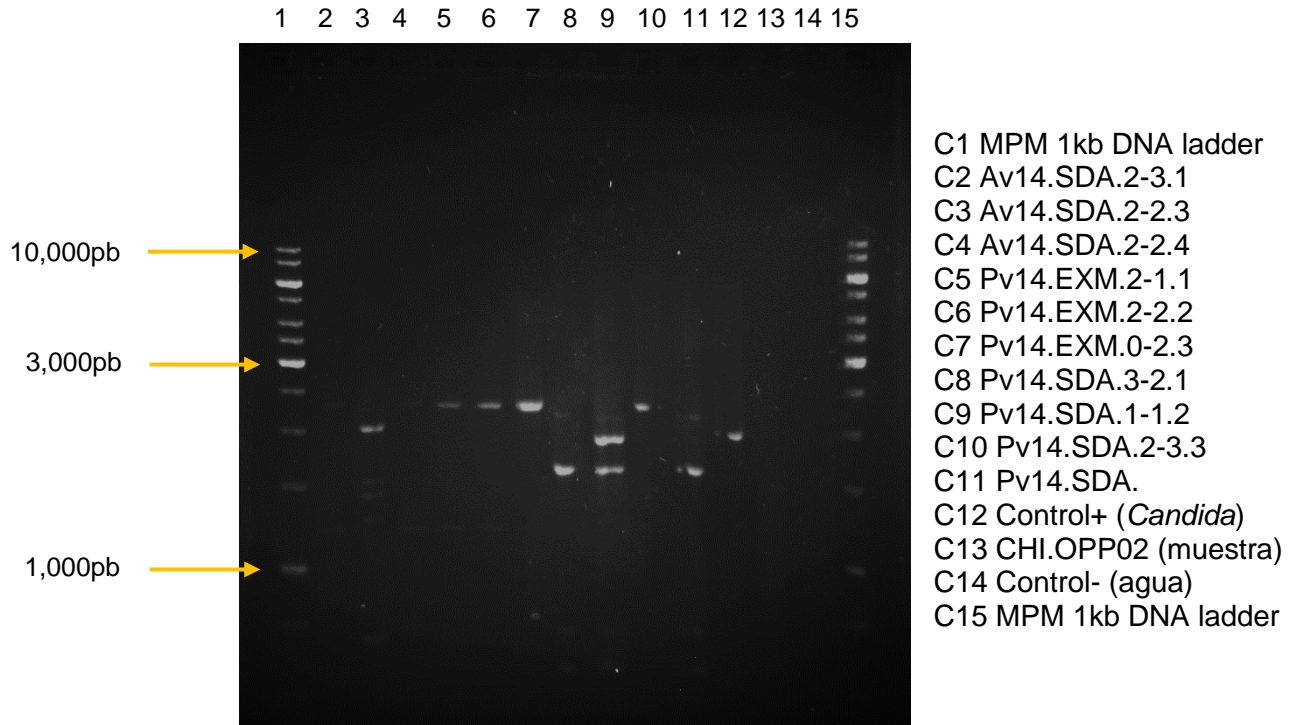
**Figura 28.** Gel de agarosa al 1.5% con el patrón de bandas RAPD para las muestras de ADN de levaduras de aguamiel y pulque del 21 de Diciembre.



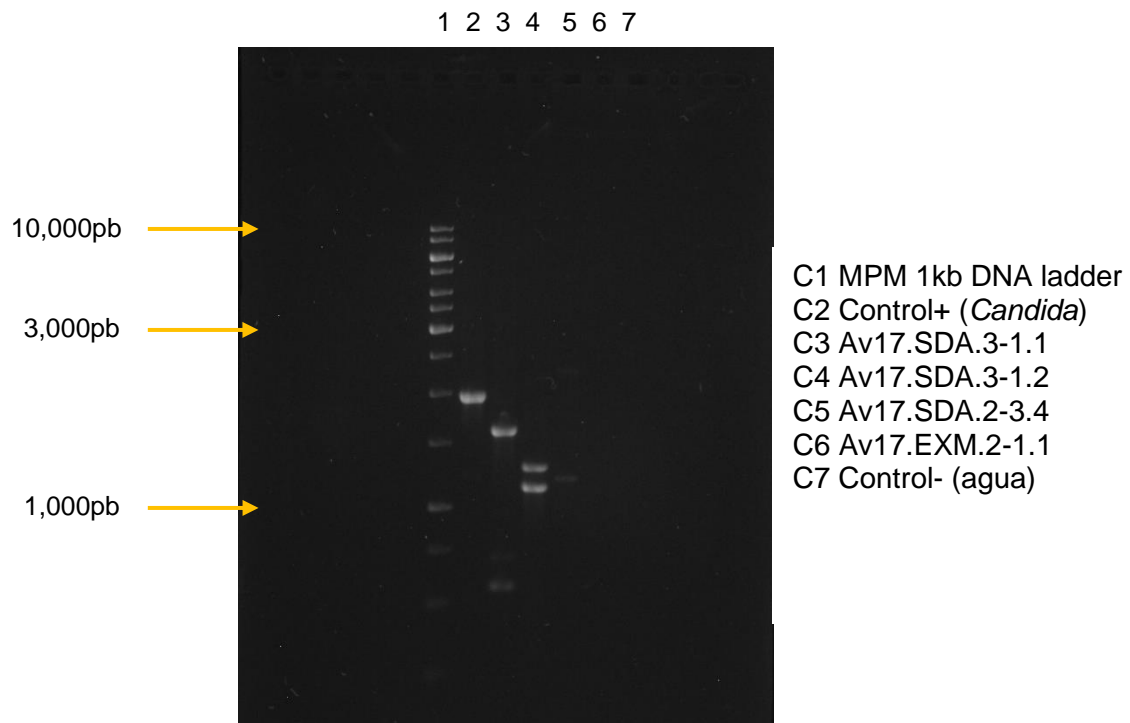
**Figura 29.** Gel de agarosa al 1.5% con el patrón de bandas RAPD para las muestras de ADN de levaduras de aguamiel y pulque del 23 de Diciembre.



**Figura 30.** Gel de agarosa al 1.5% con el patrón de bandas RAPD para las muestras de ADN de levaduras de aguamiel y pulque del 25 de Diciembre.

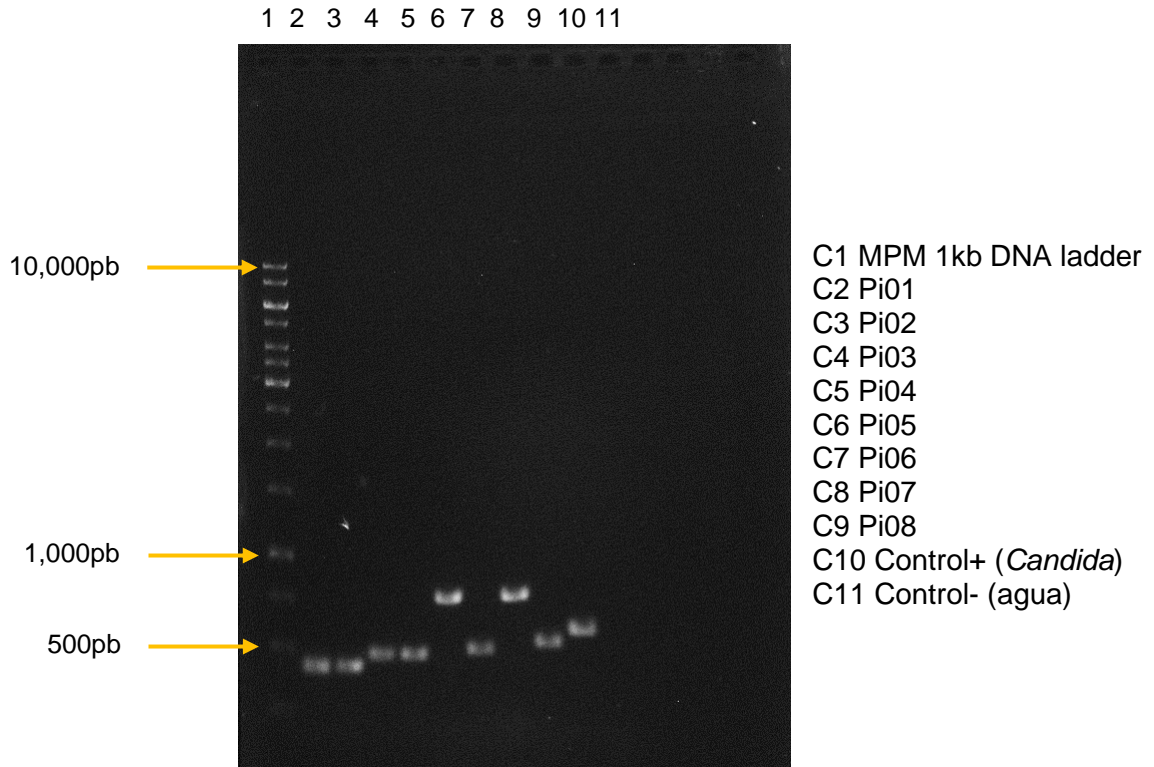


**Figura 31.** Gel de agarosa al 1.5% con el patrón de bandas RAPD para las muestras de ADN de levaduras de aguamiel y pulque del 14 de Julio.

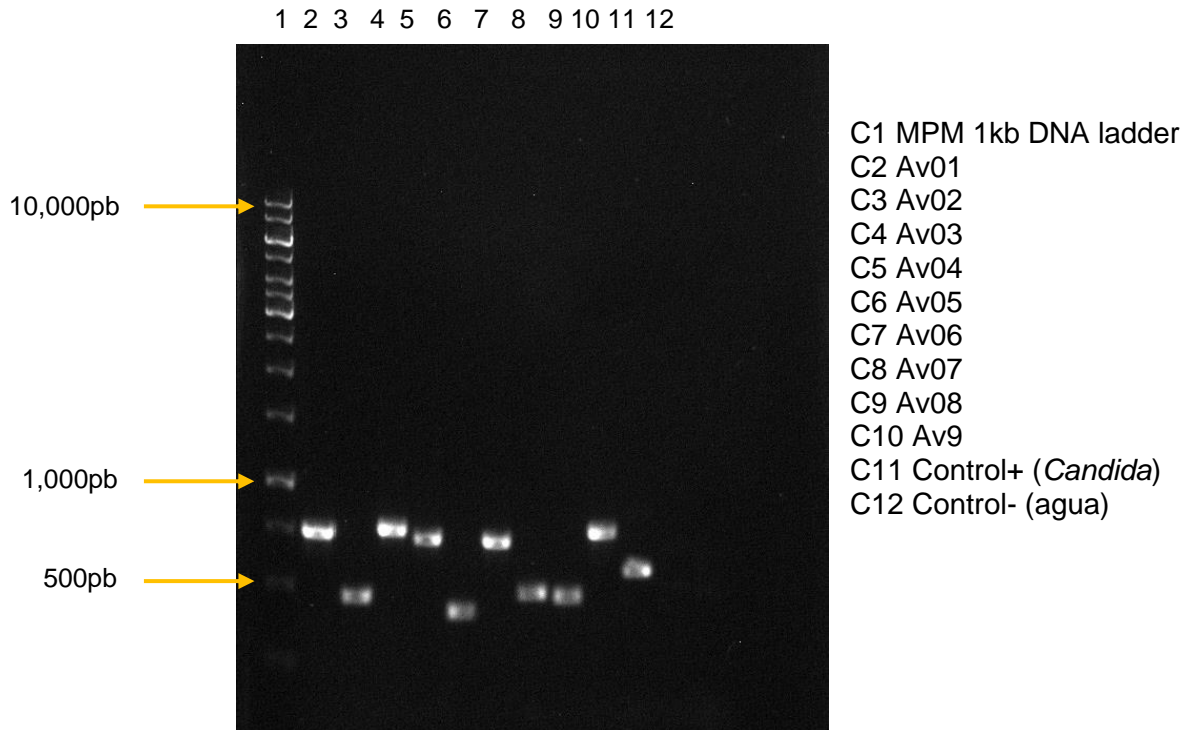


**Figura 32.** Gel de agarosa al 1.5% con el patrón de bandas RAPD para las muestras de ADN de levaduras de aguamiel y pulque del 17 de Julio.

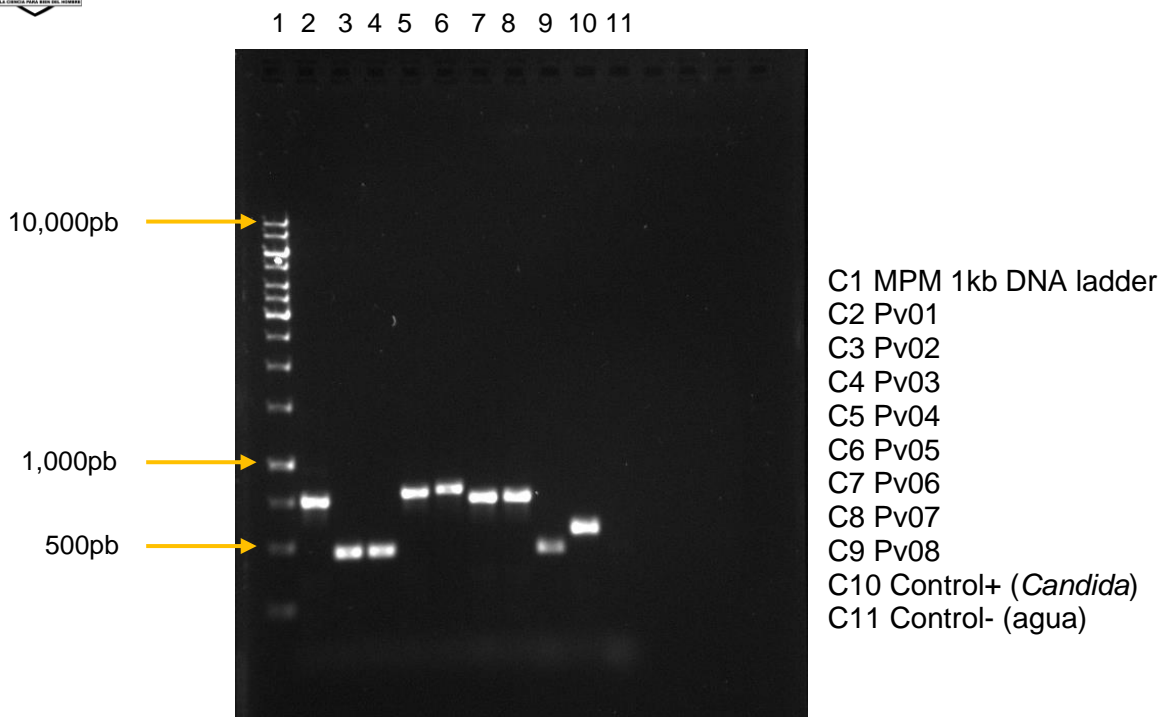
### 17.4 PCR de la región ITS 1-2 de las muestras de levaduras



**Figura 33.** Gel de agarosa al 1.2% con las muestras de amplificación de la región ITS1-2 de las levaduras de pulque invierno.

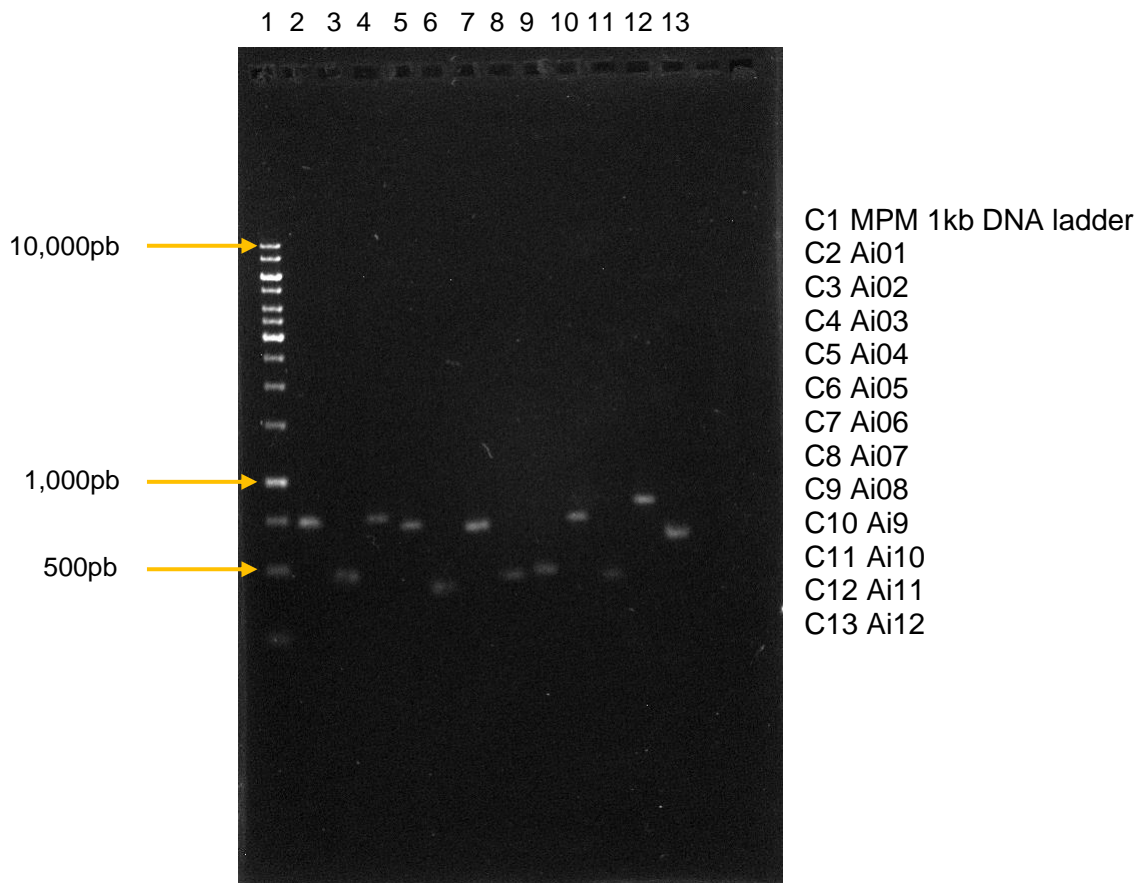


**Figura 34.** Gel de agarosa al 1.2% con las muestras de amplificación de la región ITS1-2 de las levaduras de aguamiel verano.



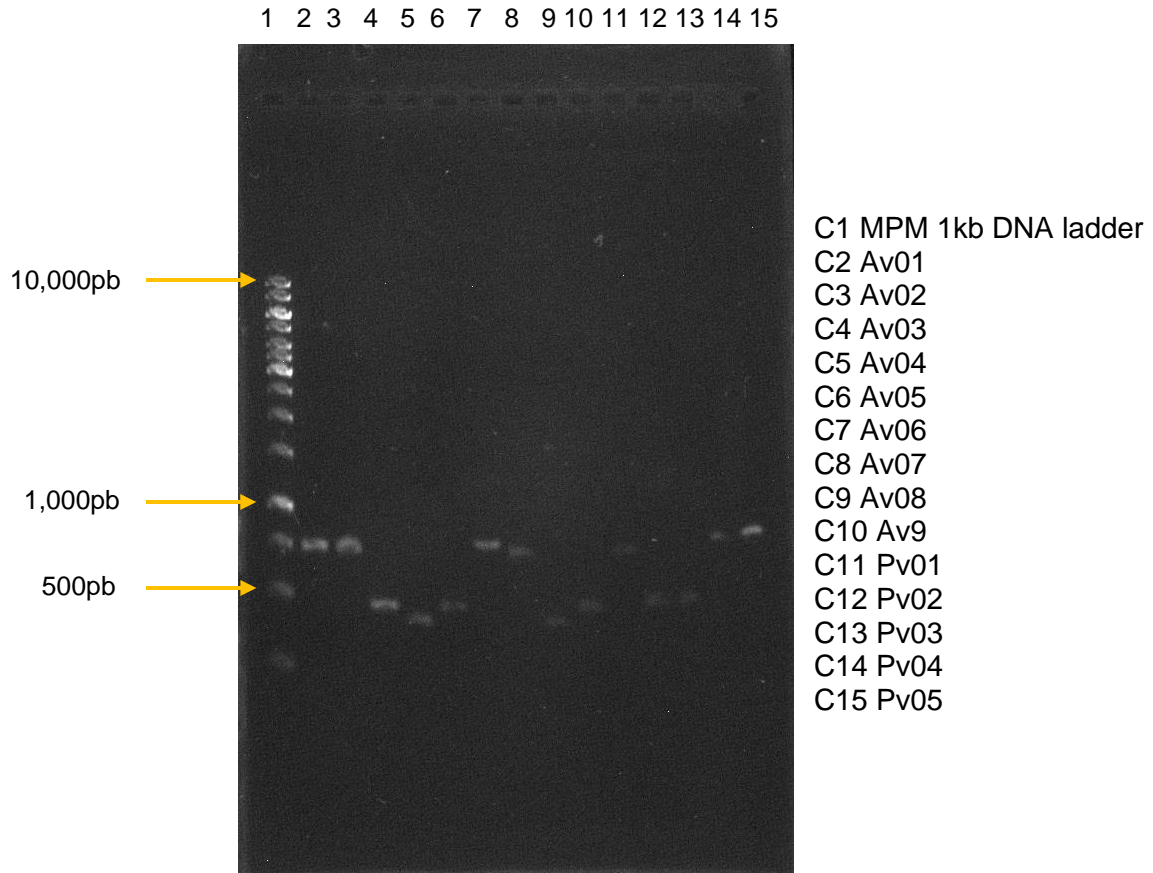
**Figura 35.** Gel de agarosa al 1.2% con las muestras de amplificación de la región ITS1-2 de las levaduras de pulque verano.

### 17.5 Purificación de productos de PCR de levaduras



**Figura 36.** Gel de agarosa al 1.2% con las muestras purificadas de la amplificación de la región ITS1-2 de las levaduras de aguamiel invierno.





**Figura 37.** Gel de agarosa al 1.2% con las muestras purificadas de la amplificación de la región ITS1-2 de las levaduras de aguamiel verano y pulque verano.

## 17.6 Cuantificación de ADN para secuenciación de levaduras

**Tabla 20.** Cuantificación de ADN de las muestras purificadas de levaduras mediante el equipo Nanodrop 2000.

Muestra	ADN (ng/ $\mu$ L)	A260/280	A260/230
Ai01	20.5	1.76	0.09
Ai02	18.8	1.74	0.1
Ai03	20.7	1.8	0.06
Ai04	21.8	1.65	0.07
Ai05	19.9	1.86	0.04
Ai06	23.1	1.71	0.06
Ai07	20.5	1.76	0.09
Ai08	20.5	1.72	0.16
Ai09	23.6	1.84	0.03
Ai10	12.7	1.7	0.09
Ai11	24.0	1.72	0.19
Ai12	20.4	1.72	0.16
Av01	23.9	1.7	0.22
Av02	24.3	1.84	0.05
Av03	23.9	1.79	0.06
Av04	20.6	1.85	0.04
Av05	17.9	1.66	0.16
Av06	16.7	1.76	0.11
Av07	13.4	1.63	0.1
Av08	19.6	1.74	0.1
Av09	20.9	1.75	0.05
Pi01	20.0	1.74	0.11
Pi02	21.4	1.71	0.19
Pi03	20.1	1.7	0.16
Pi04	20.4	1.71	0.19
Pi05	27.0	2.0	0.03
Pi06	19.6	1.75	0.08
Pi07	25.1	1.8	0.09
Pi08	18.2	1.68	0.07
Pv01	23.2	1.65	0.07
Pv02	15.5	1.61	0.46
Pv03	39.5	1.64	0.06
Pv04	42.9	1.53	0.07
Pv05	15.8	1.73	0.13
Pv06	46.3	1.61	0.08
Pv07	17.6	1.69	0.22
Pv08	28.4	1.64	0.07



## 17.7 Secuencias de nucleótidos de las muestras

>Ai01 Ai09, Av01, Av02, Pi05, Pi07, Pv01, Pv06, Pv07 *Kluyveromyces marxianus*

GATCATTAAAGATTATGAATGAATAGATTACTGGGGGAATCGCCTGAACAAGGCCTGCGCTTAATT  
GCGCGGCCAGTTCTTGATTCTCTGCTATCAGTTTTCTATTTCTCATCCTAAACACAATGGAGTTTTT  
TCTCTATGAACTACTTCCCTGGAGAGCTCGTCTCTCCAGTGGACATAAACACAAACAATATTTTGT  
ATTATGAAAACTATTATACTATAAAATTTAATATTCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTC  
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATATGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCAA  
ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCT  
CTCAAACCTTTGGGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTCTAGGGTAACTTGAAAGTGGCTAGCCGTT  
GCCATCTGCGTGAGCAGGGCTGCGTGTCAAGTCTATGGACTCGACTCTTGACATCTACGTCTTA  
GGTTTGCGCCAATTCGTGGTAAGCTTGGGTCATAGAGACTCATAGGTGTTATAAAGACTCGCTGG  
TGTTTGTCTCCTTGAGGCATACGGCTTTAACCAAACCTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGG  
AGTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA

>Ai02, Ai07, Av03, Pv03 *\*Pichia sp., Candida ethanolica*

TCATTACTGTGAACATTTTTCTTCAKCGKGCAGCGCACACAMCMCMAAACRGAATACATTTTT  
ARAAGTTTATTAACACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAARAGCGCAS  
CGAAATGCGATACCTAGKKGKAATTGCAGCCATCGKGAATCATCRAGTTCTTGAACGCACATTGC  
GCCCCGTCGGTATTCGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCGTTTCCTTCTTGACGACRAGAGTT  
GCGCARAGCTGGCCCGGCCACGGCCCCGCCRAAAARAAACRAGGGCACRAGCGAACTARAACA  
GGACGCTKGGGGCCTCARAGCACACAACGAGCTCRACCTC

>Ai03 *\*Kazachstania gamospora*

CTGCGGAAGGATCATTAAAGATTTAAAATAATTTGGAGACGTTTGTTTAGAGAGAGATTGGTAAT  
GGGACAGCCTGCGCTTAACTGCGCGTTGGACTGAGACTGGTTGTTAATTTCTTTAGGCGTGTTT  
CTATATTACACTACTGTGGAGTTTTTTTTCTTTACAACCTATTTTTTTTTCTTTGGGCTTTTGGCCCA  
GAGTGACAAACACAAACAATTTTGTAAATTTTACAAGTCAATCATGCTTTTTATTAAGCAAACCA  
AAATATTCAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC  
GATACGTAATGTGAATTGCAGAATCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTG  
GTTCTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCAAACAACCTTGTGGTTGTGAGT  
GACACTCTGTTTATGCAGAGTTAACTTGAATTTGTTAGCTGTTTAGATTTTTGTCTAAATTCAATTC  
CCAAAAGGATATTCTCAGTGAGAGTTGATTTTTTGTGCTATTAGGTTTTACCAACTTCGACGGTGAT  
CAGTCTTGAGCTTTGGATGTTAAAGTTCTCTTGGTGAAGATGTTTTTACAAACCAGTCTTGGCGAA  
CAATACTCTTTAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA

>Ai04 *Candida boidinii*

GATCATTACAGAATCTCTTCTAAAGTTTTGCTGTGAGTAACTATTCTAGCGCTGCTGAAATATTGCG  
TGCGCGGTTTGTGCTTGTGGTAACTCTTTRGGAAAACCTCTATACACTTTGTTTTCTTATTAGAGAC



AAAATTGCTTTGGTCAGATGTGCGTAAAACCACGACTGATCAGAGATTAATAAAACTCACTTTTGT  
TTTCGGACAAAAACGTGTATTATTCATAGTCAAACCTTGAAGCTATTCTTTATTGAATTGCTGAAC  
TAACTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAGTGCG  
ATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATATTGCGCCCTCTGG  
TATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCATATCCCTAGGATGTGGTGATGAAC  
GAYACTTTCGCAAGAAAGTCCGTTTGAATGAATTGGCACGAGTCTTTCGACAGATTGATGCTATG  
TTTTCAATGTATTAGGTTTACACCATCGTTGATTGTAGTATTGGRCTGTTGGAGTTATGGGCTTTGC  
TTACAACTTTACCTTAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAG  
CATATCA

>Ai05, Pi02 \**Clavispora opuntiae*, *Candida intermedia*

TCATTAATATAAACATTTACACATTGTTTTTGATAACACAACAMCCTAATATTTTTTATTCAACTTTTT  
AAAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCG  
ATACGTAGTATGACTTGCAGACGTGAATCATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTCGAGGTATT  
CCTCGAGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGGCTTACTTCAAACCTCAGGTTTGGTTTTGCCCATGAAAT  
ATTACTGCCGTGTATCTAAGCTTACACCGCAACTACAATTTGCCCTCAAATCAGGTAGGACTACC  
CGCTGAACTTAAGCATATCAATAAG

>Ai06 \**Wickerhamomyces bovis*

TCATTATAGTATTTGCCAGCGCTTCGGTGCGCGGCGATTCTACACGCTTGTGTAAGCTTTTGAAT  
TTGCTTTGGGCTGTGCGGGGCGAGTTAGCGAGCGTTAGCGAGCTAGTGAGCCTGGCGAGCCTG  
GCGTGTCTAGGCACCCAGCCCAGAGATTTTAAACACAGAGATTTATTCTTTCTAACCACAGTCATA  
ACCAGAATACAAATATTCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGC  
AGCGAATTGCGATAAGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT  
GCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAGGCGCTGCCTAG  
CTGTCCGAGCCTAGCAATAGGCGGAGACCCCGCGCAGCGCCCGGTATTGAGTGATACTCCGCC  
AGGGTTAACTTGAATAAGATTTTGGCAAGAGTGTGCTAGGCGCAGCTTGGGCCAGTGTAATGT  
ATTAGTTTACCAACTCATTAGACTACCCTACCGCAAGTTTATCACCAGCTCGGCCTAAGAACAT  
CTTCATAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC

>Ai10 \**Wickerhamiella pararugosa*, *Candida rugosa*

AATTTAGWCTAATACGAAAAAATCAAACCTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGTATCGATGAA  
GAACGCAGCAAAGSGCGATARATAATGYGAATTGCAKACGTGAATCWTTGAGTTTTTGAACGCMC  
WTTGCACCTCTTTGGAGGWATACTTGKGTGAGCGYCATTTTTTTCYCCACATATATMTTAKTGWW  
AATGGTTCACTATATGGAAGTAAAAAGATWATACRCWGTTGTTAGACACAAGCTGTGGAAATTATC  
AAATTTTGACCTCWTATCAAGTAAGATCACCCGCTGAACTTAAGCATATCARTAASCGGAGGA

>Ai11 *Candida sonorensis*

GACCTGCGGAGGATCATTACAGTATTCTTTTCAGGCTGAATTGGCATTGAGCTTTCTGCTATAGGA  
GTGCTGGGTGTTTACAGACTGCGCTGCTGAAATATTGCGTGCGCGGACTGTTGCCTGGTATTCTG



GAAAGTGAGACGTCTTTTCATCAAGGCTTGAAAAACCTCCTTCTACACTTTGTTTTCTTATTAGAGA  
CAAATTTGCTTTGGCTAGTAGCTGCGTAAAAACAGCGGTCTAGCCAGAGGTTTTCAAACAAAACCTC  
TTGTTTTAATATTCTTTTCTTCACGGGAAGAGTATGGAACGTGATAATTTATTATAATTTAGTCATT  
AAATTAAGGACGCAAGTTCTAACTAAAAATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTCGC  
ATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATTGAAT  
CTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCCTC  
TCAAACCCTTTTTTGGGTCTGGTGATGAGTGATACTGCTGGCTGGGTTTGTTTTACAGACCGAGCA  
GGCAGTTCATTTGAAATGCATTGGCATGAGTTTTTGTTCACAAGCTATAATTGTTTATTCAATGTA  
TTAGTTTTATCCATCGTTGTAGAAGCAGTTAGAGCGTGTGGCAAAGTTTTGGCTCTGCCTAACAA  
ACTTTTTATTTAATCATAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATC

>Ai12 *Rhodotorula mucilaginosa*

CTGCGGAGGATCATTAGTGAATATAGGACGTCCAACCTTAACCTGGAGTCCGAACTCTCACTTTCTA  
ACCCTGTGCACCTGTTTGGGATAGTAACTCTCGCAAGAGAGCGAACTCCTATTCACTTATAAACAC  
AAAGTCTATGAATGTATTAATTTTATAACAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGCTCTCG  
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA  
TCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCAATACT  
TCAACCCTCCTCTTTCTTAATGATTGAAGAGGTGTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCCTTACGGT  
CTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCGCAATCGAACTTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTAT  
TCGCTGAGGAATTCTAGTCTTCGGATTAGAGCCGGTGGTTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAAT  
GTCTACATTTTAAGATTAGATCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATA

>Av04, Pi01 \**Clavispora lusitaniae*, *Candida intermedia*

GATCATTAAAAAATATTATACACTTTGCATTTGCGAACAAAAAATAAWTTTTTTTTATTTCGAATATTT  
TAAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCG  
ATACGTAGTATGACTTGCAGACGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCTCGAGGCATT  
CCTCGAGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGCATCCCCTCTAACCTTTGGTTAGGCGTTGCTCCGAAAT  
ATCAACCGCGCTGTCAACACGTTTACAGCACGACATTTCCGCCCTCAAATCAGGTAGGACTACCCG  
CTGAACTTAAGCATATCAATAGCCGGAGGA

>Av06, Pv04 *Zygosaccharomyces bailii*

CTGCGGAGGATCATTATAGAAATTTCTGATTGACGAGTCTGGAGTAGTTGTGTCTCTCTGTTTTT  
TCAAGGCCTGCGCTTAATTGCGCGGTCTAKAGCGGAGGGAGTTAAGCATAGTTMCTCTGGCTTTC  
AATTTACACACAGTGGAGTTTCTACTTTTTTTTATTCTTCTTTGGGAGGATGGGTTTCGTTCCACTCCC  
AGAGGTAAAAACACAAACAATTTTTTTTTTTTTTTTTTAAWWTTACMCAGYCAAAAACRAATMCTAAA  
AAACAAAATWTTCAAAAYTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCSCATCRATRAAAAACSCASCRAA  
ATGCGATACGTAATGKGAATTGCAAATTCCGKGAATCATCRAATCTTTRAACSCMCWTTGSSCCC  
CTTGGTWTTCRRGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCWTTTCTTCTCAAACWTTGCGGTTTTGGWA  
GKGAGKGATATTCTGTTTTTCTMTTGGGTTAACTTGAAATTGCAAGCCTTTGGGGAACSCGKKGK



GGKGAKTTTTAGGCGGAAACGTYTTGCTCTCCTCTTTCCTAACCAAATGTCGWATTAGGTTTTACC  
GACTCCRA

>Pi04 \**Pichia cactophila*, *Candida inconspicua*

GACCTGCGGAGGATCATTACTGTGATTTAACATCTTTACTGCGTGAGCGCACAAACACCTA  
AACATGAATACTTACTAGTCACTAAGAAATCTAAAGAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT  
TCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTRCAGCCATCGTGAATCA  
TCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCTCCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGT  
TTCCTTCTTGCGAAGCAGAGTTGGGGTTGTCACCGTCTTTCGGTGGCTCCCCGAAATGGAACG  
ATTGCGGGCTAGAGAGCGAACTATAAACGCGCGTTCTCCCCGCCGAACTTTTAATCAAGCTCGA  
CCTCAAATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA

>Pi08 *Pichia membranifaciens*

ACCTGCGGAGGATCATTACTGTGATTATACCAACACCACACTGTGTGGGCGCACAAAACACCTAA  
ACCTGGAGTATACACACGTCAACAAAAGATYAAAAGAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG  
TTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATC  
ATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCGCCCGTCCGGTATTCCGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCG  
TTTTCTTCTTGTGCACCGCGGGGTCTTTCAGATCCTCTCTGCGCARAGCTGGCCGKGCCACTGG  
CCCGGCCGAAAAGAAACGTTGCGGACGAAGCGAACTACATCGGGACGCTTTGGCCGCCGAGCG  
AAAAAAAAMCACCATTGAGCTCGACCTCARATCAGGTAGGAGTACCCGCTGAACTTAAGCWTATC  
AAT

>Pv05 \**Moesziomyces aphidis*, *Moesziomyces bullatus*

CTGCAGATGGATCATTTCGATGAAAACCTTTTTCTTGAGGTGTGGCTCSCACCTGTCTAACTAAA  
TCGAGCTACCACATTTAACACGGTTGCATCGGTTGGCTGTCAAACAGTGCGCGCGGCGATTTAT  
TTCGCCTCCCCGCGCATTGCGAGACGGTCGACATTTACCAAAAACACTGTTGATACCATAGGATTT  
GAACGTAGATGAAACTCGACTGGTAATGCGGTCGTCTAAAATCTAAAAACAACTTTTGGCAACGGA  
TCTCTTGGTTCTCCCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAGTG  
AATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCCGCAGATCTAATCTGGGGAGCATGCCTGTTT  
GAGGGCCGCGAATTGTTTGAACGACAGCTTTCTTATTTAGTTGAGAAAGCTGGCGGATCGGTAT  
TGAGGGTCTTGCCATCTTCCACGGTGGCTCCCTCGAAATGCATTAGCGCATCCATTGATAGGCA  
AGACGGACGAAAGCTCGTTATTTGCCCCACGTCTTCCCTGCCGGTTTTTGATAATATCAGGACTT  
CGGAGAGGAGAGGCGCAGGGTCGAGGAGCTGGACGCGACGTTTTGCTGGTTGGAGTGCTTCTG  
AACCCCGCCCATGCCTCCCCTTCTTCGGAAGGAGAGGAAGGGATTTAATTTCAATTCATCGGCCT  
CAGATTGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCATAR

## 17.8 Extracción de ADN para metagenoma

**Tabla 21.** Cuantificación de ADN de las muestras para metagenoma mediante el equipo Nanodrop 2000.

Muestra	ADN (ng/μL)	A260/280	A260/230
Ai21	109	1.88	1.59
Ai23	66	1.91	2.11
Ai25	136.2	1.88	1.86
Av12	216.5	1.86	1.37
Av14	149.8	1.86	2.17
Av17	60.3	1.88	1.3
Pi21	112.9	1.91	2.13
Pi23	141.3	1.91	1.9
Pi25	82.5	1.91	2.0
Pv12	108	1.87	1.83
Pv14	152.8	1.9	2.2
Pv17	90.6	1.93	2.12

## 17.8 Determinaciones químicas

**Tabla 22.** Parámetros definidos para aguamiel (NMX-V-022-1972) y pulque (NMX-V-037-1972) según Normas Mexicanas.

Determinación/ Producto	Aguamiel	Pulque
pH	6.6-7.5	3.7-4.2
Proteína	3.0 g/L	N/A
Azúcares reductores	80.0-120.0 g/L	1.0-8.0 g/L
Grado alcohólico	N/A	6.0-9.0%

**Tabla 23.** Comparaciones múltiples de Nemenyi para la determinación de pH.

Muestra	Frecuencia	Suma rangos	Media rangos	Grupos	
Ai	9	33.000	3.667	A	
Av	9	24.000	2.667	A	B
Pi	9	16.500	1.833		B
Pv	9	16.500	1.833		B

**Tabla 24.** Comparaciones múltiples de Nemenyi para la determinación de acidez total.

Muestra	Frecuencia	Suma rangos	Media rangos	Grupos	
Pi	9	33.000	3.667	A	
Pv	9	30.000	3.333	A	
Av	9	15.000	1.667		B
Ai	9	12.000	1.333		B



**Tabla 25.** Comparaciones múltiples de Nemenyi para la determinación de proteínas.

Muestra	Frecuencia	Suma rangos	Media rangos	Grupos		
Av	9	32.000	3.556	A		
Ai	9	31.000	3.444	A	B	
Pv	9	17.000	1.889		B	C
Pi	9	10.000	1.111			C

**Tabla 26.** Comparaciones múltiples de Nemenyi para la determinación de azúcares reductores.

Muestra	Frecuencia	Suma rangos	Media rangos	Grupos		
Av	9	35.000	3.889	A		
Pv	9	27.000	3.000	A	B	
Pi	9	16.000	1.778		B	C
Ai	9	12.000	1.333			C

**Tabla 27.** Comparaciones múltiples de Nemenyi para la determinación de azúcares totales.

Muestra	Frecuencia	Suma rangos	Media rangos	Grupos		
Av	21	76.000	3.619	A		
Ai	21	71.000	3.381	A		
Pv	21	41.000	1.952		B	
Pi	21	22.000	1.048		B	





## 17.9 Análisis de componentes principales

**Tabla 28.** Valores propios de los componentes principales para aguamiel.

	CP 1	CP 2	CP3
Valor propio	4.207	1.778	0.014
Varianza	70.126	29.641	0.233
Varianza acumulada	70.126	99.767	100
pH	-0.5334	-0.46108	0.13101
Acidez	-0.78414	-0.48014	0.12428
Proteínas	<b>-0.84245</b>	<b>-0.49813</b>	0.16133
Azúcares totales	<b>8.3953</b>	0.80966	<b>0.45257</b>
Azúcares reductores	<b>0.2395</b>	-0.28439	<b>-1.0867</b>
Bacterias lácticas	-0.60126	-0.40469	-0.040706
Bacterias acéticas	-0.46184	-0.44586	-0.059251
Bacterias mesófilas	<b>0.33574</b>	-0.18061	<b>-1.0904</b>
Bacterias coliformes	<b>-0.84786</b>	<b>-0.4968</b>	0.16534
Bacterias Gram-	0.113	<b>1.9441</b>	<b>1.087</b>
Levaduras 1	-0.79577	<b>2.2067</b>	-0.048594
Levaduras 2	<b>-0.9312</b>	<b>1.8368</b>	-0.11308
Secuencias bacterias	-0.21537	-0.38196	-0.16548
Chao 1 bacterias	-0.21537	-0.38196	-0.16548
Shannon bacterias	-0.81211	-0.49314	0.12354
Simpson bacterias	-0.83193	-0.49645	0.14218
Secuencias levaduras	0.18325	-0.39053	0.058086
Chao 1 bacterias	0.18565	-0.41332	0.058272
Shannon levaduras	-0.76486	-0.49221	0.12033
Simpson levaduras	-0.81485	-0.49605	0.14577

**Tabla 29.** Valores propios de los componentes principales para el pulque.

	CP 1	CP 2	CP3
Valor propio	4.10	1.194	0.706
Varianza	68.331	19.909	11.76
Varianza acumulada	68.331	88.24	100
pH	-0.3844	-0.23631	-0.36387
Acidez	-0.17228	-0.25312	-0.37627
Proteínas	-1.3895	-0.63391	-0.42829
Azúcares totales	<b>5.5662</b>	-0.35357	<b>2.9534</b>
Azúcares reductores	-0.057859	-0.62438	0.20129
Bacterias lácticas	<b>-0.91209</b>	<b>3.063</b>	<b>2.1125</b>
Bacterias acéticas	<b>-0.63744</b>	-0.59572	-0.090508
Bacterias mesófilas	0.63284	<b>1.7325</b>	-0.66309
Bacterias coliformes	-1.4008	-0.63712	-0.43094
Bacterias Gram-	-1.403	-0.63829	-0.43045
Levaduras 1	-1.0845	-0.56074	0.056426
Levaduras 2	-1.0044	-0.55538	0.15293
Secuencias bacterias	<b>3.1557</b>	1.1047	-0.14954
Chao 1 bacterias	<b>3.1557</b>	1.1047	-0.14954
Shannon bacterias	-1.0344	-0.50265	-0.38967
Simpson bacterias	-1.2379	-0.57466	-0.4145
Secuencias levaduras	0.37322	0.16194	-0.37155
Chao 1 bacterias	0.37322	0.16194	-0.37155



Shannon levaduras	-1.2293	-0.56313	-0.42179
Simpson levaduras	-1.3091	-0.59968	-0.42505

### 17.10 Correlación de Spearman para las variables

Tabla 30. Correlación de Spearman para muestras de aguamiel.

	pH	Acidez	Proteínas	Azú. totales	Azú. reductores
Acidez	-0.899				
	0.015				
Proteínas	0.657	-0.406			
	0.156	0.425			
Azú. totales	0.257	0.029	0.371		
	0.623	0.957	0.468		
Azú. reductores	-0.429	0.551	-0.486	0.143	
	0.397	0.257	0.329	0.787	
Bac. lácticas	0.257	-0.203	0.714	-0.143	-0.314
	0.623	0.700	0.111	0.787	0.544
Bac. acéticas	-0.371	0.145	-0.257	-0.943	-0.257
	0.468	0.784	0.623	0.005	0.623
Bac. mesófilas	-0.754	0.544	-0.696	-0.551	0.580
	0.084	0.264	0.125	0.257	0.228
Bac. coliformes	0.464	-0.618	0.493	0.029	-0.928
	0.354	0.191	0.321	0.957	0.008
Bac. Gram-	0.257	-0.493	0.371	-0.371	-0.886
	0.623	0.321	0.468	0.468	0.019
Hongos-levaduras 1	-0.371	0.522	0.029	0.657	0.486
	0.468	0.288	0.957	0.156	0.329
Hongos-levaduras 2	-0.600	0.812	-0.200	0.314	0.829
	0.208	0.050	0.704	0.544	0.042
Sec. bacterias	-0.500	0.567	-0.647	0.000	0.971
	0.312	0.240	0.165	1.000	0.001
Chao 1 bacterias	-0.500	0.567	-0.647	0.000	0.971
	0.312	0.240	0.165	1.000	0.001
Shannon bacteria	-0.200	0.406	-0.314	0.429	0.943
	0.704	0.425	0.544	0.397	0.005
Simpson bacteria	-0.200	0.406	-0.314	0.429	0.943
	0.704	0.425	0.544	0.397	0.005
Sec. levaduras	0.870	-0.882	0.319	0.087	-0.522
	0.024	0.020	0.538	0.870	0.288
Chao 1 levaduras	0.886	-0.899	0.371	-0.029	-0.543
	0.019	0.015	0.468	0.957	0.266
Shannon levadura	0.429	-0.116	0.771	0.029	-0.143
	0.397	0.827	0.072	0.957	0.787
Simpson levadura	0.429	-0.116	0.771	0.029	-0.143
	0.397	0.827	0.072	0.957	0.787

**Tabla 30.** Correlación de Spearman para muestras de aguamiel (continuación).

	Bac. lácticas	Bac. acéticas	Bac. mesófilas	Bac. coliformes	Bac. Gram-
Bac. acéticas	0.200				
	0.704				
Bac. mesófilas	-0.029	0.464			
	0.957	0.354			
Bac. coliformes	0.377	0.029	-0.529		
	0.461	0.957	0.280		
Bac. Gram-	0.543	0.429	-0.203	0.899	
	0.266	0.397	0.700	0.015	
Hongos-levaduras 1	0.086	-0.600	0.203	-0.232	-0.371
	0.872	0.208	0.700	0.658	0.468
Hongos-levaduras 2	-0.029	-0.257	0.493	-0.754	-0.714
	0.957	0.623	0.321	0.084	0.111
Sec. bacterias	-0.471	-0.118	0.627	-0.955	-0.883
	0.346	0.824	0.183	0.003	0.020
Chao 1 bacterias	-0.471	-0.118	0.627	-0.955	-0.883
	0.346	0.824	0.183	0.003	0.020
Shannon bacteria	-0.371	-0.543	0.290	-0.841	-0.943
	0.468	0.266	0.577	0.036	0.005
Simpson bacteria	-0.371	-0.543	0.290	-0.841	-0.943
	0.468	0.266	0.577	0.036	0.005
Sec. levaduras	-0.145	-0.203	-0.735	0.471	0.261
	0.784	0.700	0.096	0.346	0.618
Chao 1 levaduras	-0.029	-0.086	-0.696	0.464	0.314
	0.957	0.872	0.125	0.354	0.544
Shannon levadura	0.600	0.086	-0.406	-0.029	0.029
	0.208	0.872	0.425	0.957	0.957
Simpson levadura	0.600	0.086	-0.406	-0.029	0.029
	0.208	0.872	0.425	0.957	0.957

**Tabla 30.** Correlación de Spearman para muestras de aguamiel (continuación).

	Hongos-levaduras 1	Hongos-levaduras 2	Sec. bacterias	Chao 1 bacterias
Hongos-levaduras 2	0.771			
	0.072			
Sec. bacterias	0.324	0.736		
	0.531	0.096		
Chao 1 bacterias	0.324	0.736	1.000	
	0.531	0.096	*	
Shannon bacteria	0.543	0.771	0.883	0.883
	0.266	0.072	0.020	0.020
Simpson bacteria	0.543	0.771	0.883	0.883
	0.266	0.072	0.020	0.020
Sec. levaduras	-0.638	-0.812	-0.478	-0.478

	0.173	0.050	0.338	0.338
Chao 1 levaduras	-0.714	-0.829	-0.500	-0.500
	0.111	0.042	0.312	0.312
Shannon levadura	-0.200	0.029	-0.235	-0.235
	0.704	0.957	0.653	0.653
Simpson levadura	-0.200	0.029	-0.235	-0.235
	0.704	0.957	0.653	0.653

**Tabla 30.** Correlación de Spearman para muestras de aguamiel (continuación).

	Shannon bac.	Simpson bac.	Sec. levaduras	Chao 1 levaduras	Shannon levadura
Simpson bacteria	1.000				
	*				
Sec. levaduras	-0.319	-0.319			
	0.538	0.538			
Chao 1 levaduras	-0.371	-0.371	0.986		
	0.468	0.468	0.000		
Shannon levadura	-0.086	-0.086	0.145	0.257	
	0.872	0.872	0.784	0.623	
Simpson levadura	-0.086	-0.086	0.145	0.257	1.000
	0.872	0.872	0.784	0.623	*

**Tabla 31.** Correlación de Spearman para muestras de pulque.

	pH	Acidez	Proteínas	Azú. totales	Azú. reductores
Acidez	-0.314				
	0.544				
Proteínas	0.029	-0.257			
	0.957	0.623			
Azú. totales	0.143	-0.143	0.771		
	0.787	0.787	0.072		
Azú. reductores	0.600	-0.257	0.543	0.771	
	0.208	0.623	0.266	0.072	
Bac. lácticas	-0.143	0.314	-0.371	-0.829	-0.600
	0.787	0.544	0.468	0.042	0.208
Bac. acéticas	0.257	-0.429	0.657	0.771	0.886
	0.623	0.397	0.156	0.072	0.019
Bac. mesófilas	-0.543	-0.486	-0.257	-0.371	-0.600
	0.266	0.329	0.623	0.468	0.208
Bac. coliformes	-0.493	0.232	-0.522	-0.754	-0.986
	0.321	0.658	0.288	0.084	0.000
Bac. Gram-	-0.293	-0.683	0.098	0.098	0.098
	0.573	0.135	0.854	0.854	0.854
Hongos-levaduras 1	1.000	-0.314	0.029	0.143	0.600
	*	0.544	0.957	0.787	0.208
Hongos-levaduras 2	0.771	0.086	-0.029	0.086	0.657
	0.072	0.872	0.957	0.872	0.156
Sec. bacterias	-0.177	-0.294	-0.147	0.029	0.265

	0.738	0.571	0.781	0.956	0.612
Chao 1 bacterias	-0.177	-0.294	-0.147	0.029	0.265
	0.738	0.571	0.781	0.956	0.612
Shannon bacteria	0.143	-0.486	0.429	0.657	0.771
	0.787	0.329	0.397	0.156	0.072
Simpson bacteria	0.143	-0.486	0.429	0.657	0.771
	0.787	0.329	0.397	0.156	0.072
Sec. levaduras	-0.617	-0.247	0.000	-0.309	-0.309
	0.192	0.637	1.000	0.552	0.552
Chao 1 levaduras	-0.617	-0.247	0.000	-0.309	-0.309
	0.192	0.637	1.000	0.552	0.552
Shannon levadura	-0.486	-0.600	-0.143	-0.257	-0.371
	0.329	0.208	0.787	0.623	0.468
Simpson levadura	-0.143	-0.886	0.314	0.200	0.086
	0.787	0.019	0.544	0.704	0.872

**Tabla 31.** Correlación de Spearman para muestras de pulque (continuación).

	Bac. lácticas	Bac. acéticas	Bac. mesófilas	Bac. coliformes	Bac. Gram-
Bac. acéticas	-0.6				
	0.208				
Bac. mesófilas	0.029	-0.257			
	0.957	0.623			
Bac. coliformes	0.58	-0.928	0.551		
	0.228	0.008	0.257		
Bac. Gram-	-0.293	0.488	0.683	-0.198	
	0.573	0.326	0.135	0.707	
Hongos-levaduras 1	-0.143	0.257	-0.543	-0.493	-0.293
	0.787	0.623	0.266	0.321	0.573
Hongos-levaduras 2	0.086	0.371	-0.771	-0.638	-0.293
	0.872	0.468	0.072	0.173	0.573
Sec. bacterias	-0.177	0.53	0.294	-0.403	0.804
	0.738	0.28	0.571	0.428	0.054
Chao 1 bacterias	-0.177	0.53	0.294	-0.403	0.804
	0.738	0.28	0.571	0.428	0.054
Shannon bacteria	-0.657	0.943	-0.029	-0.841	0.683
	0.156	0.005	0.957	0.036	0.135
Simpson bacteria	-0.657	0.943	-0.029	-0.841	0.683
	0.156	0.005	0.957	0.036	0.135
Sec. levaduras	0.339	0.123	0.617	0.172	0.738
	0.51	0.816	0.192	0.744	0.094
Chao 1 levaduras	0.339	0.123	0.617	0.172	0.738
	0.51	0.816	0.192	0.744	0.094
Shannon levadura	-0.029	0.029	0.943	0.29	0.878
	0.957	0.957	0.005	0.577	0.021

Simpson levadura	-0.371	0.429	0.714	-0.116	0.878
	0.468	0.397	0.111	0.827	0.021

**Tabla 31.** Correlación de Spearman para muestras de pulque (continuación).

	Hongos-levaduras 1	Hongos-levaduras 2	Sec. bacterias	Chao 1 bacterias
Hongos-levaduras 2	0.771			
	0.072			
Sec. bacterias	-0.177	0.147		
	0.738	0.781		
Chao 1 bacterias	-0.177	0.147	1	
	0.738	0.781	*	
Shannon bacteria	0.143	0.257	0.736	0.736
	0.787	0.623	0.096	0.096
Simpson bacteria	0.143	0.257	0.736	0.736
	0.787	0.623	0.096	0.096
Sec. levaduras	-0.617	-0.339	0.652	0.652
	0.192	0.51	0.161	0.161
Chao 1 levaduras	-0.617	-0.339	0.652	0.652
	0.192	0.51	0.161	0.161
Shannon levadura	-0.486	-0.6	0.559	0.559
	0.329	0.208	0.249	0.249
Simpson levadura	-0.143	-0.429	0.441	0.441
	0.787	0.397	0.381	0.381

**Tabla 31.** Correlación de Spearman para muestras de pulque (continuación).

	Shannon bac.	Simpson bac.	Sec. levaduras	Chao 1 levaduras	Shannon levadura
Simpson bacteria	1				
	*				
Sec. levaduras	0.247	0.247			
	0.637	0.637			
Chao 1 levaduras	0.247	0.247	1		
	0.637	0.637	*		
Shannon levadura	0.257	0.257	0.772	0.772	
	0.623	0.623	0.072	0.072	
Simpson levadura	0.543	0.543	0.525	0.525	0.829
	0.266	0.266	0.285	0.285	0.042